



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Iva Jančíková

Studium transportních systémů mikroorganismů

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: 4F4 Biofyzika, chemická a makromolekulární fyzika

Praha 2018

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 18. 6. 2018

podpis

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucí mé disertační práce doc. RNDr. Daně Gáškové, CSc. za projevenou důvěru v moje schopnosti. Nebýt její pomocné ruky a geniálních nápadů, tato práce by nikdy nevznikla. Děkuji jí za nabídnuté příležitosti naučit se něco nového, za její schovívavost a trpělivost s mými začátečnickými chybami a především za pomoc s výsledky našich experimentů.

Dále děkuji Mgr. Jakubovi Zahumenskému, Ph.D. a prof. RNDr. Jaromíru Pláškoví, CSc. za technické i odborné rady a pomoc a za spolupráci při sepisování publikací. Díky vynikající zahraniční spolupráci mohu poděkovat i prof. RNDr. Yvettě Gbelské, CSc. za cenné odborné rady, za její trpělivé odpovědi na moje nezkušené dotazy a za neustálé vědecké výzvy. Děkuji také RNDr. Alexandře Svrbické, Ph.D. za to, že mě zasvětila do správných postupů provádění biologických testů.

Obrovské díky pak patří mému muži Pavlovi za vytrvalou lásku a podporu, kterou mi poskytoval během celého mého studia, a také za vytvoření skriptů, které mi spojovaly výsledky biologických testů do pěkných přehledných obrázků. Neméně děkuji i mé rodině (rodičům a sestře) a blízkým přátelům za trpělivost, podporu a důvěru, které mi vždy projevovali.

Název práce: Studium transportních systémů mikroorganismů

Autor: Mgr. Iva Jančíková

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

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

Abstrakt: Nadprodukce transportních proteinů, které aktivně odstraňují cizorodé látky z buněk, je zodpovědná za fenomén nazývaný mnohočetná léková rezistence (MDR). Zjištění, že potenciometrická fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem hlavních MDR pump u tří druhů kvasinek, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*, nám umožnilo použít diS-C₃(3) fluorescenční metodu pro sledování inhibice činnosti těchto membránových transportérů účinkem různých chemických stresorů (společných substrátů). Z porovnání míry inhibice transportu sondy pumpami ScPdr5p a KIPdr5p vyplynulo odlišné uspořádání jejich vazebné kapsy, které je v případě KIPdr5p těsnější. U kvasinky *K. lactis* jsme dále zjistili, že zatímco delece genu *KIPDR16* neovlivňuje aktivitu KIPdr5p, vede pouze k hyperpolarizaci buněk, delece genu *KIERG6* se projeví jak změnou membránového potenciálu, tak potlačením činnosti KIPdr5p. Skutečnost, že sonda je substrátem nejenom dvou hlavních pump ScPdr5p a ScSnq2p u *S. cerevisiae*, ale také dvou hlavních pump CaCdr1p a CaCdr2p u *C. albicans*, nám umožnila vyvinout efektivní postup pro vyhledávání účinných inhibitorů těchto MDR proteinů. S jeho pomocí se nám podařilo identifikovat látku H, nově syntetizovaný derivát 1,4-dihydropyridinu, účinně inhibující činnost pumpy CaCdr1p. Prokázali jsme, že k úplné inhibici transportu sondy z buněk rezistentních klinických izolátů *C. albicans* je zapotřebí použít látky účinně blokující činnost obou pump CaCdr1p i CaCdr2p.

Klíčová slova: mnohočetná léková rezistence, fluorescenční sonda diS-C₃(3), MDR pumpa, inhibitor, substrát

Title: Study of transport systems of microorganisms

Author: Mgr. Iva Jančíková

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: Assoc. Prof. RNDr. Dana Gášková, CSc., Institute of Physics

Abstract: Overexpression of drug efflux pumps is responsible for a multidrug resistance (MDR). We used the potentiometric fluorescent probe diS-C₃(3), which is a substrate of major MDR pumps in three yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* (*ScPdr5p*, *ScSnq2p*), *Kluyveromyces lactis* (*KIPdr5p*) and *Candida albicans* (*CaCdr1p*, *CaCdr2p*), to monitor inhibition of selected membrane transporters caused by various chemical stressors (diS-C₃(3) assay). The extent of inhibition of probe transport points to a tighter arrangement of the *KIPdr5p* binding pocket compared to that of *ScPdr5p*. Furthermore, we discovered that while deletion of the *KIPDR16* gene does not affect *KIPdr5p* activity, it only caused cell hyperpolarization, deletion of the *KIERG6* gene results in both change in membrane potential and in a suppression of the pump's activity. We developed an effective method to search for inhibitors of MDR proteins of *C. albicans*, which is based on pre-screening their potential to block the probe efflux from *S. cerevisiae* cells. Using this method we identified the substance H, derivative of 1,4-dihydropyridine, which efficiently inhibits the activity of the *CaCdr1p* pump. Moreover, we have shown that stressors that block the activity of both the *CaCdr1p* and the *CaCdr2p* pumps can completely inhibit the probe export from the resistant clinical isolates of *C. albicans*.

Keywords: multidrug resistance, fluorescence probe diS-C₃(3), MDR pump, inhibitor, substrate

Obsah

Úvod.....	1
1 Teoretická část	3
1.1 Kvasinky – prospěšné i nebezpečné mikroorganismy	3
1.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1.2 <i>Kluyveromyces lactis</i>	4
1.1.3 <i>Candida albicans</i>	5
1.2 Plazmatická membrána kvasinek	7
1.2.1 Membránové transportní proteiny.....	8
1.2.1.1 <i>Primárně aktivní transportéry - superrodina ATP-binding cassette (ABC) proteinů</i>	8
1.2.1.2 <i>Sekundárně aktivní membránové transportéry - Major facilitators superfamily (Superrodina MFS)</i>	13
1.3 Membránový potenciál.....	15
1.4 Fenomén mnohočetné lékové rezistence (MDR).....	15
1.4.1 Transportéry <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.4.2 Transportéry <i>Kluyveromyces lactis</i>	21
1.4.3 Transportéry <i>Candida albicans</i>	22
1.5 Léčba kvasinkových infekcí a mnohočetná léková rezistence.....	25
1.5.1 Možnosti buněčné obrany proti lékům.....	25
1.5.1.1 <i>Nespecifický transport zprostředkovaný MDR proteiny - vazebná kapsa</i>	27
1.5.2 Možnosti překonání mnohočetné lékové rezistence.....	29
1.6 Způsob účinku chemických stresorů (modulátorů, inhibitorů a substrátů)....	30
1.6.1 Látky způsobující vyčerpání ATP	30
1.6.2 Antimykotika (azolové sloučeniny)	31
1.6.3 Ionofory.....	34
1.6.4 Signální molekula - modulátor aktivity MDR pump	35
1.7 Fluorescenční sondy pro sledování aktivity MDR pump.....	35
1.7.1 Rhodaminová barviva	35
1.7.2 Potenciometrická fluorescenční sonda diS-C ₃ (3).....	36
2 Materiál a metody	41
2.1 Chemikálie a materiál.....	41
2.2 Kultivační média a pufr.....	43
2.3 Kvasinkové kmeny	44
2.4 Uchovávání a kultivace kvasinkových kultur	45
2.5 Měření růstových křivek a stanovení obsahu glukózy v médiu během růstu kvasinek.....	46

2.6	Stanovení velikosti buněk a jejich počtu ve vzorku.....	47
2.7	Testy citlivosti kvasinkových buněk k chemickým stresorům založené na sledování inhibice jejich růstu.....	47
2.7.1	Zónový test (Disk-diffusion assay).....	47
2.7.2	Kapkový test (Spot assay).....	49
2.8	Měření akumulace potenciometrické fluorescenční sondy diS-C ₃ (3) v buňkách	50
2.8.1	Fluorescenčně mikroskopické monitorování akumulace a lokalizace sondy v cytosolu buněk.....	51
2.8.2	Spektrofluorimetrické monitorování akumulace sondy v buňkách: diS-C ₃ (3) fluorescenční metoda (metoda barvicích křivek).....	51
3	Výsledky a diskuze.....	53
3.1	Cíle práce.....	53
3.2	Studium funkčních odlišností pumpy Pdr5p kvasinek <i>Kluyveromyces lactis</i> a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
3.2.1	Ovlivnění růstu kvasinek <i>Kluyveromyces lactis</i> a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> přítomností pumpy Pdr5p v jejich membráně	56
3.2.2	Vliv přítomnosti pumpy Pdr5p v membráně kvasinek obou druhů na akumulaci fluorescenční sondy diS-C ₃ (3) v buňkách.....	58
3.2.3	Vliv chemických stresorů na aktivní odstraňování fluorescenční sondy diS-C ₃ (3) z buněk pumpou ScPdr5p a K1Pdr5p.....	60
3.2.3.1	<i>Porovnání inhibičního účinku klotrimazolu na transport sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p a K1Pdr5p.....</i>	<i>62</i>
3.2.3.2	<i>Identifikace vazebných míst ve vazebné kapse pumpy ScPdr5p, do kterých se váže fluorescenční sonda diS-C₃(3)</i>	<i>66</i>
3.2.3.3	<i>Porovnání inhibičního účinku mikonazolu, bifonazolu, ketokonazolu a itrakonazolu na transport sondy diS-C₃(3) pumpou ScPdr5p a K1Pdr5p.....</i>	<i>68</i>
3.2.3.4	<i>Stanovení počtu vazebných míst ve vazebné kapse pumpy K1Pdr5p</i>	<i>72</i>
3.2.3.5	<i>Porovnání velikosti vazebné kapsy K1Pdr5p a ScPdr5p pomocí účinných inhibitorů transportu sondy pumpou ScPdr5p</i>	<i>75</i>
3.3	Studium vlivu delece genů <i>KIPDR16</i> a <i>KIERG6</i> na funkci plazmatické membrány buněk <i>Kluyveromyces lactis</i>	79
3.3.1	Vliv absence vnitrobuněčných proteinů kódovaných geny <i>KIPDR16</i> a <i>KIERG6</i> na růst kultury kvasinek <i>Kluyveromyces lactis</i>	79
3.3.2	Vliv delece genů <i>KIPDR16</i> a <i>KIERG6</i> na velikost membránového potenciálu a aktivitu MDR pump buněk <i>Kluyveromyces lactis</i>	80

3.4	Aplikace diS-C ₃ (3) fluorescenční metody pro vyhledávání inhibitorů MDR pump <i>CaCdr1p</i> a <i>CaCdr2p</i> podmíněně patogenní kvasinky <i>Candida albicans</i>	85
3.4.1	Vliv přítomnosti pumpy <i>CaCdr1p</i> nebo <i>CaCdr2p</i> v membráně kvasinek <i>C. albicans</i> na akumulaci sondy diS-C ₃ (3) v buňkách	86
3.4.2	Zavedení efektivního postupu pro vyhledání inhibitorů pump <i>CaCdr1p</i> a <i>CaCdr2p</i> založeného na použití látek účinně inhibujících transport sondy diS-C ₃ (3) pumpami <i>ScPdr5p</i> a/nebo <i>ScSnq2p</i>	90
3.4.2.1	<i>Porovnání inhibičního účinku farnesolu na transport sondy diS-C₃(3) pumpami CaCdr1p a CaCdr2p u C. albicans a pumpami ScPdr5p a ScSnq2p u S. cerevisiae</i>	90
3.4.2.2	<i>Testování inhibičního účinku beauvericinu a enniatinu B na transportní aktivitu pump CaCdr1p, CaCdr2p, ScPdr5p a ScSnq2p</i>	96
3.4.2.3	<i>Testování inhibičního účinku série derivátů 1,4-dihydropyridinu na transport sondy diS-C₃(3) pumpami ScPdr5p, ScSnq2p, CaCdr1p a CaCdr2p</i>	100
3.4.3	Vliv různých inhibitorů pump <i>CaCdr1p</i> a <i>CaCdr2p</i> na odstraňování fluorescenční sondy diS-C ₃ (3) z buněk klinického izolátu <i>C. albicans</i> CY 1123 rezistentního na léčbu flukonazolem.....	105
3.4.3.1	<i>Porovnání akumulace sondy diS-C₃(3) v buňkách kmene CY 1123 a SC5314</i>	105
3.4.3.2	<i>Testování účinku inhibitorů pump CaCdr1p a CaCdr2p na akumulaci sondy diS-C₃(3) v buňkách CY 1123 a SC5314</i>	109
4	Závěr	113
	Seznam použité literatury.....	115
	Seznam tabulek	127
	Seznam použitých zkratk.....	129
	Přílohy	133

Úvod

Každá živá buňka se potřebuje chránit před negativními vlivy okolí i vlastními zplodinami. Nezbytnou podmínkou pro přežívání jednobuněčných organismů, jako jsou bakterie nebo kvasinky, je jejich efektivní obrana proti účinkům jak toxinů produkovaných soupeřícími mikroorganismy, tak škodlivých chemických látek přítomných v okolním prostředí. V důsledku nadměrného používání antibiotik a antimykotik při léčbě bakteriálních a kvasinkových infekcí došlo k tak intenzivnímu rozvoji různých buněčných obranných mechanismů, až se některé patogenní mikroorganismy staly vůči nim zcela rezistentní. Jedním z mnoha obranných systémů, který významnou měrou přispívá k odolnosti buněk k účinku xenobiotik, je nadměrná produkce membránových proteinů, které jsou zodpovědné za odstraňování nežádoucích látek z buněk, vedoucí k fenoménu tzv. mnohočetné lékové rezistence (anglicky multidrug resistance, odtud jejich označení jako MDR pumpy).

Hlavními MDR transportéry kvasinek jsou *ScPdr5p*, *ScSnq2p* a *ScYor1p* u *Saccharomyces cerevisiae*, *KIPdr5p* u *Kluyveromyces lactis* a *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u *Candida albicans*, z nichž většina je v důsledku evolučního vývoje navzájem vysoce homologní. Ačkoliv je známá celá řada strukturně a funkčně odlišných látek, např. léků, které jsou často společnými substráty MDR pump, informace o uspořádání vazebných kapes těchto pump jsou stále velmi omezené navzdory dlouhodobému intenzivnímu výzkumu v této oblasti, a stejně limitované je i množství jejich dosud identifikovaných účinných inhibitorů. Navíc značná část současných znalostí pochází od nejlépe prostudované MDR pumpy *ScPdr5p*.

V disertační práci jsme se zaměřili nejenom na studium rozdílného uspořádání vazebné kapsy pumpy *ScPdr5p* u kvasinky *S. cerevisiae* a jeho méně prozkoumaného homologu *KIPdr5p* u nekonvenční kvasinky *Kluyveromyces lactis* a vlivu delece genů *KIPDR16* a *KIERG6* u buněk *K. lactis* na velikost jejich membránového potenciálu a aktivitu MDR pump (hlavně *KIPdr5p*), ale také na vyhledávání účinných inhibitorů dvou hlavních MDR pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* (homologů *ScPdr5p*) u podmíněně patogenní kvasinky *Candida albicans*. Podařilo se nám vyvinout efektivní postup pro vyhledávání inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*

spočívající v použití nepatogenních kvasinek *S. cerevisiae* pro prvotní monitorování inhibičních účinků velkých sérií látek, např. nově syntetizovaných.

K dosažení vytýčených cílů disertační práce byla použita zejména diS-C₃(3) fluorescenční metoda, která je citlivým nástrojem pro současné monitorování vlivu látek (inhibitorů, léků, atd.) na změnu membránového potenciálu buněk a aktivity jejich MDR pump, pro něž je sonda diS-C₃(3) substrátem.

1 Teoretická část

1.1 Kvasinky – prospěšné i nebezpečné mikroorganismy

Kvasinky jsou často používaným modelovým eukaryotním organismem pro studium transportních procesů probíhajících na membránách buněk. Důvodů, proč jsou kvasinky (zejména *Saccharomyces cerevisiae*) tak oblíbené, je celá řada:

1. Kvasinka je nejjednodušší (primitivní) eukaryotní buňka.
2. Je možné ji velmi rychle množit.
3. Celá řada buněčných procesů je stejná u kvasinek a u vyšších eukaryot.
4. Jsou zavedené postupy přípravy geneticky modifikovaných mutantních kmenů.

Stavba kvasinkové buňky je (s výjimkou buněčné stěny) srovnatelná se stavbou lidské buňky, obsahuje jádro a membránou ohraničené organely. Vzhledem k tomu, že kvasinka je jednobuněčný organismus, je obklopena nejenom plazmatickou membránou, ale také buněčnou stěnou, která ji chrání proti osmotickému tlaku, prostor mezi membránou a buněčnou stěnou se nazývá periplazma.

V této studii jsme se zabývali činností membránových proteinů, které transportují látky z cytoplazmy do periplazmy, u tří druhů kvasinek, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans* (obr. 1-1). Všechny použité modelové organismy patří do rodiny *Saccharomycotina*.

1.1.1 *Saccharomyces. cerevisiae*

S. cerevisiae je nejznámější, nejprozkoumanější a nejběžnější druh kvasinky. Jejich genom byl kompletně sekvenován jako první z řádu kvasinek. Jsou běžně používané v potravinářském průmyslu jako pивní, pekařské a vinné kvasinky. Jejich metabolismus v přítomnosti cukrů v okolním médiu upřednostňuje fermentaci [1], přirozeně se vyskytují například na ovocných slupkách, a proto je kvašení známo lidstvu již od pradávna.

Vstup monosacharidů do buňky zajišťuje více než 18 hexózových transportérů [2]. V přítomnosti glukózy v médiu dochází k úplnému potlačení

buněčného dýchání (tzv. Crabtreeho efekt^{*}), takže v buňkách probíhá pouze glykolýza a kvasinky *S. cerevisiae* se tedy označují jako Crabtree-pozitivní [3, 4]. Právě tato vlastnost poskytuje člověku potřebné výhody při kvašení ovoce na alkohol.

1.1.2 *Kluyveromyces lactis*

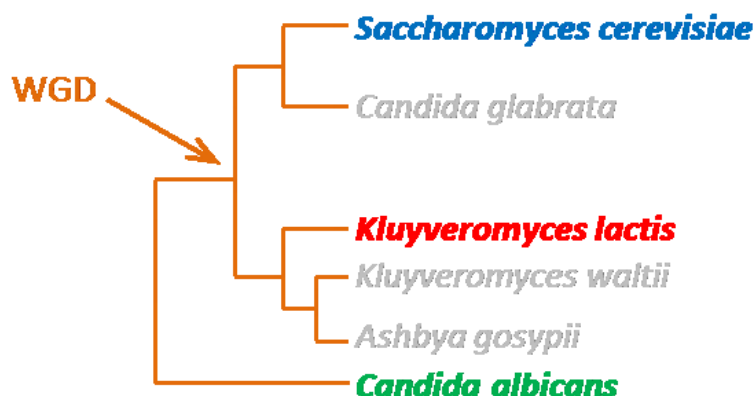
K. lactis je méně známý a méně prozkoumaný druh kvasinky. Pro svou schopnost asimilace laktózy je tato mléčná kvasinka využívána v potravinářském průmyslu, konkrétně v mlékárenském průmyslu. Tyto kvasinky produkují protein β -galaktosidázu, která štěpí laktózu v mléku na glukózu a galaktózu a je komerčně využívána pro odstranění laktózy z mléčných výrobků pro osoby s alergií, dále se využívá i při výrobě sýrů, jogurtů nebo zmrzliny. Kvasinky *K. lactis* jsou také využívány k heterologní produkci enzymu chymozinu, syřidla pro výrobu sýrů, které v současné době nahradilo dříve používaný hovězí enzym [3].

Kvasinka *K. lactis* patří spolu s *S. cerevisiae* do rodu *Hemiascomycete*, přesto se však v několika důležitých vlastnostech výrazně liší, a proto jsou někdy kvasinky *K. lactis* označovány jako nekonvenční kvasinkový modelový organismus. Tyto kvasinky vykazují tzv. Kluyverův efekt, což znamená, že jsou schopné zpracovávat cukry jako galaktózu, sacharózu nebo maltózu pouze v aerobních podmínkách s dostatečným přísunem kyslíku [3]. Za anaerobních podmínek nejsou schopny transportovat cukry (a to dokonce ani glukózu) do buněk, takže tyto kvasinky jsou na rozdíl od *S. cerevisiae* striktně aerobní [4].

U kvasinek *K. lactis* nedochází k potlačení dýchání v přítomnosti glukózy, dokáží tedy fermentovat i dýchat současně, dokonce upřednostňují dýchání před fermentací, takže se označují jako Crabtree-negativní [1]. To je možná důsledkem toho, že tyto kvasinky nejsou schopny života bez mitochondriální DNA a syntézy mitochondriálních proteinů, tj. jsou tzv. petite-negativní [4]. Tyto jejich vlastnosti mohou dále souviset s výrazně nižším množstvím hexózových transportérů v membráně buněk *K. lactis* (doposud 4 identifikované transportéry) oproti *S. cerevisiae* [2]. Buňky *Kluyveromyces lactis* mají tedy velice pomalý a regulovaný import glukózy a v buňkách je rychle a efektivně kompletně zpracována [4].

^{*} tj. buňky pouze fermentují a dochází k hromadění etanolu v buňkách i v médiu

Genom *K. lactis* byl také sekvenován a stejně jako v případě její blízké příbuzné kvasinky *S. cerevisiae*, obsahuje srovnatelné množství genů kódujících stejné množství proteinů. Některé homologní proteiny jsou dokonce sekvenčně delší u *K. lactis* než u *S. cerevisiae*. Předpokládá se, že evoluční cesty kvasinek *K. lactis* a *S. cerevisiae* se rozešly ještě před tzv. zdvojením celého genomu, WGD (z anglického whole genome duplication)[5], obr. 1-1, a zatímco kvasinky *S. cerevisiae* podstoupily WGD a většinu genů tak obsahují nejméně ve dvou kopiích, tak *K. lactis* tímto procesem neprošly. Tomu odpovídá jednak zachované pořadí genů, jednak snížené množství genů transkripčních faktorů u *K. lactis*. Většina transkripčních faktorů, které jsou ve více kopiích u *S. cerevisiae*, má pouze jediného homologního zástupce u *K. lactis* [1, 6]. Vzhledem k tomu, že množství genů je u obou kmenů velmi podobné, předpokládá se, že geny, které nejsou homologní s geny *S. cerevisiae*, mají zřejmě odlišnou funkci nebo vlivem evoluce došlo k tolika mutacím, že je už nebylo možné ztotožnit mezi oběma druhy [1, 6].



Obr. 1-1 Fylogenetický strom příbuznosti kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*. Šipka označuje místo, kde pravděpodobně došlo ke zdvojení celého genomu (WGD) podle [5]. Upravený obrázek z publikace [6].

1.1.3 *Candida. albicans*

Tyto podmíněně patogenní kvasinky se vyskytují běžně kolem nás a jsou součástí lidského mikrobiálního osídlení, aniž by to člověka ohrozilo na zdraví. Běžná jednobuněčná forma kvasinky bývá neškodná, za specifických podmínek se však může přichytit na lidském těle a vytvoří mnohobuněčné vláknité útvary (tzv. hýfy), které jsou silně invazivní a patogenní [7]. Pobídkou k tvorbě hýf může být zvýšené množství glukózy v médiu, změna pH, teploty nebo zvýšená koncentrace steroidních hormonů (především estrogenů) v okolí [8]. Z tohoto důvodu se

do okruhu lidí ohrožených touto kvasinkou dostávají diabetici, lidé dlouhodobě trpící stresem a těhotné ženy. Pro osoby s oslabenou imunitou, jako jsou předčasně narozené děti a staří lidé, pacienti trpící nemocí AIDS, onkologičtí pacienti po léčbě chemoterapeutiky nebo osoby léčené imunosupresivou po transplantaci, může infekce[†] způsobená kvasinkou *C. albicans* skončit jejich smrtí.

Tyto kvasinky způsobují asi 9 % krevních infekcí, které však vedou až ve 40 % případů k úmrtí pacienta [9]. Více než 75 % žen se ve svém životě alespoň jednou setkalo s vaginální mykózou, z čehož 90 % bylo způsobeno právě kvasinkou *C. albicans*. Kandidóza je čtvrtou nejčastější nemocniční infekcí [10].

Genom kvasinky *C. albicans* byl také sekvenován a v porovnání s *S. cerevisiae* má (podobně jako *K. lactis*) snížené množství genů transkripčních faktorů. Kvasinka *C. albicans* je však od *S. cerevisiae* fylogeneticky vzdálenější než *K. lactis* (obr. 1-1) [6].

Přestože genom *C. albicans* obsahuje asi 19 genů kódujících hexózové transportéry, tedy prakticky stejné množství jako *S. cerevisiae* [2], tato kvasinka je stejně jako *K. lactis* Crabtree-negativní (tabulka 1-1).

Kvasinky	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>C. albicans</i>
Preferovaný metabolismus	fermentace (glykolýza)	dýchání + fermentace (pentózový cyklus + glykolýza)	dýchání + fermentace (pentózový cyklus + glykolýza)
	Crabtree-pozitivní	Crabtree-negativní	Crabtree-negativní
Růst	aerobní i anaerobní	striktně aerobní	aerobní i anaerobní
Využití	(alkoholové) kvašení potravinářský průmysl heterologní produkce proteinů	mlékárenský průmysl chymozin, β -galaktosidáza heterologní produkce proteinů	X lidský PATOGEN

Tabulka 1-1 Porovnání vybraných charakteristik kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*.

[†] Infekce houbového původu jsou označovány jako mykózy, pokud jsou způsobeny kvasinkami druhu *Candida*, nazývají se kandidózy.

1.2 Plazmatická membrána kvasinek

Kvasinkové buňky jsou stejně jako všechny ostatní živé buňky ohraničeny membránou. Plazmatická membrána je dvojná vrstva lipidů, která je polární na povrchu a hydrofobní uvnitř vrstvy díky charakteru lipidů, které jsou tvořeny polární hlavičkou a nepolárními ocásky. Vzhledem ke schopnosti buněk tvořit různé polární hlavičky a spojovat je s různými lipidovými řetězci může být membrána jedné buňky tvořena až více než tisícem různých druhů lipidů [11]. Buněčná membrána je navíc asymetrická, takže složení vnitřního a vnějšího listu membrány se může diametrálně odlišovat i co se týče druhů lipidů.

Kromě lipidů tvoří membránu i řada dalších molekul, významné postavení zaujímají steroly, z nichž nejdůležitější roli hraje ergosterol. Tyto molekuly mají vliv na biofyzikální vlastnosti membrány, jako je její permeabilita, fluidita, zakřivení, tloušťka, integrita, asymetrie nebo rigidita [12]. Pro kvasinkovou buněčnou membránu je ergosterol zcela esenciální a v případě narušení jeho biosyntetické dráhy může mít jeho nedostatek nebo výměna za jiné steroly fatální důsledky pro strukturu a funkci plazmatické membrány kvasinek [12]. V membráně buněk vyšších eukaryot, tj. i lidských buněk, se ergosterol nevyskytuje [13], ale stejnou funkci zastává cholesterol.

Dvojná lipidní vrstva sama o sobě je polopropustná, mohou přes ni projít malé nenabitě nebo hydrofobní molekuly. Vytváří tak přirozenou bariéru mezi vnějším prostředím s vnitřním prostorem buňky, jehož složení je koncentračně odlišné, a tím pomáhá buňce udržovat (nejen iontovou) homeostázi. Buňka však potřebuje pro svůj život a zdravý růst také přísun živin a iontů a odvod zplodin, proto je buněčná membrána prostoupena množstvím proteinů, které zprostředkovávají transport látek, které přes ni samovolně neprojdou. Kromě transportu slouží tyto proteiny také jako receptory, kotvy nebo enzymy [14].

Membrána je fluidní útvar a proteiny společně se steroly často tvoří jakési ostrůvky (tzv. mikrodomény), kde je procentuálně vyšší zastoupení sterolů, proteinů a sfingolipidů oproti zbytku membrány [15, 16]. Mikrodomény jsou rigidnější části membrány, které mohou hrát roli i v různých vnitrobuněčných procesech, při růstu i buněčné smrti, a pro některé membránové proteiny (např. proteiny ovlivňující koncentrace iontů K^+ , Na^+ a H^+ v buňce) je lokalizace v těchto místech nezbytná

k jejich správné funkci [16]. Nicméně se nejedná o stálé útvary, mohou vznikat a samovolně se rozpadat.

1.2.1 Membránové transportní proteiny

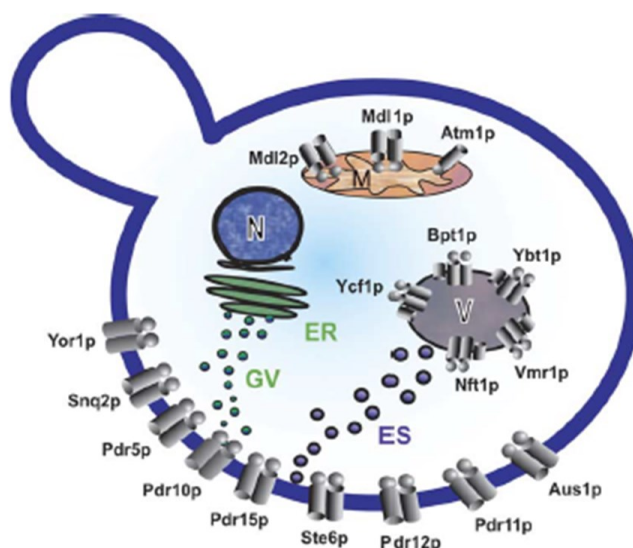
Membránové transportní proteiny můžeme rozdělit podle spotřeby energie do tří kategorií. Kanály, nebo také póry, umožňují pasivní průchod látky podle jejího koncentračního gradientu a nepotřebují k tomu přísun energie. Bývají vysoce selektivní a mohou být uzavíratelné/otevíratelné např. napětím, změnou pH či jinak [14].

Další proteiny zprostředkovávají aktivní transport, tj. přenášejí látky aktivně i proti směru jejich koncentračního gradientu za spotřeby energie. Pokud pochází tato energie z hydrolýzy ATP, mluvíme o primárně aktivních transportérech nebo pumpách. Pokud je energie získávána při transportu látky po spádu koncentračního gradientu k přenosu jiné látky proti jejímu koncentračnímu gradientu, pak jde o sekundárně aktivní transport [17]. Transportní proteiny se kromě cytoplazmatické membrány nacházejí také ve vnitřních buněčných membránách.

1.2.1.1 *Primárně aktivní transportéry - superrodina ATP-binding cassette (ABC) proteinů*

Superrodina ABC (z anglického názvu ATP-binding cassette) transportérů je významná skupina více než 3000 proteinů, které získávají energii z hydrolýzy ATP a jsou tedy primárně aktivní. Pumpy z této rodiny se nacházejí ve všech organismech od bakterií přes kvasinky, rostliny až po člověka [18, 19] a transportují široké spektrum látek, jako jsou cukry, aminokyseliny, peptidy, vitamíny, ionty, lipidy, steroidy, glukokortikoidy, toxiny, hormony, antimykotika, chemoterapeutika, polypeptidy a další látky [19-21].

Zatímco prokaryotní buňky mají jak membránové exportéry, tak importéry (živin, růstových faktorů a stopových prvků) z rodiny ABC proteinů [19], ABC pumpy v eukaryotických buňkách zprostředkovávají pouze export ven z buněk nebo do lumenu organel – vakuol, mitochondrií aj. [19, 21] (obr. 1-2). Další proteiny z této rodiny fungují jako kanály nebo regulují aktivitu kanálů [22]. Některé ABC proteiny jsou netransportující systémy, které fungují jako receptory či proteázy [20], nebo se starají o regulaci procesů, opravu DNA či kontrolu translace [19].



Obr. 1-2 Schematické znázornění lokalizace ABC proteinů v membránách buňky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. N jádro, V vakuola, ER endoplazmatické retikulum, GV Golgiho váčky, ES endozomy, M mitochondrie. Převzato z [23].

Superrodina ABC zahrnuje proteiny 6 rodin: PDR (pleiotropic drug resistance), MDR (multidrug resistance), MRP/CFTR (multidrug resistance-associated protein/cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), RLI (RNase L inhibitor), ALDP (adrenoleukodystrophy protein) a YEF3 (yeast elongation factor 3) [20, 24].

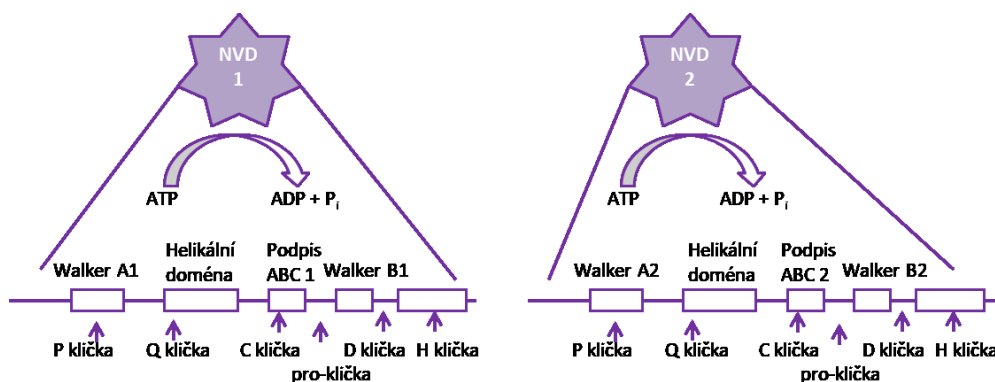
Téměř všechny ABC proteiny mají zachovanou podobnou architekturu, kterou nejčastěji tvoří čtyři domény: dvě hydrofobní transmembránové domény (TMD) tvořené zpravidla šesti transmembránovými α helixy a dvě hydrofilní nukleotid vázící domény (NVD), u nichž dochází k vazbě a hydrolýze nukleotid trifosfátů, nejčastěji ATP, ale třeba také GTP, CTP nebo UTP [25, 26].

Kvasinkové ABC proteiny jsou tvořeny 1300 – 1600 aminokyselinami a jejich velikost se pohybuje mezi 140 a 170 kDa [17]. Standardní stavba proteinů ze superrodiny ABC (a minimální funkční struktura) je (TMD-NVD)₂ [10, 27], existuje však i obrácené uspořádání (typické pro PDR rodinu proteinů) nebo proteiny poloviční délky (TMD-NVD), které pravděpodobně pracují jako homo/heterodimery. Právě ze studia funkce těchto polovičních transportérů vznikla hypotéza, že proteiny o plné délce vznikly fúzí genů dvou různých proteinů poloviční délky [10, 28]. Některé ABC proteiny (konkrétně rodina MRP) mají strukturu dokonce delší o jednu

transmembránovou doménu, tedy TMD-(TMD-NVD)₂, její funkce je ovšem nejasná [22].

Nukleotid vážící doména má sedm zachovaných klíčových sekvenčních motivů (z nichž první tři jsou nejvýznamnější), podle nichž se proteiny řadí do ABC rodiny (obr. 1-3): (1) **Walker A** motiv (P klička) spojuje konzervovaný β skládaný list se sousedním α-helixem, (2) **Walker B** motiv, který tvoří β skládaný list, (3) **ABC podpis**[‡]/C motiv či C klička („LSGGQ“), která spojuje 2 α-helixy přímo naproti motivu Walker B (jemuž předchází), (4) Q klička, která spojuje Walker A motiv s ABC podpisem, (5) pro-klička, která spojuje C-koncový α-helix ABC podpisu s β skládaným listem motivu Walker B, (6) H klička na konci Walker B motivu, která spojuje konzervovaný β skládaný list se sousedním α-helixem, a (7) D klička, která spojuje β skládaný list Walker B motivu se strukturně konzervovaným α-helixem [10]. Někdy se uvádí navíc ještě A klička a tzv. „switch“ motiv [29].

Motivy Walker A a Walker B tvoří zhruba 90 – 120 aminokyselin [17], zatímco C motiv pouze 12 konzervovaných aminokyselin [30]. Q klička hraje pravděpodobně signalizační roli v komunikaci mezi TM a NV doménami a také řídí rotaci NVD během konformační změny, D klička nejspíš ovlivňuje katalytickou aktivitu a komunikaci mezi aktivními místy TMD [21].



Obr. 1-3 Schematické znázornění důležitých motivů nukleotid vážících domén (NVD) ABC proteinů. Vytvořeno podle [10].

Obě NVD jsou navzájem odlišné, zatímco u jedné domény jsou vysoce konzervovány motivy Walker A a Walker B, u druhé domény je to právě ABC podpis, což dokazuje, že každá doména má odlišnou funkci při hydrolyze ATP [10].

[‡] Při sekvenování je to právě zjištěný ABC podpis, který automaticky řadí zkoumané proteiny do ABC rodiny.

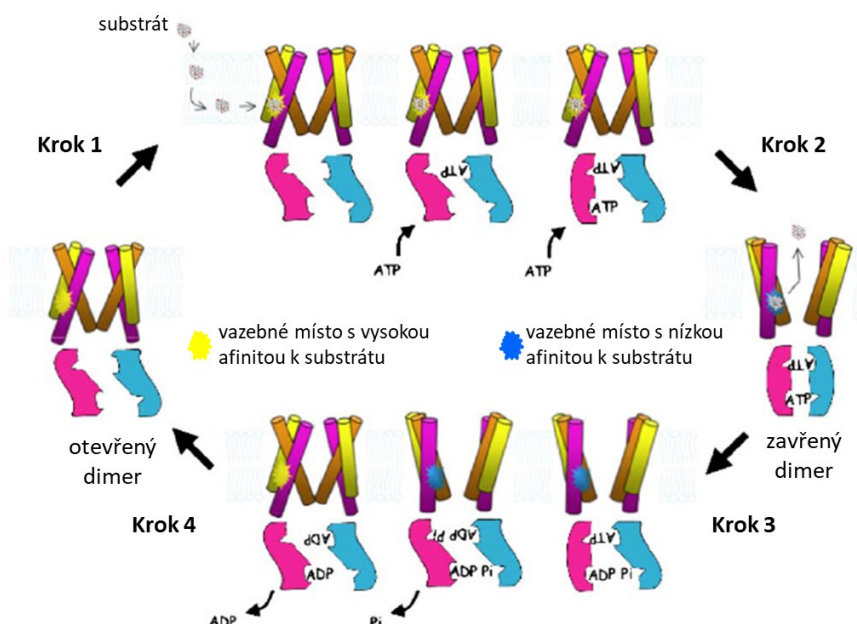
Nukleotid vážící domény jsou navzájem těsně provázané a tvoří společně dimer [31], který obsahuje dvě vazebná místa pro ATP (resp. NTP) tvořená vždy oběma Walker motivy, H, D a Q kličkou z jedné NVD a ABC podpisem z druhé domény [10, 29, 32].

Oproti NVD jsou TM domény daleko méně konzervovány napříč organismy [30]. Obě transmembránové domény společně tvoří v membráně pór s dostatečně velkou vazebnou kapsou [27], která obsahuje vazebná místa pro transportované látky [32]. TMD prodělávají daleko větší konformační změny při navázání, transportu a uvolňování substrátu než NVD při hydrolýze ATP [32].

Kličky spojující transmembránové helixy obou TMD mají také svou funkci. Vnitrobuněčné kličky jsou kratší a více konzervované a umožňují komunikaci mezi TMD a NVD, zatímco periplazmatické kličky hrají roli při skládání proteinu a jeho lokalizaci, ale i při rozpoznávání substrátu [8].

Podle dostupných krystalových struktur prokaryotních ABC proteinů a lidského P-glykoproteinu (shrnutí v [29]) byl navržen model transportu substrátů přes membránu, který je označován jako „switch“ model (obr. 1-4). Předpokládá se, že transport substrátů probíhá ve 4 krocích. Na začátku, v klidovém stavu, je vazebná kapsa tvořená transmembránovými helixy otevřená směrem do cytoplazmy, takže vazebné místo s vysokou afinitou je dostupné pro substráty zevnitř buňky (či vnitřního listu membrány). V prvním kroku dojde k vazbě substrátu do vazebného místa ve vazebné kapse, což vede ke konformační změně, která přiblíží helikální část NVD ke vnitrobuněčným kličkám, které váží transmembránové α -helixy (dochází tak ke komunikaci mezi TMD a NVD). Tato změna umožní vazbu ATP do vazebné kapsy tvořené oběma NVD a následně jsou obě vazebná místa obsazena molekulami ATP. Již tato vazba (a nikoliv samotná hydrolýza navázaného ATP) poskytuje dostatek energie k další konformační změně proteinu, kdy ve druhém kroku vzniká tzv. zavřený dimer (jde o malou konformační změnu - rotaci obou NVD dojde k jejich přiblížení). Transmembránová část proteinu prochází větší konformační změnou, při níž se vazebná kapsa s navázaným substrátem otevře extracelulárním směrem a dojde k uvolnění substrátu (v důsledku snížení afinity vazebného místa k substrátu). Právě snížení afinity vazebného místa je klíčový prvek v tomto modelu, protože snižuje pravděpodobnost opětovného navázání substrátu do vazebné kapsy a tím minimalizuje riziko jeho transportu opačným směrem, tj. zpět do buňky [33]. Ve třetím kroku dojde po uvolnění substrátu z vazebné kapsy k hydrolýze

navázaného ATP, uvolnění P_i (navázané na ABC podpis jedné NVD) a následně uvolnění ADP (vázané motivem Walker A druhé NVD), které „přepne“ protein zpět do vnitrobuněčně orientované otevřené konformace (odtud název „switch“ model). Ve čtvrtém kroku dochází opět k rotaci obou NVD do stavu otevřeného dimeru a celý cyklus se může opakovat. [10, 19, 31, 34]



Obr. 1-4 Schematické znázornění čtyř základních kroků při transportu substrátu ABC pumpou přes membránu („Switch“ model). Po navázání substrátu dochází k obsazení obou vazebných míst pro ATP (krok 1), což uvolní dostatek energie k tvorbě zavřeného dimeru nukleotid vázících domén (NVD) a změně konformace proteinu tak, že se vazebná kapsa (původně přístupná z cytoplazmy) otevře směrem do periplazmy a navázaný substrát se uvolní (krok 2). Následně probíhá hydrolyza ATP a protein se přepne směrem do cytoplazmy (krok 3), po uvolnění ADP vzniká otevřený dimer NVD a celý cyklus se může opakovat (krok 4). *Převzato z [34].*

Z důvodu prevence zpětného přenosu substrátů do buněk fungují ABC proteiny jako tzv. „molekulární diody“. To znamená, že pokud z nějakého důvodu nedojde ke snížení afinity vazebného místa k substrátu při otevření vazebné kapsy do periplazmy (nebo se substrát z ní neuvolní), dojde k zablokování proteinu v této konformaci [33]. K přepnutí proteinu nedochází také v případě, že koncentrace transportované látky vně buňky je tak vysoká, že se substrát naváže i do místa se sníženou afinitou. Byla dokonce identifikována aminokyselina, která se na tomto mechanismu jednosměrného transportu podílí [33].

Hydrolyza ATP pravděpodobně není pro samotný transport substrátu nutná, stačí energie uvolněná při vazbě ATP do vazebné kapsy dimeru tvořeného NVD. Stejně tak zřejmě není zapotřebí obsadit obě vazebné kapsy nukleotid trifosfátem (je možné že i vazba jednoho ATP stačí ke stabilizaci zavřeného dimeru NVD) a při vazbě ATP do obou vazebných míst nemusí vždy docházet k hydrolyze obou navázaných ATP [31, 34]. Stechiometrie transportu se tedy může u různých ABC transportérů lišit. Předpokládá se, že primární je hydrolyza ATP navázaného na NVD2, která je vyžadována pro přepnutí proteinu [8].

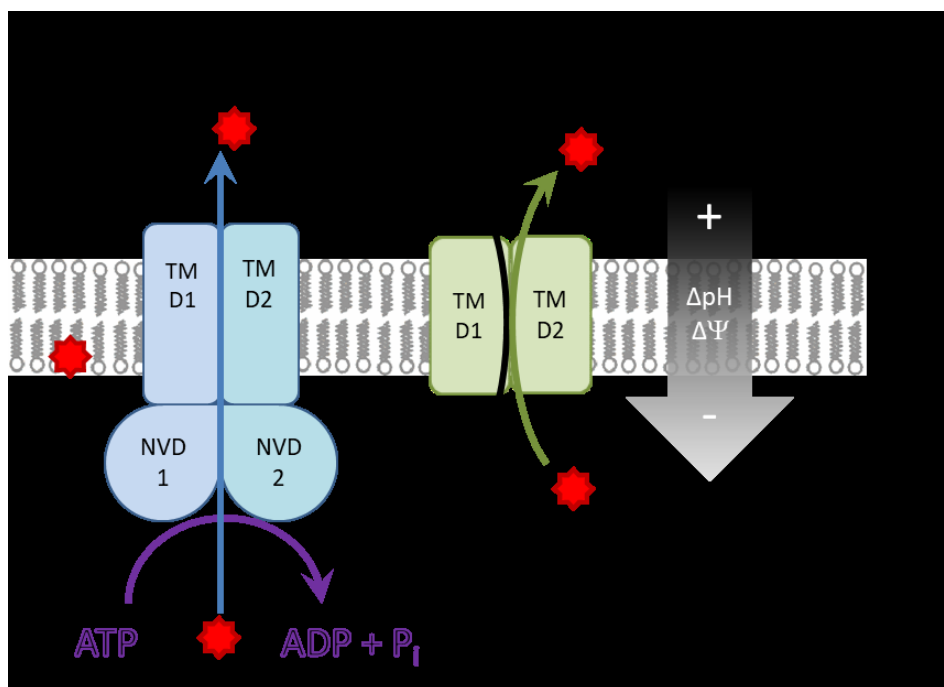
Vazebná kapsa ABC proteinů je flexibilní a dostatečně velká na to, aby mohlo dojít k vazbě různých substrátů i k jejich kotransportu [10]. Uvnitř kapsy se nachází množství aromatických a hydrofobních aminokyselin, takže ke stabilizaci navázaného substrátu je využito van der Waalsových sil [27], ale také negativně nabitých aminokyselin, které mohou neutralizovat pozitivně nabitě substráty [10, 27]. Navíc nemusí docházet k vazbě substrátů pouze z cytosolu, ale ABC proteiny mohou zachytit substráty už při průchodu membránou přímo z vnitřního listu membrány [27], takže se nežádoucí látky vůbec nedostávají dovnitř do buněk a tyto pumpy tak představují vysoce efektivní první obrannou linii buněk proti chemickému stresu [17].

1.2.1.2 *Sekundárně aktivní membránové transportéry - Major facilitators superfamily (Superrodina MFS)*

Další skupiny proteinů, které se podílejí na obraně buněk transportem široké škály strukturně a funkčně rozdílných látek z buněk, nezískávají energii k jejich transportu z hydrolyzy ATP (jako ABC proteiny), ale využívají elektrochemického gradientu protonů (případně jiných látek) přes membránu buněk (obr. 1-5). Tyto transportéry umožňují vstup protonů do buněk, přičemž energie získaná jejich přenosem je dostatečná k transportu jiných látek ven z buněk, jedná se tedy o sekundárně aktivní membránové transportní proteiny.

Existují nejméně tři větší rodiny proteinů, jejichž členové se nespécializují na transport konkrétní látky: MFS (major facilitator superfamily), RND (Resistance-Nodulation-Division) a SMR (small multidrug resistance) rodiny. RND proteiny se nacházejí u prokaryot i eukaryot a mají rozličné fyziologické funkce. Není jich mnoho a nejsou příliš prozkoumané. Proteiny z rodiny SMR se nacházejí pouze v prokaryotických buňkách. Jsou to nejmenší nespecifické transportní proteiny, které

se skládají ze čtyř transmembránových α helixů a málo výrazné domény umístěné mimo membránu, pracují jako dimery. [27]



Obr. 1-5 Schematické znázornění primárně a sekundárně aktivních MDR transportérů.

Superrodina MFS proteinů zahrnuje více než 350 transportérů z bakterií i eukaryotických organismů, které zprostředkovávají uniport, symport nebo antiport cukrů, peptidů, iontů, organických kyselin a léků [35, 36]. Patří sem také všechny hexózoové transportéry u *S. cerevisiae* [2]. Fylogeneticky zahrnuje superrodina MFS 17 rodin, které se navzájem liší typem přenášených substrátů i směrem jejich přenosu [36]. Pouze dvě rodiny sdružují antiportéry protonů a různých chemických látek, DHA14 (drug:H⁺ antiporter) a DHA 12 [36].

Proteiny z těchto dvou rodin se stavbou podobají ABC proteinům tím, že také obsahují dvě TMD po šesti (nebo sedmi) α helixech, které tvoří vazebnou kapsu pro substrát v membráně, nemají však hydrolytické NVD, obě TMD jsou propojené pouze cytoplazmatickou kličkou [37]. MFS transportéry jsou tvořeny 400 – 800 aminokyselinami a mají velikost mezi 45 – 90 kDa [17]. Proteiny z rodiny DHA14 mají 14 transmembránových α helixů, DHA12 jich má stejně jako většina ABC proteinů 12 [36].

Transport protonů a dalších látek je zřejmě prostorově oddělený, tyto transportéry fungují zřejmě na podobném principu jako ABC pumpy jen s jiným

zdrojem energie. Usnadnění difuze protonu vede ke konformační změně a otevření vazebné kapsy extracelulárním směrem a následnému uvolnění transportované látky snížením afinity vazebné kapsy. Pak dojde k uvolnění protonu a transportér se vrátí do původní konformace s kapsou otevřenou vnitrobuněčným směrem a s vysokou afinitou k transportované látce [27].

1.3 Membránový potenciál

Při transportu iontů (nebo nabitých molekul) přes membránu vzniká na obou stranách membrány rozdílné napětí. Tento rozdíl je v buněčné biologii označován jako membránový potenciál ($\Delta\Psi$), který je záporný uvnitř buněk. Vytváření a udržování membránového potenciálu je pro všechny živé buňky zcela esenciální proces, právě existence membránového potenciálu je základním poznávacím znakem každé živé buňky. U kvasinkových buněk jsou je membránový potenciál tvořen především tokem protonů (H^+) a draselných iontů (K^+).

U kvasinek je hlavním generátorem membránového potenciálu primárně aktivní transmembránový protein H^+ -ATPáza (Pma1p). Tato protonová pumpa využívá energii z hydrolyzy ATP k exportu protonů přes plazmatickou membránu, čímž největší měrou přispívá k existenci a udržování membránového potenciálu. Tím, že generuje elektrochemický gradient protonů přes membránu, přispívá také k vnitřní pH homeostázi [38]. Pumpa Pma1p tvoří zhruba 10-20 % všech membránových proteinů u kvasinek [39]. Právě její aktivace (např. přidáním glukózy k buňkám) [40] či inhibice (přidáním známého inhibitoru 2-deoxy-D-glukózy) [41] se projeví především změnou hodnoty membránového potenciálu (hyperpolarizací či depolarizací) doprovázenou změnou vnitrobuněčného pH. Hodnotu membránového potenciálu a vnitřního pH mohou ovlivňovat také různé chemické stresory, nejvíce pak ionofory a protonofory.

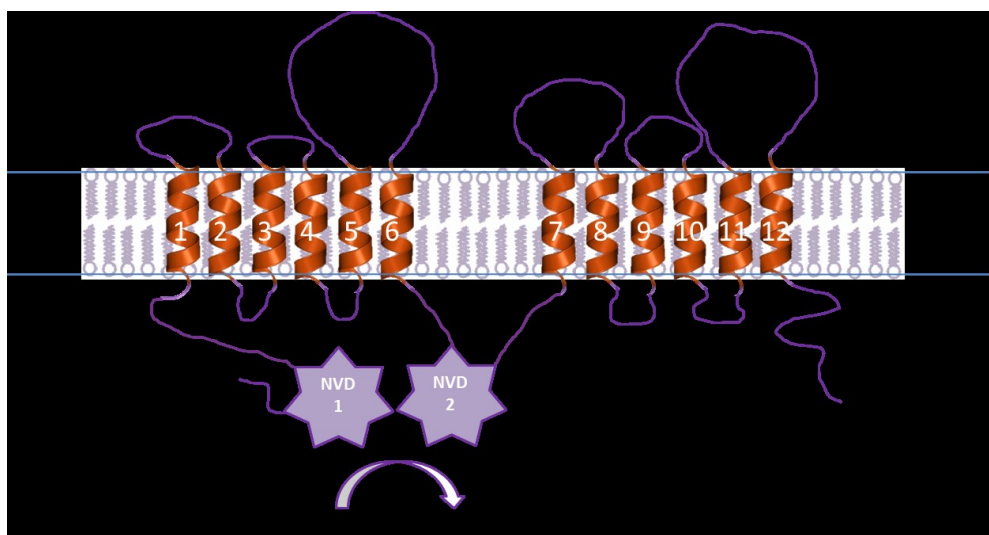
1.4 Fenomén mnohočetné lékové rezistence (MDR)

Přítomnosti nadměrného množství proteinů z rodiny ABC a/nebo MFS v membránách buněk je připisován vznik fenoménu nazvaného mnohočetná léková rezistence, MDR (z anglického multidrug resistance). Buňky při něm vykazují vysokou odolnost vůči širokému spektru strukturně a funkčně odlišných léčiv a je jednou z hlavních příčin selhání léčby infekcí způsobených patogenními

mikroorganismy či selhání léčby nádorových onemocnění. Buňka se dokáže bránit proti chemickému stresu různými způsoby (viz kapitola 1.5.1), nicméně MDR pumpy hrají v buněčné obraně exkluzivní roli.

Původním úkolem těchto pump bylo především ochránit buňku před toxickým stresem způsobeným jednak vlastními toxickými meziproducty či odpadními látkami, jednak cizorodými látkami obsaženými ve vnějším okolí. Vlivem evoluce však tato buněčná reakce na stres (a tedy výhoda) v některých případech vyústila v nadměrnou expresi těchto pump, což způsobilo, že některé buňky (patogenní mikroorganismy nebo rakovinné buňky) mohou být vysoce odolné vůči léčbě antibiotiky, antimykotiky, chemoterapeutiky či jinými léky [27]. Tato rezistence bývá také často důsledkem nadměrného plošného a dlouhodobého používání antibiotik a antimykotik [12].

U kvasinek je vznik mnohočetné lékové rezistence spjat především s PDR rodinou ABC proteinů. Proteiny plné délky z této rodiny jsou až na výjimky o velikosti 160 kDa a oproti ostatním rodinám z ABC superrodiny mají obrácenou stavbu, tj. (NVD-TMD)₂ [10, 28] (obr. 1-6). PDR pumpy se často nachází v rigidnějších místech membrány, která jsou bohatá na ergosterol a sfingolipidy, tj. v mikrodoménách [28].



Obr. 1-6 Schematické znázornění topologie PDR proteinů. NVD nukleotid vázící doména, TMD transmembránová doména složená ze šesti α -helixů, hydrolyza ATP probíhá za spolupráce obou NV domén. *Vytvořeno podle [28].*

U lidí jsou známy proteiny z rodiny PDR pouze poloviční délky [10] a za vznik mnohočetné lékové rezistence je zodpovědná především nadprodukce P-glykoproteinu, což je první objevený a nejprozkoumanější MDR protein vůbec.

Právě jeho nadměrná exprese u rakovinných buněk snižuje účinnost léčby chemoterapeutiky až u 40 % nádorů [27].

Fylogeneticky se PDR proteiny dají rozdělit do 8 klastrů označených A-H, klast H je rozštěpen na podskupiny H1 (a ten ještě na H1a a H1b) a H2, takže se někdy uvádí celkový počet 10 klastrů [28]. Klast A se někdy označuje jako Pdr5p/10p/15p, klast D jako Snq2p/Pdr12p, klast E jako Aus1p/Pdr11p[§], všechny tyto klastry obsahují proteiny kvasinek výhradně z rodiny *Saccharomycotina* [10, 28, 42]. Mezi jednotlivé klastry je rozděleno:

- (1) 10 proteinů kvasinky *S. cerevisiae* (4 pumpy v klastru A, 3 proteiny v klastru D, 2 transportéry v klastru E a 1 protein v klastru F),
- (2) 5 proteinů kvasinky *K. lactis* (2 pumpy v klastru A, 2 transportéry v klastru D a 1 protein v F klastru) a
- (3) 7 proteinů kvasinky *C. albicans* (5 pump v klastru A, 1 protein v klastru D a 1 transportér v klastru F) [10, 43].

Předpokládá se, že proteiny klastru E fungují jako cholesterolové importéry a jsou to jediné kvasinkové PDR transportéry, které zprostředkovávají transport do buněk a ne ven. Proteiny z klastru F jsou jediné konzervované u mnoha testovaných kvasinkových druhů (jako jediný obsahuje zástupce z více než 6 různých druhů kvasinek) [28] a pouze u proteinů z tohoto klastru jsou obě NVD symetrické. U většiny ostatních proteinů je u NVD1 silně konzervován ABC podpis (ABC1) zatímco u NVD2 jsou to Walker A2, Walker B2 motivy a pro-, Q a H kličky [10] (viz obr. 1-3).

Podle míry zachovaných aminokyselinových sekvencí je zřejmé, že membránový helix 2 je důležitý pro transport a rozpoznávání substrátu a podílí se na tvorbě vazebné kapsy, oproti tomu helix 10 se nejvíce liší napříč různými PDR proteiny, takže se předpokládá, že nemá funkci při transportu substrátů, ale tvoří spíše vnější část vazebné kapsy [28].

1.4.1 Transportéry *Saccharomyces cerevisiae*

Genetický kód kvasinek *S. cerevisiae* obsahuje 31 genů kódujících ABC proteiny [28], z čehož nejvíce transportérů (9 proteinů plné délky a 1 poloviční) spadá do rodiny PDR [20].

[§] V jiných publikacích lze nalézt i jiné členění/označení klastrů: A Pdr12p, B Snq2p, C Pdr5p/10p/15p [43], jsou to však pouze různé terminologie, homologie proteinů zůstává zachována.

Jedním z prvních identifikovaných PDR transportérů, které způsobují rezistenci vůči velkému množství látek, je protein **ScSnq2p**, nazvaný podle toho, že způsobuje rezistenci buněk vůči mutagenu 4-nitroquinoline N-oxidu (NQO) [35]. Tento 169 kDa protein se podílí také na toleranci buněk ke kovovým iontům, jako jsou Na^+ , Li^+ a Mn^{2+} [44, 45].

Nejvíce a nejlépe prozkoumaným PDR proteinem je **ScPdr5p**, homologní s ScSnq2p (37 % identita, 50 % podobnost [46]), který byl objevený před více než 25 lety [47]. Tento 160 kDa velký protein se nejvýrazněji podílí na vzniku MDR u kvasinek *S. cerevisiae* a vykazuje ještě širší spektrum exportovaných látek než ScSnq2p. Působí např. jako translokáza lipidů (např. fosfatidyletanolaminu) z vnitřního do vnějšího listu membrány, je to tedy flopáza [48]. Tento protein nebyl nikdy krystalizován, ale jeho předpokládaná struktura byla namodelována v rámci studie [49]. Exprese obou pump (ScPdr5p i ScSnq2p) je regulována dvěma transkripčními faktory *ScPDR1* a *ScPDR3* a jejich exprese může být indukována různým typem stresu, např. teplotním šokem nebo chemickým stresem [50]. Oba se také podílí na exportu kovových iontů [45] a estradiolu (a dalších sterolů) ven z buněk či do vnějšího listu membrány [51].

Dalšími blízkými homology ScPdr5p proteinu jsou **ScPdr10p** a **ScPdr15p** (více než 66 % a 74 % identita s ScPdr5p), které spolu s ním patří do klastru A a jsou exprimovány především při buněčném stresu [20, 44], jako je např. snížení pH, přítomnost slabých kyselin, zvýšení osmolarity nebo při hladovění [44]. Jejich exprese je řízena také transkripčními faktory *ScPDR1* a *ScPDR3* stejně jako u ScPdr5p [52]. Existuje předpoklad, že proteiny ScPdr5p a ScPdr15p vznikly při zdvojení celého genomu (WGD) z jednoho prapůvodního proteinu, zatímco ScPdr10p vznikl po WGD nezávisle [43]. Pumpa ScPdr15p se (stejně jako ScPdr5p) podílí na udržení lipidové asymetrie membrány transportem fosfatidyletanolaminu a pravděpodobně také odstraňuje poškozené lipidy z membrány [48], dále se podílí na rezistenci vůči některým substrátům ScPdr5p (např. chloramfenikolu) [44]. Jeho exprese je podobně jako u ScPdr5p závislá na růstové fázi, ale zatímco ScPdr5p je přítomen pouze v membránách buněk v exponenciální fázi růstu (tj. v přítomnosti glukózy v médiu), ScPdr15p je aktivní především u buněk v diauxické a postdiauxické fázi, tedy po vyčerpání glukózy [44, 53]. Přidání glukózy k hladovějícím buňkám znovu stimuluje expresi pumpy ScPdr5p [53].

Nejbližší homolog proteinu *ScSng2p* je **ScPdr12p**, který s ním sdílí téměř 60 % sekvenční identitu [44] (a 37 % identitu s *ScPdr5p* [24]). Tento transportér se výrazně podílí na rezistenci buněk vůči slabým organickým kyselinám jako je kyselina octová, sorbová, benzoová nebo propionová, které se běžně používají jako konzervační látky pro potraviny. Jeho exprese je řízená jak přítomností těchto kyselin v okolí buněk, tak snížením vnitrobuněčného pH, případně i změnou osmolarity [44].

Protein **ScPdr16p** je i se svým homologem **ScPdr17p** (49 % identita, 75 % podobnost) regulován pouze transkripčním faktorem *ScPDR1* [54]. Protein *ScPdr16p* patří do rodiny přenašečů fosfatidylinositolu, jehož přesun mezi membránami v buňkách zprostředkovává [55]. Pracuje jako dimer a fosfatidylinositol se pravděpodobně váže přímo do jeho vazebné kapsy [56]. Jeho přítomnost v buňkách zvyšuje jejich odolnost vůči azolovým léčivům, naopak jeho nepřítomnost vede k hromadění prekurzorů syntézy ergosterolu (např. lanosterolu či skvalenu) v membránách buněk [54, 55]. Z toho vyplývá, že protein *ScPdr16p* pravděpodobně ovlivňuje některý z enzymů syntetické dráhy ergosterolu, což může být i *Erg11p*, který je cílem právě azolových sloučenin (viz kapitola 1.6.2), případně se může podílet na přesunu sterolů a meziproductů biosyntetické dráhy ergosterolu mezi membránami či mezi komplexy příslušných enzymů [55]. Spekuluje se také o jeho signální roli o složení plazmatické membrány, především obsahu sterolů [56]. Protein *ScPdr17p* se spolu s *ScPdr16p* podílí na procesu syntézy lipidů a možná také transportu lipidů do plazmatické membrány **, stejně se podobá transportérům fosfatidylinositolu, ale kromě něj umožňuje přesun také fosfatidylserinu [55]. Delece obou těchto proteinů vede ke zvýšení citlivosti buněk vůči širokému spektru léčivých látek, což je nejspíše důsledkem odlišného složení plazmatické membrány (tj. zvýšení obsahu meziproductů syntetických drah ergosterolu a/nebo lipidů a snížení obsahu ergosterolu v plazmatické membráně), které umožňuje lepší difuzi léčiv do buněk [54]. Při deleci proteinu *ScPdr16p* může jeho funkci převzít právě jeho homolog *ScPdr17p* [55].

Také protein **ScPdr18p** ovlivňuje složení plazmatické membrány (stejně jako *ScPdr16p* a *ScPdr17p*). Jeho exprese je regulována mimo jiné transkripčním faktorem

** *U obou těchto proteinů není zcela jasná jejich lokalizace. Jejich funkce je spjatá s transportem mezi membránami, takže se mohou vyskytovat jak v endoplazmatickém retikulu, lipidových váčcích, tak u plazmatické membrány [55].*

ScPDR3 a delece genu pro *ScPdr18p* způsobuje zvýšenou akumulaci meziproduktů biosyntetické dráhy ergosterolu (jako jsou lanosterol, skvalen a další) a snížení obsahu ergosterolu v plazmatické membráně, což je doprovázeno i poklesem membránového potenciálu buněk. Jeho přítomnost naopak vede ke zvýšené odolnosti buněk vůči xenobiotikům a dvojmocným kovovým iontům jako je Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} nebo Zn^{2+} . Předpokládá se tedy, že hraje roli přímo při inkorporaci ergosterolu do plazmatické membrány. [57]

Nejlépe charakterizovaným MRP proteinem kvasinek *S. cerevisiae* je **ScYor1p**, který byl identifikován jako transportér zodpovědný za rezistenci buněk vůči oligomycinu [20]. Je to zřejmě jediný MRP protein nacházející se v plazmatické membráně buněk [23] a je považován společně s pumpami *ScPdr5p* a *ScSnq2p* za hlavního původce mnohočetné lékové rezistence (MDR) u kvasinek *S. cerevisiae*. Substráty *ScYor1p* tvoří především anionty [39]. Substrátové specifity všech tří hlavních MDR pump se do značné míry překrývají (např. v případě itraconazolu či flukonazolu) a exprese proteinu *ScYor1p* je řízena stejnými transkripčními faktory jako *ScPdr5p*, *ScSnq2p*, *ScPdr10p* a *ScPdr15p* [52]. Protein *ScYor1p* je také flopázou pro fosfatidyletanolamin [28].

Další transportní protein kvasinek *S. cerevisiae* z rodiny MRP je **ScYcf1p**, který se na rozdíl od výše zmíněných nenachází v plazmatické membráně ale v membráně vakuol, kde transportuje ionty těžkých kovů navázané na glutathion S [20, 44], takže jeho nadprodukce v buňkách je příčinou jejich zvýšené odolnosti vůči kadmii (ale také arsenu či antimonu). Je možné, že hraje roli i při apoptóze buněk [23]. Vakuolární MRP pumpou homologní s *ScYcf1p* je pumpa **ScBpt1p**, která se také podílí na odstraňování kadmia z cytosolu buněk a také může transportovat glutathion a jeho konjugáty [23].

Kvasinky *S. cerevisiae* exprimují ještě vakuolární MRP pumpu **ScYbt1p**, která transportuje žlučové kyseliny a látky podobné detergentům do lumenu vakuoly, čímž se pravděpodobně také podílí na ochraně buněk před toxickým stresem [23].

Kvasinky *S. cerevisiae* mají čtyři zástupce z MDR rodiny, z nichž nejvýznamnější postavení má první objevený kvasinkový ABC protein **ScSte6p**, který transportuje feromon α -faktor ven z buněk. Tento membránový protein je homologní s lidským P-glykoproteinem [44], ale nepodílí se na vzniku mnohočetné lékové rezistence [24]. Ostatní tři proteiny se nacházejí v membráně mitochondrií. Zatímco protein **ScMdl1p** odstraňuje z mitochondrií peptidy, které vznikají

při proteolýze membránových proteinů z vnitřní membrány mitochondrií a může hrát roli i při odolnosti buněk vůči oxidativnímu stresu, role jeho homologu **ScMdl2p** zůstává nejasná [23]. Posledním zástupcem MDR rodiny u kvasinek *S. cerevisiae* je transportér poloviční délky (na rozdíl od předchozích tří) **Atm1p**, který jako homodimer exportuje Fe/S proteiny z mitochondriální matrix [20, 23, 44].

Zástupce ABC importérů u *S. cerevisiae* představují pumpy **ScAus1p** a **ScPdr11p** (homology pump *ScSnq2p* a *ScPdr12p*). Tyto pumpy transportují cholesterol, ergosterol a další steroly do buněk, takže jsou nezbytné při anaerobním růstu, kdy si buňky nejsou schopny samy syntetizovat steroly [19, 24, 43].

Genom *S. cerevisiae* obsahuje geny pro 28 MFS transportérů [58], z nichž jen některé se v menší míře podílejí na vzniku MDR. Např. **ScAtr1p** způsobuje rezistenci na aminotriazol [35].

1.4.2 Transportéry *Kluyveromyces lactis*

Nejprozkoumanější PDR pumpou u kvasinek *K. lactis* je **KIPdr5p** objevená v roce 2001. Tato 172 kDa pumpa je z 63,8 % identická s *ScPdr5p*, z 62,8 % identická s *ScPdr15p* a z 59,5 % identická s *ScPdr10p* [59]. Oproti *ScPdr5p* je její transkripce regulována jediným transkripčním faktorem *KIPDR1* (Drobná et al., 2008). Přítomnost pumpy *KIPdr5p* v membránách buněk zvyšuje jejich rezistenci vůči oligomycinu (jako *ScYor1p*), rhodaminu a azolovým antimykotikům [59, 60]. Genom *K. lactis* kóduje ještě dva proteiny podobné pumpám *KIPdr5p* a *ScPdr5p*, z nichž jeden je zřejmě homolog *ScSnq2p* a druhý zřejmě homolog *ScPdr15p* [61], jejich příspěvek k rezistenci buněk však nebyl dosud zkoumán.

Dalším objeveným proteinem, který má svůj podíl na zvýšené odolnosti kvasinkových buněk *K. lactis* je **KIPdr16p**. Tento protein je z 66 % podobný *ScPdr16p* a pravděpodobně se také angažuje při syntéze ergosterolu, protože jeho odstranění vede k hromadění lanosterolu a snížení obsahu ergosterolu v membránách buněk [62]. Ovlivněním složení membrány může *KIPdr16p* měnit pasivní difuzi látek přes membránu. Přítomnost tohoto proteinu v buňkách zvyšuje jejich odolnost vůči azolům, oligomycinu, NQO a alkalickým iontům [62]. I tento protein je regulován jediným transkripčním faktorem *KIPDR1*, i když v menší míře než *KIPdr5p* [63].

V těchto kvasinkách byl dále identifikován protein **KIYbt1p**, vakuolární ABC transportér [61], jehož konkrétní funkce v těchto kvasinkách není doposud známá.

Genom kvasinky *K. lactis* dále obsahuje geny pro homology proteinů *ScPdr12p* (***KIPdr12p***), *ScYor1p*, *ScYcf1p* či *ScAtm1p*, nebyly však identifikovány geny pro proteiny podobné *ScPdr11p* nebo *Aus1p* [61]. Role těchto homologních proteinů zatím nebyla blíže studována.

Byly identifikovány dva MFS transportéry, které se podílí na exportu xenobiotik z buněk *K. lactis*, protein ***KIKnq1p***, jehož substrátem jsou např. NQO, bifonazol nebo ketokonazol [64], a protein ***KITpo1p***, který transportuje polyaminy [63].

1.4.3 Transportéry *Candida albicans*

Kvasinky *Candida albicans* mohou exprimovat až 28 ABC proteinů plné délky, což je velmi podobné množství jako u *S. cerevisiae*, a 95 MFS proteinů [28, 65]. U těchto kvasinek se PDR proteiny označují jako CDR (z anglického *Candida drug resistance*). Genom *C. albicans* obsahuje 9 ABC pump z rodiny PDR, z čehož 7 má plnou délku [8, 28].

U kvasinek *C. albicans* byly identifikovány 4 proteiny homologní s *ScPdr5p* a tedy i *KIPdr5p* [66]. První identifikovaný a nejvýznamnější 170 kDa velký protein byl označen jako ***CaCdr1p*** (56 % identita a 76 % podobnost s *ScPdr5p*, 42 % identita s *ScSnq2p* a 53,8 % identita s *KIPdr5p* [49, 59, 67]). Tento protein odstraňuje z buněk velké množství různých látek včetně azolových sloučenin či steroidů [28, 44], čímž se právě jeho nadprodukce stává hlavní příčinou mnohočetné lékové rezistence u kvasinek *C. albicans*. Podobně jako *ScPdr5p* je i *CaCdr1p* flopázou pro membránový lipid fosfatidyletanolamin [44]. Jeho zvýšená exprese je pozorována u buněk v hýřivé fázi růstu a může být také vyvolána stresem (jako u *ScPdr5p*) [68]. Tento transportér může navíc fungovat i jako protonová pumpa, čímž snižuje u některých látek průnik do buněk, pokud je závislý na pH [24].

Pumpa ***CaCdr2p*** je z 84 % identická s *CaCdr1p* a je také spojována se vznikem MDR [8, 24]. Pumpa *CaCdr2p* je opět fosfolipidovou flopázou [24]. Některé substráty pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* mohou tlumit transport fosfolipidů těmito pumpami, což dokládá, že vazebná místa pro fosfolipidy a jiné substráty ve vazebné kapse těchto pump se překrývají [24]. Oproti početné skupině substrátů pumpy *CaCdr1p* nebylo dosud identifikováno mnoho substrátů či inhibitorů pumpy *CaCdr2p* [69].

Proteiny **CaCdr3p** (56 % identita s *CaCdr1p*, 55% identita s *CaCdr2p*) a **CaCdr4p** nehrají roli při vzniku mnohočetné lékové rezistence. Protein *CaCdr3p* je exprimován jen v určité fázi životního cyklu buněk, pravděpodobně je flipázou, ale jeho funkce zatím nebyla blíže objasněná [17], protein *CaCdr4p* je stejně jako *CaCdr1p* a *CaCdr2p* fosfolipidovou flopázou [28].

Protein **CaPdr16p** je homologem proteinu *ScPdr16p* (54 % identita, 68 % podobnost) a shodně s ní také patří do rodiny přenašečů fosfatidylinositolu [70]. Jeho delece vede až k dvojnásobnému snížení rezistence buněk *C. albicans* vůči účinkům azolů [70]. Společně s pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* bývá také nadprodukován v buňkách rezistentních klinických izolátů *C. albicans*, protože je regulován stejným transkripčním faktorem jako tyto pumpy [71].

U těchto kvasinek byly dále identifikovány homology proteinů *ScSnq2p* [66], *ScYor1p*, vakuolárních pump *ScYcf1p* a *ScBpt1p* a všech tří identifikovaných mitochondriálních proteinů *ScMdl1p*, *ScMdl2p* a *ScAtm1p* [8] (viz tabulka 1-2). Buňky *C. albicans* navíc exprimují proteiny **CaCdr11p**, **CaHst6p**, pravděpodobný transportér feromonu a-faktoru a protein **CaMlt1p**, který transportuje fosfatidylcholin do vakuol a podílí se na virulenci těchto kvasinek [8].

Na mnohočetné lékové rezistenci buněk *C. albicans* se vedle ABC pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* výrazně podílí i MFS transportér označovaný jako **CaMdr1p**.

	Název	Rodina	Lokalizace	Funkce
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScSte6p	MDR	plazm. membrána	sekrece feromonu α
	ScPdr5p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	ScPdr10p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	ScPdr11p	PDR	plazm. membrána	import sterolů do buněk rostoucích anaerobně
	ScPdr12p	PDR	plazm. membrána	obrana proti slabým kyselinám
	ScPdr15p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	ScPdr17p	PDR	endoplazmatické retikulum	role při syntéze fosfolipidů
	ScPdr18p	PDR	plazm. membrána	transport a inkorporace ergosterolu do membrány
	ScYbt1p	MRP	membrána vakuol	detoxifikace buněk
	ScAus1p	PDR	plazm. membrána	import sterolů do buněk rostoucích anaerobně
<i>S. cerevisiae/ K. lactis/ C. albicans</i>	Snq2p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	Pdr16p	PDR	endoplazmatické retikulum/váčky	přenašeč fosfatidylinositolu, role při syntéze ergosterolu
	Yor1p	MRP	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	Ycf1p	MRP	membrána vakuol	detoxifikace buněk (ionty těžkých kovů)
	Atm1p	MDR	membrána mitochondrií	export Fe/S proteinů z mitochondrií
<i>K. lactis</i>	K/Pdr5p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	K/Pdr12p	PDR	plazm. membrána	neznámá
	K/Ybt1p	MRP	membrána vakuol	neznámá
<i>Candida albicans</i>	CaCdr1p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	CaCdr2p	PDR	plazm. membrána	obrana proti toxickému stresu
	CaCdr3p	PDR	plazm. membrána	flipáza
	CaCdr4p	PDR	plazm. membrána	flopáza fosfolipidů
	CaCdr11p	PDR	plazm. membrána	neznámá
	CaMlt1p	MRP	membrána vakuol	import fosfatidylcholinu
	CaHst6p	MDR	plazm. membrána	transport feromonu a-faktor
<i>S. cerevisiae/ C. albicans</i>	Mdl1p	MDR	membrána mitochondrií	transport peptidů z mitochondrií
	Mdl2p	MDR	membrána mitochondrií	neznámá
	Bpt1p	MRP	membrána vakuol	detoxifikace buněk

Tabulka 1-2 Přehled ABC transportérů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*. Červeně jsou zvýrazněny proteiny, které jsou studovány v disertační práci.

1.5 Léčba kvasinkových infekcí a mnohočetná léková rezistence

Klinicky nejvýznamnější roli hraje mnohočetná léková rezistence především u podmíněně patogenních kvasinek *C. albicans*. Při studiu rezistence tohoto druhu kvasinek se pro minimalizaci rizika při manipulaci s nimi často provádějí experimenty na kvasinkách *S. cerevisiae*, ve kterých byly heterologně exprimovány MDR pumpy z kvasinek *C. albicans* – především *CaCdr1p* a *CaCdr2p* (ale i *CaMdr1p*) [72, 73]. V takových systémech se však (nejen) exprese těchto genů řídí metabolismem příjemce [72] a výsledky těchto studií pak nemusí přesně odpovídat vlastnostem těchto proteinů v původním organismu.

Důraz je však kladen také na výzkum přímo na klinických izolátech *C. albicans* získaných od pacientů trpících častými a stále se vracejícími kandidózami, jejichž původci jsou rezistentní na užívaná antimykotika (nejčastěji azolové sloučeniny). Převážná většina těchto izolátů disponuje zvýšeným množstvím MDR pump v membráně, především *CaCdr1p* i *CaCdr2p* [69, 74], ale také pumpy *CaMdr1p* [75]. Navíc u nich bývá i zvýšená exprese proteinu *CaPdr16p* [70] či enzymů biosyntetické dráhy [75] včetně *CaErg11p* [76]. U některých izolátů byly zjištěny také bodové mutace enzymů *CaErg11p* a *CaErg3p* (shrnutí v [12],[77] a [78]).

Masový rozmach dlouhodobého a opakovaného užívání antibiotik a antimykotik, u nichž byly minimalizovány vedlejší účinky na lidské buňky, vedl k rostoucí odolnosti patogenních organismů vůči nim [79]. To spolu se zvyšujícím se podílem lidí s narušenou imunitou v populaci (předčasně narozené děti, staří lidé, pacienti trpící AIDS, lidé po chemoterapii či pacienti užívající imunosupresiva po transplantaci) vede k nebývale důležitému cíli překonat rezistenci u patogenních mikroorganismů, které mohou způsobit i smrt těchto osob.

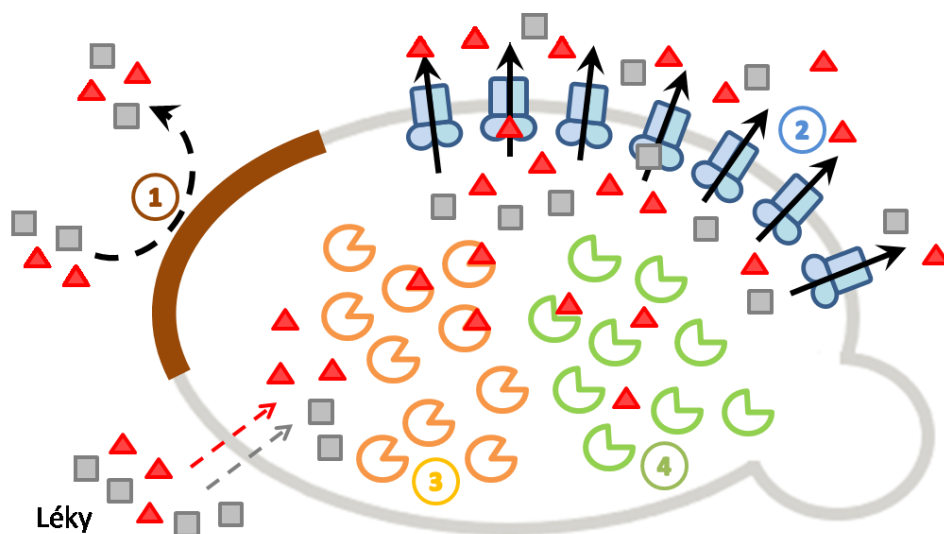
1.5.1 Možnosti buněčné obrany proti lékům

Kvasinkové buňky (podobně jako ostatní eukaryotní buňky) mají ke své ochraně proti cizorodým látkám (včetně léků) více možností. Mohou aktivně snížit vnitrobuněčnou koncentraci těchto látek tím, že cíleně pozmění složení membrány (či buněčné stěny), aby byla pro tyto látky méně propustná, omezí aktivní transport xenobiotika do cytosolu nebo nadprodukuje proteiny, které transportují léky ven

z buněk (např. MDR pumpy). Dále snižují účinnost léků tak, že zvýší produkci proteinů/enzymů, které jsou cílem daného léčiva, či je modifikují tak, aby se jejich aktivita zvýšila nebo/a jejich afinita k danému léku maximálně snížila (obr. 1-7). Navíc může být buněčná ochrana ještě posílena tím, že je léčivo deaktivováno v cytosolu pomocí enzymatického aparátu či transportováno do organel, a společně s tím buňky také často zintenzivní opravu DNA. [27, 67, 77, 80]

1. Změna složení plazmatické membrány (a buněčné stěny) → zvýšení rigidity → snížení průniku léčiva do buněk

2. Nadprodukce exportních MDR pump → snížení vnitrobuněčné koncentrace léčiva



3. Nadprodukce cílového enzymu (proteinu) → snížení účinnosti léčiva

4. Modifikace cílového proteinu → změna afinity k léčivu → snížení jeho účinnosti

Obr. 1-7 Schematické znázornění čtyř hlavních příčin rezistence kvasinek vůči lékům. Vytvořeno podle [67].

Většina výše zmíněných ochranných opatření je účinná pouze vůči úzkému spektru léčivých látek, proto aktivní odstraňování pomocí MDR pump, které transportují stovky různých chemických sloučenin ven z buněk a tím mohou vést až k mnohočetné lékové rezistenci, tolik vyniká mezi ostatními možnostmi.

Mnohočetná léková rezistence nejvíce komplikuje jak léčbu rakoviny, tak léčbu infekcí způsobených patogenními mikroorganismy, v případě kvasinek se pak nejčastěji jedná o kandidózy. Mnoho léků (od peptidů, steroidních hormonů, přes azoly, antibiotika a antimykotika až po chemoterapeutika) je tvořeno poměrně malými lipofilními planárními molekulami, takže mohou procházet membránou

do buněk [27]. Většina z nich je však substrátem hlavních kvasinkových MDR pump (*ScPdr5p*, *ScSnq2p*, *KIPdr5p*, *CaCdr1p* a *CaCdr2p*), takže jejich vnitrobuněčná koncentrace je aktivně snižována a tím se redukuje i jejich účinnost. Nejen z tohoto důvodu je znalost substrátové specifity jednotlivých MDR transportérů stále v centru vědecké i lékařské pozornosti.

1.5.1.1 *Nespecifický transport zprostředkovaný MDR proteiny - vazebná kapsa*

Proč však vede nadprodukce některých pump k mnohočetné lékové rezistenci? Z jakého důvodu je jejich substrátová specifita tak málo omezená?

Vzhledem k tomu, jak široké spektrum nesourodých látek jsou schopny MDR pumpy transportovat, nebylo dosud možné identifikovat specifické chemické vlastnosti látek, které by předem určovaly, zda bude sloučenina substrátem pumpy či nikoliv. Při zkoumání rozpoznávání jednotlivých substrátů *ScPdr5p* a jejich vlastností byla objevena významná role celkového povrchu transportovaných molekul, optimální velikost transportovaných substrátů je mezi 200 a 225 Å³ (minimálně však 90 Å³), a schopnost substrátů tvořit vodíkové vazby [81]. Zřejmě však již není tolik podstatná samotná hydrofobicita látek či jejich schopnost ionizace [81]. Je možné, že hydrofobicita substrátů je spjatá s velikostí molekul, tj. čím je molekula větší, tím je většinou i více hydrofobní, a proto požadavek na velikost molekul může být primární a zahrnovat v sobě také jejich hydrofobicitu. Malé molekuly navíc rychle difundují přes membránu, větší procházejí pomaleji, čímž se zvyšuje šance jejich zachycení ve vazebné kapse přímo z membrány a mohou tedy být exportovány MDR pumpou efektivněji. U *CaCdr1p* jsou preferované substráty často rozvětvené aromatické sloučeniny, které tuto podmínku splňují [28].

Obecně je jako vysvětlení velmi široké substrátové specifity přijímán předpoklad, že ABC proteiny (konkrétně jejich TMD) tvoří v membráně velkou hydrofobní vazebnou kapsu, ve které se nachází množství vazebných míst, která se mohou i překrývat a lišit v afinitě k jednotlivým substrátům, případně se do jednotlivých vazebných míst mohou vázat odlišné substráty a být i společně transportovány [8, 19, 27, 31, 34]. Tento předpoklad potvrzují také výzkumy na hlavním lidském MDR transportéru P-glykoproteinu, kde se předpokládá až 7 odlišných vazebných míst ve vazebné kapse [49, 79]. Vazebná kapsa pumpy *CaCdr1p* obsahuje nejméně tři vazebná místa [28, 82], jedno pro rhodamin 6G

(R6G) a azoly (itakonazol, ketokonazol, mikonazol)^{††}, jiné místo pro flukonazol a pravděpodobně další pro iodoarylazidoprazosin [28, 83]. Pomocí cílených jednobodových mutací bylo zjištěno, že vazebnou kapsu *CaCdr1p* tvoří aminokyseliny z helixů 1, 3 a 6 z jedné TM domény a z helixů 7, 9, 11 a 12 z druhé TMD^{‡‡} [79]. Helix 4 se vůbec nepodílí na vazbě substrátů, zatímco helix 10 je součástí vazebné kapsy pouze v otevřené konformaci proteinu [79]. Vazebná kapsa je také tvořena převážně hydrofobními a aromatickými aminokyselinami, proto má větší afinitu k hydrofobním než k hydrofilním látkám [8, 79].

U pumpy *ScPdr5p* se již od roku 1996 předpokládalo více vazebných míst ve vazebné kapse [84]. Sledováním akumulace radioaktivně značených substrátů chloramfenikolu a tritylimidazolu (TI) v buňkách bylo za pomoci série relativně jednoduchých strukturně podobných substrátů zjištěno, že jde o nejméně 3 vazebná místa, do jednoho se váže chloramfenikol, do jiného TI a existuje nejméně jedno další [81]. Klotrimazol (Clo) je schopný úplně kompetitivně inhibovat transport chloramfenikolu a méně výrazně blokovat i transport tritylimidazolu, z čehož vyplývá, že některé substráty se mohou vázat do více vazebných míst (případně s lišící se afinitou) nebo se některá vazebná místa mohou překrývat [81]. V následující studii byla místa označena jako 1, 2 a 3, přičemž místo 1 bylo charakterizováno výtokem fluorescenční sondy R6G, místo 2 výše zmíněným radioaktivně značeným TI. S použitím jiné série jednoduchých substrátů bylo ukázáno, že substráty místa 1 mají většinou tři skupiny akceptorů vodíkové vazby (donory elektronového páru), nebo alespoň dva donory elektronového páru a jednu elektronegativní skupinu na aromatickém kruhu, která umožňuje elektrostatické interakce mezi substrátem a místem 1, substrátům místa 2 stačí mít jednu skupinu akceptoru vodíkové vazby [85]. Následující výzkumy však ukázaly na substráty místa 1, které nesplňují ani jedno z uvedených pravidel, takže nelze souhrnně definovat, jaké jednoznačné vlastnosti má substrát vazebného místa 1 [86]. Podobně jako u chloramfenikolu způsobuje klotrimazol koncentračně závislou inhibici transportu R6G, která je kompletní po přidání 40 μM Clo [85]. Podle vzájemného ovlivnění transportu modelových substrátů míst 1 a 2 se zdá, že se nachází v těsné

^{††} *Potvrzeno pomocí zjištěné kompetice R6G s azoly [82].*

^{‡‡} *V jiné publikaci je uváděno, že vazebnou kapsu tvoří helixy 1, 2 a 11 na jedné straně a na druhé helixy 4, 5 a 8 [8]. Tyto výsledky vycházejí ze série 250 jednobodových mutací proteinu *CaCdr1p*.*

blízkosti, takže substráty vazebného místa 1 mohou obsadit či stericky ovlivnit i vazebné místo 2 [85], nebo snad dokonce místo 1 zahrnuje i vazebné místo 2 [86]. Klotrimazol navíc inhibuje ATPázovou aktivitu pumpy *ScPdr5p*, což ale překvapivě nepřerušuje transport tímto proteinem, stejný účinek má i TI [26]. Jako jediný se ani do místa 1 ani do místa 2 neváže tetrabutylcín (TBT), takže definuje vazebné místo 3 ve vazebné kapse *ScPdr5p*, které má zřejmě nároky na hydrofobicitu substrátu [86]. Metodou výtoku sondy R6G byly identifikovány jako další substráty vážící se do místa 1 2-(metyl-trityl-amino) etanol (MTAE) a 2-(chloro-etyl)-metyl-tritylamin. Detekcí koncentračně závislé úplné inhibice transportu značeného TI byly nalezeny další substráty vážící se do místa 2 (např. tritylamin) [86].

U ostatních kvasinkových MDR pump však nebyly tak podrobné studie provedeny, takže jejich vazebná kapsa není ani zdaleka tak detailně zmapována.

1.5.2 Možnosti překonání mnohočetné lékové rezistence

Strategií, jimiž lze překonat mnohočetnou lékovou rezistenci u lidských patogenů bez zásahu do genetického kódu buněk, je několik. Nejjednodušší možností je zvýšení dávek antimykotika tak, že vstup kvantitativně převyšuje aktivní výstup [42]. Tím se však bohužel zintenzivní i nežádoucí vedlejší účinky na lidské buňky a tato metoda nemusí vždy vést k vyléčení pacienta.

Další cestou je snaha vyvinout nová léčiva, která nebudou MDR pumpami transportována. Nejčastěji se přistupuje k modifikacím již používaných účinných léků, které jsou známými substráty některé MDR pumpy. Při těchto úpravách však často ztrácí nově vyvinuté látky svůj léčebný účinek, nehledě na to, že většina buněk obsahuje více MDR transportérů, které nemusí mít stejné substrátové preference [27]. Vývoj nového účinného léku je navíc časově i finančně značně náročný a metody, jimiž lze otestovat, zda jsou nová léčiva substrátem MDR pump, jsou velmi omezené. Z tohoto důvodu je žádoucí hledat nejen nové účinné látky, ale také nové metody, jimiž lze ověřit, že tyto látky nebudou transportovány MDR pumpami ven z buněk [87]. Vzhledem k tomu, že v případě vnitrobuněčných cílů většiny léčiv má buňka více možností jeho zneškodnění (viz kapitola 1.5.1 a obr. 1-7), nadějnými kandidáty na antimykotika jsou povrchově aktivní látky, které působí na buněčnou stěnu a membránu a nemusí tedy proniknout až do buněk [88].

Pokud bychom však chtěli k léčbě použít známé léčivo, které je substrátem přítomné MDR pumpy, bez nutnosti zvyšování jeho dávek pacientovi, můžeme

využít tzv. kombinované terapie. Při tomto postupu se podá lék společně s další látkou, která způsobí zablokování exportu léčiva MDR transportérem (nazýváme ji tedy inhibitorem), čímž dojde ke zvýšení vnitrobuněčné koncentrace účinného léku [27, 88]. Inhibitory mohou blokovat výstup léčiva z buněk jednak tím, že jsou také substrátem pumpy a soutěží (kompetují) tak s léčivem o transport pumpou, nebo zablokují činnost MDR pump přímou interakcí s proteinem či nepřímo ovlivní jeho blízké lipidní okolí. Inhibitor nemusí mít nutně antifungální vlastnosti, jeho hlavní příspěvek k léčbě spočívá především v inhibici aktivního odstraňování léčiva MDR pumpami [89]. Známými inhibitory/substráty pumpy *ScPdr5p* jsou enniatin B nebo farnesol, u pumpy *CaCdr1p* je to také enniatin B nebo jeho analog beauvericin, který inhibuje i činnost *CaCdr2p*. Pro účinnou kombinovanou terapii lze použít např. běžně používaná antimykotika jako je ketokonazol či itraconazol společně s beauvericinem [87].

Jinou možností zastavení transportu léčiva z buněk je vyčerpání ATP, které poskytuje energii k transportu ABC pumpami [42], avšak stresory vedoucí k vyčerpání ATP mohou působit i na buňky pacienta.

1.6 Způsob účinku chemických stresorů (modulátorů, inhibitorů a substrátů)

Jak již bylo několikrát zmiňováno, je známo velké množství substrátů hlavních MDR pump různých kvasinkových druhů (*Pdr5p*, *Snq2p*, *Cdr1p*, *Cdr2p*), ať už jsou to antibiotika či antimykotika, ionofory (CCCP, enniatin, beauvericin), fluorescenční substráty (rhodamin 6G, rhodamin 123, rhodamin B, Nile red, diS-C₃(3)), ale stejně tak i fyziologické substráty jako steroidy nebo lipidy [28, 52, 90, 91]. Zatímco u některých substrátů/inhibitorů jsou známé informace o jejich způsobu účinku, cílových enzymech nebo afinitě k vazebným místům ve vazebné kapse MDR pump, vyhledávání látek s potenciálem inhibovat tyto pumpy je stále v centru nejen lékařské pozornosti.

1.6.1 Látky způsobující vyčerpání ATP

Omezení či zastavení činnosti pump závislých na energii z hydrolyzy ATP je možné dosáhnout použitím 2-deoxy-D-glukózy (2-DG). Jedná se o malou molekulu, která je analogem D-glukózy, a hojně se používá jako glykolytický inhibitor [41, 92].

2-DG vstupuje do glykolýzy, kterou však zastavuje po třetí reakci a inhibuje enzym hexokinázu [92] a tím kompetitivně blokuje i činnost enzymu fosfoglucoizomerázy [93]. Jejím působením tak dochází k postupnému vyčerpání buněčných zásob ATP [41]. K vyčerpání ATP se mohou používat i inhibitory mitochondriální H^+ -ATPázy jako je např. oligomycin.

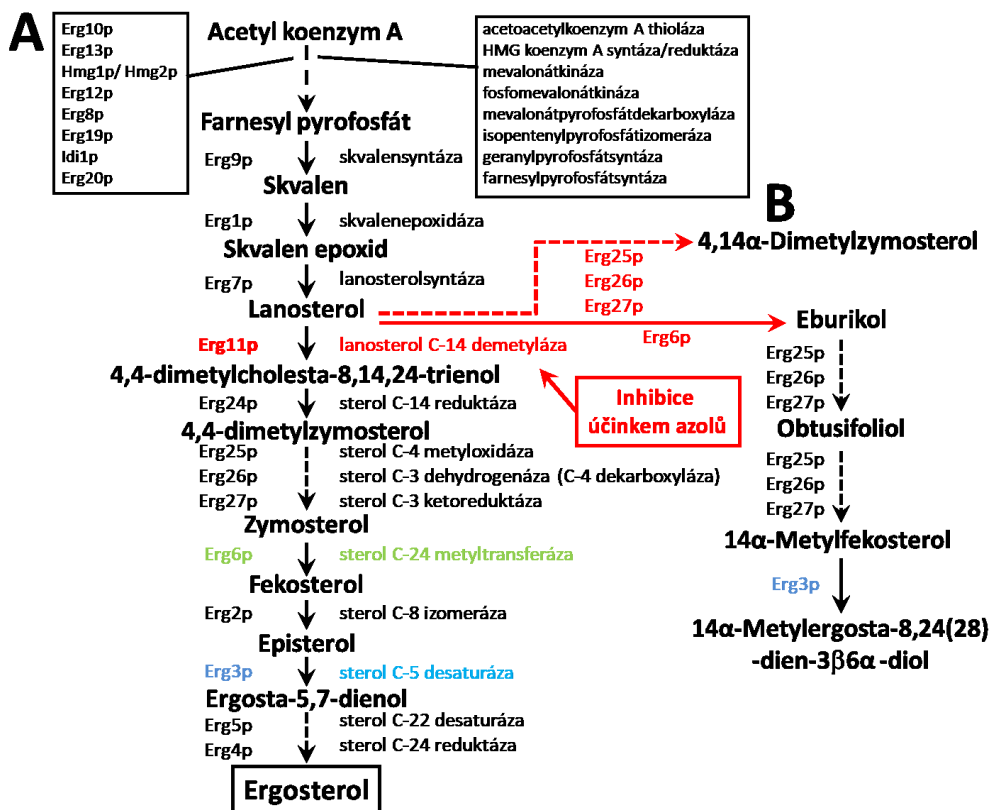
1.6.2 Antimykotika (azolové sloučeniny)

Mezi nejběžněji používaná antimykotika v lékařské praxi obecně patří azolové sloučeniny, kromě klotrimazolu je to ketokonazol, mikonazol, flukonazol a itraconazol. Azoly byly objeveny koncem 60. let minulého století a během uplynulých více než 40 let zažívá jejich používání velký rozmach a jsou stále vyvíjeny nové varianty [94]. Tyto sloučeniny patří mezi tzv. fungistatika, tj. do určité výše jejich koncentrace v okolí jsou kvasinkové buňky schopné přežít, ale dojde k zastavení jejich růstu a rozmnožování [88].

Azolová antimykotika jsou syntetické látky se shodným základním mechanismem účinku. Všechny azoly narušují biosyntézu ergosterolu (obr. 1-8), nejdůležitějšího strukturního sterolu plazmatické membrány kvasinek, tím, že inhibují enzym spojený s cytochromem P450 14α -lanosterol demetylázu (Erg11p), což je klíčový enzym této dráhy v kvasinkách [42, 95]. Jeho inhibice vede k zastavení buněčného růstu [88] a následkem přerušení syntézy ergosterolu dochází jednak k postupnému vyčerpání ergosterolu z plazmatické membrány [42], jednak k hromadění sterolových meziproductů v buňkách a buněčných membránách [74, 88, 96]. Obě tyto skutečnosti mohou mít za následek zvýšení propustnosti membrány pro další léčiva i její větší náchylnost k poškození [96].

Azolové sloučeniny můžeme podle struktury rozdělit na deriváty imidazolu (klotrimazol, ketokonazol, mikonazol, bifonazol) a deriváty triazolu (itraconazol, flukonazol). Starší imidazolové sloučeniny mají komplexnější účinek na buňky, jejich vyšší koncentrace mohou působit přímo na buněčnou membránu, inhibují i některé enzymy spojené s membránou nebo biosyntézu lipidů [96, 97]. Jejich vazba na Erg11p je navíc méně specifická a mohou tak napadat i jiné enzymy spojené s cytochromem P450 [97]. Novější triazolové sloučeniny jsou selektivnější a jsou pomaleji metabolizovány, takže mají zanedbatelný vliv na syntézu sterolů lidského organismu [98] a minimální výskyt vedlejších nežádoucích účinků [94]. Proto se

pro léčbu systémových mykóz volí hlavně triazolové sloučeniny a imidazoly se používají převážně pouze k lokálním aplikacím [94].



Obr. 1-8 Azoly narušují syntetickou dráhu ergosterolu. Biosyntetická dráha ergosterolu v kvasinkách (A) s vyznačenými významnými enzymy a její vedlejší dráha při inhibici enzymu Erg11p účinkem azolů (červeně) (B). Vytvořeno podle [99, 100].

Imidazolové deriváty první generace jsou dodnes hojně využívané v dermatologii a gynekologii. **Klotrimazol** je složkou krémů proti kožním mykózám (jako je Aknecolor nebo Canesten) a tablet užívaných pro léčbu vaginálních kandidóz (např. Candibene) [94, 101], **mikonazol** se v 70. letech minulého století pravidelně používal i k léčbě systémových mykóz, dnes je však již překonán modernějšími triazolovými sloučeninami a používá se formou gelů (např. Daktarin) či tablet především proti povrchovým a slizničním mykózám [94]. Také deriváty imidazolu druhé generace mají své místo při léčbě dermatologických a gynekologických onemocnění způsobených kvasinkami. Šampony proti lupům (např. Nizoral) obsahují **ketokonazol** a krémy na kožní či nehtové mykózy (např. Canespor nebo Mycospor) zase **bifonazol** [94, 101].

Triazolová antimykotika jsou označována jako třetí generace azolových derivátů [94]. **Flukonazol** s minimem vedlejších účinků dodnes vykazuje dobré výsledky při léčbě kožních i slizničních infekcí, **itraconazol** s širším spektrem účinku^{§§} se používá jak na kožní mykózy, tak ve formě tablet při léčbě mykóz sliznic či vnitřních orgánů [101]. Od konce 80. let jsou nejvyužívanějšími (azolovými) léčivy právě flukonazol a itraconazol^{***} pro jejich schopnost bezpečně a efektivně léčit lokální a systémové houbové infekce bez velkých vedlejších účinků [12, 102].

Díky intenzivnímu a plošnému používání azolových sloučenin došlo k dlouhodobému vystavení patogenních organismů jejich účinkům, což významnou měrou přispělo ke zvýšenému výskytu rezistentních kmenů nejen u kvasinek [79]. Kvasinkové buňky si v reakci na azoly vyvinuly vysoce účinné obranné mechanismy (obr. 1-7). Kromě (1) nadměrné exprese MDR pump, které aktivně odstraňují azoly z buněk, kvasinky také (2) nadměrně exprimují právě cílový enzym azolů Erg11p nebo (3) ho cíleně jednobodově mutují tak, aby se výrazně snížila jeho afinita k vazbě azolů [28, 42, 74], případně (4) pozmění biosyntetickou dráhu ergosterolu (obr. 1-8A) tak, aby nevznikaly vedlejší toxické produkty této dráhy [12, 103, 104]. U některých buněk kvasinek *C. albicans* odolných vůči účinkům azolů byla také zjištěna mutace enzymu Erg3p, při jehož dysfunkci buňky hromadí netoxický meziprodukt vedlejší syntetické dráhy ergosterolu 14 α -metylfekosterol (viz obr. 1-8B) [88, 103, 104]. Předchozí studie navíc ukázaly, že ketokonazol může díky přímé interakci s transkripčním faktorem ScPdr1p stimulovat expresi některých PDR proteinů (ScPdr5p a ScPdr15p) [9], ale také enzymů syntetické dráhy ergosterolu (Erg3p a Erg11p) [88], takže dlouhodobé vystavení buněk jeho účinkům u nich indukuje vznik MDR a snižuje tak jeho účinnost.

Azoly jsou známé substráty hlavních MDR pump ScPdr5p a K/Pdr5p ale také CaCdr1p [39, 60, 63, 72-74, 105, 106] (a také lidského P-glykoproteinu [107]), ale u pumpy CaCdr2p se informace o jejich transportu rozcházejí v závislosti na použitých kmenech kvasinek [73, 108]. Některé azoly jsou také substráty MFS proteinů, konkrétně proteinu CaMdr1p [88]. Předpokládá se, že jejich vazebné místo je hluboko uvnitř vazebné kapsy MDR pumpy [79].

^{§§} Itraconazol účinkuje proti širokému spektru kvasinkových a houbových druhů, často se používá v případech, kdy selže léčba flukonazolem [94].

^{***} Itraconazol se používá méně na systémová onemocnění, protože jeho vstřebávání je závislé na kyselém prostředí v žaludku, takže se těžko dosahuje potřebné účinné koncentrace [94, 102].

1.6.3 Ionofory

Ionofory jsou látky, které dokáží prostoupit membránou při současném přenosu iontů. Tím jednak narušují iontovou homeostázu buněk (i permeabilitu buněčné membrány pro daný typ iontů), jednak ovlivňují membránový potenciál buněk [109].

Látkou s ionoforickými vlastnostmi je známý mykotoxin **enniatin**, který je produkován plísněmi rodu *Fusarium* [110]. Do rodiny enniatinů patří i látka **beauvericin** (větší analog enniatinu), která byla prvně identifikována jako produkt houby z rodu *Beauveria* a je také (stejně jako enniatin) produkována plísněmi rodu *Fusarium* [111]. Enniatin i beauvericin se tedy často vyskytují jako kontaminanty kukuřice, pšenice a ječmenu, které jsou těmito plísněmi napadeny [110, 111]. Obě látky jsou cyklické hexadepsipeptidy s antibiotickými účinky [111, 112] a působí jako ionofory s vysokou selektivitou pro jednomocné, zejména draselné, ionty [110, 112]. Beauvericin může transportovat ionty alkalických kovů [111], tvořit v membránách kanály selektivní pro kationty [110] a značně narušuje hladinu také vápníku v buňkách^{†††} [87]. Jak beauvericin, tak enniatin jsou lipofilní molekuly, a proto se snadno inkorporují do buněčných membrán, kde vytvářejí dimerní struktury propustné pro ionty, čímž narušují jejich fyziologickou rovnováhu [112]. Po průchodu plazmatickou membránou mohou tyto ionofory prostoupit až do vnitřní mitochondriální membrány a zkratovat tak mitochondriální membránový potenciál důsledkem vtoku K^+ do mitochondriální matrix, čímž dochází k inhibici respirace spojené se syntézou ATP [112].

Enniatin je známým netoxickým (kompetitivním) inhibitorem^{†††} a současně také substrátem pumpy *ScPdr5p* a *CaCdr1p*, nikoliv však pumpy *ScSng2p* a *CaCdr2p* [69, 90, 113, 114] (také viz příloha 3). Bylo dokázáno, že **beauvericin** blokuje činnost^{***} obou pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* [87] a dokonce i činnost lidského P-glykoproteinu v lidských rakovinných buňkách [115]. Jeho kombinované přidání s mikonazolem vedlo ke zvýšení citlivosti buněk *C. albicans* k jeho účinkům a to i u klinických izolátů, které jsou rezistentní vůči flukonazolu [116]. Tyto skutečnosti

^{†††} Přítomnost beauvericinu v buňkách vede ke zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápníku a tím i ke vzniku oxidativního stresu, který může být předzvěstí buněčné smrti [87]. Přesné příčiny zvýšené hladiny Ca^{2+} v buňkách ani zdroj vápenatých iontů však nejsou dosud zcela objasněny.

^{***} Blokuje výtok rhodaminu 123 nebo odstraňování fluorescenční sondy *diS-C₃(3)* z kvasinkových buněk.

poukazují na jeho výrazný potenciál k použití v rámci kombinované terapie s běžně používanými antimykotiky, ale také chemoterapeutiky u lidských buněk.

1.6.4 Signální molekula - modulátor aktivity MDR pump

Hlavní signální molekula kvasinek *C. albicans* farnesol byla identifikována jako modulátor ^{§§§} MDR pump *ScPdr5p*, *CaCdr1p* a *CaCdr2p* (nikoliv *CaMdr1p*)[117]. Tento seskviterpenový alkohol, který se přirozeně vyskytuje v esenciálním oleji některých rostlin a který je prekurzorem při syntéze sterolů v kvasinkách, byl objeven jako první tzv. „quorum sensing“ molekula u eukaryotního organismu [118]. Jeho akumulace při vysoké buněčné hustotě kvasinek *C. albicans* blokuje morfologickou přeměnu kvasinkové formy na vláknitou [118], tvorbu biofilmů [119], inhibuje syntézu proteinů a translaci [120] a může indukovat apoptózu [117].

Tato látka je vhodná pro kombinovanou terapii např. s flukonazolem či itraconazolem [119] a právě její synergická funkce s běžně používanými antimykotiky představuje efektivní možnost léčby kandidóz při použití netoxických koncentrací obou látek [117].

1.7 Fluorescenční sondy pro sledování aktivity MDR pump

Substráty a inhibitory MDR pump lze identifikovat několika málo metodami. Kromě radioaktivního značení látek (substrátů) a následného sledování jejich akumulace v buňkách s aktivními MDR pumpami (jako např. v [51, 74, 81]), se často využívají i fluorescenční sondy, které jsou také často substrátem těchto pump.

1.7.1 Rhodaminová barviva

Ke sledování aktivity MDR pump je nejdéle používána potenciometrická sonda rhodamin 6G (R6G), která je aktivně odstraňována pumpami *ScPdr5p* [84], *KIPdr5p* [60] a také *CaCdr1p* a *CaCdr2p* [72, 73]. Metoda je založená na tom, že sonda je držena membránovým potenciálem uvnitř buněk a pokud je substrátem sledované MDR pumpy, je aktivně odstraňována z buněk.

Buňky se před měřením 1-2 hodiny inkubují se sondou a nechají se vyhledávat většinou přidáním 2-deoxy-D-glukózy (případně jen odmytím média a

^{§§§} *Inhibuje transport rhodaminu 6G z buněk [117].*

inkubací v pufru bez přítomnosti glukózy). Jinými slovy u buněk dojde úplnému vyčerpání ATP, takže pumpy nemohou exportovat sondu ven a to má za následek zvýšenou akumulaci R6G uvnitř buněk. Poté je sonda odmyta z vnějšího média a k buňkám se přidá glukóza [84]. Po dodání energie se aktivují přítomné MDR pumpy a dochází k výtoku sondy ven z buněk. Následně je možné pomocí fluorescenční flow cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie sledovat zbývající akumulaci sondy v buňkách [60, 90, 121], případně pomocí spektrofluorimetrie sledovat vzrůstající signál fluorescence rhodaminu z okolního pufru [84]. Různé modifikace metody zahrnují v rámci přípravy ještě např. omývání studeným pufrem (0 °C) a další manipulaci s buňkami desítky minut před samotným měřením [60, 90].

Při vyhledávání inhibitorů pump touto metodou jsou buňky inkubovány předem s testovanou látkou, a pokud nedochází po přidání glukózy k buňkám s akumulovanou sondou R6G k jeho zvýšenému výtoku ven z buněk (a je tedy detekováno více fluorescence z opůsobených buněk oproti kontrole bez opůsobení), tak je testovaná látka inhibitorem. Pokud je inhibitor přidán až po glukóze v průběhu experimentu, je vidět postupné snižování transportu sondy ven z buněk [84]. Tímto způsobem byly testovány substráty *ScPdr5p* např. v rámci studií [84] a [85] a tuto metodu lze úspěšně použít i s fluorescenční sondou rhodaminem 123, jak byly identifikovány např. inhibitory pumpy *ScPdr5p* enniatin B a D [90]. Rhodamin 123 je stejně jako R6G substrátem jak pumpy *ScPdr5p* [84], tak pumpy *CaCdr1p* [72].

1.7.2 Potenciometrická fluorescenční sonda diS-C₃(3)

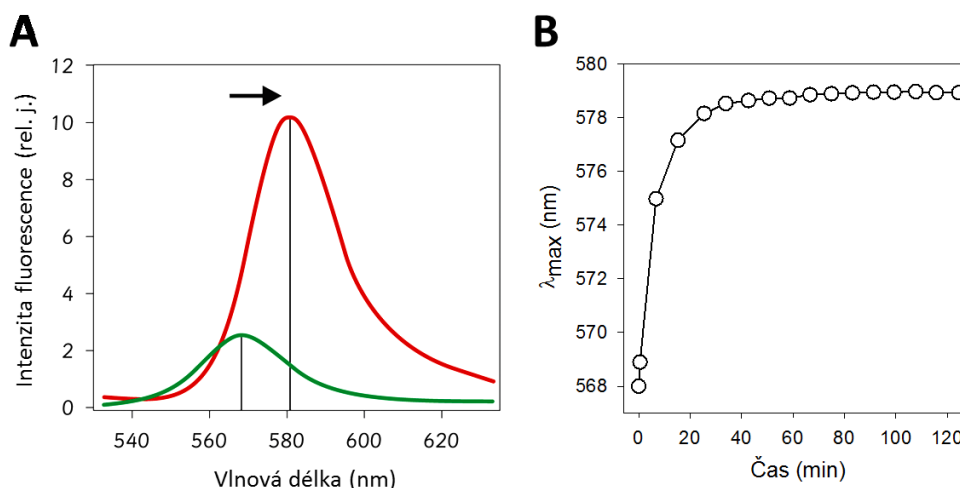
Také potenciometrická fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem MDR pump a fluorescenční metoda (diS-C₃(3) assay) vyvinutá týmem doc. Gáškové využívá vlastností této sondy ke sledování jak membránového potenciálu buněk kvasinek, tak aktivity MDR pump přítomných v jejich membráně.

Tato kladně nabitá redistribuční sonda je lipofilní, takže snadno prochází do buněk, do nichž je navíc tažena jejich záporným membránovým potenciálem. Pomocí změny vnitrobuněčné akumulace sondy tedy můžeme sledovat změny membránového potenciálu v reálném čase *in vivo* bez nutnosti (časově ani jinak) náročné přípravy buněk [122].

Charakteristickou vlastností této sondy je její reverzibilní vazba na cytosolické komponenty po jejím vstupu do buněk. Tato vazba je doprovázena posunem maxima a intenzity fluorescence (λ_{\max} a I_{\max}) sondy (viz obr. 1-9A).

Fluorescenční spektrum volné sondy má maximum na vlnové délce 569 nm, při vazbě sondy dochází k posunu polohy tohoto maxima do červené oblasti spektra až o 13 nm a ke zvýšení kvantového výtěžku fluorescence [122]. Při vhodné volbě poměru koncentrací buněk a sondy, může tento posun názorně odrážet aktuální změny membránového potenciálu [122, 123]. Časovou závislost polohy maxima fluorescence sondy λ_{\max} nazýváme „barvicí křivkou“ (obr. 1-9B) [124], proto fluorescenční metoda sledování akumulace fluorescenční sondy diS-C₃(3) v buňkách někdy označuje jako metoda barvicích křivek.

Vstup sondy do kvasinkových buněk probíhá až do dosažení dynamické rovnováhy, tj. do vyrovnání koncentrací volné sondy vně a uvnitř buněk (v řádech minut). Ustavení rovnováhy mezi volnou a vázanou sondou uvnitř buněk je takřka okamžité. Pronikání sondy do buněk je ale zpomaleno buněčnou stěnou, takže je dosaženo dynamické rovnováhy během 20-30 minut v závislosti na její tloušťce a propustnosti [122, 123, 125].



Obr. 1-9 Vstup potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3) do buněk je doprovázen posunem polohy maxima její fluorescence do červené oblasti spektra. (A) Změny emisních parametrů fluorescence sondy diS-C₃(3) po jejím navázání na cytosolické komponenty. Fluorescenční spektrum volné sondy (zelená) a vázané sondy (červená). (B) Časová závislost posunu polohy maxima fluorescence sondy λ_{\max} po jejím přidání k suspenzi kvasinkových buněk, tzv. barvicí křivka. Rovnovážná hodnota λ_{\max} odráží velikost membránového potenciálu buněk (pokud nejsou přítomny MDR pumpy v membráně).

Už v roce 1999 vznikla hypotéza, že sonda diS-C₃(3) může být substrátem MDR pump a v roce 2002 bylo potvrzeno, že je skutečně transportována hlavními pumpami kvasinek *S. cerevisiae* [125]. V další studii bylo dokázáno, že sondu

aktivně odstraňují z buněk pumpy *ScPdr5p* a *ScSnq2p* ale nikoliv *ScYor1p* [126]. Právě toto zjištění umožnilo modifikaci metody ke sledování účinků různých látek, chemických stresorů, a to jak na membránový potenciál, tak na aktivitu těchto dvou pump.

Touto fluorescenční metodou bylo již na začátku testování zjištěno, že změny membránového potenciálu nemají vliv na aktivitu pump, a stejně tak naopak platí, že přítomnost pump v membráně buněk nemá vliv na velikost jejich membránového potenciálu [126]. Navíc bylo ukázáno, že membránový potenciál se u starších buněk postupně snižuje [125, 126].

Následně bylo touto metodou dokázáno, že na aktivitu pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* má zásadní vliv, v jaké růstové fázi se buňky nacházejí, respektive, kolik živin zbývá v růstovém médiu [126-128]. Toto pozorování bylo potvrzeno i jinými studiemi, kde bylo zjištěno, že u starších buněk již nedochází k expresi některých PDR pump [53], nicméně pumpy mohou být znovu exprimovány po přidání glukózy a živin k buňkám [127].

Přidání chemického stresoru k buňkám může vést ke změně jejich membránového potenciálu (k hyperpolarizaci či depolarizaci buněk) nebo k inhibici transportu sondy sledovanou MDR pumpou (z různých příčin). Důležité však je rozeznat tyto změny od barvení permeabilizovaných buněk. Pokud jsou v suspenzi permeabilizované buňky, sonda se naváže na uvolněné cytosolické komponenty v médiu, takže poloha maxima fluorescence sondy se posune do vyšších vlnových délek^{****} [129] podobně jako v případě inhibice transportu sondy MDR pumpami nebo při hyperpolarizaci. Za účelem rozlišení těchto případů byl vyvinut diagnostický postup detekce množství permeabilizovaných buněk v měřeném vzorku. K testované suspenzi buněk je na konci měření přidáván tzv. CD koktejl [113]. Jedná se o kombinaci dvou látek, protonoforu CCCP (karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon) a inhibitoru H^+ -ATPázy DM-11 (2-dodekanoyloxyetyl-dimetylamonium chlorid), která vede ke „zkratování“ membránového potenciálu živých buněk. Po přidání CD koktejlu k živým buňkám dochází k rychlému posunu fluorescenčního maxima do modré oblasti (většinou kolem 570-572 nm) a detekujeme výrazný a rychlý pokles polohy maxima v barvicích křivkách. Pokud

^{****} V důsledku přítomnosti vázané sondy vně buněk se poloha maxima fluorescence sondy diS-C₃(3) z média posouvá do červené oblasti spektra, v základním uspořádání experimentu detekujeme z okolí buněk pouze signál volné sondy a příspěvek vázané sondy pochází z živých buněk.

jsou však buňky účinkem stresoru permeabilizované (mrtvé), k žádnému takovému poklesu nedochází. Pokud je pozorován jen částečný pokles, dá se odhadnout množství mrtvých buněk ve vzorku [130].

Při inhibici transportu sondy může mít testovaný stresor vliv přímo na protein či jeho těsné lipidní okolí (je tedy inhibitor MDR pumpy) nebo může být substrátem pumpy, jedná se tedy o kompetitivní inhibici transportu sondy, anebo stresor způsobí vyčerpání ATP a dojde k vypnutí pump v důsledku nedostatku pohonné energie exportu. Při vhodné volbě stresorů, doplňkových experimentů a jejich kombinace můžeme v některých případech přesně stanovit, jaká je příčina inhibice transportu sondy, kterou detekujeme metodou barvicích křivek (diS-C₃(3) assay). Ukázkovým příkladem je komplexní studie účinku alkoholů na *ScPdr5p* a *ScSnq2p* [130].

Touto metodou byly určeny inhibitory (v některých případech i substráty) pumpy *ScPdr5p*, které nemají vliv na membránový potenciál, jako je FK506, enniatin B nebo rapamycin [113], dále substrát *ScPdr5p*, který ovlivňuje velikost membránového potenciálu benzalkonium chlorid, nebo povrchově aktivní látky, jako oktenidin dihydrochlorid, které nemají vliv na činnost pump, ale depolarizují buněčnou membránu a často i permeabilizují buňky [131].

Dále se mírnou modifikací metody barvicích křivek dá zkoumat, zda je inhibice transportu sondy trvalá, tj. inhibitor se např. pevně naváže na protein a znemožní tak jeho správnou funkci i poté, co je odstraněn z okolního prostředí. Reverzibilita vazby se zkoumá pomocí odmytí inhibitoru, který necháme před měřením na buňky působit. Takto bylo prokázáno, že zatímco inhibice pomocí FK506 je trvalá, tzn. pumpa *ScPdr5p* není schopna exportovat sondu ani po odstranění FK506 z okolního média, činnost pump *ScPdr5p* i *ScSnq2p* se po opůsobení a následném odmytí alkoholů o různé délce řetězce (propanol - hexanol) téměř plně obnoví [130].

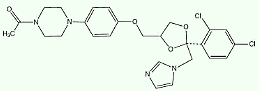
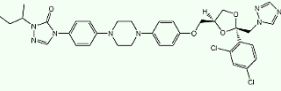
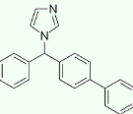
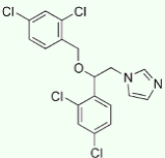
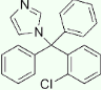
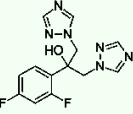
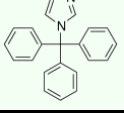
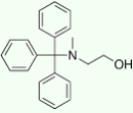
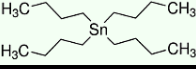
Na našem pracovišti bylo navíc v rámci bakalářské práce dokázáno, že fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem také lidské MDR pumpy P-glykoproteinu [132], což ukazuje na její potenciál do budoucna, kdy bude možné pomocí fluorescenční diS-C₃(3) metody k vyhledávání inhibitorů a substrátů přímo na lidských buňkách. V současné době se metoda používá i na modelovém organismu *Candida albicans* nejen u nás, ale i v laboratoři v Polsku, kde bylo zjištěno, že sonda diS-C₃(3) je substrátem i pro pumpy *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, ale nikoliv pro *CaMdr1p* [114].

V rámci této disertační práce jsme metodu modifikovali, abychom ji mohli použít na novém modelovém organismu *Kluyveromyces lactis*. Navíc jsme pomocí zavedení nové veličiny umožnili porovnat vliv stresorů (azolů a dalších látek) na transport sondy pumpami Pdr5p dvou druhů kvasinek. Využitím sondy diS-C₃(3) jako modelového substrátu v kombinaci se substráty jednotlivých vazebných míst ve vazebné kapse pumpy ScPdr5p jsme detailně prozkoumali obě vazebné kapsy, tedy jak ScPdr5p, tak KIPdr5p z hlediska jejich velikosti, počtu vazebných míst i vazby konkrétních substrátů. Ověřili jsme si, že metoda lze dobře použít také pro sledování vlivu delecí jiných genů na velikost membránového potenciálu kvasinek *K. lactis*.

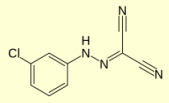
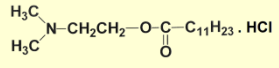
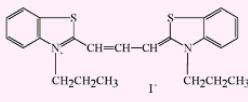
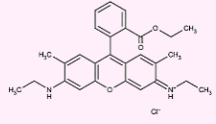
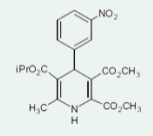
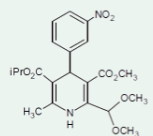
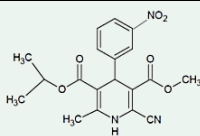
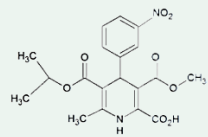
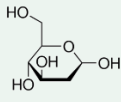
V neposlední řadě jsme pomocí této fluorescenční metody navrhli efektivní postup k vyhledávání účinných inhibitorů pump CaCdr1p a CaCdr2p u patogenní kvasinky *Candida albicans* pomocí testování potenciálních látek na pumpách ScPdr5p a ScSnq2p nepatogenních kvasinek *S. cerevisiae*. Tento postup se osvědčil a při následném testování na rezistentním klinickém izolátu jsme potvrdili náš předpoklad, že účinné inhibitory transportu sondy pumpami ScPdr5p a ScSnq2p jsou také inhibitory transportu sondy pump CaCdr1p a CaCdr2p, což má perspektivu v možném budoucím lékařském využití našich poznatků.

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie a materiál

Chemikálie	Výrobce	Doplňující informace	
Kvasinkový extrakt	Serva	Složky živných prostředí pro kultivaci a uchovávání kvasinkových kultur	
Bakteriologický pepton	Oxoid		
Bakteriologický agar	Roth		
D-glukóza	Sigma		
Glycerol bezvodý p. a.	Lach-Ner		
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p. a.	Sigma	Složky citrát-fosfátového pufru	
Kyselina citrónová (bezvodá)	Penta		
Ketokonazol	Sigma		Společné substráty MDR pumpy Pdr5p u <i>S. cerevisiae</i> a <i>K. lactis</i>
Itrakonazol	Sigma		
Bifonazol	Sigma		
Mikonazol	Sigma		
Klotrimazol	Sigma		
Flukonazol	Sigma		
TI Tritylimidazol	AlfaAesar		
MTAE 2-(metyl-trityl-amino)- etanol	Sigma		
TBT Tetrabutylcín	Sigma		

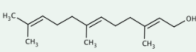
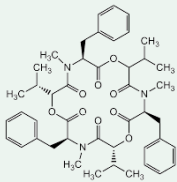
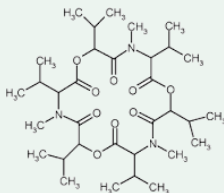
Tabulka 2-1: Přehled použitých chemikálií a materiálu (Část I)

Chemikálie	Výrobce	Doplňující informace	
CCCP karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon	Sigma	 <i>Protonofor</i>	Složky diagnostického CD koktejlu
DM-11 2-dodekanoyloxyetyl- dimetylamonium chlorid	Technická univerzita ve Wroclavi ^{††††}	 <i>Lyzozomotropní látka</i> <i>Inhibitor H⁺-ATPázy</i>	
diS-C ₃ (3) 3,3'-dipropylthiokarbocyanin jodid	Fluka		Fluorescenční Sondy
Rhodamin 6G	Sigma		
Derivát H 5-izopropyl 2,3-dimetyl 6-metyl- 4-(3-nitrofenyl)-1,4- dihydropyridin-2,3,5- trikarboxylát	Slovenská technická univerzita v Bratislavě ^{‡‡‡‡}		Potenciální inhibitory (modulátory) MDR pump CaCdr1p a/nebo CaCdr2p u <i>C. albicans</i> a ScPdr5p u <i>S. cerevisiae</i>
Derivát S 5-izopropyl 3-metyl-2- (dimetoxymetyl)-6-metyl-4-(3- nitrofenyl)-1,4-dihydropyridin- 3,5-dikarboxylát	Slovenská technická univerzita v Bratislavě ^{††††}		
Derivát 5 5-izopropyl 3-metyl 2-kyano-6- metyl-4-(3-nitrofenyl)-1,4- dihydropyridin-3,5-dikarboxylát	Slovenská technická univerzita v Bratislavě ^{††††}		
Derivát 7 Kyselina 5-izopropoxykarbonyl- 3-metoxycarbonyl-6-metyl-4-(3- nitrofenyl)-1,4-dihydropyridin- 2-karboxylová	Slovenská technická univerzita v Bratislavě ^{††††}		
2-deoxy-D-glukóza	Sigma		Inhibitor glykolýzy

Tabulka 2-1: Přehled použitých chemikálií a materiálu (Část II)

^{††††} Látka DM-11 byla syntetizována v Oddělení chemie (prof. S. Witek) na Technické univerzitě ve Wroclavi a darována dr. A. Krasowskou (Ústav genetiky a mikrobiologie Wroclavské univerzity).

^{‡‡‡‡} Deriváty H, S, 5 a 7 byly syntetizovány v Oddělení organické chemie na Fakultě chemické a potravinářské technologie Slovenské technické univerzity v Bratislavě a poskytnuty Ing. Petrou Olejníkovou z Oddělení biochemie a mikrobiologie Slovenské technické univerzity v Bratislavě.

Chemikálie	Výrobce	Doplňující informace	
Farnesol	Sigma		
Beauvericin	Cayman Chemical Company		
Enniatin B	Sigma		
Etanol pro UV spektroskopii	Lachema	Rozpouštědla	diS-C ₃ (3), rhodamin 6G farnesol, beauvericin
DMF (N,N-dimethylformamid) pro UV spektroskopii	Fluka		CCCP, TI
DMSO (dimethylsulfoxid)	Fluka		azoly, MTAE, enniatin B, 1,4-DHP
Aceton	Fluka		TBT
Destilovaná voda	-		DM-11, D-glukóza, 2-deoxy-D-glukóza
BIO LA TEST Glukosa liquid 1000	Pliva-Lachema Diagnostika, s.r.o.		Činidlo pro stanovení obsahu glukózy v médiu <i>Návod použití je uveden na příbalovém letáku</i>

Tabulka 2-1: Přehled použitých chemikálií a materiálu (Část III)

Zásobní roztoky fluorescenční sondy diS-C₃(3), enniatinu B a protonoforu CCCP jsme uchovávali při teplotě -18°; roztoky všech ostatních látek při teplotě 4°C.

2.2 Kultivační média a pufr

• Kultivační médium YPD

kvasinkový extrakt	20 g
Pepton	10 g
D-glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

• YPD agar 1(2) %

kvasinkový extrakt	20 g
Pepton	10 g
Agar	10 (20) g
D-glukóza	20 g
destilovaná voda	1000 ml

- 10 mM citrát-fosfátový pufr (C-P pufr)

Na₂HPO₄ · 12 H₂O 3,6 g

destilovaná voda 1000 ml

Titrací kyselinou citrónovou jsme nastavili pH C-P pufru na hodnotu pH = 6,0.

2.3 Kvasinkové kmeny

	Kmen	Genotyp	Zdroj Důsledek
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AD12	<i>MATα, pdr1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG</i>	Sbírka UCL* Absence pump <i>ScYor1p</i> a <i>ScSnq2p</i>
	AD13	<i>MATα, pdr1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, pdr5Δ::hisG</i>	Sbírka UCL* Absence pump <i>ScYor1p</i> a <i>ScPdr5p</i>
	AD1-3	<i>MATα, pdr1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG, pdr5Δ::hisG</i>	Sbírka UCL* Absence pump <i>ScYor1p</i> , <i>ScSnq2p</i> a <i>ScPdr5p</i>
	AD1-8	<i>MATα, pdr1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG, pdr5Δ::hisG, pdr10Δ::hisG, pdr11Δ::hisG, yef1Δ::hisG, pdr3Δ::hisG, pdr15Δ::hisG</i>	Sbírka UCL* Absence pump <i>ScYor1p</i> , <i>ScSnq2p</i> , <i>ScPdr5p</i> , <i>ScPdr10p</i> , <i>ScPdr11p</i> , <i>ScYcf1p</i> a <i>ScPdr15p</i> a transkripčního faktoru <i>ScPdr3p</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CK373/1	<i>MATα uraA1 ade2 Rag⁺ pKD1⁺, pdr5Δ::kan</i>	Sbírka UKB* Absence pumpy <i>KIPdr5p</i>
	CK373/1 + <i>KIPDR5</i>	<i>MATα uraA1 ade2 Rag⁺ pKD1⁺, pdr5Δ::kan/KIPDR5</i>	Sbírka UKB* Exprese pumpy <i>KIPdr5p</i> z plazmidu
	<i>Klku80Δ</i> (CBS2359 <i>ku80</i>)	<i>MATα ku80::loxP</i>	Sbírka UKB* rodičovský kmen
	<i>Klku80Δ pdr16Δ</i>	<i>MATα ku80Δ::loxP, Klpdr16Δ::kanMX</i>	Sbírka UKB* Absence vnitrobuněčného proteinu <i>KIPdr16p</i>
	<i>Klku80Δ erg6Δ</i>	<i>MATα ku80Δ::loxP, Klerg6Δ::kanMX</i>	Sbírka UKB* Absence enzymu sterol C-24 metyltransferázy

Tabulka 2-2: Přehled použitých kvasinkových kmenů (Část I)

* UCL - Université Catholique de Louvain, Faculté des Sciences Agronomiques, Belgium

♦ UKB - Univerzita Komenského v Bratislave, Přírodovedecká fakulta, Slovensko

	Kmen	Genotyp	Zdroj
			Důsledek
<i>Candida albicans</i>	$\Delta cdr1$ (DSY 448)	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434, cdr1Δ::hisG-URA3-hisG/cdr1Δ::hisG</i>	Sbírka STUB* Absence pumpy <i>CaCdr1p</i>
	$\Delta cdr2$ (DSY 653)	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434, cdr2Δ::hisG-URA3-hisG/cdr2Δ::hisG</i>	Sbírka STUB* Absence pumpy <i>CaCdr2p</i>
	$\Delta cdr1\Delta cdr2$ (DSY 654)	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434, cdr1Δ::hisG/cdr1Δ::hisG, cdr2Δ::hisG-URA3-hisG/cdr2Δ::hisG</i>	Sbírka STUB* Absence pump <i>CaCdr1p</i> a <i>CaCdr2p</i>
	SC5314	<i>URA3/URA3</i>	Sbírka UKB* Standardní kmen citlivý na flukonazol
	CY 1123	-	Sbírka UKB* Klinický izolát rezistentní na flukonazol

Tabulka 2-2: Přehled použitých kvasinkových kmenů (Část II)

2.4 Uchovávání a kultivace kvasinkových kultur

Všechny zásobní buněčné kultury byly uchovávány při teplotě -80 °C v médiu obsahujícím 60 % glycerol, 10 % glukózu, 20 % pepton a 10 % kvasinkový extrakt. V případě klinického izolátu CY 1123 médium navíc obsahovalo flukonazol v koncentraci 64 µg/ml. Z těchto konzerv jsme sterilní kličkou přenesli malé množství kvasinek na Petriho misky s 2 % YPD agarem a nechali je růst 24 hodin při teplotě 30 °C v inkubátoru Incucell 55. Kultivace buněk klinického izolátu CY 1123 a standardního divokého kmene SC5314 probíhala při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Misky s kulturami kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byly uchovávány v lednici při teplotě 4°C maximálně po dobu jednoho měsíce, misky s kvasinkami *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans* po dobu 1 týdne.

Kultivace kvasinkových kultur pro měření probíhala ve dvou krocích. Nejprve jsme do 10 ml YPD média (v Erlenmayerově baňce o objemu 50 ml) sterilní kličkou přenesli z misky malé množství kvasinek. Buňky jsme aerobně kultivovali v reciproké třepací lázni při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Poté jsme malý objem

* STUB – Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, Fakulta Chemickej a Potravinárskej Technológie, Slovensko

(1 – 10 μ l) takto vzniklého inokula[#] zaočkovali do 10 ml čerstvého média a buňky jsme kultivovali v třepací lázni při 30 °C, dokud nedosáhly požadované fáze růstu.

2.5 Měření růstových křivek a stanovení obsahu glukózy v médiu během růstu kvasinek

Měření růstových křivek[§] jsme prováděli pomocí spektrofotometrické detekce zvyšujícího se zákalu (optické hustoty) buněčné suspenze, tj. OD (z anglického optical density). Optickou hustotu jsme měřili na vlnové délce 578 nm (OD_{578}) na spektrofotometru Amerschan Biosciences Novaspec III v 1 cm spektroskopických kyvetách.

Pro měření růstových křivek jsme do 10 ml čerstvého YPD média zaočkovali takové množství inokula, aby počáteční OD_{578} kultury bylo přibližně 0,1. Poté jsme odečítali hodnoty OD_{578} narostlé kultury v hodinových intervalech po dobu 40 hodin. Vzorky hustších buněčných suspenzí jsme ředili 30 - 50x, aby naměřené hodnoty OD nepřekročily hodnotu 0,4, která je horní hranicí lineárního rozsahu přístroje Novaspec III.

Současně s měřením OD buněčné kultury jsme stanovovali také obsah glukózy v růstovém médiu YPD pomocí činidla BLT Glukosa Liquid 1000. V důsledku chemické reakce činidla s glukózou dochází ke vzniku chinoniminového barviva. Intenzita vzniklého růžového zbarvení, která je úměrná koncentraci glukózy, se detekuje spektrofotometricky.

Pro stanovení změn obsahu glukózy v médiu během růstu buněčné kultury jsme v hodinových intervalech odebírali 100 μ l buněčné suspenze do mikrozkušavek typu Eppendorf. Z těchto vzorků jsme po odstředění odebrali 10 μ l supernatantu a přenesli do kyvety s 1 ml činidla BIO LA TEST Glukosa liquid 1000. Po 20 minutách inkubace jsme přidali 1 ml destilované vody a změřili OD_{578} roztoku na absorpčním spektrofotometru Novaspec III.

[#] V případě, že byla během jednoho týdne prováděna série experimentů, bylo toto inokulum uchováno v chladničce při 4 °C a opakovaně použito k zaočkování hlavní kultury.

[§] Růstová křivka je grafické vyjádření průběhu přírůstků počtu buněk v suspenzi v pravidelných časových intervalech od zaočkování kultury.

2.6 Stanovení velikosti buněk a jejich počtu ve vzorku

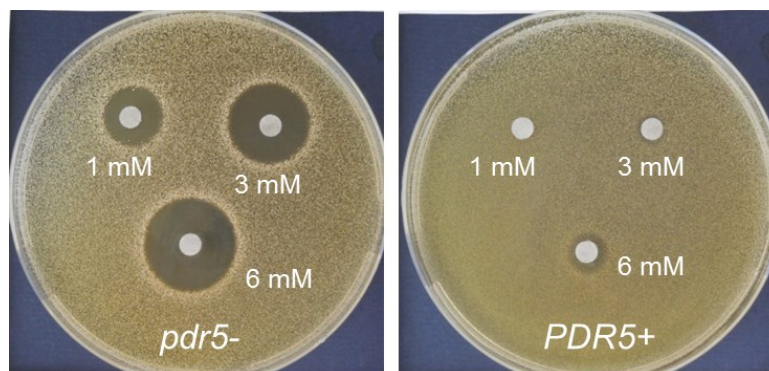
Velikost buněk *S. cerevisiae* a *K. lactis* a jejich počet ve vzorku o známé hodnotě OD₅₇₈ jsme stanovovali pomocí zobrazovacího cytometru Vision Cellometer (Nexcelom Bioscience). Buňky připravené podle kapitoly 2.4 jsme dvakrát promyli destilovanou vodou (2 min, 3000 otáček/min, Megafuge 1.0) a naředili C-P pufrem (pH 6) na různé hodnoty OD₅₇₈ (0,1 – 0,25, Novaspec III). Do počítačích komůrek přístroje (speciální mikroskopická sklíčka) jsme umístili 20 µl vzorku a pomocí programu, který je součástí zobrazovacího cytometru, jsme stanovili jak průměrnou velikost buněk, tak jejich počet ve vzorku.

2.7 Testy citlivosti kvasinkových buněk k chemickým stresorům založené na sledování inhibice jejich růstu

2.7.1 Zónový test (Disk-diffusion assay)

Tato standardně používaná metoda umožňuje stanovit antifungální účinnost testované látky, tj. citlivost buněk k ní, pomocí velikosti inhibiční zóny, oblasti bez viditelného růstu buněk. Inhibiční zóna se vytvoří díky difuzi látky aplikované na papírový terčík umístěný na agarovém médiu s buňkami po 48 hodinové inkubaci. Velikost zóny závisí na tom, jak účinná je látka při inhibici růstu buněk.

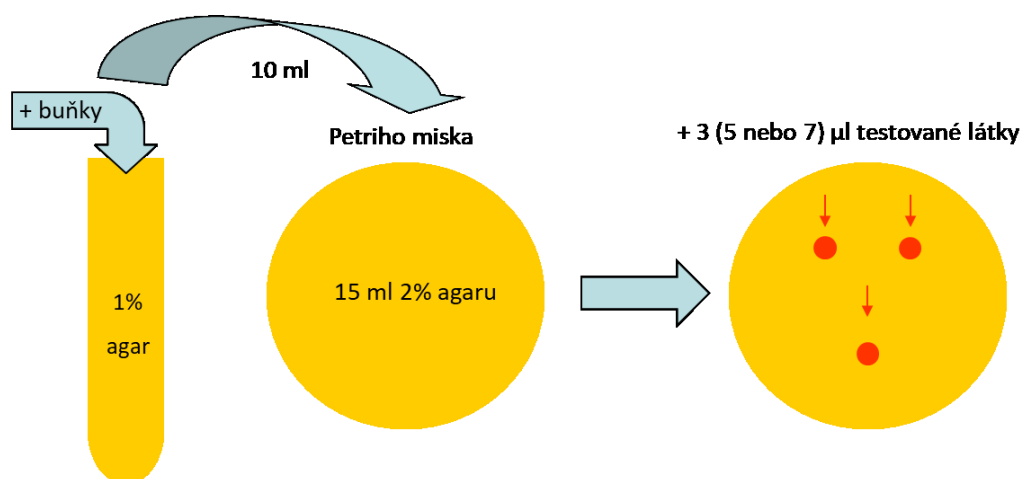
Inhibiční účinnost látky může být samotnými buňkami výrazně snížena díky jejímu aktivnímu odstraňování z buněk MDR pumpami, pro které je látka substrátem. Tato skutečnost činí metodu velmi populární při stanovení substrátové specifity MDR pump. Z rozdílné velikosti inhibičních zón, které vzniknou po přidání látky k buňkám majícím a postrádajícím MDR pumpu, lze totiž snadno usuzovat na to, že látka je substrátem dané pumpy (jako příklad je ukázána látka benzalkonium chlorid na obrázku 2-1). V disertační práci byly pomocí zónových testů identifikovány substráty pumpy *KIPdr5p* u kvasinek *Kluyveromyces lactis* a také substráty pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u *Candida albicans*.



Obr. 2-1 Odstraňování látek z buněk MDR pumpami vede ke snížení jejich inhibiční účinnosti. Rozdíly ve velikosti inhibičních zón u buněk AD1-3 postrádajících pumpu Pdr5p (A) a AD12 s její nadprodukcí (B) vytvořených po aplikaci benzalkonium chloridu o různé koncentraci.

Buňky testovaných kmenů jsme kultivovali podle kapitoly 2.4. Kvasinky jsme dvakrát promyli sterilní destilovanou vodou (2 min, 3000 otáček/min, Heraeus Instruments Megafuge 1.0) a resuspendovali v destilované vodě. Poté jsme do 1 % YPD agarů přidali takový objem kvasinkové suspenze, aby výsledná koncentrace buněk byla $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. 10 ml takto připravené suspenze buněk (teplota agarů byla nižší než 45°C) jsme vylili na Petriho misku (průměr 9 cm) s pevným 2 % YPD agarem (15 ml). Po zatuhnutí agarů jsme na jeho povrch umístili sterilní kolečka z filtračního papíru, na která jsme následně nanесли 3-7 μ l zkoumané látky, obr. 2-2.

V případě, že bylo cílem experimentu zjistit, zda testovaná látka (substrát) kompetuje s jinými substráty o transport zkoumanou MDR pumpou, použili jsme modifikovanou verzi zónového testu (tzv. „dvojitý přidání“ nebo „trojitý přidání“), při níž jsou jednotlivé dvě nebo tři látky nanášeny na totéž kolečko s časovým odstupem nejméně 15 minut. Misky jsme nechali růst při teplotě 30 °C v inkubátoru po dobu 48 hodin. Po 24 a 48 hodinách růstu jsme misky vyfotografovali a porovnali jsme velikosti inhibičních zón.



Obr. 2-2 Schematické znázornění postupu při zónovém testu.

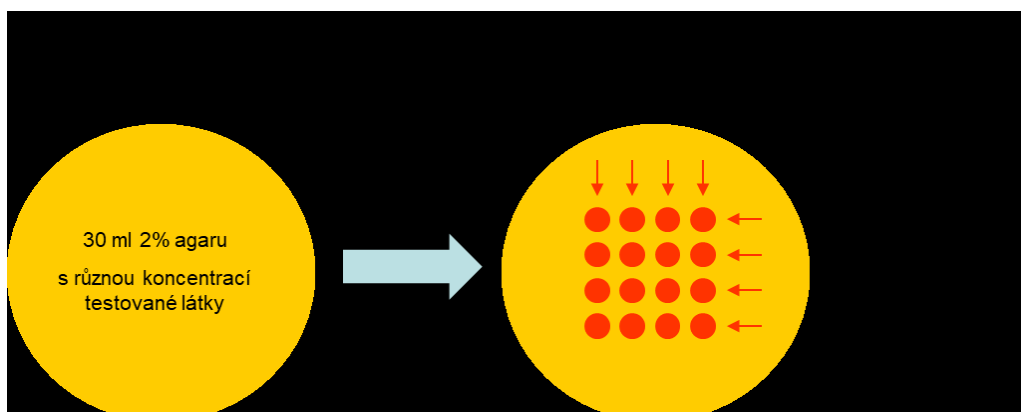
2.7.2 Kapkový test (Spot assay)

Citlivost buněk vůči účinkům chemické látky je u tohoto testu určována pomocí jejich rozdílného růstu na pevném agarovém médiu bez a v přítomnosti testované látky. Buňky definované koncentrace se kapou v malém objemu buněčné suspenze na povrch média. Tento způsob experimentálního uspořádání (opačný než u zónového testu) umožňuje současně na jedné misce testovat buňky až osmi kvasinkových kmenů, což řadí kapkový test mezi vysoce výkonné vyšetřovací metody. Z důvodu zvýšení citlivosti metody jsou na agar v řadě nanášeny kapky z různě naředěné zásobní suspenze (postupné desetinásobné ředění), což umožňuje testování antifungální účinnosti látky při různém poměru koncentrací látky a buněk^{§§§§}.

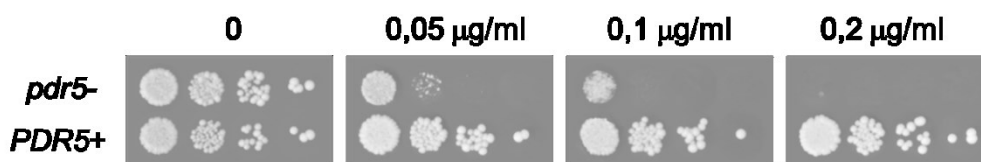
Buňky testovaných kmenů jsme kultivovali podle kapitoly 2.4, dvakrát promyli sterilní destilovanou vodou (2 min, 3000 otáček/min, Megafuge 1.0) a resuspendovali v destilované vodě. Poté jsme do jamek mikrotitrační destičky připravili naředěné suspenze jednotlivých kmenů o koncentracích $1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^5$ a $1 \cdot 10^4$ buněk/ml. Na misky s 30 ml 2 % YPD agaru jsme osmikanálovou pipetou kapali 4 μl takto připravených buněčných suspenzí, obr. 2-3. Kontrolní misky neobsahovaly žádnou látku, v agaru ostatních misek byla přítomna testovaná látka v požadované koncentraci. Misky jsme následně 48 hodin kultivovali při teplotě 30 °C v inkubátoru a poté vyfotografovali. Ukázka výsledku kapkového testu

^{§§§§} V zónovém testu, u něhož zůstává koncentrace buněk v agarovém médiu konstantní, se tento poměr mění v důsledku klesající koncentrace látky směrem od terčičku při její difuzi agarem.

dokumentující vliv přítomnosti MDR pumpy *ScPdr5p* v membráně buněk na jejich citlivost k mikonazolu je na obrázku 2-4.



Obr. 2-3 Schematické znázornění postupu při kapkovém testu.



Obr. 2-4 Výsledek kapkového testu. Vliv různé koncentrace mikonazolu na růst buněk postrádajících MDR pumpu Pdr5p (*pdr5-*) a s její nadprodukcí (*PDR5+*).

2.8 Měření akumulace potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3) v buňkách

Kladně nabitá fluorescenční sonda diS-C₃(3), která díky svému lipofilnímu charakteru snadno prochází plazmatickou membránou, se akumuluje v cytosolu buněk, neboť hnací silou pro vstup sondy do buňky je nejenom její koncentrační gradient (původní koncentrace v buňce je totiž nulová), ale také existence membránového potenciálu $\Delta\Psi$ (záporný uvnitř buňky), viz kapitola 1.7.2. Rovnovážná koncentrace sondy v buňce je tím vyšší, čím je membránový potenciál uvnitř buňky zápornější. Stanovení rozdílů ve velikosti membránového potenciálu buněk na základě odlišné rovnovážné vnitrobuněčné koncentrace sondy je však komplikován skutečností, že sonda je substrátem některých MDR pump (např. *ScPdr5p* a *ScSnq2p* u kvasinky *S. cerevisiae* [113, 126]), *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u patogenní kvasinky *C. albicans* [114] i lidského P-glykoproteinu [132]. Tyto pumpy aktivně odstraňují sondu z cytosolu buněk, a proto rovnovážná vnitrobuněčná koncentrace sondy neodpovídá velikosti jejich membránového potenciálu, ale je

nižší. Jinými slovy, z pouhé znalosti akumulace sondy v buňkách, u kterých nebyly geny kódující tyto pumpy odstraněny, nelze jednoduše získat informaci ani o velikosti membránového potenciálu ani o aktivitě pump. Nízká vnitrobuněčná koncentrace sondy může být stejně tak důsledkem nízkého membránového potenciálu buněk s nízkou, popř. nulovou, aktivitou pump jako vysoké aktivity pump u buněk s vysokým membránovým potenciálem.

2.8.1 Fluorescenčně mikroskopické monitorování akumulace a lokalizace sondy v cytosolu buněk

Buňky připravené podle kapitoly 2.4 jsme dvakrát promyli destilovanou vodou (2 min, 3000 otáček/min, Megafuge 1.0) a naředili C-P pufrem (pH 6) na hodnotu $OD_{578} = 0,1$ (Novaspec III). K suspenzi buněk testovaných kmenů jsme přidali fluorescenční sondu diS-C₃(3) na výslednou koncentraci $2 \cdot 10^{-8}$ M a nechali inkubovat 30 minut. Poté jsme na mikroskopické sklíčko nanесли 10 μ l buněčné suspenze a sledovali na vybrané části vzorku akumulaci a lokalizaci sondy v buňkách pomocí laserového skenovacího konfokálního fluorescenčního mikroskopu Olympus IX83/FV1200 s objektivem UPLSAPO 60x/1.2 s vodní imerzí ($\lambda_{ex} = 515$ nm, $\lambda_{em} = 575 - 620$ nm).

2.8.2 Spektrofluorimetrické monitorování akumulace sondy v buňkách: diS-C₃(3) fluorescenční metoda (metoda barvicích křivek)

Výhodou této metody je, že umožňuje sledovat celý průběh akumulace sondy v buňkách pomocí monitorování polohy maxima (λ_{max}) a intenzity (I_{max}) měřeného fluorescenčního signálu v čase, viz kapitola 1.7.2. Závislost λ_{max} nebo I_{max} na čase od přidání fluorescenční sondy k buněčné suspenzi se nazývá „barvicí křivka“ (odtud název metody).

Buňky testovaných kmenů jsme připravili podle kapitoly 2.4, dvakrát promyli destilovanou vodou, popř. C-P pufrem (pH 6), a resuspendovali v C-P pufru na požadovanou hodnotu OD_{578} 0,11 nebo 0,125 pro buňky *S. cerevisiae*, 0,13 pro buňky *K. lactis* a 0,1 pro buňky *C. albicans*. K 3 ml buněčné suspenze ve spektroskopické kyvetě (PMMA, optická dráha 1 cm) jsme 30 sekund před změřením prvního fluorescenčního emisního spektra přidali sondu diS-C₃(3) tak, aby její výsledná koncentrace byla $2 \cdot 10^{-8}$ M. Fluorescenční emisní spektra jsme

měřili při pokojové teplotě každých 4 – 8 min na spektrofluorimetru FluoroMax-4 (JobinYvon – skupina HORIBA) za občasného jemného promíchání vzorků. Excitační vlnová délka byla 531 nm, emisní spektra byla měřena v rozsahu 560 – 590 nm a rozptýlené světlo bylo eliminováno skleněným oranžovým filtrem s cutoff vlnovou délkou 540 nm. Změření jednoho spektra trvalo 20 sekund. Komunikaci mezi počítačem a spektrofluorimetrem zajišťoval program DataMax.

Námi používané experimentální uspořádání, tj. rotování kyvet se vzorky s vůči sobě posunutými časy přidání sondy, umožňuje současně měřit barvicí křivky až 16 vzorků. Tímto způsobem lze v rámci jednoho experimentu testovat například (1) účinek stresoru v širokém koncentračním rozmezí, (2) působení různých stresorů a zejména (3) účinek stresoru na buňky s různým zastoupením membránových transportérů, především MDR pump, nebo vnitrobuněčných proteinů.

V závislosti na konkrétním záměru experimentu může být stresor přidán buď předem, nebo následně po přidání sondy k buněčné suspenzi (obvykle 20 min). Pokud je zapotřebí v rámci experimentu potvrdit, že změny v barvicích křivkách po přidání stresoru nesouvisí s permeabilizací buněk, je k „obarvené“ suspenzi buněk na konci měření (obvykle po 60. minutě barvení) přidán tzv. CD koktejl[†]. CD koktejl je v těchto experimentech běžně používán jako diagnostický nástroj pro stanovení integrity buněk [130].

[†] **Složení CD koktejlů:** 10 μ M CCCP + 10 μ M DM-11 pro buňky *S. cerevisiae* a *C. albicans*
5 μ M CCCP + 5 μ M DM-11 pro buňky *K. lactis*

3 Výsledky a diskuze

3.1 Cíle práce

Život buněk je neodmyslitelně spjat s neustálou výměnou látek s okolím, jako je přijímání živin, odstraňování odpadních látek a transport malých anorganických iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) a protonů přes plazmatickou membránu při udržování iontové homeostáze. Specifický import a export těchto fyziologicky relevantních látek je zprostředkován selektivními kanály a pumpami, tvořenými molekulami proteinů, které prostupují membránu.

V membránách buněk však existuje také specifická skupina relativně neselektivních pump, z nichž každá je schopna odstraňovat z buněk široké spektrum strukturně i funkčně odlišných látek, které do nich pronikly. V průběhu evoluce se tyto pumpy vyvinuly u všech buněk (bakterie, kvasinky i živočišné buňky včetně lidských) jako obranný systém buněk před toxickými účinky nejrůznějších typů chemických látek ve vnějším prostředí, což jim umožňovalo přežít za nepříznivých podmínek. Jejich nadprodukce v membráně buňky vede k fenoménu nazvanému mnohočetná léková rezistence (anglicky multidrug resistance - odtud vyplývá i jejich název MDR pumpy). V dnešní době představuje tento fenomén hlavní klinický problém při léčbě bakteriálních a kvasinkových infekcí a/nebo rakoviny. Tyto pumpy jsou zodpovědné například za rezistenci patogenních mikroorganismů vůči antibiotikům, antimykotikům a dezinfekčním přípravkům nebo rezistenci rakovinných buněk vůči chemoterapeutikům. Proto je velké úsilí vynakládáno na vyhledávání látek (inhibitorů), které by činnost těchto pump zablokovaly, což by vedlo k zefektivnění léčby konvenčními léky.

Navzdory dlouhodobému intenzivnímu výzkumu v této oblasti jsou znalosti o interakcích látek s MDR pumpami stále velmi omezené. Dodnes se například nepodařilo dát jednoznačnou odpověď i na tak zásadní otázku, jakou je počet a uspořádání vazebných míst ve vazebné kapse MDR transportérů. Navíc, převážná část současných poznatků pochází od patrně nejlépe prostudované MDR pumpy ScPdr5p u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

Hlavním cílem první části předkládané disertační práce bylo charakterizovat společné a rozdílné vlastnosti pumpy Pdr5p u kvasinky *S. cerevisiae* (ScPdr5p) a

jeho méně prozkoumaného homologu u nekonvenční kvasinky *Kluyveromyces lactis* (*KIPdr5p*). V této části jsme se soustředili zejména na objasnění následujících otázek:

- Lze fluorescenční metodu „diS-C₃(3) assay“, která byla vyvinuta na školícím pracovišti pro sledování aktivity dvou hlavních MDR pump u kvasinek *S. cerevisiae*, *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, použít také pro monitorování aktivity pumpy *KIPdr5p* u *K. lactis*? Jinými slovy, je fluorescenční sonda diS-C₃(3) substrátem nejenom *ScPdr5p*, ale rovněž *KIPdr5p*?
- Pokud ano, lze pomocí stanovení míry inhibice transportu sondy vyvolané společnými substráty obou pump (azoly a další) zjistit, do kolika vazebných míst v jejich vazebné kapse se fluorescenční sonda váže?
- Existují rozdíly v uspořádání vazebné kapsy *ScPdr5p* a *KIPdr5p*, konkrétně v počtu rozlišitelných vazebných míst a v celkové velikosti?

V druhé části práce jsme se zabývali studiem vlivu delece dvou genů (*KIPDR16* a *KIERG6*) u buněk *K. lactis* na velikost jejich membránového potenciálu a aktivitu MDR pump, zejména *KIPdr5p*. Oba tyto geny kódují vnitrobuněčné proteiny, které se účastní tvorby (*KIERG6*) resp. transportu (*KIPDR16*) metabolitů esenciálních pro výstavbu plazmatické membrány buněk. Gen *KIERG6* kóduje enzym sterol C-24 metyltransferázu katalyzující přeměnu zymosterolu na fekosterol v biosyntetické dráze ergosterolu, viz kapitola 1.6.2, který je esenciální stavební a regulační složkou kvasinkové membrány. Gen *KIPDR16* kóduje protein *KIPdr16p*, který transportuje fosfatidylinositol z endoplazmatického retikula do membrány, viz kapitola 1.4.2. Není proto překvapující, že delece těchto genů ovlivňuje vlastnosti plazmatické membrány vedoucí ke zvýšené citlivosti buněk vůči široké škále cizorodých látek [62, 133]. Aby bylo možné pomocí metody barvicích křivek odlišit vliv delece daného genu na membránový potenciál od vlivu na transportní aktivitu MDR pump, bylo nutné k buňkám jak rodičovského, tak mutantního kmene přidat specifický inhibitor, který činnost těchto pump zablokuje, např. 2-deoxy-D-glukózu. Vzhledem k tomu, že akumulace sondy v buňkách s inhibovanými MDR pumpami je řízena pouze velikostí jejich membránového potenciálu [113], odráží difference mezi barvicími křivkami buněk obou kmenů v přítomnosti inhibitoru jejich rozdílný membránový potenciál. O aktivitě MDR pump u buněk daného kmene vypovídá difference mezi jejich barvením bez (kontrola) a v přítomnosti inhibitoru. Nulová difference indikuje, že MDR pumpy u těchto buněk nejsou aktivní.

Hlavním cílem třetí, závěrečné části práce bylo zavedení efektivního postupu pro vyhledávání účinných inhibitorů dvou hlavních MDR pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u podmíněně patogenní kvasinky *Candida albicans*. Skutečnost, že fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem nejenom pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* [126], ale rovněž pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* [114], homologních s *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, a že se jejich substrátové specifity často překrývají, nás totiž přivedla na myšlenku, jak zredukovat počet fluorescenčních experimentů s patogenními kvasinkami při testování inhibičního účinku velkých sérií látek, např. nově syntetizovaných. Naše strategie spočívá v použití nepatogenních kvasinek *S. cerevisiae* s nadprodukcí pumpy *ScPdr5p* nebo *ScSnq2p* v membráně pro prvotní monitorování inhibiční účinnosti všech testovaných látek. Pouze ty látky, které efektivně inhibují transport sondy zprostředkovaný alespoň jednou z těchto pump, jsou následně testovány jako potenciální inhibitory pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*. Po ověření platnosti námi navrženého postupu pomocí několika látek (farnesol, enniatin B a jeho analog beauvericin), které jsou známými modulátory aktivity pump *ScPdr5p* a *CaCdr1p*, popř. *CaCdr2p*, jsme tento způsob vyhledávání účinných inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* použili při testování série derivátů 1,4-dihydropyridinu (1,4-DHP), viz tabulka 2-1, část II. Testováním látek schopných inhibovat transport sondy alespoň jednou z dvojice pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* na buňkách rezistentního klinického izolátu *C. albicans*, jsme jednoznačně prokázali, že k úplnému zablokování aktivního odstraňování sondy z těchto buněk je zapotřebí použít látky účinně inhibující činnost obou pump. Nicméně, i látky, u kterých bylo zjištěno, že inhibují pouze pumpu *CaCdr1p*, mohou být z lékařského hlediska velmi důležité. Dokázali jsme totiž, že aktivní odstraňování mnoha léků, zejména azolů, je zprostředkováno právě touto pumpou.

3.2 Studium funkčních odlišností pumpy *Pdr5p* kvasinek *Kluyveromyces lactis* a *Saccharomyces cerevisiae*

Pdr5p je hlavní MDR pumpou u obou druhů, která je schopná odstraňovat z buněk celou škálu strukturně a funkčně odlišných látek. Obě tyto pumpy jsou si z hlediska jejich sekvence, struktury i funkce velmi podobné. Pumpa *KIPdr5p* (1525 aminokyselin) sdílí 63,8 % sekvenční identitu s *ScPdr5p* (1522 aminokyselin) [59]. Mají také podobnou molekulární strukturu se stejnou

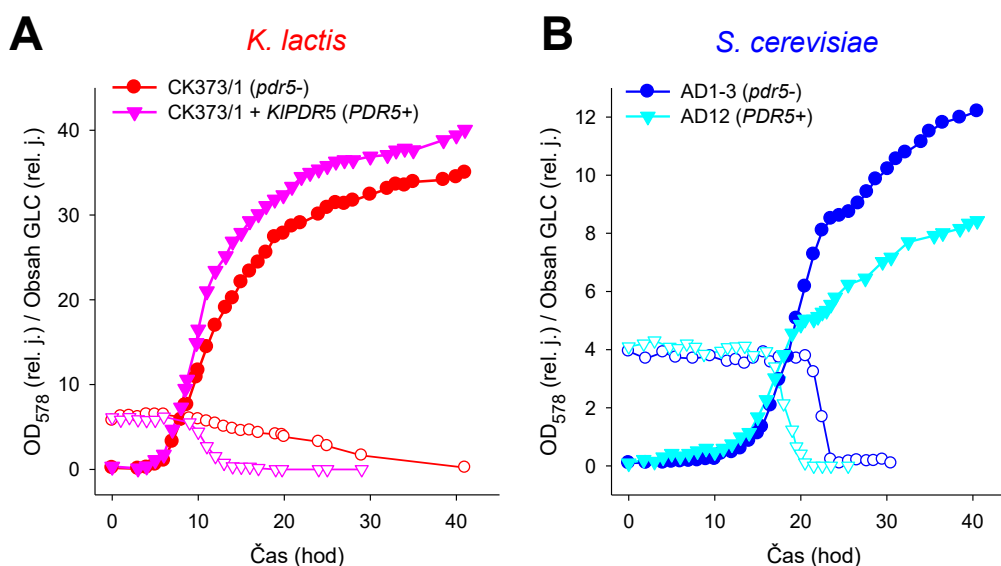
organizací jejich funkčních domén [59]. Ačkoli nevykazují zcela překrývající se substrátovou specifitu, aminokyseliny, jejichž mutace vedou ke ztrátě transportní aktivity nebo ke snížení exprese ScPdr5p, jsou striktně konzervovány v KIPdr5p [59, 134].

Zatímco funkce a struktura ScPdr5p byly podrobně studovány a popsány během posledních více než 25 let (shrnutí v [47]), informace o jeho homologu KIPdr5p jsou doposud spíše sporadické. Na rozdíl od rozsáhlých studií o povaze vazebné kapsy ScPdr5p [81, 84-86, 135, 136], nebyl zatím podobný výzkum u pumpy KIPdr5p proveden.

Proto bylo hlavním cílem této studie poskytnout nové informace o pumpě KIPdr5p, zejména o případném rozdílném uspořádání její vazebné kapsy v porovnání s ScPdr5p se zaměřením na jejich velikost a počet vazebných míst.

3.2.1 Ovlivnění růstu kvasinek *Kluyveromyces lactis* a *Saccharomyces cerevisiae* přítomností pumpy Pdr5p v jejich membráně

K základním rozdílům mezi kvasinkami *K. lactis* a *S. cerevisiae* patří bezesporu jejich odlišný metabolismus uhlíku. Na rozdíl od buněk *S. cerevisiae* nedodrží buňky *K. lactis* striktně fermentativní metabolismus v přítomnosti glukózy, ale fermentují a respirují souběžně. Proto jejich růstové křivky postrádají jasně rozlišitelné fáze růstu kultury pozorované u buněk *S. cerevisiae*, tj. exponenciální fázi, diauxii a post-diauxický růst, které souvisejí s přechodem těchto buněk z fermentativního na oxidativní metabolismus. Zajímalo nás, jakým způsobem ovlivňuje přítomnost pumpy Pdr5p růst buněk obou druhů v souvislosti s jejich odlišným metabolismem. Pro sledování případného rozdílného vlivu Pdr5p na růst buněk byla použita dvojice izogenních kmenů lišící se přítomností pumpy Pdr5p v membráně (CK373/1 a CK373/1 + *KIPDR5* u *K. lactis*, AD1-3 a AD12 u *S. cerevisiae*), které jsou dále v práci značené jako *pdr5*- a *PDR5*+ kmeny. Je potřeba zdůraznit, že u obou kmenů *PDR5*+ není exprese pumpy Pdr5p řízena fyziologicky, tj. u *K. lactis* je KIPdr5p exprimována z plazmidu, u *S. cerevisiae* je ScPdr5p nadprodukována v důsledku přítomnosti *pdr1-3* alely (viz tabulka 2-2, část I).



Obr. 3-1 Vliv pumpy *Pdr5p* na růst kultury kvasinek *K. lactis* (A) a *S. cerevisiae* (B) v bohatém kultivačním médiu YPD. Plné symboly – růstové křivky jednotlivých kmenů kvasinek, korespondující prázdné symboly – závislost obsahu glukózy v růstovém médiu na době kultivace kultury.

Jak je patrné z obrázku 3-1, ovlivňuje přítomnost *Pdr5p* v plazmatické membráně buněk *K. lactis* a *S. cerevisiae* jejich růst opačným způsobem. Zatímco u buněk kmene *K. lactis* CK373/1 má její přítomnost pozitivní dopad na růst kultury (obr. 3-1A), kultura buněk kmene *S. cerevisiae* AD12 (*PDR5*+) dorůstá na nižší hodnoty OD a k přechodu do diauxické fáze potřebuje kratší dobu než kmen AD1-3 (*pdr5*-), obr. 3-1B. Tento negativní vliv přítomnosti *ScPdr5p* u buněk *S. cerevisiae* na jejich růst, který byl již dříve popsán [126], lze vysvětlit rychlejším vyčerpáním glukózy z růstového média během striktně fermentativního růstu v důsledku vyšší spotřeby ATP spojené s činností pumpy *ScPdr5p*, jak je patrné z obrázku 3-1B. To má samozřejmě za následek, že u buněk AD12 dochází k přechodu do diauxie (a následnému pomalejšímu post-diauxickému růstu) při nižších hodnotách OD než u kmene AD1-3. Ačkoliv i u buněk *K. lactis* exprimujících pumpu *KIPdr5p* dochází k rychlejšímu vyčerpání glukózy z růstového média než u buněk „bezpumpového“ kmene, obr. 3-2A, neprojeví se tato skutečnost zpomalením jejich růstu. Naopak se zdá, že úbytek glukózy z média růst kultury akceleruje. Je tedy možné, že u těchto buněk, které fermentují a respirují současně, zpomaluje glukóza jejich růst.

Závěrem lze tedy konstatovat, že ovlivnění růstu kultury kvasinek obou druhů přítomností pumpy *Pdr5p* v jejich membráně je vyvoláno zvýšenou spotřebou

glukózy z růstového média. Rychlejší vyčerpání glukózy má však v důsledku jejich rozdílného metabolismu opačný vliv na průběh růstu kultury.

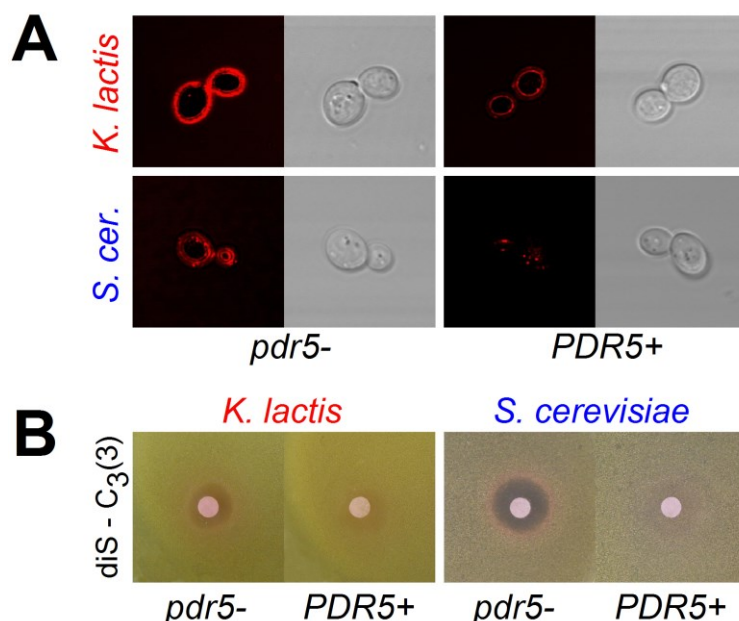
3.2.2 Vliv přítomnosti pumpy Pdr5p v membráně kvasinek obou druhů na akumulaci fluorescenční sondy diS-C₃(3) v buňkách

Předností diS-C₃(3) fluorescenční metody, která byla vyvinuta na školícím pracovišti, je možnost současného monitorování změn membránového potenciálu a aktivity dvou hlavních MDR pump u kvasinek *S. cerevisiae*, ScPdr5p a ScSnq2p, účinkem různých chemických stresorů [113, 130]. Vzhledem k vysoké citlivosti metody a možnosti sledování těchto změn u buněk v jejich relativně nezměněném fyziologickém stavu^s jsme se rozhodli použít tuto metodu také pro získání nových informací o pumpě KIPdr5p, zejména o případném rozdílném uspořádání její vazebné kapsy v porovnání s ScPdr5p.

Klíčovým požadavkem pro studium činnosti pumpy KIPdr5p pomocí diS-C₃(3) fluorescenční metody bylo, že sonda musí být touto pumpou odstraňována z buněk *K. lactis*, tj. být jejím substrátem. Jak je patrné ze snímků z fluorescenčního mikroskopu (obr. 3-2A), sonda se v buňkách PDR5+ obou druhů akumuluje podstatně méně než v buňkách pdr5-, což svědčí o jejím aktivním odstraňování z buněk jak pumpou ScPdr5p, tak KIPdr5p[¶]. Nižší vnitrobuněčnou koncentraci sondy v buňkách PDR5+ potvrzuje také menší velikost inhibičních zón vytvořených po aplikaci sondy na terčík v porovnání se zónami pozorovanými u buněk pdr5-, obr. 3-2B. Tyto výsledky jasně demonstrují, že fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem nejen pumpy ScPdr5p ale i pumpy KIPdr5p. Tento výsledek, který byl prezentován už na 31. konferenci SMYTE v roce 2013 (příloha 4), umožnil použít metodu barvicích křivek (diS-C₃(3) assay) k rozsáhlé studii funkčních odlišností těchto dvou pump (příloha 1, příloha 6).

^s Buňky nejsou před měřením výrazně stresovány, např. hladověny, pouze promyty v destilované vodě a resuspendovány v C-P pufru (viz kapitola 2.8.2)

[¶] Tmavý prostor uvnitř buněk na obrázku 3-2A představují vakuoly, do kterých sondu neproniká. Jejich membránový potenciál je totiž na rozdíl od potenciálu plazmatické membrány pozitivní uvnitř, protože vakuolární V-ATPáza pumpuje protony do vakuoly.



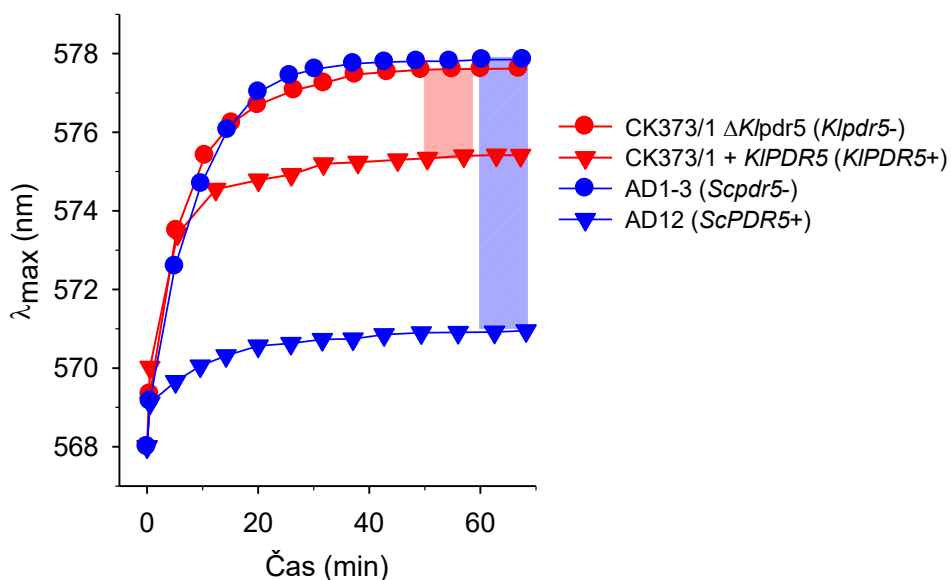
Obr. 3-2 Fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem nejenom pumpy *ScPdr5p*, ale také pumpy *KIPdr5p*. (A) Vnitrobuněčná akumulace sondy v buňkách *S. cerevisiae* AD1-3 (*pdr5*-) a AD12 (*PDR5*+) a *K. lactis* CK373/1 (*pdr5*-) a CK373/1 + *KIPDR5* (*PDR5*+) byla detekována pomocí konfokálního mikroskopu po 30 minutách inkubace s $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3). (B) Inhibiční zóny všech testovaných kmenů vytvořené po aplikaci 1 mM diS-C₃(3).

Nezbytným krokem při zavádění fluorescenční metody barvicích křivek na novém modelovém organismu (*K. lactis*) je určení „experimentálního okna“, tj. je potřeba definovat použitelné rozsahy koncentrací buněk a sondy pro dosažení lineárního vztahu mezi polohou maxima fluorescence (λ_{\max}) z buněčné suspenze a vnitrobuněčnou koncentrací sondy. Navíc, je-li cílem experimentu porovnávat barvení buněk dvou odlišných druhů, jejichž velikost se může lišit, je nezbytné při použití dané koncentrace sondy držet jejich celkovou biomasu ve vzorku konstantní [122]. Vzhledem k tomu, že buňky *K. lactis* jsou menší než buňky *S. cerevisiae* ($V_{Kl}/V_{Sc} \sim 0.6$), bylo nutné použít vyšší koncentraci buněk *K. lactis* ($2,5 \cdot 10^6$ buněk/ml odpovídající OD₅₇₈ 0,13) než buněk *S. cerevisiae* ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml odpovídající OD₅₇₈ 0,11).

Jak je patrné z obrázku 3-3, barví se buňky *PDR5*+ obou druhů díky aktivnímu odstraňování sondy z cytosolu pumpou *Pdr5p* méně než buňky *pdr5*-. Zatímco buňky *Scpdr5*- a *Klpdr5*-, ve kterých se sonda akumuluje v závislosti na jejich membránovém potenciálu, se intenzivně barví a jejich rovnovážné hodnoty λ_{\max} jsou srovnatelné, je vnitrobuněčná koncentrace sondy u buněk *KIPDR5*+ vyšší

než u buněk *ScPDR5+*. Činnost pumpy Pdr5p neovlivňuje membránový potenciál buněk, a proto je rozdíl mezi barvením buněk „pumpového“ a „bezpumpového“ kmene ve stejné růstové fázi odrazem pouze aktivního odstraňování sondy z buněk, tedy transportní aktivity pumpy Pdr5p [113, 126]. Vzhledem k výrazně nižšímu barvení buněk AD12 než buněk CK373/1 + *KIPDR5*, je tato diference u buněk *S. cerevisiae* podstatně větší než u *K. lactis*, což svědčí o výrazně vyšší celkové aktivitě pumpy *ScPdr5p* v porovnání s *KIPdr5p*.

Pravděpodobnou příčinou pozorovaného rozdílu v celkové aktivitě obou pump je nadprodukce *ScPdr5p* v membráně buněk použitého kmene *S. cerevisiae*, AD12 [46]. Samozřejmě existují i jiná možná vysvětlení pozorovaného rozdílu. Například, odstraňování sondy z buněk pumpou *ScPdr5p* je efektivnější než pumpou *KIPdr5p*, protože *ScPdr5p* je schopna v rámci jednoho transportního cyklu přenést větší počet molekul sondy než *KIPdr5p*.



Obr. 3-3 Celková aktivita pumpy Pdr5p u buněk *KIPDR5+* je menší než u *ScPDR5+*. Barvicí křivky exponenciálních buněk *S. cerevisiae* AD1-3 a AD12 (modře) a buněk *K. lactis* ze zrychlené fáze růstu (červeně). Diference mezi rovnovážnou hodnotou λ_{\max} (*pdr5-*) a λ_{\max} (*PDR5+*), která odráží celkovou aktivitu pumpy Pdr5p, je u obou druhů zvýrazněna obdélníkem v odpovídající barvě.

3.2.3 Vliv chemických stresorů na aktivní odstraňování fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk pumpou *ScPdr5p* a *KIPdr5p*

Je-li k buňkám *PDR5+* přidána chemická látka (stresor), jejímž účinkem dojde k inhibici transportu sondy pumpou Pdr5p, mizí diference mezi barvením buněk pumpového a bezpumpového kmene. Jinými slovy, vnitrobuněčná

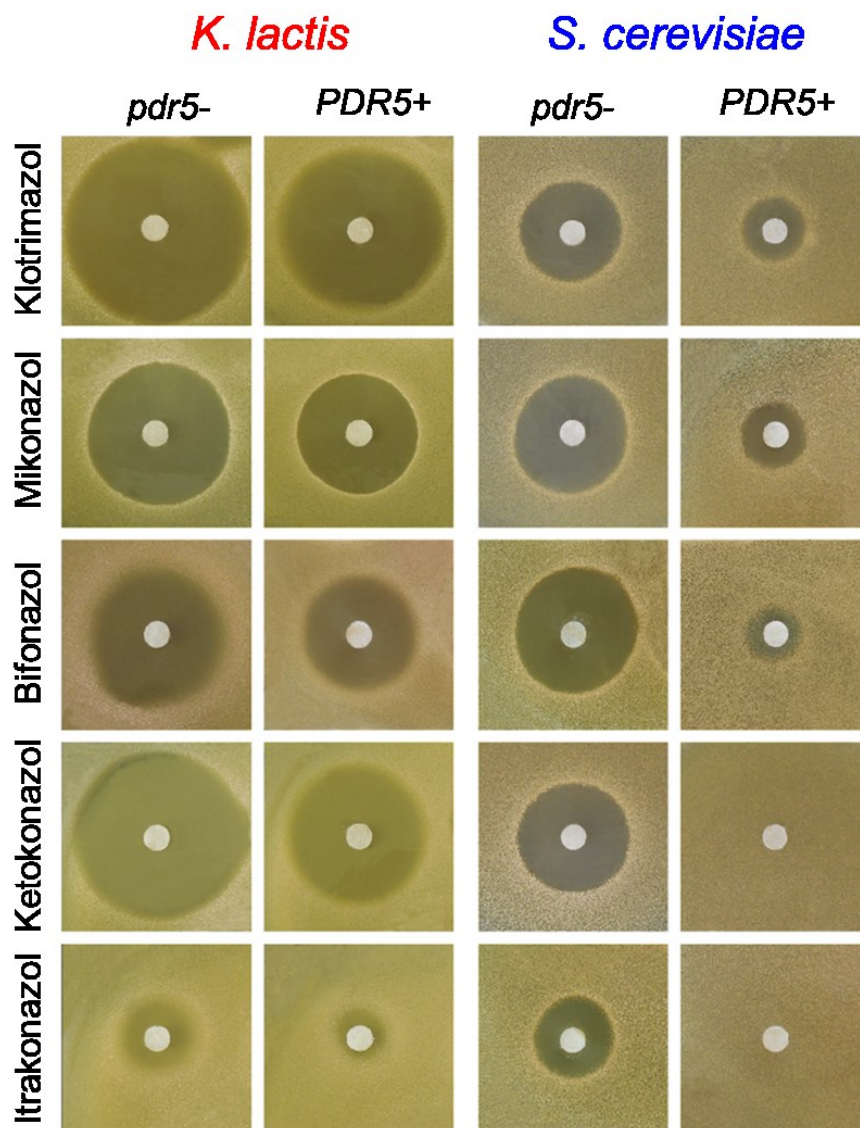
koncentrace sondy v buňkách *PDR5+* dosáhne stejné úrovně jako v buňkách *pdr5-*. Tato úroveň je dána pouze aktuální hodnotou membránového potenciálu buněk po působení stresoru [113, 131].

Zjištěná absence transportu sondy pumpou však může mít několik příčin:

- (1) Působením stresoru může dojít k vyčerpání ATP, které poskytuje energii potřebnou pro aktivní transport substrátu MDR pumpou z buněk,
- (2) Stresor může být stejně jako sonda substrátem pumpy a účinně tak soutěžit (kompetovat) se sondou o transport,
- (3) Stresor může modulovat (inhibovat) činnost pumpy v důsledku jeho přímé interakce s pumpovým proteinem a/nebo jeho lipidovým okolím.

Abychom mohli pomocí diS-C₃(3) fluorescenční metody zjistit případné odlišnosti v uspořádání vazebné kapsy Pdr5p u kvasinek *S. cerevisiae* a *K. lactis*, použili jsme sérii poměrně jednoduchých azolů[©] (klotrimazol, mikonazol, bifonazol, ketokonazol a itrakonazol), které jsou známými substráty jak *ScPdr5p* [39, 81, 85], tak *KlPdr5p* [63, 137], viz také obr. 3-4. Konkrétně jsme se zaměřili na monitorování koncentračně závislého inhibičního účinku testovaných azolů na transport sondy pumpou Pdr5p obou druhů. To nám umožnilo získat informace o schopnosti těchto společných substrátů kompetitivně inhibovat transport sondy pumpou *ScPdr5p* a *KlPdr5p* a rozhodnout tak, jestli se tyto substráty a sonda diS-C₃(3) váží do stejného místa či míst ve vazebné kapse pumpy.

[©] Všechny testované azoly jsou klinicky používaná antimykotika, viz kapitola 1.6.2.

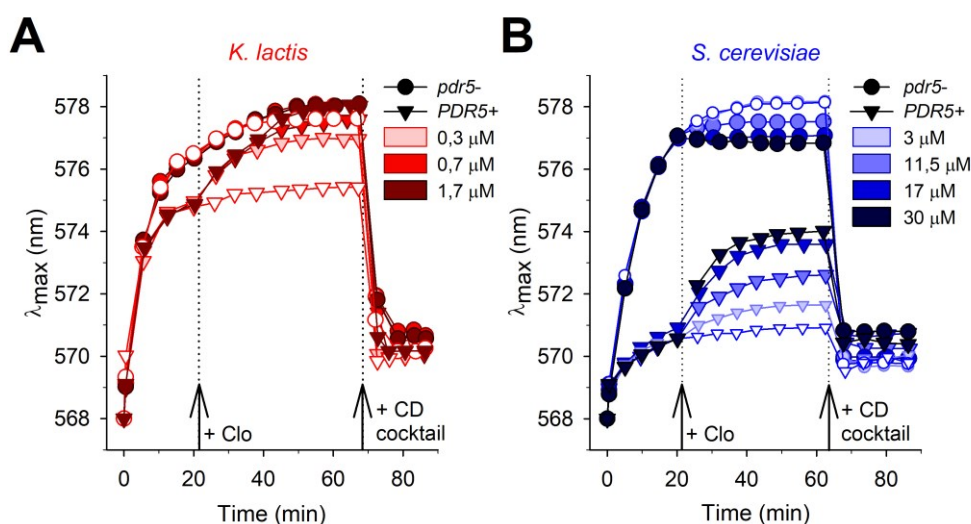


Obr. 3-4 Testované azoly jsou substráty jak pumpy *ScPdr5p*, tak *KlPdr5p*. Inhibiční zóny buněk *pdr5-* a *PDR5+* obou druhů vzniklé účinkem klotrimazolu (5,8 mM), mikonazolu (4,8 mM), bifonazolu (6,4 mM), ketokonazolu (3,8 mM) a itrakonazolu (2,8 mM).

3.2.3.1 Porovnání inhibičního účinku klotrimazolu na transport sondy *diS-C₃(3)* pumpou *ScPdr5p* a *KlPdr5p*

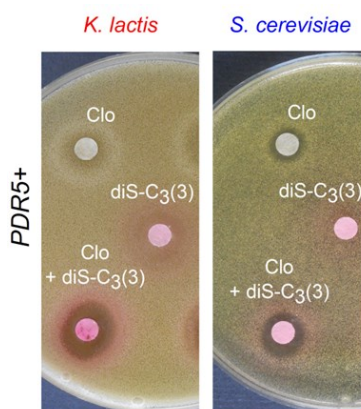
Abychom optimalizovali naši *diS-C₃(3)* fluorescenční metodu pro porovnávání rozsahu inhibice transportu sondy oběma pumpami po přidání jejich společného substrátu, použili jsme jako modelovou sloučeninu klotrimazol. U něj jako jediného z testovaných substrátů bylo známo, že se váže do dvou vazebných míst (označené jako místo 1 a místo 2) ze tří doposud identifikovaných ve vazebné kapse *ScPdr5p* [81, 86].

Vzhledem k výrazně vyšší celkové aktivitě pumpy *ScPdr5p* při odstraňování sondy z buněk v porovnání s *KIPdr5p*, viz obr. 3-3, bylo pro dosažení srovnatelného rozsahu inhibice transportu sondy oběma pumpami po přidání klotrimazolu zapotřebí použít řádově vyšší koncentrace tohoto substrátu u buněk *S. cerevisiae* než u buněk *K. lactis*, obr. 3-5A, B. Jak je patrné z obrázku 3-5, přidání klotrimazolu k buňkám *pdr5-* obou druhů, jejichž barvení je řízeno pouze velikostí membránového potenciálu [125], nevede k výrazným změnám v barvení buněk vzhledem ke kontrole, což svědčí o malém vlivu této látky na jejich membránový potenciál. Naopak, přidání klotrimazolu k buňkám *PDR5+* obou druhů má za následek koncentračně závislý nárůst jejich barvení v porovnání s barvením kontroly. Tato skutečnost způsobuje, že se zvyšující se koncentrací klotrimazolu se difference mezi barvicími křivkami buněk *PDR5+* a *pdr5-* zmenšuje (u buněk *K. lactis* je při koncentraci klotrimazolu 1,7 μM dosaženo dokonce nulového rozdílu), což demonstruje koncentračně závislý charakter inhibice transportu sondy klotrimazolem. Abychom jednoznačně prokázali, že nárůst v barvení buněk exprimujících pumpu *Pdr5p* po přidání klotrimazolu je skutečně výsledkem inhibice transportu sondy a nesouvisí s pouhým nárůstem frakce permeabilizovaných buněk ve vzorku, přidali jsme k suspenzi buněk diagnostický CD koktejl, viz kapitola 2.8.2. Koincidence všech barvicích křivek po přidání koktejlu jasně prokazuje absenci permeabilizovaných buněk ve vzorcích [130].



Obr. 3-5 Inhibiční účinek klotrimazolu na transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) pumpou *KIPdr5p* (A) a *ScPdr5p* (B). Barvicí křivky buněk *pdr5-* a *PDR5+* obou druhů vystavených účinku klotrimazolu. Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk. Levá šipka spolu s přerušovanou čarou označuje čas přidání klotrimazolu (Clo), pravá šipka pak čas přidání diagnostického CD koktejlu.

Schopnost klotrimazolu kompetovat se sondou diS-C₃(3) o transport pumpou *ScPdr5p* a *KIPdr5p* stanovenou pomocí fluorescenční metody jsme prokázali rovněž pomocí zónového testu (obr. 3-6). Po aplikaci klotrimazolu a sondy na jeden terčík dochází totiž u buněk *PDR5+* obou druhů ke zvětšení velikosti inhibiční zóny v porovnání se zónami vytvořenými v přítomnosti samotného klotrimazolu nebo sondy.



Obr. 3-6 Klotrimazol kompetuje s fluorescenční sondou diS-C₃(3) o transport pumpami *KIPdr5p* a *ScPdr5p*. Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk *PDR5+* *K. lactis* (vlevo) a *S. cerevisiae* (vpravo) vystavených účinku klotrimazolu (0,01 mM pro *K. lactis* / 4,4 mM pro *S. cerevisiae*), sondy diS-C₃(3) (1 mM) a jejich příslušné kombinaci.

Ačkoliv je monitorování celého průběhu barvení buněk (barvicí křivky) velmi vhodné pro sledování dynamiky procesů, které probíhají po přidání substrátu či jiné testované látky, jako například změny membránového potenciálu, není tento způsob prezentace výsledků příliš vhodný pro porovnávání účinku větší série chemických látek u více kvasinkových druhů. Vzhledem k tomu, že hlavním cílem této studie nebylo sledování změn membránového potenciálu, ke kterým dochází při působení testovaných látek/substrátů, ale stanovení inhibičního účinku těchto látek na transport sondy pumpou *KIPdr5p* a *ScPdr5p*, rozhodli jsme se pro stanovení rozsahu inhibice transportu sondy zprostředkované substrátem použít pouze rovnovážné hodnoty λ_{\max} barvicích křivek a následující rovnici:

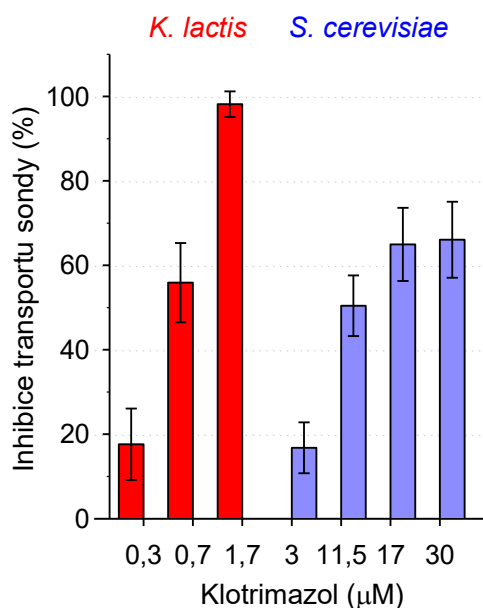
$$\text{Rozsah inhibice transportu sondy} = \left(1 - \frac{\underline{A}}{\underline{B}}\right) \cdot 100, \quad (1)$$

kde \underline{A} označuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{\max} u buněk *pdr5-* a *PDR5+* v přítomnosti substrátu a \underline{B} v jeho nepřítomnosti, zlomek A/B pak představuje zbytkovou aktivitu pumpy po přidání substrátu.

Výhodou tohoto způsobu vyhodnocení výsledků získaných metodou barvicích křivek je i možnost plného využití statistické analýzy při vícenásobném opakování daného experimentu. Navíc je možné v rámci jednoho obrázku porovnat schopnost substrátu inhibovat transport sondy zprostředkovaný pumpou Pdr5p u obou studovaných druhů kvasinek (obr. 3-7), ve kterém jsou tímto způsobem vyhodnoceny výsledky pěti nezávislých experimentů s klotrimazolem, jejichž reprezentativní ukázka je na obr. obr. 3-5.

Jak je patrné z levé části obrázku 3-7, dokonce i nízká koncentrace klotrimazolu (1,7 μM) je dostačující k úplné inhibici transportu sondy pumpou *KIPdr5p*, což indikuje, že se klotrimazol váže do stejného místa či míst v její vazebné kapse jako sonda diS-C₃(3). Na druhou stranu dokonce ani nejvyšší použitá koncentrace klotrimazolu (30 μM) není dostatečná k úplnému potlačení transportu sondy pumpou *ScPdr5p* (pravá část obr. 3-7). Rozsah inhibice transportu sondy činí v tomto případě jen $\sim 60\%$. Zjištěná saturační a neúplná kompetitivní inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* klotrimazolem je typickým rysem vazebných kapes s více vazebnými místy [85], v nichž se substráty mohou vázat do různých vazebných míst a být tak společně pumpou transportovány z buněk.

Vzhledem k tomu, že se klotrimazol váže pouze do vazebných míst 1 a 2 ve vazebné kapse *ScPdr5p* [26, 81], dospěli jsme k závěru, že satureovaná neúplná inhibice transportu sondy touto pumpou vyvolaná klotrimazolem je důsledkem vazby sondy diS-C₃(3) nejen do vazebných míst 1 a/nebo 2, ale také do třetího vazebného místa označeného jako místo 3. Jinými slovy, vazba sondy i do vazebného místa, do kterého se klotrimazol neváže, umožňuje pumpě *ScPdr5p* současně transportovat oba substráty (klotrimazol a sondu). Při vysokých, saturačních koncentracích klotrimazolu by tak zbytková aktivita pumpy ($\sim 40\%$) měla být důsledkem transportu sondy vázané pouze místem 3.



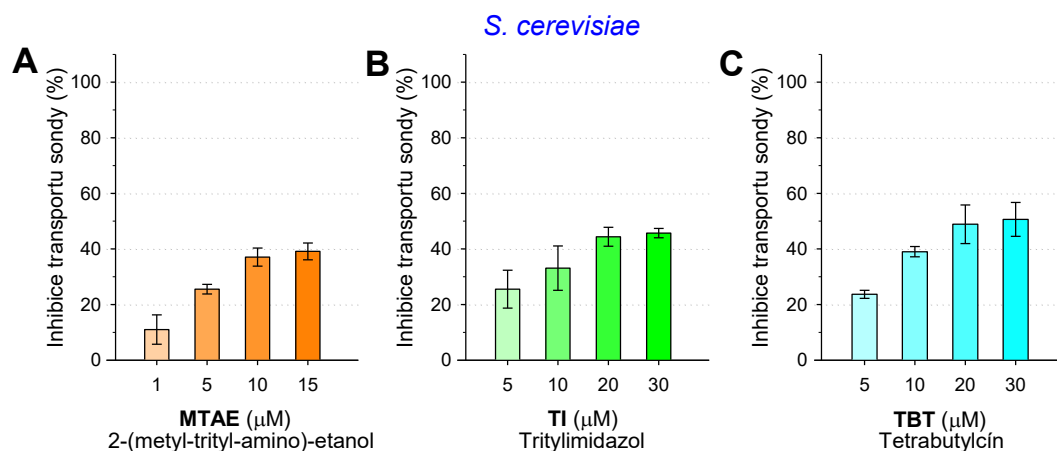
Obr. 3-7 Klotrimazol zcela inhibuje transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) pumpou *K/Pdr5p* nikoliv však pumpou *ScPdr5p*. Rozsah inhibice transportu sondy pumpou *K/Pdr5p* (červeně) a *ScPdr5p* (modře) po přidání klotrimazolu. Klotrimazol byl přidán ve 20. minutě barvení, rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány z pěti nezávislých experimentů.

3.2.3.2 Identifikace vazebných míst ve vazebné kapse pumpy *ScPdr5p*, do kterých se váže fluorescenční sonda diS-C₃(3)

Abychom dokázali naše tvrzení, že sonda diS-C₃(3) se váže nejenom do míst 1 a/nebo 2, ale také do místa 3 ve vazebné kapse *ScPdr5p* (viz předchozí kapitola), použili jsme diS-C₃(3) fluorescenční metodu a sérii relativně jednoduchých látek, které, jak bylo identifikováno Johnem Golinem a jeho týmem [81, 85, 86], jsou substráty pumpy *ScPdr5p* vážící se specificky pouze do jednoho z vazebných míst ve vazebné kapse pumpy. Látka 2-(metyl-trityl-amino)-etanol (MTAE) se váže pouze do místa 1, tritylimidazol (TI) do místa 2 a tetrabutylcín (TBT) se váže výhradně do místa 3. Jejich strukturální vzorce jsou uvedeny v tabulce 2-1, část I.

Stejně jako v případě klotrimazolu, způsobují všechny testovací substráty jednotlivých vazebných míst saturační neúplnou kompetitivní inhibici transportu sondy pumpou *ScPdr5p*, s rozsahem inhibice ~ 40 % až 50 % (obr. 3-8). Výsledky tohoto experimentu jasně dokazují, že sonda se váže do všech tří vazebných míst ve vazebné kapse pumpy *ScPdr5p*, i když pravděpodobně s odlišnou afinitou. Nemůže být tedy dosaženo úplné inhibice transportu sondy touto pumpou pomocí substrátu, který se váže pouze do jednoho nebo do dvou vazebných míst (jako

v případě klotrimazolu). Jinými slovy, k úplné kompetitivní inhibici transportu sondy pumpou *ScPdr5p* je zapotřebí použít substrát, který, podobně jako sonda diS-C₃(3), interaguje se všemi vazebnými místy v její vazebné kapse.

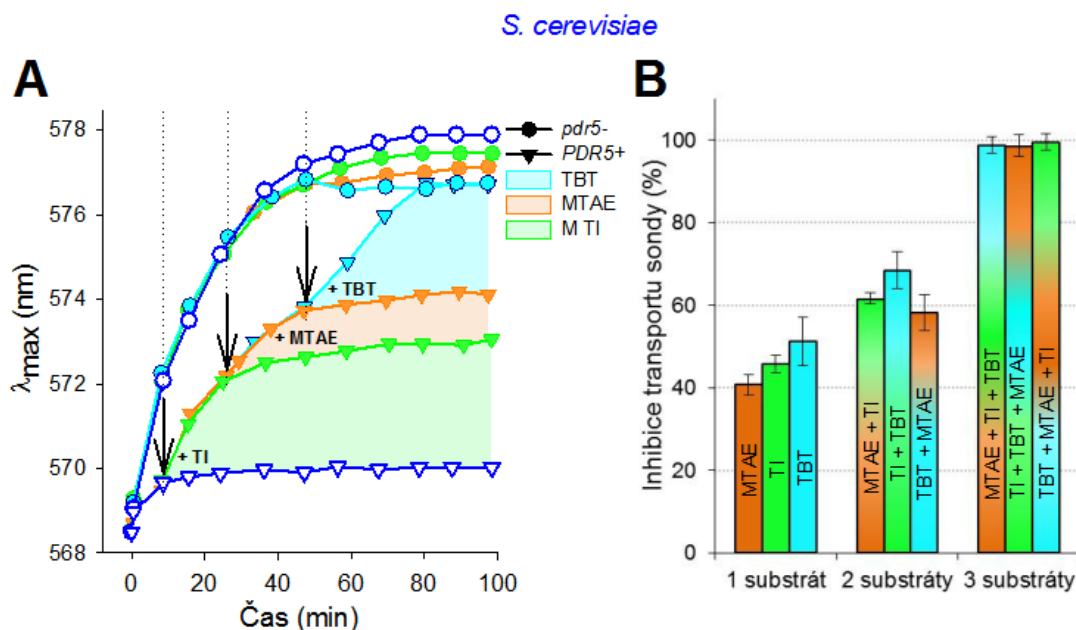


Obr. 3-8 Fluorescenční sonda diS-C₃(3) se váže do všech tří vazebných míst ve vazebné kapse *ScPdr5p*. Koncentračně závislý rozsah inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po přidání (A) MTAE - místo 1; (B) TI - místo 2; a (C) TBT - místo 3. Všechny testovací substráty byly přidány ve 20. minutě barvení, rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze šesti nezávislých experimentů.

Abychom tato naše tvrzení jasně demonstrovali, provedli jsme modelové experimenty, ve kterých jsme k buňkám *PDR5+* a *pdr5-* přidávali postupně jednotlivé testovací substráty (MTAE, TI a TBT) v různých kombinacích (obr. 3-9).

Jak vyplývá z obrázku 3-9A, ze kterého je patrný reálný průběh experimentu, pouze přidání všech tří substrátů vede ke splynutí barvicích křivek buněk *PDR5+* a *pdr5-* indikujících úplnou inhibici transportu sondy pumpou *ScPdr5p*. Dosažení úplného zablokování transportu sondy je přitom nezávislé na pořadí, v jakém byly testovací substráty k buňkám přidávány, obr. 3-9B. Navíc je z obrázku 3-9B patrné, že kombinované přidání dvou testovacích substrátů pro jednotlivá vazebná místa vede ke zhruba 60 % inhibici transportu sondy, což je srovnatelné s inhibičním účinkem klotrimazolu vážícího se do míst 1 a 2, viz obr. 3-7. Z porovnání rozsahu inhibice transportu sondy po přidání dvou (60 %) a jediného substrátu (40 % - 50 %) dále vyplývá, že nárůst rozsahu inhibice po přidání druhého substrátu nemá aditivní charakter. Jedním z možných vysvětlení této nesrovnatelnosti je, že přidání testovacího substrátu daného vazebného místa negativně ovlivní také vazbu sondy do zbývajících vazebných míst. To by mohlo být způsobeno prostorovým překrytím

alespoň některých vazebných míst ve vazebné kapse *ScPdr5p*, kde přítomnost jednoho substrátu redukuje afinitu druhého [85, 138].



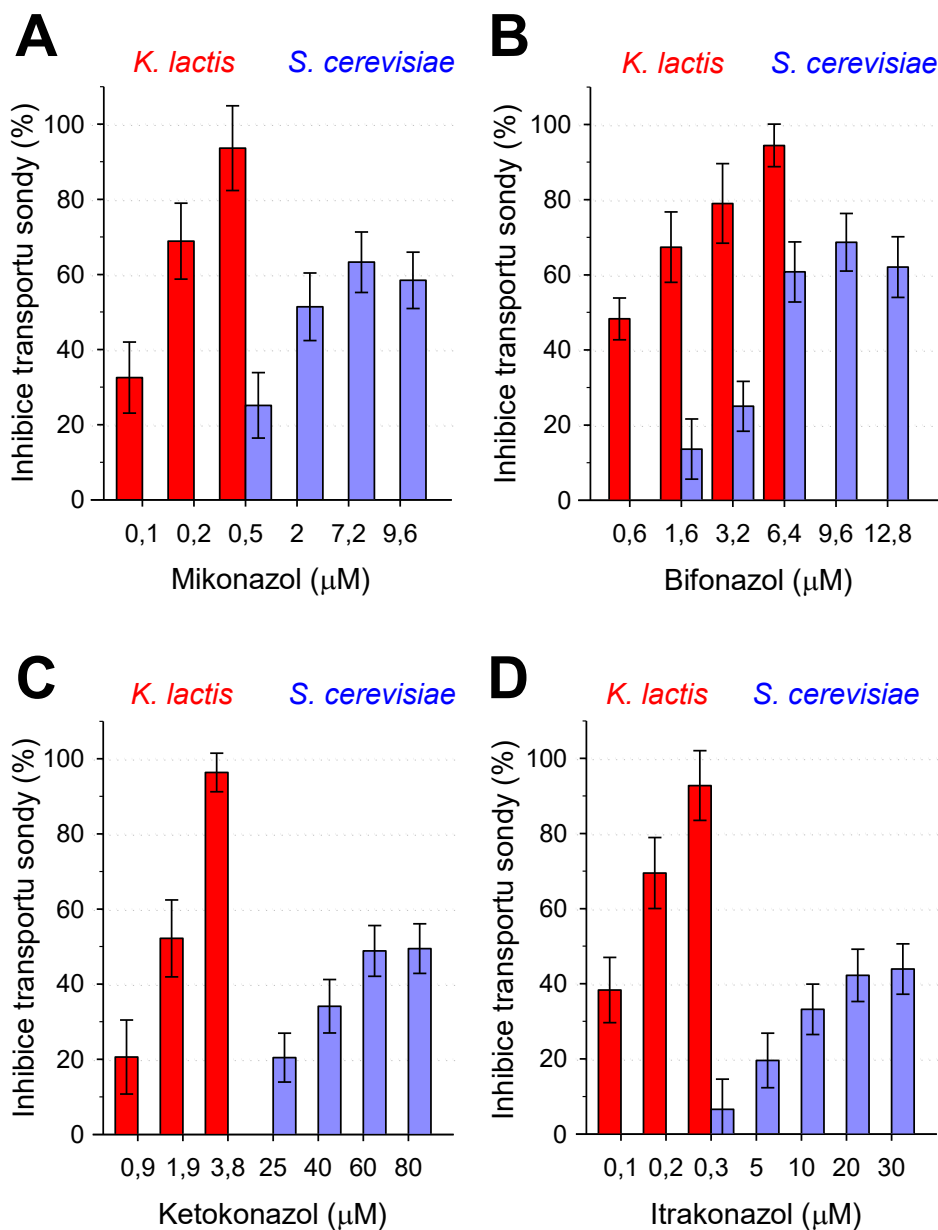
Obr. 3-9 Úplné inhibice transportu fluorescenční sondy diS-C₃(3) pumpou *ScPdr5p* je dosaženo až přidáním všech tří testovacích substrátů jednotlivých vazebných míst. (A) Barvicí křivky buněk *pdr5-* a *PDR5+*, ke kterým byly postupně přidávány jednotlivé testovací substráty v saturačních koncentracích (15 μ M MTAE, 30 μ M TI a 30 μ M TBT). Šipky spolu s přerušovanými čarami ukazují čas přidání jednotlivých substrátů. Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk. (B) Rozsah inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* po přidání testovacích substrátů v různých kombinacích, stanoven podle rovnice (1). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze čtyř nezávislých experimentů.

3.2.3.3 Porovnání inhibičního účinku mikonazolu, bifonazolu, ketokonazolu a itrakonazolu na transport sondy diS-C₃(3) pumpou *ScPdr5p* a *K1Pdr5p*

Výsledky uvedené v předchozích kapitolách ukazují, že sonda diS-C₃(3) se váže do všech identifikovaných vazebných míst ve vazebné kapse pumpy *ScPdr5p* a *K1Pdr5p*. To nám umožnilo použít ji jako citlivý nástroj pro identifikaci vazebných míst ostatních testovaných azolů (mikonazolu, bifonazolu, ketokonazolu a itrakonazolu).

Jak vyplývá z výsledků fluorescenčních experimentů, obr. 3-10, prováděných analogicky jako u klotrimazolu, je účinnost inhibice všech testovaných azolů srovnatelná s účinkem klotrimazolu, tj. úplná kompetitivní inhibice transportu sondy pumpou *K1Pdr5p* a saturační, neúplná inhibice pumpou *ScPdr5p*. (Na odlišnou schopnost azolů inhibovat transport sondy pumpou *ScPdr5p* a *K1Pdr5p* poprvé

upozornily výsledky, které byly prezentovány na 32. konferenci SMYTE v roce 2014, viz příloha 5.)

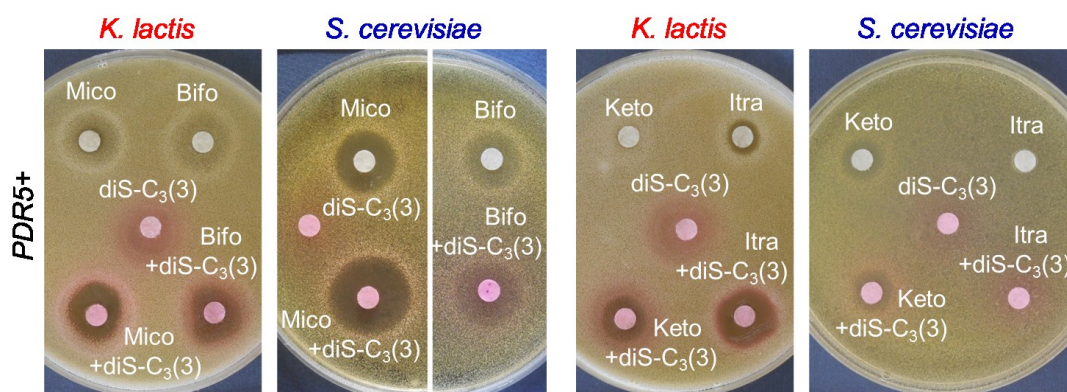


Obr. 3-10 Azoly jsou účinnými inhibitory transportu fluorescenční sondy diS-C₃(3) pumpou *KIPdr5p* nikoliv však pumpou *ScPdr5p*. Rozsah inhibice transportu sondy pumpou *KIPdr5p* (červeně) a *ScPdr5p* (modře) po přidání (A) mikonazolu, (B) bifonazolu, (C) ketokonazolu a (D) itrakonazolu. Azoly byly přidány ve 20. minutě barvení, rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze šesti nezávislých experimentů.

Rozsah inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* zprostředkovaný mikonazolem (obr. 3-10A) a bifonazolem (obr. 3-10B) je stejný jako u klotrimazolu, tj. ~ 60 %. U ketokonazolu (obr. 3-10C) a itrakonazolu (obr. 3-10D) je dosaženo

nižšího rozsahu inhibice, přibližně 50 % a 43 %. Navíc je u posledních dvou jmenovaných azolů zapotřebí k dosažení maximálního rozsahu inhibice podstatně vyšších koncentrací v porovnání s mikonazolem. Zejména u ketokonazolu je jeho saturační koncentrace osmkrát vyšší než u mikonazolu.

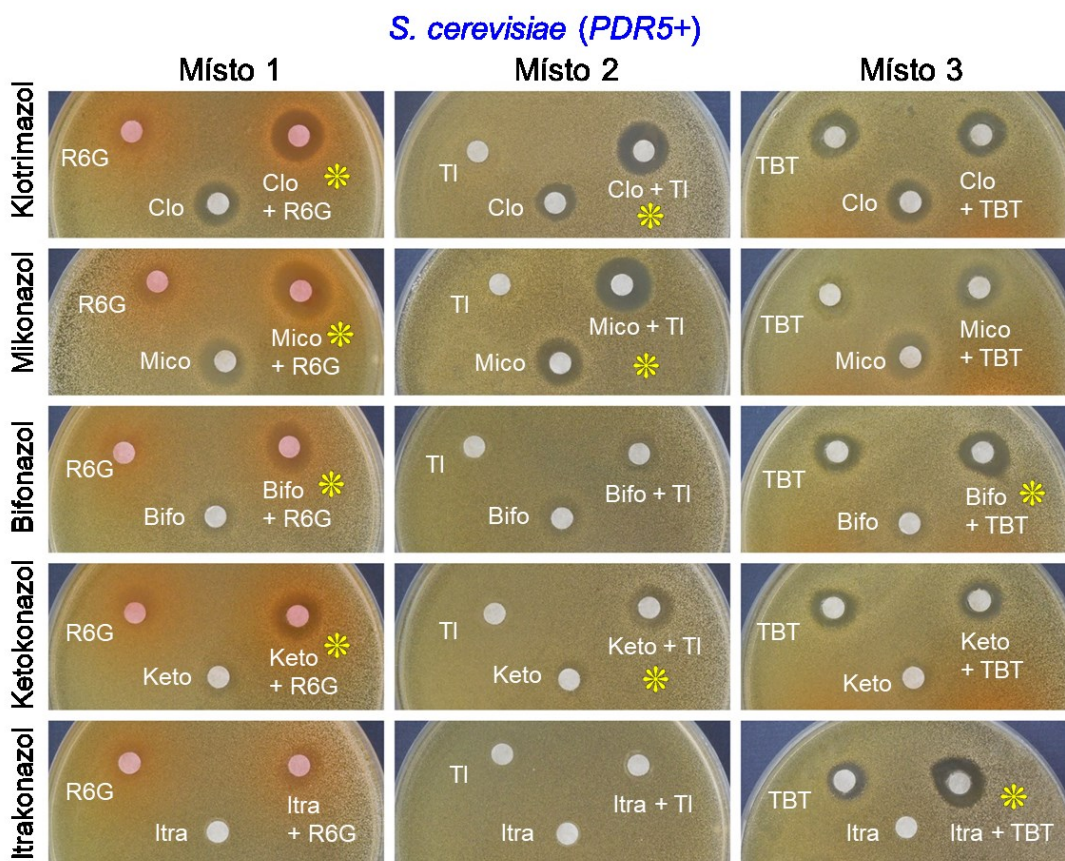
Potřeba relativně vysokých koncentrací ketokonazolu a itraconazolu pro dosažení inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* je ukázána rovněž na výsledcích zónového testu na buňkách *PDR5+* obou druhů (obr. 3-11). Zatímco kombinované přidání ketokonazolu nebo itraconazolu se sondou k buňkám *K. lactis* způsobuje zvětšení inhibičních zón v porovnání s velikostí zón vytvořených v přítomnosti samotného azolu nebo sondy, u buněk *S. cerevisiae* k žádnému takovému zvětšení zón nedochází, viz pravá část obrázku 3-11. To je pravděpodobně zapříčiněno nízkou koncentrací těchto dvou azolů v okolí disku, která neumožňuje účinnou kompetici sondy a azolu o transport.



Obr. 3-11 Kompetice jednotlivých azolů s fluorescenční sondou diS-C₃(3) o transport pumpami *K/Pdr5p* a *ScPdr5p*. Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk *PDR5+* *K. lactis* a *S. cerevisiae* vystavených účinku azolů, sondě diS-C₃(3) (1 mM) a jejich příslušné kombinaci. Zásobní roztoky azolů pro *K. lactis/S. cerevisiae*: mikonazol (5/5 mM), bifonazol (6,5/6,5 mM), ketokonazol (4/7,5 mM) a itraconazol (3/5,7 mM).

Bez ohledu na to, že jsou pro dosažení satureované neúplné inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* zapotřebí různé koncentrace jednotlivých azolů jako důsledek relativní afinity sondy a testovaného azolu k vazebným místům, samotný saturační charakter u všech testovaných azolů (obr. 3-7 a obr. 3-10) naznačuje, že žádný z azolů se neváže do více než dvou vazebných míst ve vazebné kapse *ScPdr5p*. Vazba sondy do zbývajících míst (jednoho nebo dvou) tak umožňuje její transport pumpou spolu s azolem, byť se sníženou účinností.

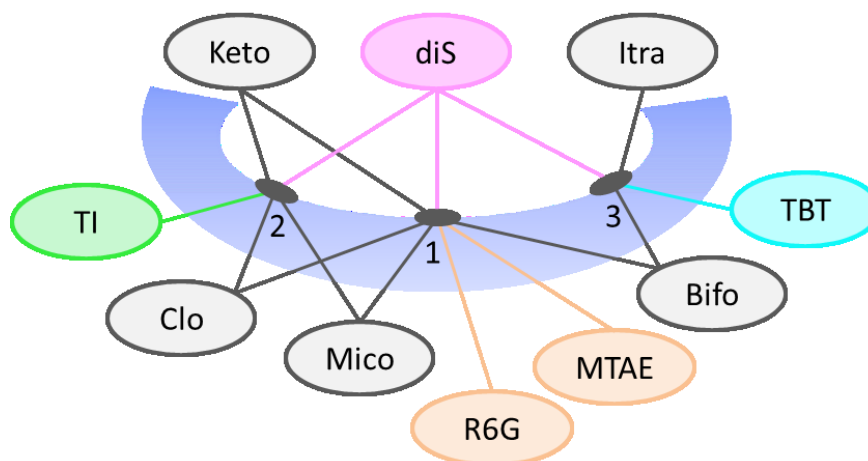
Abychom jednoznačně potvrdili tento náš závěr, provedli jsme pomocí zónového testu sérii experimentů na buňkách *ScPDR5+*, ve kterých jsme studovali kompetici azolů s testovacími substráty míst 1, 2 a 3 (obr. 3-12). V těchto experimentech byly pro místo 2 a 3 použity stejné testovací substráty jako u fluorescenčních experimentů v kapitole 3.2.3.2, tj. TI a TBT. Protože MTAE (místo 1) špatně difunduje agarem, použili jsme místo něj rhodamin 6G (R6G), který je rovněž substrátem pumpy *ScPdr5p* vážící se pouze do místa 1.



Obr. 3-12 Azoly se váží pouze do jednoho nebo dvou vazebných míst ze tří doposud identifikovaných ve vazebné kapse *ScPdr5p*. Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk *PDR5+* *S. cerevisiae* vystavených účinku azolů, testovacím substrátům a jejich příslušné kombinaci. Zásobní roztoky azolů: klotrimazol (4,4 mM), mikonazol (3,6 mM), bifonazol (1,6 mM), ketokonazol (7,6 mM) a itraconazol (4,2 mM). Zásobní roztoky testovacích substrátů: rhodamin 6G (10 mM), TI (1 mM) a TBT (2,8 M). Žlutými hvězdičkami jsou označeny ty kombinace azolů a substrátů jednotlivých vazebných míst, při kterých došlo k rozšíření zóny.

Jak je patrné ze zvětšení inhibičních zón při kombinovaném přidání azolu a testovacího substrátu na obrázku 3-12, vykazují testované azoly podle očekávání vazbu pouze do jednoho nebo do dvou vazebných míst. Itraconazol se váže pouze

do jednoho vazebného místa (místo 3), ostatní azoly se váží do dvou vazebných míst (klotrimazol, mikonazol a ketokonazol do míst 1 a 2, bifonazol do míst 1 a 3). Pro větší přehlednost je vazba jednotlivých azolů do vazebných míst ve vazebné kapse *ScPdr5p* společně s vazbou sondy diS-C₃(3) a testovacích substrátů schematicky znázorněna na obrázku 3-13.



Obr. 3-13 Schematický přehled vazebných míst testovaných azolů, fluorescenční sondy diS-C₃(3) a testovacích substrátů ve vazebné kapse pumpy *ScPdr5p*.

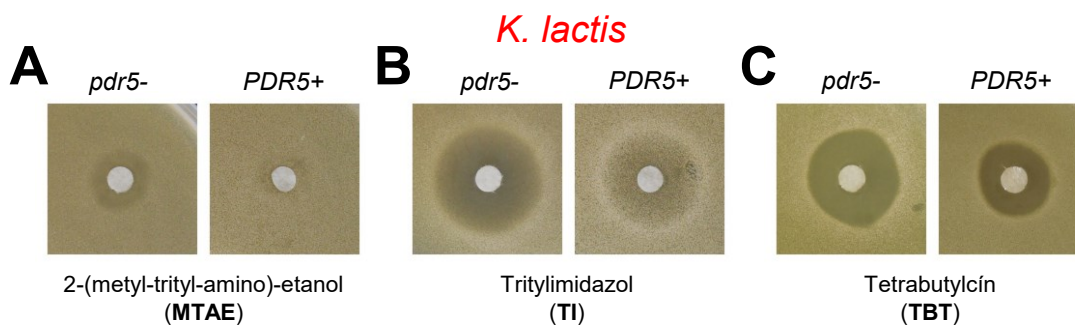
3.2.3.4 Stanovení počtu vazebných míst ve vazebné kapse pumpy *K1Pdr5p*

Jak indikuje kompletní kompetitivní inhibice transportu sondy pumpou *K1Pdr5p* všemi testovanými azoly, obr. 3-7 a obr. 3-10, sonda se váže (na rozdíl od *ScPdr5p*) do stejného vazebného místa či míst v její vazebné kapse jako azoly. Jinými slovy, ve vazebné kapse *K1Pdr5p* neexistuje žádné další vazebné místo, které by bylo exkluzivní pouze pro sondu.

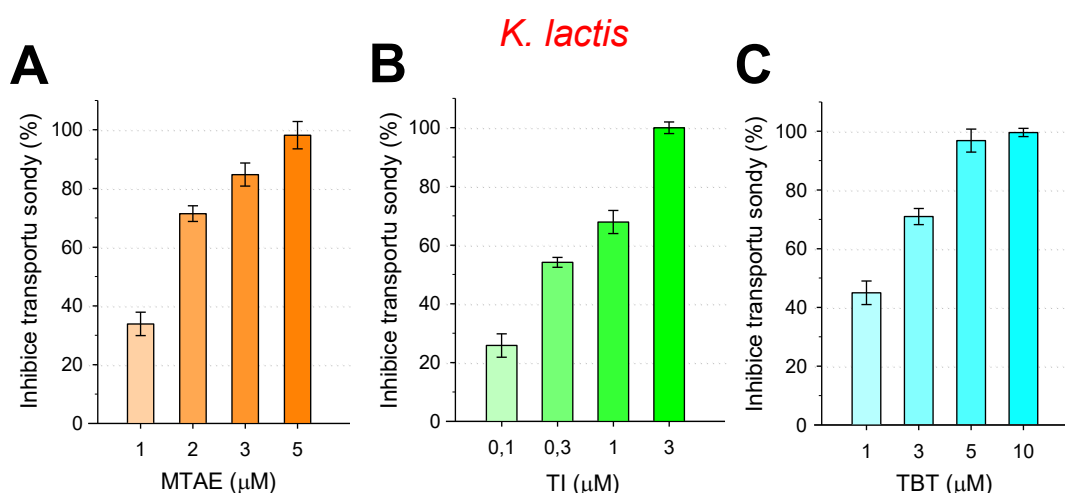
Abychom získali více informací o počtu vazebných míst v kapse *K1Pdr5p*, testovali jsme inhibiční účinnost transportu sondy touto pumpou testovacími substráty jednotlivých vazebných míst *ScPdr5p* (MTAE, TI a TBT), které, jak jsme zjistili, jsou rovněž substráty pumpy *K1Pdr5p* (obr. 3-14). Jak je patrné z obrázku 3-15, způsobují všechny testovací substráty na rozdíl od *ScPdr5p* úplnou kompetitivní inhibici transportu sondy pumpou *K1Pdr5p*, což naznačuje, že se váží do stejného vazebného místa či míst vazebné kapsy jako sonda a azoly. Navíc, jak vyplývá z výsledku zónového testu, obr. 3-16A, váží se všechny testované azoly do stejného vazebného místa či míst. Jakákoliv kombinace dvou azolů přidaných současně na papírový terčík vede totiž ve všech případech ke zvětšení inhibičních zón v porovnání se zónami vytvořenými po aplikaci azolů samotných. Kromě toho, když

je sonda přidána na stejný terčik jako příslušné dva azoly, dochází vždy k dalšímu zvětšení velikosti zóny.

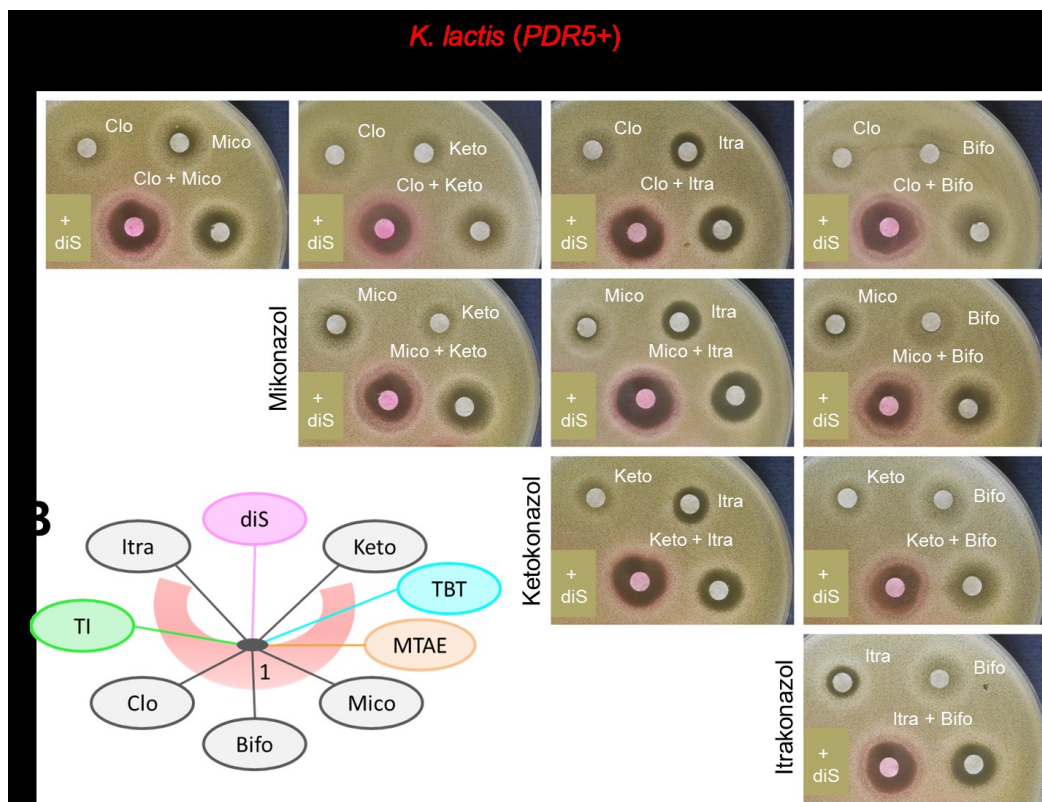
Všechna tato data naznačují existenci pouze jednoho detekovatelného vazebného místa pro rozpoznávání substrátu a jeho vazbu ve vazebné kapse *K/Pdr5p*, jak je schematicky znázorněno na obrázku 3-16B.



Obr. 3-14 Testovací substráty jednotlivých vazebných míst ve vazebné kapse *ScPdr5p* jsou rovněž substráty *K/Pdr5p*. Inhibiční zóny buněk *pdr5-* a *PDR5+* + *K. lactis* vzniklé účinkem (A) 1 mM MTAE, (B) 0,1 mM TI a (C) 0,9 M TBT.



Obr. 3-15 Všechny testovací substráty se váží do stejného vazebného místa či míst ve vazebné kapse *K/Pdr5p* jako fluorescenční sonda diS-C₃(3). Koncentračně závislý inhibiční účinek (A) MTAE, (B) TI a (C) TBT na transport sondy pumpou *K/Pdr5p*. Všechny testovací substráty byly přidány ve 20. minutě barvení, rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze čtyř nezávislých experimentů.



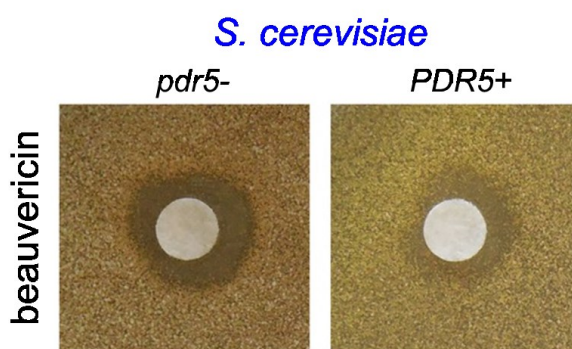
Obr. 3-16 Všechny azoly se váží do stejného vazebného místa či míst ve vazebné kapse *K/Pdr5p* jako fluorescenční sonda diS-C₃(3) a testovací substráty. **(A)** Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk *PDR5+* *K. lactis* vystavených účinku azolů a jejich příslušným kombinacím bez nebo v přítomnosti fluorescenční sondy diS-C₃(3) (1 mM). Zásobní roztoky azolů: klotrimazol (0,01 mM), mikonazol (0,02 mM), ketokonazol (0,03 mM), itraconazol (0,1 mM) a bifonazol (0,2 mM). **(B)** Schématické znázornění vazby všech testovaných substrátů do stejného vazebného místa či míst ve vazebné kapse *K/Pdr5p*.

Toto naše zjištění je skutečně velmi neočekávané a zajímavé, neboť obě pumpy jsou si sekvenčně, strukturně a funkčně velmi podobné. Oba proteiny, jak jsme již zmiňovali na začátku, (1) sdílejí 63,8 % aminokyselinovou sekvenci identitu [59], (2) mají podobnou molekulární strukturu se stejnou organizací jejich funkčních domén [59] a (3) vykazují velký překryv substrátové specifity. Na základě těchto známých faktů a našich výsledků jsme dospěli k závěru, že ve vazebné kapse *K/Pdr5p* existuje také více vazebných míst pro substráty, jejich uspořádání je však těsnější než uspořádání vazebných míst u *ScPdr5p*. V důsledku těsné blízkosti vazebných míst v kapse *K/Pdr5p* může totiž již navázaný substrát stericky bránit vazbě druhého substrátu do jiného vazebného místa. Jinými slovy, větší počet těsně uspořádaných vazebných míst v kapse *K/Pdr5p* sice zaručuje pumpě širokou substrátovou specifitu díky interakci jednotlivých substrátů s různými vazebnými

místa, ale neumožňuje současnou vazbu více substrátů (např. sondy a azolu) do různých vazebných míst a tudíž jejich společný transport pumpou *KIPdr5p*.

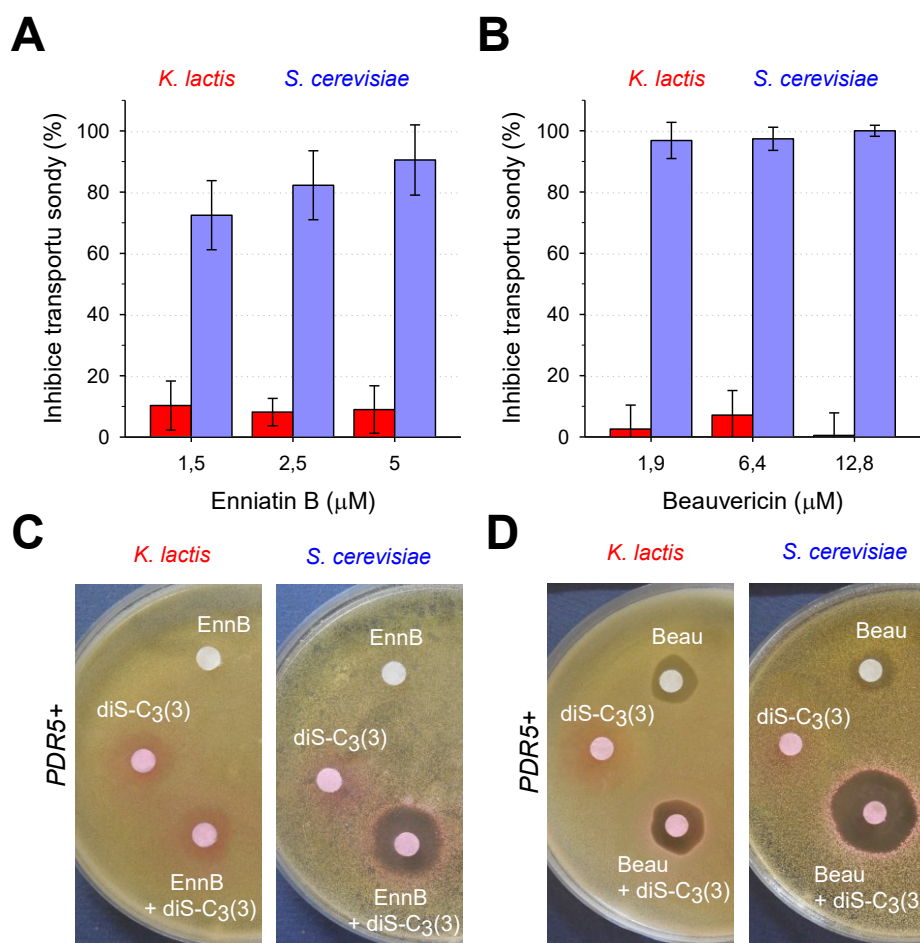
3.2.3.5 Porovnání velikosti vazebné kapsy *KIPdr5p* a *ScPdr5p* pomocí účinných inhibitorů transportu sondy pumpou *ScPdr5p*

Těsnější uspořádání vazebných míst ve vazebné kapse *KIPdr5p* v porovnání s *ScPdr5p* přirozeně evokuje představu menší velikosti její dutiny. Pokusili jsme se tuto naši hypotézu dokázat pomocí relativně velkých substrátů *ScPdr5*, enniatinu B [90] a beauvericinu (obr. 3-17), u kterých jsme již dříve [113], popř. v rámci této studie, zjistili, že účinně inhibují transport sondy pumpou *ScPdr5p*.



Obr. 3-17 Beauvericin je substrátem pumpy *ScPdr5p*. Inhibiční zóny buněk *pdr5-* a *PDR5+* *S. cerevisiae* vzniklé účinkem 12,8 mM beauvericinu.

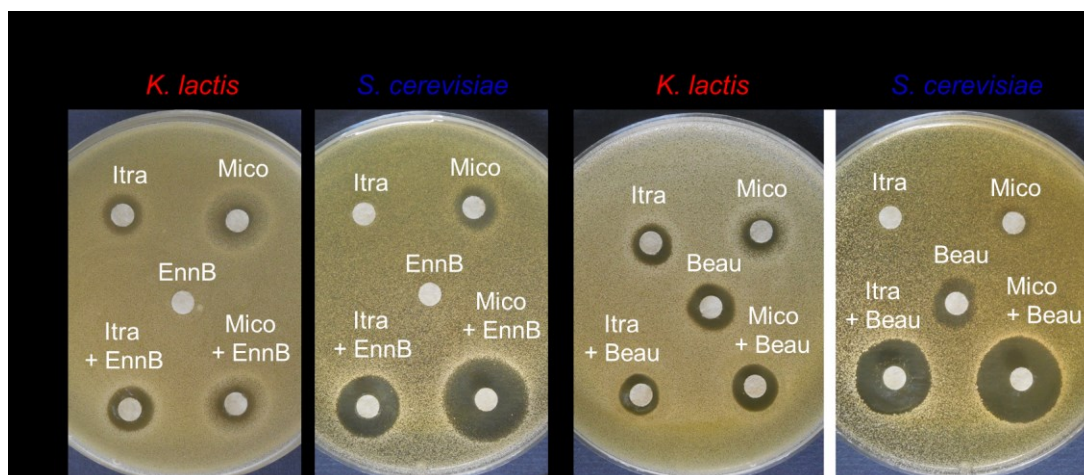
Jak je patrné z obrázku 3-18A,B, zatímco již nízká koncentrace obou těchto látek je dostatečná pro úplnou inhibici transportu sondy pumpou *ScPdr5p*, jejich účinek na transport sondy pumpou *KIPdr5p* je zanedbatelný. Výsledky získané pomocí diS-C₃(3) fluorescenční metody jsou ve shodě s identicky koncipovaným zónovým testem, obr. 3-18C,D. Ke zvětšení inhibiční zóny po současném přidání sondy a enniatinu B (obr. 3-18C) nebo beauvericinu (obr. 3-18D) dochází pouze u buněk *PDR5+* *S. cerevisiae*, nikoliv *K. lactis*. Vzhledem k tomu, že i v experimentech, ve kterých jsme jako substrát použili místo sondy dva vybrané azoly (itrakonazol - vazebné místo 3 v *ScPdr5p*, mikonazol – vazebná místa 1 a 2 v *ScPdr5p*), docházelo ke zvětšení inhibičních zón po kombinovaném přidání azolu a enniatinu B nebo beauvericinu pouze u buněk *S. cerevisiae* (obr. 3-19), lze jednoznačně konstatovat, že velké molekuly enniatin B a jeho analog beauvericin nejsou schopny interagovat s vazebnými místy v *KIPdr5p*.



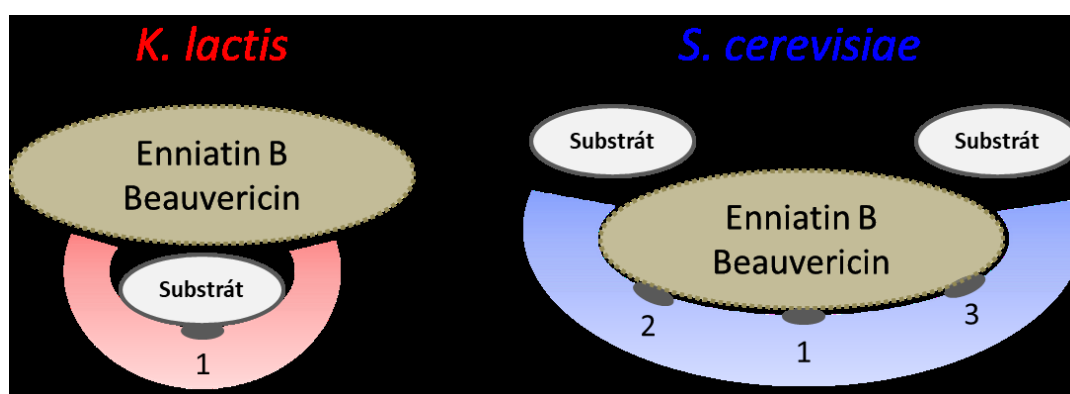
Obr. 3-18 Enniatin B a jeho analog beauvericin, relativně velké substráty pumpy *ScPdr5p*, mají zanedbatelný inhibiční účinek na transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) pumpou *KIPdr5p*. Rozsah inhibice transportu sondy pumpou *KIPdr5p* (červeně) a *ScPdr5p* (modře) po přidání (A) enniatinu B a (B) beauvericinu. Obě látky byly přidány ve 20. minutě barvení, rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze čtyř nezávislých experimentů. Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk *PDR5+* *K. lactis* (vlevo) a *S. cerevisiae* (vpravo) vystavených účinku sondy diS-C₃(3) (1 mM), enniatinu B (C) nebo beauvericinu (D) a jejich příslušné kombinaci. Zásobní roztoky látek pro *K. lactis/S. cerevisiae*: enniatin B (0,2/0,8 mM), beauvericin (6,4/12,8 mM).

Jedním z možných vysvětlení nedostatečného účinku enniatinu B a beauvericinu na transport sondy nebo jiných substrátů pumpou *KIPdr5p* by mohlo být, že tyto velké molekuly nevstupují do buněk *K. lactis*. Tuto možnost jsme však vyloučili na základě jejich depolarizačního účinku na buňky *K. lactis*, jak vyplynulo z poklesu λ_{\max} v barvicích křivkách buněk *pdr5-* *K. lactis* po jejich přidání, což není patrné z obrázku 3-18A,B. Jako nejpravděpodobnější příčinou neschopnosti těchto relativně velkých molekul inhibovat transport substrátů pumpou *KIPdr5p* se zdá být

menší velikost její vazebné kapsy v porovnání s *ScPdr5p*. Molekuly obou látek jsou zřejmě příliš velké na to, aby se vešly do vazebné kapsy *KIPdr5p*, na druhou stranu jsou však dostatečně velké, aby zcela zablokovaly vazbu sondy do všech tří vazebných míst pumpy *ScPdr5p* (nebo vazbu jiných substrátů, jako jsou azoly, které interagují jen s některými vazebnými místy v kapse), jak je graficky znázorněno na obrázku 3-20.



Obr. 3-19 Enniatin B a beauvericin mají zanedbatelný inhibiční účinek na transport azolů pumpou *KIPdr5p*. Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk *PDR5+* *K. lactis* (vlevo) a *S. cerevisiae* (vpravo) vystavených účinku vybraného azolu (itraconazolu, mikonazolu), enniatinu B (A) nebo beauvericinu (B) a jejich příslušné kombinaci. Zásobní roztoky pro *K. lactis/S. cerevisiae*: enniatin B (0,2/0,8 mM), beauvericin (6,4/12,8 mM), itraconazol (0,1/2,8 mM) a mikonazol (0,03/1,2 mM).



Obr. 3-20 Schematické znázornění rozdílné velikosti vazebné kapsy *ScPdr5p* a *KIPdr5p* demonstrující odlišné požadavky na velikost jejich substrátů.

3.3 Studium vlivu delece genů *KIPDR16* a *KIERG6* na funkci plazmatické membrány buněk *Kluyveromyces lactis*

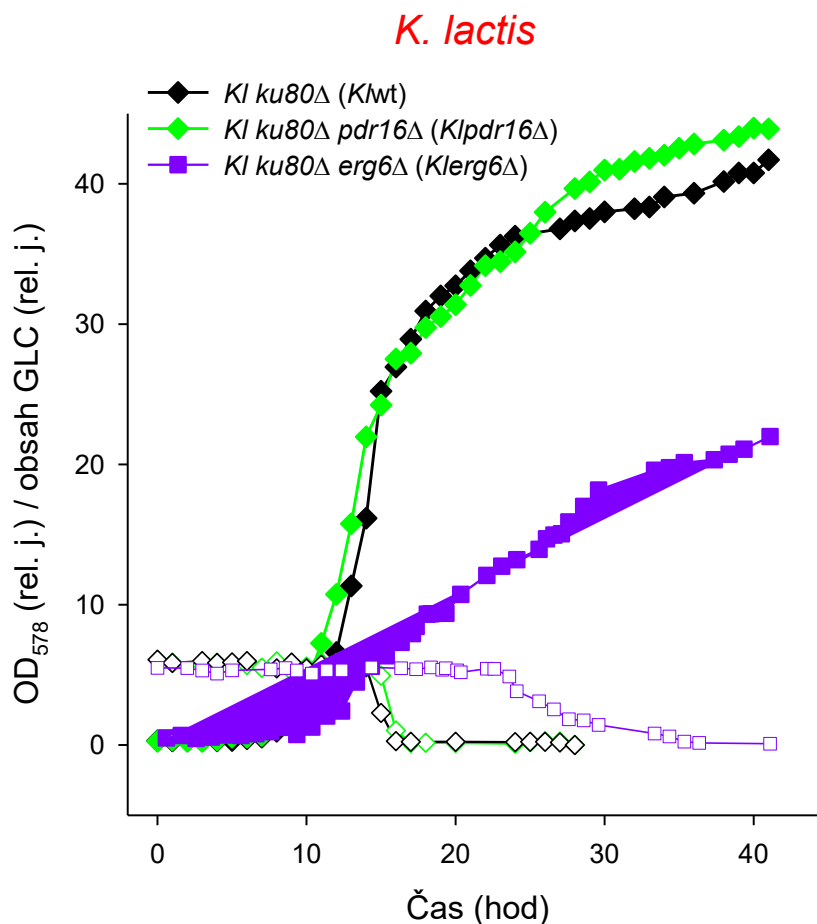
Vzhledem k tomu, že oba tyto geny kódují vnitrobuněčné proteiny, které se účastní tvorby (*KIERG6*) resp. transportu (*KIPDR16*) metabolitů esenciálních pro výstavbu plazmatické membrány buněk (viz kapitola 1.6.2, resp. 1.4.2), lze logicky předpokládat, že absence těchto proteinů bude ovlivňovat vlastnosti plazmatické membrány. Proto bylo hlavním cílem této části disertační práce posoudit vliv delece těchto genů u buněk *Kluyveromyces lactis* na některé jejich základní charakteristiky, konkrétně na růst buněčné kultury, velikost membránového potenciálu a aktivitu MDR pump.

3.3.1 Vliv absence vnitrobuněčných proteinů kódovaných geny *KIPDR16* a *KIERG6* na růst kultury kvasinek *Kluyveromyces lactis*

Zatímco vnitrobuněčný protein *KIPdr16p* kódovaný genem *KIPDR16* transportuje fosfatidylinositol z endoplazmatického retikula do membrány, enzym sterol C-24 metyltransferáza (*KIERG6*) katalyzuje přeměnu zymosterolu na fekosterol v biosyntetické dráze ergosterolu, který je esenciální stavební a regulační složkou kvasinkové membrány. Zajímalo nás proto, jaký je dopad absence jednotlivých proteinů na růst kultury buněk *K. lactis*. Pro sledování vlivu delece genů *KIPDR16* a *KIERG6* na růst buněk byla použita trojice izogenních kmenů lišící se přítomností vnitrobuněčných proteinů (*Klku80Δ*, *Klku80Δ pdr16Δ* a *Klku80Δ erg6Δ*), viz tabulka 2-2, část I, které jsou dále v práci značeny jako *Klwt*, *Kl pdr16Δ* a *Kl erg6Δ*.

Jak je patrné z obrázku 3-21, ovlivňuje absence jednotlivých proteinů růst kultury kvasinek *K. lactis* v bohatém kultivačním médiu s glukózou (YPD) odlišným způsobem. Zatímco růst buněk kmene *Kl pdr16Δ* postrádajících protein *KIPdr16p* se výrazně neliší od růstu rodičovského kmene *Klwt* (včetně rychlosti vyčerpání glukózy), kmen *Kl erg6Δ* postrádající enzym sterol C-24 metyltransferázu roste velmi pomalu a dorůstá na nižší hodnoty OD, což je doprovázeno pomalým vyčerpáváním glukózy z růstového média. Můžeme tedy konstatovat, že zatímco delece genu *KIPDR16* nemá zásadní vliv na růst buněk, rozmnožování buněk *Kl erg6Δ* je

v důsledku nepřítomnosti enzymu kódovaného genem *KIERG6* velmi pomalé. Důvodem špatného růstu buněk tohoto kmene je zřejmě nedostatek ergosterolu v plazmatické membráně, který je nezbytný pro udržení její integrity a pro životaschopnost buněk.



Obr. 3-21 Vliv delece genů *KIPDR16* a *KIERG6* na růst kultury kvasinek *K. lactis* v bohatém kultivačním médiu YPD. Plné symboly – růstové křivky jednotlivých kmenů kvasinek, korespondující prázdné symboly – závislost obsahu glukózy v růstovém médiu na době kultivace kultury.

3.3.2 Vliv delece genů *KIPDR16* a *KIERG6* na velikost membránového potenciálu a aktivitu MDR pump buněk *Kluyveromyces lactis*

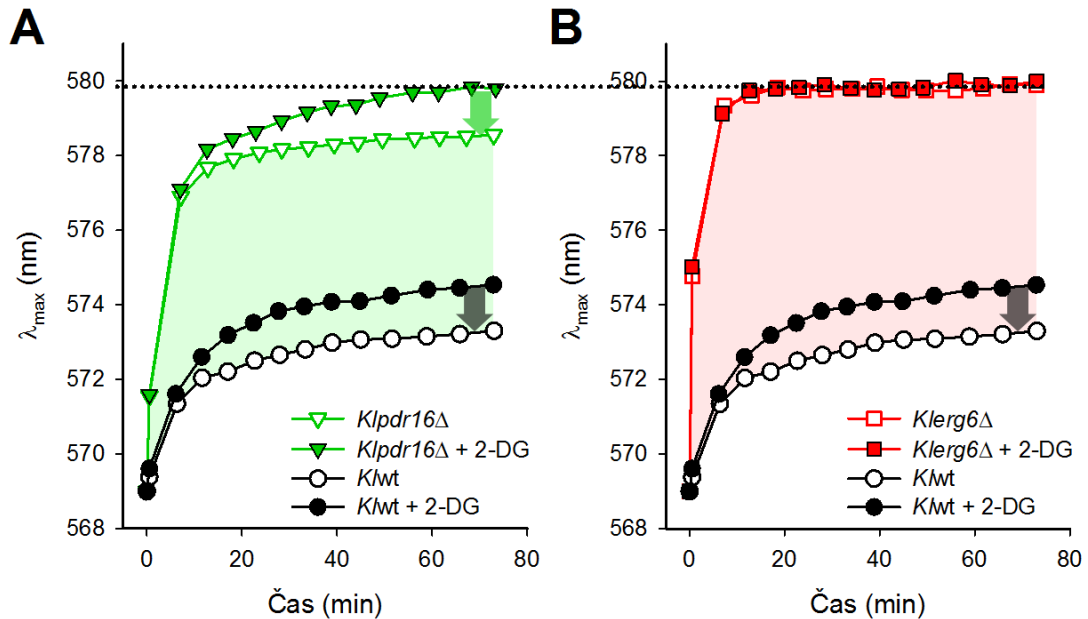
Jak bylo ukázáno v kapitole 3.2.3, umožňuje diS-C₃(3) fluorescenční metoda (metoda barvicích křivek) současné sledování změn membránového potenciálu a aktivity MDR pump účinkem stresorů nejenom u kvasinek *S. cerevisiae*, ale také u buněk *K. lactis*. Ke stanovení těchto změn je však nezbytné mít k dispozici sérii izogenních kmenů lišící se přítomností studované MDR pumpy či pump v plazmatické membráně buněk, tj. pumpové a bezpumpové mutantní kmeny.

Vzhledem k tomu, že buňky testovaných kmenů (*Klwt*, *Klpdr16Δ* a *Klerg6Δ*), nemají geny kódující MDR pumpy deletovány, nelze jednoduše z pouhého rozdílu v barvení buněk rodičovského a mutantního kmene získat informaci o vlivu delece daného genu na velikost membránového potenciálu a aktivitu MDR pump. Buňky mutantního kmene mohou mít totiž v důsledku této delece jak jiný membránový potenciál, tak odlišnou aktivitu MDR pump než buňky rodičovského kmene.

Aby bylo možné stanovit, jaký vliv má delece daného genu na membránový potenciál a aktivitu MDR pump na základě rozdílného barvení buněk rodičovského a mutantního kmene, je nutné k buňkám obou kmenů přidat specifický inhibitor, který činnost těchto pump zablokuje, např. 2-deoxy-D-glukózu. Jak už bylo zmiňováno, akumulace sondy v buňkách s inhibovanými MDR pumpami je řízena pouze velikostí jejich membránového potenciálu [113] a tedy difference mezi barvicími křivkami buněk obou kmenů v přítomnosti inhibitoru odráží pouze jejich rozdílný membránový potenciál. O aktivitě MDR pump u buněk daného kmene vypovídá difference mezi jejich barvením bez (kontrola) a v přítomnosti inhibitoru. Například, nulová difference indikuje, že MDR pumpy u těchto buněk nejsou aktivní.

Jak je patrné z obrázku 3-22, vede delece jak genu *KIPDR16*, tak genu *KIERG6* ke zvýšené akumulaci fluorescenční sondy v buňkách mutantních kmenů *Klpdr16Δ* a *Klerg6Δ* vzhledem k barvení buněk rodičovského kmene *Klwt*. Vstup sondy do buněk je u obou mutantních kmenů podstatně rychlejší a rovnovážná úroveň jejich obarvení vyšší než u *Klwt*. Tento charakter barvení je typický pro buňky se zvýšenou permeabilitou buněčné stěny a plazmatické membrány, které jsou hyperpolarizovány kvůli výtoku kationtů z buněk [131].

Abychom mohli porovnat rozsah hyperpolarizace vyvolané delecí jednotlivých genů, inkubovali jsme buňky po dobu jedné hodiny v C-P pufru s 5 mM 2-deoxy-D-glukózou (2-DG). Inkubace buněk s 2-DG vede totiž k zablokování glykolýzy a následně k vyčerpání vnitrobuněčného ATP, které poskytuje energii potřebnou pro aktivní transport substrátu MDR pumpami z buněk. Je potřeba zdůraznit, že vyčerpání ATP vede k zablokování všech MDR pump, pro které je sonda substrátem, bez ohledu na to, zdali je tato skutečnost známa (jako u *KIPdr5p*, viz kapitola 3.2.2) či nikoliv.



Obr. 3-22 Plazmatická membrána buněk *Klpdr16Δ* a *Klerg6Δ* je hyperpolarizována, delece genu *KIERG6* vede navíc ke ztrátě aktivity MDR pump. Porovnání barvicích křivek buněk rodičovského kmene *Kltwt* a mutantního kmene *Klpdr16Δ* (A) nebo *Klerg6Δ* (B) inkubovaných po dobu 1 hodiny v C-P pufru bez (prázdné symboly) nebo v přítomnosti (plné symboly) 5 mM 2-deoxy-D-glukózy (2-DG). Zvýšená akumulace sondy v buňkách *Klpdr16Δ* nebo *Klerg6Δ* vzhledem k barvení buněk *Kltwt* je zvýrazněna barevnou výplní mezi barvicími křivkami. Šipky znázorňují příspěvek MDR pump k barvení buněk daného kmene. Vodorovná přerušovaná čára demonstruje stejnou rovnovážnou hodnotu λ_{\max} u buněk obou mutantních kmenů s inhibovanými MDR pumpami indikující stejnou velikost jejich membránového potenciálu.

Jak naznačuje přerušovaná vodorovná čára spojující obrázky 3-22A a 3-22B, dosahují buňky *Klerg6Δ* a *Klpdr16Δ* inkubované s 2-DG stejnou rovnovážnou hodnotu λ_{\max} indikující jejich stejný membránový potenciál. Tento výsledek je zcela originální a ukazuje, že bez ohledu na způsob, jakým delece genů *KIERG6* a *KIPDR16* ovlivňuje stav plazmatické membrány buněk, dochází v obou případech k nabudování stejně vysokého membránového potenciálu.

Dalším důležitým zjištěním vyplývajícím z obrázku 3-22 je, že zatímco delece genu *KIPDR16* nemá vliv na aktivitu MDR pump, u buněk *Klerg6Δ* dochází v důsledku delece *KIERG6* ke ztrátě jejich aktivity. O zachování aktivity MDR pump u buněk *Klpdr16Δ* vypovídá rozdíl v jejich barvení bez a po inkubaci s 2-DG, který

je identický jako u buněk rodičovského kmene *Klwt*. Nulovou aktivitu MDR pump u buněk *Klrg6Δ* dokumentuje identické barvení buněk bez a v přítomnosti 2-DG.

Naše zjištění, že delece genů *KIERG6* a *KIPDR16* ovlivňuje vlastnosti plazmatické membrány buněk jako je membránový potenciál nebo aktivita MDR pump, přispěly k vysvětlení pozorované hypersenzitivity těchto buněk vůči široké škále cizorodých látek [62, 133]. Konkrétně, výsledky z obrázku 3-22A týkající se vlivu delece genu *KIPDR16* na membránový potenciál buněk byly publikovány v roce 2015 (příloha 2), výsledky z obrázku 3-22B jsou součástí připravovaného manuskriptu.

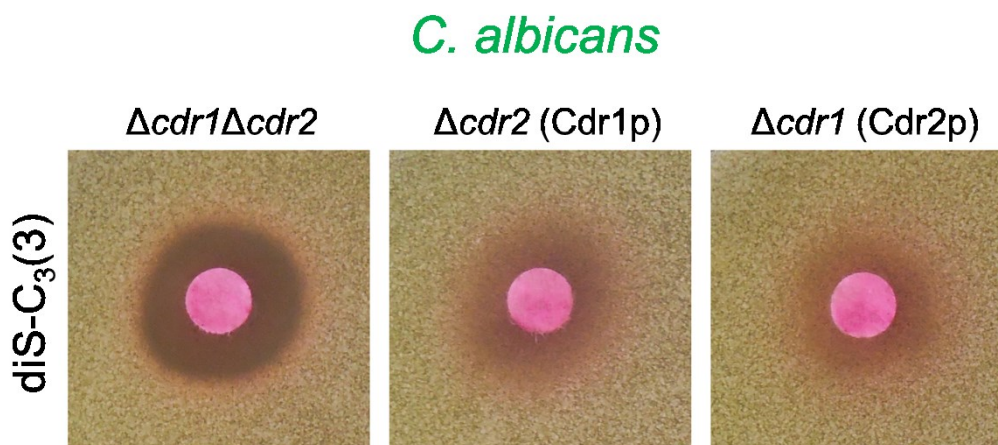
3.4 Aplikace diS-C₃(3) fluorescenční metody pro vyhledávání inhibitorů MDR pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* podmíněně patogenní kvasinky *Candida albicans*

Kvasinka *Candida albicans*, která se obvykle vyskytuje jako relativně neškodný organismus v lidském mikrobiomu[@] [7], patří mezi nejvýznamnější houbové patogeny ohrožující život člověka. Kandidóza, infekce způsobená přemnožením této kvasinky, může být vyvolána různými poruchami při udržování stabilního vnitřního prostředí organismu, jako je narušená obranyschopnost imunitního systému nebo porušení epiteliálních krevních bariér v důsledku poranění nebo chirurgického zákroku (viz kapitola 1.1.3). Hlavní příčinou selhávání léčby kandidózy je rezistence buněk vůči širokému spektru antifungálních léků (antimykotik), která se u kvasinek *Candida* vyvinula v důsledku jejich velmi rozšířeného a dlouhodobého užívání. Jednou ze čtyř strategií, kterou kvasinka *Candida albicans* používá pro získání rezistence vůči antifungální terapii, je zvýšený export léků z buněk zprostředkovaný MDR transportéry v plazmatické membráně (viz [139] a kapitola 1.5.1). Jak bylo zjištěno, většina klinických izolátů *C. albicans* vykazuje nadměrnou expresi genů kódujících MDR proteiny *CaCdr1p*, *CaCdr2p* nebo *CaMdr1p* (viz kapitola 1.5 a [77]). Proto je značné úsilí vynakládáno na vyhledávání látek inhibujících činnost těchto pump, které by mohly být použité v rámci tzv. kombinovaná terapie spolu s běžně používanými antimykotiky (kapitola 1.5.2). Nalezení takových inhibitorů by mělo jak pozitivní dopad na pacienta, tak také kladný ekonomický důsledek, neboť jejich podávání spolu s antimykotiky by zásadním způsobem snížilo podávané koncentrace léků.

Jak bylo dokázáno pomocí diS-C₃(3) fluorescenční metody a série izogenních kmenů *C. albicans* lišících se přítomností pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* v membráně buněk [114] a je jasně demonstrováno výsledky zónového testu na obrázku 3-23 (při použití týchž kmenů, viz tabulka 2-2, část II), fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem nejenom MDR pump *KIPdr5p*, *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, ale také *CaCdr1p* a *CaCdr2p*. Tato skutečnost umožňuje použít naši metodu barvicích křivek i pro vyhledávání inhibitorů těchto dvou pump. Navíc, vzhledem k vysoké homologii

[@] Mikrobiom je souhrnné označení pro mikrobiální osídlení lidského těla. Jedná se o soubor bakterií, kvasinek, hub, virů a protozoí (prvoků) vyskytující se na lidském těle a v něm.

pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* s *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, lze minimalizovat počet experimentů na kvasinkách *C. albicans* tím, že prvotní testování velké série nově syntetizovaných látek bude prováděno na kvasinkách *S. cerevisiae*. Pouze účinné inhibitory pumpy *ScPdr5p* a/nebo *ScSnq2p*, budou následně testovány jako potenciální inhibitory pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*.



Obr. 3-23 Fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem dvou hlavních MDR pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* kvasinky *C. albicans*. Inhibiční zóny vzniklé účinkem 1 mM diS-C₃(3) u izogenních kmenů ($\Delta cdr1\Delta cdr2$, $\Delta cdr1$ a $\Delta cdr2$) s různým zastoupením obou pump v membráně. Menší velikost inhibičních zón u buněk pumpových kmenů ($\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$) vytvořených po aplikaci sondy na terčik v porovnání se zónami pozorovanými u buněk bezpumpového kmene ($\Delta cdr1\Delta cdr2$) vypovídá o nižší koncentraci sondy v těchto buňkách v důsledku jejího aktivního odstraňování pumpou *CaCdr1p* nebo *CaCdr2p*.

3.4.1 Vliv přítomnosti pumpy *CaCdr1p* nebo *CaCdr2p* v membráně kvasinek *C. albicans* na akumulaci sondy diS-C₃(3) v buňkách

Charakter barvicích křivek buněk *C. albicans* exprimujících pouze pumpu *CaCdr1p* ($\Delta cdr2$), obr. 3-24A, nebo *CaCdr2p* ($\Delta cdr1$), obr. 3-24B, se výrazně liší od průběhu barvení buněk *PDR5+* *S. cerevisiae* a *K. lactis* (viz obr. 3-3). Zatímco u těchto druhů kvasinek pozorujeme již od začátku měření nižší barvení buněk *PDR5+* než buněk *pdr5-*, barvení buněk $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ je po dobu cca 40 minut identické s barvením buněk bezpumpového kmene $\Delta cdr1\Delta cdr2$ [&], teprve poté se koncentrace sondy v buňkách začíná snižovat, jak indikuje pokles λ_{max} . Je-li k buňkám přidána glukóza, rozsah tohoto poklesu se výrazně zvýší, aniž by došlo ke

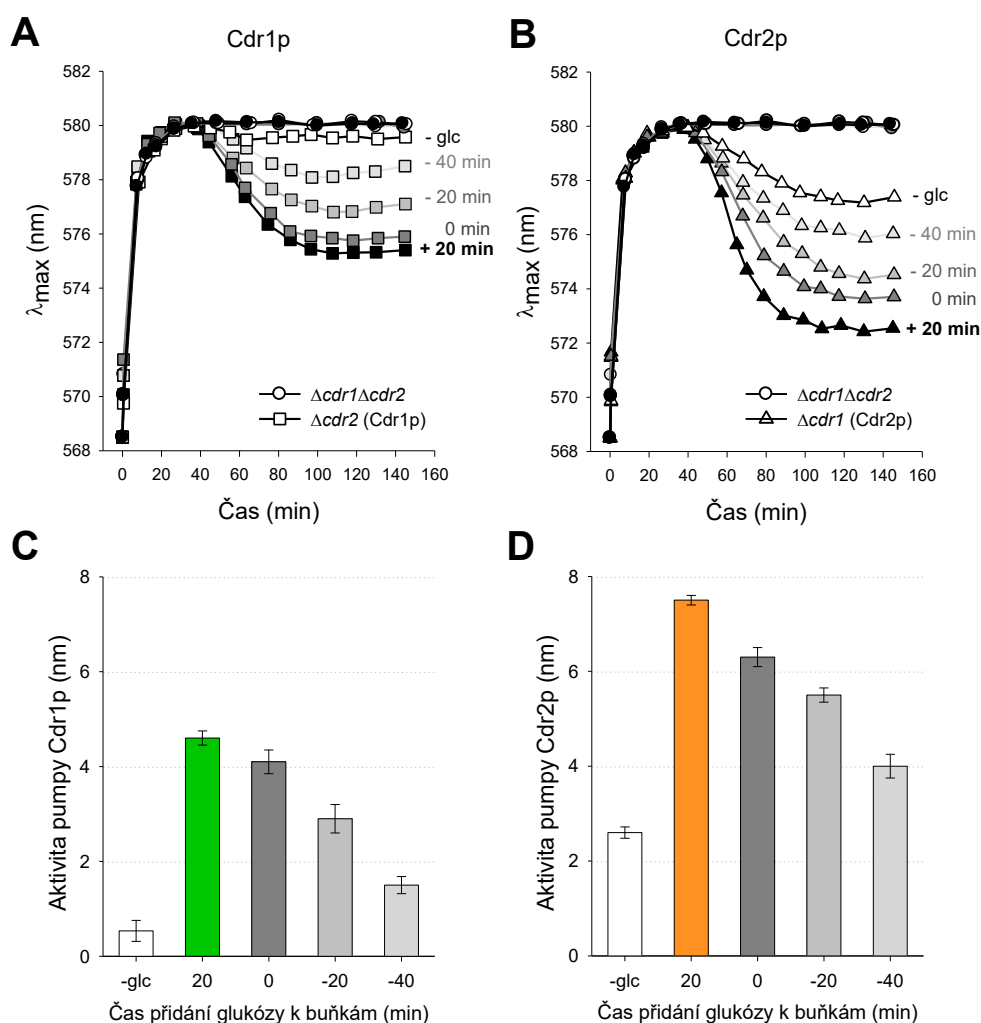
[&] Akumulace sondy v buňkách $\Delta cdr1\Delta cdr2$ je řízena pouze velikostí jejich membránového potenciálu.

zkrácení první fáze barvení. Je tedy zřejmé, že za dvoufázový průběh akumulace fluorescenční sondy diS-C₃(3) v buňkách obou pumpových kmenů $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ je zodpovědná cca 40minutová časová prodleva mezi přidáním sondy ke vzorku a jejím aktivním odstraňováním z buněk oběma pumpami, která není patrná u buněk *PDR5+* *S. cerevisiae* ani *K. lactis*.

Zjištěná absence aktivního transportu sondy pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* po dobu 40 minut může souviset buď s (1) nízkou aktivitou pump přítomných v membráně buněk, k jejichž aktivaci je zapotřebí inkubace buněk se sondou (substrátem), nebo (2) nízkou koncentrací pump v membráně; teprve přidání glukózy indukuje zvýšenou expresi genů *CaCDR1* a *CaCDR2*. Důvodem této absence nemůže být nedostatek ATP poskytující energii potřebnou pro aktivní transport sondy pumpami z buněk, jak vyplývá z výrazného poklesu v barvení buněk obou pumpových kmenů v přítomnosti glukózy svědčícím o vysoké aktivitě pump, viz obr. 3-24A,B. Navíc, ani po třech hodinách experimentu jsme nezaznamenali úbytek glukózy ve vzorku.

Přidání glukózy k buňkám $\Delta cdr2$ indukuje během cca 40 minut vysokou hladinu proteinu *CaCdr1p* v jejich plazmatické membráně [140] a s velkou pravděpodobností i pumpu *CaCdr2p* u buněk $\Delta cdr1$, proto jsme očekávali, že její přidání 20-40 minut před měřením, tj. s časovým předstihem postačujícím pro syntézu pump *de novo*, způsobí, že se buňky budou již od začátku barvit málo stejně jako buňky *PDR5+* *S. cerevisiae* a *K. lactis* (obr. 3-3).

C. albicans



Obr. 3-24 Glukóza výrazně zvyšuje celkovou aktivitu MDR pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* při odstraňování fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk *Candida albicans*. Porovnání barvicích křivek buněk *C. albicans* $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ (A) nebo $\Delta cdr2$ (B), ke kterým byla glukóza (glc) o výsledné koncentraci 2 % přidána (1) před sondou (40 nebo 20 minut), (2) společně se sondou nebo (3) 20 min po jejím přidání. Prázdné symboly - kontroly bez přidané glukózy. Závislost celkové aktivity pumpy *CaCdr1p* (C) nebo *CaCdr2p* (D) na čase přidání glukózy k buněčné suspenzi vzhledem k začátku měření, která byla stanovená z (A) nebo (B) jako rozdíl mezi příslušnými rovnovážnými hodnotami λ_{max} buněk bezpumpového a pumpového kmene. Prázdné sloupce - aktivita pump v nepřítomnosti glukózy. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

Jak je ale patrné z obrázků 3-24A,B, předchozí inkubace buněk s glukózou žádným způsobem vstup sondy do buněk neovlivňuje. Vzhledem k tomu, že dokonce buňky obou pumpových kmenů, ke kterým byla glukóza přidána 40 minut před sondou, vykazují identické počáteční barvení s buňkami $\Delta cdr1\Delta cdr2$, vyloučili

jsme jako možnou příčinu časové prodlevy v aktivním odstraňování sondy pumpami CaCdr1p a CaCdr2p z buněk výše zmiňovanou možnost (2). Zvýšení počtu pump v membráně buněk indukované glukózou se projeví až ve druhé fázi barvení výrazným poklesem λ_{\max} indikujícím jejich vysokou celkovou aktivitu^{##}.

Jako nejpravděpodobnější vysvětlení dvoufázového profilu barvení buněk obou pumpových kmenů se zdá být aktivace existujících a nově syntetizovaných pump v membráně samotnou sondou, která je jejich substrátem. Aby došlo k jejich aktivaci, je zapotřebí buňky po určitou dobu inkubovat se sondou. Po tuto dobu však sonda vstupuje podle membránového potenciálu do buněk, což má za následek, že se jejich barvení po dobu cca 40 minut neliší od barvení buněk bezpumpového kmene. Nelze vyloučit ani možnost, že sonda sama (podobně jako glukóza) indukuje zvýšenou expresi obou pump.

Dalším důležitým zjištěním vyplývajícím z obrázku 3-24 je negativní dopad dlouhodobé inkubace buněk s glukózou na aktivitu obou pump. Zatímco celková rovnovážná aktivita pumpy CaCdr1p u buněk $\Delta cdr2$ je po přidání glukózy ve 20. minutě barvení zvýšena téměř 9krát^{§§} v porovnání s její nízkou hodnotou u kontrolních buněk, přidání glukózy před nebo současně se sondou vede ke snížení celkové aktivity pumpy, která klesá s rostoucí dobou inkubace buněk s glukózou, obr. 3-24C. Tento trend je rovněž patrný u buněk $\Delta cdr1$, u kterých je i bez glukózy pozorováno aktivní odstraňování sondy pumpou CaCdr2p, obr. 3-34D. Téměř trojnásobné^{§§} zvýšení její celkové aktivity po přidání glukózy 20 minut po sondě poklesne jen na dvojnásobek původní aktivity, je-li glukóza přidána 40 minut před začátkem měření, obr. 3-34D. Možným důvodem by mohla být relativně rychlá degradace pump v membráně endocytózou (turnover) [141]. Bez ohledu na to, co je skutečnou příčinou pozorovaného poklesu celkové aktivity pump v závislosti na době inkubace s glukózou (to nebylo cílem disertační práce), přidávali jsme glukózu ve všech následujících experimentech až ve 20. minutě barvení.

Tyto doposud nepublikované výsledky jsou z lékařského hlediska velmi zajímavé, neboť naznačují, že inkubace buněk *C. albicans* s různými antifungálními

^{##} Větší aktivita pumpy CaCdr2p může být důsledkem nejenom vyššího zastoupení pumpy CaCdr2p v plazmatické membráně buněk $\Delta cdr1$, ale také jejího efektivnějšího odstraňování sondy z buněk v porovnání s pumpou CaCdr1p, viz rozdílná celková aktivita pump ScPdr5p a KlPdr5p, kapitola 3.2.2.

^{§§} Stanoveno jako poměr aktivity pumpy v a bez přítomnosti glukózy ve vzorku z obr. 3-24C, nebo D.

léky/substráty vede nejenom ke zvýšené expresi pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* [77, 142], ale také k jejich aktivaci.

3.4.2 Zavedení efektivního postupu pro vyhledání inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* založeného na použití látek účinně inhibujících transport sondy diS-C₃(3) pumpami *ScPdr5p* a/nebo *ScSnq2p*

Abychom potvrdili oprávněnost námi navrženého postupu pro vyhledávání účinných inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* založeného na primárním testování inhibičního účinku látek na transport sondy pumpou *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, použili jsme jednak dvě látky, které jsou známými modulátory aktivity obou pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* a také pumpy *ScPdr5p*, farnesol [117] a beauvericin [87, 114] (obr. 3-18B), jednak enniatin B, který je známým inhibitorem pumpy *CaCdr1p* [69] a *ScPdr5p*, ([113], obr. 3-18A). Tento postup jsme poté aplikovali na testování inhibičního účinku čtyř nově syntetizovaných derivátů 1,4-dihydropyridinu^{¶¶} (1,4-DHP) [143] označených jako derivát S, H, 5 a 7, viz tabulka 2-1, část II. Navíc, jsme testovali inhibiční účinnost látek vybraných na základě výsledků našeho postupu přímo na buňkách rezistentního klinického izolátu *C. albicans* CY 1123, za jejichž rezistenci vůči antifungálním lékům, např. azolům, je zodpovědná zejména nadprodukce pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* v membráně.

3.4.2.1 Porovnání inhibičního účinku farnesolu na transport sondy diS-C₃(3) pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u *C. albicans* a pumpami *ScPdr5p* a *ScSnq2p* u *S. cerevisiae*

Zatímco existuje celá řada látek v různých stádiích klinických zkoušek, které jsou schopny inhibovat (modulovat) činnost MDR pumpy P-glykoproteinu (lidský homolog pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*) u rakovinných buněk [144], neexistuje mnoho příkladů látek, které inhibují odstraňování léků MDR pumpami z patogenních kvasinek. Jednou z těchto látek, u které bylo zjištěno, že moduluje aktivitu pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* a také *ScPdr5p*, je farnesol, hlavní signální molekula *C. albicans* [117]. Vybrali jsme si jej proto jako jednoho z kandidátů pro ověření

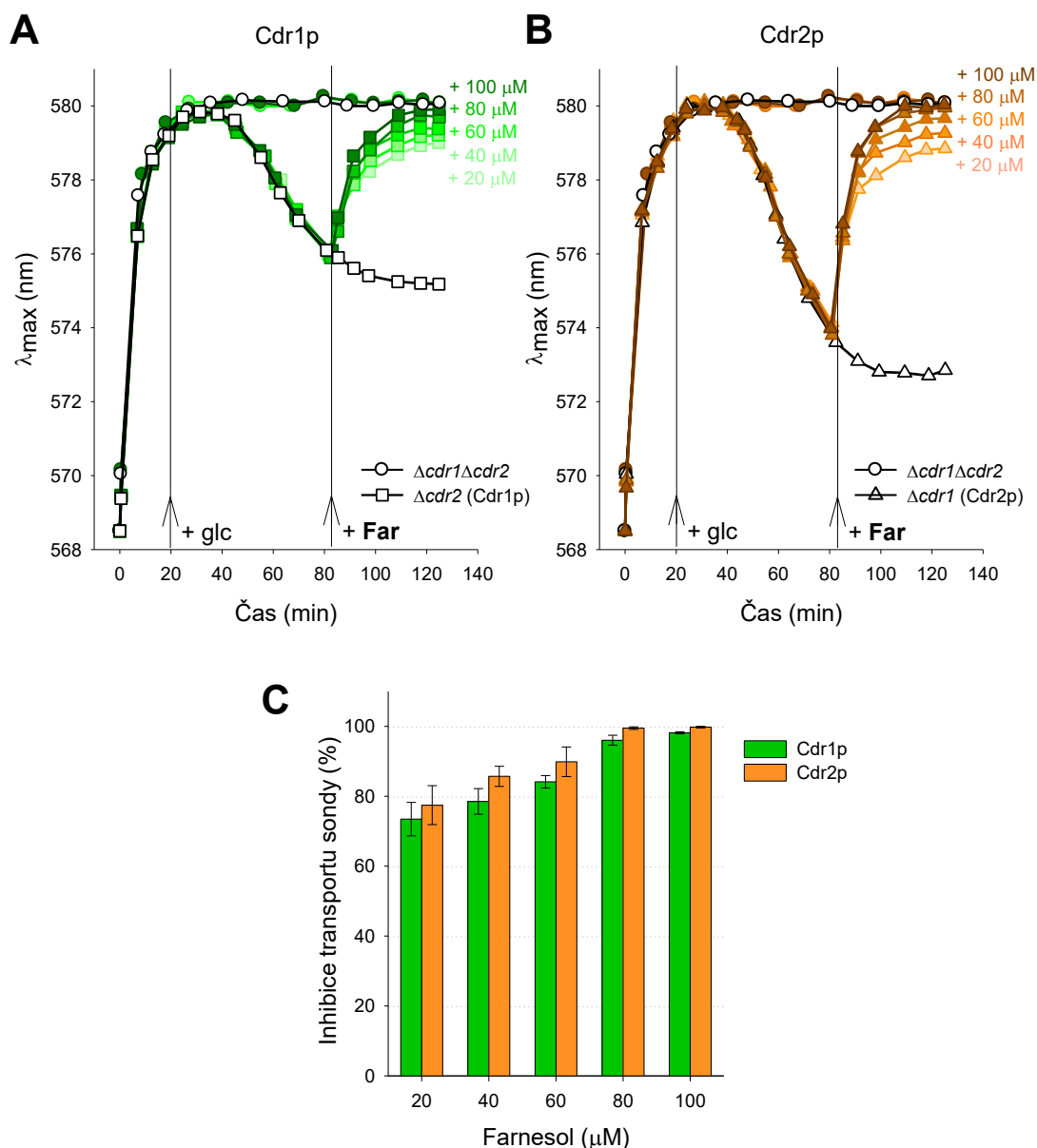
^{¶¶} Látka 1,4-DHP je meziproduct vzniklý při syntéze nilvadipinu, který funguje jako inhibitor vápníkového kanálu [143].

našeho tvrzení, že pokud látka blokuje transport substrátu (sondy) alespoň jednou z dvojice pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, inhibuje přinejmenším také jednu z pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p*.

Ačkoliv jsme pro testování účinku farnesolu na aktivitu pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* použili jiný soubor izogenních mutantních kmenů (viz tabulka 2-2, část II) než autoři článku [117]^{###}, dospěli jsme k témuž zjištění, tj. že 100 μM koncentrace farnesolu je postačující pro úplnou inhibici transportu substrátu/sondy oběma pumpami, obr. 3-25. U buněk *S. cerevisiae* AD12 s nadprodukcí pumpy *ScPdr5p* byla koncentrace účinně inhibující transport sondy dokonce nižší ($\sim 60 \mu\text{M}$), obr. 3-26A,C. Navíc, tato koncentrace byla dostatečná také pro úplné zablokování aktivního odstraňování sondy z buněk AD13 s nadprodukcí pumpy *ScSnq2p*, obr. 3-26B,C. Tento doposud nepublikovaný výsledek, že farnesol je účinným inhibitorem pumpy *ScSnq2p*, je velmi významný, protože prozatím nebyly inhibitory této pumpy s výjimkou alkoholů [130] identifikovány.

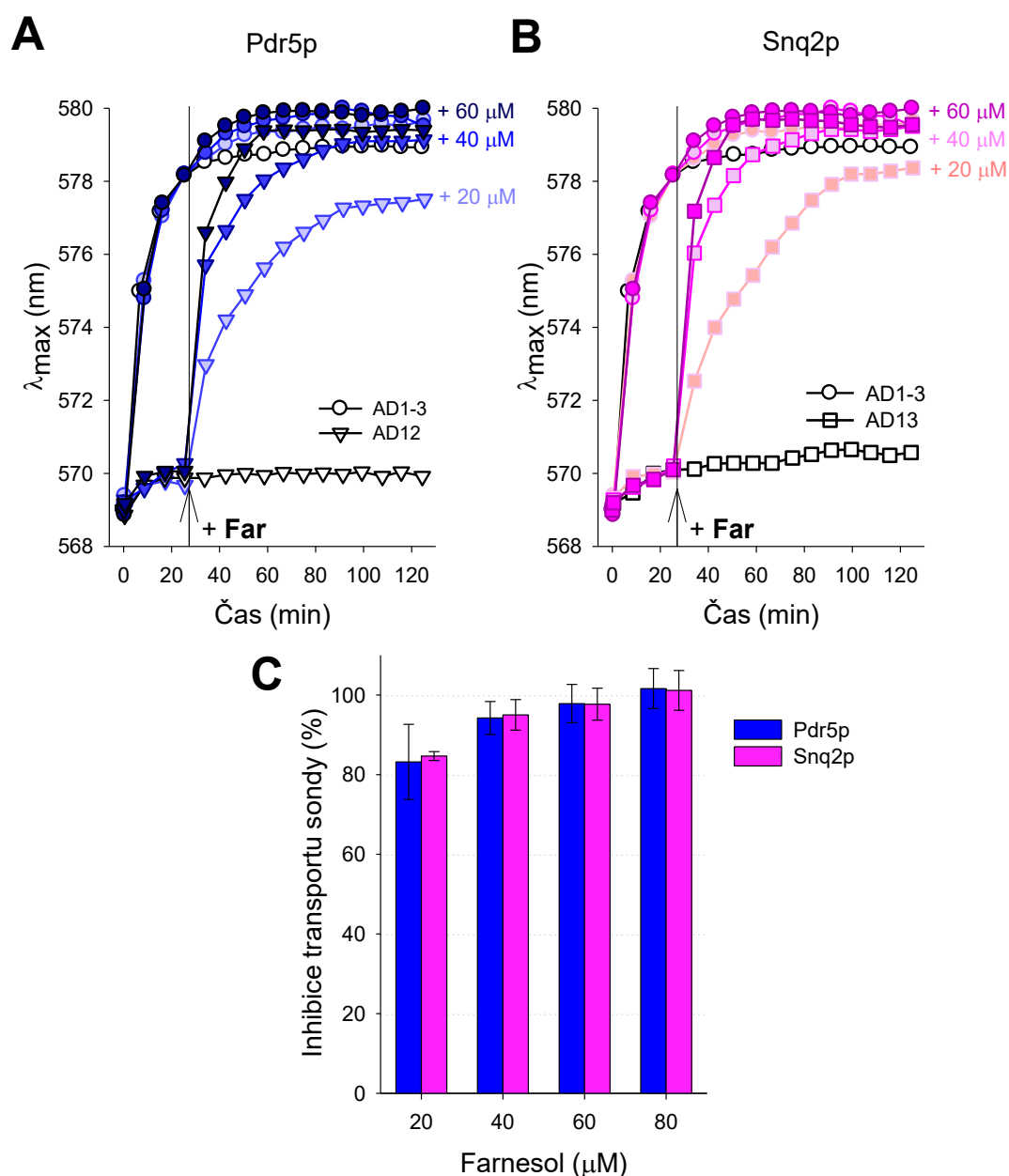
^{###} V této studii byla použita série chimérických konstruktů vzniklých heterologní expresí genů *CaCDR1* nebo *CaCDR2* v nepatogenní kvasince *S. cerevisiae* AD1-8, která má deletováno sedm genů kódujících ABC transportéry. Ačkoliv je kvasinka *S. cerevisiae* často volena pro expresi a výzkum MDR pump *C. albicans*, je důležité vzít do úvahy nejenom odlišný metabolismus těchto dvou mikroorganismů, ale také to, že, heterologní exprese ovlivňuje několik dalších vnitrobuněčných interakcí zodpovědných za rezistenci vůči lékům, jako je interakce pumpy s jinými proteiny a regulačními systémy [114].

C. albicans



Obr. 3-25 Farnesol je účinným inhibítorem transportu fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk *Candida albicans* jak pumpou *CaCdr1p*, tak pumpou *CaCdr2p*. Porovnání barvicích křivek buněk *C. albicans* $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr2$ (A) nebo $\Delta cdr1$ (B), ke kterým byla ve 20. minutě barvení přidána glukóza o výsledné koncentraci 2 % a v 82. minutě farnesol (Far). Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk bez přidání farnesolu. (C) Koncentračně závislý rozsah inhibice transportu sondy pumpou *CaCdr1p* (zeleně) a *CaCdr2p* (oranžově) vyvolaný farnesolem. Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které \underline{A} představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{max} u buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ nebo $\Delta cdr2$ v přítomnosti farnesolu a **B** v jeho nepřítomnosti. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

S. cerevisiae

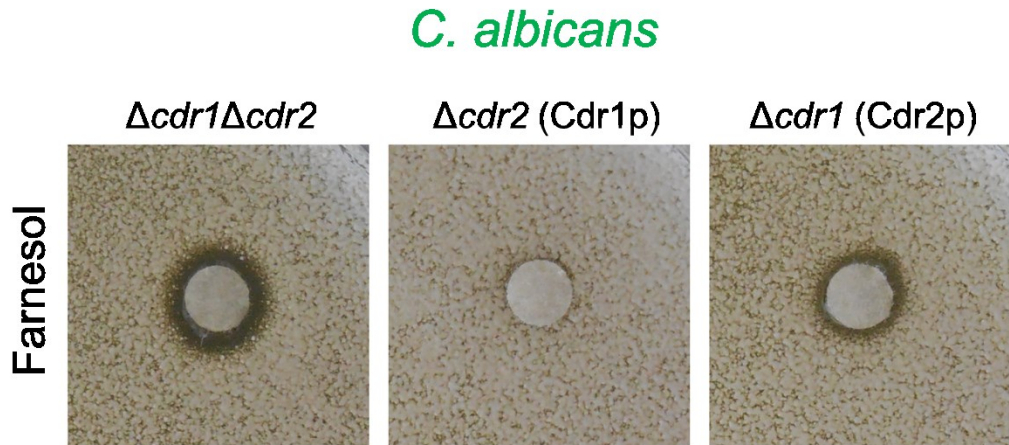


Obr. 3-26 Farnesol účinně inhibuje transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk *Saccharomyces cerevisiae* nejenom pumpou *ScPdr5p*, ale také pumpou *ScSnq2p*. Porovnání barvicích křivek buněk *S. cerevisiae* AD1-3 a AD12 (A**) nebo AD13 (**B**), ke kterým byl ve 25. minutě barvení přidán farnesol (Far). Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk bez přidání farnesolu. (**C**) Koncentračně závislý rozsah inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* (modře) a *ScSnq2p* (růžově) vyvolaný farnesolem. Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které **A** představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{\max} u buněk AD1-3 a AD12 nebo AD13 v přítomnosti farnesolu a **B** v jeho nepřítomnosti. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.**

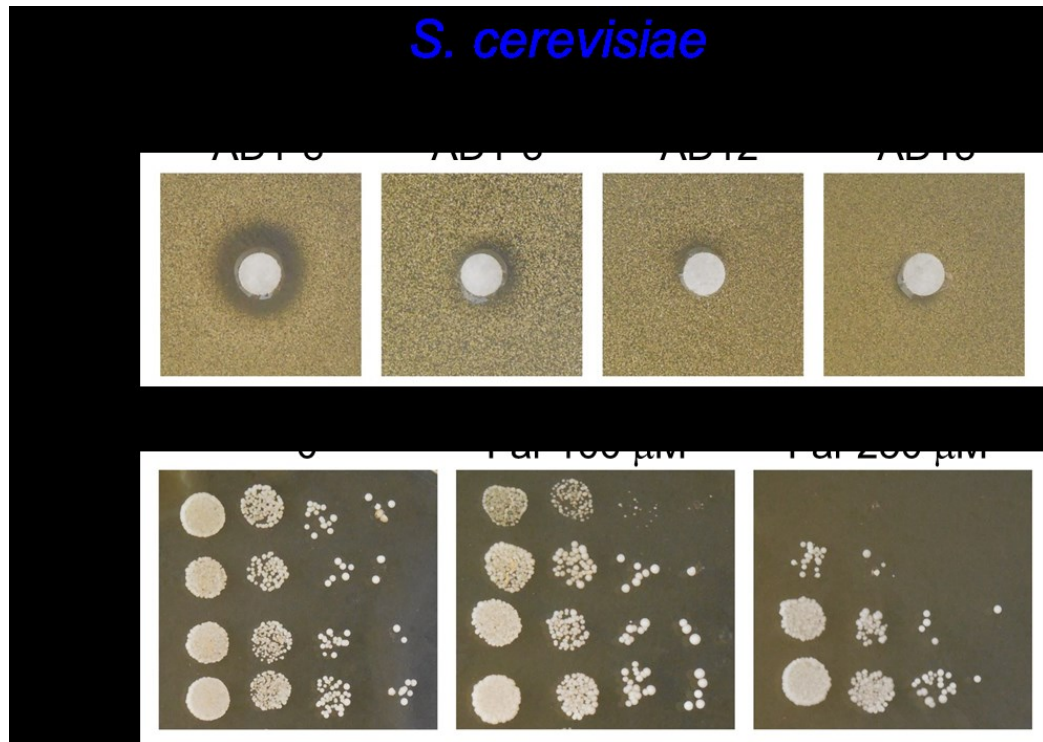
Zajímalo nás, jestli ke koncentračně závislému inhibičnímu účinku farnesolu na transport sondy pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, obr. 3-25C, a pumpami *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, obr. 3-26C, přispívá[☞] jeho kompetice se sondou o transport. Jinými slovy, jestli je farnesol substrátem těchto pump. Jak vyplývá z výsledků zónových testů (v případě *ScPdr5p* a *ScSnq2p* také kapkového testu), farnesol je substrátem jak obou pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u *C. albicans*, obr. 3-27, tak pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* u *S. cerevisiae*, obr. 3-28A,B.

Naše tvrzení, že za koncentračně závislý inhibiční účinek farnesolu je zodpovědná zejména jeho kompetice se sondou o transport pumpami, je v souladu se zjištěním, že farnesol kompetitivně inhibuje odstraňování rhodaminu 6G, známého substrátu pump *CaCdr1p*, *CaCdr2p* a *ScPdr5p*, těmito pumpami z buněk [117]. V rámci této studie se však autorům nepodařilo prokázat, že je farnesol substrátem těchto pump. Pravděpodobnou příčinou absence rozdílů v přežívání buněk s nadprodukcí pump v membráně a bezpumpového kmene vystavených účinku různých koncentrací farnesolu může být velká citlivost bezpumpového kmene *S. cerevisiae* AD1-8, který byl použit pro expresi genů *CaCDR1*, *CaCDR2* a *ScPDR5*. Dokázali jsme totiž, že tolerance kmene AD1-8 vůči účinku farnesolu je podstatně nižší než u buněk AD1-3 (obr. 3-28). Je možné, že menší citlivost buněk AD1-3, u nichž jsou oproti buňkám AD1-8 navíc exprimovány čtyři ABC transportéry (*ScPdr10p*, *ScPdr11p*, *ScPdr15p* a *ScYcf1p*), je důsledkem aktivního odstraňování farnesolu z buněk některými z těchto pump, např. *ScPdr10p* a *ScPdr15p*, které jsou homology pumpy *ScPdr5p*, viz kapitola 1.4.1. Tato skutečnost by vysvětlovala i zdánlivou hyperpolarizaci buněk AD1-3, která není pozorována u buněk *C. albicans* $\Delta cdr1\Delta cdr2$, jako důsledek kompetitivní inhibice transportu sondy farnesolem některou z těchto pump. Vzhledem k tomu, že u buněk AD1-8 je kromě genů pro ABC transportéry deletován také gen kódující transkripční faktor *ScPdr3p*, který reguluje produkty genů podílejících se také na biosyntéze sfingolipidů [145, 146], nelze tedy vyloučit ani možnost, že zvýšená citlivost tohoto kmene je důsledkem odlišné kompozice plazmatické membrány těchto buněk.

[☞] Vzhledem k různorodosti účinků farnesolu na buňky (viz kapitola 1.6.4), z nichž mnohé mohou významně ovlivňovat aktivitu pump i při jeho krátkodobém působení (60-100 min), nelze vyloučit možnost, že případná kompetitivní inhibice transportu sondy farnesolem je pouze jedním z faktorů, které jsou zodpovědné za pozorovaný koncentračně závislý inhibiční účinek farnesolu.



Obr. 3-27 Farnesol je substrátem dvou hlavních pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* kvasinky *C. albicans*. Inhibiční zóny buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$, $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ vzniklé účinkem 1,9 M farnesolu.



Obr. 3-28 Farnesol je substrátem nejenom pumpy *ScPdr5p*, ale také pumpy *ScSng2p* kvasinky *S. cerevisiae*. (A) Inhibiční zóny buněk kmenů AD1-8, AD1-3, AD12 a AD13 vystavené účinku 3,8 M farnesolu. (B) Citlivost kmenů AD1-8, AD1-3, AD12 a AD13 k farnesolu stanovená pomocí kapkového testu. Na misky s 30 ml 2 % YPD agaru byly nakapány 4 μ l naředěných suspenzí jednotlivých kmenů o koncentracích $1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^5$ a $1 \cdot 10^4$ buněk/ml (zleva doprava). Kontrolní miska (0) neobsahovala farnesol, v agaru zbylých dvou misek byl rozmíchán farnesol na výslednou koncentraci 100 μ M nebo 250 μ M.

Ačkoliv nelze obecně vyloučit možnost, že se v závislosti na mechanismu inhibičního účinku testované látky bude rozsah inhibice transportu sondy/substrátu u pump *C. albicans* a *S. cerevisiae* lišit^{••}, výsledky série experimentů s farnesolem podporují naše tvrzení, že pokud látka inhibuje transport sondy pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* inhibuje rovněž pumpy *ScPdr5p* a *ScSnq2p*.

3.4.2.2 Testování inhibičního účinku beauvericinu a enniatinu B na transportní aktivitu pump *CaCdr1p*, *CaCdr2p*, *ScPdr5p* a *ScSnq2p*

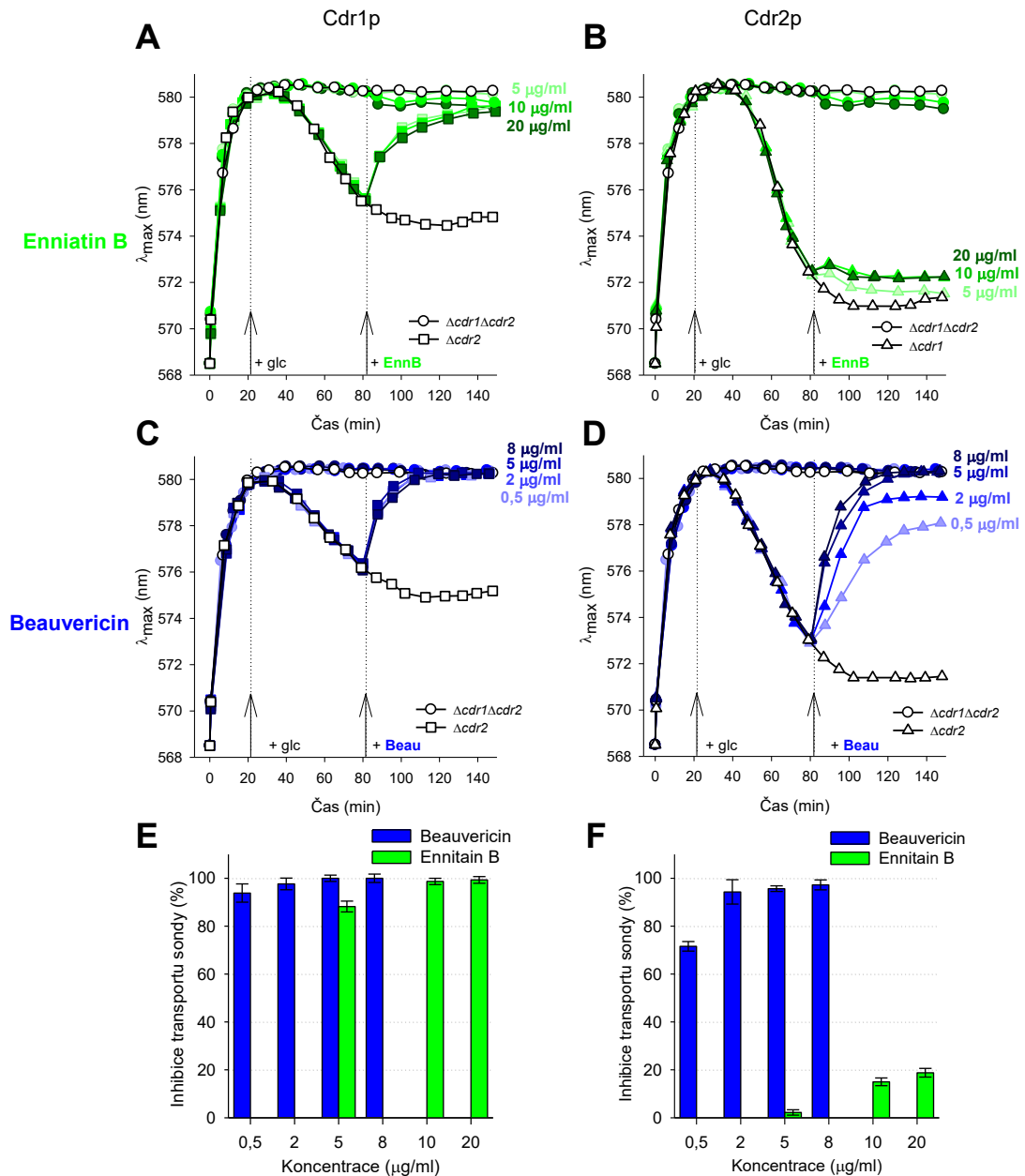
Dalšími dvěma látkami se známým inhibičním účinkem na pumpy *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, které jsme testovali pro ověření našeho tvrzení, viz kapitola 3.4.2, byl jednak beauvericin inhibující transport sondy diS-C₃(3) nebo rhodaminu 6G oběma pumpami [87, 114], jednak enniatin B, který je známým inhibitorem pumpy *CaCdr1p* [69].

Jak je patrné z obrázku 3-29, beauvericin inhibuje transport sondy oběma pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* podle našeho očekávání (obr. 3-29A,B,E,F), zatímco enniatin B pouze pumpou *CaCdr1p* (obr. 3-29C,D,E,F). Jak vyplývá z koncentračně závislé inhibice transportu sondy beauvericinem (obr. 3-29E,F), je tato látka účinnějším inhibitorem pumpy *CaCdr1p* než *CaCdr2p*. Vzhledem k tomu, že jsme zatím jako jediní dokázali (zatím nepublikovaný výsledek), že beauvericin je substrátem obou pump (obr. 3-30), lze pozorovanou inhibici vysvětlit kompeticí sondy a beauvericinu o transport^{♦♦}. Účinnější inhibice transportu sondy pumpou *CaCdr1p* než *CaCdr2p* je pak zřejmě důsledkem vyšší afinity tohoto substrátu k vazebným místům ve vazebné kapse *CaCdr1p* v porovnání s *CaCdr2p*, jak indikuje větší inhibiční zóna u buněk $\Delta cdr1$ než u buněk $\Delta cdr2$, obr. 3-30.

^{••} Například, je-li testovaná látka substrátem všech pump (jako v případě farnesolu), záleží rozsah kompetitivní inhibice transportu sondy danou pumpou na takových faktorech, jako je (1) počet vazebných míst ve vazebné kapse pumpy, se kterými látka a sonda interagují, (2) velikost molekuly substrátu a (3) velikost vazebné kapsy pumpy a uspořádání jejích vazebných míst, viz kapitola 3.2.3. Některé z těchto údajů nejsou zatím u pump *ScSnq2p*, *CaCdr1p* a *CaCdr2p* k dispozici.

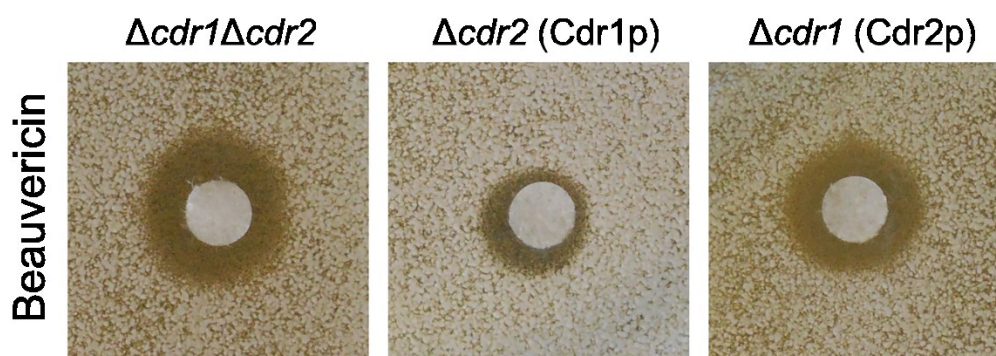
^{♦♦} Vzhledem k okamžitému účinku beauvericinu na aktivitu obou pump (viz paralelní průběh barvení buněk $\Delta cdr1$ a $\Delta cdr2$ po přidání beauvericinu s barvením negativní kontroly $\Delta cdr1$ $\Delta cdr2$) a jeho zanedbatelnému vlivu na membránový potenciál lze prakticky vyloučit možnost, že za inhibici pump je zodpovědná dysfunkce mitochondrií spojená s nedostatkem ATP pro jejich činnost [112].

C. albicans



Obr. 3-29 Zatímco beauvericin je účinným inhibítoem transportu fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk *Candida albicans* jak pumpou CaCdr1p, tak pumpou CaCdr2p, enniatin B inhibuje pouze pumpu CaCdr1p. Porovnání barvicích křivek buněk *C. albicans* $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr2$ (A, C) nebo $\Delta cdr1$ (B, D), ke kterým byla ve 20. minutě barvení přidána glukóza o výsledné koncentraci 2 % a v 82. minutě beauvericin (A, B) nebo enniatin B (C, D). Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk bez přidání testovaných látek. Koncentračně závislý rozsah inhibice transportu sondy pumpou CaCdr1p (E) a pumpou CaCdr2p (F) vyvolaný beauvericinem (modře) nebo enniatinem B (zeleně). Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které \underline{A} představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{max} u buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ nebo $\Delta cdr2$ v přítomnosti a \underline{B} v nepřítomnosti beauvericinu nebo enniatinu B. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

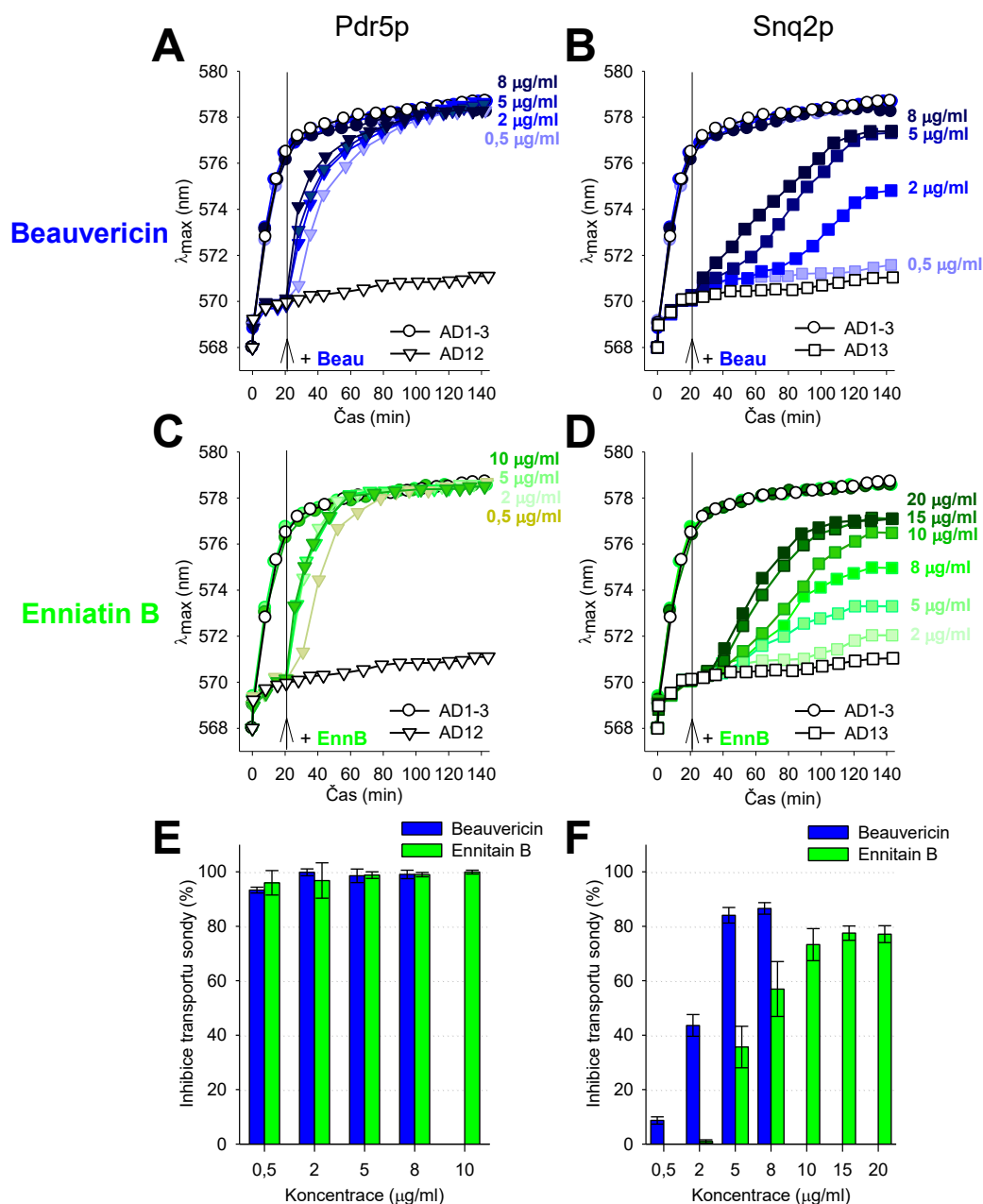
C. albicans



Obr. 3-30 Beauvericin je slabším substrátem MDR pumpy *CaCdr2p* než *CaCdr1p*. Inhibiční zóny buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$, $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ vzniklé účinkem 6,4 mM beauvericinu (5 mg/ml).

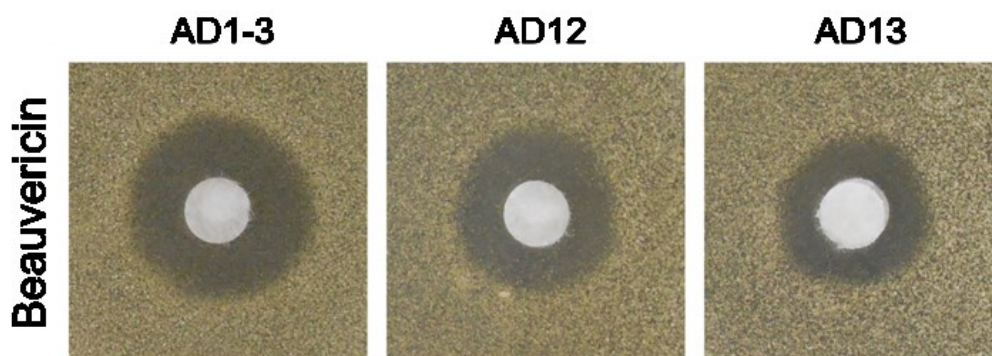
Zatímco okamžité zablokování transportu sondy pumpou *ScPdr5p* u buněk *S. cerevisiae* AD12 již při použití nízkých koncentrací jak beauvericinu, obr. 3-31A,E, tak enniatinu B, obr. 3-31C,E, nebylo překvapující (viz obr. 3-18), náš předpoklad vyplývající z dřívější studie [113], že enniatin B ani beauvericin nebudou inhibovat transport sondy pumpou *ScSnq2p*, se nepotvrdil, obr. 3-31B,D,F. Jak totiž vyplývá z těchto výsledků, zvyšující se koncentrace obou látek vede ke koncentračně závislému nárůstu inhibice transportu sondy pumpou *ScSnq2p* (účinné koncentrace enniatinu B jsou až 7krát vyšší než ty použité v [113]). Navíc je pozorována saturovaná neúplná inhibice transportu sondy touto pumpou jak účinkem beauvericinu, tak enniatinu B (obr. 3-31F). Rozsah inhibice transportu sondy u beauvericinu činí ~ 87 %, u enniatinu B ~ 77 %. Na základě analýzy výsledků získaných při porovnávání rozsahu inhibice transportu sondy pumpou *K/Pdr5p* a *ScPdr5p* vyvolaného azoly (viz kapitola 3.2.3) a vzhledem k tomu, že beauvericin je substrátem nejenom pumpy *ScPdr5p*, ale také pumpy *ScSnq2p*, obr. 3-32, je neúplná saturovaná inhibice transportu sondy touto pumpou vyvolaná beauvericinem a enniatinem důsledkem jiného uspořádání (větší velikosti) vazebné kapsy *ScSnq2p* umožňující kotransport těchto látek se sondou. Detailní studie rozdílného uspořádání vazebné kapsy *ScPdr5p* a *ScSnq2p* bude předmětem dalšího výzkumu.

S. cerevisiae



Obr. 3-31 Jak beauvericin, tak enniatin B inhibují transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk *Saccharomyces cerevisiae* nejenom pumpou *ScPdr5p*, ale také pumpou *ScSnq2p*. Porovnání barvicích křivek buněk *S. cerevisiae* AD1-3 a AD12 (A, C) nebo AD13 (B, D), ke kterým byl ve 20. minutě barvení přidán beauvericin (A, B) nebo enniatin B (C, D). Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk bez přidání testovaných látek. Koncentračně závislý rozsah inhibice transportu sondy pumpou *ScPdr5p* (E) a pumpou *ScSnq2p* (F) vyvolaný beauvericinem (modře) nebo enniatinem B (zeleně). Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které **A** představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{max} u buněk AD1-3 a AD12 nebo AD13 v přítomnosti a **B** v nepřítomnosti beauvericinu nebo enniatinu B. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

S. cerevisiae



Obr. 3-32 Beauvericin je substrátem nejenom pumpy *ScPdr5p*, ale také pumpy *ScSnq2p* kvasinky *S. cerevisiae*. Inhibiční zóny buněk kmenů AD1-3, AD12 a AD13 vzniklé účinkem 3,2 mM beauvericinu (2,5 mg/ml).

Výsledky experimentů se známými inhibitory MDR pump u *C. albicans* (farnesol, beauvericin a enniatin B), dokazují, že pokud látka blokuje transport substrátu (sondy) alespoň jednou z dvojice pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, inhibuje přinejmenším jednu z pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p*.

3.4.2.3 Testování inhibičního účinku série derivátů 1,4-dihydropyridinu na transport sondy diS-C₃(3) pumpami *ScPdr5p*, *ScSnq2p*, *CaCdr1p* a *CaCdr2p*

Na základě výsledků dvou předcházejících kapitol můžeme konstatovat, že naše strategie použití nepatogenních kvasinek *S. cerevisiae* pro prvotní výběr látek s inhibičním potenciálem je opodstatněná. Nicméně abychom zcela jednoznačně demonstrovali spolehlivost tohoto postupu, bylo zapotřebí dokázat, že skutečně pouze látka, která inhibuje aktivní odstraňování sondy diS-C₃(3) z buněk *S. cerevisiae* pumpami *ScPdr5p* a/nebo *ScSnq2p*, blokuje rovněž transport substrátu (sondy) alespoň jednou z dvojice pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u kvasinek *C. albicans*. Jinými slovy, pokud přidání testované látky nevede k zablokování činnosti pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, není jejím účinkem ovlivněna ani aktivita pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*. Provedli jsme proto sérii experimentů, v rámci kterých jsme testovali čtyři nově syntetizované deriváty 1,4-dihydropyridinu (1,4-DHP) označené jako derivát S, H, 5 a 7 (viz tabulka 2-1, část II).

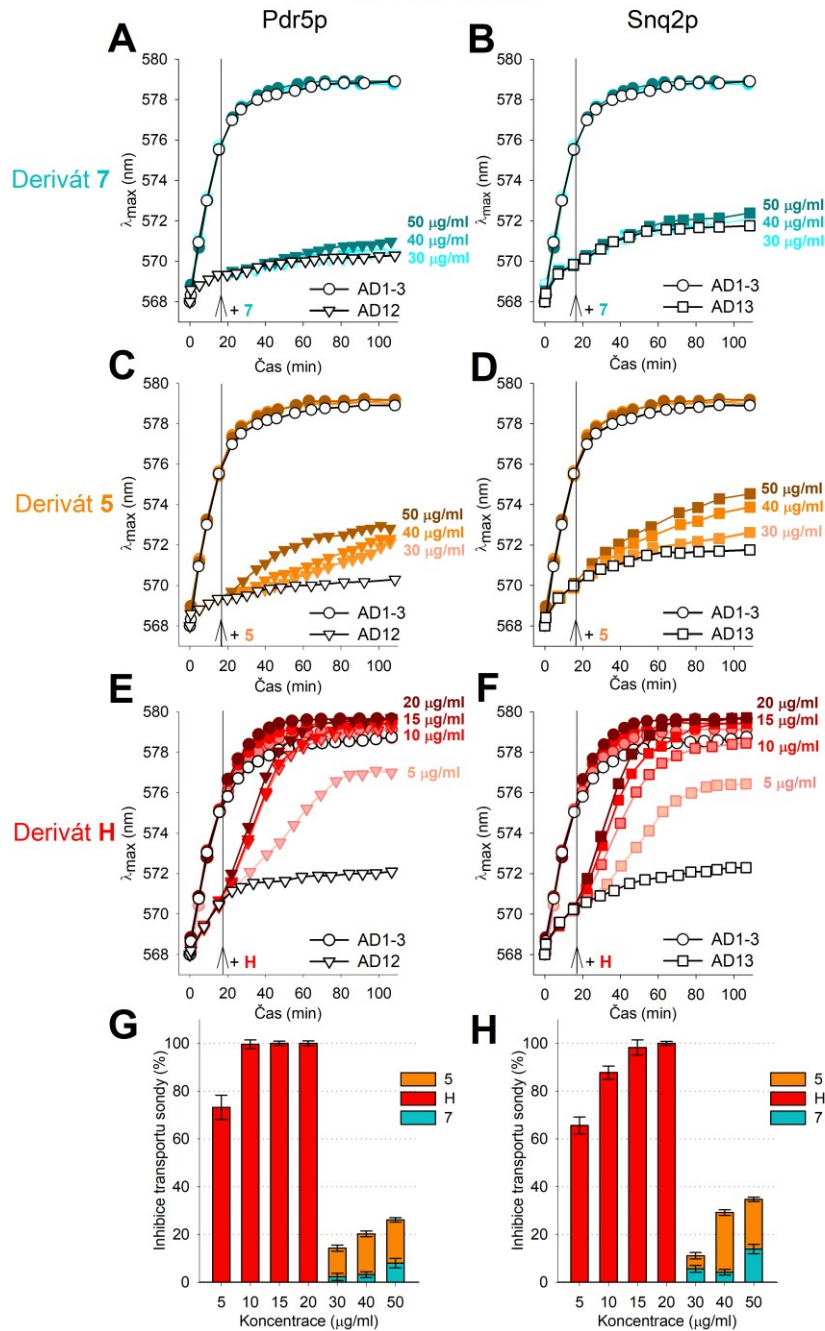
Základní podmínkou pro použití diS-C₃(3) fluorescenční metody pro sledování vlivu chemického stresu na buňky je absence vázané sondy v médiu

(C-P pufru), viz kapitola 1.7.2. Pro stanovení účinku testované látky na membránový potenciál buněk a aktivitu jejich MDR pump, která je přidána k buněčné suspenzi a zůstává v médiu po celou dobu experimentu, je tedy nutné, aby její interakce se sondou vedoucí k posunu λ_{\max} do červené oblasti spektra byla minimální, popř. aby látka sama nefluoreskovala v daném rozsahu vlnových délek. Vzhledem k tomu, že derivát S i při nízkých koncentracích výrazně ovlivňoval emisní spektrum sondy v pufru v důsledku jejich vzájemné interakce, jeho vliv na transport sondy MDR pumpami jsme nestudovali.

Jak je patrné z obrázku 3-33, derivát 7 nevykazuje prakticky žádný inhibiční účinek ani na jednu z pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* (obr. 3-33A,G,B,H) a rozsah inhibice transportu sondy oběma pumpami vyvolané derivátem 5 je nízký (u *ScPdr5p* ~ 25 %, u *ScSnq2p* ~ 35 %), obr. 3-33B,G,C,H. Ze všech tří testovaných derivátů pouze derivát H účinně inhibuje transport sondy oběma pumpami (obr. 3-43E,G,F,H).

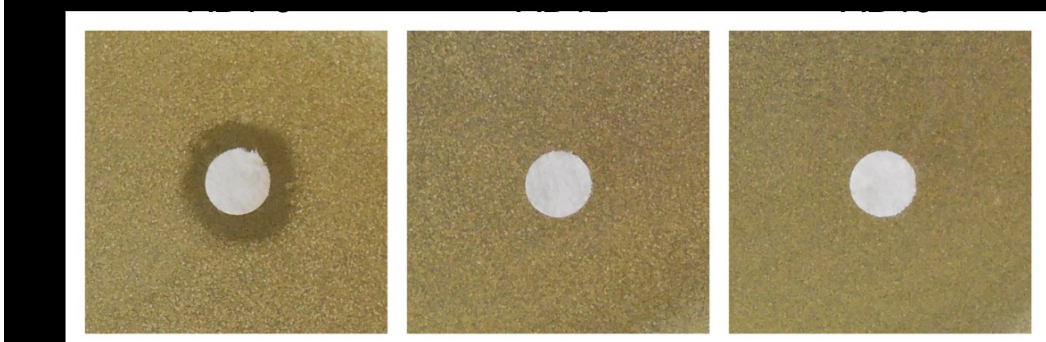
Vzhledem k tomu, že derivát H je substrátem obou pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* (obr. 3-34), koncentračně závislý rozsah inhibice transportu sondy oběma pumpami (obr. 3-33G,H) je s velkou pravděpodobností důsledkem kompetice sondy a derivátu H o transport, neboť látka sama nevykazuje žádnou antifungální aktivitu (viz příloha 3).

S. cerevisiae



Obr. 3-33 Pouze derivát H účinně inhibuje transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) oběma pumpami *ScPdr5p* a *ScSnq2p*. Barvicí křivky buněk *S. cerevisiae* AD1-3 a AD12 (A, C, E) nebo AD13 (B, D, F), ke kterým byl v 17. minutě barvení přidán derivát 7 (A, B), derivát 5 (C, D) nebo derivát H (E, F). Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk. Porovnání inhibičního účinku jednotlivých derivátů na transport sondy pumpou *ScPdr5p* (G) nebo *ScSnq2p* (H). Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které Δ představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{\max} u buněk AD1-3 a AD12 nebo AD13 v přítomnosti a **B** v nepřítomnosti derivátu. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

S. cerevisiae

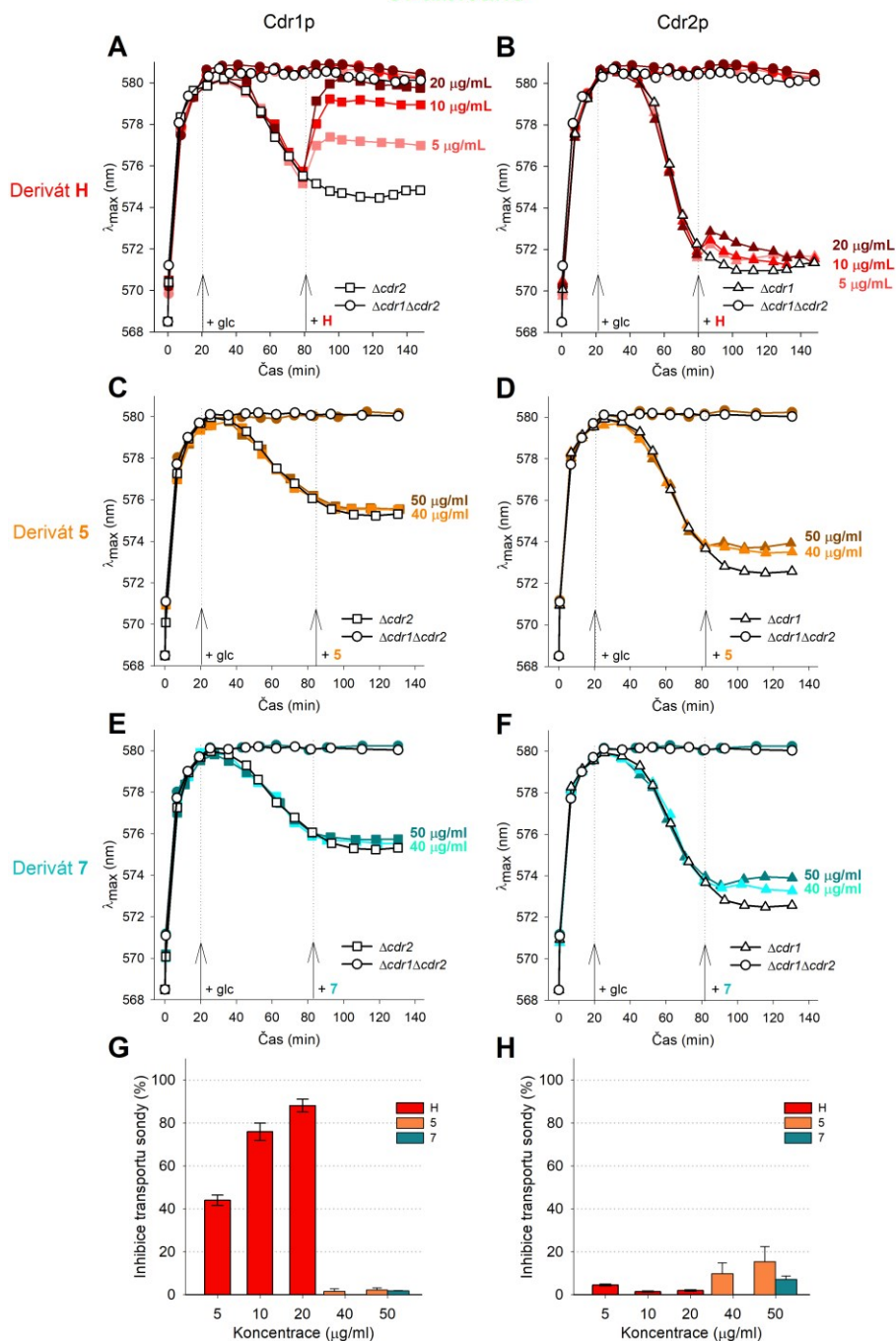


Obr. 3-34 Derivát H je substrátem obou pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p* kvasinky *S. cerevisiae*. Inhibiční zóny buněk kmenů AD1-3, AD12 a AD13 vzniklé účinkem derivátu H o koncentraci 10 mg/ml.

Ačkoliv z testovaných látek pouze derivát H inhibuje pumpy *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, ověřovali jsme u všech derivátů jejich vliv na transport sondy pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u kvasinky *C. albicans*. Zatímco přidání derivátu H k buňkám $\Delta cdr1$ (*CaCdr2p*) „aktivovaným“ glukózou nemá zásadní vliv na jejich barvení (obr. 3-35B), u buněk $\Delta cdr2$ (*CaCdr1p*) vede ke koncentračně závislému posunu rovnovážné hodnoty λ_{max} směrem k delším vlnovým délkám až na úroveň prakticky identickou s kmenem $\Delta cdr1\Delta cdr2$ (obr. 3-35A). Jinými slovy, derivát H inhibuje transport sondy pumpou *CaCdr1p* (obr. 3-35A,G) nikoliv však pumpou *CaCdr2p* (obr. 3-35B,H), podobně jako enniatin B (obr. 3-9C,D,E,F). Vliv derivátů 5 a 7 na transport sondy oběma pumpami je, podle našeho předpokladu, zanedbatelný (obr. 3-35C-F), což jednoznačně potvrzuje spolehlivost námi zavedeného efektivního postupu pro vyhledání inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*.

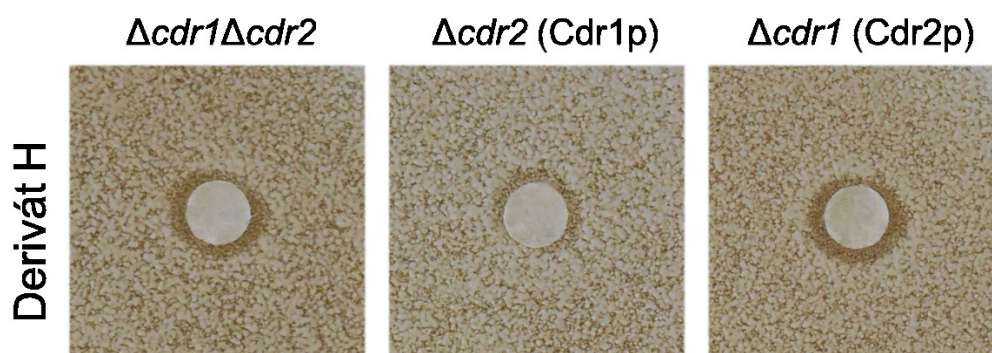
Inhibiční účinek nově syntetizovaného derivátu H na transport sondy pumpou *CaCdr1p*, nikoliv však pumpou *CaCdr2p*, byl publikován jako součást studie (příloha 3) vzniklé ve spolupráci s laboratoří dr. Olejníkové v Bratislavě, v rámci které byla úplná inhibice transportu sondy oběma pumpami vyvolaná nízkou koncentrací beauvericinu (5 $\mu\text{g/ml}$) použita jako jedna z pozitivních kontrol. Jak je navíc dokumentováno na obrázku 3-36, derivát H je substrátem pumpy *CaCdr1p*, což může být hlavní příčinou jeho rozdílného vlivu na aktivitu pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*.

C. albicans



Obr. 3-35 Pouze derivát H je účinným inhibítozem transportu fluorescenční sondy diS-C₃(3) pumpou CaCdr1p, nikoliv však pumpou CaCdr2p. Barvicí křivky buněk *C. albicans* $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr2$ (A, C, E) nebo $\Delta cdr1$ (B, D, F), ke kterým byla ve 20. minutě barvení přidána glukóza o výsledné koncentraci 2 % a v 82. minutě derivát H (A, B), derivát 5 (C, D) nebo derivát 7 (E, F). Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk bez přidání testovaných látek. Porovnání inhibičního účinku jednotlivých derivátů na transport sondy pumpou CaCdr1p (G) nebo CaCdr2p (H). Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které **A** představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{max} u buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ nebo $\Delta cdr2$ v přítomnosti a **B** v nepřítomnosti derivátu. Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

C. albicans



Obr. 3-36 Derivat H je substrátem pumpy *CaCdr1p*, nikoliv však pumpy *CaCdr2p*. Inhibiční zóny buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$, $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ vystavených účinku derivátu H o koncentraci 10 mg/ml.

3.4.3 Vliv různých inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* na odstraňování fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk klinického izolátu *C. albicans* CY 1123 rezistentního na léčbu flukonazolem

Abychom demonstrovali význam diS-C₃(3) fluorescenční metody pro vyhledávání nových inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* testovali jsme vliv farnesolu, beauvericinu, enniatinu B a derivátu H také na odstraňování sondy z buněk klinického izolátu *C. albicans* CY 1123. Jako referenci jsme použili citlivý standardní divoký kmen *C. albicans* SC5314, ačkoliv není geneticky příbuzný s kmenem CY 1123. Vzhledem k tomu, že buňky obou testovaných kmenů exprimují obě pumpy *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, byť v různé míře**, bylo zapotřebí nejprve nalézt vhodné experimentální podmínky pro testování účinku těchto inhibitorů.

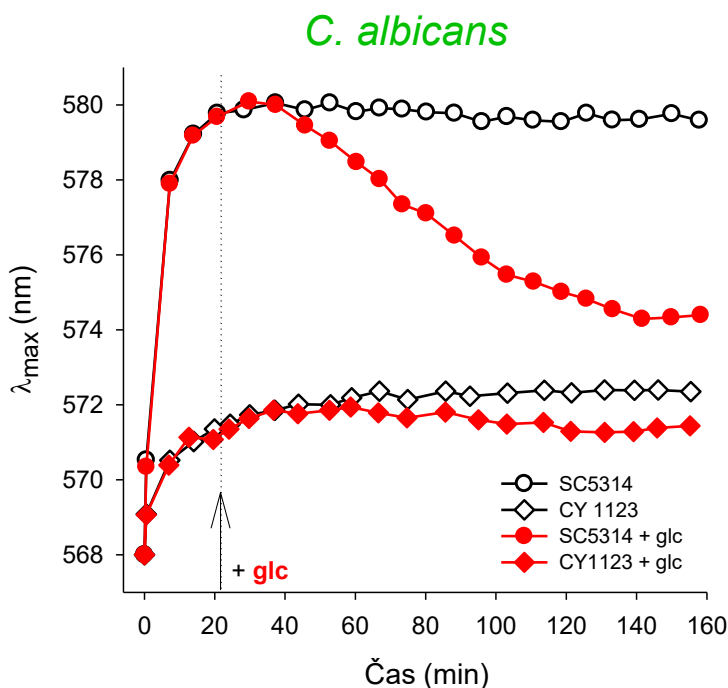
3.4.3.1 Porovnání akumulace sondy diS-C₃(3) v buňkách kmene CY 1123 a SC5314

Vzhledem k tomu, že fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, nikoliv však pumpy *CaMdr1p* [114], závisí rozsah akumulace fluorescenční sondy diS-C₃(3) v buňkách exprimujících všechny tyto pumpy pouze na celkové aktivitě pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, která souvisí s jejich množstvím v plazmatické membráně. Jinými slovy, sonda se akumuluje podstatně více

** Zatímco u většiny klinických izolátů včetně CY 1123 byla prokázána nadměrná exprese genů kódujících MDR pumpy *CaCdr1p*, *CaCdr2p* a *CaMdr1p*, u buněk citlivého kmene SC5314 je exprese těchto genů nízká.

v buňkách s nízkou aktivitou těchto dvou pump než v buňkách s jejich vysokou aktivitou.

Jak je patrné z obrázku 3-37, buňky kmene SC5314 s nízkou koncentrací MDR pump v membráně se v nepřítomnosti glukózy intenzivně barví a profil jejich barvicí křivky je stejný jako u buněk bezpumpového kmene $\Delta cdr1\Delta cdr2$ (viz obr. 3-24). Teprve přidání glukózy vede k poklesu λ_{\max} souvisejícím se syntézou pump *de novo* a jejich aktivací sondou (viz kapitola 3.4.1). Barvení buněk klinického izolátu CY 1123 rezistentního na flukonazol, který byl uchováván v jeho přítomnosti (viz kapitola 2.4), se v důsledku nadprodukce pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* barví málo a to již od začátku měření. Přidání glukózy již nevede k výraznému poklesu v jejich barvení. Pravděpodobnou příčinou toho, že profil barvení buněk CY 1123 je zcela odlišný od barvení buněk pumpových kmenů $\Delta cdr1$ a $\Delta cdr2$ a svým charakterem připomíná barvení buněk *PDR5+* u *S. cerevisiae* a *K. lactis* (viz obr. 3.3), je, že již před přidáním sondy byly pumpy aktivovány substrátem/flukonazolem a k odstraňování sondy tak dochází bezprostředně po jejím přidání k buněčné suspenzi.



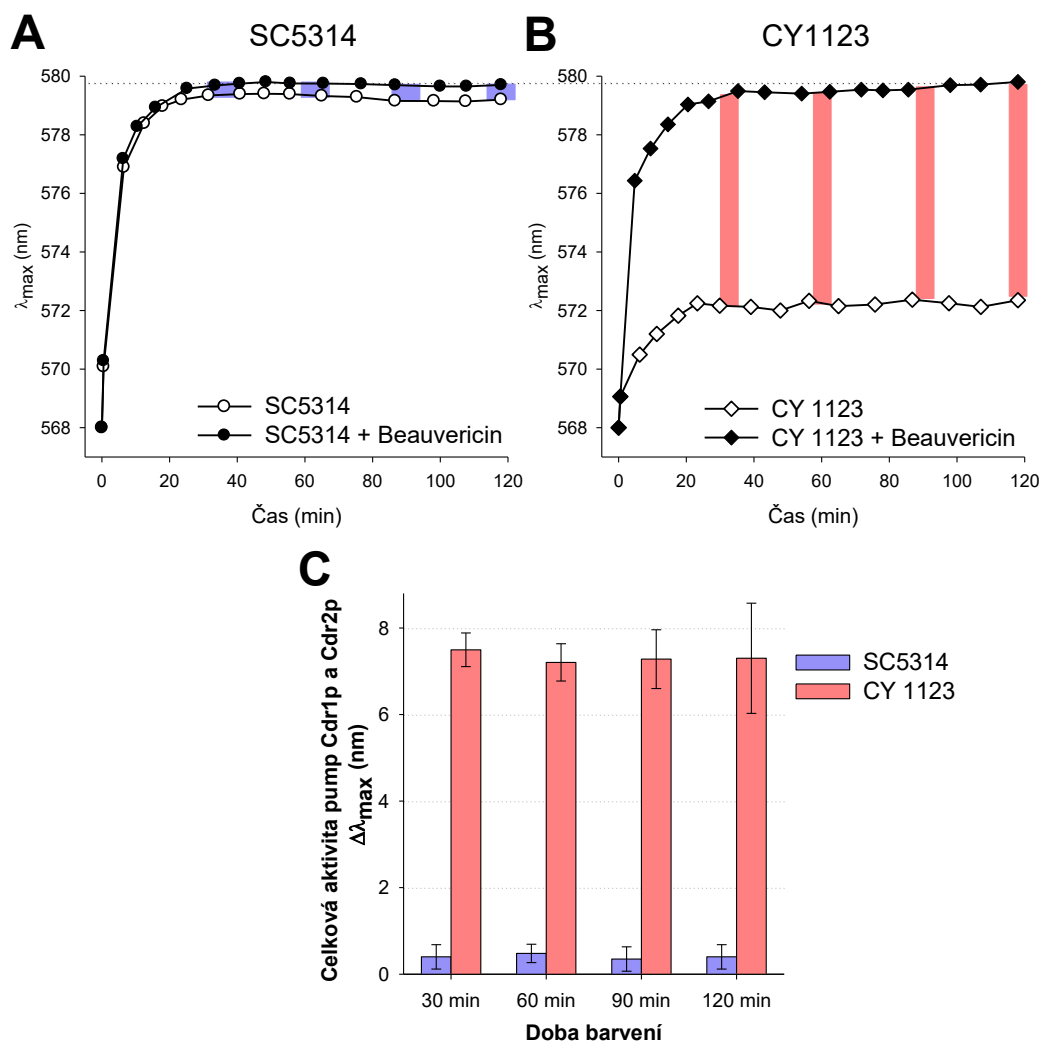
Obr. 3-37 Zatímco přítomnost glukózy významně nezvýší celkovou aktivitu pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* při odstraňování fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk klinického izolátu CY 1123, u buněk standardního divokého kmene SC5314 vede k výraznému nárůstu jejich aktivity. Barvicí křivky buněk standardního divokého kmene SC5314 a klinického izolátu CY 1123 bez přidané glukózy (prázdné symboly) a po přidání glukózy (glc) o výsledné koncentraci 2 % ve 22. minutě barvení (červené symboly).

Abychom mohli stanovit celkovou aktivitu pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u buněk kmene SC5314 a klinického izolátu CY 1123 bez přidání glukózy a její stabilitu v čase, bylo nutné porovnat barvicí křivky buněk daného kmene s aktivními a inhibovanými pumpami[∇]. Pro zablokování činnosti pump jsme 10 minut před měřením přidali k suspenzi buněk obou kmenů beauvericin o koncentraci 8 µg/ml (10 µM), která je dostatečná pro úplnou inhibici transportu sondy oběma pumpami a má přitom zanedbatelný vliv na membránový potenciál (viz kapitola 3.4.2.2).

Jak vyplývá z obrázků 3-38A,B, je rozdíl mezi barvením buněk obou kmenů bez a v přítomnosti beauvericinu konstantní po celou dobu měření (2 hodiny). Navíc, jak naznačuje přerušovaná vodorovná čára mezi obr. 3-38A a obr. 3-38B, mají buňky SC5314 a CY 1123, byť nejsou geneticky příbuzné, stejný membránový potenciál. Skutečnost, že v nepřítomnosti glukózy je aktivita pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u buněk citlivého standardního kmene SC5314 po celou dobu experimentu velmi nízká v porovnání s jejich vysokou a stabilní aktivitou u buněk klinického izolátu CY 1123 (obr. 3-38C), byla důvodem, proč jsme si zvolili tyto experimentální podmínky pro monitorování účinku různých inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* na odstraňování sondy z buněk klinického izolátu CY 1123 a referenčního kmene SC5314.

[∇] *Odrázem aktivity MDR pump u buněk pumpového kmene je diference mezi jejich barvením a barvením buněk izogenního bezpumpového kmene, ve kterém je akumulace sondy řízena pouze velikostí membránového potenciálu. Pokud není takový kmen k dispozici, jako u kmenů SC5314 a CY 1123, lze jako negativní kontrolu použít tytéž buňky, u kterých byla činnost pump zablokována pomocí specifického inhibitoru, který neovlivňuje membránový potenciál buněk.*

C. albicans



Obr. 3-38 V nepřítomnosti glukózy je celková aktivita pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u buněk klinického izolátu CY 1123 stabilní a výrazně vyšší než u buněk standardního divokého kmene *Candida albicans* SC5314. Barvicí křivky buněk standardního divokého kmene SC5314 (**A**) a klinického izolátu CY 1123 (**B**) bez (prázdné symboly) a v přítomnosti 10 μ M beauvericinu (plné symboly). Beauvericin byl k suspenzi buněk přidán 10 min před fluorescenční sondou diS-C₃(3). Přerušovaná vodorovná čára demonstruje stejnou rovnovážnou hodnotu λ_{\max} barvicích křivek buněk obou kmenů s inhibovanými pumpami beauvericinem indikující jejich stejný membránový potenciál. Modré (**A**) a červené (**B**) sloupce zvýrazňující rozdíly mezi hodnotami λ_{\max} u buněk v přítomnosti a nepřítomnosti beauvericinu demonstrují celkovou aktivitu *CaCdr1p* a *CaCdr2p* ve čtyřech různých časech (30, 60, 90 a 120 min). (**C**) Porovnání celkové aktivity pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* u buněk standardního kmene SC5314 (panel A) a klinického izolátu CY 1123 (panel B). Střední hodnoty a směrodatné odchylky byly získány ze tří nezávislých experimentů.

3.4.3.2 Testování účinku inhibitorů pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* na akumulaci sondy *diS-C₃(3)* v buňkách *CY 1123* a *SC5314*

Hlavním cílem testování inhibitorů obou pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* (beauvericin, farnesol) nebo jen pumpy *CaCdr1p* (enniatin B, derivát H) na buňkách rezistentního klinického izolátu *C. albicans* *CY 1123* bylo zodpovězení následujících otázek:

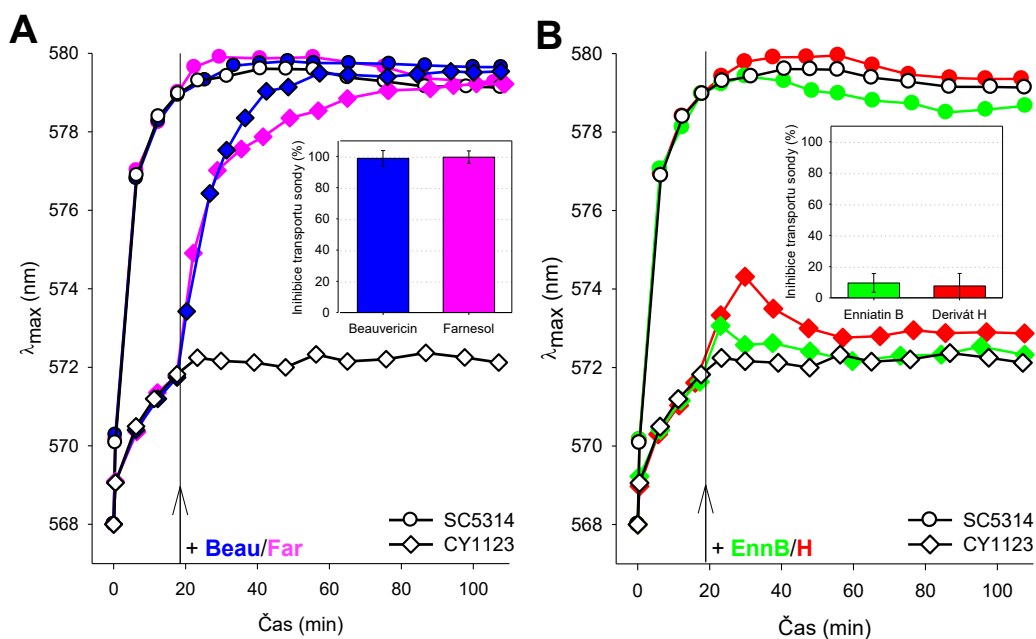
- (1) Jsou koncentrace látek, které účinně inhibují činnost jak pumpy *CaCdr1p* u buněk $\Delta cdr2$, tak pumpy *CaCdr2p* u buněk $\Delta cdr1$, dostatečné k úplnému zablokování transportu sondy z buněk klinického izolátu *CY 1123*?
- (2) Jaký vliv na odstraňování sondy z buněk klinického izolátu *CY 1123* mají inhibitory pumpy *CaCdr1p*?
- (3) Jsou látky inhibující pouze pumpu *CaCdr1p* z lékařského hlediska důležité?

Splynutí barvicích křivek buněk *SC5314* a *CY 1123* po přidání jak 10 μM beauvericinu (8 $\mu\text{g/ml}$), tak 100 μM farnesolu, obr. 3-39A (u beauvericinu viz též obr. 3-38A,B), jasně dokazuje, že použité koncentrace^x jsou dostatečné pro úplnou inhibici transportu sondy pumpami *CaCdr1p* a *CaCdr2p* i u buněk klinického izolátu *CY 1123* s nadprodukcí těchto pump v membráně.

Ačkoliv jsme nepředpokládali, že přidání látek účinně inhibující pouze pumpu *CaCdr1p* povede k výrazné akumulaci sondy v buňkách *CY 1123* vzhledem k vysoké aktivitě pumpy *CaCdr2p*, zanedbatelný inhibiční účinek (~ 10 %) jak enniatinu B, tak derivátu H (obr. 3-39B) byl poměrně neočekávaný. Důvodem může být jak vyšší zastoupení pumpy *CaCdr2p* v membráně buněk tohoto klinického izolátu, tak její efektivnější odstraňování sondy z buněk v porovnání s pumpou *CaCdr1p* (viz kapitola 3.4.1).

^x Jedná se o koncentrace, při kterých byla pozorována úplná inhibice transportu sondy jak pumpou *CaCdr1p* u buněk $\Delta cdr2$, tak pumpou *CaCdr2p* u buněk $\Delta cdr1$.

C. albicans

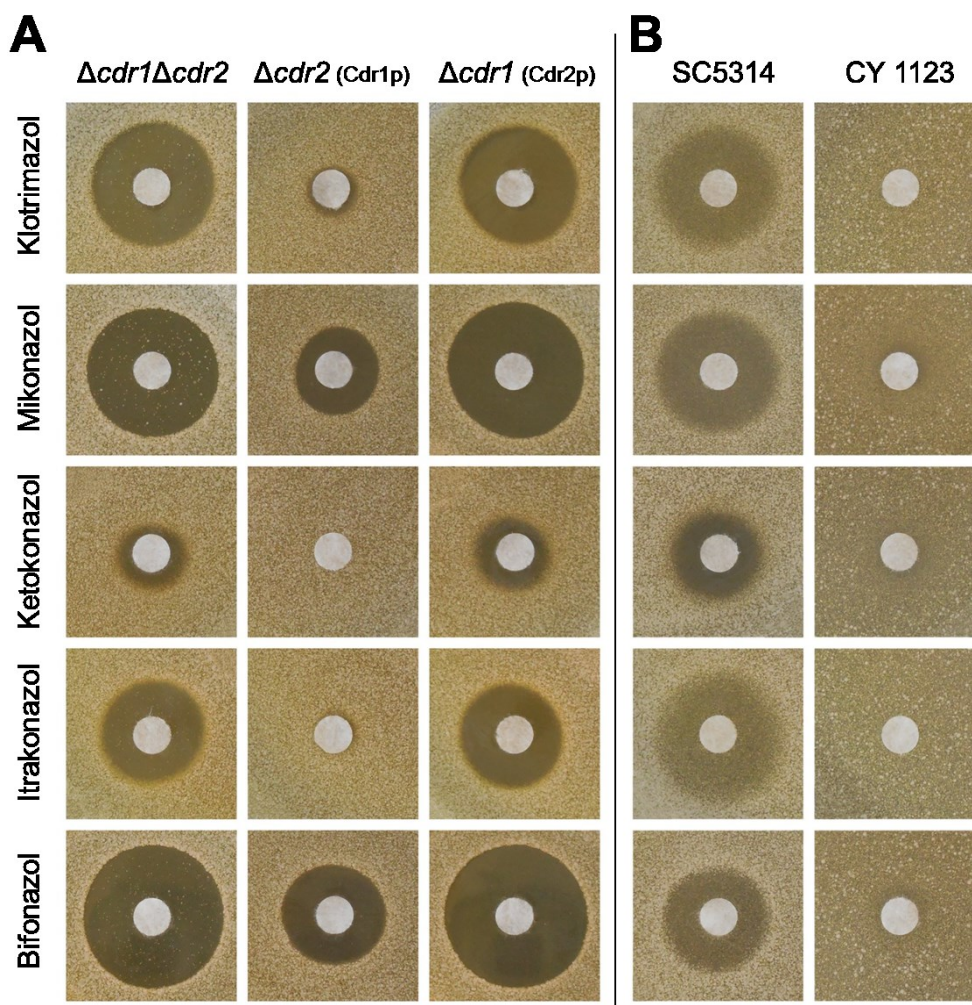


Obr. 3-39 Pouze účinné inhibitory obou pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* jsou schopny úplně zablokovat transport fluorescenční sondy diS-C₃(3) z buněk klinického izolátu CY1123. Porovnání barvicích křivek buněk standardního divokého kmene SC5314 a klinického izolátu CY 1123, ke kterým byly v 18. minutě barvení přidány (A) inhibitory obou pump, beauvericin a farnesol, a (B) inhibitory pouze pumpy *CaCdr1p*, enniatin B a derivát H. Prázdné symboly – barvení kontrolních buněk bez přidání testovaných látek. Vložené obrázky v (A) a (B) – střední hodnoty a směrodatné odchylky rozsahu inhibice transportu sondy vyvolané jednotlivými inhibitory u buněk klinického izolátu CY 1123 ze tří nezávislých experimentů. Rozsah inhibice transportu sondy byl určen podle rovnice (1), ve které **A** představuje rozdíl mezi rovnovážnými hodnotami λ_{max} u buněk citlivého standardního kmene SC5314 a klinického izolátu CY 1123 v přítomnosti a **B** v nepřítomnosti testovaných látek.

Zjištění, že inhibitory pumpy *CaCdr1p* nemají v podstatě vliv na transport sondy (a pravděpodobně také jakékoliv jiné látky/léku, pokud je tato substrátem obou pump) z buněk s více aktivními MDR pumpami, evokuje pochybnost o významu vyhledávání takovýchto inhibitorů. Zajímalo nás proto, zda jsou azoly, které jsou často používány při léčbě kandidóz (viz kapitola 1.6.2), opravdu substráty obou pump, jak vyplývá z výsledků zónových testů studie z roku 2007 provedené pomocí série chimérických konstruktů vzniklých heterologní expresí genů *CaCDR1* nebo *CaCDR2* v nepatogenní kvasince *S. cerevisiae* AD1-8 [73], nebo pouze pumpy *CaCdr1p*, jak ukazují výsledky z roku 1997 [108].

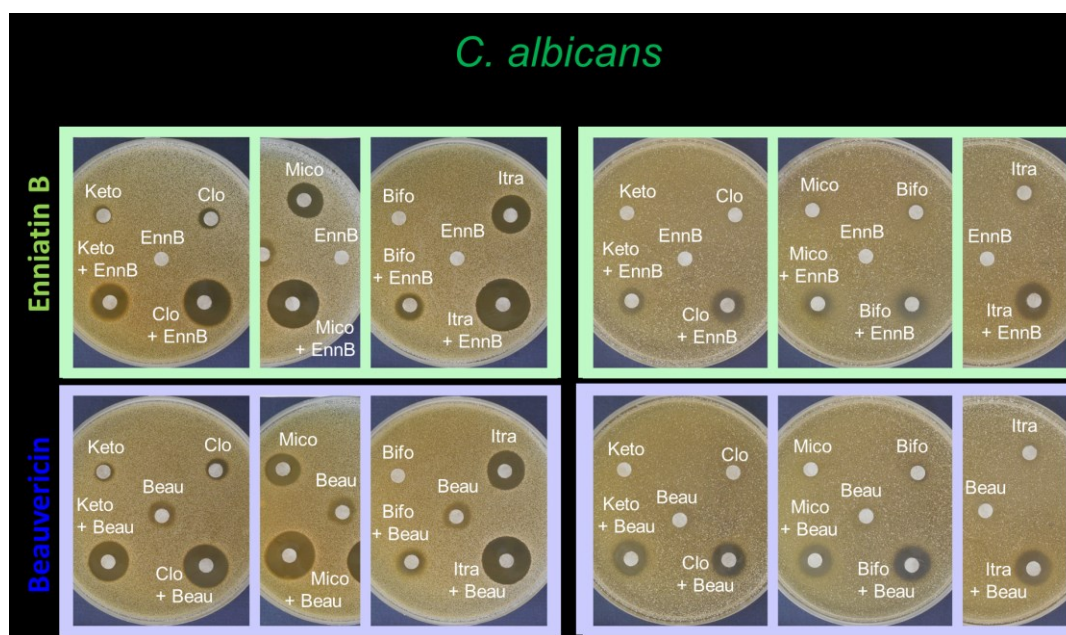
Jak ukazují výsledky naší studie, ve které byla použita série izogenních kmenů *C. albicans* $\Delta cdr1\Delta cdr2$, $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$, jsou všechny testované azoly substráty pouze pumpy *CaCdr1p*, obr. 3-40A. To znamená, že za rozdíly v citlivosti buněk standardního kmene SC5314 a klinického izolátu CY 1123 k těmto azolům je zodpovědná zejména nadprodukce pumpy *CaCdr1p* u buněk CY 1123, obr. 3-40B.

C. albicans



Obr. 3-40 Za rezistenci buněk klinického izolátu CY1123 k azolům je zodpovědná zejména nadprodukce pumpy *CaCdr1p*. **(A)** Testované azoly jsou substráty pumpy *CaCdr1p*, nikoliv však pumpy *CaCdr2p*. Inhibiční zóny buněk $\Delta cdr1\Delta cdr2$, $\Delta cdr2$ a $\Delta cdr1$ vzniklé účinkem klotrimazolu (5,8 μM), mikonazolu (19,2 μM), ketokonazolu (3,8 μM), itrakonazolu (42,4 μM) a bifonazolu (193 μM). **(B)** Odlišná citlivost buněk standardního kmene SC5314 a klinického izolátu CY 1123 k testovaným azolům. Inhibiční zóny buněk SC5314 a CY 1123 vystavené účinku klotrimazolu (43,5 μM), mikonazolu (144 μM), ketokonazolu (28,2 μM), itrakonazolu (85 μM) a bifonazolu (3,22 mM).

Abychom zdůraznili důležitost látek inhibujících pouze pumpu *CaCdr1p* při léčbě kandidóz pomocí azolů, provedli jsme experimenty, ve kterých jsme porovnávali jejich účinek v kombinaci s enniatinem B nebo beauvericinem, a to nejenom u buněk $\Delta cdr2$, obr. 3-41A, ale také u buněk klinického izolátu, obr. 3-41B. Výsledky jednoznačně potvrzují, že z lékařského hlediska jsou inhibitory pumpy *CaCdr1p* velmi významné, protože jejich použití v kombinaci s azoly vede k vyšší citlivosti buněk k účinku těchto léků v důsledku jejich zvýšené akumulace v buňkách.



Obr. 3-41 Inhibitory pumpy *CaCdr1p* výrazně zvyšují citlivost jak buněk $\Delta cdr2$, tak buněk klinického izolátu CY 1123 k účinku azolů. Porovnání velikosti inhibičních zón vytvořených u buněk $\Delta cdr2$ (A) a CY 1123 (B) vystavených účinku azolů, enniatinu B (0,39 mM) nebo beauvericinu (3,2 mM) a jejich příslušné kombinaci. Zásobní roztoky pro buňky $\Delta cdr2$ /CY 1123: ketokonazol (3,8/28,2 μ M), klotrimazol (5,8/43,5 μ M), mikonazol (19,2/144 μ M), bifonazol (193 μ M/3,22 mM) a itraconazol (42,4/85 μ M).

Jak vyplývá ze studie prováděné na klinickém izolátu CY 1123, mohou být pro léčbu kandidóz pomocí kombinované terapie důležité rovněž inhibitory účinně blokující odstraňování léků z buněk pouze jednou z dvojice pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, zejména pumpou *CaCdr1p*. Z tohoto pohledu se jeví náš postup umožňující pomocí diS-C₃(3) fluorescenční metody vyhledávat účinné inhibitory jak pumpy *CaCdr1p*, tak pumpy *CaCdr2p* (viz kapitola 3.4.2) jako velmi perspektivní.

4 Závěr

Hlavním cílem disertační práce bylo studium vlivu různých chemických látek (substrátů, inhibitorů, atd.) na transportní aktivitu MDR pump u tří druhů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*. Naše zjištění, že potenciometrická fluorescenční sonda diS-C₃(3) je substrátem nejenom pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p*, ale také pumpy *KIPdr5p* a pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*, nám umožnilo použít diS-C₃(3) fluorescenční metodu původně vyvinutou pro sledování aktivity pump u *S. cerevisiae* také pro výzkum méně prozkoumaných pump u *K. lactis* a *C. albicans*. Výsledky získané pomocí fluorescenční metody byly podpořeny biologickými testy, zejména zónovým testem, který umožňuje stanovit, jestli je testovaná látka substrátem pump. Výsledky disertační práce byly publikovány v impaktovaných mezinárodních časopisech (přílohy 1-3) a prezentovány na mezinárodních konferencích (přílohy 4-6).

První část práce se zabývá porovnáním velikostí vazebných kapes pumpy *ScPdr5p* u kvasinky *S. cerevisiae* a jeho méně prozkoumaného homologu *KIPdr5p* kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Pro stanovení rozdílů v uspořádání vazebné kapsy *ScPdr5p* a *KIPdr5p* pomocí diS-C₃(3) fluorescenční metody jsme použili (1) sérii poměrně jednoduchých azolů, které jsou známými společnými substráty obou pump, (2) modelové substráty jednotlivých vazebných míst ve vazebné kapse *ScPdr5p* a (3) relativně velké substráty pumpy *ScPdr5*, enniatin B a jeho analog beauvericin. K nejvýznamnějším výsledkům této části práce bezesporu patří:

- Fluorescenční sonda diS-C₃(3) se váže do všech identifikovaných vazebných míst ve vazebné kapse obou pump.
- Uspořádání vazebných míst ve vazebné kapse *KIPdr5p* je těsnější než uspořádání vazebných míst u *ScPdr5p*, což je důsledkem menší velikosti její vazebné kapsy v porovnání s *ScPdr5p*.

Nejdůležitějším výsledkem druhé části práce, která se týkala studia vlivu delece genů *KIPDR16* a *KIERG6* u buněk *K. lactis* na velikost jejich membránového potenciálu a aktivitu MDR pump, je zjištění, že bez ohledu na způsob, jakým delece těchto genů ovlivňuje stav plazmatické membrány buněk, dochází v obou případech k její hyperpolarizaci. Dalším důležitým zjištěním je, že zatímco delece genu

KIPDR16 nemá vliv na aktivitu MDR pump, v důsledku delece *KIERG6* dochází ke ztrátě jejich aktivity.

Hlavním cílem závěrečné části práce bylo zavedení efektivního postupu pro vyhledávání účinných inhibitorů dvou hlavních MDR pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* (homologů *ScPdr5p*) u podmíněně patogenní kvasinky *Candida albicans*. Těžiště vyvinuté metody spočívá v použití nepatogenních kvasinek *S. cerevisiae* pro prvotní monitorování účinku všech testovaných látek na aktivitu pump *ScPdr5p* a *ScSnq2p*. Pouze ty látky, které efektivně inhibují transport sondy zprostředkovaný alespoň jednou z těchto pump, jsou následně testovány jako potenciální inhibitory pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p*. Pomocí tohoto postupu se nám podařilo ze série nově syntetizovaných derivátů 1,4-dihydropyridinu identifikovat derivát H jako nový účinný inhibitor pumpy *CaCdr1p*.

Navíc jsme v rámci této studie ukázali, že k úplnému zablokování aktivního odstraňování sondy z buněk rezistentního klinického izolátu CY 1123 s nadprodukcí pump *CaCdr1p* a *CaCdr2p* v jejich membráně, je zapotřebí použít látky účinně inhibující činnost obou pump. Nicméně také látky, které jsou účinnými inhibitory pouze pumpy *CaCdr1p* (jako enniatin B nebo derivát H), mohou být z lékařského hlediska velmi důležité. Jak jsme totiž dokázali, azoly (nejčastěji používaná antimykotika) jsou odstraňovány z buněk právě touto pumpou.

Vzhledem k tomu, že fluorescenční sonda diS-C₃(3) je také substrátem lidského P-glykoproteinu, který je zodpovědný např. za rezistenci rakovinných buněk vůči chemoterapeutikům, představuje diS-C₃(3) fluorescenční metoda perspektivní nástroj k vyhledávání nových účinných inhibitorů této MDR pumpy, které by mohly být použity v kombinované terapii s protirakovinnými léky.

Seznam použité literatury

1. Bussereau, F., et al., *The Kluyveromyces lactis repertoire of transcriptional regulators*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(3): p. 325-35.
2. Horak, J., *Regulations of sugar transporters: insights from yeast*. Curr Genet, 2013. **59**(1-2): p. 1-31.
3. Rodicio, R. and J.J. Heinisch, *Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of Kluyveromyces lactis*. Yeast, 2013. **30**(5): p. 165-77.
4. Schaffrath, R. and K.D. Breunig, *Genetics and molecular physiology of the yeast Kluyveromyces lactis*. Fungal Genet Biol, 2000. **30**(3): p. 173-90.
5. Wolfe, K.H. and D.C. Shields, *Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 708-13.
6. Drobna, E., A. Bialkova, and J. Subik, *Transcriptional regulators of seven yeast species: comparative genome analysis. Review*. Folia Microbiol (Praha), 2008. **53**(4): p. 275-87.
7. Koh, A.Y., *Gastrointestinal Colonization of Fungi*. Curr Fung Inf Rep, 2013. **7**(2): p. 144-151.
8. Prasad, R., et al., *The ABCs of Candida albicans Multidrug Transporter Cdr1*. Eukaryot Cell, 2015. **14**(12): p. 1154-64.
9. Thakur, J.K., et al., *A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 604-9.
10. Lamping, E., et al., *Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function*. Fungal Genet Biol, 2010. **47**(2): p. 127-42.
11. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
12. Ghannoum, M.A. and L.B. Rice, *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(4): p. 501-17.
13. Parks, L.W. and W.M. Casey, *Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast*. Ann Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 95-116.
14. Tan, S., H.T. Tan, and M.C. Chung, *Membrane proteins and membrane proteomics*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 3924-32.
15. Malinsky, J., et al., *Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi*. Annu Rev Plant Biol, 2013. **64**: p. 501-29.
16. Mollinedo, F., *Lipid raft involvement in yeast cell growth and death*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 140.
17. Del Sorbo, G., H. Schoonbeek, and M.A. De Waard, *Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides*. Fungal Genet Biol, 2000. **30**(1): p. 1-15.

18. Prasad, R., et al., *Multidrug resistance: An emerging threat*. Current Science, 1996. **71**(3): p. 205-213.
19. Licht, A., Schneider, E., *ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions*. Cent Eur J Biol, 2011. **6**(5): p. 785-801.
20. Bauer, B.E., H. Wolfger, and K. Kuchler, *Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 217-36.
21. Jones, P.M. and A.M. George, *The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(6): p. 682-99.
22. Stieger, B. and C.F. Higgins, *Twenty years of ATP-binding cassette (ABC) transporters*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 543.
23. Jungwirth, H. and K. Kuchler, *Yeast ABC transporters - a tale of sex, stress, drugs and aging*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1131-8.
24. Prasad, R. and S. Panwar, *Physiological functions of multidrug transporters in yeast*. Current Science, 2004. **86**(1): p. 62-73.
25. Decottignies, A., et al., *Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12797-803.
26. Golin, J., et al., *Complete inhibition of the Pdr5p multidrug efflux pump ATPase activity by its transport substrate clotrimazole suggests that GTP as well as ATP may be used as an energy source*. Biochemistry, 2007. **46**(45): p. 13109-19.
27. Higgins, C.F., *Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 749-757.
28. Prasad, R. and A. Goffeau, *Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance*. Annu Rev Microbiol, 2012. **66**: p. 39-63.
29. Hollenstein, K., R.J. Dawson, and K.P. Locher, *Structure and mechanism of ABC transporter proteins*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(4): p. 412-8.
30. Gottesman, M.M. and S.V. Ambudkar, *Overview: ABC transporters and human disease*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(6): p. 453-8.
31. Higgins, C.F. and K.J. Linton, *The ATP switch model for ABC transporters*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(10): p. 918-26.
32. Jones, P.M., M.L. O'Mara, and A.M. George, *ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(10): p. 520-31.

33. Mehla, J., et al., *Evidence for a molecular diode-based mechanism in a multispecific ATP-binding cassette (ABC) exporter: SER-1368 as a gatekeeping residue in the yeast multidrug transporter Pdr5*. J Biol Chem, 2014. **289**(38): p. 26597-606.
34. Linton, K.J. and C.F. Higgins, *Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 555-67.
35. Balzi, E. and A. Goffeau, *Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1187**(2): p. 152-62.
36. Pao, S.S., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, Jr., *Major facilitator superfamily*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 1-34.
37. Panwar, S.L., R. Pasrija, and R. Prasad, *Membrane homeostasis and multidrug resistance in yeast*. Bioscience Reports, 2008. **28**(4): p. 217-228.
38. Serrano, R., M.C. Kielland-Brandt, and G.R. Fink, *Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases*. Nature, 1986. **319**(6055): p. 689-93.
39. Rogers, B., et al., *The pleiotropic drug ABC transporters from Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(2): p. 207-14.
40. Brandao, R.L., et al., *Glucose-induced activation of the plasma membrane H(+)-ATPase in Fusarium oxysporum*. J Gen Microbiol, 1992. **138 Pt 8**: p. 1579-86.
41. Zhong, D., et al., *The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23225-33.
42. Cannon, R.D., et al., *Efflux-mediated antifungal drug resistance*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 291-321, Table of Contents.
43. Seret, M.L., et al., *Combined phylogeny and neighborhood analysis of the evolution of the ABC transporters conferring multiple drug resistance in hemiascomycete yeasts*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 459.
44. Wolfger, H., Y.M. Mamnun, and K. Kuchler, *Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 375-89.
45. Miyahara, K., et al., *The involvement of the Saccharomyces cerevisiae multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance*. FEBS Lett, 1996. **399**(3): p. 317-20.
46. Balzi, E., et al., *PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2206-14.
47. Golin, J. and S.V. Ambudkar, *The multidrug transporter Pdr5 on the 25th*

- anniversary of its discovery: an important model for the study of asymmetric ABC transporters*. Biochem J, 2015. **467**(3): p. 353-63.
48. Schuller, C., et al., *Membrane-active compounds activate the transcription factors Pdr1 and Pdr3 connecting pleiotropic drug resistance and membrane lipid homeostasis in saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4932-44.
 49. Rutledge, R.M., et al., *Toward understanding the mechanism of action of the yeast multidrug resistance transporter Pdr5p: a molecular modeling study*. J Struct Biol, 2011. **173**(2): p. 333-44.
 50. Hirata, D., K. Yano, and T. Miyakawa, *Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet, 1994. **242**(3): p. 250-6.
 51. Mahe, Y., Y. Lemoine, and K. Kuchler, *The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of Saccharomyces cerevisiae can mediate transport of steroids in vivo*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25167-72.
 52. Kolaczowska, A. and A. Goffeau, *Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast*. Drug Resist Updat, 1999. **2**(6): p. 403-414.
 53. Mamnun, Y.M., C. Schuller, and K. Kuchler, *Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase*. FEBS Lett, 2004. **559**(1-3): p. 111-7.
 54. van den Hazel, H.B., et al., *PDR16 and PDR17, two homologous genes of Saccharomyces cerevisiae, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 1934-41.
 55. Simova, Z., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae Pdr16p restricts changes in ergosterol biosynthesis caused by the presence of azole antifungals*. Yeast, 2013. **30**(6): p. 229-41.
 56. Holic, R., et al., *Phosphatidylinositol binding of Saccharomyces cerevisiae Pdr16p represents an essential feature of this lipid transfer protein to provide protection against azole antifungals*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(10): p. 1483-90.
 57. Cabrito, T.R., et al., *The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multidrug resistance*. Biochem J, 2011. **440**(2): p. 195-202.
 58. Goffeau, A., et al., *Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily*. Yeast, 1997. **13**(1): p. 43-54.

59. Chen, X.J., *Activity of the Kluyveromyces lactis Pdr5 multidrug transporter is modulated by the Sit4 protein phosphatase.* J Bacteriol, 2001. **183**(13): p. 3939-48.
60. Chen, X.J., et al., *Positive and negative control of multidrug resistance by the Sit4 protein phosphatase in Kluyveromyces lactis.* J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14865-72.
61. Gbelska, Y., J.J. Krijger, and K.D. Breunig, *Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species.* FEMS Yeast Res, 2006. **6**(3): p. 345-55.
62. Goffa, E., et al., *Isolation and functional analysis of the KIPDR16 gene.* FEMS Yeast Res, 2014. **14**(2): p. 337-45.
63. Balkova, K., et al., *Functional analysis of the Kluyveromyces lactis PDR1 gene.* FEMS Yeast Res, 2009. **9**(2): p. 321-7.
64. Takacova, M., et al., *KNQ1, a Kluyveromyces lactis gene encoding a drug efflux permease.* Curr Genet, 2004. **45**(1): p. 1-8.
65. Prasad, R., M. Sharma, and M.K. Rawal, *Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic Candida albicans.* J Amino Acids, 2011. **2011**: p. 531412.
66. Gaur, M., D. Choudhury, and R. Prasad, *Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, Candida albicans.* J Mol Microbiol Biotechnol, 2005. **9**(1): p. 3-15.
67. Kolaczowski, M. and A. Goffeau, *Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance.* Pharmacol Ther, 1997. **76**(1-3): p. 219-42.
68. Krishnamurthy, S., et al., *Expression of CDR1, a multidrug resistance gene of Candida albicans: transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones.* FEMS Microbiol Lett, 1998. **160**(2): p. 191-7.
69. Holmes, A.R., et al., *ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant Candida albicans clinical isolates.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(11): p. 3851-62.
70. Saidane, S., et al., *PDR16-mediated azole resistance in Candida albicans.* Mol Microbiol, 2006. **60**(6): p. 1546-62.
71. Znaidi, S., et al., *The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in Candida albicans.* Mol Microbiol, 2007. **66**(2): p. 440-52.
72. Nakamura, K., et al., *Functional expression of Candida albicans drug efflux pump Cdr1p in a Saccharomyces cerevisiae strain deficient in membrane transporters.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3366-74.

73. Lamping, E., et al., *Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(7): p. 1150-65.
74. Sanglard, D., et al., *Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(11): p. 2378-86.
75. Dunkel, N., et al., *A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical Candida albicans isolate*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(7): p. 1180-90.
76. Kolecka, A., et al., *Subinhibitory concentrations of fluconazole increase the intracellular sodium content in both fluconazole-resistant and -sensitive Candida albicans strains*. Can J Microbiol, 2009. **55**(5): p. 605-10.
77. Sanglard, D., et al., *Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates*. Drug Resist Updat, 1998. **1**(4): p. 255-65.
78. Spampinato, C. and D. Leonardi, *Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 204237.
79. Rawal, M.K., et al., *Insight into pleiotropic drug resistance ATP-binding cassette pump drug transport through mutagenesis of Cdr1p transmembrane domains*. J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24480-93.
80. Sipos, G. and K. Kuchler, *Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(4): p. 471-81.
81. Golin, J., et al., *Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5963-9.
82. Puri, N., et al., *The amino acid residues of transmembrane helix 5 of multidrug resistance protein CaCdr1p of Candida albicans are involved in substrate specificity and drug transport*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(9): p. 1752-61.
83. Shukla, S., et al., *Functional characterization of Candida albicans ABC transporter Cdr1p*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(6): p. 1361-75.
84. Kolaczowski, M., et al., *Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31543-8.
85. Hanson, L., et al., *The role of hydrogen bond acceptor groups in the interaction of substrates with Pdr5p, a major yeast drug transporter*. Biochemistry, 2005. **44**(28): p. 9703-13.

86. Golin, J., S.V. Ambudkar, and L. May, *The yeast Pdr5p multidrug transporter: how does it recognize so many substrates?* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(1): p. 1-5.
87. Tong, Y., et al., *Beauvericin counteracted multi-drug resistant Candida albicans by blocking ABC transporters.* Synth Syst Biotechnol, 2016. **1**(3): p. 158-168.
88. Cannon, R.D., et al., *Candida albicans drug resistance another way to cope with stress.* Microbiology, 2007. **153**(Pt 10): p. 3211-7.
89. Prasad, R., A. Banerjee, and A.H. Shah, *Resistance to antifungal therapies.* Essays Biochem, 2017. **61**(1): p. 157-166.
90. Hiraga, K., et al., *Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(4): p. 1119-25.
91. Decottignies, A., et al., *ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p.* J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12612-22.
92. Wick, A.N., et al., *Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose.* J Biol Chem, 1957. **224**(2): p. 963-9.
93. Ralser, M., et al., *A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(46): p. 17807-11.
94. Doležal, M., Buchta, V., *Aktuální pohled na skupinu antimykotik.* Praktické lékařství, 2006. **2**(1): p. 10-14.
95. Tsujimoto, Y., et al., *Functional roles of YPT31 and YPT32 in clotrimazole resistance of Saccharomyces cerevisiae through effects on vacuoles and ATP-binding cassette transporter(s).* J Biosci Bioeng, 2013. **115**(1): p. 4-11.
96. Georgopapadakou, N.H. and T.J. Walsh, *Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies.* Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(2): p. 279-91.
97. Sheehan, D.J., C.A. Hitchcock, and C.M. Sibley, *Current and emerging azole antifungal agents.* Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 40-79.
98. Krausová, L., Grim, J., Pávek, P., *Azolová antimykotika: mechanismy lékových interakcí.* Klin Farmakol Farm, 2009. **23**(2): p. 86-89.
99. Onyewu, C., et al., *Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against Candida albicans, Candida glabrata, and Candida krusei.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 956-64.

100. Hull, C.M., et al., *Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of Candida glabrata harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(8): p. 4223-32.
101. <https://www.mojelekarna.cz/leky/ucinne-latky.html?hledej=11>.
102. Shao, P.L., L.M. Huang, and P.R. Hsueh, *Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007. **30**(6): p. 487-495.
103. Anderson, J.B., et al., *Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2003. **163**(4): p. 1287-98.
104. Kanafani, Z.A. and J.R. Perfect, *Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(1): p. 120-8.
105. Kolaczowska, A., et al., *Compensatory activation of the multidrug transporters Pdr5p, Snq2p, and Yor1p by Pdr1p in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 2008. **582**(6): p. 977-83.
106. Sanglard, D., et al., *Susceptibilities of Candida albicans multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(10): p. 2300-5.
107. Miyama, T., et al., *P-glycoprotein-mediated transport of itraconazole across the blood-brain barrier*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(7): p. 1738-44.
108. Sanglard, D., et al., *Cloning of Candida albicans genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene*. Microbiology, 1997. **143 (Pt 2)**: p. 405-16.
109. Mallebrera, B., et al., *Mechanisms of beauvericin toxicity and antioxidant cellular defense*. Toxicol Lett, 2016. **246**: p. 28-34.
110. Jestoi, M., *Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2008. **48**(1): p. 21-49.
111. Meca, G., et al., *Ciclohexadepipeptide beauvericin degradation by different strains of Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem Toxicol, 2013. **59**: p. 334-8.
112. Tonshin, A.A., et al., *The Fusarium mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis*. Toxicology, 2010. **276**(1): p. 49-57.

113. Hendrych, T., et al., *Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the S. cerevisiae multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(3): p. 717-23.
114. Szczepaniak, J., M. Lukaszewicz, and A. Krasowska, *Detection of inhibitors of Candida albicans Cdr transporters using a diS-C3(3) fluorescence*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 176.
115. Sharom, F.J., et al., *Linear and cyclic peptides as substrates and modulators of P-glycoprotein: peptide binding and effects on drug transport and accumulation*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 3): p. 621-30.
116. Fukuda, T., et al., *New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, Produced by Beauveria sp. FKI-1366. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties*. J Antibiot (Tokyo), 2004. **57**(2): p. 110-6.
117. Sharma, M. and R. Prasad, *The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(10): p. 4834-43.
118. Hornby, J.M., et al., *Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 2982-92.
119. Xia, J., et al., *In vitro inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of Candida albicans resistant strains*. Biofouling, 2017. **33**(4): p. 283-293.
120. Egbe, N.E., et al., *Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in C. albicans and S. cerevisiae*. Microb Cell, 2017. **4**(9): p. 294-304.
121. Egner, R., et al., *Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(2): p. 523-43.
122. Gaskova, D., et al., *Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(13): p. 1189-97.
123. Gaskova, D., et al., *Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C3(3) assay*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(5): p. 575-84.
124. Denksteinova, B., et al., *Monitoring of membrane potential changes in Saccharomyces cerevisiae by diS-C3(3) fluorescence*. Folia Microbiol (Praha), 1997. **42**(3): p. 221-4.

125. Gaskova, D., et al., *Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C3(3) fluorescence*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(8): p. 931-7.
126. Cadek, R., et al., *Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of S. cerevisiae: effect of pump overproduction and carbon source*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1665**(1-2): p. 111-7.
127. Malac, J., K. Sigler, and D. Gaskova, *Glucose-induced MDR pump resynthesis in respiring yeast cells depends on nutrient level*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(1): p. 138-41.
128. Malac, J., et al., *Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C3(3) fluorescence assay*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2536-43.
129. Gaskova, D., et al., *Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C(3)(3) in yeast*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1511**(1): p. 74-9.
130. Gaskova, D., et al., *Alcohols are inhibitors of Saccharomyces cerevisiae multidrug-resistance pumps Pdr5p and Snq2p*. FEMS Yeast Res, 2013. **13**(8): p. 782-95.
131. Kodedova, M., et al., *Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells*. Biotechniques, 2011. **50**(1): p. 58-63.
132. Velas, L., *Sledování účinku medicínsky významných léčiv na aktivitu lidského P-glykoproteinu pomocí fluorescenčních sond (Bakalářská práce)*. 2015, MFF UK: Praha.
133. Konecna, A., et al., *ERG6 gene deletion modifies Kluyveromyces lactis susceptibility to various growth inhibitors*. Yeast, 2016. **33**(12): p. 621-632.
134. Dou, W., et al., *Mutations of charged amino acids at the cytoplasmic end of transmembrane helix 2 affect transport activity of the budding yeast multidrug resistance protein Pdr5p*. FEMS Yeast Res, 2016. **16**(4).
135. Kolaczowski, M., K. Michalak, and N. Motohashi, *Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance*. Int J Antimicrob Agents, 2003. **22**(3): p. 279-83.
136. Kolaczowski, M., et al., *New high-throughput screening assay to reveal similarities and differences in inhibitory sensitivities of multidrug ATP-binding cassette transporters*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4): p. 1516-27.

137. Takacova, M., et al., *Isolation, heterologous cloning and sequencing of the RPL28 gene in Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet*, 2002. **42**(1): p. 21-6.
138. Pascaud, C., M. Garrigos, and S. Orlowski, *Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents*. *Biochem J*, 1998. **333 (Pt 2)**: p. 351-8.
139. Sanglard, D., A. Coste, and S. Ferrari, *Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation*. *FEMS Yeast Res*, 2009. **9**(7): p. 1029-50.
140. Szczepaniak, J., M. Lukaszewicz, and A. Krasowska, *Estimation of Candida albicans ABC Transporter Behavior in Real-Time via Fluorescence*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 1382.
141. Egner, R., et al., *Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(11): p. 5879-87.
142. Henry, K.W., et al., *Antagonism of azole activity against Candida albicans following induction of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(8): p. 1968-74.
143. Chudík, L., Marchalín S., Daich A., Decroix, B., *New synthesis of the calcium antagonist Nilvadipine*. *Res Adv Synth Org Chem*, 2000(1): p. 1-7.
144. Wu, C.P., S. Ohnuma, and S.V. Ambudkar, *Discovering natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011. **12**(4): p. 609-20.
145. Hallstrom, T.C., et al., *Coordinate control of sphingolipid biosynthesis and multidrug resistance in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 23674-80.
146. Kolaczowski, M., et al., *Differential regulation of ceramide synthase components LAC1 and LAG1 in Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(4): p. 880-92.

Seznam tabulek

- Tabulka 1-1 Porovnání vybraných charakteristik kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*
- Tabulka 1-2 Přehled ABC transportérů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*
- Tabulka 2-1 Přehled použitých chemikálií a materiálu
- Tabulka 2-2 Přehled použitých kvasinkových kmenů

Seznam použitých zkratek

ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ADP	<u>A</u> denosine <u>d</u> iphosphate (adenosin difosfát)
AIDS	<u>A</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency <u>s</u> ndrome (syndrom získaného selhání imunity)
ALDP	<u>A</u> drenoleukodystrophy <u>p</u> rotein
ATP	<u>A</u> denosine <u>t</u> riphosphate (adenosin trifosfát)
BAC	<u>B</u> enzalkonium <u>c</u> hlorid
Beau	<u>B</u> eauvericin
Bifo	<u>B</u> ifonazol
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
C-P pufr	<u>C</u> itrate- <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer (citrát-fosfátový pufr)
CCCP	<u>C</u> arbonyl <u>c</u> yanide <u>3</u> - <u>c</u> hlorophenylhydrazone
CD koktejl	Koktejl obsahující <u>C</u> CCP a <u>D</u> M-11
CDR	<u>C</u> andida <u>d</u> rug <u>r</u> esistance
CFTR	<u>C</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane <u>c</u> onductance <u>r</u> egulator
Clo	<u>C</u> lotrimazole (klotrimazol)
CTP	<u>C</u> ytidine <u>t</u> riphosphate (cytidin trifosfát)
DHA1/2	<u>d</u> rug: <u>H</u> ⁺ <u>a</u> ntiporter <u>1</u> / <u>2</u>
diS, diS-C ₃ (3)	<u>3</u> , <u>3</u> '- <u>d</u> ipropyl <u>t</u> hiokarbocyanin jodid
DM-11	2-dodekanoyloxyethyl- <u>d</u> imethylamonium chlorid
DMF	N,N- <u>d</u> imetylformamid
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
EnnB	<u>E</u> nniatin <u>B</u>
ER	<u>E</u> ndoplazmatické <u>r</u> etikulum
ES	<u>E</u> ndosomes (endozomy)
GTP	<u>G</u> uanosine <u>t</u> riphosphate (guanosin trifosfát)
GV	<u>G</u> olgiho <u>v</u> áčky
HMG	3- <u>h</u> ydroxy-3- <u>m</u> etylglutaryl
I _{max}	Intenzita maxima fluorescence
Itra	<u>I</u> trakonazol
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>

Keto	<u>Ketokonazol</u>
M	<u>Mitochondrie</u>
MDR	<u>Multidrug resistance</u> (mnohočetná léková rezistence)
MFS	<u>Major facilitator superfamily</u>
Mico	<u>Miconazole</u> (mikonazol)
MRP	<u>Multidrug resistance-associated protein</u>
MTAE	2-(<u>metyl-trityl-amino</u>)- <u>etanol</u>
N	<u>Nucleus</u> (jádro)
NQO	4- <u>nitroquinoline</u> N- <u>oxid</u>
NTP	<u>Nucleotide triphosphate</u> (nukleotid trifosfát)
NVD	<u>Nukleotid vážící doména</u>
OD	<u>Optical density</u> (optická hustota)
PDR	<u>Pleiotropic drug resistance</u>
RLI	<u>RNase L inhibitor</u>
RND	<u>Resistance-Nodulation-Division</u>
R6G	<u>Rhodamin 6G</u>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SMR	<u>Small multidrug resistance</u>
STUB	<u>Slovenská technická univerzita v Bratislavě</u>
TBT	<u>Tetrabutyltin</u> (tetrabutylcín)
TI	<u>Tritylimidazol</u>
TMD	<u>Transmembránová doména</u>
UCL	<u>Université catholique de Louvain</u>
UKB	<u>Univerzita Komenského v Bratislavě</u>
UTP	<u>Uridine triphosphate</u> (uridin trifosfát)
V	<u>Vakuola</u>
V_{kl}	průměrný objem buňky kvasinek <i>Kluyveromyces lactis</i>
V_{sc}	průměrný objem buňky kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
WGD	<u>Whole genome duplication</u> (zdvojení celého genomu)
YEF3	<u>Yeast elongation factor EF-3</u>
YPD	<u>Yeast extract, peptone, dextrose</u> (růstové médium obsahující 2 % kvasinkového extraktu, 1 % peptonu a 2 % glukózy), agar obsahuje navíc 1 nebo 2 % agaru
λ_{max}	Vlnová délka polohy <u>maxima</u> emisního spektra

λ_{em}	<u>E</u> misní vlnová délka
λ_{ex}	<u>E</u> xcitační vlnová délka
1,4-DHP	<i>1,4-dihydropyridine-2,3,5-tricarboxylate</i>
2-DG	2- <u>d</u> eoxy-D- <u>g</u> lukóza

Přílohy

Publikace

1. **Jančíková I.**, Zahumenský J., Gbelská Y., Gášková D.: Differences in the arrangement of the Pdr5p multidrug transporter binding pocket of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 2017, vol. 17.
2. Tóth Hervay N., Goffa E., Svrbická A., Šímová Z., Griač P., **Jančíková I.**, Gášková D., Morvová M., Šikurová L., Gbelská Y.: Deletion of the *PDR16* gene influences the plasma membrane properties of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, vol. 61, p. 273-279.
3. Ježíková Z., Pagáč T., Pfeiferová B., Bujdáková H., Dižová S., **Jančíková I.**, Gášková D., Olejníková P.: Synergy between azoles and 1,4-dihydropyridine derivative as an option to control fungal infections. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2017, p. 1-8.

Konferenční příspěvky

4. **Jančíková I.**, Gášková D., Gbelská Y.: Monitoring the activity of *Kluyveromyces lactis* multidrug resistance pump *KIPdr5p* by diS-C₃(3) screening assay. 31st *Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Antalya, Turecko, 26. 9. 2013, str. 32, přednáška
5. **Jančíková I.**, Gbelská Y., Gášková D.: Comparison of the inhibitory effect of various chemical stressors on the transport activity of Pdr5p from *S. cerevisiae* and *K. lactis*. 32nd *Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Montreal, Kanada, 28. 8. 2014, str. 5, přednáška
6. **Jančíková I.**, Zahumenský J., Gbelská Y., Gášková D.: Differences in the arrangement of the Pdr5p multidrug transporter binding pocket of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. 35th *Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, Gurgaon, Indie, 18. 9. 2017, str. 17, přednáška



FEMS Yeast Research, 17, 2017, fox073

doi: 10.1093/femsyr/fox073

Advance Access Publication Date: 11 September 2017

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Differences in the arrangement of the Pdr5p multidrug transporter binding pocket of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*

Iva Jančíková¹, Jakub Zahumenský^{1,†}, Yveta Gbelská² and Dana Gášková^{1,*}

¹Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic and ²Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Science, Department of Microbiology and Virology, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

*Corresponding author: Charles University in Prague Faculty of Mathematics and Physics Institute of Physics Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic. Tel: +420 221911348; Fax: (+420) 224922797; E-mail: gaskova@karlov.mff.cuni.cz

†Present address: Jakub Zahumenský, Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Experimental Medicine, Department of Microscopy, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

One sentence summary: Using our diS-C₃(3) diagnostic assay, we show that the ability of common substrates (azoles) of ScPdr5p and KIPdr5p to competitively inhibit the Pdr5p-mediated efflux of the probe differs in the two species as a consequence of tighter arrangement of the KIPdr5p binding pocket compared to that of ScPdr5p.

Editor: Jens Nielsen

ABSTRACT

Multidrug transporters are often responsible for failure of medical treatment, since they expel a variety of structurally and functionally unrelated drugs out of the cell. We found that the fluorescent probe diS-C₃(3) is a substrate of not only Pdr5p of *Saccharomyces cerevisiae* (ScPdr5p) but also of its less-explored *Kluyveromyces lactis* homologue (KIPdr5p). This enabled us to compare the ability of azoles to competitively inhibit the Pdr5p-mediated probe efflux in the two species. In *K. lactis*, these azoles completely inhibit probe transport by KIPdr5p and also compete with each other for transport. This indicates that the probe and the azoles are bound by the same site(s) of the KIPdr5p binding pocket. On the other hand, the azoles' capacity to inhibit the probe transport by ScPdr5p is limited, as a result of their partial cotransport with the probe. While the azoles bind to only one or two separate binding sites, the probe is able to bind to all three of them. Moreover, the bulky ScPdr5p substrate enniatin B, which effectively inhibits both probe and azole transport by the pump, has negligible effect on KIPdr5p. Our data point to a tighter arrangement of the KIPdr5p binding pocket compared to that of ScPdr5p.

Keywords: Pdr5p; binding site; fluorescent probe diS-C₃(3); azoles; competitive inhibition; enniatin B

INTRODUCTION

Multidrug resistance (MDR) is an evolutionary conserved cellular mechanism providing defence against chemical toxicity of environmental toxins and drugs. In yeast, MDR is the result of the overexpression of drug efflux pumps belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of plasma

membrane proteins (Prasad and Goffeau 2012). One of the main MDR pumps of *Saccharomyces cerevisiae* is ScPdr5p, which is able to rid the cells of an astonishingly wide range of structurally and functionally distinct compounds (Kolaczowski et al. 1996). The function and structure of ScPdr5p have been studied and described in detail over the last 25 years (reviewed in Golin and Ambudkar 2015). The results of these studies have provided

Received: 27 July 2017; Accepted: 7 September 2017

© FEMS 2017. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

us, among other things, with knowledge about the way substrates bind to the pump. Based on studies using rhodamine 6G as a benchmark substrate, Kolaczowski et al. (1996) proposed that ScPdr5p makes use of more than one site to bind its substrates. This idea has been elaborated upon by others and the current view is that the binding pocket of ScPdr5p has at least three distinct binding sites, each apparently using different chemical properties to transport the substrates, as shown by [³H]-chloramphenicol accumulation (Golin et al. 2003; Hanson et al. 2005).

Owing to its industrial application (e.g. in lactose fermentation and as a host for heterologous protein expression) and metabolic peculiarities (Crabtree-negative, petite-negative), *Kluyveromyces lactis* has become an alternative model organism to the more traditional *S. cerevisiae*, especially for other unconventional yeast species. The two species are phylogenetically closely related, both being members of the *Saccharomycetaceae* family. It has been proposed by Wolfe and Shields (1997) that *S. cerevisiae* underwent a whole-genome duplication after its divergence from *K. lactis*. While the majority of the duplicated genes have been deleted from the genome over time, most of the duplicates that have remained in *S. cerevisiae* only have a single homologue in *K. lactis*. The number of genes coding ABC transporters is also somewhat lower in *K. lactis* (22 vs 29 in *S. cerevisiae*) (Gbelska, Krijger and Breunig 2006). There have been extensive studies on the nature of the ScPdr5p binding pocket concerning its size and number of binding sites. However, similar studies of KlPdr5p, the *K. lactis* homologue of ScPdr5p (Chen 2001), have not been carried out to date, leading to complete absence of data on this important pump parameter.

To fill some of the gaps, we used a novel approach utilising the diS-C₃(3) fluorescence assay originally developed in our laboratory to study the activity of ScPdr5p in cell suspensions (Gaskova et al. 2002). The fluorescence assay is based on comparing the accumulation of the benchmark pump substrate diS-C₃(3) in Pdr5p-expressing and Pdr5p-deficient cells in the presence and absence of a substrate/inhibitor (Hendrych et al. 2009). The difference in staining between Pdr5p-expressing and Pdr5p-deficient cells reflects the pump's capacity for probe transport. Hence, monitoring of how this difference is affected by the addition of a substrate provides us with information about possible inhibition of probe transport and substrate-probe co-transport, as is the case of ScPdr5p-mediated transport of ketoconazole (Gaskova et al. 2013). From such data, conclusions about the character of the Pdr5p binding pocket can be drawn.

In this study, we show that the diS-C₃(3) fluorescent probe is a valuable benchmark substrate not only for monitoring of the transport activity of ScPdr5p but also of KlPdr5p. This allows us to select a series of common ScPdr5p and KlPdr5p azole substrates and monitor their ability to competitively inhibit the Pdr5p-mediated probe transport in both species. The main aim of this study is to bring insight into the differences between the binding pockets of KlPdr5p and ScPdr5p, focusing on their size and the number of binding sites.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains

The *Saccharomyces cerevisiae* strains AD1–3 (MAT α , PDR1–3, *ura3*, *his1*, *yor1* Δ ::*hisG*, *snq2* Δ ::*hisG*, *pdr5* Δ ::*hisG*) and AD12 (MAT α , PDR1–3, *ura3*, *his1*, *yor1* Δ ::*hisG*, *snq2* Δ ::*hisG*) (Decottignies et al. 1998) are derived from the parental strain US50–18C (MAT α ,

PDR1–3, *ura3*, *his1*). The *Kluyveromyces lactis* strains CK373/1 (MAT α , *uraA1*, *ade2*, RAG1+ (pKD1+), *pdr5* Δ ::*kan*) (Chen 2001) and CK373/1 + KlPDR5 (MAT α , *uraA1*, *ade2*, RAG1+ (pKD1+), *pdr5* Δ ::*kan*, p26) (Takacova et al. 2002) are derived from the parental strain PM6–7A (MAT α , *uraA1*, *ade2*, RAG1+ (pKD1+)) (Chen, Wesolowski and Fukuhara 1992).

For convenience, the Pdr5p-expressing strains AD12 and CK373/1 + KlPDR5 are in text referred to as PDR5+ strains and the Pdr5p-deficient strains AD1–3 and CK373/1 as *pdr5*-strains.

Media and cell growth conditions

Yeast precultures were grown in YPD medium (2% yeast extract, 1% bacto-peptone and 2% glucose) at 30°C for 24 h. A small volume (10–40 μ l for *S. cerevisiae* and 1–10 μ l for *K. lactis*) of this preculture was added to 10 ml of fresh YPD medium, and the main culture was grown until it reached the desired phase of growth.

Fluorescence measurements of diS-C₃(3) accumulation in cells

Exponential yeast cells were harvested, washed twice with distilled water and resuspended in citrate-phosphate buffer (10 mM HNa₂O₄P·12H₂O titrated to pH 6.0 with citric acid). The optimal concentration of *K. lactis* cells was set to OD₅₇₈ = 0.13 (2.5 \times 10⁶ cells/ml). Since *K. lactis* cells are slightly smaller than *S. cerevisiae* cells, the concentration of *S. cerevisiae* cells was set to OD₅₇₈ = 0.11 (1.8 \times 10⁶ cells/ml) to keep the overall biomass in the samples constant. This adjustment is important when comparing different yeast strains/species using the diS-C₃(3) fluorescence assay.

The diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide) probe was added to 3 ml aliquots of the yeast cell suspension in cuvettes to a final concentration of 2 \times 10⁻⁸ M. Fluorescence emission spectra of the stained cell suspensions were measured using a FluoroMax-4 spectrofluorimeter (Horiba JobinYvon) in intervals of 2–5 min. The excitation wavelength was 531 nm, fluorescence emission range was 560–590 nm and scattered light was eliminated by an orange glass filter with a cut-off wavelength of 540 nm.

The rate and extent of intracellular probe accumulation are reported by the dependence of the diS-C₃(3) fluorescence emission maximum wavelength (λ_{max}) on the time of staining, the so-called staining curve (Denksteinova et al. 1997; Gaskova et al. 1998). When appropriate, the tested compound was added to the desired final concentration after ~20 min of staining. The samples were kept at room temperature and occasionally gently stirred.

The activity of the pump was determined as the difference between the equilibrium intracellular probe concentration (i.e. the equilibrium level of staining, Λ) of *pdr5*- and PDR5+ strains in the absence and presence of substrates.

Confocal fluorescence microscopy

Cell suspensions were prepared in the same way as described above for the spectrofluorimetric measurements and stained with 2 \times 10⁻⁸ M diS-C₃(3) probe for 30 min. After this incubation interval, micrographs were captured using an Olympus IX83/FV1200 laser scanning microscope with a water immersion objective UPLSAPO 60x/1.2.

Disc diffusion assay

To determine the substrate specificity of KIPdr5p and ScPdr5p, disc diffusion assays were performed as described before (Gaskova et al. 2013). Tested chemicals (3–7 μ l) were spotted onto Whatman paper discs lying on the top of the cell-containing top agar. After 48 h at 30°C, the plates were photographed and the sizes of the growth inhibition zones were measured. To determine the possibility of competitive inhibition between two substrates, we used a ‘double addition’ mode of the classical disc diffusion test (Gaskova et al. 2013), where one of the tested pair of compounds was added onto a disc 15 min before the other (and vice versa). When appropriate, the fluorescence probe diS-C₃(3) was added 15 min after the addition of the second substrate (a ‘triple addition’ mode).

Chemicals

The following materials were purchased from the respective companies: diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide), DMSO (dimethyl sulfoxide), DMF (dimethyl formamide) and acetone (Fluka, Prague, Czech Republic), yeast extract (Serva, Heidelberg, Germany), bactopeptone (Oxoid, Brno, Czech Republic), glucose, ethanol for UV spectroscopy and Na₂HPO₄·12H₂O (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), citric acid (Penta, Prague, Czech Republic), agar (Dr Kulich, Pharma, Hradec Kralove, Czech Republic). Pdr5p substrates, protonophore and lysosomotropic compound were obtained from the following sources: azoles (clotrimazole, miconazole, bifonazole, ketoconazole, itraconazole), enniatin B, 2-(methyl-trityl-amino)-ethanol, tritylimidazole, tetrabutyltin, rhodamine 6G and protonophore CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), and the lysosomotropic compound DM-11 (2-dodecanoyloxyethyltrimethylammonium chloride) was synthesised in the laboratory of Prof. S. Witek (Univ. Wrocław; Witek et al. 1997) and kindly provided by Dr A. Krawowska.

RESULTS AND DISCUSSION

Fluorescent probe diS-C₃(3) and tested azoles are substrates shared by ScPdr5p and KIPdr5p

In order to determine if the diS-C₃(3) fluorescent probe is a substrate of KIPdr5p, we compared its accumulation in the Pdr5p-expressing and Pdr5p-deficient (henceforth referred to as PDR5+ and pdr5- respectively) *Kluyveromyces lactis* strains using confocal fluorescence microscopy (Fig. 1A) and disc diffusion tests (Fig. 1B). The lower probe accumulation in PDR5+ cells compared to pdr5- cells and greater growth inhibition zones of pdr5- cells clearly show that diS-C₃(3) is indeed a substrate of KIPdr5p, just like it is a substrate of ScPdr5p (Fig. 1A and B). It is worth noting that the dark compartments inside the cells in Fig. 1A are vacuoles that do not accumulate the probe. Their membrane potential is, in contrast to plasma membrane potential, positive inside, because the vacuolar V-ATPase pumps protons into the vacuole.

To get insight into the possible differences in the arrangement of Pdr5p substrate-binding pocket in both species, we used a series of relatively simple azoles (clotrimazole, miconazole, bifonazole, ketoconazole and itraconazole) that are known substrates of both ScPdr5p (Rogers et al. 2001; Golin et al. 2003; Hanson et al. 2005) and KIPdr5p (Takacova et al. 2002; Balkova et al. 2009), see also Fig. 2. Monitoring their ability to competitively

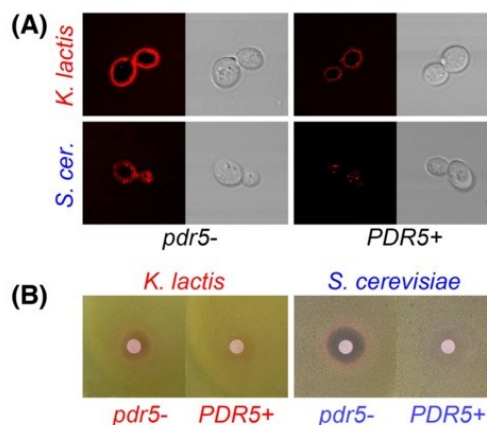


Figure 1. diS-C₃(3) is a substrate of both ScPdr5p and KIPdr5p. (A) Intracellular accumulation of the probe in *S. cerevisiae* (both PDR5+ and pdr5-) and *K. lactis* (both PDR5+ and pdr5-) cells was imaged by confocal microscopy after 30 min incubation with the fluorescent probe. (B) Growth inhibition zones measured in a disc diffusion test; all strains were exposed to 1 mM diS-C₃(3).

inhibit the Pdr5p-mediated probe transport in both species enabled us to decide whether these substrates and diS-C₃(3) bind to the same site(s) in the binding pocket of the pump.

Different effectiveness of clotrimazole to competitively inhibit Pdr5p-mediated probe transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*

To optimise our diS-C₃(3) fluorescence assay (Hendrych et al. 2009; Gaskova et al. 2013) for comparing the probe transport activity of the studied pumps after addition of a shared substrate, we used clotrimazole as a model compound, since it is known to bind to two (referred as site 1 and site 2) out of the three binding sites in the ScPdr5p binding pocket, having different affinities for each (Golin et al. 2003; Golin, Ambudkar and May 2007).

To achieve comparable extent of clotrimazole-induced inhibition of Pdr5p-mediated probe efflux in both species, it was necessary to add higher concentrations of the substrate to *S. cerevisiae* cells than to *K. lactis* cells, as indicated by the staining of the strains (Fig. 3A and B). This difference originates in higher overall ScPdr5p activity compared to that of KIPdr5p, which is probably a consequence of the overexpression of Pdr5p in the used *S. cerevisiae* strain, AD12 (Balzi et al. 1994). The lower Pdr5p expression in *K. lactis* is reflected in the smaller difference of diS-C₃(3) staining of PDR5+ and pdr5- control cells (Fig. 3A and B) and also in the less striking difference in the inhibition zone sizes of the strains in the presence of clotrimazole (Fig. 2).

Clotrimazole addition to cells of both species diminishes the difference of staining levels between the PDR5+ and pdr5- strains, demonstrating the concentration-dependent character of the probe transport inhibition (Fig. 3A and B). In general, staining of MDR pump-deficient cells is dependent solely on their membrane potential (Gaskova et al. 2002). The addition of clotrimazole to the pdr5- strains has only a small effect on their staining, indicating slight hyperpolarisation of *K. lactis* cells (Fig. 3A) and weak depolarisation of *S. cerevisiae* cells (Fig. 3B). We therefore conclude that the compound does not have a significant effect on membrane potential. Note that since membrane potential is not affected by the presence or absence of Pdr5p (and vice

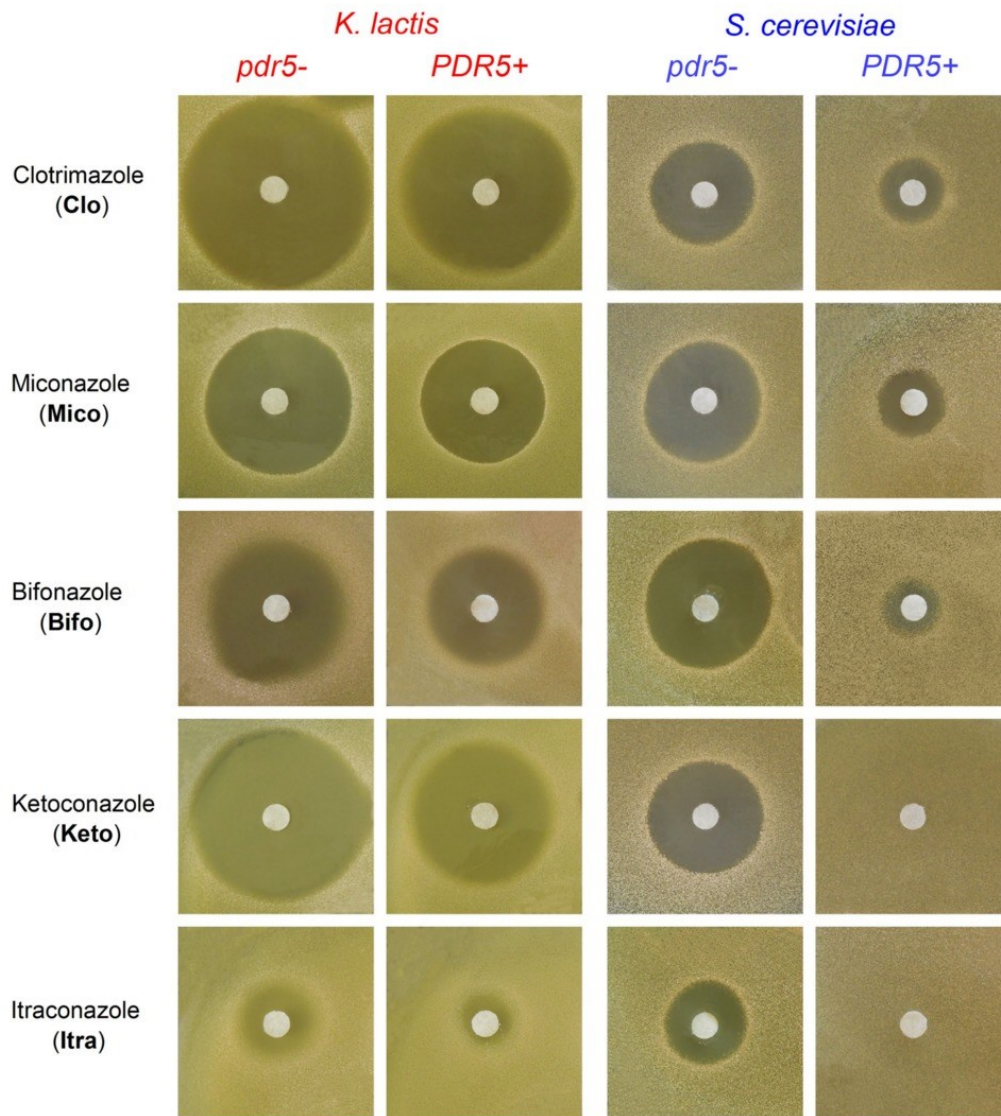


Figure 2. The tested azoles are substrates of both ScPdr5p and KlPdr5p. Growth inhibition zones of *pdr5-* and *PDR5+* cells of both species exposed to clotrimazole (5.8 mM), miconazole (4.8 mM), bifonazole (6.4 mM), ketoconazole (3.8 mM) and itraconazole (2.8 mM).

versa) (Gaskova et al. 2002), the change in membrane potential caused by clotrimazole (or generally any compound) is the same in *pdr5-* and *PDR5+* cells, i.e. the absolute difference between the staining of the strains is not affected by a change in their membrane potential. To confirm that the increase in staining of Pdr5p-expressing cells after clotrimazole addition is indeed the result of inhibition of probe transport and is not connected to a rise in the fraction of permeabilised cells, we added the diagnostic CD cocktail (10 μ M CCCP + 10 μ M DM-11). The coincidence of staining curves after the addition of the cocktail clearly demonstrates the absence of permeabilised cells in the sample

(Gaskova et al. 2013). For illustration, the competition of clotrimazole and the diS-C₃(3) probe for transport is also documented by the increased size of the growth inhibition zones when they are applied together (Fig. 3C).

While the staining curves readily display the dynamics of the processes taking place after the addition of a substrate, they are not very convenient for comparison among a greater set of substrates and species. It is far more practical to compare the emission maxima in equilibrium, Λ , which also enables us to take full advantage of statistical analysis. To compare the effect of various substrates, we assessed the extent of substrate-mediated

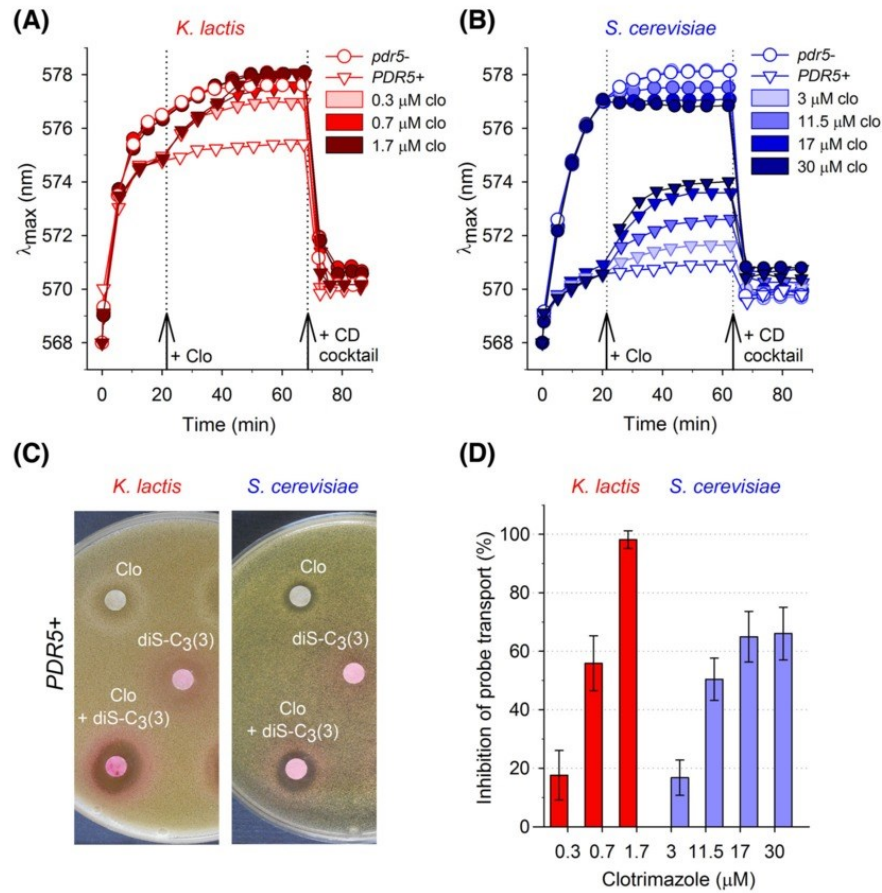


Figure 3. Clotrimazole completely inhibits probe transport by KIPdr5p but not by ScPdr5p. The inhibitory effect of clotrimazole (added at $t = 20$ min) on the activity of (A) KIPdr5p and (B) ScPdr5p. Data are representative of five independent repeats. (C) Comparison of growth inhibition zones of the *PDR5+* *K. lactis* (left) and *S. cerevisiae* strain (right) exposed to clotrimazole (0.01 mM for *K. lactis*/4.4 mM for *S. cerevisiae*), diS-C₃(3) (1 mM) and their respective combinations. (D) Extent of inhibition of the probe transport mediated by KIPdr5p (red) and ScPdr5p (blue) after the addition of clotrimazole. Clotrimazole was added at $t = 20$ min, Δ values measured and the extent of probe transport inhibition calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from five independent repeats.

probe transport inhibition utilising the measured Δ values and the following equation:

$$\text{Inhibition of probe transport} = \left(1 - \frac{\Delta_{\text{substrate}}^{\text{pdr5-}} - \Delta_{\text{substrate}}^{\text{PDR5+}}}{\Delta_{\text{control}}^{\text{pdr5-}} - \Delta_{\text{control}}^{\text{PDR5+}}} \right) \times 100, \quad (1)$$

where Δ denotes the emission maximum wavelength in equilibrium, lower indices 'substrate' and 'control' indicate the presence and absence of a substrate, respectively, and upper indices '*pdr5-*' and '*PDR5+*' indicate the absence and presence of Pdr5p, respectively. The second term in the brackets denotes the residual probe pumping activity after the addition of a substrate.

Equation 1 enables us to readily compare the ability of various substrates to inhibit the probe transport mediated by Pdr5p in both studied species. As is evident from Fig. 3D, even a low clotrimazole concentration (1.7 μM) is sufficient to cause

complete inhibition of the probe transport in *K. lactis*, suggesting that clotrimazole binds to the same site(s) as the probe.

On the other hand, the addition of clotrimazole to *S. cerevisiae* cells, even to the highest used concentration (30 μM), is not sufficient to fully suppress the ScPdr5p-mediated probe transport, amounting to only ~60% inhibition. This saturating and incomplete competitive inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport by clotrimazole is a typical feature for binding pockets with multiple binding sites (Hanson et al. 2005).

This saturation contrasts with complete clotrimazole-induced inhibition of ScPdr5p-mediated efflux of rhodamine 6G (Hanson et al. 2005) which is known to bind only to site 1 (Golin et al. 2003). We therefore conclude that the saturating incomplete inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport by clotrimazole is the result of diS-C₃(3) probe binding not only to clotrimazole-binding sites 1 and/or site 2, but also to site 3 which does not bind clotrimazole. In this case, incomplete

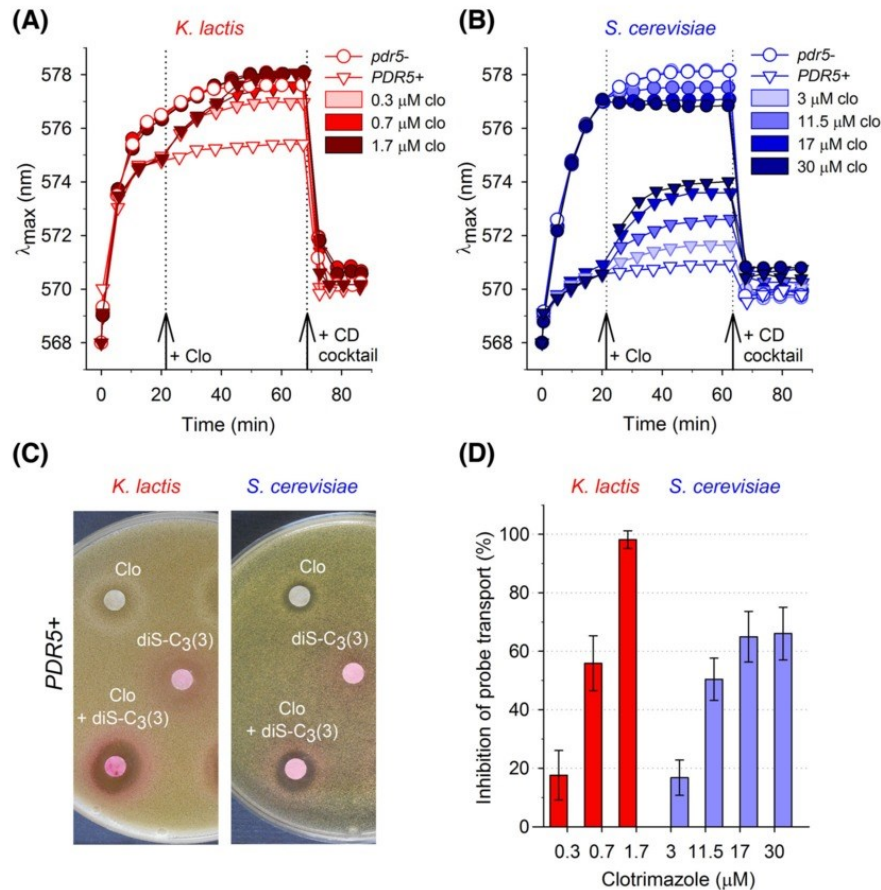


Figure 3. Clotrimazole completely inhibits probe transport by KIPdr5p but not by ScPdr5p. The inhibitory effect of clotrimazole (added at $t = 20$ min) on the activity of (A) KIPdr5p and (B) ScPdr5p. Data are representative of five independent repeats. (C) Comparison of growth inhibition zones of the *PDR5*⁺ *K. lactis* (left) and *S. cerevisiae* strain (right) exposed to clotrimazole (0.01 mM for *K. lactis*/4.4 mM for *S. cerevisiae*), diS-C₃(3) (1 mM) and their respective combinations. (D) Extent of inhibition of the probe transport mediated by KIPdr5p (red) and ScPdr5p (blue) after the addition of clotrimazole. Clotrimazole was added at $t = 20$ min, Δ values measured and the extent of probe transport inhibition calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from five independent repeats.

probe transport inhibition utilising the measured Δ values and the following equation:

$$\text{Inhibition of probe transport} = \left(1 - \frac{\Delta_{\text{substrate}}^{\text{pdr5}^-} - \Delta_{\text{substrate}}^{\text{PDR5}^+}}{\Delta_{\text{control}}^{\text{pdr5}^-} - \Delta_{\text{control}}^{\text{PDR5}^+}} \right) \times 100, \quad (1)$$

where Δ denotes the emission maximum wavelength in equilibrium, lower indices 'substrate' and 'control' indicate the presence and absence of a substrate, respectively, and upper indices '*pdr5*⁻' and '*PDR5*⁺' indicate the absence and presence of Pdr5p, respectively. The second term in the brackets denotes the residual probe pumping activity after the addition of a substrate.

Equation 1 enables us to readily compare the ability of various substrates to inhibit the probe transport mediated by Pdr5p in both studied species. As is evident from Fig. 3D, even a low clotrimazole concentration (1.7 μM) is sufficient to cause

complete inhibition of the probe transport in *K. lactis*, suggesting that clotrimazole binds to the same site(s) as the probe.

On the other hand, the addition of clotrimazole to *S. cerevisiae* cells, even to the highest used concentration (30 μM), is not sufficient to fully suppress the ScPdr5p-mediated probe transport, amounting to only ~60% inhibition. This saturating and incomplete competitive inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport by clotrimazole is a typical feature for binding pockets with multiple binding sites (Hanson et al. 2005).

This saturation contrasts with complete clotrimazole-induced inhibition of ScPdr5p-mediated efflux of rhodamine 6G (Hanson et al. 2005) which is known to bind only to site 1 (Golin et al. 2003). We therefore conclude that the saturating incomplete inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport by clotrimazole is the result of diS-C₃(3) probe binding not only to clotrimazole-binding sites 1 and/or site 2, but also to site 3 which does not bind clotrimazole. In this case, incomplete

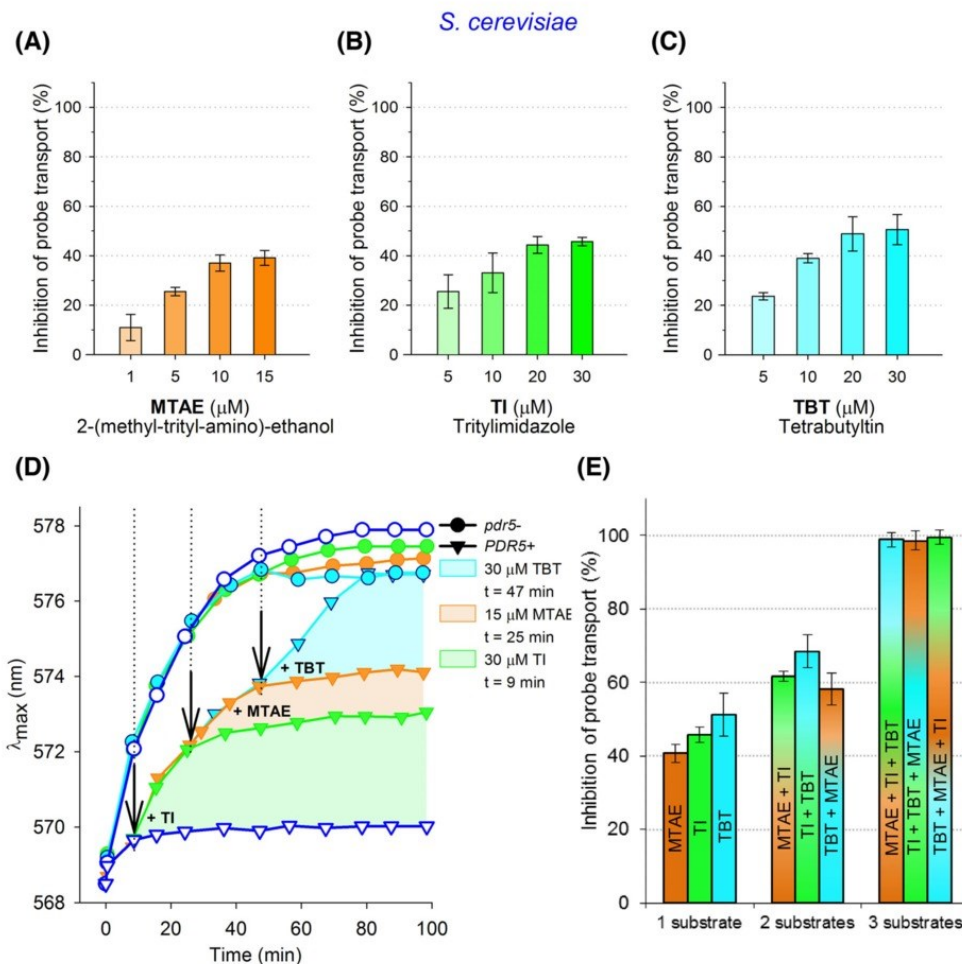


Figure 4. DiS-C₃(3) binds to all three substrate-binding sites of ScPdr5p. Concentration-dependent saturating inhibitory effect of (A) MTAE, site 1 benchmark substrate; (B) TI, site 2 benchmark substrate; and (C) TBT, site 3 benchmark substrate, on ScPdr5p-mediated probe transport, calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from six independent repeats. (D) λ_{max} changes in *pdr5-* and *PDR5+* cells with sequential addition of individual benchmark substrates at saturation concentrations, control cells—empty blue symbols. Data are representative of four independent repeats. (E) Extent of inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport after addition of benchmark substrates in different combinations, calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from four independent repeats.

inhibition of probe transport by clotrimazole could be explained by co-transport of the two compounds.

In ScPdr5p binding pocket the probe diS-C₃(3) binds to all three identified substrate-binding sites

The multisite nature of ScPdr5p binding pocket was discovered using the approach introduced by Golin et al. (Golin et al. 2003; Hanson et al. 2005; Golin, Ambudkar and May 2007). Based on the study of competitive inhibition of relatively simple substances, several Pdr5p substrates have been identified that bind specifically only to one of the binding sites. Rhodamine 6G, chloramphenicol, 2-(methyl-trityl-amino)-ethanol and (2-chloro-ethyl)-methyl-trityl-amine defined a single transport site, referred to as site 1. Tritylimidazole and tritylamine are the site 2 substrates,

and tetrabutyltin binds only exclusively to site 3 (Golin, Ambudkar and May 2007).

To confirm our statement that diS-C₃(3) binds not only to site 1 and/or site 2 but also to site 3 (see above), we used diS-C₃(3) fluorescence assay and 2-(methyl-trityl-amino)-ethanol (MTAE), tritylimidazole (TI) and tetrabutyltin (TBT) as benchmark substrates for the single binding sites. The choice of MTAE and TI as substrates for sites 1 and 2, respectively, was given by their minimal direct interaction with the probe. Any strong interaction complicates the interpretation of the results due to shift of λ_{max} towards longer wavelengths (a red shift) and can thus falsely indicate Pdr5p inhibition.

Like clotrimazole, all benchmark substrates of single binding sites cause saturating, incomplete competitive inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport, amounting to ~40%–50% inhibition (Fig. 4A–C). This indicates that the probe binds to all

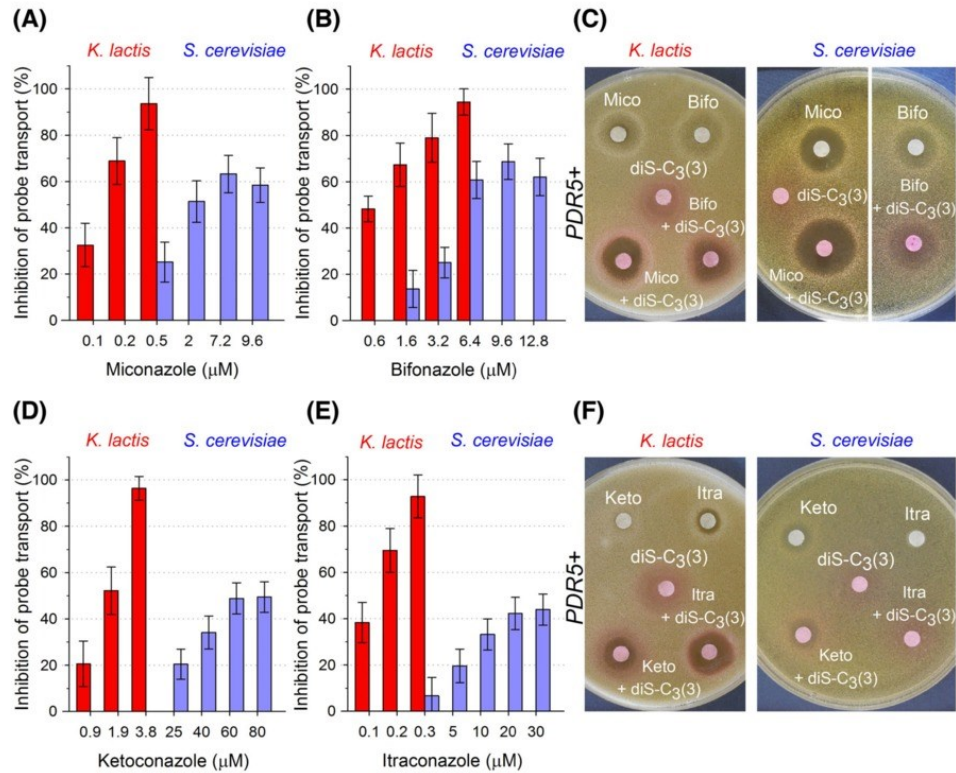


Figure 5. Azoles are effective inhibitors of probe transport in *K. lactis*, but not *S. cerevisiae*. The concentration-dependent inhibitory effect of (A) miconazole (Mico), (B) bifonazole (Bifo), (D) ketoconazole (Keto) and (E) itraconazole (Itra) on Pdr5p-mediated probe transport in *K. lactis* (red) and *S. cerevisiae* (blue), calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from six independent repeats. (F, G) Comparison of growth inhibition zones of the PDR5+ of both species exposed to azoles, diS-C₃(3) (1 mM) and their respective combinations. Stock solutions of azoles for *K. lactis*/*S. cerevisiae*: miconazole (5/5 mM), bifonazole (6.5/6.5 mM), ketoconazole (4/7.5 mM) and itraconazole (3/5.7 mM).

three binding sites, possibly with distinct affinities. Therefore, complete inhibition of probe transport cannot be accomplished by a substrate that binds only to one or two of them.

To clearly demonstrate that the addition of substrates that bind only to two different ScPdr5p binding sites, such as clotrimazole, is not sufficient for a complete competitive inhibition of probe transport, we have performed model experiments in which we added individual substrates in different combinations (Fig. 4D and E). The main function of Fig. 4D is to show the overall trend of λ_{max} changes in ScPdr5p-deficient and ScPdr5p-expressing cells after exposure to individual benchmark substrates and their combinations. As can be seen from Fig. 4E, only the addition of all three individual benchmark substrates leads to complete inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport. In addition, it should be emphasised that the combined addition of benchmark substrates for sites 1 and 2 (as well as any other combination) results in about 60% inhibition, comparable with the effect of clotrimazole that binds to sites 1 and 2. Comparison of the extent of probe transport inhibition after the addition of two (60%) and a single substrate (40%–50%) suggests that the increase in inhibition is not merely additive in character. One probable explanation of this incomparability appears to be that the addition of a benchmark substrate of a given binding site also adversely affects the binding of the probe to the remaining

ones. This could be caused by a spatial overlap of at least some binding sites, where the presence of one substrate, e.g. TI, reduces the affinity of the second one, i.e. the probe in this case (Pascaud et al. 1998; Hanson et al. 2005).

DiS-C₃(3) is partially co-transported with azoles by ScPdr5p but not KIPdr5p

Our results indicate that the diS-C₃(3) probe binds to all identified binding sites of both ScPdr5p and KIPdr5p. This allowed us to use it as a sensitive tool for identifying the binding sites of other azoles (Fig. 5). Experiments analogous to those performed with clotrimazole were carried out with miconazole (Mico), bifonazole (Bifo), ketoconazole (Keto) and itraconazole (Itra).

The inhibition effectiveness of all tested azoles is comparable to that of clotrimazole, i.e. complete inhibition of KIPdr5p-mediated probe transport and saturating, incomplete competitive inhibition of ScPdr5p (Fig. 5). In the case of miconazole (Fig. 5A) and bifonazole (Fig. 5B), the inhibition of ScPdr5p is the same as that of clotrimazole, i.e. ~60%. Ketoconazole (Fig. 5D) and itraconazole (Fig. 5E) achieve saturation at a lower extent of inhibition, about 50% and 43%, respectively. Furthermore, the maximum attainable inhibition with ketoconazole and itraconazole is achieved at higher concentrations. In particular,

ketoconazole requires eight times higher concentration than miconazole to achieve saturation. The requirement for relatively high concentrations of the last two azoles is documented also by the disc diffusion tests performed with PDR5+ cells of both species (Fig. 5C and F). The combined addition of the probe with either ketoconazole or itraconazole to PDR5+ *K. lactis* cells causes an enlargement of the growth inhibition zones compared to the addition of the respective substrates alone. In the case of *S. cerevisiae*, however, no such enlargement is visible (Fig. 5F). This is most likely due to a diffusion-controlled decrease in the azole concentration around the disc below the effective limit.

Various concentrations of azoles are needed to achieve saturated incomplete inhibition of ScPdr5p-mediated probe transport as a consequence of the relative affinity of the probe and the tested azole to the binding sites. Nevertheless, the saturating character itself (Fig. 5) indicates that none of the azoles binds to more than two binding sites of ScPdr5p binding pocket. The probe binding to the remaining one/two sites is sufficient for its transport, although at diminished efficiency. To confirm our conclusion unambiguously, we performed a series of disc diffusion tests on PDR5+ *S. cerevisiae* cells in which we studied the competition of the azoles with the benchmark substrates of sites 1, 2 and 3 (Fig. 6A). In these experiments, the same benchmark substrates as for the former experiment were used for site 2 (TI) and for site 3 (TBT). MTAE (site 1) was substituted by rhodamine 6G (R6G), as MTAE diffuses poorly through agar. As expected, the tested azoles exhibit binding to only one (itraconazole—site 3) or to two binding sites (clotrimazole, miconazole and ketoconazole—sites 1 and 2; bifonazole—sites 1 and 3), as indicated by the enlargement of the growth inhibition zones after the combined addition of two substrates. A schematic representation of the binding of individual azoles together with diS-C₃(3) and benchmark substrates to the binding sites of ScPdr5p is shown in Fig. 6B.

KIPdr5p has only one detectable binding site

Complete competitive inhibition of KIPdr5p-mediated probe transport by all tested azoles indicates that, unlike in the case of ScPdr5p, the probe binds to the same binding site(s) as the azoles. In other words, there is no additional binding site in KIPdr5p that would be exclusive to the probe.

To get more information on the number of binding sites in KIPdr5p, we performed experiments analogous to those with ScPdr5p. As we found that the benchmark substrates of the individual binding sites of ScPdr5p (MTAE, TI and TBT) are also KIPdr5p substrates (Fig. 7A–C), we tested their inhibition effectiveness of probe transport by KIPdr5p (Fig. 7D–F). In contrast to the case of ScPdr5p, all benchmark substrates cause complete competitive inhibition of probe transport indicating that they bind to the same binding site(s) of the binding pocket as the probe and azoles. In addition, simultaneous addition of azoles in various combinations to a paper disc in a disc diffusion test always results in an enlargement of growth inhibition zones compared to that of the addition of the respective azole alone. This indicates that they are binding to the same binding site(s). When the probe is added to the same paper disc as the two azoles, an additional increase in the zone size is observed in all cases (Fig. 7G). All of these data indicate the existence of only one detectable binding site for substrate recognition and binding in the KIPdr5p binding pocket (Fig. 7H). This finding is indeed unexpected and interesting because KIPdr5p transporter (1525 amino acids) shares 63.8% aa sequence identity with ScPdr5p (1522 amino acids). In addition, structurally, these two proteins have

a similar molecular architecture with the same organisation of their functional domains (Chen 2001). Although these pumps do not display completely overlapping substrate specificities, amino acids whose mutations lead to loss of transport activity or decreased expression of ScPdr5p are strictly conserved in KIPdr5p (Chen 2001; Dou et al. 2016).

Taken together, the published knowledge and our results indicate that the arrangement of the binding sites in KIPdr5p binding pocket is tighter than that of ScPdr5p. This in turn means that an already bound substrate may sterically hinder the binding of another to a distinct binding site.

The specificity of individual binding domains as well as actual arrangement of the Pdr5p binding pocket, particularly in KIPdr5p, could be elucidated by studying Pdr5p mutants with exchanged binding sites and will be a challenge for our future studies.

KIPdr5p and ScPdr5p binding pockets differ in both size and number of binding sites

The higher number of distinct binding sites in the ScPdr5p binding pocket compared to KIPdr5p naturally evokes the idea of its larger cavity size. We have tried to prove this by using a relatively bulky substrate of ScPdr5p, enniatin B (Hiraga et al. 2005), that we have previously found to effectively inhibit the probe transport by ScPdr5p (Hendrych et al. 2009), see also Fig. 8A. As seen in Fig. 8A, enniatin B completely inhibits the ScPdr5p-mediated probe transport already at the concentration of 5 μ M. On the other hand, its effect on KIPdr5p is negligible. The difference in inhibition efficiency is further demonstrated by the size of growth inhibition zones after the probe addition to PDR5+ cells of both species in both the presence and absence of enniatin B (Fig. 8B). While the combined addition of the diS-C₃(3) probe and enniatin B gives rise to a growth inhibition zone in *S. cerevisiae*, there are no zones in *K. lactis* regardless of the identity of the used compounds or their combination (Fig. 8B). Furthermore, the effect of the combined addition of enniatin B with the studied azoles is in character similar to its combined addition with the probe, i.e. it leads to an enlargement of growth inhibition zones only in the case of ScPdr5p (Fig. 8C). A possible explanation for the lack of effect of enniatin B on KIPdr5p-mediated transport of the probe or other substrates could be that enniatin B does not enter these cells. However, we excluded this possibility due to the fact that this ionophore antibiotic (Hiraga et al. 2005) causes slight depolarisation of *K. lactis* cells, which is even greater than that of *S. cerevisiae* cells. This assertion is based on the decrease in the staining curves of *pdr5*- cells of both species after addition of enniatin B, which are not shown here.

Taken together, both the diS-C₃(3) transport inhibition data (Fig. 8A) and the results of the disc diffusion assay performed with the probe (Fig. 8B) and with azoles (Fig. 8C) document the inability of the relatively large molecule enniatin B to inhibit the transport of KIPdr5p substrates and indicate that the molecule is too bulky to be accommodated by the KIPdr5p binding pocket (see Fig. 8D). On the other hand, it is large enough to completely block probe binding to all three ScPdr5p binding sites (or binding of other substrates, such as azoles, interacting with multiple binding sites in the pocket) (Fig. 8D). This drug size-dependent cut-off limit resembles the cut-off effect observed in the case of alcohol-induced anaesthesia caused by their interaction with receptors (Pringle, Brown and Miller 1981; Franks and Lieb 1984) and supports the proposed difference in the size of the binding pockets of ScPdr5p and KIPdr5p.

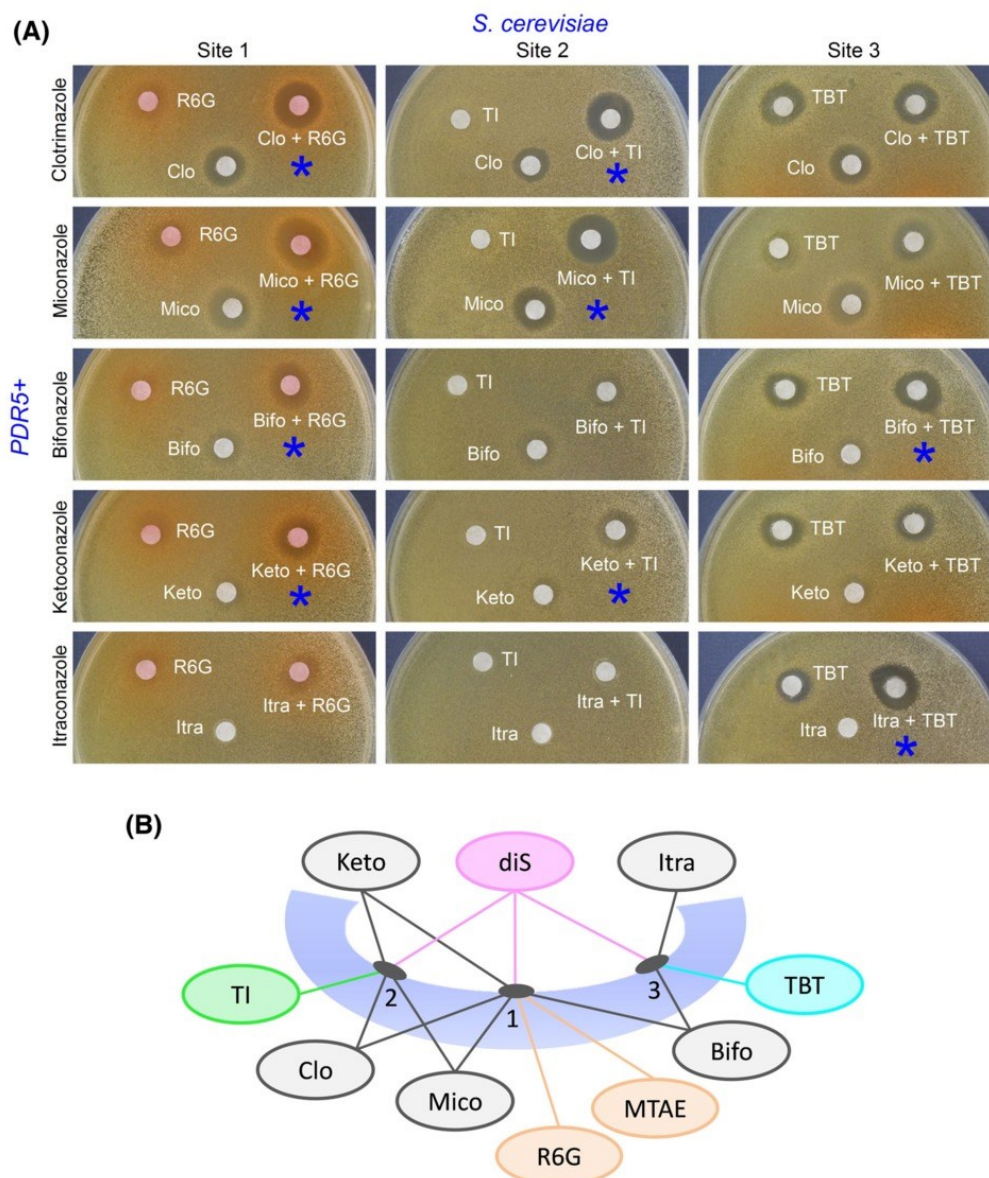


Figure 6. Azoles exhibit binding to only one or two out of the three binding sites in the ScPdr5p binding pocket. **(A)** Growth inhibition zones of the PDR5+ *S. cerevisiae* strain exposed to azoles, benchmark substrates of individual binding sites and their respective combinations. Stock solutions of azoles: clotrimazole (4.4 mM), miconazole (3.6 mM), bifonazole (1.6 mM), ketoconazole (7.6 mM) and itraconazole (4.2 mM). Stock solutions of benchmark substrates: rhodamine 6G (10 mM), TI (1 mM) and TBT (2.8 M). Asterisks highlight combinations of azoles and benchmark substrates leading to an enlargement of the growth-inhibition zones. **(B)** Schematic overview of the binding sites of tested azoles, fluorescent probe diS-C₃(3) and benchmark substrates in the ScPdr5p binding pocket.

CONCLUSIONS

We compared the ability of different azoles to competitively inhibit the ScPdr5p- and KIPdr5p-mediated diS-C₃(3) probe transport. Although these MDR pumps share numerous substrates (such as tested azoles and the diS-C₃(3) fluorescent probe), it

was not clear whether they have the same arrangement of their binding pockets. The possible differences include the number of binding sites and the overall size of the binding pocket, which seem to be of great importance for substrate–transporter interactions. Our data indicate that the substrate specificities and

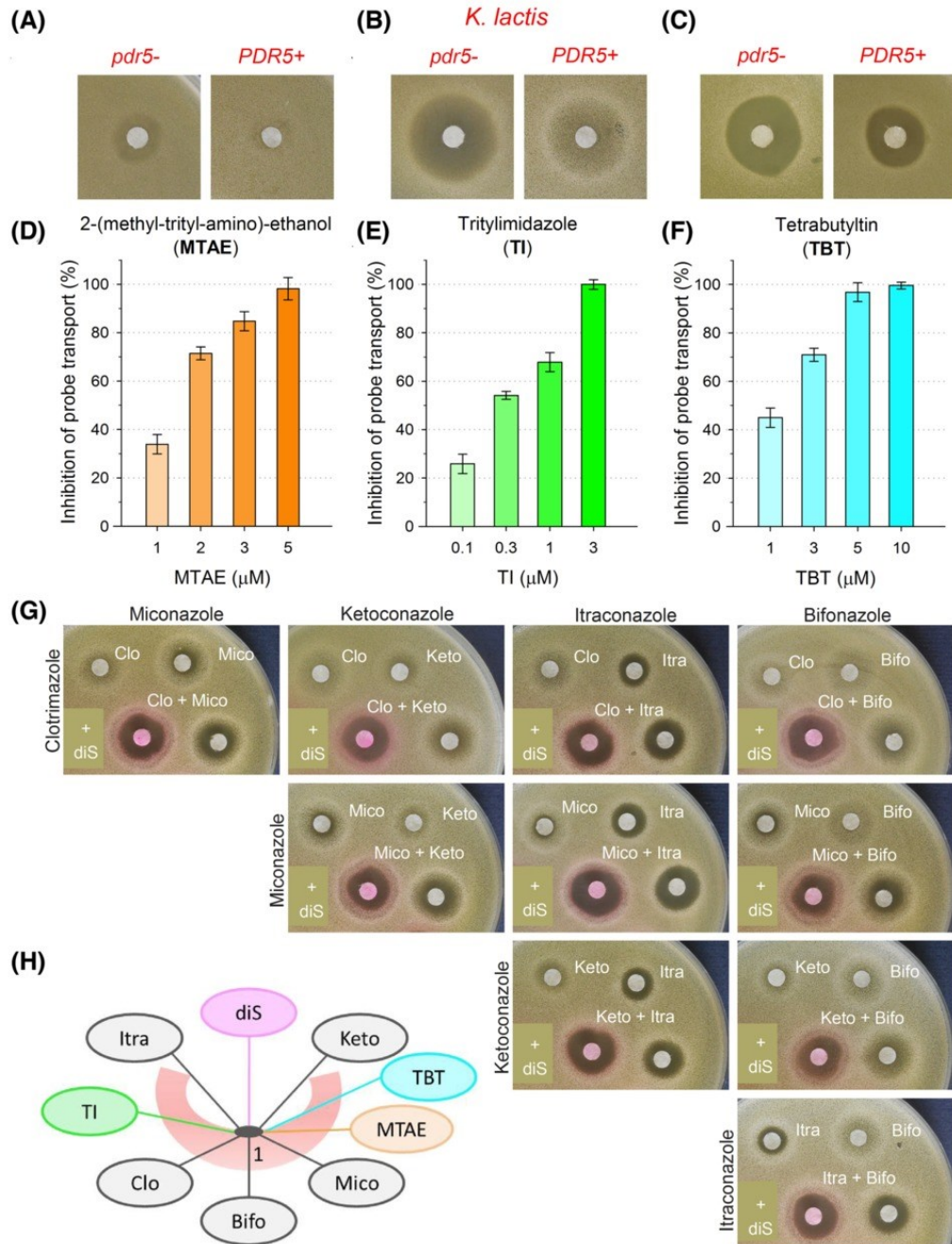


Figure 7. All KIPdr5p substrates bind to the same binding site(s) in the binding pocket. Growth inhibition zones of *pdr5-* and *PDR5+* *K. lactis* cells exposed to (A) MTAE (1 mM), (B) TI (0.1 mM) and (C) TBT (0.9 M). The concentration-dependent inhibitory effect of (D) MTAE, (E) TI and (F) TBT on Pdr5p-mediated probe transport in *K. lactis* cells, calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from four independent repeats. (G) Growth inhibition zones of the *PDR5+* *K. lactis* strain exposed to azoles and their respective combinations with and without the addition of the fluorescent probe diS-C₃(3) (1 mM). Stock solutions of azoles: clotrimazole (0.01 mM), miconazole (0.02 mM), ketoconazole (0.03 mM), itraconazole (0.1 mM) and bifonazole (0.2 mM). (H) Schematic illustration of the same binding site(s) of all tested substrates in the KIPdr5p binding pocket.

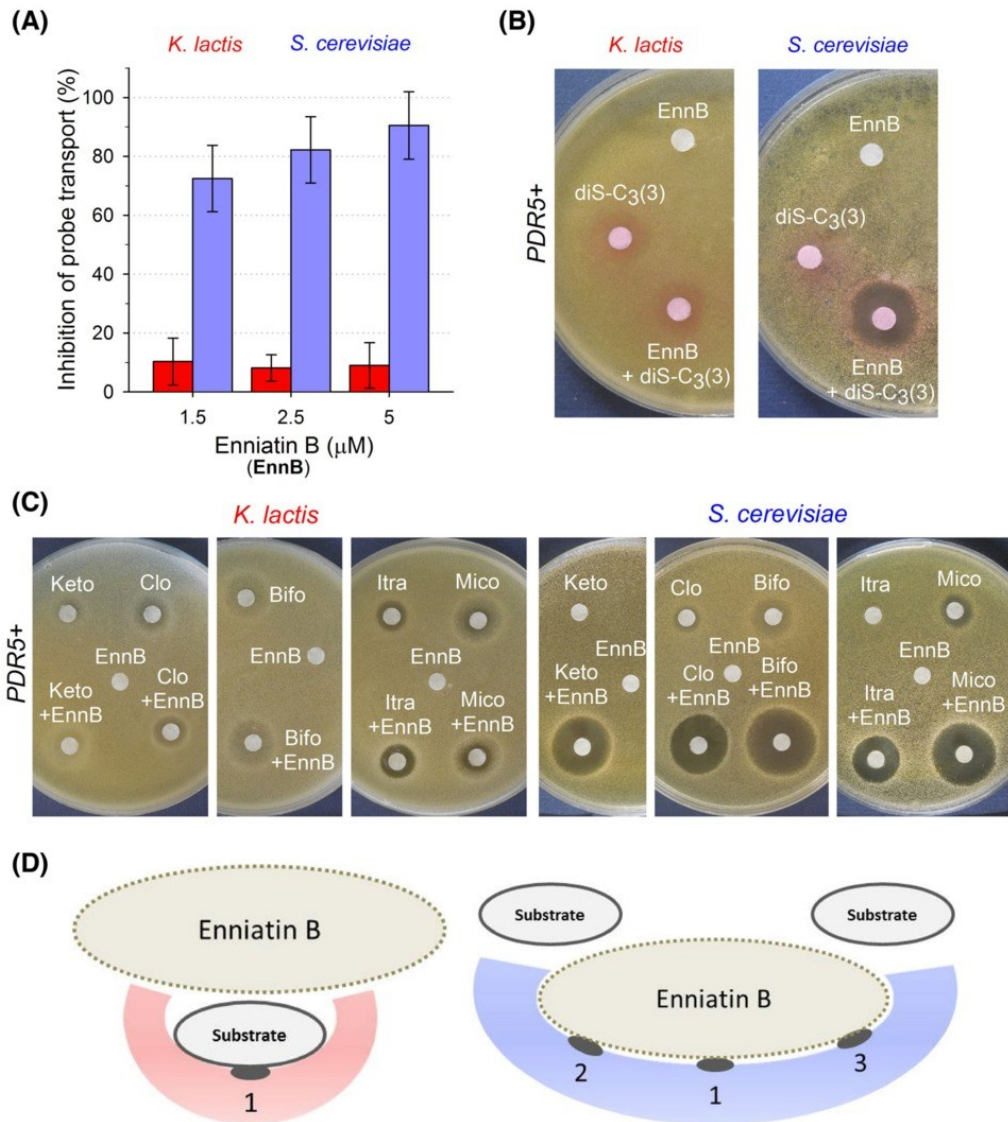


Figure 8. Enniatin B, a bulky substrate of ScPdr5p, has a negligible inhibitory effect on KIPdr5p-mediated transport of the probe and azoles. **(A)** The concentration-dependent inhibitory effect of enniatin B on Pdr5p-mediated probe transport in *K. lactis* (red) and *S. cerevisiae* (blue), calculated according to Eq. 1. Means and SDs were calculated from four independent repeats. Comparison of growth inhibition zones of the *PDR5+* *K. lactis* and *S. cerevisiae* strains exposed to **(B)** enniatin B, diS-C₃(3) (1 mM) and their respective combination and to **(C)** enniatin B, individual tested azoles and their respective combination. Stock solutions for *K. lactis*/*S. cerevisiae*: enniatin B (0.13/0.8 mM), ketoconazole (0.03/1.9 mM), clotrimazole (0.01/4.4 mM), bifonazole (0.2/3.2 mM), itraconazole (0.1/2.8 mM) and miconazole (0.03/1.2 mM). **(D)** Schematic representation of the different sizes of the binding pocket of ScPdr5p and KIPdr5p demonstrating different requirements for the size of their substrates.

affinities for various substrates of the two pumps differ. We demonstrate that the Pdr5p binding pocket in *Saccharomyces cerevisiae* houses more distinct binding sites and is larger than that of *Kluyveromyces lactis*, as schematically illustrated in Fig. 9, summarising both the already published knowledge and the findings presented in the current study.

The fact that the diS-C₃(3) fluorescent probe, used as a benchmark substrate in the study, is also expelled by Cdr1p, a *Candida albicans* homologue of ScPdr5p (Szczepaniak, Lukaszewicz and Krasowska 2015), and by the mammalian transporter P-gp (also homologous to ScPdr5p) (unpublished data) makes our approach very promising for future studies of multiple transport sites of

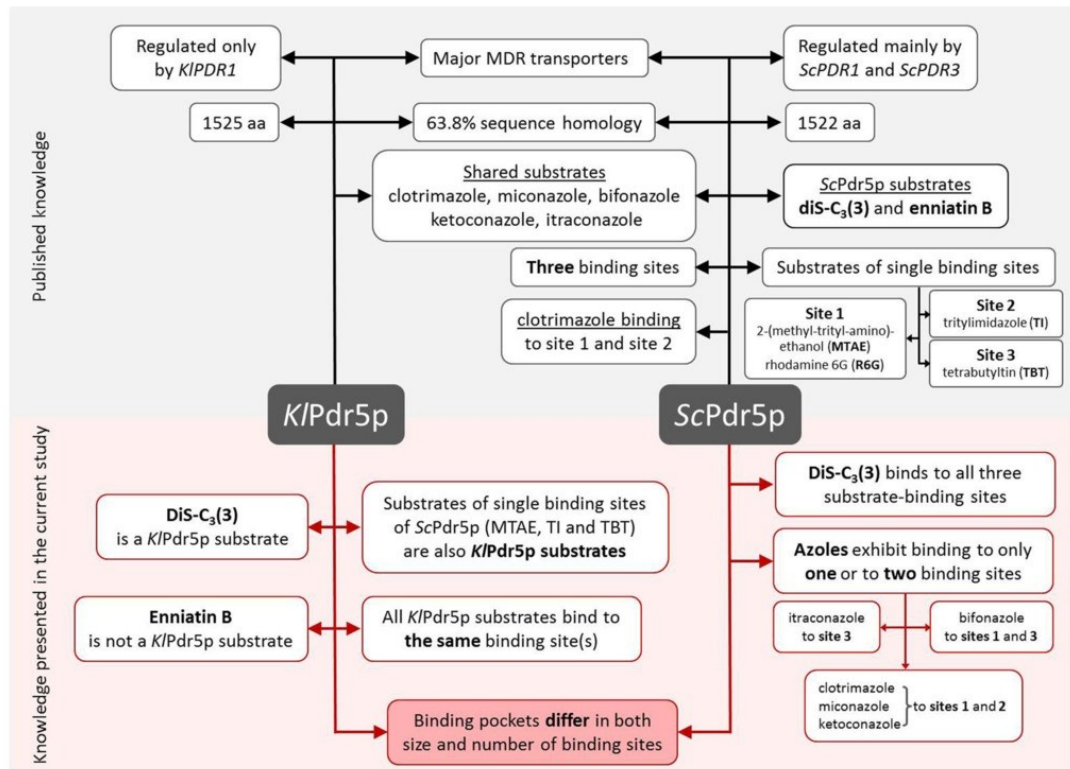


Figure 9. Schematic overview of both the already published knowledge of the ScPdr5p and K/Pdr5p pumps and the findings presented in the current study.

these medically important MDR pumps in relation to substrates with chemically complex structure such as enniatin B.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Andre Goffeau (Universite Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium) for the isogenic mutant strains.

FUNDING

This work was supported by Charles University [SVV 260323], EU supported Operational Programme 'Research and Development for Innovation' [OP VaVpI no. CZ.1.05/4.1.00/16.0340], Slovak Research and Development Agency [APVV-0282-10] and VEGA [1/0077/14 and 2/0111/15].

Conflicts of interest. None declared.

REFERENCES

- Balkova K, Sarinova M, Hodurova Z et al. Functional analysis of the *Kluyveromyces lactis* PDR1 gene. *FEMS Yeast Res* 2009;**9**:321–7.
- Balzi E, Wang M, Leterme S et al. Pdr5, A novel yeast multidrug-resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator Pdr1. *J Biol Chem* 1994;**269**:2206–14.
- Chen XJ. Activity of the *Kluyveromyces lactis* Pdr5 multidrug transporter is modulated by the sit4 protein phosphatase. *J Bacteriol* 2001;**183**:3939–48.
- Chen XJ, Wesolowski LM, Fukuhara H. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene Rag1. *Mol Gen Genet* 1992;**233**:97–105.
- Decottignies A, Grant AM, Nichols JW et al. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem* 1998;**273**:12612–22.
- Denksteinova B, Gaskova D, Herman P et al. Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C₃(3) fluorescence. *Folia Microbiol* 1997;**42**:221–4.
- Dou W, Zhu J, Wang T et al. Mutations of charged amino acids at the cytoplasmic end of transmembrane helix 2 affect transport activity of the budding yeast multidrug resistance protein Pdr5p. *FEMS Yeast Res* 2016;**16**:1–11.
- Franks NP, Lieb WR. Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors. *Nature* 1984;**310**:599–601.
- Gaskova D, Brodska B, Herman P et al. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C₃(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998;**14**:1189–97.
- Gaskova D, Cadek R, Chaloupka R et al. Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C₃(3) fluorescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;**34**:931–7.

- Gaskova D, Plasek J, Zahumensky J et al. Alcohols are inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *FEMS Yeast Res* 2013;**13**:782–95.
- Gbelska Y, Krijger JJ, Breunig KD. Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. *FEMS Yeast Res* 2006;**6**:345–55.
- Golin J, Ambudkar SV. The multidrug transporter Pdr5 on the 25th anniversary of its discovery: an important model for the study of asymmetric ABC transporters. *Biochem J* 2015;**467**:353–63.
- Golin J, Ambudkar SV, Gottesman MM et al. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *J Biol Chem* 2003;**278**:5963–9.
- Golin J, Ambudkar SV, May L. The yeast Pdr5p multidrug transporter: How does it recognize so many substrates?. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**356**:1–5.
- Hanson L, May L, Tuma P et al. The role of hydrogen bond acceptor groups in the interaction of substrates with Pdr5p, a major yeast drug transporter. *Biochemistry* 2005;**44**: 9703–13.
- Hendrych T, Kodedova M, Sigler K et al. Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *BBA - Biomembranes* 2009;**1788**:717–23.
- Hiraga K, Yamamoto S, Fukuda H et al, Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *S. cerevisiae*. *Biochem Bioph Res Co* 2005;**328**:1119–25.
- Kolaczowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A et al. Drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* 1996;**271**:31543–8.
- Pascaud MB, Herreros E, Aliouat EM et al. Evaluation of drug efficacy by using animal models or in vitro systems; *FEMS Immun Med Microbiol* 1998;**22**:173–9.
- Prasad R, Goffeau A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 2012;**66**:39–63.
- Pringle MJ, Brown KB, Miller KW. Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols?. *Mol Pharmacol* 1981;**19**:49–55.
- Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M et al. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microb Biotech* 2001;**3**:207–14.
- Szczepaniak J, Lukaszewicz M, Krasowska A. Detection of inhibitors of *Candida albicans* Cdr transporters using a diS-C₃(3) fluorescence. *Front Microbiol* 2015;**6**:176.
- Takacova M, Sklenar P, Gbelska Y et al. Isolation, heterological cloning and sequencing of the RPL28 gene in *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* 2002;**42**:21–6.
- Witek S, Goffeau A, Nader J et al. Lysosomotropic aminoesters act as H⁺-ATPase inhibitors in yeast. *Folia Microbiol* 1997;**42**: 252–4.
- Wolfe KH, Shields DC. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 1997;**387**:708–13.

Deletion of the *PDR16* gene influences the plasma membrane properties of the yeast *Kluyveromyces lactis*

Nora Toth Hervay, Eduard Goffa, Alexandra Svr̃bicka, Zuzana Simova, Peter Griac, Iva Jancikova, Dana Gaskova, Marcela Morvova, Libusa Sikurova, and Yvetta Gbelska

Abstract: The plasma membrane is the first line of cell defense against changes in external environment, thus its integrity and functionality are of utmost importance. The plasma membrane properties depend on both its protein and lipid composition. The *PDR16* gene is involved in the control of *Kluyveromyces lactis* susceptibility to drugs and alkali metal cations. It encodes the homologue of the major *K. lactis* phosphatidylinositol transfer protein Sec14p. Sec14p participates in protein secretion, regulation of lipid synthesis, and turnover in vivo. We report here that the plasma membrane of the *Klpr16Δ* mutant is hyperpolarized and its fluidity is lower than that of the parental strain. In addition, protoplasts prepared from the *Klpr16Δ* cells display decreased stability when subjected to hypo-osmotic conditions. These changes in membrane properties lead to an accumulation of radiolabeled fluconazole and lithium cations inside mutant cells. Our results point to the fact that the *PDR16* gene of *K. lactis* (*KIPDR16*) influences the plasma membrane properties in *K. lactis* that lead to subsequent changes in susceptibility to a broad range of xenobiotics.

Key words: plasma membrane, multidrug resistance, *Kluyveromyces lactis*, *PDR16*.

Résumé : La membrane cytoplasmique est la première ligne de défense se dressant contre les changements environnementaux externes, d'où l'importance primordiale de son intégrité et de son bon fonctionnement. Les propriétés de la membrane cytoplasmique dépendent des protéines et des lipides qui la composent. Chez *Kluyveromyces lactis*, le gène *PDR16* participe au contrôle de la susceptibilité aux médicaments et aux cations de métaux alcalins. Il code Sec14p, un homologue de la protéine majeure du transfert du phosphatidylinositol chez *K. lactis*. Sec14p participe à la sécrétion des protéines, à la régulation de la synthèse des lipides et au recyclage in vivo. Nous rapportons dans le présent ouvrage que la membrane cytoplasmique du mutant *Klpr16Δ* est hyperpolarisée et que sa fluidité est moindre que celle de la souche parentale. En outre, les protoplastes préparés à partir de cellules de *Klpr16Δ* présentent une stabilité inférieure lorsque soumis à des conditions hypo-osmotiques. Ces divergences des propriétés membranaires entraînent une accumulation de fluconazole et de cations lithium radiomarqués à l'intérieur des cellules mutantes. Nos résultats indiquent que le gène *KIPDR16* influence les propriétés de la membrane cytoplasmique chez *K. lactis*, ce qui amène des changements sur le plan de la susceptibilité à un large éventail de xénobiotiques. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : membrane cytoplasmique, multirésistance aux médicaments, *Kluyveromyces lactis*, *PDR16*.

Introduction

The eukaryotic plasma membrane, heterogeneous in composition of lipids and proteins, is an active barrier between the organism and its external environment. Variations in external physical and (or) chemical conditions may lead to structural changes of the plasma membrane that influence its physical characteristics and functionality. As the outermost boundary of the cell, the plasma membrane has to respond quickly and selectively to a number of different signals from inside and outside cells. Thus, increased expression of the plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins resulting in drug efflux is observed in the presence of various cytotoxic compounds. While the direct drug efflux activity of these transporters is important for the development of multidrug resistance, several studies point to the fact that changes in the overall membrane structure and function are likely to have similarly important contributions leading to in-

creased resistance to a variety of xenobiotics (Panwar et al. 2008; Shahi and Moye-Rowley 2009). In the multidrug resistance network of *Saccharomyces cerevisiae*, Pdr1p and Pdr3p have been found to be the principal regulators of ABC transporter genes expression (Balzi et al. 1987; Delaveau et al. 1994). Besides ABC transporter genes, the transcription factors Pdr1p and Pdr3p control the expression of many other genes encoding sphingolipid and phospholipid homeostasis proteins (DeRisi et al. 2000; Hallstrom et al. 2001; Kolaczowski et al. 2004; Kihara and Igarashi 2004; Panwar and Moye-Rowley 2006). One of them is the *ScPDR16* gene (also known as *Sfh3p*), which affects lipid biosynthesis and resistance of yeast cells to azole inhibitors of ergosterol metabolism (van den Hazel et al. 1999). Studies in *S. cerevisiae* have shown that Pdr16p is 1 of 5 members of the Sec14-like phosphatidylinositol transfer protein (PITP) superfamily (Griac 2007; Schaaf et al. 2008; Bankaitis et al. 2009). The PITP proteins display various subcellular localiza-

Received 18 September 2014. Revision received 14 January 2015. Accepted 14 January 2015.

N. Toth Hervay, A. Svr̃bicka, and Y. Gbelska. Comenius University in Bratislava, Department of Microbiology and Virology, Mlynska dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic.

E. Goffa, Z. Simova, and P. Griac. Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic.

I. Jancikova and D. Gaskova. Institute of Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague, Czech Republic.

M. Morvova and L. Sikurova. Comenius University in Bratislava, Department of Nuclear Physics and Biophysics, FMPI, Mlynska dolina, 842 48 Bratislava, Slovak Republic.

Corresponding author: Yvetta Gbelska (e-mail: gbelska@fns.uniba.sk).

Can. J. Microbiol. 61: 273–279 (2015) dx.doi.org/10.1139/cjm-2014-0627

Published at www.nrcresearchpress.com/cjm on 15 January 2015.

tions (Schnabl et al. 2003) and diverse functions related to lipid metabolism, membrane trafficking, and phosphoinositide-mediated signaling (reviewed in Griac 2007; Ghosh and Bankaitis 2011; Schuh and Audhya 2012). The *Saccharomyces cerevisiae* Pdr16p (ScPdr16p) recombinant protein purifies as a dimer (Ren et al. 2011) and its structure differs from other Sec14 homologues, all of which are monomeric. A model explaining the dimer–monomer state change of ScPdr16p, depending on phosphatidylinositol (PtdIns) binding destabilizing the ScPdr16p dimer, has been proposed (Yang et al. 2013; Yuan et al. 2013). Recent reports indicate that ScPdr16p is involved in a developmentally regulated program of meiotic membrane biogenesis and seems to be an inhibitor of lipid droplet utilization based on its ability to bind PtdIns and to stimulate PtdIns-4-P production (Ren et al. 2014). Holic et al. (2014) has shown that in *S. cerevisiae* PtdIns binding is critical for ScPdr16p function in modulation of sterol metabolism in response to the presence of antifungal azoles. Deletion of the *PDR16* gene in yeast pathogens *Candida glabrata* and *Candida albicans* also enhances fluconazole sensitivity (Kaur et al. 2004; Saidane et al. 2006; Culaikova et al. 2013). Recently, we have isolated the ScPDR16 homologue from the phylogenetically related yeast *Kluyveromyces lactis* and showed that the *KIPDR16* gene deletion results in increased drug susceptibility of *Klpr16Δ* mutant cells to various drugs and alkali metal cations, increased amount of lanosterol at the expense of ergosterol, and a higher accumulation of rhodamine 6G while maintaining the expression and activity of membrane efflux pumps (Goffa et al. 2014).

In the present work, the role of the *KIPDR16* gene in the control of plasma membrane properties related to drug susceptibility in *K. lactis* was studied. It was found that the plasma membrane of the *Klpr16Δ* mutant is hyperpolarized and its fluidity is lower than that of the parental strain, leading to increased accumulation of radiolabeled fluconazole and lithium cations in mutant cells.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The following yeast haploid strains were used: *K. lactis* PM6-7A (*MATA uraA1 ade2 Rag+ pKD1+*) (Chen et al. 1992) and *K. lactis* CBS2359ku80Δ (*MATA ku80::loxP*) (Kooistra et al. 2004) parental strain and its isogenic *pdr16Δ* deletion mutant (Goffa et al. 2014). Cells were grown on glucose-rich (YPD) medium (2% glucose, 1% yeast extract, 2% Bacto peptone) or on minimal medium (YNB) containing 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and appropriate nutritional requirements (uracil or adenine). The media were solidified with 2% Bacto agar.

Protoplasts were prepared by a modified snail gut procedure (Kovac et al. 1968). Washed *K. lactis* parental and isogenic *pdr16Δ* deletion mutant cells pregrown in YPD were incubated in 20 mL of pretreating buffer (1% yeast extract, 1% glucose, 25 mol/L DTT, 20 mmol/L HEPES [N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid]-Tris (pH 8.0)) for 30 min at 28 °C, washed with 1.35 mol/L sorbitol in 10 mmol/L citrate phosphate buffer (pH 5.8), and treated with lyophilized snail gut enzyme in 1 mL of the 1.35 mol/L sorbitol solution at 28 °C for 1 h. The protoplasts were washed twice with a solution containing 1.34 mol/L sorbitol in 1 mmol/L EDTA (pH 7.0) and resuspended in this solution to 3×10^2 units/mL.

Osmotic stability test

Osmotic stability of protoplasts was evaluated according to Alterthum and Rose (1973). A 0.1 mL volume of the prepared protoplasts suspension was added to 2 mL of sorbitol dissolved in 5 mmol/L citrate phosphate buffer (pH 7.0) in the concentration range 0.2–1.6 mol/L. After standing for 10 min at room temperature the turbidity of the mixtures was determined as absorbance at 600 nm.

Drug susceptibility assays

Drug susceptibility of the parental strain *K. lactis* CBS2359ku80Δ and the *pdr16Δ* deletion mutant was determined by a spot assay.

Yeast cultures were grown overnight in YPD medium, diluted, and spotted as 10-fold dilutions onto YPD medium containing chemical stress inducers (all obtained from Sigma–Aldrich) tested in the following specified concentration ranges: hygromycin B (5–40 μg/mL), spermine tetrahydrochloride (0–3 mmol/L), tetramethylammonium chloride (0–0.6 mmol/L), sodium dodecylsulfate (SDS) (0.005%–1%), N-lauroylsarcosine (0%–1%), and Triton X-100 (0.1%–3.5%). The growth was scored after 2 days of incubation at 28 °C.

Fluconazole accumulation by *K. lactis* cells

Yeast cells were grown in YPD medium to the exponential phase (2×10^7 cells/mL). The culture was washed twice and concentrated to the concentration 1×10^9 cells/mL in YNB medium (1.7 g yeast nitrogen base without amino acids or ammonium sulfate, 5 g/L ammonium sulfate, pH 5.0) containing 2% glucose. A 10 μL volume of 10-times-diluted stock solution (37 kBq) of ^3H -labeled fluconazole (specific activity 103.6 GBq/mmol/L; Moravek Biochemicals, USA) were added per millilitre of cell suspension. Chemically, the final concentration of [^3H]fluconazole, 109 ng/mL, was significantly below the minimal inhibitory concentration for both tested strains. At the indicated time points, 500 μL of the cell suspension was removed, filtered, and washed 3 times with a wash solution containing 10 μg/mL fluconazole and 1% NP-40 (a detergent). The radioactivity associated with the cells was counted for 2 min in Bray scintillation cocktail (per litre: 4 g diphenyloxazole, 0.2 g phenyloxazolebenzene, 100 mL methanol, 60 g naphthalene, 20 mL ethylene glycol, and dioxane to 1 L) using a liquid scintillation analyzer Tri-Carb 2900TR (PerkinElmer). Data were expressed as picomoles of [^3H]fluconazole/ 10^8 cells.

Lithium accumulation by *K. lactis* cells

Yeast cells were grown in YPD to the exponential phase 1×10^7 cells/mL and separated into 2 aliquots of 25 mL. After centrifugation, the yeast cells were resuspended in 25 mL of YPD media containing 100 mmol/L LiCl and incubated aerobically at 30 °C for 1 h. After washing twice with deionized water, the cells were resuspended in 20 mL of incubation buffer (10 mmol/L Tris, 0.1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L RbCl, pH 4.5). Aliquots of 5 mL were filtered using a Millipore filter (Merck) with a pore diameter of 0.8 μm, washed twice with 5 mL of wash buffer (20 mmol/L MgCl₂), resuspended in 5 mL of extraction buffer (10 mmol/L MgCl₂, 0.2 mol/L HCl), and incubated overnight at laboratory temperature. The supernatant after centrifugation was used for measurement of intracellular concentration of lithium cations with an atomic absorption spectrometer in flame emission mode (Solaar 969 AA Spectrometer – TJA Solutions).

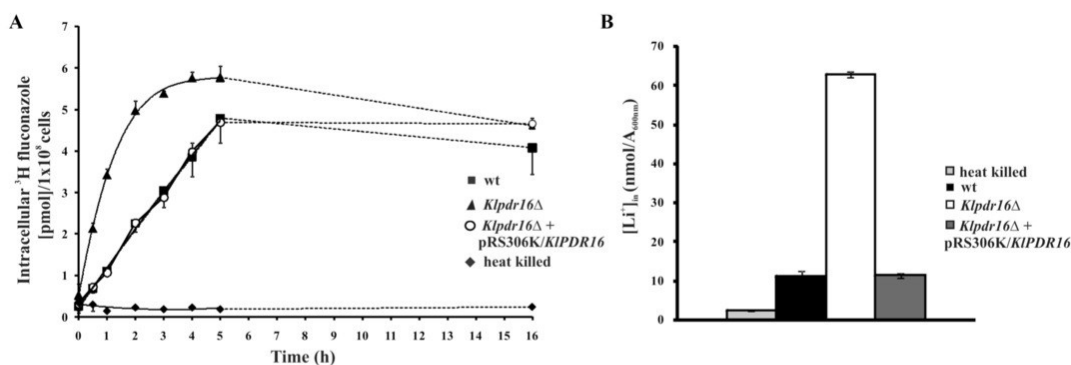
Fluorescence measurement of diS-C₃(3) accumulation in cells

Yeast cells grown on YPD to early – mid-exponential phase (1×10^7 – 5×10^7 cells/mL) were harvested, washed twice with distilled water, and resuspended in 10 mmol/L citrate-phosphate buffer (pH 6.0). A 3 mL volume of cell suspension was labeled with the potentiometric probe diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiacarboxycyanine) (Fluka) to a final concentration of 3×10^{-8} mol/L. Fluorescence emission spectra of cell suspensions were measured using FluoroMax 4 spectrofluorimeter (Jobin Yvon-Horiba) with a xenon lamp. Excitation wavelength was 531 nm; fluorescence spectra were recorded in the range of 560–590 nm.

Labeling of cells with DPH

Cells were grown in YPD medium at 28 °C to late exponential phase, collected by centrifugation, washed twice with Tris–Cl buffer (10 mmol/L Tris–Cl, pH 7.0), and resuspended in the same buffer to an absorbance at 600 nm of 0.25. Cells were labeled with a fluorescent probe DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, Serva, Germany) at 25 °C. The final concentration of DPH in cell suspensions was 1.5×10^{-7} mol/L.

Fig. 1. Fluconazole (A) and lithium (B) accumulation in *Klpr16Δ* and isogenic parental cells. (A) Deletion of the *KIPDR16* gene leads to increased accumulation of radiolabeled fluconazole. [³H]fluconazole was added at time 0 and its accumulation was measured using a cell filtration technique (for details see Material and methods). Data represent means ± SD from 3 independent experiments. Heat-inactivated cells were used to assess the binding of radioactive fluconazole to the cell surface. (B) Deletion of the *KIPDR16* gene leads to increased Li⁺ accumulation in *Kluyveromyces lactis* cells. The cells were incubated for 1 h in 100 mmol/L LiCl, as described in Material and methods, and the intracellular concentration of Li⁺ was estimated using atomic absorption spectrometry. Data represent the means from 3 independent experiments ± SD.



Steady-state anisotropy measurement

A Luminescence Spectrometer PerkinElmer LS 45 (USA) was used for L-format polarization measurements of the steady-state fluorescence anisotropy of DPH. The excitation and emission wavelengths were set to 360 and 430 nm, respectively. The measurements were carried out at 25 ± 1 °C. The steady-state fluorescence anisotropy (r_s) was used for assessment of membrane fluidity and calculated according to the following equation (Lakowicz 2006; Abe and Hiraki 2009):

$$r_s = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$$

where I represents the fluorescence intensity of DPH-labeled cells. The subscript VV indicates measurements with both polarizers positioned vertically, while the subscript VH indicates measurements with the excitation polarizer in the vertical position and the emission polarizer in the horizontal position. G stands for the Grating factor, $G = I_{HV}/I_{HH}$, obtained for the unlabeled cells, i.e., blank. The subscripts HV and HH indicate the positions of polarizers opposite VH and VV, respectively. The anisotropy values were measured with 8.55 s time slots during 60 min of DPH incubation with cells.

Data were processed in FL Winlab software and expressed as means with standard deviations from 7 independent experiments. For statistical analyses, the Mann–Whitney U test was used and the level of statistical significance was set to $P < 0.01$.

Results

On the basis of our previous results (Goffa et al. 2014), we proposed that the susceptibility of the *Klpr16Δ* mutant to cytotoxic drugs could be the result of their enhanced passive diffusion into mutant cells. The present work is focused on the impact of the *KIPDR16* gene on the plasma membrane properties in *K. lactis*.

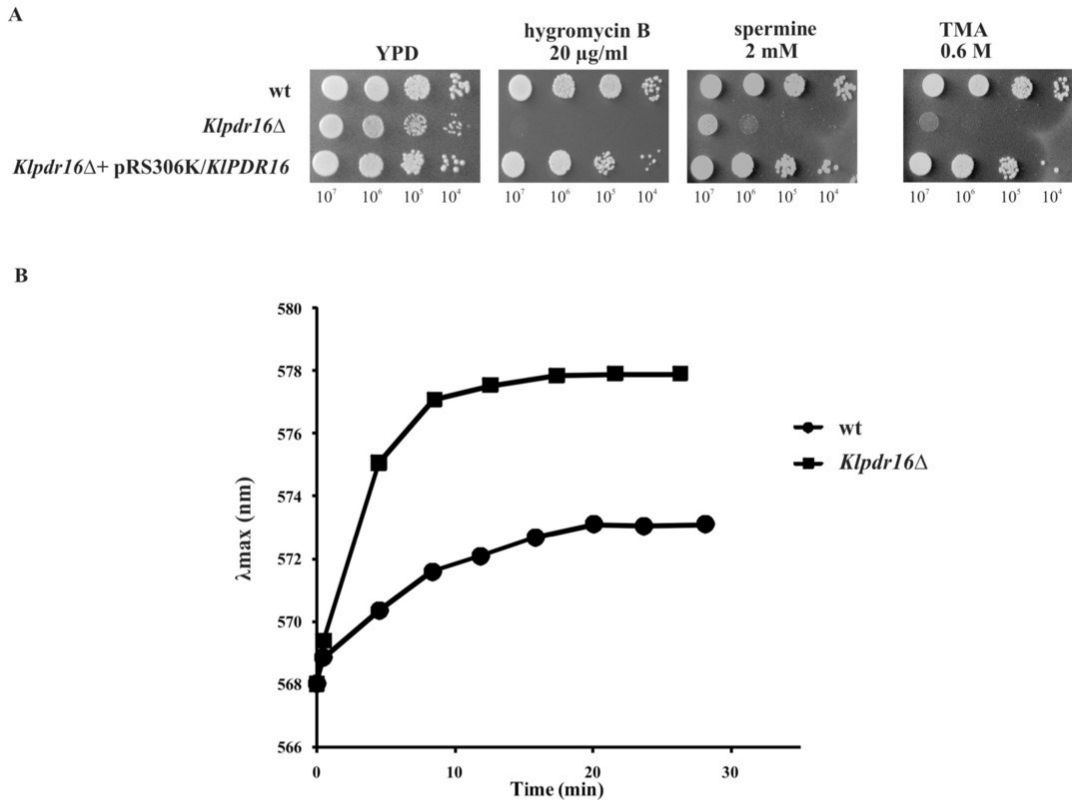
KIPDR16 deletion leads to increased accumulation of radiolabeled fluconazole and lithium in mutant cells

To better understand the mechanisms leading to the increased sensitivity of the *Klpr16Δ* mutant cells to antifungal azoles, we measured azole accumulation using ³H-radiolabeled fluconazole in the *Klpr16Δ* mutant cells and compared it with fluconazole accumulation in the parental cells and in the cells of the *Klpr16Δ*

mutant expressing the *KIPDR16* gene from a plasmid. Heat-killed cells were used as a control for nonspecific binding of fluconazole to the cell's surface (Mansfield et al. 2010). As Fig. 1A demonstrates, the *Klpr16Δ* mutant cells accumulated radiolabeled fluconazole about 3 times faster (initial rate 0.049 pmol/min·10⁸ cells) than cells of the parental strain (initial rate 0.015 pmol/min·10⁸ cells) or the *Klpr16Δ* mutant expressing the *KIPDR16* gene (initial rate 0.013 pmol/min·10⁸ cells). Only a very small percentage (<5%) of added radiolabeled fluconazole remained bound to heat-killed cells, indicating that the rest of the radioactivity associated with the cells represents intracellular fluconazole. Intracellular fluconazole levels of the *Klpr16Δ* mutant cells seemed to be already saturated at the 3 h time point after addition of radiolabeled fluconazole, increasing only slightly at the 4 and 5 h time points. Intracellular fluconazole levels of the parental strain cells and the *Klpr16Δ* mutant cells expressing the *KIPDR16* gene from a plasmid were steadily increasing at these time points. Eventually, at the end of the experiment, at the 16 h time point after addition of radioactive fluconazole to the cells, all yeast cultures, i.e., the parental strain, the *Klpr16Δ* mutant strain, and the *Klpr16Δ* mutant strain expressing the *KIPDR16* gene, exhibited similar intracellular fluconazole levels. The radiolabeled fluconazole accumulation experiment was done under the conditions (YNB, 2% glucose) that prevented the active growth of the yeast culture due to the high cell density (10⁹ cells/mL), but otherwise the cells remained energized with the efflux pumps active. Taking into account our previous results (Goffa et al. 2014), which showed no difference in efflux of another typical efflux pump substrate, rhodamine 6G, between the parental strain and the *Klpr16Δ* mutant strain, the fluconazole accumulation experiment indicates that the increased uptake of fluconazole into the *Klpr16Δ* mutant cells was most likely caused by the change in membrane properties of the *Klpr16Δ* mutant cells.

The ability of *K. lactis* cells devoid of the *KIPDR16* gene to accumulate higher amounts of cytotoxic compounds was corroborated further by the measurement of lithium accumulation inside *K. lactis* cells, using atomic absorption spectrometry (see Material and methods). As shown in Fig. 1B, the *Klpr16Δ* mutant cells accumulated 6 times more lithium than the corresponding parental wild-type strain. The expression of the *KIPDR16* gene from a

Fig. 2. The *Klpr16Δ* deletion increases the susceptibility of *Kluyveromyces lactis* cells to positively charged compounds (A) and causes plasma membrane hyperpolarization (B). (A) Spotting assays were performed with a 10-fold dilution of overnight culture on YPD medium containing hygromycin B, spermine tetrahydrochloride, and tetramethylammonium chloride (TMA) as indicated. The plates were incubated for 2 days at 28 °C. (B) Fluorescent probing of membrane potential in cell suspensions of *Klpr16Δ* and corresponding wild-type cells (wt) using diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiobarbiturate).



multicopy plasmid was found to return the accumulated lithium amount to that of the wild-type strain.

***KIPDR16* deletion results in hyperpolarization of the plasma membrane**

We wondered whether the sensitivity of the *Klpr16Δ* mutant strain to alkali metal cations could be the result of the yeast plasma membrane hyperpolarization. We tested the sensitivity of the *Klpr16Δ* mutant strain to positively charged compounds (hygromycin B, spermine tetrahydrochloride, and tetramethylammonium chloride), often used as indicators for a hyperpolarized or depolarized yeast plasma membrane (Perlin et al. 1988). Figure 2A demonstrates that the *KIPDR16* gene deletion (*Klpr16Δ*) results in increased sensitivity of *K. lactis* mutant cells to all cationic compounds tested compared with the parental strain. The expression of the *KIPDR16* gene from a multicopy plasmid was found to rescue the susceptibility phenotype of the *Klpr16Δ* mutant cells to levels comparable with that of the parental strain (Fig. 2A).

Next, we measured the membrane potential-driven redistribution of fluorescent dye diS-C₃(3), assessing changes in the fluorescence maximum λ_{\max} and fluorescence intensity (Gaskova et al. 1998, 2001) in the *Klpr16Δ* mutant cells relative to the parental *K. lactis* strain. The diS-C₃(3) assay, as Fig. 2B clearly shows, resulted

in the shift of λ_{\max} to longer wavelengths in the *Klpr16Δ* mutant strain due to its hyperpolarized plasma membrane. On the basis of these results, we propose that *KIPDR16p* participates in the control of the plasma membrane potential.

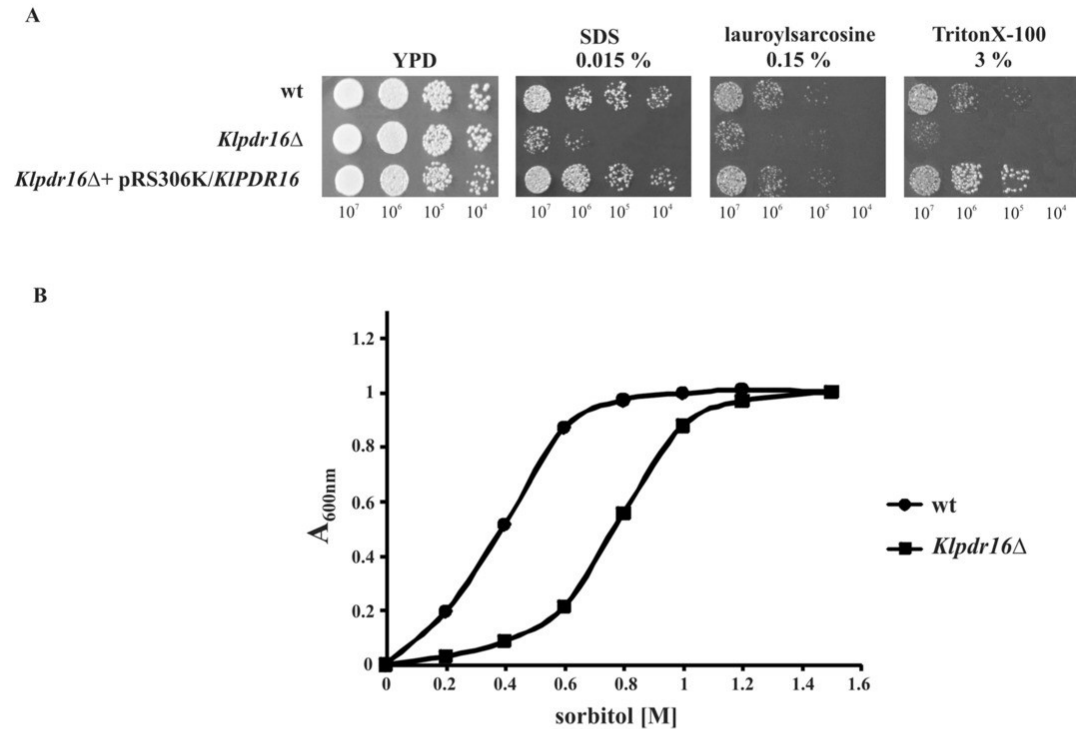
Decreased plasma membrane stability of the *Klpr16Δ* mutant

To compare the plasma membrane stability of the *Klpr16Δ* mutant cells with that of the parental wild-type strain, we tested the ability of cells to grow in the presence of various membrane active compounds. Figure 3A clearly demonstrates higher susceptibility of *Klpr16Δ* mutant cells to SDS, lauroylsarcosine, and Triton X-100 compared with the parental wild-type strain. The introduction of the *KIPDR16* gene on a multicopy plasmid into the *Klpr16Δ* mutant restored the wild-type strain susceptibility. Decreased stability of the mutant plasma membrane was also demonstrated by the decreased osmotic stability of protoplasts prepared from *Klpr16Δ* mutant strain compared with that of the parental wild-type strain (Fig. 3B), supporting our proposal of the impact of *KIPDR16p* on the plasma membrane properties in *K. lactis*.

Reduced plasma membrane fluidity in the *Klpr16Δ* mutant

As we have shown in our recent work, the *Klpr16Δ* mutation leads to a decreased content of ergosterol in whole-cell extract

Fig. 3. The *KIPDR16* gene deletion negatively influences the plasma membrane stability. (A) Deletion of *KIPDR16* gene confers hypersensitivity to SDS (sodium dodecylsulfate), lauroylsarcosine, and Triton X-100. Spotting assays were performed with a 10-fold dilution of overnight cultures on YPD medium containing the indicated compounds. The plates were incubated for 2 days at 28 °C. (B) Osmotic stability of *Kluyveromyces lactis* protoplasts. A 0.1 mL volume of protoplast's suspension was added to 2 mL of sorbitol dissolved in 5 mmol/L citrate phosphate buffer (pH 7.0) at concentrations indicated on the abscissa. After standing for 10 min at room temperature the turbidity of the mixtures was determined as absorbance at 600 nm.



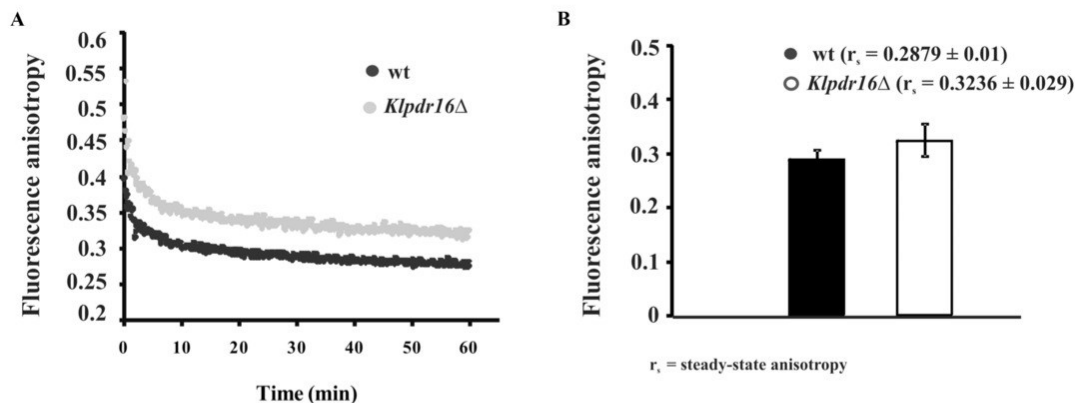
(Goffa et al. 2014). Ergosterol plays an essential role in yeast plasma membrane function, affecting membrane rigidity, fluidity, and permeability (reviewed in Parks et al. 1995). To analyze the possible role played by *KIPDR16p* in the structure and function of the *K. lactis* plasma membrane, we used the fluorescence depolarization technique. A lipophilic molecule, DPH, is commonly used in such experiments and the measurement of the steady-state anisotropy of DPH is the most common technique to estimate ordering of the membrane lipid constituents, which is inversely proportional to the membrane fluidity (Shinitzky 1984; Lentz 1993). To examine whether the drug susceptibility in the *Klpdr16*Δ mutant is attributable to changes in the plasma membrane fluidity, we performed fluorescence anisotropy measurements on cells labeled with DPH. The incorporation of DPH into the plasma membrane of yeast cells was checked by fluorescence anisotropy decay within 60 min of addition of DPH (Fig. 4A). The DPH anisotropy values reached the plateau in 40 min, which was kept within 40–60 min intervals of DPH incubation with both *K. lactis* strains, wild type and *Klpdr16*Δ, analyzed. This indicates that DPH molecules are incorporated into the yeast plasma membrane and persist (40–60 min) in the membrane hydrophobic region (Shinitzky 1984). The anisotropy value at the completion of DPH incorporation in the *Klpdr16*Δ mutant strain was significantly higher (by 12%, $P < 0.01$) than that recorded for the parental strain (Fig. 4B), pointing to an increased ordering of lipid molecules in the hydrophobic re-

gion of the membranes, i.e., to reduced plasma membrane fluidity in the *Klpdr16*Δ mutant. Since no significant alterations in the phospholipid composition or fatty acid composition of *Klpdr16*Δ mutant cells compared with the parental strain were observed (Goffa et al. 2014), the changes in the ergosterol content could contribute to the altered plasma membrane fluidity of *Klpdr16*Δ mutant cells.

Discussion

In the present work, we studied the impact of *KIPDR16p* on the plasma membrane properties in *K. lactis*. Our previous work showed that phenotype manifestations of *Klpdr16*Δ deletion were more prominent than those reported for *S. cerevisiae* *PDR16* gene deletion (Goffa et al. 2014). Besides exhibiting the increased susceptibility to antifungal azoles used in clinical medicine and agriculture that has been shown for *S. cerevisiae* *pdr16*Δ strain (Simova et al. 2013), the *K. lactis* *pdr16*Δ mutant also exhibited an increased susceptibility to other xenobiotics (oligomycin, rhodamine 6G, 4-nitroquinoline-*N*-oxide) and alkali metal cations. Significant differences in the inhibition of the sterol biosynthetic pathway were observed between the *K. lactis* *Klpdr16*Δ strain and its corresponding wild-type strain (Goffa et al. 2014). On the contrary, these differences in the corresponding *Scpdr16*Δ mutant and wild-type strain were observed only when *S. cerevisiae* cells were challenged

Fig. 4. Representative time courses of fluorescence anisotropy of DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) (A) and its values at the completion of DPH incorporation in the *Klpr16Δ* mutant and wild-type (wt) yeast cells. (B) The values of DPH fluorescence anisotropy for *Kluyveromyces lactis* *Klpr16Δ* mutant and wild-type yeast cells are expressed as means \pm SD of 7 independent experiments.



by subinhibitory concentrations of the azoles (miconazole or fluconazole) (Simova et al. 2013). Given the presumed role of *KIPDR16p* to influence plasma membrane structure and function, we assessed the effect of *KIPDR16* expression on the intracellular accumulation of ^3H -labeled fluconazole. We found that in *K. lactis* *pr16Δ* mutant and wild-type cells, the rate of radiolabeled fluconazole accumulation markedly differs in the first hours of the experiment. On the contrary, in *S. cerevisiae*, both *Scpdr16Δ* and wild-type cells accumulated the same amount of radioactive fluconazole (Simova et al. 2013). Taking into account the susceptibility of *Klpr16Δ* mutant cells to a broader spectrum of antifungal compounds and alkali metal cations, the lower amount of ergosterol in *Klpr16Δ* mutant cells even in the absence of azoles, and the differences in the course of radiolabeled fluconazole accumulation in comparison with *S. cerevisiae*, we propose that the differences between the 2 yeast species observed could be the result of different plasma membrane properties.

The lipid composition of a cellular membrane has profound effects on its biophysical properties. A low level of ergosterol in the yeast plasma membrane leads to disruption of the membrane lateral order, which results in changes of membrane fluidity and the physiological membrane potential being compromised. On the basis of the results obtained using the diS-C₃(3) assay showing the differences in plasma membrane potential between the *K. lactis* parental and *Klpr16Δ* mutant cells, we propose that *KIPDR16p* is involved in the control of *K. lactis* plasma membrane potential, preventing excessive hyperpolarization.

Finally, by using DPH for the measurement of plasma membrane anisotropy, we have shown that the changes in the ergosterol content could contribute to the altered plasma membrane fluidity in *Klpr16Δ* mutant cells. Indeed, changes in the structural properties of the *K. lactis* membrane (decreased sterol/phospholipid ratio, the decreased saturated fatty acid/monounsaturated fatty acid ratio) could explain the higher membrane fluidity, which represents higher resistance of the *K. lactis* yeast to several drugs compared with its *Klpr16Δ* mutant. Our results thus support the observations of Mishra et al. (2008), who found increased membrane fluidity in fluconazole-resistant *C. albicans* clinical isolates from diabetic patients, and those of Younsi et al. (2000), explaining higher membrane fluidity with changes in its lipid composition, representing a process of metabolic resistance of the *K. lactis* yeast to amphotericin B. The precise molecular function of *KIPDR16p* in providing protection against azole antifungals is not known yet and requires further experimentation. We can only

speculate that similarly to the proposals of Holic et al. (2014) for *ScPdr16p* and Cabrito et al. (2011) for *ScPdr18p*, the inhibitory effect of *KIPDR16* deletion on sterol biosynthesis could result from probing local sterol concentrations, thus influencing the activity of ergosterol-synthesizing enzymes.

Conclusion

KIPDR16 is a functional homologue of the *ScPDR16* gene and its disruption leads to increased susceptibility of cells to several cytotoxic drugs and alkali metal cations, to enhanced accumulation of radiolabeled fluconazole and lithium, to plasma membrane hyperpolarization, and to reduced plasma membrane fluidity. The results of the present study suggest that *KIPDR16p* plays a role in plasma membrane "stability", this physiological trait contributing to a multidrug resistance phenotype. The participation of *KIPDR16p* in the dynamics of yeast membranes could be the reason (explanation) of altered plasma membrane properties associated with *KIPDR16* gene deletion. All these observations point to a relationship among intracellular membrane trafficking, phosphatidylinositol metabolism, multidrug resistance, and plasma membrane properties in the biotechnologically important yeast species *K. lactis*.

Acknowledgements

We thank Ol'ga Zimmermannová and Hana Sychrová (Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic) for their kind help with lithium uptake measurement. This work was supported by grants from the Slovak Grant Agency of Science (VEGA 1/0867/12, VEGA 1/0077/14), the Slovak Research and Developmental Agency (APVV-0282-10, APVV-0134-12), and Comenius University (UK 361/2014, UK 246/2014). The publication is also the result of the project implementation: Comenius University in Bratislava Science Park supported by the Research and Development Operational Programme funded by the European Research and Development Funding (ERDF) (Information and Technology Monitoring System (ITMS) 26240220086).

References

- Abe, F., and Hiraki, T. 2009. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**: 743–752. doi:10.1016/j.bbame.2008.12.002. PMID:19118519.
- Alterthum, F., and Rose, A.H. 1973. Osmotic lysis of sphaeroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 371–382. doi:10.1099/00221287-77-2-371. PMID:4584061.

- Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E., and Goffeau, A. 1987. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **262**: 16871–16879. PMID:3316228.
- Bankaitis, V.A., Mousley, C.J., and Schaaf, G. 2009. The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 150–160. doi:10.1016/j.tibs.2009.10.008. PMID:19926291.
- Cabrito, T.R., Teixeira, M., Singh, A., Prasad, R., and Sa-Correia, I. 2011. The yeast ABC transporter *Pdr18* (ORF *YNR070w*) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multidrug resistance. *Biochem. J.* **440**: 195–202. doi:10.1042/BJ20110876. PMID:21831043.
- Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M., and Fukuhara, H. 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 97–105. PMID:1603079.
- Culakova, H., Dzugasova, V., Perzelova, J., Gbelska, Y., and Subik, J. 2013. Mutation of the *GgPDR16* gene attenuates azole tolerance and biofilm production in pathogenic *Candida glabrata*. *Yeast*, **30**: 403–414. doi:10.1002/yea.2978. PMID:23939632.
- Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik, J., and Jacq, C. 1994. *PDR3*, a new yeast regulatory gene is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 501–511. doi:10.1007/BF00583901. PMID:8078477.
- DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C., et al. 2000. Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.* **470**: 156–160. doi:10.1016/S0014-5793(00)01294-1. PMID:10734226.
- Gaskova, D., Brodska, B., Herman, P., Vecer, J., Malinský, J., Sigler, K., et al. 1998. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: di- C_{12} (3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**: 1189–1197. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980930)14:13<1189::AID-YEA320>3.3.CO;2-B. PMID:9791890.
- Gaskova, D., Cadek, R., Chaloupka, R., Plasek, J., and Sigler, K. 2001. Factors underlying membrane potential — dependent and independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: di- C_{12} (3) in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1511**: 74–79. doi:10.1016/S0005-2736(00)00383-7. PMID:11248206.
- Ghosh, R., and Bankaitis, V.A. 2011. Phosphatidylinositol transfer proteins: negotiating the regulatory interface between lipid metabolism and lipid signaling in diverse cellular processes. *BioFactors*, **37**: 290–308. doi:10.1002/biof.180. PMID:21915936.
- Goffa, E., Balazfyova, Z., Toth Hervay, N., Simova, Z., Balazova, M., Griac, P., et al. 2014. Isolation and functional analysis of the *KIPDR16* gene. *FEMS Yeast Res.* **14**: 337–345. doi:10.1111/1567-1364.12102. PMID:24119036.
- Griac, P. 2007. Sec14 related proteins in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**: 737–745. doi:10.1016/j.bbali.2007.02.008. PMID:17395532.
- Hallstrom, T.C., Lambert, I., Schorling, S., Balzi, E., Goffeau, A., et al. 2001. Coordinate control of sphingolipid biosynthesis and multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 23674–23680. doi:10.1074/jbc.M101568200. PMID:11323424.
- Holic, R., Simova, Z., Ashlin, T., Pevala, V., Poloncova, K., Tahotna, D., et al. 2014. Phosphatidylinositol binding of *Saccharomyces cerevisiae* *Pdr16p* represents an essential feature of this lipid transfer protein to provide protection against azole antifungals. *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**: 1483–1490. doi:10.1016/j.bbali.2014.07.014. PMID:25066473.
- Kaur, R., Castano, I., and Cormack, B.P. 2004. Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1600–1613. doi:10.1128/AAC.48.5.1600-1613.2004. PMID:15105111.
- Kihara, A., and Igarashi, Y. 2004. Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Mol. Biol. Cell*, **15**: 4949–4959. doi:10.1091/mbc.E04-06-0458. PMID:15342785.
- Kolaczkowski, M., Kolaczowska, A., Gaigg, B., Schneider, R., and Moye-Rowley, W.S. 2004. Differential regulation of ceramide synthase components LAC1 and LAG1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **3**: 880–892. doi:10.1128/EC.3.4.880-892.2004. PMID:15302821.
- Kooistra, R., Hooykaas, P.J., and Steensma, H.Y. 2004. Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **21**: 781–792. doi:10.1002/yea.1131. PMID:15282801.
- Kovac, L., Bednarova, H., and Greksak, M. 1968. Oxidative phosphorylation in yeast. I. Isolation and properties of phosphorylating mitochondria from stationary phase cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **153**: 32–42. doi:10.1016/0005-2728(68)90143-6.
- Lakowicz, J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Springer, New York.
- Lentz, B.R. 1993. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, **64**: 99–116. doi:10.1016/0009-3084(93)90060-G. PMID:8242843.
- Mansfield, B.E., Oltean, H.N., and Oliver, B.G. 2010. Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* **6**: e1001126. doi:10.1371/journal.ppat.1001126. PMID:20941354.
- Mishra, N.N., Prasad, T., Sharma, N., and Gupta, D.K. 2008. Membrane fluidity and lipid composition of fluconazole resistant and susceptible strains of *Candida albicans* isolated from diabetic patients. *Braz. J. Microbiol.* **39**: 219–225. doi:10.1590/S1517-83822008000200004. PMID:24031205.
- Panwar, S.L., and Moye-Rowley, W.S. 2006. Long chain base tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* is induced by retrograde signals from the mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**: 6376–6384. doi:10.1074/jbc.M512115200. PMID:16407254.
- Panwar, S.L., Pasrija, R., and Prasad, R. 2008. Membrane homeostasis and multidrug resistance in yeast. *Biosci. Rep.* **28**: 217–228. doi:10.1042/BSR20080071. PMID:18754755.
- Parks, L.W., Smith, S.J., and Crowley, J.H. 1995. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast — a review. *Lipids*, **30**: 227–230. doi:10.1007/BF02537825. PMID:7791530.
- Perlin, D.S., Brown, C.L., and Haber, J.E. 1988. Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**: 18118–18122. PMID:3056938.
- Ren, J., Schaaf, G., Bankaitis, V.A., Ortlund, E.A., and Pathak, M.C. 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Sfh3, a member of the Sec14 protein superfamily. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**: 1239–1243. doi:10.1107/S174430911027096. PMID:22102037.
- Ren, J., Lin, C.P., Pathak, M.C., Temple, B.R., Nile, A.H., Mousley, C.J., et al. 2014. A phosphatidylinositol transfer protein integrates phosphoinositide signaling with lipid droplet metabolism to regulate a developmental program of nutrient stress-induced membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **25**: 712–727. doi:10.1091/mbc.E13-11-0634. PMID:24403601.
- Saidane, S., Weber, S., De Deken, X., St-Germain, G., and Raymond, M. 2006. *PDR16*-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1546–1562. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05196.x. PMID:16796687.
- Schaaf, G., Ortlund, E.A., Tyeryar, K.R., Mousley, C.J., Ile, K.E., Garrett, T.A., et al. 2008. Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Mol. Cell*, **29**: 191–206. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.026. PMID:18243114.
- Schnabl, M., Oskolkova, O.V., Holic, R., Brezná, B., Pichler, H., Zágorský, M., et al. 2003. Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur. J. Biochem.* **270**: 3133–3145. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03688.x. PMID:12869188.
- Schuh, A.L., and Audhya, A. 2012. Phosphoinositide signaling during membrane transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell. Biochem.* **59**: 35–63. doi:10.1007/978-94-007-3015-1_2. PMID:22374087.
- Shahi, P., and Moye-Rowley, W.S. 2009. Coordinate control of lipid composition and drug transport activities is required for normal multidrug resistance in fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**: 852–859. doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.012. PMID:19150512.
- Shinitzky, M. 1984. Membrane fluidity and cellular functions. In *Physiology of membrane fluidity*. Edited by M. Shinitzky. CRC Press, Boca Raton, Fla., USA. pp. 1–51.
- Simova, Z., Poloncova, K., Tahotna, D., Holic, R., Hapala, I., Smith, A.R., et al. 2013. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Pdr16p* restricts changes in ergosterol biosynthesis caused by the presence of azole antifungals. *Yeast*, **30**: 229–241. doi:10.1002/yea.2956. PMID:23606207.
- van den Hazel, H.B., Pichler, H., do Valle Matta, M.A., Leitner, E., Goffeau, A., and Daum, G. 1999. *PDR16* and *PDR17*, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J. Biol. Chem.* **274**: 1934–1941. doi:10.1074/jbc.274.4.1934. PMID:9890948.
- Yang, H., Tong, J., Leonard, T.A., and Im, Y.J. 2013. Structural determinants for phosphatidylinositol recognition by Sfh3 and substrate-induced dimer-monomer transition during lipid transfer cycles. *FEBS Lett.* **587**: 1610–1616. doi:10.1016/j.febslet.2013.04.009. PMID:23603387.
- Younsi, M., Ramanandraibe, E., Bonaly, R., Donner, M., and Coulon, J. 2000. Amphotericin B resistance and membrane fluidity in *Kluyveromyces lactis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1911–1916. doi:10.1128/AAC.44.7.1911-1916.2000. PMID:10858353.
- Yuan, Y., Zhao, W., Wang, X., Gao, Y., Niu, L., and Teng, M. 2013. Dimeric SFH3 has structural changes in its binding pocket that are associated with a dimer-monomer state transformation induced by substrate binding. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* **69**: 313–323. doi:10.1107/S0907444912046161. PMID:23519406.



Synergy between azoles and 1,4-dihydropyridine derivative as an option to control fungal infections

Zuzana Ježíková · Tomáš Pagáč · Barbora Pfeiferová · Helena Bujdáková · Stanislava Dižová · Iva Jančíková · Dana Gášková · Petra Olejníková

Received: 25 April 2017 / Accepted: 29 May 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract With emerging fungal infections and developing resistance, there is a need for understanding the mechanisms of resistance as well as its clinical impact while planning the treatment strategies. Several approaches could be taken to overcome the problems arising from the management of fungal diseases. Besides the discovery of novel effective agents, one realistic alternative is to enhance the activity of existing agents. This strategy could be achieved by combining existing antifungal agents with other bioactive substances with known activity profiles (combination therapy). Azole antifungals are the most frequently used class of substances used to treat fungal infections. Fluconazole is often the first choice for antifungal treatment. The aim of this work was to

study potential synergy between azoles and 1,4-dihydropyridine-2,3,5-tricarboxylate (termed derivative H) in order to control fungal infections. This article points out the synergy between azoles and newly synthesized derivative H in order to fight fungal infections. Experiments confirmed the role of derivative H as substrate/inhibitor of fungal transporter Cdr1p relating to increased sensitivity to fluconazole. These findings, plus decreased expression of *ERG11*, are responsible for the synergistic effect.

Keywords ABC transporter · Antifungal agents · Efflux · Fungal infection · Synergy

Introduction

Invasive fungal infections have emerged as an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. Although several new antifungal drugs have been licensed in recent years, fungal drug resistance is becoming a major concern during treatment of such patients. An understanding of the mechanism of resistance and its clinical impact is important while planning the treatment strategies.

Superficial fungal infections are common and are usually not life threatening. Invasive fungal infections (IFI) have a lower incidence but they are associated with high mortality in at-risk patients (Brown et al. 2012). When considering nosocomial bloodstream

Z. Ježíková (✉) · T. Pagáč · B. Pfeiferová · P. Olejníková
Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9,
812 37 Bratislava, Slovakia
e-mail: zuz.jezikova@gmail.com

H. Bujdáková · S. Dižová
Department of Microbiology and Virology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina,
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4, Slovakia

I. Jančíková · D. Gášková
Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics,
Charles University, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2,
Czech Republic

infections, the frequency of IFI has been increasing over the last two decades, which is also paralleled by changes in the pattern of the aetiological species (Pfaller and Diekema 2010). Although *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* remain predominant pathogens, other species of these two genera, as well as members of the zygomycetes, have gained increasing importance (Maschmeyer 2006).

However, despite an increase in the use of antifungal agents over the past two decades, the clinical outcome remains unsatisfactory (Ruhnke 2014). First, early and directed antifungal therapy cannot be implemented due to delays in fungal disease diagnosis. Antifungal drugs have also restricted routes of administration, spectrum of activity, and bioavailability (Denning and Hope 2010). Second, only a few antifungal agents are available and the efficacy of these drugs is challenged by toxicity and negative interactions with other prescribed agents. Third, extensive use of antifungal agents for therapeutic or prophylactic purposes tends to favour the emergence of drug resistance (Bowyer et al. 2011; Miceli and Lee 2011; Rodloff et al. 2011).

Several approaches could be undertaken in order to overcome the numerous problems arising from the management of fungal diseases. Besides the discovery of novel effective agents, one realistic alternative option would be to enhance the activity of existing agents. This strategy could be achieved by combining existing antifungal agents with other bioactive substances with known activity profiles (combination therapy).

Antifungal treatments for combating fungal infections are usually administered as monotherapies. With the few antifungal agents available for medical treatment and the inevitable development of resistance in fungal pathogens, combination therapy may be a future alternative to augment the efficacy of existing agents by synergistic effects. The main purpose of this work is to show effective antifungal activity of known antifungals with other bioactive molecules. Within the limited antifungal armamentarium, azole antifungals are the most frequent class used to treat fungal infections. These antifungals, such as fluconazole, are often the treatment option for many fungal infections as they are inexpensive, exhibit limited toxicity, and are available for oral administration. Chudik et al. (2000) described the synthesis of 1,4-dihydropyridine-2,3,5-tricarboxylate (termed derivative H in this study), an intermediate of nilvadipine

synthesis. Nilvadipine is known to be a Ca channel blocker. However, considering the substituents of derivative H, its role as Ca channel antagonist is not known (Chudik et al. 2000). The aim of this work is to study potential synergy between azoles and derivative H in order to control fungal infections.

Materials and methods

Strains and growth media

The *C. albicans* strains used in this study (Table 1) were generous gifts from D. Sanglard (Lausanne, Switzerland) (Sanglard et al. 1995, 1996, 1997). All strains were grown at 37 °C on YPD (yeast extract-peptone-dextrose) medium.

Microdilution assay

Antifungal susceptibility of model yeast *C. albicans* was evaluated by microdilution method (CLSI 1996). Microbes were cultivated for 16 h (in Sabouraud medium (SB; Biolife, Milano, Italy)) at 200 rpm. Cultures were adjusted to a cell density of 106 cells mL⁻¹ into SB. 198 µL of inoculated broth was transferred to each well of the 96-well flat bottom polystyrene microplate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) that contained 2 µL of pure (tested chromatographically) antifungal compounds dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich Ltd., Steinheim, Germany), at the final concentrations 0.1–5 µg fluconazole mL⁻¹, 0.01–1 µg voriconazole mL⁻¹ and 10–100 µg derivative H mL⁻¹. Either 2 µL of individual antifungal compound was used (fluconazole, voriconazole or derivative H) or the combination of azole (fluconazole resp. voriconazole) with derivative H. As control, 10 wells of each microtiter plate were filled with DMSO instead of tested antifungal drug. Final concentrations of DMSO never exceeded 1% (v/v) either in control or in treated samples. The inoculated microplates were incubated at 37 °C until reaching the stationary phase (Pelletier et al. 2000).

Sample preparation for diS-C₃(3) efflux measurement and fluorescence microscopy

Cells were prepared according to Gášková et al. (2013) with modifications. *C. albicans* strains were

Table 1 Collection of *C. albicans* strains used in this study

Strain	Genotype	References	Indication
CAF 2-1	ura3Δ::imm434/URA3	Fonzi and Irwin (1993)	
DSY 448	cdr1Δ::hisG-URA3-hisG/cdr1Δ::hisG	Sanglard et al. (1996)	<i>Δcdr1 CDR2+</i>
DSY 653	cdr2Δ::hisG-URA3-hisG/cdr2Δ::hisG	Sanglard et al. (1997)	<i>Δcdr2 CDR1+</i>
DSY 654	cdr1Δ::hisG/cdr1Δ::hisG	Sanglard et al. (1997)	<i>Δcdr1Δcdr2</i>

precultured in YPD medium (1% bactopectone, 1% yeast extract, 2% glucose) on a reciprocal shaker for 12 h and 37 °C. Then, 150 µL of the main culture was added to 20 mL of fresh YPD medium, incubated at 120 rpm for 11 h at 37 °C. The stationary cells were harvested by centrifugation (1000×g for 3 min) and washed twice in distilled water. After the second washing, they were resuspended in 10 mmol citrate-phosphate buffer L⁻¹ (pH = 6) to the desired concentration with OD₆₀₀ = 0.4 and kept on ice (Gášková et al. 2013).

DiS-C₃(3) efflux measurement

Aliquots of cell suspensions in citrate-phosphate buffer (3 mL, OD₆₀₀ = 0.1) were labeled with diS-C₃(3) (5 × 10⁻⁸ mol 3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide L⁻¹) (Sigma Aldrich Ltd., Steinheim, Germany) at room temperature. Fluorescence emission spectra of the diS-C₃(3) stained cell suspensions were measured using a FluoroMax-4 spectrofluorometer (Horiba JobinYvon) in intervals of 2–5 min (full emission scan duration 20 s) for 120 min, with gentle stirring before each measurement. Excitation wavelength was 531 nm, fluorescence emission range 560–590 nm, and scattered light was eliminated by orange glass filter with a cutoff wavelength of 540 nm. 2% (w/v) glucose was added after 60 min, derivative H after 80 min and CD cocktail was added after 150 min of staining with diS-C₃(3). This cocktail is composed of 10 µmol CCCP L⁻¹ as protonophore plus the lysosomotropic compound 10 µmol DM-11 L⁻¹ acting as an H⁺-ATPase inhibitor.

Fluorescence microscopy

Cell suspensions in citrate-phosphate buffer (1 mL, OD₆₀₀ = 0.4) were stained with 10⁻⁵ mol diS-C₃(3) L⁻¹ probe for 150 min, with 2% (w/v) glucose added after 60 min and derivative H (30, 50, 100 µg mL⁻¹) added after 80 min. Aliquots of cell suspensions were

pelleted by centrifuging, washed in deionized water, and 4 µL of samples were visualized by fluorescence microscopy (Szczepaniak et al. 2015).

RNA extraction and reverse transcription

C. albicans CAF 2-1 cells were precultured overnight in 15 mL of sterile SB medium at 37 °C under shaking. 1% inoculum (10⁶ cells mL⁻¹) was cultivated 3 h under the same conditions. The cells were pelleted by centrifuging and washed twice using saline solution. Yeast cells were resuspended in 5 mL of sterile SB medium with addition of 50 µL of fluconazole, derivative H, or the combination of both compounds, in order to achieve the desired concentration corresponding to MIC₅₀. The control sample was treated the same way with addition of DMSO instead of tested antifungal drug. Cell suspensions were incubated 1 h at 25 °C under shaking.

Cells were then harvested by centrifugation and yeast RNA was extracted using RNA purification kit (Thermo Scientific GeneJet RNA Purification kit, Thermo Fisher Scientific) based on using a lyticase for RNA isolation. Next, RNA was DNase treated using a DNase treatment of RNA kit (DNase I, RNase-free kit, Thermo Fisher Scientific). The extracted RNA was quantified using a ND-1000 UV-visible light spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The first strand of cDNA was synthesized by reverse transcription using a commercial RT kit (Thermo Scientific Maxime First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, Thermo Fisher Scientific) in regard to these conditions: 10 min at 25 °C → 15 min at 50 °C → 5 min at 85 °C (Jia et al. 2016).

Real-time PCR

Primers for the *ACT*, *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* genes were obtained from the study of Yu et al. (2012). Primers were used in concentration of 10 mmol L⁻¹. Real-time PCR was performed in 96-well plates with

SYBR[®]Green PCR Kit, QIAGEN. Real-time PCR mastermix (containing the primers) was added to the plates filled with cDNA diluted in ratio 1:100. Initial denaturation step was held for 10 min at 95 °C; followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C for primer annealing and 1 min at 58 °C as a synthesis temperature for all genes. The melting curve was analyzed after the amplification to ensure the absence of primer dimers. Dissociation cycle was 15 s at 95 °C, 15 s at 58 °C and 15 s at 95 °C. Level of gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method in respect to housekeeping gene *ACT1*. Samples were compared to the control represented by the standard strain *C. albicans* CAF 2-1 cultivated with DMSO as mentioned above. Each experiment was performed in 4 parallel samples (Nailis et al. 2010).

Results and discussion

Antifungal activity was expressed as the concentration of the antifungals inhibiting growth by 50% (MIC₅₀). These MIC₅₀ values were evaluated from the dose–response curves, where the percentage of growth is the function of concentration. MIC₅₀ values for *C. albicans* parental strain are shown in Table 2. The derivative H did not have antifungal activity when tested alone. However, when tested in combination with fluconazole or voriconazole, we can see that the sensitivity of the parental strain increased 10 times, indicating the synergy between two compounds (Table 2).

The elevated sensitivity of derivative H treated cells to azoles could probably be explained by the ability of derivative H to inhibit MDR mediated drug

efflux. This would lead to a dramatic increase of intracellular azole concentration and therefore increase their effect. In order to prove this hypothesis, we examined the inhibitory action of derivative H by means of the diS-C₃(3) assay. This method is useful for the detection of transport inhibition of a benchmark substrate, the diS-C₃(3) fluorescent probe, not only by *ScPdr5p* and *ScSnq2p* (Hendrych et al. 2009; Gášková et al. 2013) but also by *CaCdr1p* and *CaCdr2p* (Szczepaniak et al. 2015).

While the addition of derivative H (in all used concentrations) to glucose-activated $\Delta cdr1 CDR2+$ cells did not have any effect on the intracellular probe concentration (i.e. the staining was in all cases identical with the control), there was a concentration-dependent elevation of staining in the $\Delta cdr2 CDR1+$ strain, indicating elevation of intracellular probe concentration, to the level identical with the $\Delta cdr1\Delta cdr2$ strain, Fig. 1a. As the reaction of these cells to the diagnostic CD cocktail (Gášková et al. 2013) clearly demonstrated the absence of permeabilized cells, we can ascribe the lowering of the difference in staining of the $\Delta cdr2 CDR1+$ and $\Delta cdr1\Delta cdr2$ strains to the inhibitory action of derivative H, Fig. 1b. It is evident that the inhibition efficiency of 20 mg derivative H mL⁻¹ is comparable to that of enniatin B, a known Cdr1p inhibitor, and beauvericin, a known Cdr1 and Cdr2p inhibitor (Szczepaniak et al. 2015). To support this finding, we decided to visualize the accumulation of fluorescent probe inside the cells using a fluorescence microscope.

Fluorescence microscopy images showed accumulation/efflux of the tested probe. The wild type strain accumulated the fluorescent probe inside the cells,

Table 2 Sensitivity of *C. albicans* to tested compounds, expressed by MIC₅₀ values (µg mL⁻¹)

Strain	MIC ₅₀				
	F	F + H ₇₅ µg mL ⁻¹	H	V	V + H ₇₅ µg mL ⁻¹
<i>C. albicans</i> CAF 2-1	2.5	0.25	N	1	0.1
<i>C. albicans</i> $\Delta cdr1\Delta cdr2$	1	0.05	N	0.05	0.01

F fluconazole, V voriconazole, H 1,4-dihydropyridine-2,3,5-tricarboxylate, N non-active

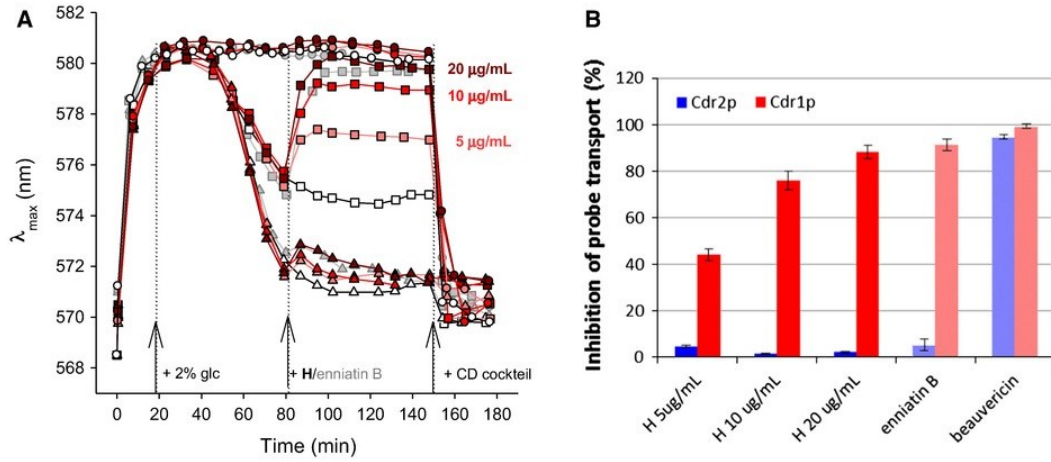


Fig. 1 Derivative H is an effective probe transport inhibitor of *C. albicans* Cdr1p, but not Cdr2p. **a** The concentration dependent effect of derivative H (added at $t = 80$ min) on staining of *Candida albicans* cells with the fluorescent probe diS-C₃(3) of $\Delta cdr2$ CDR1+ (squares), $\Delta cdr1$ CDR2+ (triangles) and $\Delta cdr1 \Delta cdr2$ mutant cells (circles). In addition, the effect of Cdr1p inhibitor enniatin B, 3 μ g mL⁻¹, is shown (gray). Left-hand arrow with dotted line indicates glucose addition. Middle-hand arrow with dotted line indicates the addition of derivative H or enniatin B. Right-hand arrow with dotted lines indicates the addition of diagnostic CD cocktail testing the permeabilization of the plasma membrane (10 μ M

CCCp L⁻¹ plus 10 μ M DM-11 L⁻¹). Three independent experiments of each condition are shown. **b** The extent of Cdr2p (blue) and Cdr1p (red) inhibition caused by derivative H. Complete inhibition of Cdr1p- and Cdr2p-mediated probe transport by beauvericin, 5 μ g mL⁻¹, (a known inhibitor of Cdr1p and Cdr2p) and inhibition of Cdr1p by enniatin B, 3 μ g mL⁻¹, (Cdr1p inhibitor) are taken as positive controls. The extent of substrate-mediated probe transport inhibition is calculated by dividing the equilibrium staining difference of treated cells by that of controls and subtracting this value from 100%

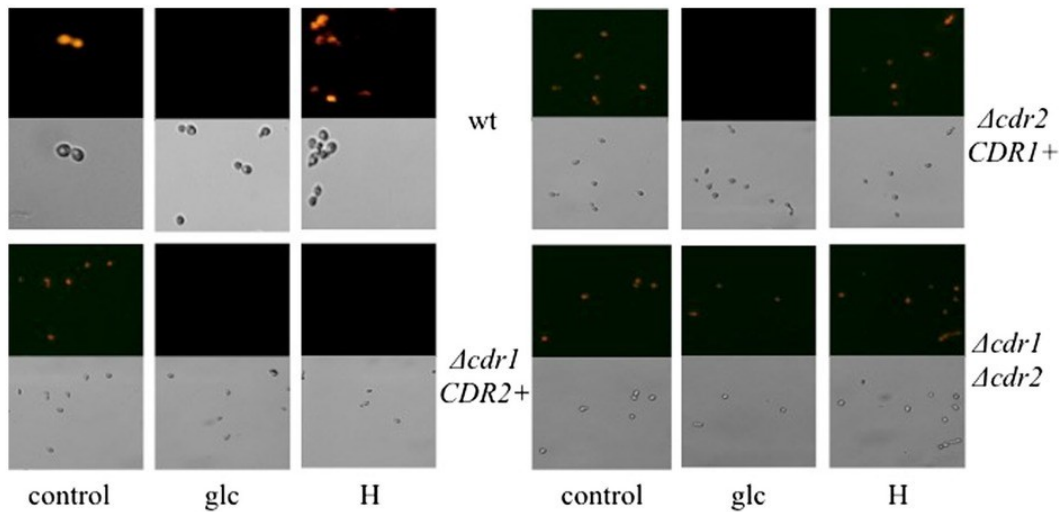


Fig. 2 Inhibition of diS-C₃(3) export by derivative H in *Candida albicans* cells. Staining was observed by fluorescence microscopy with glucose added after 60 min and derivative H after 80 min

whereas after addition of glucose there was an active efflux of the probe out of the cell. But as can be seen (Fig. 2) after the treatment with derivative H, the probe remained inside the cells. This observation suggested derivative H to be a potential inhibitor of efflux pumps. In comparison with the wild type strain, the deletion mutant $\Delta cdr1 CDR2+$ showed notable efflux of the carbocyanine probe after the addition of derivative H. $\Delta cdr2 CDR1+$ showed the same pattern as the wild type strain. These observations correlate also with our findings mentioned above and therefore we can assume that derivative H acted as inhibitor of Cdr1p. The final experiment serving as control demonstrated double deletion mutant $\Delta cdr1\Delta cdr2$ and its ability to accumulate/efflux tested probe. At the beginning there was a significant accumulation of diSC₃(3) inside the cells. However, after the addition of glucose there was no efflux observed. Derivative H had no influence on this process, as there is no efflux transporter present within this strain. These results suggested derivative H to be the inhibitor of Cdr1p.

To confirm the hypothesis mentioned above (derivative H being a substrate resp. inhibitor for efflux pumps), we decided to explore the antifungal activity on a double deletion mutant strain lacking both *CDR1* and *CDR2* genes. Antifungal activity showing the synergistic effect of azoles in combination with derivative H in the double deletion mutant is represented in Table 2. Surprisingly, in contrast to our expectation, the sensitivity of $\Delta cdr1\Delta cdr2$ to fluconazole in combination with derivative H was higher. In combination with azoles, we observed that the sensitivity of the double deletion mutant strain increased 20 times in the presence of fluconazole and 5 times in the presence of voriconazole, indicating the synergy between the two compounds. These results show that derivative H had no influence on the growth of the double mutant strain. Thus it didn't have any antifungal activity when tested alone.

These results therefore suggested a putative mechanism responsible for synergistic effect other than the presence of efflux transporters. This was supported by the results with the double deletion mutant, which has an increased sensitivity to azoles in combination with derivative H in absence of both *CDR1* and *CDR2*.

The main mechanisms of azole resistance in *Candida* species include mainly alterations in

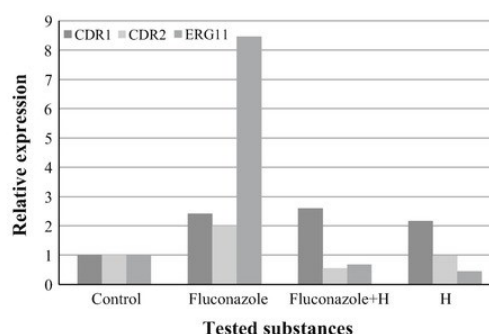


Fig. 3 Gene expression data from *Candida albicans* CAF 2-1 parental strain using real-time PCR. H = 1,4-dihydropyridine-2,3,5-tricarboxylate

ERG11 gene, which encodes the azole target enzyme, and upregulation of the *CDR1* and *CDR2* genes, which encode efflux pumps (Sanguinetti et al. 2005). However, fluorescence of derivative H proved its localisation inside the yeast cells (data not shown). The question is whether derivative H affects the expression of specific genes, for example *ERG11* (encoding sterol-14 α -demethylase). Given these observations, real time PCR was chosen as the method to unravel the next piece of the puzzle.

Figure 3 represents the impact of the tested drugs on the expression of *C. albicans* CAF 2-1 genes encoding PDR transporters (*CDR1*, *CDR2*) and sterol-14 α -demethylase (*ERG11*). *C. albicans* CAF 2-1 in absence of antifungal agents served as control. The expression of *CDR1* was higher in the presence of fluconazole, derivative H and in the presence of both substances, as compared to control. *CDR2* showed increased expression in the presence of fluconazole. The expression level of *ERG11* was increased 8 times in the presence of fluconazole, but decreased in the presence of derivative H and the combination of both agents, as compared to control. Notably, one of the most common mechanisms of resistance to azoles is increased expression of *ERG11*, the gene encoding the azole target. After the addition of derivative H to fluconazole, the expression of *ERG11* was still lower than in the control. The derivative decreasing the expression of *ERG11* might be the reason behind the increased sensitivity of yeasts to azoles (MIC₅₀ values in Table 2).

Conclusions

The constant emergence of fungal resistance brings the need for an improved understanding of the reasons responsible for this resistance and greater attention to methods to prevent and control these infections. With increasing number of resistant strains and the possibility to combine already known agents in order to avoid the discovery of new targets for existing compounds, combination therapy might be a future alternative to combat fungal infections. Therefore, this study has identified a synergy between azoles and the newly synthesized derivative H to fight fungal infections. Experiments confirmed the role of derivative H as substrate/inhibitor of fungal transporter Cdr1p. Antifungal activity, fluorescence microscopy as well as the measurement of transport of diS-C₃(3) were all consistent with this finding. Even though the efflux through ABC transporters is not the only mechanism behind the resistance of *C. albicans* to antifungal drugs, it is important to consider it as one of the possible ways along with decreased expression of target genes.

Acknowledgements This work was supported by Grant Agency of Slovak Republic (Grant No. 1/0371/16 and 1/0096/17) and APVV-0719-12. The contribution is also the result of the project: Research Center for Industrial Synthesis of Drugs, ITMS 26240220061, supported by the Research and Development Operational Programme funded by the ERDF.

Compliance with Ethical Standards This article is in compliance with ethical standards.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Bowyer P, Moore CB, Rautemaa R, Denning DW, Richardson MD (2011) Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*. *Curr Infect Dis Rep* 13:485–491
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4:165rv13
- Chudik L, Marchalín Š, Daich A, Decroix B (2000) New synthesis of the calcium antagonist *Nilvadipine*. *Res Adv Synth Org Chem* 1:1–7
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (1996) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeast; approved standard. VA Medical Center, Tucson. NCCLS document M27-A 17
- Denning DW, Hope WW (2010) Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol* 18:195–204
- Fonzi WA, Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134:717–728
- Gášková D, Plášek J, Zahumenský J, Benešová I, Buriánková L, Sigler K (2013) Alcohols are inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* multidrug-resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *FEMS Yeast Res* 13:782–795
- Hendrych T, Kodedová M, Sigler K, Gášková D (2009) Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the *S. cerevisiae* multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. *BBA-Biomembr* 1788:717–723
- Jia W, Zhang H, Li C, Li G, Liu X, Wei J (2016) The calcineurin inhibitor cyclosporine synergistically enhances the susceptibility of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by multiple mechanisms. *BMC Microbiol* 16:1–10
- Maschmeyer G (2006) The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *Int J Antimicrob Agents* 27:3–6
- Miceli MH, Lee SA (2011) Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. *Mycoses* 54:666–678
- Nailis H, Kucharíková S, Řičíková M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, Coenye T (2010) Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol* 10:1–11
- Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ (2000) Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *J Clin Microbiol* 38:1563–1568
- Pfaller MA, Diekema DJ (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1–53
- Rodloff AC, Koch D, Schaumann R (2011) Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res* 16:187–195
- Ruhnke M (2014) Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. *Clin Microbiol Infect* 20:11–18
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod J, Bille J (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2378–2386
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2300–2305
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143:405–416

- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G (2005) Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of anti-fungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 49:668–679
- Szczepaniak J, Lukaszewicz M, Krasowska A (2015) Detection of inhibitors of *Candida albicans* Cdr transporters using a diS-C3(3) fluorescence. *Front Microbiol* 6:1–6
- Yu LH, Wei X, Ma M, Chen XJ, Xu SB (2012) Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 56:770–775



Monitoring the activity of *Kluyveromyces lactis* multidrug resistance pump *K/Pdr5p* by diS-C₃(3) screening assay

Iva Jančíková¹, Dana Gášková¹ and Yvetta Gbelská²

¹Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic

²Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Science, Department of Microbiology and Virology, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

Multidrug resistance (MDR) is a ubiquitous biological phenomenon that occurs in living organisms to resist structurally and functionally different (many types of) cytotoxic compounds. Lower efficiency of these drugs is generally a consequence of overexpression of drug-efflux pumps localized in cell membranes that actively expel a wide range of structurally unrelated drugs from the cell. These efflux pumps are present in all type of cells, from bacteria to human. Pdr5p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*ScPdr5p*) and the human P-glycoprotein are among the best-studied eukaryotic MDR efflux pumps.

Although *S. cerevisiae* and *K. lactis* yeast are phylogenetically relatively close to each other (both species belong to the family *Saccharomycetaceae*), the knowledge regarding *ScPdr5p* contrasts with the relative paucity of data concerning other yeast MDR efflux pumps including the biotechnologically important *K. lactis*.

In preceding SMYTEs we introduced a diS-C₃(3) screening assay for monitoring the activity of two major pumps of *S. cerevisiae* – *ScPdr5p* and *ScSnq2p*. The assay is based on comparing the accumulation of the potentiometric fluorescent probe diS-C₃(3), a substrate of both pumps, in Pdr5p- or Snq2p-expressing cells versus the mutant, efflux pump-deficient cells.

Using the diS-C₃(3) screening assay in a set of isogenic *K/Pdr5p* mutant strains we found that the probe is also a substrate of this drug efflux pump. In the present study we investigated the influence of a growth phase and cultivation/incubation conditions on the activity of *K/Pdr5p*. We also determined the effect of known pump substrates on the ability of the pump to export the probe from the cell.

This work is supported by Grant Agency of Charles University in Prague, project n. 1072313 and the Grant Agency of SR APVV-0282-10.

Comparison of the inhibitory effect of various chemical stressors on the transport activity of Pdr5p from *S. cerevisiae* and *K. lactis*

Iva Jančíková¹, Yveta Gbelská² and Dana Gášková¹

¹Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic

²Department of Microbiology and Virology, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovak Republic

Multidrug resistance (MDR) is an evolutionary conserved cellular defence mechanism whose main function is to deal with potential toxicity of environmental stressors. Among the mechanisms that contribute to MDR in yeast, the overexpression of drug efflux pumps belonging to the ABC superfamily is the most frequent cause of resistance to cytotoxic compounds. To find compounds that inhibit the activity of the *S. cerevisiae* protein ScPdr5p, we have developed a fluorescence method for monitoring changes in the activity of the pump in intact cells. The method is based on the use of potentiometric fluorescent probe diS-C₃(3), which is a substrate of two major *S. cerevisiae* MDR pumps, ScPdr5 and ScSnq2p [1]. *K. lactis* has become an alternative model to the traditional yeast *S. cerevisiae* owing to its industrial applications (e.g. lactose fermentation, heterologous protein production) and metabolic peculiarities (Crabtree-negative, *petite*-negative yeast species). *K. lactis* is phylogenetically close to *S. cerevisiae*. We have found that the probe is also a substrate of KIPdr5p, the main MDR pump of *K. lactis*. Although ScPdr5p and KIPdr5p share 63.8% identity [2], the transport mechanism and substrate specificity may differ. In this study we tested various substrates of either pump for their ability to inhibit the diS-C₃(3) transport through these pumps.

This work is supported by Grant Agency of Charles University in Prague, project n. 10723.

References:

- [1] Čadek, R, Chládková, K, Sigler, K, Gášková, D. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1665**, 111-7.
- [2] Chen, X. J. (2001) *Journal of Bacteriology* **183**, 3939-48.



Differences in the arrangement of the Pdr5p multidrug transporter binding pocket of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*

Iva Jančíková¹, Jakub Zahumenský^{1,2}, Yvetta Gbelská³ and Dana Gášková¹

¹Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic

²Czech Academy of Sciences, Institute of Experimental Medicine, Department of Microscopy, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

³Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Science, Department of Microbiology and Virology, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

Multidrug resistance (MDR) is a phenomenon often responsible for failure of medical treatment. It is mediated by plasma membrane transporters expelling a variety of structurally and functionally unrelated drugs out of the cell. We found that the fluorescent probe diS-C₃(3) is a substrate of not only Pdr5p of *Saccharomyces cerevisiae* (*ScPdr5p*), but also of its less-explored *Kluyveromyces lactis* homologue (*KIPdr5p*). This enabled us to compare the ability of relatively simple azoles to competitively inhibit the Pdr5p-mediated efflux of the probe in both species. We found that azoles not only completely inhibit probe transport by *KIPdr5p*, but also compete with each other. This indicates that the probe and the used azoles are bound by the same site of the *KIPdr5p* binding pocket. On the other hand, the azoles' capacity to inhibit the probe transport by *ScPdr5p* displays saturating competitive character, indicating their partial cotransport with the probe. While the azoles bind to only one or two separate binding sites, the probe is able to bind to all three of them. Moreover, the bulky *ScPdr5p* substrate enniatin B, which effectively inhibits both probe and azole transport by the pump, has negligible effect on *KIPdr5p*. Our data indicates a tighter arrangement of the *KIPdr5p* binding pocket compared to that of *ScPdr5p*.