

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta
DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Adéla Vodáková

**Měření změn vnitrobuněčné koncentrace iontů
v mikroorganismech**

Fyzikální Ústav UK

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Chci z celého srdce poděkovat prof. RNDr. Jaromíru Pláškoví, CSc., že se mě ujal ve chvíli, kdy mě opustil původní vedoucí diplomové práce. Jeho rady, vedení a hlavně optimismus mají velkou zásluhu na pohodovém průběhu následujícího období, kdy jsem musela změnit zaměření práce. Dále děkuji Mgr. Ivě Doležalové za pomoc s prvními krůčky v mikrobiologické laboratoři, za její přátelský přístup a za to, že byla vždy ochotna poradit a podělit se o své zkušenosti. Velký dík také patří příteli Pepovi a celé mé rodině za podporu ve studiu i jinde.

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

V Praze dne 9.4.2013

Adéla Vodáková

Název práce: *Měření změn vnitrobuněčné koncentrace iontů v mikroorganismech*

Autor: *Bc. Adéla Vodáková*

Katedra/Ústav: *Fyzikální ústav UK*

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

Abstrakt: *Diplomová práce se zabývá měřením vnitrobuněčné koncentrace iontů v bakteriích *Escherichia coli* a kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* pomocí geneticky kódovaných fluorescenčních sond obsahujících zelený fluorescenční protein (GFP). V úvodu práce shrnuji známé poznatky o tomto proteinu a jeho spektrálních charakteristikách. Pro experimentální část práce byl vybrán senzor reagující na změny pH ve svém okolí změnou poměru intenzity fluorescence dvou pásů v excitačním spektru – poměrový pHluorin. Tato sonda byla otestována jak v bakteriálních, tak v kvasinkových buňkách. Byla sledována schopnost mikrobiálních buněk udržovat si stálou hodnotu cytosolického pH při odlišných vnějších podmínkách, jako je různé pH suspenze, přidání glukózy či KCl do suspenze. V práci je dále řešen problém odstranění příspěvku autofluorescence buněk ze signálu GFP při kalibraci a následném měření vnitrobuněčného pH. Úspěšně byla použita metoda synchronně skenované fluorescence pro potlačení nechtěných příspěvků. Při použití této metody navíc dochází k vylepšení poměru signálu k šumu a tím k zpřesnění odečítaných hodnot cytosolického pH.*

Klíčová slova: *fluorescenční sondy, GFP, pHluorin, synchronně skenovaná fluorescence, cytosolické pH*

Title: *The monitoring of intracellular ion concentrations in microbial cells*

Author: *Bc. Adéla Vodáková*

Department: *Institute of Physics UK*

Supervisor: *prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.*

Abstract: *The Master Thesis focuses on monitoring of intracellular ion concentrations in bacteria *Escherichia coli* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* using genetically encoded fluorescent probes with green fluorescent protein (GFP). Acquired knowledge about this protein and its spectral characteristics is summarized in the introduction. For experimental study a pH-sensitive sensor which displays a ratio change of two excitation fluorescence peaks – pHluorin – was chosen. This probe was tested in bacteria and yeast cells. The experiments concentrated on the ability of the cell to maintain a constant cytosolic pH under various conditions like different pH values of the suspension, addition of glucose or KCl to the suspension. Another topic discussed in the thesis is the elimination of the cell autofluorescence from the GFP signal. For this purpose the synchronous fluorescence scan technique was successfully used. I have found out that by using this method the measurements of cytosolic pH values are even more accurate thanks to the improved signal to noise ratio.*

Keywords: *fluorescent probes, GFP, pHluorin, synchronous fluorescence scan, cytosolic pH*

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1. Vnitrobuněčná koncentrace iontů, vnitrobuněčné pH	3
2.1.1. Pufrační kapacita cytosolu.....	4
2.1.2. Biologické membrány a membránový transport.....	6
2.1.3. Membránový potenciál, regulace vnitrobuněčné koncentrace iontů.....	7
2.2. Fluorescenční sondy a jejich použitelnost pro měření vnitrobuněčné koncentrace iontů	9
2.2.1. Syntetické fluorescenční sondy.....	10
2.2.2. Geneticky kódované fluorescenční sondy.....	11
2.3. Green fluorescent protein (GFP)	12
2.3.1. Struktura GFP.....	12
2.3.2. Spektrální charakteristiky fluorescence GFP.....	13
2.3.3. Protonový transfer v GFP.....	16
2.3.4. Faktory ovlivňující spektrální charakteristiky GFP.....	19
2.4. GFP jako geneticky kódovaná intracelulární sonda Me^{2+} a H^+	20
2.4.1. pHluorin.....	21
2.5. Autofluorescence kvasinkových buněk a metody jejího odfiltrování od signálu GFP	24
2.5.1. Filtry.....	25
2.5.2. Metody využívající dvou vlnových délek.....	26
2.5.3. Synchronně skenovaná fluorescence.....	26
2.5.4. Polarizace fluorescence.....	29
2.5.5. Zhášení autofluorescence.....	30
2.5.6. Fotochemické metody.....	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1. Použité kmeny buněk	32
3.2. Kultivace buněk	32
3.2.1. Kultivace bakteriálních buněk.....	33
3.2.2. Kultivace kvasinkových buněk.....	34
3.3. Použité pufry	35

3.4. Fluorescenční měření	36
3.4.1. Excitační fluorescenční spektra.....	36
3.4.2. Emisní fluorescenční spektra.....	37
3.4.3. Časově rozlišené měření poměru intenzit pásů.....	37
3.4.4. Synchronně skenovaná fluorescenční (SF) spektra.....	38
4. ZPRACOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH VÝSLEDKŮ	39
4.1. Výsledky experimentů provedených na bakteriích <i>E. coli</i>	39
4.1.1. Kalibrace odezvy pHluorinu.....	39
4.1.2. Pufrační kapacita cytosolu.....	42
4.2. Výsledky experimentů provedených na kvasinkách <i>S. cerevisiae</i>	45
4.2.1. Odstranění autofluorescence buněk a dalších příspěvků pozadí ze spekter pHluorinu.....	45
4.2.2. Kalibrace odezvy pHluorinu.....	48
4.2.3. Vliv různého pH suspenze na schopnost udržování stálého cytosolického pH.....	55
4.2.4. Vliv glukózy na cytosolické pH.....	57
4.2.5. Vliv KCl na cytosolické pH.....	58
5. ZÁVĚR	60

1. ÚVOD

V diplomové práci se zabývám studiem metod sledování vnitrobuněčné koncentrace iontů v mikrobiálních buňkách. Speciálně jsem se zaměřila na přímé pozorování změn intracelulárního pH, neboť udržování homeostáze hraje klíčovou roli ve schopnosti buňky přežít.

Jako modelový organismus byla vybrána za prokaryotní organismy gram-negativní bakterie *Escherichia coli*, za eukaryota pak kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Měření cytosolické koncentrace iontů v bakteriích *E. coli* lze využít pro studium funkce transmembránových kanálů, pórů a pump. V námi použitém mutantním kmeni transport do buňky probíhá pouze za pomoci transmembránového proteinu MntH (Manganese Proton-dependent Transporter). Jde o protein z rodiny membránových proteinů Nramp, které transportují dvojmocné kovy (Me^{2+}) za pomoci symportu s protony. Zástupci této rodiny se vyskytují u celé řady organismů – od bakterií přes rostliny, houby, nižší živočichy až po člověka. Jde o sekundárně aktivní transportéry a jejich klíčová fyziologická role je udržování homeostáze dvojmocných kovových iontů v organismu.

Pomocí měření změn vnitrobuněčné koncentrace iontů H^+ lze také studovat vliv depolarizace buňky na vnitrobuněčné pH. Membránový potenciál je hnací silou pro transport iontů, reguluje membránové proteiny a jako důsledek také reguluje pH uvnitř buňky. Na tento výzkum byly použity kvasinky *S. cerevisiae*.

Jedním z cílů této diplomové práce je vytvořit přehled již existujících fluorescenčních sond použitelných pro měření intracelulární koncentrace iontů a zhodnotit jejich použitelnost v mikrobiálních buňkách. Zaměřila jsem se zejména na neinvazivní fluorescenční sondy, neboť ty umožňují měření za fyziologických podmínek.

Jedněmi z takových sond jsou senzory obsahující zelený fluorescenční protein (GFP). Plazmid pro expresi tohoto proteinu se snadno zakomponovává do genomu použitých modelových organismů. Buňka sama poté sondu exprimuje. V rámci diplomové práce byla vypracována literární rešerše týkající se fotofyzikálních charakteristik fluorescence tohoto slibného fluorescenčního proteinu.

Posledním z témat řešených v rámci teoretické části práce je problém odstranění autofluorescence kvasinkových buněk ze signálu získaného při

fluorescenčním měření. Existuje několik metod separace fluorescenčního signálu sondy GFP od autofluorescence kvasinek. Vytvořila jsem jejich přehled a zhodnotila použitelnost jednotlivých metod pro konkrétní sondu používanou pro měření vnitrobuněčného pH.

Experimentální část práce nejprve navazuje na předchozí výzkumy na Fyzikálním ústavu UK sledováním transportu protonů přes protein MntH bakterií *E. coli* pomocí měření změn vnitrobuněčného pH. Dále byly provedeny experimenty sledující pufrací kapacitu cytosolu *E. coli* v závislosti na různém vnějším pH.

Na kvasinkách *S. cerevisiae* byla experimentálně testována možnost použití synchronně skenované fluorescence pro odstínění vlivu autofluorescence buněk a dalších parazitních signálů. V návaznosti byly za použití synchronní fluorescence provedeny experimenty sledující schopnost kvasinkových buněk udržet si stálé vnitrobuněčné pH při různých hodnotách okolního pH. Dále jsem pozorovala vliv zvýšení koncentrace K^+ iontů a vliv přidané výživy ve formě glukózy na cytosolické pH a pufrací schopnost kvasinkových buněk.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vnitrobuněčná koncentrace iontů, vnitrobuněčné pH

Vnitřní prostředí buňky je nehomogenní roztok obsahující velké množství iontů a molekul, které mají vliv na správné fungování biochemických pochodů. Tento roztok u prokaryotických organismů obsahuje RNA molekuly, ribozomy a kolísavý počet rozpustných enzymů. U eukaryot jde o vysoce organizovaný gel, v němž plavou organely.

pH roztoku je definováno jako:

$$pH = -\log(a_{H^+}) \quad (1)$$

a_{H^+} ... aktivita H^+ iontů ve vodě

pH nabývá hodnot 0 – 14, škála je pomyslně rozdělena na dvě části: kyselé pH ($pH = 0 - 7$) a zásadité ($pH = 7 - 14$); hodnotu $pH = 7$ označujeme za neutrální.

Vnitrobuněčné pH (pH_{in}) je tedy veličina, která by měla přímo ukazovat na množství volných protonů v cytosolu. Pokud však vypočteme objem cytosolu v průměrně veliké kvasinkové buňce, tak při $pH = 7$, vychází počet volných protonů v cytosolu buňky ne více než ~3000. Avšak v kvasinkové buňce jsou řádově milióny proteinových molekul, které mohou být ovlivněny pH_{in} . Koncentrace anorganických fosfátových molekul je také o 5 řádů vyšší než vypočtená koncentrace volných protonů. Vnitrobuněčné pH v biologických systémech je tedy lépe definovat jako kombinovanou relativní protonaci všech slabých kyselin a zásad v cytosolu, neboť všechny protony, které mohou disociovat od nějaké skupiny se ihned podílejí na protonaci jiné molekuly [1].

Udržování pH homeostáze je silně spjato se zajištěním dobrých životních podmínek pro buňku, neboť pH ovlivňuje mnoho biochemických procesů. V neutrálním pH jsou téměř všechny rozpustné intermediáty biosyntézy ionizovány, protože jsou fosforylovány či karboxylovány. Výjimkou jsou produkty fermentace nebo vyměšování jako je například CO_2 [2]. Toto zabraňuje metabolitům, aby opustily buňku přes nepolární vnitřek vnější membrány. Celulární procesy ovlivněné změnami pH zahrnují nejen transport molekul přes membrány, ale také ovlivňují rovnováhu $NAD^+/NADH$ a tím redoxní stav buňky [3]. Redoxní stav je dále

propojen se správnou funkcí enzymů a proteinů. Jediná protonace bazické skupiny enzymu v aktivním místě může změnit interakce se sousedními rezidui a tím i afinitu k substrátu [2]. Ovlivněna jsou také nabitá rezidua peptidových řetězců a tím balení proteinů. Vnitrobuněčné pH má dále nezanedbatelný vliv na konformační stabilitu proteinů (extrémní pH může vést až k jejich denaturaci) a interakce proteinů s jinými proteiny, lipidy a metabolity.

V organismech mají důležitou roli také další ionty. Životně důležitý je příjem manganu a železa, které jsou potřebné jako redoxní kofaktory buněk a přispívají k buněčným procesům jako je například syntéza DNA, transport elektronů a kyslíku či ochrana před oxidativním stresem [4]. Draselné ionty mají roli v regulaci velikosti buňky, udržování pH homeostáze, procesu syntézy proteinů a aktivace enzymů [5]. Jiné ionty, například Na^+ , jsou naopak pro buňku toxické, takže je nutné udržovat jejich vnitrobuněčnou koncentraci relativně nízkou [5].

2.1.1. Pufrační kapacita cytosolu

Cytosol je tvořen slabě kyselými a slabě zásaditými molekulami v buňce, jde tedy o komplexní pufr. Pufrační kapacita roztoku je definována jako [6]:

$$\beta = \frac{[A]}{\Delta pH} \quad (2)$$

Tato veličina udává množství silné báze či kyseliny A, které je nutné přidat do roztoku, aby se pH změnilo o jedna. Koncentrace [A] je ve vzorci (2) udávána v mol/l.

Pufrační kapacita je závislá na pH a je nejvyšší v okolí rovnovážné konstanty pK_a molekuly tvořící pufr. V buňce k pufrační kapacitě přispívá mnoho různých molekul s několika pK_a [1], [2], [6]. Za prvé jsou to proteiny – amino a karboxylové konce proteinových řetězců a nabitě skupiny některých peptidových reziduí. Další příspěvky pocházejí od metabolitů jako je NH_3 a fosfát se třemi rovnovážnými konstantami odpovídajícími rovnováze mezi stavy jednou, dvakrát a třikrát deprotonovanými. Hodnoty rovnovážných konstant těchto molekul jsou zaneseny v Tabulce I.

Tabulka I – Rovnovážné konstanty látek přispívajících k pufrací kapacitě buňky [2]

molekula	pK _a	molekula	pK _a
-COOH konec proteinů	3,1	Lys	10,0
-NH ₂ konec proteinů	8,0	Tyr	10,0
Asp, Glu	4,4	Arg	12,0
His	6,5	PO ₄ H ₂ ⁻	2,1
Cys	8,5	PO ₄ H ²⁻	7,2
NH ₃	9,2	PO ₄ ³⁻	12,7

Určení pufrací kapacity cytosolu v bakteriálních či kvasinkových buňkách lze dosáhnout rychlým okyselením suspenze s buňkami přidáním slabé kyseliny nebo báze na definovanou koncentraci $[A]_{tot}$. Tyto látky jsou schopny projít přes membránu v nenabitěm stavu a pak disociovat v cytoplazmě. Pokud používáme pufr, ve kterém platí $pH_{in} > pH_{ext}$, pak je vhodné použít kyselinu, protože ta disociuje s větší pravděpodobností uvnitř buňky ve vyšším pH než vně buňky. Množství disociované kyseliny a tedy i množství uvolněných protonů uvnitř buňky spočteme podle vztahu odvozeného v [7]:

$$[A]_{in} = \frac{K_a [A]_{tot} [H^+]_{ext}}{[H^+]_{in} (K_a + [H^+]_{ext})} \quad (3)$$

K_a disociační konstanta přidávané kyseliny

$[A]_{tot}$ celková koncentrace přidávané kyseliny

$[H^+]_{ext}$... množství protonů vně buňky

$[H^+]_{in}$ množství protonů uvnitř buňky

$[H^+]_{ext}$ a $[H^+]_{in}$ určíme ze známé hodnoty pH pufru a naměřené hodnoty pH_{in} .

Pokud se uvnitř buněk disociuje všechna prošlá kyselina, $[A]_{in}$ pak odpovídá koncentraci uvolněných protonů v cytosolu. Pro buněčné suspenze lze pak vztah (2) upravit, aby vyjadřoval pufrací kapacitu cytosolu buněk:

$$\beta = \frac{[A]_{in}}{\Delta pH} \quad (4)$$

Několik skupin se již zabývalo určováním pufrací kapacity bakteriálních i kvasinkových buněk. Tato schopnost závisí nejenom na pH vnějšího pufru, ale také na jeho typu. Marešová a kol. [8] určili tuto hodnotu u kvasinek v *S. cerevisiae* inkubovaných v citrát-fosfátovém pufru $\beta = 50 \pm 15$ mM na jednotku pH. U bakterií

byla tato studie provedena v rámci prací [7], [9]. Hodnoty pufrční kapacity naměřené v CP pufrch byly změřeny $\beta = 40 \pm 10$ mM a $\beta = 45 \pm 15$ mM na jednotku pH, při použití MES pufru je však pufrční schopnost buněk signifikantně vyšší: $\beta = 105 \pm 25$ mM na jednotku pH.

2.1.2. Biologické membrány a membránový transport

Všechny metabolické pochody probíhají uvnitř buněk. Jejich vnitřní prostor tedy musí být striktně oddělen od okolí. Toto ohraničení zajišťují biologické membrány. Biologická membrána v buňce plní hned několik významných funkcí: chrání buňku před vnějšími vlivy, udržuje vnitřní homeostázu, obsahuje receptory pro vnější podněty a tak umožňuje komunikaci s okolím, propouští potřebné látky dovnitř a odpadní látky ven.

Hlavním stavebním kamenem membrán je dvojná vrstva lipidů. Ty jsou otočeny nepolárními konci dovnitř a povrch membrány je tvořen polárními hlavičkami. Díky tomuto uspořádání je plasmatická membrána semipermeabilní. Je volně propustná pouze pro malé molekuly plynů jako jsou CO_2 , N_2 či O_2 a malé nenabitě polární molekuly jako je například voda či ethanol. Větší nenabitě polární molekuly (glukóza), ionty a nabitě molekuly (aminokyseliny, ATP) mohou skrz membrány procházet pouze za pomoci specifických transportních proteinů, které substrát aktivně transportují.

Podle energetické bilance lze transport dělit na pasivní, při kterém je využívána energie uschovaná v rozdílu elektrochemického potenciálu na opačných stranách bariéry, a aktivní, kterému je nutno dodat energii zvenčí.

Pasivní transportéry můžeme rozdělit za prvé na kanály a póry a za druhé na sekundárně aktivní transportéry. Kanály a póry umožňují difúzi ve směru elektrochemického gradientu transportovaných látek, tento transport bývá označován také jako usnadněná difúze. Nedochozí u nich k žádným nebo jen velmi malým konformačním změnám v průběhu transportního děje. Setkáváme se u nich pouze s uniportem, vždy je tedy transportován pouze jeden substrát.

Sekundárně aktivní transportéry oproti tomu transportují vždy více substrátů najednou. Jde buď o symportéry, kdy jdou dva různé substráty spolu z jedné strany membrány na druhou, anebo antiportéry, kdy se substráty na opačných stranách

membrány vzájemně vyměňují. Sekundárně aktivní transport vyžaduje poměrně velké konformační změny transportéru, z toho důvodu je tento proces pomalejší než usnadněná difúze. Energie pro transport je brána z gradientu elektrochemického potenciálu alespoň jedné z transportovaných látek. Tento gradient si buňky u některých látek udržují primárně aktivním transportem nebo metabolickými procesy.

Energie pro primárně aktivní transport je získávána z hydrolýzy ATP, dekarboxylace, methylace, redoxních reakcí (při buněčném dýchání) či absorpce světla (ve fotosyntéze). Mezi primárně aktivní transportéry patří zejména ATPázy, které spojují transport iontů s hydrolýzou ATP.

2.1.3. Membránový potenciál, regulace vnitrobuněčné koncentrace iontů

Cytosolické pH se v bakteriích i kvasinkách udržuje na přibližně neutrální hodnotě. U kvasinek byla experimentálně stanovena hodnota $\text{pH}_{\text{in}} = 7,2 \pm 0,2$ [3]. Tato hodnota je optimální pro život buňky a také růst kultury. Většina organel má také svou specifickou hodnotu pH, která je asociována s procesy probíhajícími v těchto organelách. Koncentrační rozdíly iontů tvoří gradienty, které jsou zdrojem energie pro pohon mnoha buněčných procesů. H^+ gradienty jsou zakomponovány v transportu živin pomocí symportu či antiportu. U bakterií se tyto přenašeče vyskytují na vnější membráně, u kvasinek i na membránách organel. Všechny iontové gradienty přes membránu dohromady tvoří membránový potenciál $\Delta\Psi$, který tvoří největší pohonnou sílu pro přenos iontů a živin.

V kvasinkách je $\Delta\Psi$ tvořen hlavně H^+ , K^+ a Na^+ elektrochemickým gradientem [2]. Protonový gradient je potřebný pro vznik $\Delta\Psi$, tento vzniklý potenciál na oplátku ovlivňuje aktivitu pump přispívajících k H^+ gradientu. Přes $\Delta\Psi$ jsou propojeny také gradienty různých iontů, neboť změna v gradientu jednoho typu iontů ovlivňuje celý $\Delta\Psi$ a tím i transport ostatních iontů. Tímto způsobem k regulaci pH_{in} přispívají také transportéry jednomocných i dvojmocných kovových iontů a naopak změny pH_{in} ovlivňují koncentrační rovnováhu těchto iontů.

V membráně kvasinek jsou dva hlavní typy protonových ATPáz (P-typ a V-typ), které vytvářejí $\Delta\Psi$ [2]. Vyskytuje se zde 16 ATPáz P-typu, z nichž dvě transportují protony. Tyto transmembránové proteiny velkou měrou přispívají k

udržování celkové homeostáze všech typů iontů. Největší příspěvek k regulaci pH_{in} v kvasinkách pochází od H^+ -ATPázy Pma1p (resp. Pma2p u *S. cerevisiae*). Dalšími regulátory jsou ATPázy V-typu, neboli vakuolární ATPázy. Ty jsou zodpovědné za okyselení několika typů organel – vakuol, endosomů, Golgiho aparátu a dalších. Na rozdíl od P-ATPáz je nenalezneme ve vnější membráně, ale v membránách organel. Regulují pH_{in} tím, že pumpují protony ven z cytosolu do lumen organel. Nejen, že tento proces ovlivňuje pH_{in} , ale také acidifikuje organelu a přispívá k navyšování elektrochemického gradientu potřebného pro membránový potenciál na organele.

Kromě ATPáz mají důležitou roli v udržování homeostáze kvasinek také kationt/ H^+ exchangery [2] přenášející monovalentní kationty přes membrány. Hlavním zdrojem energie těchto sekundárně aktivních transportérů je protonový gradient nabudovaný ATPázami. Nejčastěji jsou těmito proteiny přenášeny ionty draslíku a sodíku. Jak již bylo řečeno v úvodu kapitoly 2.1, K^+ ionty mají roli v regulaci mnoha biochemických procesů v buňce [5]. Na^+ je na druhou stranu pro buňku toxický, takže je nutné udržovat jeho vnitrobuněčnou koncentraci relativně nízkou.

Dalším faktorem ovlivňujícím pH homeostázi cytosolu je nízká extracelulární koncentrace glukózy [10] a dalších živin, jako je galaktóza nebo glycerol či ethanol. Hladovějící kvasinkové buňky mají pH_{in} pouhých 6,0. Po přidání glukózy do roztoku však začne jeho hodnota rovnoměrně růst a do 30 minut se ustálí kolem 7,3 [3].

V námi používaných mutantech bakterie *E. coli* jako zástupci eukaryotních organismů je situace jednodušší. Transport iontů probíhá pouze pomocí transmembránového proteinu MntH. Jde o transportní protein z rodiny Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) nacházející se v gamma proteobakteriích [4]. Nramp homology tvoří rodinu transportérů umožňujících průnik divalentních iontů do buněk za pomoci energie uschované v elektrochemickém gradientu iontů. Jedná se tedy o sekundárně aktivní transportéry. Hlavní biochemická role Nramp proteinů je udržování homeostáze dvojmocných kovů. Celá rodina sdílí stejnou transmembránovou topologii. N-konec se nachází v cytoplazmě, dále následuje 11 nebo 12 transmembránových segmentů, C-konec je pak exponován do periplazmy společně se smyčkami mezi doménami 1/2, 3/4, 5/6, 7/8 a 9/10. Celková transmembránová struktura proteinu z rodiny Nramp a transport dvojmocných kovů závislý na H^+ jsou funkčně propojeny. MntH transportuje Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} ,

Zn^{2+} . Tyto ionty se skrz membránu dostávají konkrétně symportem s protony. Žádný z Nramp proteinů zatím nebyl zkrystalizován, tedy 3D struktura těchto proteinů je neznámá. Z homologního modelování (homologie s SLC6) však vznikl návrh trojdimenzionální struktury [11]. Podle tohoto návrhu každá polovina proteinu MntH formuje dva trojhelikální shluky. Toto uspořádání bylo pozorováno i u jiných transmembránových transportních proteinů. Pravděpodobně jde o „rocker-switch“ mechanismus pohybu α -šroubovic během transportu substrátu. V rozhraní mezi dvěma „polovinami“ proteinu se během tohoto pohybu periplazmatické konce šroubovic oddálí zatímco cytoplazmatické konce se přibližují a naopak. Tím se střídavě zpřístupní vazebná místa na obou stranách membrány.

2.2. Fluorescenční sondy a jejich použitelnost pro měření vnitrobuněčné koncentrace iontů

Fluorescenční sonda je látka reagující na změnu vnějšího parametru změnou ve svém excitačním či emisním spektru nebo kvantovém výtěžku, resp. střední době života. Fluorescenční značky se široce používají při studiu biologických membrán: při pozorování membránového potenciálu, určování koncentrace elektricky nabitě sondy v závislosti na změnách potenciálu na membráně, při studiu interakcí látek s membránou, viskozity, fluidity, doménové struktury a teplotních fázových přechodů membrány nebo membránového transportu [12], [13], [14]. Fluorescenční sondy mohou sloužit jako indikátory koncentrace či distribuce iontů uvnitř buněk nebo jednotlivých organel [15]. Pomocí fluorescenční mikroskopie je možné také zobrazování tkání, buněk i organel. Tyto značky tak nacházejí široké uplatnění ve fyziologických studiích, mapování biochemických drah různých metabolitů nebo imunologických testech [15], [16].

Určení intracelulárního pH pomocí fluorescenčních sond je možné pouze tehdy, pokud je sonda lokalizovaná v cytoplazmě a ne v organelách s nízkým pH, jako jsou například vakuoly [17]. Při vývoji nového senzoru jsou tedy velice důležité studie ukazující distribuci sondy v buňce.

Fluorescenční senzory lze rozdělit do dvou kategorií: syntetické, které jsou připraveny v laboratoři a poté vpraveny do cílových buněk, a geneticky kódované,

kteře jsou vhodnou mutací genomu pokusných organismů exprimovány přímo uvnitř buněk.

2.2.1. Syntetické fluorescenční sondy

Velikým problémem synteticky připravených fluorescenčních sond je nutnost poměrně náročné manipulace s buňkami při transportu látky do buněk, což znesnadňuje experiment, jehož výsledek do značné míry závisí na použité metodě obarvení kolonií. Nejhůře se tento úkol splňuje u gram-negativních bakterií. Vnější membrána je pro větší molekuly nepropustná. Další bariérou je peptidoglykan v periplazmatickém prostoru. Některá barviva mohou být i záporně nabitá, a tedy při průniku membránou musí jít proti membránovému potenciálu.

Odezva fluorescenčního senzoru by neměla být závislá na množství fluoroforu v buňkách. Jelikož množství sondy přítomné v buňce se těžko kontroluje, bylo potřeba nalézt jiný způsob korekce signálu na koncentrační rozdíly vzorků. Nejvhodnější jsou sondy, u nichž lze pozorovat spektrální charakteristiku nezávislou na koncentraci fluoroforu, například poměr intenzit fluorescence při dvou různých emisních či excitačních vlnových délkách.

Pro účely měření vnitrobuněčného pH bylo vytvořeno množství sond odvozených od fluoresceinu. Jde o karboxylovou kyselinu obsahující několik aromatických jader s velice intenzivní fluorescencí. Kromě klasického měření intenzity signálu lze za pomoci derivátů fluoresceinu určit pH také měřením doby života fluorescence, která je pH-dependentní [18].

S myšlenkou signálu nezávislého na koncentraci sondy v buňkách byla vytvořena sonda s fluorochromem seminaphthorhodafluor (SNARF) [17]. V emisním spektru této sondy se nachází dva pásy na odlišných vlnových délkách se vzájemně inverzní závislostí na pH. U sondy tohoto typu tedy lze určit pH z poměru intenzity fluorescence změřené na dvou vlnových délkách, a to nezávisle na aktuální koncentraci fluorochromu.

Dalším senzorem umožňujícím poměrové měření je polyamino-karboxylová kyselina Fura-2. V diplomové práci L. Beranové [19] byly provedeny pokusy o obarvení bakterií E.coli pomocí této sondy. Jako slibné se zdálo použití elektroporačních metod. Po optimalizaci tohoto postupu byl vidět jasný vliv přidání

dvojmocných kovových iontů na excitační spektrum sondy. Změna tohoto spektra však byla pozorována i u negativní kontroly. Během elektroporace tedy pravděpodobně dochází k narušení membrány a ionty pak procházejí i jinudy než přes transportní protein MntH studovaný v této práci. Barvivo se také mohlo dostat pouze do periplazmatického prostoru. Další možností obarvení buněk je použití derivátu sondy volně procházejícího přes membránu, v tomto případě se používá acetoxymethylester sondy (Fura-2AM). Bohužel ani tento přístup nebyl úspěšný. Buňky nebylo možné obarvit ani po odstranění povrchových struktur bakterií. Neaktivní derivát sondy Fura-2AM sice do sféroplastů prochází, avšak pravděpodobně dále nedochází k plnému rozložení acetoxymethylesteru. Po odstranění povrchových struktur buňky již také nejde o fyziologický model.

Přechozí odstavec ilustruje hlavní nevýhodu synteticky připravených sond. Z tohoto důvodu se ve své práci zabývám spíše sondami geneticky kódovanými, u kterých odpadá problém transportu na správné místo v buňkách.

2.2.2. Geneticky kódované fluorescenční sondy

Výše popsané problémy můžeme vyřešit použitím geneticky kódovaných fluorescenčních sond. Tyto biosenzory jsou exprimovány přímo v cytosolu buňky. DNA kódující gen pro tvorbu senzoru je do buněk přenesena pomocí vhodného vektoru, kterým může být plasmid, virální DNA, či bakteriofág. Navázáním cizí DNA na vektor vznikne rekombinantní DNA, která je pak do cílových buněk přenesena například v liposomech, elektroporací nebo pomocí teplotního šoku. Pomocí rekombinantní DNA lze klonovat delší fragmenty, ale lze ji použít i pro bodové mutace.

Velikou skupinou geneticky kódovaných sond jsou senzory odvozené od zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Podrobnější popis tohoto proteinu a jeho derivátů je uveden v následující kapitole.

2.3. Green Fluorescent Protein (GFP)

Zelený fluorescenční protein (GFP) byl objeven v medúze *Aequorea victoria* žijící ve studených vodách Tichého oceánu. Tato medúza obsahuje bioluminiscenční

protein aequorin emitující modré světlo. Tímto zářením je excitován zelený fluorescenční protein, který pak emituje v zelené části viditelného spektra. Pokud je GFP extrahován a ozářen slunečním světlem, absorbuje v ultrafialové oblasti a vyzářuje dlouhovlnnější zelené světlo [20], [21], [22], [23].

2.3.1. Struktura GFP

Přesnému určení struktury GFP se věnovalo mnoho krystalografických studií. Jako první divoký typ GFP popsal Shimomura roku 1979 [20]. Krystalovou strukturu pak publikoval Yang et. al roku 1996 [24].

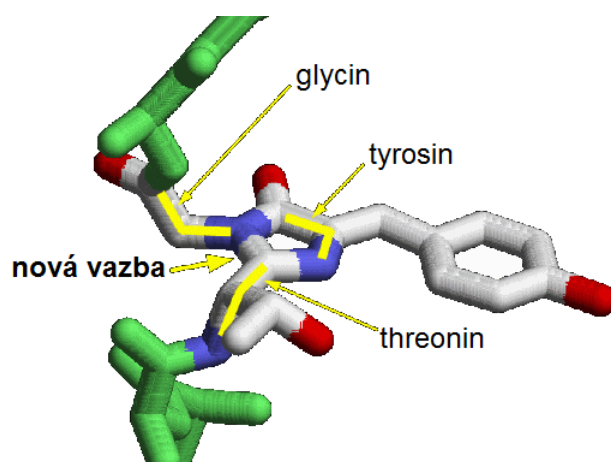


Obr.2.1 – Struktura zeleného fluorescenčního proteinu, převzato z [25].

Divoký typ GFP je stabilní, proteolýze odolný jednovláknový řetězec sestavený z 238 reziduí s molekulovou vahou 27 kDa [23]. Proteinový řetězec je tvořen jedenácti antiparalelními β -listy, které se skládají do cylindrického barelu s jednou α -šroubovicí vedoucí vnitřkem. Na vrchní části válce jsou 3 krátké šroubovice a zespodu barelu jeden velice krátký helikální segment tvoří jakousi pokličku. Barel je téměř perfektní válec o délce 42 Å a průměru 24 Å [26]. Struktura kostry GFP je zobrazena na Obr.2.1.

Chromofor je tvořen post-translační autokatalyckou cyklizací třech aminokyselinových reziduí peptidového řetězce, a to Gly67, Tyr66 a Ser65 (nebo

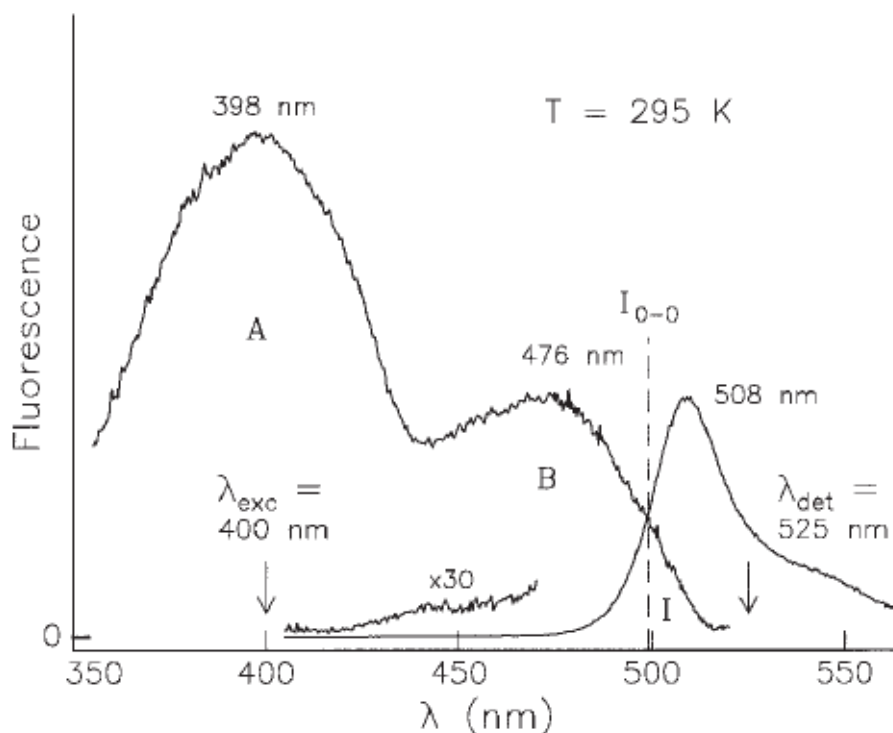
v některých mutantech Thr65) [23], [24], [26], [27], [28] (viz Obr.2.2). Chromofor je umístěn uprostřed barelu a jeho rovina svírá s osou symetrie barelu 60°. Je zcela odstíněn od okolního rozpouštědla. Toto je pravděpodobně důvod velmi malého Stokesova posuvu emise vůči excitaci, velkého kvantového výtěžku fluorescence, neschopnosti O₂ ani jiných látek zhaset excitovaný stav a relativně velká rezistence chromoforu vůči titraci na vnější pH [26], [28]. Denaturace tohoto proteinu se objevuje až při teplotě 76°C [23]. Vysoký kvantový výtěžek fluorescence je umožněn právě díky ochraně peptidovým řetězcem. Pokud by chromofor nebyl takto izolován, molekuly vody by mu po absorpci fotonu energii okamžitě odebraly.



Obr.2.2 – Struktura chromoforu GFP, převzato z [27]

2.3.2. Spektrální charakteristiky fluorescence GFP

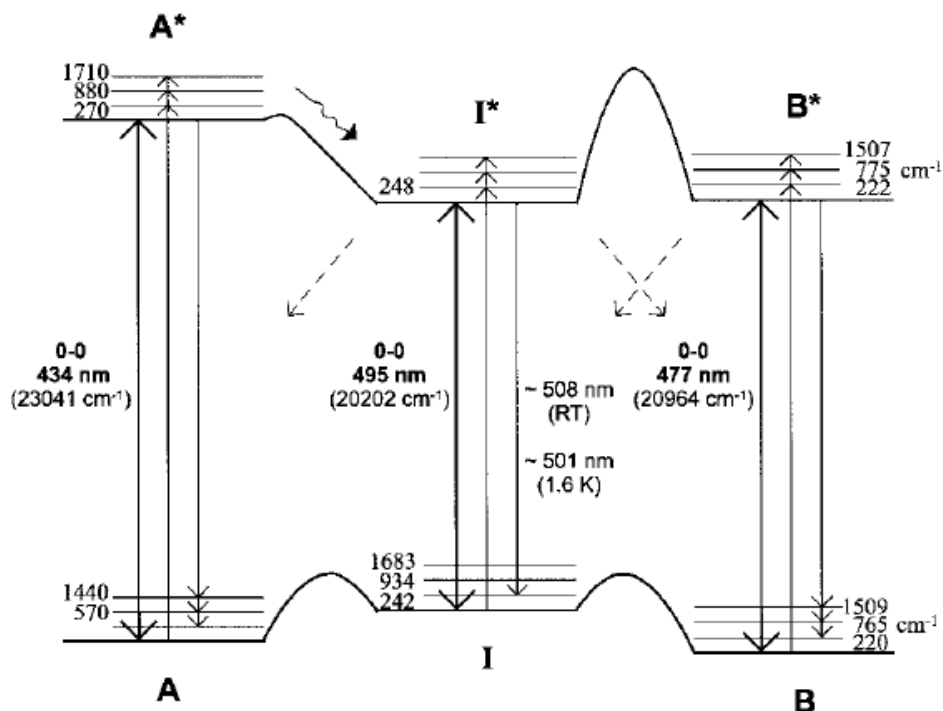
Divoký typ GFP má jedno maximum v emisním fluorescenčním spektru na vlnové délce 508 nm a dvě excitační maxima na 395 nm a 475 nm [25], [29], některé prameny [30], [31] uvádějí 398 nm a 478 nm (Obr.2.3). Relativní amplitudy těchto dvou maxim jsou citlivé na okolí a historii iluminace. Existují dvě různé formy chromoforu odpovídající těmto dvěma absorpčním maximům, a to neutrální fenolová, značená v literatuře [31] jako forma A, a anionická fenolátová, označovaná jako forma B. Liší se od sebe pouze přítomností či absencí protonu v OH skupině navázané na aromatickém kruhu Tyr66 nacházejícím se v chromoforu GFP. Mezi formami A, B je ještě přechodná forma I, která stejně jako B obsahuje deprotonovaný chromofor.



Obr.2.3 – Excitační a emisní fluorescenční spektrum divokého typu GFP při teplotě 295 K. Převzato z [31].

V GFP dochází k fotokonverzi zahrnující protonový transfer pomocí sítě vodíkových můstků popsané v kapitole 2.3.3 od excitované hladiny neutrální formy A^* k také excitované formě I^* . Tento transfer protonu je zodpovědný za fluorescenci GFP. Bylo zjištěno, že k emisi fluorescence dochází ze stavu I^* [31], a to s maximem na vlnové délce 508 nm. Creemers a kol. [31] navrhli energetické schéma těchto tří fotokonverzibilních forem u divokého typu GFP (Obr.2.4). Anionická forma (B) má při teplotě 295 K základní hladinu o trochu níže než forma neutrální (A). Základní hladina formy I musí ležet o několik set cm^{-1} výše, jelikož forma I je velice málo populovaná a za nízkých teplot není populovaná vůbec. Energetické bariéry pro přechody mezi formami jsou různé. Nejnížší je pro nezářivý přechod $A^* \rightarrow I^*$. Při excitaci chromoforu světlem o vlnové délce 397 nm se objevuje po 120 fs velmi slabé spektrum na vlnových délkách 440 – 460 nm příslušející přímé emisi $A^* \rightarrow A$. Populace A^* pak v řádu pikosekund klesá ve prospěch formy I^* [23], [32]. Poté následuje mnohem intenzivnější zářivý přechod $I^* \rightarrow I$. Naopak největší bariéra musí být překonána při přechodu $B^* \rightarrow I^*$, její výše je nejméně 2000 cm^{-1} (resp. cca 0,02 eV, přičemž při teplotě 300 K je $k_B T = 0,026 \text{ eV}$). Z tohoto důvodu je nezářivá konverze $B^* \rightarrow I^*$ prakticky zanedbatelná a excitace do B^* neindukuje

žádnou emisí z I*. Po vyexcitování chromoforu do stavu B* tedy dochází k zpětné emisí B*→B. Jelikož si jsou stavy B* a I* podobné, rozdíly mezi emisními pásy pocházejícími od konverze B*→B a I*→I jsou velmi malé. Zatímco tedy v excitačním fluorescenčním spektru pozorujeme dvě maxima (A→A*, B→B*), v emisním spektru se vyskytuje pouze jeden (A*→I* a následně vyzáření I*→I splývající s přechodem B*→B).



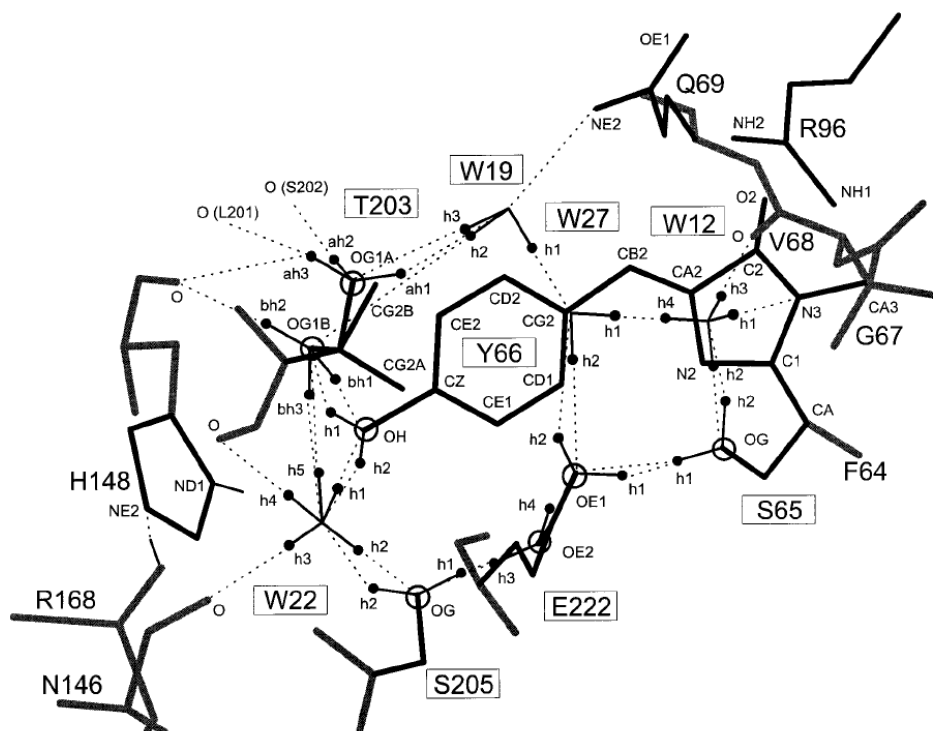
Obr.2.4 – Energetické schéma forem A, I, B divokého typu GFP. Zobrazeny jsou elektronové a vibrační přechody (v cm⁻¹). Čárkované diagonální šipky ukazují fotoindukované nezářivé přechody. Jediná fotokonverze mezi excitovanými stavy je A*→I*. Převzato z [31].

Další důležitou spektrální charakteristikou GFP je polarizace jeho fluorescence po excitaci lineárně polarizovaným světlem [33]. GFP je relativně velká molekula (27 kDa) s fluoroforem rigidně uzavřeným v barelu. Z toho důvodu v rozpouštědle rotuje jen velmi pomalu ve srovnání s dobou života jeho fluorescence. Swaminathan a kol. [34] určili dobu života fluorescence GFP jako 2,9 ns ve vodě a 2,6 ns v buněčné cytoplazmě, což je o řád rychlejší, než je příslušný rotačně korelační čas – 20 a 36 ns. Stupeň polarizace GFP byl změřen jako:

$$P = \frac{I_{kolma} - I_{rovnob} \text{ \textit{ě}zná}}{I_{kolma} + I_{rovnob} \text{ \textit{ě}zná}} = 0,398 \text{ [35].}$$

2.3.3. Protonový transfer v GFP

Charakter excitačního spektra je tedy vysvětlován existencí dvou možných protonačních forem chromoforu GFP uzavřeného v barelu proteinového řetězce, mezi kterými dochází ke konverzi zahrnující přenos protonu ($A^* \rightarrow I^*$). V následující kapitole shrnuji dosud známé poznatky o tomto transferu.

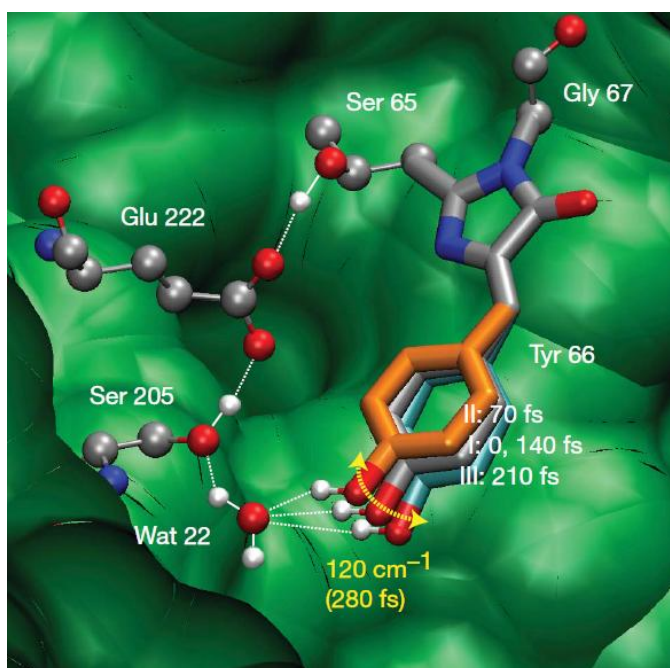


Obr.2.5 – Síť vodíkových můstků v okolí fluoroforu v divokém typu GFP. Obrázek ukazuje pozice těžkých atomů získaných z RTG analýzy [25] a modelované pozice vodíkových atomů tak, aby byla síť vodíkových můstků optimální. Převzato z [36].

Jedna strana molekuly chromoforu je otevřena k veliké kavitě uzavřené od okolního solventu. Tato dutina obsahuje 4 molekuly vody, které tvoří vodíkové můstky s bočními rezidui peptidového řetězce [36] (Obr.2.5). Rovnováha mezi protonovanou a deprotonovanou formou je ustanovena pomocí této sítě vodíkových můstků (Obr.2.5), která dovoluje přenos protonu mezi chromoforem a sousedními bočními řetězci proteinu [25]. Jde zejména o rezidua Ser65, Gln69, Arg 96, Thr203, Ser205 a Gln222 [23], [32], [36]. Největší úroveň konektivity má molekula vody

označovaná W22, tvoří vodíkové můstky s pěti okolními rezidui peptidového řetězce.

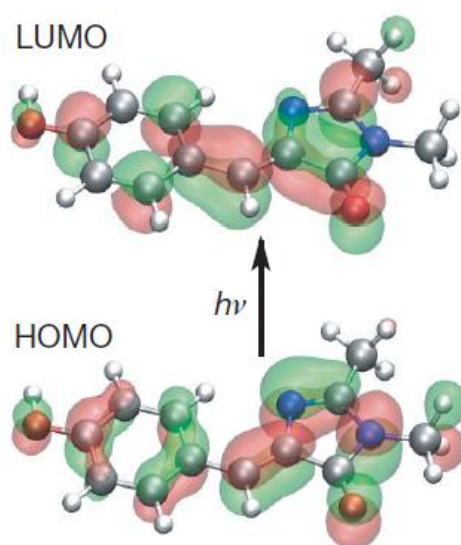
Avšak k přenosu protonu nedochází ihned po excitaci chromoforu, tento transfer se objevuje až na škále 5 – 20 ps. Je tomu tak proto, že geometrie sítě vodíkových vazeb v neexcitovaném stavu není pro přenos protonu optimalizovaná. Jevům předcházejícím protonovému přenosu se věnuje práce provedená Fangem a kol. [32].



Obr.2.6 – Kývavý mód rezidua Tyr66 v chromoforu GFP, díky kterému dojde k přiblížení protonu na fenolovém kruhu Tyr66 k vodě W22. Tři pozice fenolového kruhu (šedá (I) v 0 a 140 fs, 0°; oranžová (II) v 70 fs, +10°; světle modrá (III) v 210 fs, -10°) ilustrují pohyb v čase. Úhel +10° (struktura II) představuje optimální geometrii pro vodíkový můstek mezi fenolovým H⁺ a W22. Převzato z [32].

Po fotoexcitaci je impulzivně indukován nízkofrekvenční kývavý mód (Obr.2.6), který způsobí vyhoupnutí fenolového kruhu ven z originálně planární struktury. Tato konformační změna posouvá proton na fenolovém kruhu blíže k molekule vody W22 a tím se zesiluje již existující vodíková vazba. Doba života tohoto módu je pouze několik ps, tedy nevydrží až do dokončení přenosu protonu. Evoluce sítě vodíkových můstků v prvních pikosekundách po excitaci však usnadňuje posun v elektronové hustotě a rovnovážných pozicích jader. Změna

rozložení elektronové hustoty je spojena s excitací z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu (highest occupied molecular orbital – HOMO) do nejnižšího nezaplňného (lowest unoccupied molecular orbital – LUMO) [30], [32], [36]. Tento proces zahrnuje omezenou migraci elektronu z fenolového na imidazolinový kruh s přemostěním vazeb mezi těmito dvěma kruhy (Obr.2.7). Přesunem elektronu se snižuje pK_a rezidua Tyr66 a proton na fenolovém kruhu se stává kyseljším. Díky tomuto efektu se zesiluje vodíková vazba mezi Tyr66 a W22 a tím se vytváří vhodnější podmínky pro kýžený přenos protonu.



Obr.2.7 – Změny rozložení elektronové hustoty po excitaci ozářením. Je zde vidět přemostění vazby mezi fenolovým a imidazolinovým kruhem, které umožňuje přesun elektronu od prvního jmenovaného k druhému. Převzato z [32].

Po těchto úvodních malých konformačních změnách chromoforu dochází k přenosu protonu pomocí zesílené sítě vodíkových můstků. Scharnagl a kol. ve své práci [36] navrhl model průběhu translokace protonu v GFP. K jeho přenosu by mohlo docházet v rámci série termálně aktivovaných přeskoků, kdy proton lokalizovaně skáče mezi sousedními místy sítě vodíkových můstků mezi Tyr66 jako donorem a Gln222 jako finálním akceptorem. Tuto hypotézu podporuje také fakt, že elektronově excitovaný Tyr66 je silným protonovým injektorem a Gln222 naopak velice ochotně proton akceptuje (u posledního skoku je $\Delta G \ll 0$).

Podle známých rentgenových struktur různých variant GFP je zmíněná síť vodíkových můstků přítomna v protonačním stavu A, v anionickém stavu B je

porušena [23]. Proto nedochází ke konverzi mezi těmito dvěma stavy. Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, ze stavu A^* však dochází k přenosu protonu v excitovaném stavu do anionické formy I^* , která je velice podobná formě B^* . U této formy je však potřebná síť vodíkových můstků neporušena. Po vyzáření $I^* \rightarrow I$ se stav I vyvine pomocí zpětného transferu protonu [23] zpět do stavu A , jehož základní energie je o 7,6 kJ/mol níže.

2.3.4. Faktory ovlivňující spektrální charakteristiky GFP

Fluorescenční charakteristiky GFP může ovlivnit několik faktorů. Jedním z nich je pH. Fluorescence divokého typu GFP je stabilní v rozmezí pH 6 – 10 [37]. V kyselějším prostředí kvantový výtěžek fluorescence chromoforu klesá. Tato závislost je odlišná pro různé mutanty odvozené od GFP. Většina z nich není vůči pH tak stabilní jako divoký typ a intenzita jejich fluorescence klesá při pH nižším než 7.

Na tvar excitačního i emisního spektra má samozřejmě vliv také teplota. Spektra se s klesající teplotou stávají celkově užšími a strukturnějšími [31]. Při ochlazení GFP až na teplotu 1,6 K se krátkovlnný pás v excitačním spektru přesouvá o zhruba 10 nm k vyšším a dlouhovlnný o pár jednotek nm směrem k nižším vlnovým délkám. Za pokojové teploty a neutrálního pH má vyšší intenzitu pás na ~397 nm, při velkém snížení teploty se větší část fluorescence přesouvá na krátkovlnnější excitační pás příslušející deprotonované formě chromoforu. Tento jev potvrzuje, že tato forma má o trochu nižší energii základní hladiny (viz kapitola 2.3.2).

Ozařování divokého typu GFP může v čase způsobit dvě odlišné spektrální změny – fotoizomerizaci, kdy signifikantně klesá excitační pás na 395 nm a zároveň roste pás na excitační vlnové délce 475 nm, nebo fotovybělení způsobující rovnocenný pokles intenzity obou pásů [21]. Fotoizomerizace dominuje při excitaci v UV oblasti světelného spektra, zejména při osvětlení v rozmezí vlnových délek 280 – 395 nm. K tomuto jevu však dochází až do excitace na 490 nm [37]. Dochází k UV-indukované změně v konformaci proteinu, která zvýhodňuje deprotonovanou formu chromoforu. Po dokončení procesu fotoizomerizace nebo po osvětlení na 475 nm se u GFP objevuje velice pomalé fotovybělování. Citlivost GFP na tento jev je méně než poloviční oproti jiným fluoroforům (jako je například fluorescein).

Důvodem relativně vysoké odolnosti GFP vůči vybělování je jeho vhodné umístění uvnitř proteinové kapsle.

2.4. GFP jako geneticky kódovaná intracelulární sonda Me^{2+} a H^+

GFP je široce využíván ve vědeckém výzkumu jako vnitrobuněčný senzor. Je ideální pro zobrazování buněk a organel či pozorování metabolických drah daného substrátu značeného GFP. V mém případě jej používám jako fluorescenční sondu vnitrobuněčné koncentrace iontů. Dnes již existuje mnoho uměle připravených mutantů, které emitují na různých vlnových délkách ve viditelné oblasti. Výhoda senzorů založených na GFP je jejich neinvazivnost. Pro měření s GFP jsou buňky geneticky modifikovány tak, aby docházelo k expresi proteinu přímo v buněčném cytosolu.

Pro použití GFP jako fluorescenčního senzoru indikujícího změny v koncentraci iontů v cytosolu buněk se používají dva základní typy geneticky kódovaných sond. První typ je založen na nezářivém Försterově rezonančním přenosu energie (FRET) mezi dvěma mutanty GFP s různou vlnovou délkou emise. Přenos energie mechanismem FRET silně závisí na vzdálenosti donoru a akceptoru, jeho kvantový výtěžek klesá se šestou mocninou této vzdálenosti. Této skutečnosti využívá první typ sond na bázi GFP. Tyto senzory se typicky skládají ze dvou variant GFP o různých emisních vlnových délkách a spojky s vazebným místem pro testovaný ligand, například dvojmocný kovový iont. Přítomnost iontu změní konformaci systému, čímž se změní vzdálenost mezi fluorofory a tím se efektivně zvýší kvantový výtěžek rezonančního přenosu energie. Tato skutečnost se projeví posunem emise ve spektru. Jedněmi z takových sond jsou cameleony. Jako donor energie je použit modrý nebo cyan mutant GFP, jako akceptor pak zelená nebo žlutá verze tohoto proteinu. Mezi oběma fluorescenčními komponentami se nachází calmodulin (CaM = calcium modulated protein) na němž je vazebné místo pro Ca^{2+} [38], [39]. Jedním z problémů cameleonů je jejich relativně vysoká pH senzitivita, často také dávají falešný signál díky reakci s volným CaM v okolí sondy. Spojkou mezi dvěma mutanty GFP může být také troponin C [40]. Tato molekula je součástí troponinového komplexu (komplex tří regulujících proteinů důležitý pro kontrakci

kosterních a srdečních svalů) a obsahuje čtyři domény se strukturou helix-smyčka-helix. Smyčka obsahuje 12 aminokyselinových reziduí, které vážou dvojmocné kovové ionty, zejména Ca^{2+} a Mg^{2+} . Samozřejmě existují ještě mnohé další GFP senzory na bázi FRET reagující na další ionty. Pro pozorování Zn^{2+} byla vyvinuta sonda eZincCh-1 s tetrahedrálním $(\text{Cys})_4$ vazebným místem pro iont [41]. Bodovými mutacemi této sondy dále vznikla sonda Cd-FRET-2 reagující na ionty Cd^{2+} [41].

Druhý typ sond obsahuje pouze jeden fluorescenční protein, který se však může vyskytovat ve dvou formách lišících se protonačním stavem. Změna tohoto stavu se opět projeví v pozorovaném fluorescenčním spektru. Tyto sondy mohou přímo reagovat na ionty H^+ ve svém okolí, anebo mohou obsahovat navíc molekulu vážící ligand (např. Ca^{2+}). Jeho navázání pak nepřímo moduluje protonační stav GFP. Výhodou single-fluoroforních sensorů je mnohem rychlejší kinetika oproti sondám založeným na mechanismu FRET. Tím je pak umožněno například pozorování distribuce ligandu in vivo. Naopak nevýhodou pro sledování koncentrace dvojmocných iontů je pH-senzitivita sond obsahujících pouze jeden mutant GFP [40], neboť divoký typ GFP je na pH ve svém okolí trochu citlivý. Vhodnými mutacemi lze tuto pH-citlivost chromoforu GFP potlačit, anebo naopak navýšit. Jeden z důvodů používání sond s dvěma mutanty fluoroforu je skutečnost, že u těchto sond lze pH senzitivitu snadněji potlačit. Navýšení tohoto jevu se naopak dá využít při měření intracelulárního pH. Za tímto účelem byl vyvinut senzor pHluorin představený v následující kapitole.

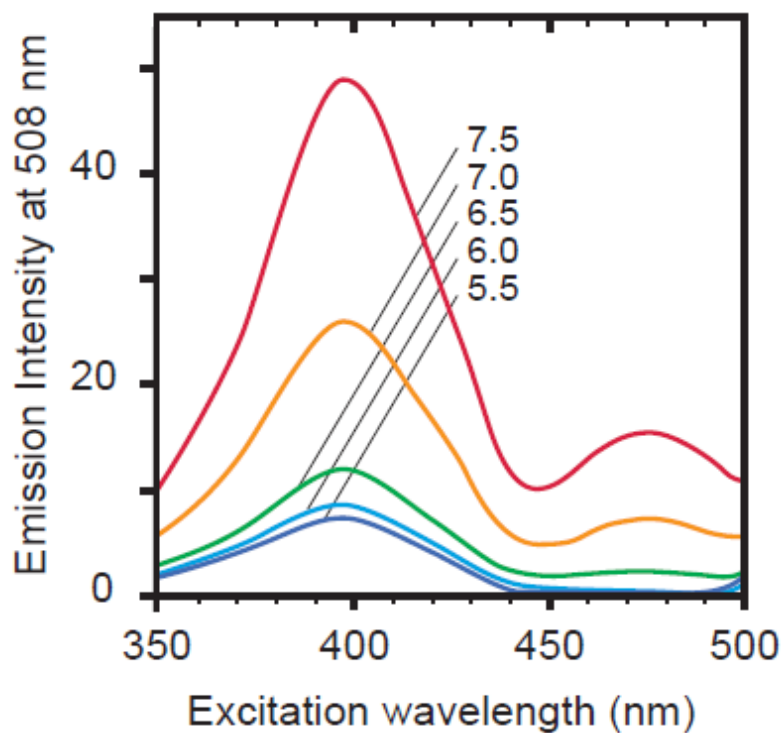
2.4.1. pHluorin

GFP splňuje většinu podmínek kladených na ideální fluorescenční senzor pH. Ten by měl mít velkou pH-citlivost a specifitu, rychlou odezvu na změny pH a dobré optické vlastnosti. Fluorescence divokého typu GFP se mění v okolí jeho pK_a o zhruba 50% na jednotku pH, je vysoce selektivní na změny pH díky odstínění chromoforu od okolí, je odolná vůči zhášení a má rychlou odezvu na změny koncentrace protonů v okolí. Excitační i emisní spektra GFP mutantů se navíc nacházejí ve viditelné části spektra a jejich autofluorescence je minimální [42].

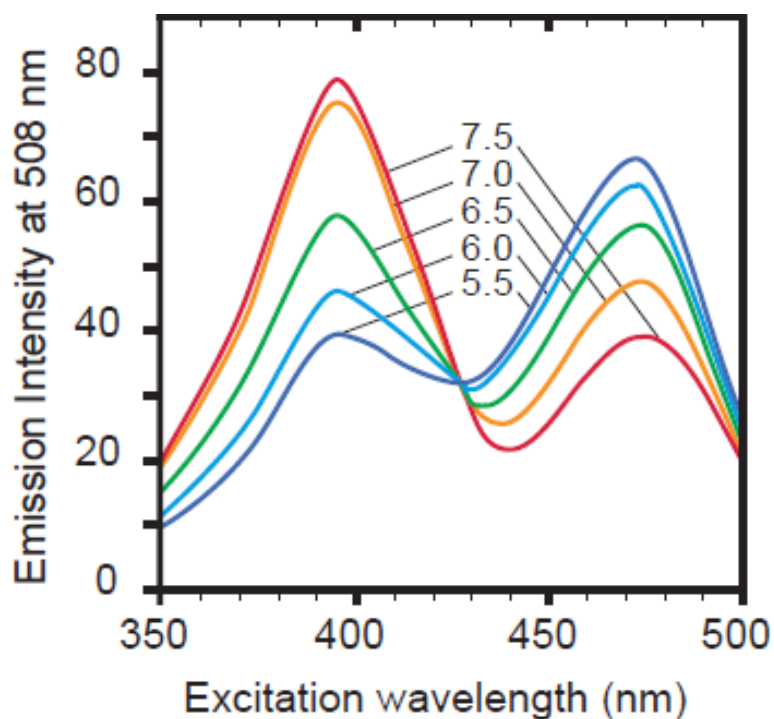
pHluorin je pH-citlivý mutant divokého typu zeleného fluorescenčního proteinu [43]. Prokázalo se, že pH posouvá rovnováhu mezi protonovanou formou A a anionickou formou B GFP v základním, tedy neexcitovaném stavu. Nerelaxovaná anionická forma I je metastabilní a velice rychle přechází na formu A, tedy k této rovnováze nepřispívá [23]. Přechody mezi těmito formami byly blíže popsány v kapitole 2.3.2. Ve vysokých pH je více populována fenolátová forma chromoforu, která je excitována na vlnové délce 395 nm, v nízkých pH je preferována forma fenolová s maximem excitace na 475 nm [42].

Různé varianty GFP, včetně divokého typu, vykazují pH-senzitivní fluorescence a absorbanci. Excitační fluorescenční spektra divokého typu GFP se však v rozmezí pH 5,5 – 10 příliš nemění [43]. Tuto závislost může značně ovlivnit mutagenese. Některé bodové mutace umožňují volnější přecházení mezi oběma protonačními formami chromoforu a tím způsobí větší spektrální změny odpovídající různému pH v okolí sondy.

Miesenbock a kol. vytvořil ve své práci [43] dva mutanty divokého typu GFP, které lze použít jako senzor určující pH v okolí proteinu. Jejich excitační spektra jsou zobrazena na Obr.2.8 a Obr.2.9. Ecliptický pHluorin celkově ztrácí intenzitu fluorescence při klesajícím pH. Při $\text{pH} < 6,0$ dokonce zcela zmizí excitační pás na vlnové délce 475 nm. Tyto změny jsou vratné, původní podoba excitačního spektra se obnoví do 20 ms po vložení proteinu do neutrálního pH. Tento mutant obsahuje bodové mutace S147D, N149Q, T161I, S202F, Q204T a A206T. Poměrový pHluorin obsahuje mutace S202H, E132D, S147E, N149L, N164I, K166Q, U167V, R168H a L220F. Protein vykazuje vratnou změnu v poměru intenzit pásů v excitačním spektru na vlnových délkách 410 nm a 470 nm v rozmezí pH 5,5 – 7,5. Za snížení excitačního pásu anionické formy chromoforu s rostoucím pH pravděpodobně může mutace S202H [23]. Protonovatelné reziduum His202 se po této mutaci vyskytuje v těsné blízkosti chromoforu GFP. V důsledku tak dochází k relativně velké modifikaci protonačních drah, což ovlivňuje optickou odezvu proteinu. Poměrový pHluorin je nyní široce používán. Lze jím sledovat dynamický vývoj pH v různých intracelulárních odděleních jako je cytoplazma [8], mitochondrie [44], peroxizomy [45], klatrinové vezikuly [46], endozomy a Golgiho aparát [47], nebo například presynaptické sekreční váčky [43].



Obr.2.8 – Excitační spektra ecliptického pHluorinu při různých pH v okolí této sondy. Převzato z [43].

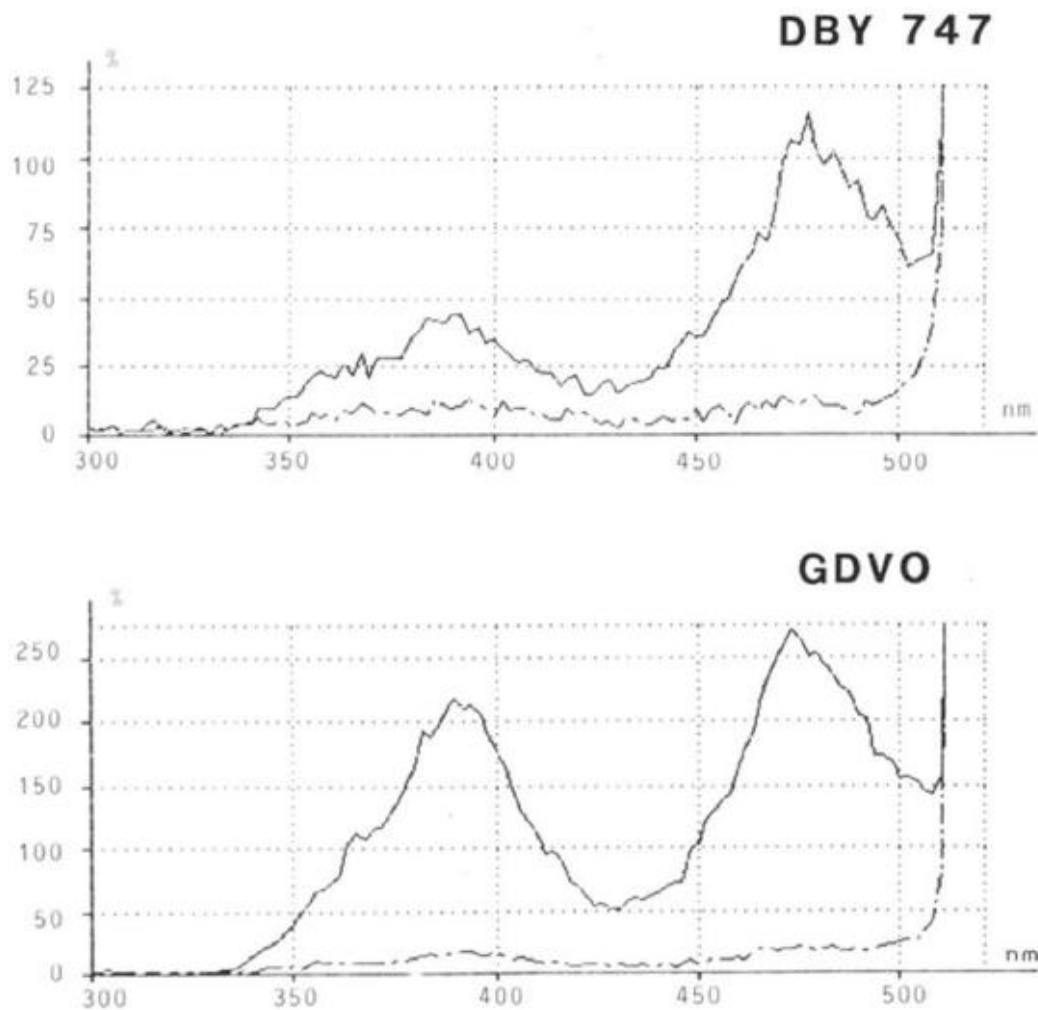


Obr.2.9 – Excitační spektra poměrového pHluorinu v závislosti na pH v jeho bezprostředním okolí. Převzato z [43].

2.5. Autofluorescence kvasinkových buněk a metody jejího odfiltrování od signálu GFP

Fluorescenční signál GFP může být kontaminován vlastní fluorescencí mikrobiálních buněk nebo použitého pufru. Oblast zájmu excitačního fluorescenčního spektra GFP je v rozmezí 350 – 510 nm. V této oblasti se také nachází excitační spektrum autofluorescence kvasinkových buněk. To lze rozdělit na dvě části: excitace na 365 nm s širokým emisním pásem o maximum na 450 – 470 nm a dvě excitační maxima na vlnových délkách 385 a 440 nm (Obr.2.10) s emisí na 520 nm [33], [48]. První příspěvek lze přisoudit koenzymu NADH, jehož excitační fluorescenční spektrum má maximum na vlnové délce ~360 nm. Druhá část spektra se pozicemi pásů v excitačním i emisním spektru shoduje se spektry flavin mononukleotidu (FMN) [48].

Parazitního signálu z pufru se dá snadno zbavit prostým odečtením fluorescence naměřené na čistém pufru bez buněk. Pro odečet signálu buněk se často používá stejný postup – odečítání autofluorescence naměřené na buňkách kmene bez plazmidu pro expresi GFP [3], [49]. Avšak ta nemusí být zcela stejná jako u geneticky modifikovaného kmene. Na Obr.2.10 jsou zobrazena autofluorescenční excitační spektra dvou kmenů *Saccharomyces cerevisiae*: divokého kmene DBY 747 a respiratorně-deficientního kmene GDVO. Kvasinky kmene GDVO nejsou schopny využít pro svůj růst žádný substrát, který nelze fermentovat, neboť postrádají množství respiračních enzymů a cytochromy (a + a₃) a b ve svých mitochondriích, tedy nejsou schopny dýchání [50]. Ze spekter zobrazených na Obr.2.10 je zřejmé, že autofluorescenční spektra divokého a geneticky modifikovaného kmene se mohou signifikantně lišit. Proto je vhodné zaměřit se na hledání vhodnějšího způsobu odfiltrování nežádoucích příspěvků od excitačního signálu sondy než je odečet autofluorescence referenčního kmene.



Obr.2.10 – Nekorigovaná fluorescenční excitační spektra dvou kmenů kvasinkových buněk *Saccharomyces cerevisiae*. Plné čáry reprezentují autofluorescenci buněčných suspenzí, čerchované odpovídají fluorescenci samotného pufru. Pás nad 510 nm je způsoben rozptylem excitačního záření. Převzato z [48].

2.5.1. Filtry

Jednou z možností odstranění příspěvku autofluorescence k celkovému emisnímu spektru fluorescence buněk obsahujících GFP je použití optických filtrů [33]. Tohoto přístupu se využívá ve spektroskopických technikách, které vizualizují nebo kvantifikují množství GFP exprimovaného v buňkách a organismech. Při správném použití je specificky excitován chromofor GFP, který poté emituje fluorescenci s větším výtěžkem než autofluorescenční molekuly. Tento přístup je však úspěšný pouze v případech, kdy je poměr signálu GFP ku autofluorescenci vysoký a hlavním cílem je zlepšení kontrastu fluorescence GFP při fluorescenční

mikroskopii. Pro účely poměrových měření je však tato metoda zvýraznění fluorescence GFP nedostatečná.

2.5.2. Metody využívající dvou vlnových délek

Pro rozlišení mezi autofluorescencí a spektrem sondy je možné využít rozlišného charakteru emisních a excitačních spekter autofluorescence a sondy. Autofluorescenční spektra bývají často široká s málo význačnými rysy jdoucí přes několik set nm. Naopak spektra GFP jsou relativně úzká a dobře definovaná.

Existují dva hlavní přístupy metod označovaných v anglické literatuře jako Dual-Wavelength differential fluorescence correction methods:

1. excitace na dvou odlišných vlnových délkách s odečítáním fluorescence na jedné emisní
2. použití jedné excitační vlnové délky a měření na dvou emisních

První přístup byl poprvé úspěšně otestován Steinkampem a Stewartem roku 1986 [51]. Autoři použili argon-ion laserovou čáru (488 nm) k excitaci GFP společně s autofluorescencí. Poté stejný vzorek excitovali kryptonovou čárou (413 nm). Tím došlo k cílené excitaci samotné autofluorescence, jejíž spektrum pak lze bez problémů odečíst. Netriviálním předpokladem metody je neměnnost excitačního spektra autofluorescence mezi dvěma laserovými čarami použitými pro excitaci. Oba lasery excitují stejný chromofor, tím dochází k vykompenzování i dalších jevů ovlivňujících fluorescenci, jako jsou například teplotné či pH fluktuační. Inverzní metoda používaná pro získání čistého emisního spektra sondy je méně náročná na laboratorní vybavení. Pro její úspěšné použití musí emisní spektrum vykazovat velice nízkou intenzitu na druhé zvolené emisní vlnové délce. Na obou zvolených vlnových délkách musí být zajištěna stejná citlivost detektoru [33]. Obě tyto metody spadají do poměrně široké kategorie metod známých jako Spectral Unmixing.

2.5.3. Synchronně skenovaná fluorescence

Konvenční fluorescenční spektra získáváme buď skenováním emisní vlnové délky (λ_{em}) s excitací vzorku na konstantní vlnové délce (λ_{ex}), nebo naopak proskenováním excitačního spektra se sběrem dat na fixní emisní vlnové délce. Třetí

možnost spočívá v simultánním (synchronním) posunu excitace a emise. Synchronní fluorescenci (SF) je možno použít ve třech základních módech [52], [53]: "

1. Synchronní fluorescence s konstantním rozdílem vlnových délek.

Zaznamenáváme fluorescenční spektrum chromoforu zatímco simultánně (synchronně) skenujeme excitační a emisní vlnové délky stejnou rychlostí a tím držíme konstantní vzdálenost (offset, $\Delta\lambda$) mezi vlnovou délkou emise a excitace. Tento mód je nejjednodušší a nejčastěji používaný.

2. Synchronní fluorescence s konstantním rozdílem energií.

V tomto případě je sken brán tak, aby se udržoval konstantní frekvenční rozdíl při současném posunu excitačního a emisního monochromátoru. Tato technika není příliš používána, komerční spektrofluorimetry ji neumožňují.

3. Synchronní spektrofluorimetrie s variací úhlů.

V tomto módu se skenuje excitační a emisní monochromátor simultánně, ale různou rychlostí, vzdálenost vlnových délek tedy není konstantní. Tato technika je používána pouze zřídka (např. v pracech [54] a [55]).

Synchronní snímání fluorescence bylo prvně navrženo Lloydem roku 1971 [54]. Následně Vo-Dinh v roce 1978 [55] formuloval základní teorii synchronně skenované fluorescence v módu konstantní vzdálenosti vlnových délek a navrhl první experimentální procedury. Intenzitu synchronní luminiscence lze vyjádřit jako [55]:

$$I_{syn}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = KcdE_{ex}(\lambda_{ex})E_{em}(\lambda_{em}) \quad (5)$$

K konstanta zahrnující technické parametry fluorimetru

c koncentrace fluoroforu ve vzorku

d tloušťka vzorku

E_{ex} ... excitační spektrum

E_{em} ... emisní spektrum

Nejpoužívanější SF technika využívá konstantní vzdálenost mezi excitační a emisní vlnovou délkou: $\lambda_{ex} - \lambda_{em} = \Delta\lambda$. Předchozí rovnice pak může být také napsána jako:

$$I_{syn} = KcdE_{ex}(\lambda_{em} - \Delta\lambda)E_{em}(\lambda_{em}) \quad (6)$$

Excitační vlnová délka zde vystupuje pouze jako parametr ve funkci popisující emisní spektrum. Stejně tak lze tento vztah napsat pouze za pomoci λ_{ex} a $\lambda_{ex} + \Delta\lambda$:

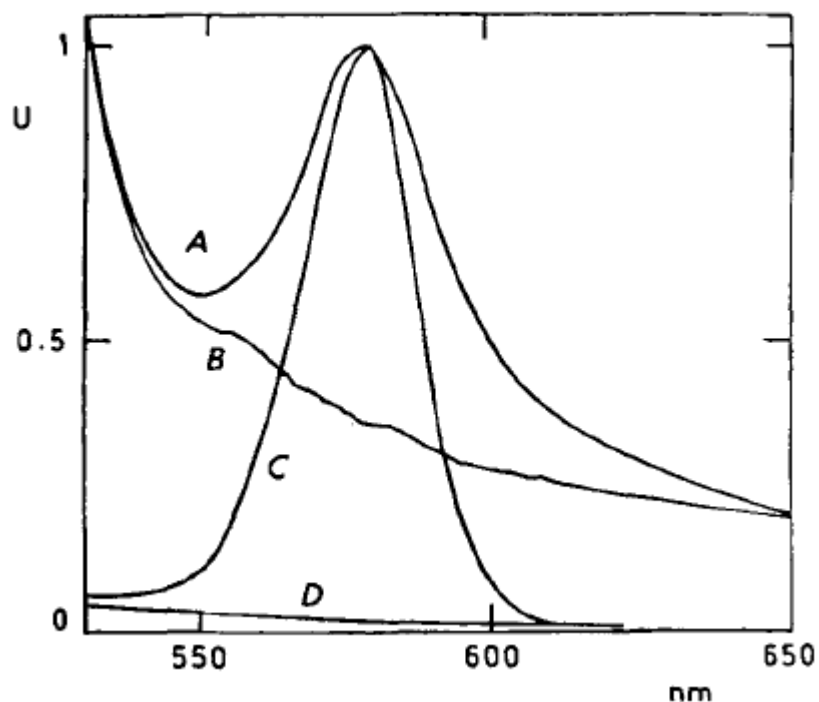
$$I_{syn} = KcdE_{ex}(\lambda_{ex})E_{em}(\lambda_{ex} + \Delta\lambda) \quad (7)$$

Z posledních dvou výrazů je zřejmé, že synchronně skenované spektrum závisí rovnocenným způsobem na emisní i excitační vlnové délce.

Jednou z hlavních výhod SF spekter oproti klasickým excitačním či emisním spektrům je zúžení spektrálních pásů a navýšení jejich intenzity [52], [53], [55], [56], [57]. Tento jev je důsledkem faktu, že synchronně skenované spektrum lze interpretovat jako emisní spektrum násobené excitačním spektrem, jenž bylo posunuto k vyšším vlnovým délkám o $\Delta\lambda$ (viz. rovnice (7)). Při správném nastavení vzdálenosti vlnových délek excitace a emise je intenzita SF pásu v nenormalizovaných spektrech typicky 5 – 10 krát vyšší než v excitačním či emisním spektru [57].

Původní uplatnění této metody bylo v multikomponentní analýze směsí či tkání. V tomto oboru je kromě již zmíněných charakteristik SF důležitá také rychlost získání potřebné informace ze vzorku. Pro multikomponentní kvantitativní analýzu komplexního vzorku se standardně měří 2D excitačně-emisní matice spekter [52], [56]. Toto měření je velice zdlouhavé. Při správně nastaveném offsetu vlnových délek lze získat stejnou informaci z jediného SF skenu, anebo je možné excitovat selektivně každou komponentu zvlášť a pozorovat ji samostatně.

SF spektroskopie se tedy dá použít pro odlišení jednotlivých příspěvků k celkové fluorescenci. V excitačních a emisních spektrech bývají pásy pocházející od jednotlivých fluoroforů často překryté přes sebe, tomu se lze v SF spektrech vyhnout. V experimentu zpravidla volíme interval $\Delta\lambda$ tak, aby odpovídal vzdálenosti maxim excitace a emise stejného fluoroforu. Tím efektivně zvýšíme selektivitu techniky [57]. Synchronní signál nemá žádné ostré maximum, pokud obě spektra – emisní i excitační – jsou bez význačných rysů [55].



Obr.2.11 – Emisní a SF spektra diS-C₃(3) sondy v suspenzi kvasinkových buněk normalizovaná v maximu pásu. A – konvenční emisní spektrum, B – příspěvek pozadí k emisnímu spektru, C – SF spektrum, D – příspěvek pozadí k SF spektru. Převzato z [57].

Poslední jmenované vlastnosti se dá dobře využít pro odstranění autofluorescenčního pozadí kvasinkových buněk od signálu GFP. V práci [57] autoři použili techniku synchronně skenované fluorescence pro odfiltrování rušivých složek pozadí od signálu sondy diS-C₃(3) používané pro měření membránového potenciálu v kvasinkových buňkách. Na Obr.2.11 jsou zobrazena emisní a SF spektra této sondy v suspenzi kvasinkových buněk normalizovaná v maximu pásu na jednotkovou intenzitu. Na vyznačených příspěvcích pozadí k jednotlivým typům spekter je vidět jednoznačný přínos SF techniky k potlačení nežádoucích signálů.

2.5.4. Polarizace fluorescence GFP

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.2., GFP produkuje značně polarizovanou fluorescenci po excitaci lineárně polarizovaným světlem. Této spektrální charakteristiky lze také využít pro účely rozlišení mezi GFP a autofluorescencí.

Změříme intenzitu signálu ve směru rovnoběžném s lineárně polarizovaným světlem a ve směru kolmém. Výsledný signál získaný jako rozdíl mezi těmito dvěma příspěvky bude velký pro GFP a mnohem menší pro malé fluorescenční molekuly, jako jsou flaviny a NAD(P)H [33]. Tato metoda je vhodná pro kvantifikaci GFP exprimovaného v buňkách [35], ne však pro získání čistého excitačního či emisního spektra. Metoda využívá odlišné vlastnosti světla, než je vlnová délka, díky tomu lze odlišit GFP od pozadí vyskytujícího se na naprosto totožné vlnové délce.

2.5.5. Zhášení autofluorescence

Jako velice užitečná vlastnost GFP se ukazuje jeho odolnost vůči zhášení. Díky dobrému odstínění chromoforu od okolního solventu je úbytek intenzity fluorescence GFP zapříčiněný přidáním zhášedla do suspenze malý. Při použití vysoké koncentrace zhášedla však přicházíme krom úbytku autofluorescenčního signálu také o fluorescenci GFP.

Hlavní nevýhodou metody je obtížný výběr zhášedla. Vybrané zhášedlo musí procházet přes buněčné membrány. Často bývají používány malé molekuly, které procházejí prostou difúzí. Zhášedlo by také samozřejmě mělo být co nejméně cytotoxické a pro efektivní použití musí mít absorpční spektrum značně převyšující emisi autofluorescence. Úspěšně byla použita jako zhášedlo toluidinová modř s maximem absorpce na 626 nm a velmi malou absorpencí v oblasti 400 – 500 nm [33]. Díky takovému rozložení absorpčního spektra toluidinová modř nebude zhaset GFP ani při vysoké koncentraci. Jako další lze použít také methylenovou modř s absorpčním pásem na 668 a 609 nm nebo trypanovou modř s absorpcí na vlnové délce 607 nm. Emise těchto molekul je ve vzdálené červené oblasti a jako taková může být snadno zablokována vhodným filtrem.

2.5.6. Fotochemické metody

GFP je relativně odolný vůči vybělování při dlouhodobém ozařování, pokud nepoužíváme světlo o vlnové délce v UV oblasti (viz kapitola 2.3.4). Této vlastnosti můžeme využít podobným způsobem jako odolnosti vůči zhášení. Bohužel kromě

vybělení autofluorescenčních komponent tato metoda může zničit také složky média kritické pro přežití buněk nebo vytvořit deriváty pro buňku škodlivé [33].

Pro odfiltrování nežádoucích příspěvků k fluorescenčnímu spektru GFP jsou užitečné také všechny metody, které posouvají excitaci či emisi GFP na jinou vlnovou délku. Jednou z možností je využít fotokonverze chromoforu při delším osvětlování UV zářením. Dochází k velkému snížení excitačního pásu na 395 nm a korespondujícímu nárůstu druhého pásu díky fotoindukovanému izomerismu molekuly [21]. Fotokonverzní proces se obrací jen velmi pomalu v periodě několika dnů, pokud je vzorek ponechán ve tmě. Osvícení divokého typu GFP UV zářením tedy posune hlavní excitační pás z 395 na 475 nm. Použití excitace na 475 nm poté redukuje autofluorescenci pocházející od NAD(P)H. Během osvitu pomocí UV však dochází k fotovybělování, tedy k celkovému snížení intenzity fluorescence.

Různé typy GFP mohou po osvětlení modrým světlem za anaerobních podmínek projít fotokonverzí směrem k červené části spektra. Takto upravené sondy pak absorbují zelené světlo na 525 nm a emitují na 600 nm. Červeně emitující formy GFP jsou stabilní alespoň 24 h, ale jejich chemická podstata není zcela známá [33]. Po vystavení záblesku modrého světla se červená emise objevuje relativně pomalu. To naznačuje, že fotoaktivace je pravděpodobně dvoufázový proces. Osvícení stimuluje rychlý přechod na excitovaný intermediát, který následně pomalu přechází na excitovaný červeně emitující stav. Touto konverzí se změní jak excitační, tak emisní charakteristika GFP.

Pro získání alternativní emisní či excitační vlnové délky lze také použít mechanismu Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Tato technika vyžaduje přidání dalšího GFP mutantu – FRET partnera. Dva vybrané GFP jsou spojeny malým spojovačem < 20 reziduí. Jako tento spojovač bývá často používán calmodulin [38], [39], další možností je například troponin C [40] (viz kapitola 2.4). Mohou se také vytvořit dva separátní GFP se speciálními proteinovými štítky, které spolu silně interagují. Oběma metodami se dva různé mutanty GFP dostanou do těsné blízkosti a tím se efektivně navýší kvantový výtěžek přenosu energie.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité kmeny buněk

Při experimentech sledujících vnitrobuněčné pH a pufrací kapacitu cytosolu v bakteriích byla používána bakterie *Escherichia coli* s hyperexprimovaným proteinem MntH. Takto upravený kmen byl v několika pracech používán pro studium funkčních charakteristik tohoto transportéru. Transformace kmene DH11S na kmen označovaný jako *EcoliA* je popsána v práci [58]. Z bakteriálních buněk mateřského kmene byl vyjmut gen nesoucí informaci o MntH a místo něj byl vložen gen pro rezistenci na kanamycin. Poté byl do buněk vpraven gen kódující původní přirozený protein MntH. U takto upravených buněk je možné kontrolovat expresi proteinu MntH přidáním L-arabinózy do suspenze. Nový kmen navíc obsahuje plazmid pGBM6-pHL nesoucí gen pro expresi pHluorinu a zároveň rezistenci na spectinomycin.

Měření vnitrobuněčného pH v kvasinkových buňkách byla provedena na dvou kmenech *Saccharomyces cerevisiae* – BY4742+pHL a BY4742[YEp352] (s genotypem MAT α his3 leu2 lys2 ura3). První jmenovaný se liší od svého mateřského kmene BY4742 pouze transformací pomocí plazmidu pVT100U nesoucím gen pro fluorescenční protein pHluorin. Druhý mutantní kmen byl používán jako negativní kontrola. Je v něm obsažen prázdný plazmid YEp352. Mutace Ura3 umožňující buňkám samostatnou syntézu uracilu [59], [60] je používána pro selekci transformovaných buněk v růstovém médiu bez uracilu.

3.2. Kultivace buněk

Používané kmeny mikrobiálních buněk jsou dlouhodobě zakonzervovány při teplotě -70°C. Odtud jsou rozmnoženy a krátkodoběji zakonzervovány v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

3.2.1. Kultivace bakteriálních buněk

Z konzervy uchovávané v -20°C je malé množství buněk sterilně přeneseno na Petriho misku s kultivačním médiem Luria-Bertani (LB). Jeho složení je popsáno v Tabulce II. Jednotlivé složky média jsou rozmíchány v destilované vodě a zautoklávovány. K médiu jsou před nalitím na misku navíc přidány tři druhy antibiotik – kanamycin, ampicilin a spectinomycin v koncentracích uvedených v Tabulce III. Vůči těmto antibiotikům jsou zkoumané kmeny *E. coli* rezistentní, zabraňují však růstu nežádoucích organismů na misce. Zaočkovaná miska se nechá přes noc kultivovat při teplotě 37°C . Poté jsou narostlé misky uchovávány v lednici při teplotě 4°C po dobu maximálně jednoho měsíce. Všechny úkony spojené s kultivací buněk jsou prováděny sterilně.

Tabulka II – LB kultivační médium pro pěstování bakterií *E. coli*

látká	koncentrace [% objemu]	množství [g/l]
Bacto-trypton	1	10
Bacto-yeast extract	0,5	5
NaCl	0,5	5
(Bacto-agar)	1,5	15

Tabulka III – Koncentrace antibiotik přidávaných ke kultivačnímu médiu

antibiotikum	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]
kanamycin	30
ampicilin	100
spectinomycin	100

Z misky s narostlými koloniemi bakterií je poté očkovací kličkou sterilně odebrána jedna kolonie do 2 ml tekutého LB média s přidávanými antibiotiky. Toto médium má složení popsané v Tabulce II, pouze neobsahuje Bacto-agar. Připravená suspenze se nechá třepat (250 RPM) přes noc při teplotě 37°C . Další den se ředí do 100x většího objemu – 10 ml suspenze v 50 ml, nebo 20 ml suspenze ve 100 ml Erlenmayerově baňce. V této nádobě se nechají buňky dále třepat po dobu dvou hodin při 37°C . Po dvou hodinách kultivace se k suspenzi přidává L-arabinóza v koncentraci 0,06% objemu. Tato látka spustí expresi transportéru MntH

v bakteriálních buňkách. Roztok s buňkami se nechá za stejných podmínek kultivovat ještě jednu hodinu.

Po dokončení kultivace jsou buňky stočeny v centrifuze po dobu 2 minut při 5000 RPM. Po odstředění je odstraněno médium, ve kterém buňky rostly a nahradí se pufrem používaným při fluorescenčních měřeních. Buňky se pak centrifugují za stejných podmínek. Po prvním promytí pufrem následuje ještě druhé.

Po dvojnásobném promytí pufrem jsou buňky resuspendovány v 1 ml pufru a následně je tato suspenze ředěna do měřících kyvet na výslednou optickou hustotu vzorku OD = 0,2 při vlnové délce 600 nm. Na měření optické hustoty byl používán přístroj NovaSpec II.

3.2.2. Kultivace kvasinkových buněk

Pro kultivaci kvasinkových buněk bylo používáno YNB minimální médium. Jeho složení je popsáno v Tabulce IV.

Tabulka IV – YNB minimální médium pro pěstování kvasinek *S. cerevisiae*

látka	koncentrace [% objemu]	množství [g/l]
YNB	0,17	1,7
ammonium sulfát	0,5	5
glukóza	2	20
(agar)	2	20

Složky média byly rozmíchány v destilované vodě a poté zautoklávovány. Poté je do něj sterilně přidána směs aminokyselin Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement Without Uracil od firmy SIGMA v koncentraci 1,92 mg/ml. Tato aminokyselinová směs neobsahuje uracil, tedy je selektivní pro námi používané kmeny kvasinek s mutací Ura3.

Pro přípravu živného média na Petriho miskách se k YNB médiu přidává agar v koncentraci uvedené v Tabulce IV. Misky jsou zaočkovány pomocí sterilní kličky ze zmrazené konzervy (-20°C) a nechány po 2 dny kultivovat v píce při 30°C. Misky s narostlými buňkami jsou uloženy v lednici při teplotě 4°C.

Inokulum – suspenze narostlých buněk v tekutém YNB médiu s přidanou směsí aminokyselin – se připravuje buď odebráním kvasinek sterilní kličkou z misky

s narostlými koloniemi, nebo rovnou z konzervy uchovávané v -20°C. Připravuje se 10 ml inokula do 50 ml nebo 20 ml do 100 ml Erlenmayerovy baňky. Inokulum se nechá třepat (150 RPM) 1 – 1,5 dne při 30°C. Takto připravená suspenze je dále přeočkována do nového YNB média se směsí SIGMA (opět do Erlenmayerovy baňky) na OD = 0,2 při vlnové délce 578 nm. Buňky dále kultivujeme v třepačce za stejných podmínek (150 RPM, 30°C) ještě 6 hodin. Po této době jsou používány kmeny *S. cerevisiae* v první polovině exponenciální fáze růstu [60].

V této růstové fázi byly buňky centrifugovány po dobu 4 minut při 3000 RPM. Stejně jako u bakteriálních buněk byly poté dvakrát promyty v pufru či destilované vodě a následně resuspendovány v 1 ml pufru (resp. destilované vody). Tato suspenze byla nakonec naředěna do kyvet na OD = 0,2 nebo 0,4 při použité vlnové délce 578 nm.

3.3. Použité pufry

Pro promývání buněk a fluorescenční měření byly používány citrát-fosfátové (CP) pufry složené z 25 mM kyseliny citrónové, 50 mM KH_2PO_4 a 50 mM K_2HPO_4 . Pro získání pufru o pH 6 – 8 smícháme KH_2PO_4 a K_2HPO_4 . Pufry o pH 4,7 – 5,5 jsou směsí kyseliny citrónové a K_2HPO_4 . Druhým typem pufru používaným ve fluorescenčních experimentech byl 100 mM MES s přídavkem 30 mM KCl.

Pro zpropustnění membrán kvasinek byly používány kalibrační pufry popsané v [8], [59], [49]. Jejich složení je zaneseno v Tabulce V. Všechny složky byly rozpuštěny v definovaném množství v destilované vodě. Na požadované pH byly tyto pufry titrovány pomocí HCl a NaOH.

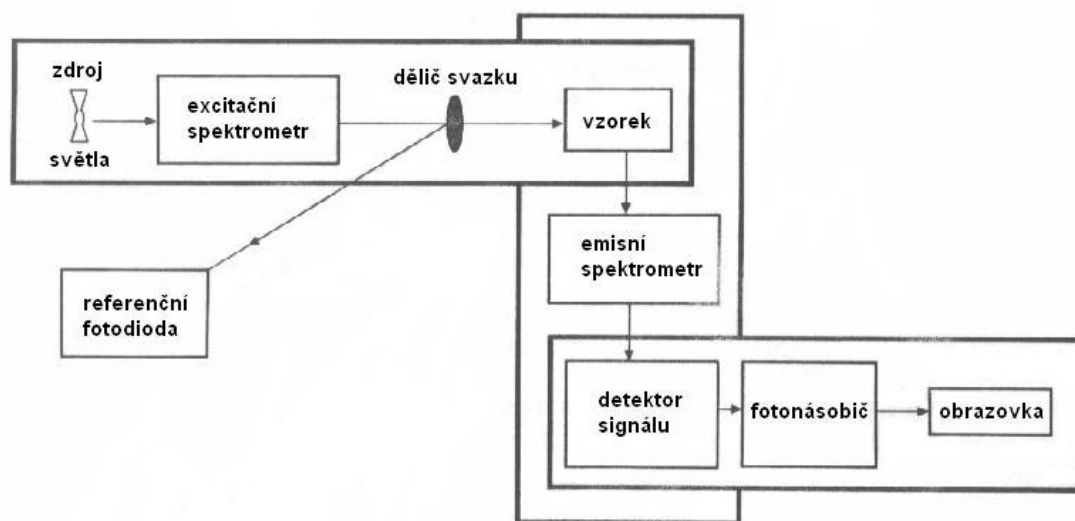
Tabulka V – Kalibrační pufry použité u kvasinek *S. cerevisiae*

látka	koncentrace [mM]	množství [g/l]
MES	50	10,66
HEPES	50	11,9
ammonium acetát	200	15,4
KCl	50	3,73
NaCl	50	2,92
2-deoxy-D-glukóza	10	1,64
azid sodný	10	0,65

3.4. Fluorescenční měření

Všechny fluorescenční experimenty byly provedeny na komerčně dostupném spektrofluorimetru Fluoromax-2 od firmy Jobin-Yvon (viz Obr.3.1). Jako zdroj excitace je používána xenonová lampa. Excitační svazek jde přes excitační mřížkový monochromátor na vzorek, odtud je pod pravým úhlem sbírán fluorescenční signál. Emisní vlnová délka je vybrána emisním mřížkovým monochromátorem. Spektrofluorimetr umožňuje sběr excitačních a emisních fluorescenčních spekter, měření vývoje poměru intenzit dvou pásů v excitačním či emisním spektru v čase a také měření synchronně skenované fluorescence.

Ve všech experimentech sledujících vnitrobuněčné pH v *E. coli* a *S. cerevisiae* byl jako sonda použit poměrový pHluorin. Všechny vzorky byly měřeny v polymethylmethakrylátových kyvetách o objemu 3 ml.



Obr.3.1 – Schéma spektrofluorimetru Fluoromax-2. Zdrojem excitace je xenonová lampa. Převzato z [9].

3.4.1. Excitační fluorescenční spektra

Na bakteriích *E. coli* obsahujících pHluorin byla měřena excitační fluorescenční spektra s emisní vlnovou délkou 520 nm v rozmezí excitačních vlnových délek 370 – 490 nm. Šířky excitační i emisní štěrby monochromátorů byly nastaveny na 3 nebo 5 nm. Integrační doba jednoho kroku byla 0,1 – 1 s, krok

1 – 3 nm. Excitační spektra byla použita pro kalibraci odezvy pHluorinu po zpropustnění membrány buněk za pomoci protonoforu CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone).

Excitační fluorescenční spektra byla proměřena také na kmenech kvasinek *S. cerevisiae* BY4742 a BY4742+pHL. Byly použity emisní vlnové délky 490, 500, 510, 530 a 540 nm. Rozmezí excitačních vlnových délek pro tato měření byla 370 – 480 nm, 300 – 485 nm, 300 – 495 nm, 370 – 520 nm a 300 (370) – 515 nm. Štěrbiny excitačního a emisního monochromátoru byly otevřeny na 5/5, 2/5 nebo 2/10 nm. Integrační doba jednotlivých kroků byla 0,1, 0,5 nebo 1 s, použitý krok 1 nebo 2 nm.

Měření excitačních spekter probíhalo v režimu S/R, kde S je signál fluorescence a R signál referenční diody. V tomto režimu jsou potlačeny pásy charakteristické pro emisní spektrum xenonu.

3.4.2. Emisní fluorescenční spektra

Série emisních spekter byla naměřena na kvasinkovém kmeni BY4742+pHL. Použité excitační vlnové délky jsou 380, 450 a 460 nm. Emise byla sbírána v rozmezí 390 – 600 (680) nm, 470 – 600 nm a 470 – 680 nm. Šířky excitační a emisní štěrby byly nastaveny na 5/5 a 10/2 nm. Také u těchto spekter byl použit krok 1 nm s integrační dobou 0,2, 0,5 nebo 1 s.

3.4.3. Časově rozlišené měření poměru intenzit pásů

Na vzorcích s bakteriemi *E. coli* byl měřen časový vývoj poměru excitačních pásů pHluorinu na vlnových délkách 410 a 470 nm. Excitační i emisní štěrbina byly pro tato měření nastaveny na 3 nm, integrační čas 1 s. Toto měření bylo použito pro určení cytosolického pH v bakteriálních buňkách a dále při určování pufrační kapacity cytosolu bakterií.

3.4.4. Synchronně skenovaná fluorescenční (SF) spektra

Metodika synchronně skenované fluorescence byla použita na obou používaných kmenech *S. cerevisiae*. Tato metoda byla zkoumána pro možnost separace nežádoucí autofluorescence buněk od signálu pHluorinu.

Bylo proměřeno velké množství SF spekter než bylo nalezeno optimální nastavení vzdálenosti excitační a emisní vlnové délky. Konečná spektra byla snímána při offsetu $\Delta\lambda = 30$ nebo 110 nm. Tyto hodnoty přesně odpovídají vzdálenosti prvního a druhého maxima excitačního spektra od maxima emise. Při nastavení $\Delta\lambda$ na 30 nm je tedy možné pozorovat dlouhovlnější pás z excitačního spektra pHluorinu, při 110 nm se objevuje krátkovlnější pás. Poměr těchto dvou pásů byl zkalibrován na odezvu pHluorinu a dále bylo z tohoto poměru odečítáno cytosolické pH. Použitý krok posunu vlnových délek při SF experimentech byl 1 nm, integrační doba byla používána 0,2, 0,3 nebo 0,5 s, excitační i emisní štěrbinu monochromátoru byly otevřeny na 5 nm.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Výsledky experimentů provedených na bakteriích

E. Coli

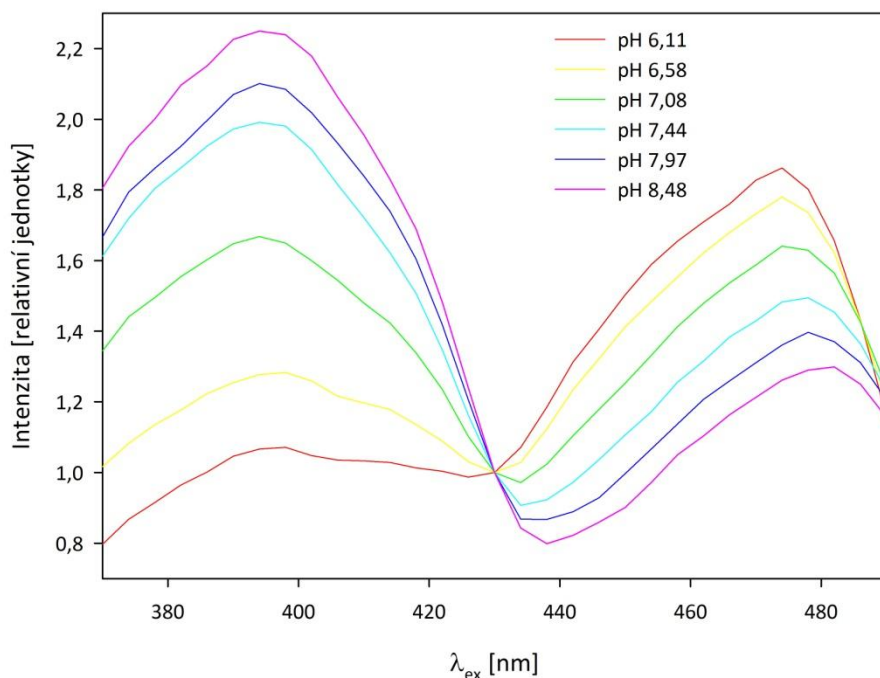
4.1.1. Kalibrace odezvy pHluorionu

V experimentech sledujících vnitrobuněčné pH jsem používala pH-citlivý mutant GFP pHluorin. Pro kalibraci jeho odezvy v mikrobiálních buňkách byla vhodným protonoforem zpropustněna vnější membrána a tím vyrovnáno pH uvnitř a vně buněk. Potom je již známé pH v bezprostřední blízkosti senzoru a jeho odezvu je možné zkalibrovat.

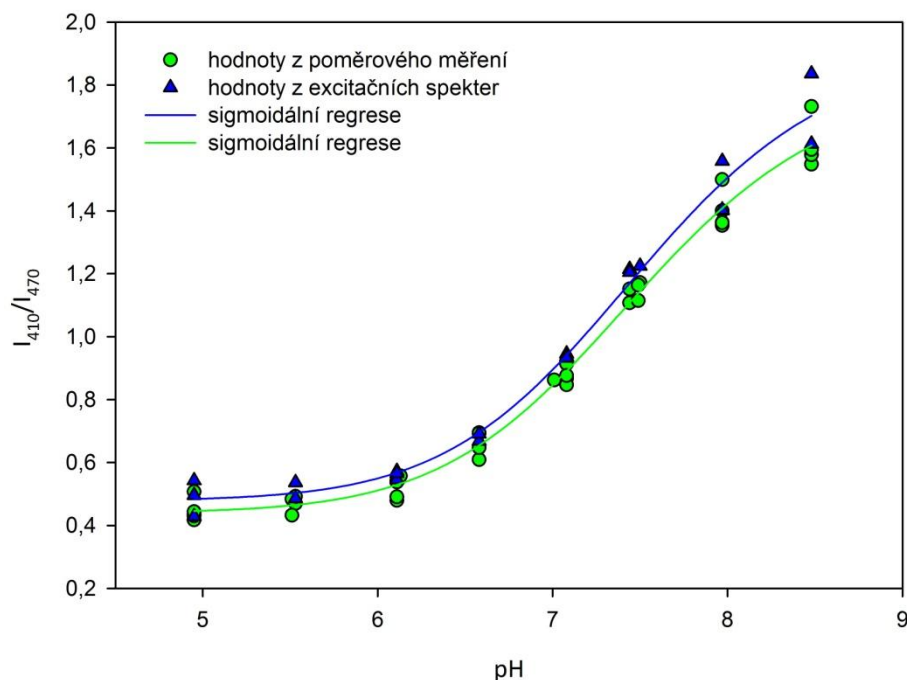
Pro účely kalibrace pHluorinu v bakteriálních buňkách byla namíchána série CP pufrů v rozmezí pH 4,5 – 8. Byla naměřena excitační spektra bakteriálních buněk v těchto pufrch s přidáním protonoforu CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) ve výsledné koncentraci 10 μ M. Tento ionofor byl vybrán na základě prací [9], [19]. Získaná excitační spektra jsou zanesena v grafu na Obr.4.1. Tato spektra byla normována na bod rozhraní obou pozorovaných pásů – 430 nm. Ze spekter byly odečítány intenzity excitačních pásů na vlnových délkách 410 a 470 nm. Poměr I_{410}/I_{470} pak určuje pH v okolí sondy.

Druhým typem experimentu použitým pro kalibraci sondy bylo přímé měření poměru intenzit I_{410}/I_{470} v čase. Přímé měření poměrů je o mnoho rychlejší než měření celých excitačních spekter. U bakterií můžeme tento typ měření použít díky tomu, že nemusíme z excitačních spekter odečítat žádné autofluorescenční pozadí, s jakým se setkáváme u eukaryotních buněk.

Oba typy experimentu pro získání poměru I_{410}/I_{470} v excitačním spektru byly navzájem porovnány. V grafu na Obr.4.2 jsou zaneseny hodnoty poměrů odečtené jak z excitačních spekter, tak z přímého měření poměru v buňkách se zpropustněnou membránou pomocí CCCP. Poměr intenzit I_{410}/I_{470} získaný z těchto dvou typů experimentu je vůči sobě nepatrně systematicky posunutý. Jelikož další experimenty byly výhradně nabírány měřením vývoje poměru intenzit v čase, používám kalibrační křivku získanou z těchto dat (na Obr.4.2 zeleně).



Obr.4.1 – Excitační fluorescenční spektra pHluorinu v bakteriích *E. coli* s přidaným protonoforem CCCP v koncentraci 10 μ M normovaná na $\lambda_{ex} = 430$ nm. Buňky byly suspendovány v CP pufrách o různém pH.



Obr.4.2 – Srovnání kalibrační křivky pHluorinu v *E. coli* získané ze dvou typů experimentů. Modře jsou označeny hodnoty poměru I_{410}/I_{470} odečtené z excitačních spekter, zeleně z přímého měření poměru. Body byly proloženy regresí podle vztahu (8).

Naměřená data byla fitována sigmoidální závislostí podle předpisu [9], [60]:

$$R = \frac{I_{max} (pH)^{n_H}}{K_{0,5}^{n_H} + (pH)^{n_H}} + C \quad (8)$$

kde R je poměr intenzit excitačních pásů I_{410}/I_{470} , ostatní proměnné jsou fitované konstanty. Hodnoty konstant získaných z fitu pomocí vztahu (8) jsou zaneseny v Tabulce VI. Regrese dat získaných z obou typů provedených experimentů jsou graficky znázorněny na Obr.4.2.

Tabulka VI – Konstanty sigmoidálního fitu kalibrační křivky (získané z poměrového měření)

konstanta	nafitovaná hodnota
I_{max}	1,48
n_H	12,85
$K_{0,5}$	7,53
C	0,44

Vzorec (8) pak byl pro účel určování vnitrobuněčného pH přepsán do tvaru:

$$pH = K_{0,5}^{n_H} \sqrt[n_H]{\frac{R-C}{I_{max} + C - R}} \quad (9)$$

Jelikož kalibrační křivka je sigmoidální, tak se chyba určení pH_{in} liší pro různá rozmezí pH. V okolí neutrálního pH je křivka nejstrmější, tedy chyba určení pH_{in} je zde nejmenší. Pro pH_{in} menší než 5,5 je naopak závislost již tak málo strmá, že pH_{in} nelze spolehlivě odečíst. Relativní chyba plynoucí z náhodných fluktuací intenzity signálu je 2%. Tabulka VII shrnuje chyby určené z maximální odchylky hodnot použitých pro kalibraci od fitu a chyby zanesené náhodným šumem.

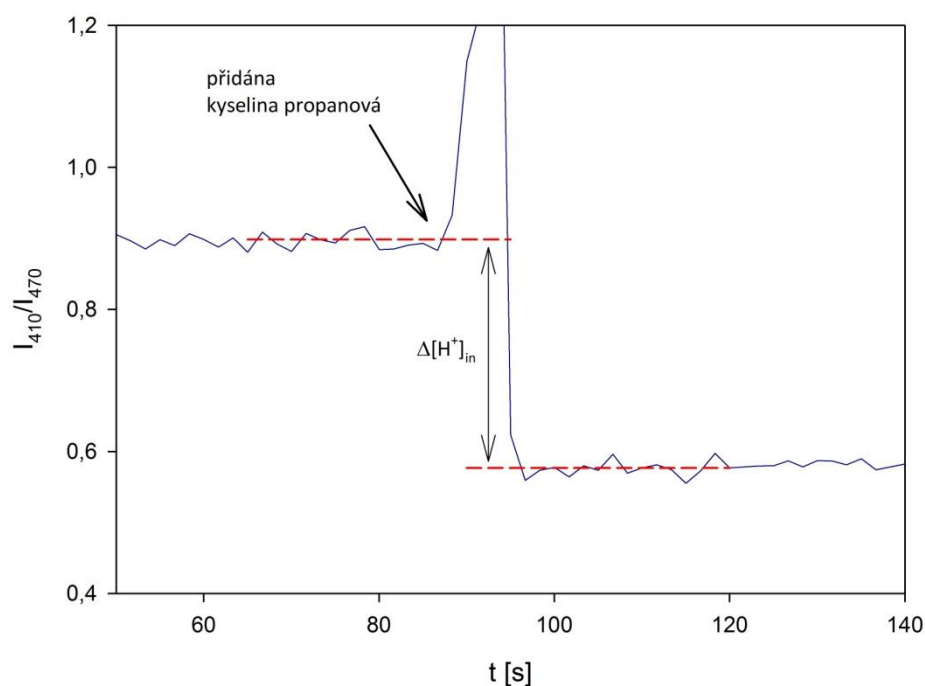
Tabulka VII – Chyba určení pH_{in} z kalibrační křivky

rozmezí pH_{in}	chyba určení pH_{in}
< 5,5	nelze spolehlivě určit pH_{in}
5,5 – 6,5	± 0,5
6,5 – 7,5	± 0,2
7,5 – 8,5	± 0,5

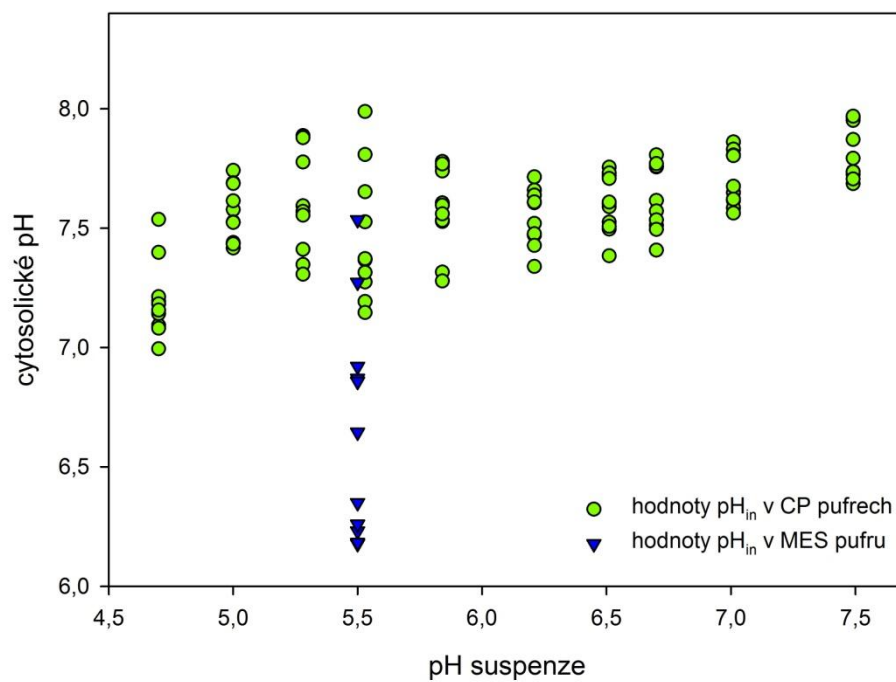
4.1.2. Pufrační kapacita cytosolu

Byla provedena série experimentů určující pufrační kapacitu (β) cytosolu bakterií *E. coli* při různém pH okolní suspenze. Měřená veličina se označuje ve vědecké literatuře za pufrační kapacitu buněčného cytosolu, avšak jde spíše o jakési měřítko homeostatické regulace pH_{in} . Měření byla prováděna při teplotě 31°C , neboť tato teplota je bližší optimálním životním podmínkám buněk.

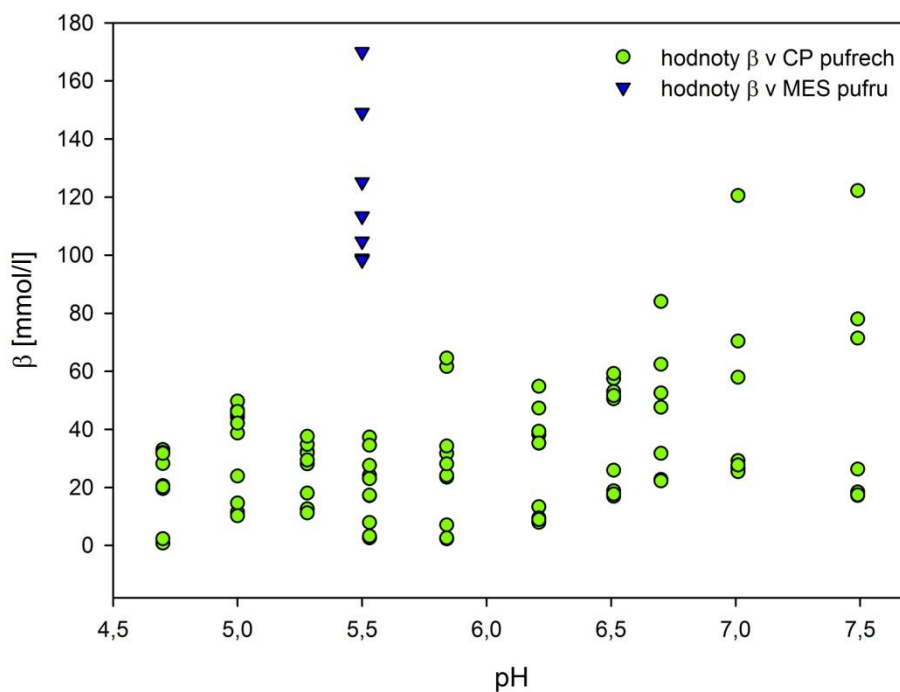
Pufrační kapacita byla měřena metodou popsanou v kapitole 2.1.1. Jako acidifikační činidlo byla do suspenze přidávána kyselina propanová v zásobní koncentraci 13,4 mM. Disociační konstanta této kyseliny je $K_a = 1,3 \cdot 10^{-5}$. Ke vzorkům bylo přidáváno různé množství této kyseliny a z pozorované skokové změny pH_{in} byla podle vztahů (3) a (4) v kapitole 2.1.1 spočtena pufrační kapacita cytosolu bakterií. Detail experimentu je zobrazen na Obr.4.3.



Obr.4.3 – Pokles poměru intenzit excitačních fluorescenčních pásů I_{410}/I_{470} pHlorinu po přidání kyseliny. Z rozdílu pH_{in} lze spočítat pufrační kapacitu cytosolu buněk. Pás v čase ~ 90 s je způsoben otevřením krytu spektrofotometru.



Obr.4.4 – Hodnoty cytosolického pH bakterií *E. coli* suspendovaných v CP pufrach o rôznom pH a MES pufru o pH 5,5.



Obr.4.5 – Pufráčňá kapacita cytosolu bakterií *E. coli* suspendovaných v CP pufrach o rôznom pH a MES pufru o pH 5,5.

Byla připravena série vzorků v CP pufrch o pH v rozmezí 4,7 – 7,5 a MES pufru o pH 5,5 při teplotě 31°C. V grafu na Obr.4.4 jsou zaneseny hodnoty cytosolického pH naměřené v bakteriálních buňkách před přidáním kyseliny propanové. K těmto vzorkům byla poté přidána kyselina propanová a byly získány hodnoty β . Výsledky jsou zaneseny v grafu na Obr.4.5.

Na Obr.4.4 je u vzorků v CP pufrch při okolním pH < 6 pozorován větší rozptyl hodnot pH_{in} než u vyšších hodnot pH suspenze. V celém rozsahu studovaných pH si však buňky udržují relativně stálou hodnotu pH_{in} . Průměrná hodnota cytosolického pH bakteriálních buněk v CP pufrch byla naměřena 7,5 – 7,6. Stejně měření proběhlo i v MES pufru o pH 5,5. Zde byl pozorován velký rozptyl naměřených hodnot v rozmezí 6,2 – 7,6. Podle [9] je hodnota pH_{in} buněk *E. coli* v tomto pufru nestálá a obecně s časem klesá. Získané hodnoty pH_{in} tedy varírují podle toho, jak dlouho byl vzorek před měřením připraven. I přes tuto skutečnost se však ve shodě s [9] prokázalo, že pufrční kapacita β v bakteriích suspendovaných v MES pufru se v čase nemění. V tomto pufru (pH 5,5) byla změřena hodnota $\beta = 123 \pm 50 \text{ mM/l}$. V CP pufrch byla pozorována pufrční kapacita nižší na celé studované škále pH. Na pufrční schopnost buňky tedy má signifikantní vliv složení okolního pufru. Tento jev byl již dříve popsán v [9]. V buňkách suspendovaných v MES pufru je pravděpodobně přítomen větší tok H^+ než v CP pufrch, tomu odpovídá i pozorovaná nestálá hodnota cytosolického pH buněk v MES pufru. MES pufr má nižší iontovou sílu než CP pufr, a tak je bezprostředně u membrány buněk kyselejší prostředí. Změněným povrchovým nábojem buněk, díky kterému se mění lokální pH na membráně, je pak zapříčiněn zvýšený tok H^+ . Možná reakce buňky na tento stres je posílení pufrčních mechanismů.

Naměřené hodnoty β bakteriálních buněk v CP pufrch se dále liší podle pH okolní suspenze. V kyselejší prostředí byla pozorována schopnost pufrce obecně nižší, průměrná naměřená hodnota pro oblast vnějšího pH 4,7 – 6,2 je $\beta = 25 \text{ mM/l}$. Schopnost držet si stále cytosolické pH je vyšší při podmínkách blízcích se optimálnímu cytosolickému pH buněk, tedy při pH 7, kde byla naměřena hodnota $\beta = 51 \text{ mM/l}$ s maximální odchylkou 72 mM/l. Průměrná pufrční kapacita v rozmezí pH 6,5 – 7,5 je $\beta = 46 \text{ mM/l}$.

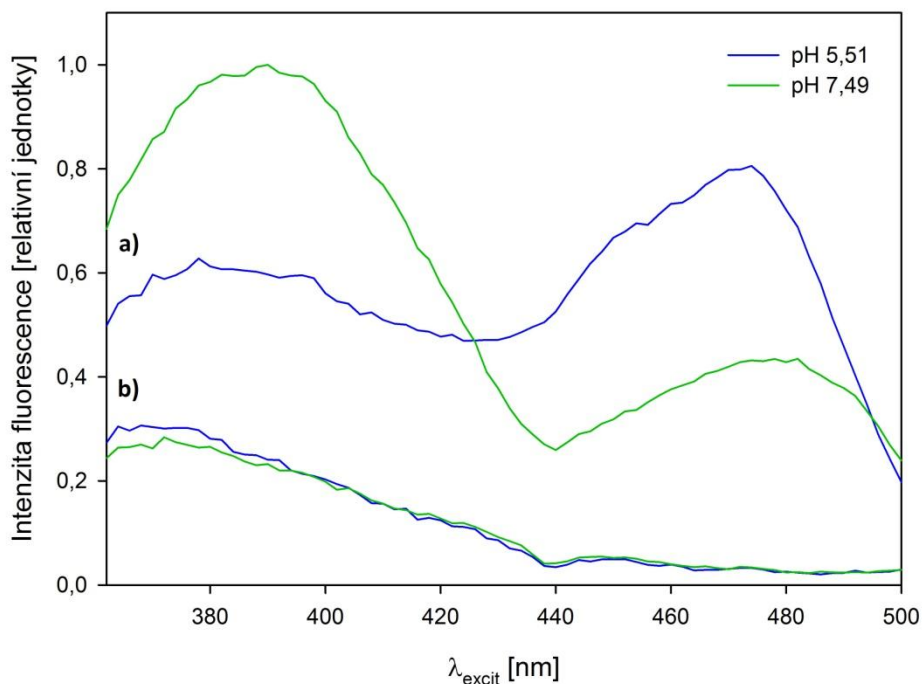
Získané výsledky naměřené v MES i CP pufrch se shodují s výsledky v pracech [7], [9], kde byly publikovány hodnoty pufrční kapacity bakterií kmene

E. coli $\beta = 105 \pm 25$ mM/l v MES pufru o pH 5,5 a 40 – 50 mM/l v CP pufrach o pH 4,7 – 5,5. Tyto hodnoty se i pro CP pufr v rámci chyby shodují se mnou naměřenými.

4.2. Výsledky experimentů provedených na kvasinkách *S. cerevisiae*

4.2.1. Odstranění autofluorescence buněk a dalších příspěvků pozadí ze spekter pHluorinu

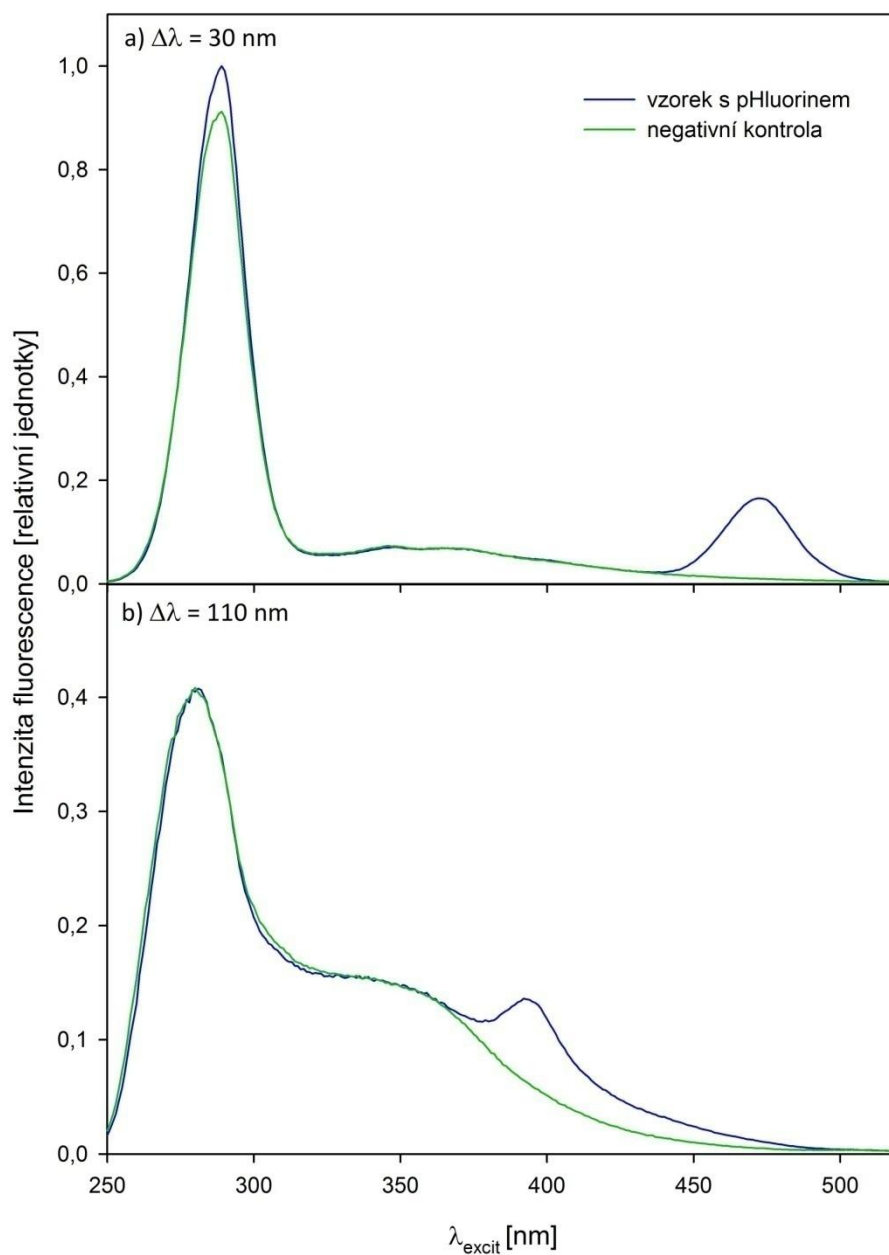
Ve všech experimentech prováděných na kvasinkách *S. cerevisiae* byla stejně jako v případě bakterií *E. coli* použita GFP sonda citlivá na pH – pHluorin. Byla změřena přímá excitační fluorescenční spektra buněk s tímto senzorem a naplnilo se očekávání relativně silné autofluorescence vyskytující se pod pásy příslušející sondě.



Obr.4.6 – Excitační fluorescenční spektra získaná z a) kvasinek kmene BY4742+pHL a b) kontrolního kmene BY4742[YEp352] v kalibračních pufrach. Modře jsou zobrazena spektra vzorků pro pH 5,51, zeleně pro pH 7,49.

Na Obr.4.6 jsou zobrazena excitační fluorescenční spektra dvou vzorků s vyrovnaným pH uvnitř a vně buněk pomocí kalibračních pufrů, jejichž složení je popsáno v kapitole 3.3. Ke každému vzorku kmene BY4742+pHL s pHluorinem bylo naměřeno také kontrolní spektrum na buňkách kmene BY4742[YEp352], které sondu neobsahují, v odpovídajícím pufru. Spektra kontrolních vzorků jsou také zanesena v grafu na Obr.4.6. Naměřená intenzita fluorescence byla znormována a od spekter bylo odečteno pozadí pocházející od použitého pufru. Tato spektra ukazují na možný příspěvek autofluorescence k celkovému signálu získanému z buněk obsahující pHluorin. Ten je největší na vlnových délkách kratších než 440 nm, kde nezanedbatelně přispívá k intenzitě fluorescence odečtené z krátkovlnnějšího pásu chromoforu GFP a prakticky nezávisí na pH okolní suspenze. Je ovšem nutné říci, že tento příspěvek k autofluorescenci byl naměřen na jiném mutantním kmeni než používáme při detekci pH_{in} , tedy pro konkrétní kmen BY4742+pHL může být více, anebo méně odlišný (viz srovnání autofluorescence dvou kmenů *S. cerevisiae* v úvodu kapitoly 2.5). Samotnou autofluorescenci buněk obsahujících GFP sondu totiž nelze snadno změřit. Z tvaru spekter zobrazených na Obr.4.6 je zřejmé, že chybná korekce autofluorescenčního pozadí může výrazně zkreslit pozorované poměry intenzit, a tím v důsledku měření pH_{in} .

Pro odstranění nežádoucích příspěvků pozadí k signálu pHluorinu jsem dále testovala možnost využití synchronně skenované fluorescence s konstantní vzdáleností vlnových délek. Tato technika je blíže představena v kapitole 2.5.3. Jedna společná optimální vzdálenost vlnových délek excitace a emise při SF experimentu pro zdůraznění obou excitačních pásů GFP nebyla nalezena. Při offsetu $\Delta\lambda = 30$ nm je dobře pozorovatelný dlouhovlnější excitační pás, při $\Delta\lambda = 110$ nm pak pás vyskytující se v excitačním spektru na kratších vlnových délkách. Pro obě $\Delta\lambda$ byla změřena SF spektra stejných vzorků, na jakých byla měřena i spektra excitační diskutovaná výše. Získaná SF spektra od vzorku s pHluorinem v kalibračním pufru o pH 5,51 a jeho negativní kontroly jsou zobrazena na Obr.4.7. Jako škála na ose x je použita vlnová délka vybraná excitačním monochromátorem. Pro získaná spektra z obou nastavení $\Delta\lambda$ bylo provedeno stejné normování intenzity fluorescence. Celková intenzita obou spekter byla normována na jednotkovou intenzitu v maximu spektra při offsetu $\Delta\lambda = 30$ nm.



Obr.4.7 – SF spektra naměřená při offsetu a) $\Delta\lambda = 30$ nm, b) $\Delta\lambda = 110$ nm na vzorku kmene BY4742+pHL (modře) a kontrolního kmene BY4742[YEp352] (zeleně). Spektra při obou $\Delta\lambda$ byla normována na jednotkovou intenzitu v maximu spektra vzorku s pHluorinem při $\Delta\lambda = 30$ nm. Buňky byly suspendovány v kalibračním pufru o pH 5,51.

Pás o největší intenzitě vyskytující se na vlnové délce ~ 289 nm ve spektru s $\Delta\lambda = 30$ nm, respektive na ~ 281 nm ve spektru s $\Delta\lambda = 110$ nm, přísluší fluorescenci peptidové kostry GFP, neboť aromatické aminokyseliny Trp, Tyr a Phe mají maximum svého absorpčního spektra v oblasti 255 – 280 nm. Jejich emise je pak posunuta o 25 – 75 nm do červena [61]. Při této vzdálenosti vlnových délek by tedy byl signál jejich fluorescence zdůrazněn nejlépe. Jejich excitační i emisní pásy jsou však relativně široké, takže jsou v SF spektrech dobře viditelné při velkém rozsahu použitých vzdáleností $\Delta\lambda$ zahrnujícím i 30 a 110 nm. Nastavení $\Delta\lambda = 30$ nm však splňuje podmínku pro zdůraznění těchto pásů lépe, což je zřejmé i na celkově vyšší intenzitě signálu proteinů než pro $\Delta\lambda = 110$ nm (viz Obr.4.7, pozor na odlišné škálování ypsilonové osy).

Rameno vyskytující se v okolí excitační vlnové délky ~ 350 nm lze snadno interpretovat jako signál od NAD(P)H. Maximum excitace volného NAD(P)H je na ~ 360 nm, maximum jeho emise na ~ 460 nm [33]. Fluorescenční signál této molekuly by tedy měl být nejlépe pozorovatelný v SF spektru při offsetu $\Delta\lambda = 100$ nm na excitačních vlnových délkách kolem ~ 360 nm, kde jej vidíme i v experimentu skenujícím excitační a emisní spektrum se vzdáleností vlnových délek $\Delta\lambda = 110$ nm.

Celulární autofluorescenci bychom mohli pozorovat při nastavení $\Delta\lambda = 80$ nebo 140 nm [33]. Od těchto hodnot $\Delta\lambda$ jsou však experimenty zaměřující se na signál GFP natolik vzdáleny, že je spektrum dalších autofluorescenčních komponent buněk potlačeno.

Všechny dosud diskutované příspěvky se vyskytují jak ve spektrech získaných z kmene BY4742+pHL, tak z BY4742[YEp352]. Na Obr.4.7 jsou jasně vidět ostré pásy chromoforu GFP – při $\Delta\lambda = 30$ nm na vlnové délce ~ 476 nm a při $\Delta\lambda = 110$ nm na ~ 393 nm. Pro odečtení intenzity fluorescence v těchto pásech lze buď odečítat spektrum negativní kontroly, jako bylo potřebné u přímých excitačních spekter, nebo lze pouze provést korekci odečtením přímky. Srovnání těchto dvou technik zpracování spekter je provedeno v kapitole 4.2.2. Při odečítání spektra kontrolního vzorku u SF spekter máme oproti přímým excitačním spektrům další nezanedbatelnou výhodu – víme, kde je začátek a konec fluorescenčních pásů GFP. Můžeme tedy posoudit, zda mají odečítaná spektra autofluorescence správnou intenzitu. V případě neshody je lze vynásobit vhodným korekčním faktorem tak, aby mimo spektrum GFP byla po odečtení pozadí nula.

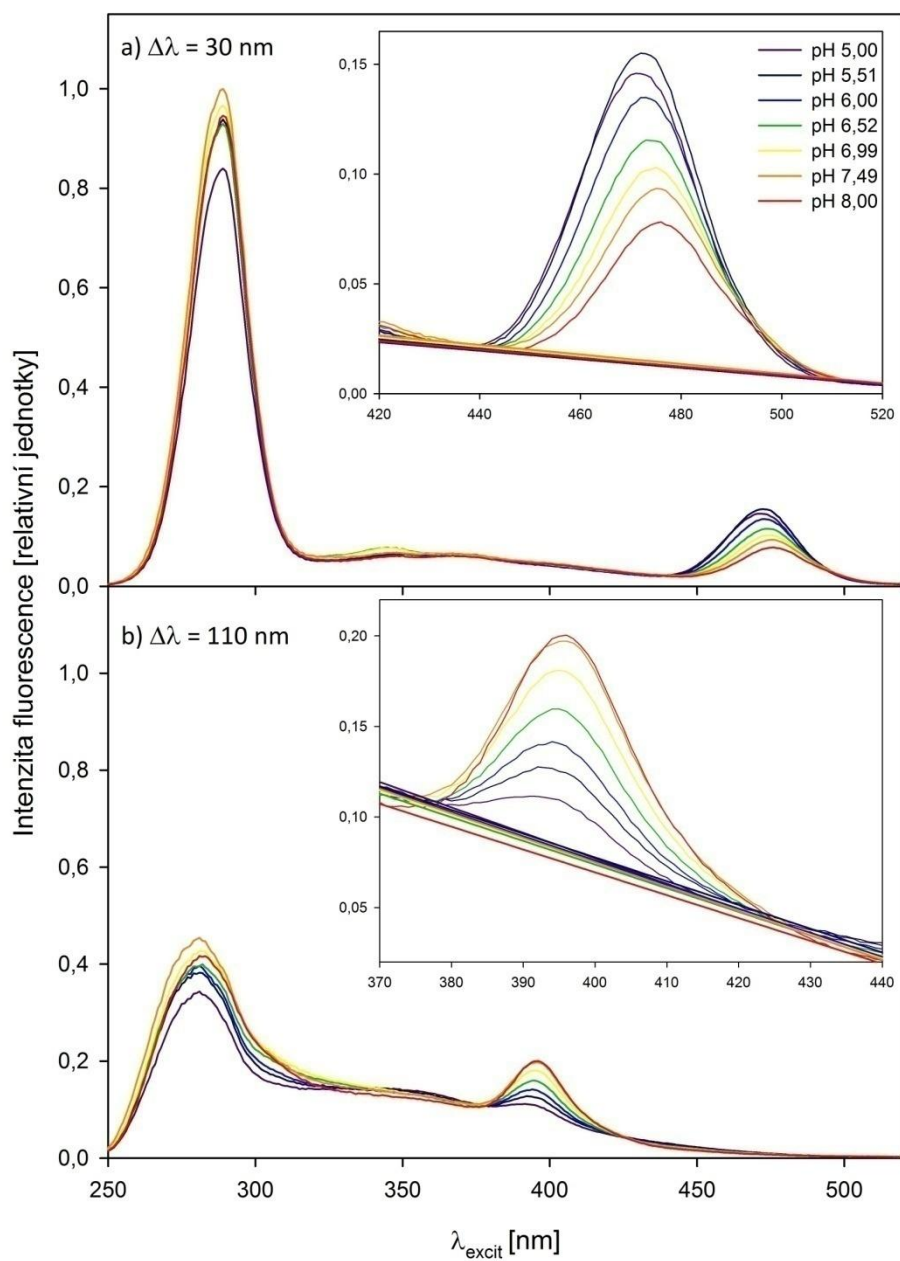
4.2.2. Kalibrace odezvy pHluorinu

Pro kalibraci odezvy bylo nutné vyrovnat pH suspenze s cytosolickým pH v buňkách. V souladu s tvrzením publikovaným v práci [8] bylo pozorováno ovlivnění spekter pHluorinu po přidání ionoforu CCCP, který jsem používala pro stejný účel u bakteriálních vzorků. Další možností bylo použití jiného protonoforu – azidu sodného. Ten funguje v kvasinkových buňkách jako inhibitor F-ATPázy, neboť stabilizuje inaktivní komplex mezi ADP a F-ATPázou [62], [63]. Buňky jsem také zkoušela permeabilizovat kalibračními pufrými popsanými v kapitole 3.3. Tyto pufrý také obsahují azid sodný, a to v koncentraci 10 mM. Při přidávání samotného protonoforu jsem používala stejnou koncentraci jako ve zmíněných kalibračních pufrých. Posledním použitým způsobem vyrovnání pH v okolí chromoforu sondy s pH pufru bylo snímání spekter na lyzátu buněk s pHluorinem.

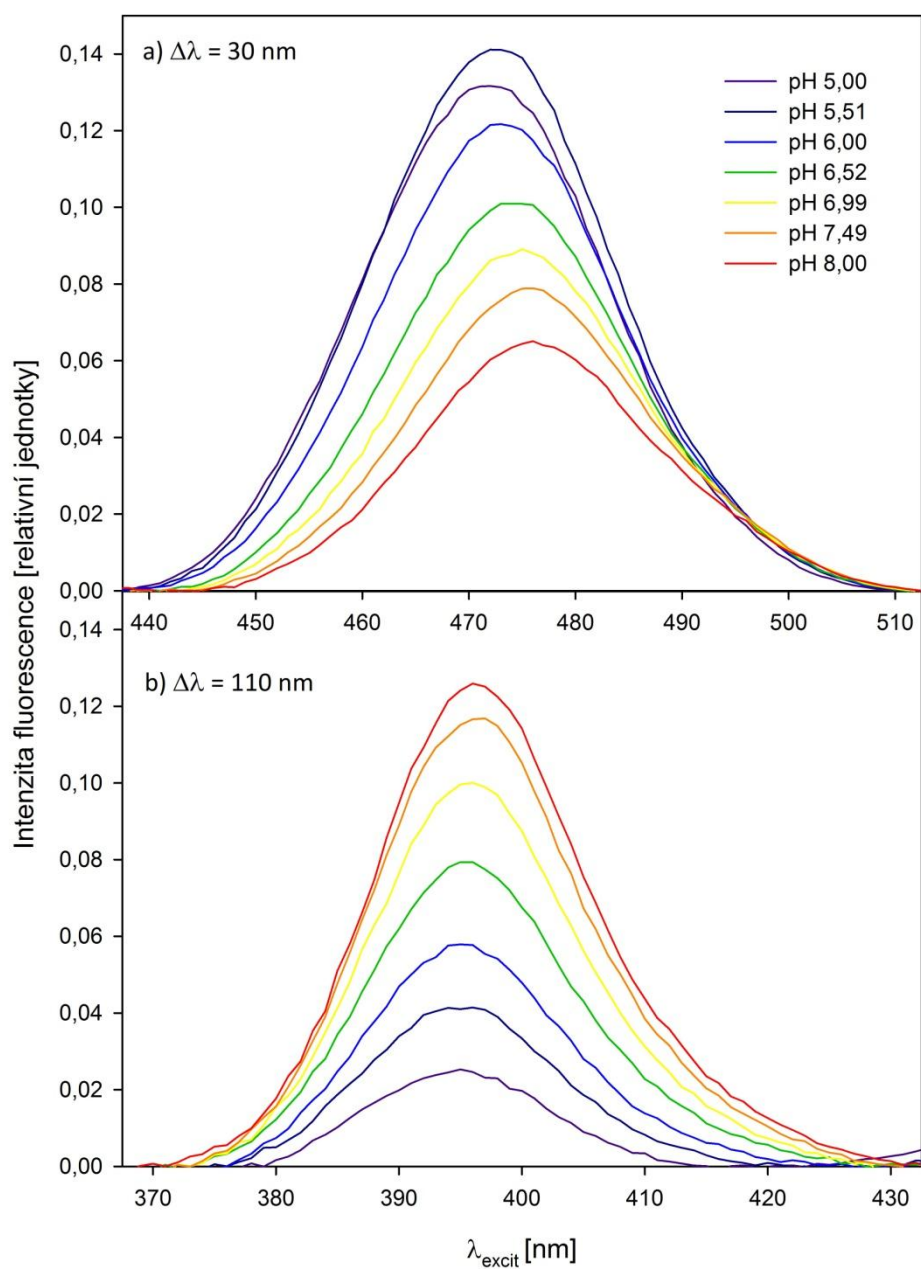
Změny pozorované pro různá pH suspenze v excitačních i SF spektrech měřených na vzorcích v CP pufrých s přidavkem 10 mM azidu sodného byly signifikantně menší než změny ve vzorcích suspendovaných v kalibračních pufrých. Z toho usuzuji, že samotný azid sodný nezpůsobí plné vyrovnání cytosolického pH s okolní suspenzí. Proto jsem jej dále pro účely kalibrací nepoužívala.

Na Obr.4.8 jsou vynesena SF spektra naměřená na sérii vzorků obsahujících pHluorin v kalibračních pufrých o rozmezí pH 5 – 8. Spektra byla opět normována stejnou hodnotou, aby se nezměnil celkový poměr intenzity fluorescence odečítaný z obou pásů sondy. Pro znázornění poměrné intenzity signálu získané z obou experimentů jsou spektra zobrazena ve stejné škále na ypsilonové ose. Ve výřezech jsou zvětšeny oblasti výskytu pásů pHluorinu a pod nimi přímky, které byly odečítány od hrubých spekter. Tímto jednoduchým zpracováním jsem získala spektra samotných pásů fluoroforu sondy, jejichž základny dobře sedí na nulové intenzitě.

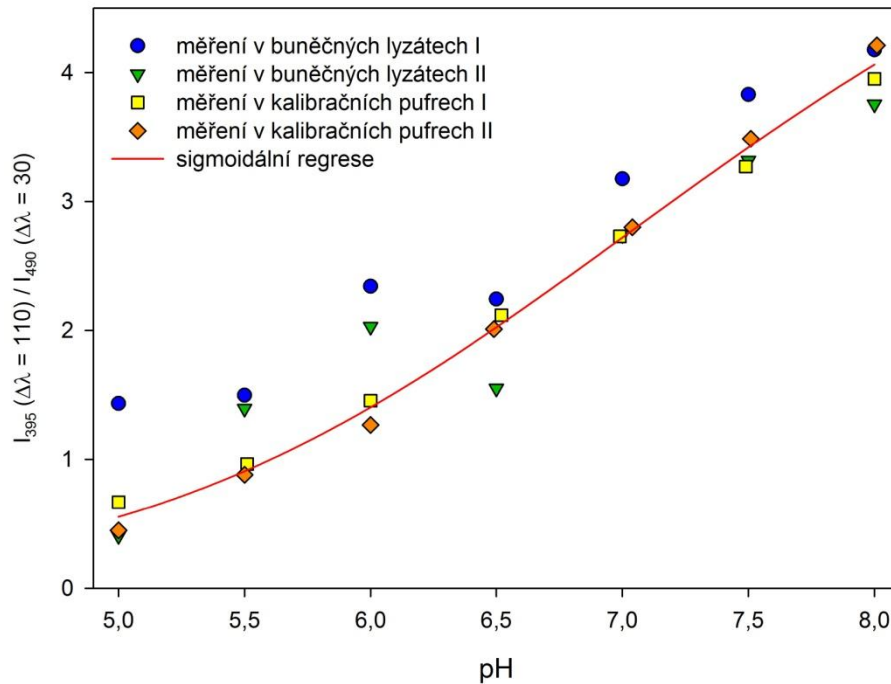
Ověřila jsem, že tímto zpracováním dostaneme téměř totožné hodnoty poměrů intenzit pásů jako při odečítání pozadí v podobě spektra kontrolního vzorku. Rozdíl odečtené hodnoty poměru ze spekter zpracovaných těmito dvěma způsoby je o řád nižší než chyba odečtu pH_{in} z kalibrační křivky. Spektra po odečtení přímky pro oba offsety $\Delta\lambda$ jsou zobrazena na Obr.4.9. Je zde jednoznačně patrné vzájemné přelévání intenzity signálu mezi oběma pásy při změnách pH v okolí sondy.



Obr.4.8 – SF spektra kvasinek kmene BY4742+pHL suspendovaných v kalibračních pufrech o pH v rozmezí 5 – 8 při offsetu a) $\Delta\lambda = 30$ nm, b) $\Delta\lambda = 110$ nm. Ve výřezech je detail pásů pHluorinu s přímkami odečítanými od spekter při zpracování.



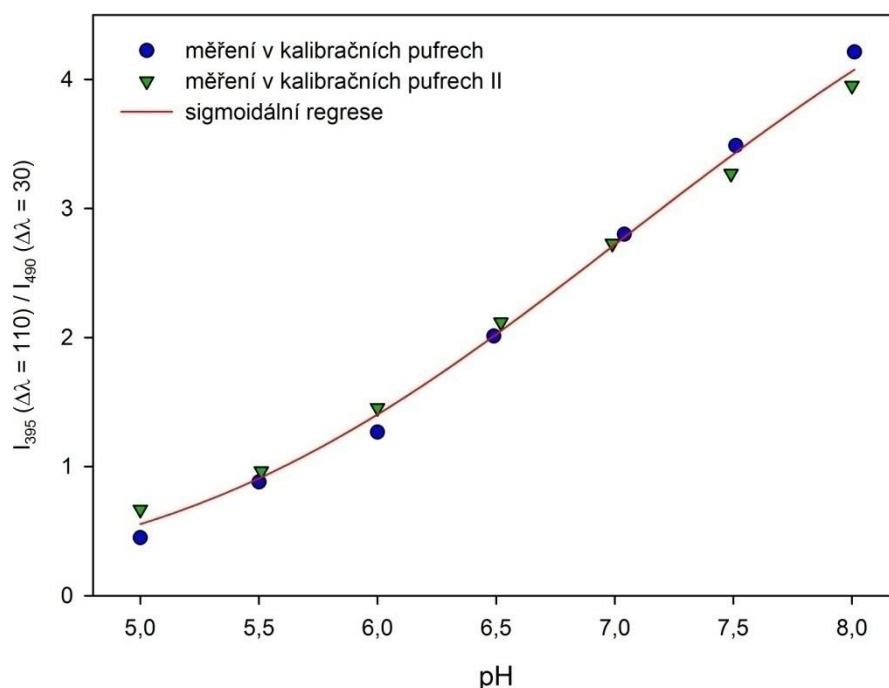
Obr.4.9 – SF spektra pHluorinu získaná z kvasinek kmene BY4742+pHL suspendovaných v kalibračních pufrách o pH v rozmezí 5 – 8 při offsetu a) $\Delta\lambda = 30$ nm, b) $\Delta\lambda = 110$ nm po odečtu přímky z hrubých dat.



Obr.4.10 – Kalibrační křivka pHluorinu v kvasinkách *S. cerevisiae*. Znáznorněn je také sigmoidální fit spočtený podle vzorce (8) z hodnot naměřených v kalibračních pufrch.

Pro odečet poměru intenzit byly vybrány vlnové délky 395 nm při $\Delta\lambda = 110$ nm a 490 nm při $\Delta\lambda = 30$ nm. Na Obr.4.10 jsou hodnoty tohoto poměru získané z kalibračních experimentů při zpropustnění membrány kvasinek pomocí kalibračních pufrů anebo při použití buněčného lyzátu. Jak je vidět z Obr.4.10, vzorky s lyzátem buněk mají relativně velký rozptyl, získané hodnoty poměrů nejsou monotónně rostoucí, ale jsou rozházené. Série vzorků znázorněná modře je dokonce mírně systematicky posunutá směrem k vyšším hodnotám poměru. Pokud se zaměříme pouze na vzorky se zpropustněnou membránou pomocí kalibračních pufrů, naměřené hodnoty monotónně rostou a rozdíl naměřených hodnot z obou experimentů je minimální. Navíc jde narozdíl od lyzátů o vzorky se zachovalými buňkami, a tak by fluorescence GFP měla lépe odpovídat fyziologickým podmínkám. Z toho důvodu jsem sestrojila kalibrační křivku jen s pomocí hodnot získaných ze vzorků suspendovaných v kalibračních pufrch. Data byla fitována stejnou sigmoidální závislostí jako byla používána při kalibraci odezvy pHluorinu u bakterií *E. coli* (vztah (8), kapitola 4.1.1), pro fit byly použity hodnoty naměřené ze

vzorků v kalibračních pufrech. Závislost je zobrazena na Obr.4.11. Hodnoty naitovaných konstant jsou shrnuty v Tabulce VIII.



Obr.4.11 – Kalibrační křivka pHluorinu v kvasinkách *S. cerevisiae* získaná ze vzorků suspendovaných v kalibračních pufrech. Naměřené hodnoty byly proloženy sigmoidální závislostí podle vzorce (8).

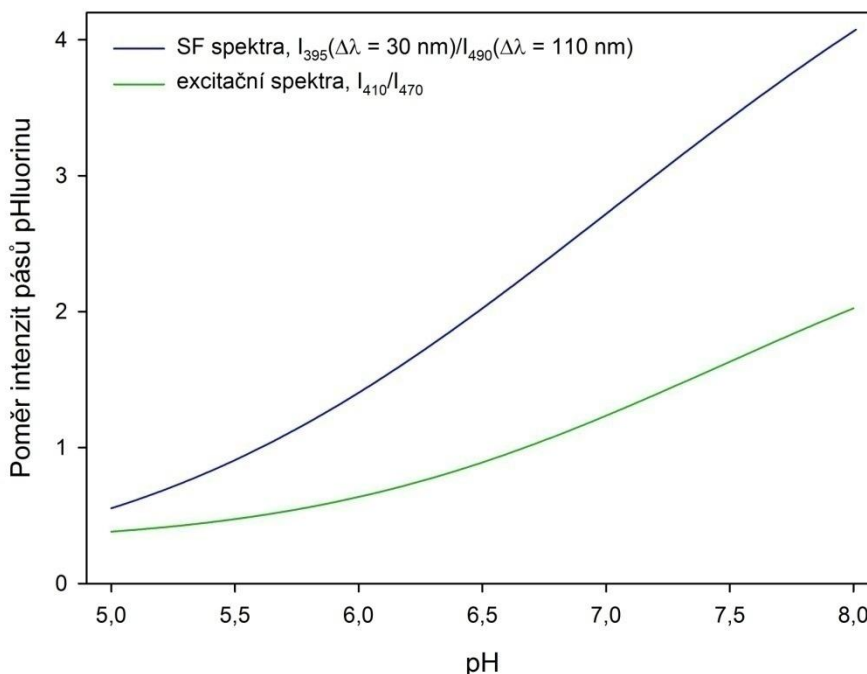
Tabulka VIII – Konstanty sigmoidálního fitu kalibrační křivky

konstanta	naitovaná hodnota
I_{max}	6,38
n_H	6,41
$K_{0,5}$	7,38
C	0,07

Dobrou vlastností získané kalibrační křivky je její rovnoměrná strmost na celém studovaném rozsahu pH. Celková chyba odečtu pH_{in} tak není příliš ovlivněna měnící se strmostí závislosti, jako tomu je u kalibrační křivky získané z přímých excitačních spekter. Na Obr.4.12 je srovnání možných kalibračních křivek:

1. Z odečtení poměru I_{410}/I_{470} z excitačních fluorescenčních spekter kvasinek s pHluorinem po odečtu spektra kontrolních vzorků
2. Z odečtení poměru $I_{395}(\Delta\lambda = 110 \text{ nm})/I_{490}(\Delta\lambda = 30 \text{ nm})$ ze SF spekter kvasinek s pHluorinem po odečtení přímky od pásů fluoroforu sondy

Kalibrační křivka získaná ze SF spekter je o mnoho strmější než křivka ukazující poměr intenzit pásů v excitačních spektrech. Její strmost je navíc téměř neměnná na celé škále měřeného pH. Určení pH_{in} je tedy spolehlivé i pro hodnoty $pH < 5,5$. V této oblasti jsou změny poměru intenzit pásů pozorované v excitačním spektru buněk s pHluorinem již tak malé, že se nedá zcela spolehlivě pH_{in} odečíst. Na tento problém jsem narazila již u určování pH_{in} v bakteriálních buňkách (viz kapitola 4.1.1). V SF spektrech byl navíc pozorován o poznání lepší poměr signálu k šumu při stejném nastavení šířky štěrbin monochromátorů (obě 5 nm) a stejné načítací době jednotlivých kroků (0,1 s). V excitačních spektrech byl větší šum pozorován v krátkovlnném pásu, kde je poměr průměrné intenzity signálu k šumu 49, v dlouhovlnnějším pásu je tento poměr lepší – kolem hodnoty 82. Při odečtu stejné charakteristiky ze SF spekter získáme průměrnou hodnot poměru signál-šum u krátkovlnného pásu 73, u dlouhovlnného pásu pak 136. Chyba zanesená náhodnými fluktuacemi signálu je tedy u odečítání poměru intenzit pásů GFP ze SF spekter snižena. Relativní chyba určení poměru intenzit je 3,3% při určování poměru z excitačních a 2,1% ze SF spekter.



Obr.4.12 – Srovnání možných kalibračních křivek získaných z přímých excitačních spekter (modře) a SF spekter (zeleně).

Celková chyba určení pH_{in} z poměru $I_{395}(\Delta\lambda = 110 \text{ nm})/I_{490}(\Delta\lambda = 30 \text{ nm})$ je dána hlavně rozptylem naměřených hodnot. Chyba určení poměru vzniklá šumem je řádově nižší. Chyby získané jako součet obou příspěvků jsou shrnuty v Tabulce IX.

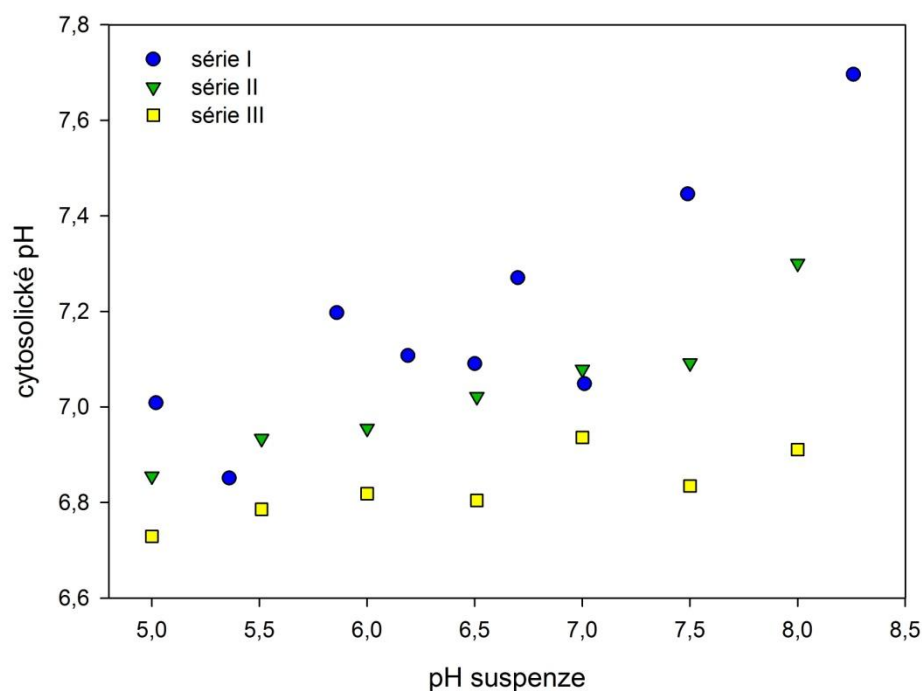
Tabulka IX – Chyba určení pH_{in} z kalibrační křivky

rozmezí pH_{in}	chyba určení pH_{in}
5,0 – 5,5	$\pm 0,2$
5,0 – 7,5	$\pm 0,1$
7,5 – 8,5	$\pm 0,2$

4.2.3. Vliv různého pH suspenze na schopnost udržování stálého cytosolického pH

V další sérii experimentů jsem sledovala schopnost kvasinkových buněk udržovat si svou pH homeostázi v závislosti na pH okolní suspenze. Protony jsou nabitě částice, tedy nemohou volně difundovat skrz membránu a tím změnit pH_{in} , ale ovlivňují membránový potenciál a tím činnost ATPáz. Tímto způsobem mohou hodnotu vnitrobuněčného pH ovlivnit.

V grafu na Obr.4.13 jsou zaneseny hodnoty cytosolického pH naměřeného ve třech různých experimentech v buňkách suspendovaných v CP pufrch o pH v rozmezí 5 – 8,3. Ačkoliv byly všechny buňky, jejichž hodnoty pH_{in} jsou znázorněny na Obr.4.13, pěstovány za naprosto stejných podmínek, vidíme zde systematické posunutí mezi jednotlivými sériemi měření. Tento jev přisuzuji biologické povaze vzorků. U buněk měřených v sérii II a III (na Obr.4.13 zeleně a žlutě) byla pozorována velice dobrá schopnost udržení stálého cytosolického pH na celé studované škále pH okolní suspenze. Je zde patrný pouze celkový mírný nárůst hodnot pH_{in} , který je silnější pro okolní $pH > 7,5$. U vzorků v první sérii měření (na Obr.4.13 modře) je celková rostoucí závislost vnitrobuněčného pH na rostoucí koncentraci H^+ iontů v okolí větší. Nicméně všechny studované kvasinky si udržují relativně stabilní hodnotu cytosolického pH při okolním pH 5 – 7, jejíž střední hodnota je rovna 7,0.



Obr.4.13 – Znázornění schopnosti buněk udržet si stálé cytosolické pH při různých hodnotách pH okolního pufru. Zobrazeny jsou hodnoty získané při třech sériích experimentů V CP pufrch. Experimenty byly provedeny za totožných podmínek.

Výsledky získané z experimentů jsou ve velice dobré shodě s pracemi [3], [17] a [64]. Podle studie Orije a kol. [3] jsou tyto buňky schopny udržovat si stálé cytosolické pH bez ohledu na okolní pH dokonce v rozmezí 3 – 7,5. V tomto rozmezí si buňky udržují pH_{in} kolem hodnoty 7,2. Pokud však okolní pH vzroste na hodnotu 8, byl pozorován systematický nárůst pH_{in} na novou stabilní hodnotu 7,5. Mé pozorování potvrzuje, že kvasinky *S. cerevisiae* mají velmi dobrou odolnost vůči změnám pH okolí při vnějším pH 5 – 7 a při dalším zvyšování pH jejich cytosolické pH roste.

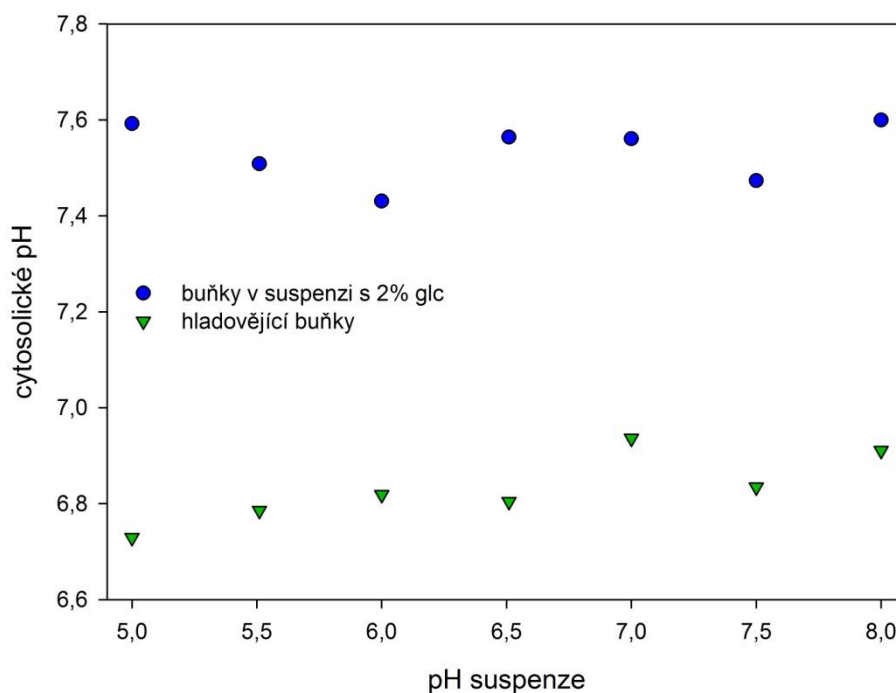
Valli a kol. [17] pozorovali, že u buněk narostlých v polovině exponenciální fáze hodnoty cytosolického pH mírně a téměř lineárně rostou se zvyšujícím se pH okolní suspenze. V práci [17] byla změřena distribuce pH_{in} v populaci kvasinkových buněk. Některé populace jsou rozdělené na dvě subpopulace s odlišným cytosolickým pH. U exponenciálně narostlých buněk se vyskytuje při vnějším $pH < 5$ subpopulace s hodnotou pH_{in} 5,5, pokud okolní pH klesá ještě dále do kyselé oblasti, tak tato subpopulace sílí. Při okolním $pH > 5$ je přítomna pouze jedna populace s pH_{in} rostoucím od 6,5 při vnějším pH 5 k 7,2 při pH okolí 7.

V experimentech provedených v diplomové práci byl v souladu s tímto tvrzením pozorován stejný mírně rostoucí trend, jak je vidět na závislosti v grafu na Obr.4.13.

Možné vysvětlení nárůstu hodnoty pH_{in} v buňkách poskytuje práce [64]. Zvýšená koncentrace H^+ iontů vně buňky ovlivňuje membránový potenciál. Při vnějším pH 5 – 6 je depolarizace rovna 11 mV, při dalším okyselování okolní suspenze ještě dále narůstá [64]. V kyselých pH je tedy membrána kvasinek pro protony propustnější, pozorované cytosolické pH by tedy mělo být nižší.

4.2.4. Vliv glukózy na cytosolické pH

V experimentech sledujících efekt glukózy na cytosolické pH bylo nejprve změřeno pH_{in} ve vzorcích v čistých CP pufrech, poté byla do kyvet se vzorky přidána glukóza v konečné koncentraci 2%. Po zhruba půl hodině byly vzorky přeměřeny znovu. Tento experiment byl proveden za účelem porovnání schopnosti buněk udržovat pH homeostázi při hladovění a po přidání výživy v podobě glukózy.



Obr.4.14 – Závislost vnitrobuněčného pH kvasinek *S. cerevisiae* na přidavku glukózy do suspenze.

Získané výsledky jsou zaneseny na Obr.4.14. Prvním znakem, kterého si lze všimnout je markantní změna v absolutní hodnotě pH_{in} , které si buňky udržují, pokud

mají dostatek glukózy pro svou výživu. Naměřené hodnoty pH_{in} v hladovějících buňkách se pohybují v rozmezí 6,6 – 6,8 s průměrnou hodnotou 6,7. U hladovějících buněk je patrný mírný rostoucí trend s rostoucím pH suspenze. Po přidání 2% glukózy do suspenze vzrostla průměrná hodnota pH_{in} na 7,5 s rozptylem hodnot mezi 7,4 – 7,6. Narozdíl od hladovějících buněk je však rozptyl naměřených hodnot kolem průměrného pH_{in} rovnoměrný na celé škále okolního pH. Tento výsledek ukazuje na možnou vyšší odolnost buněk vůči změnám pH okolního prostředí po přidání glukózy. Rostoucí trend pH_{in} s pH suspenze u hladovějících buněk v tomto konkrétním experimentu je však tak malý, že to díky velké chybě určení pH_{in} nelze říci s jistotou.

Velký nárůst cytosolického pH byl popsán již dříve [3], [10]. Oriji a kol. ve své práci [3] monitorovali nárůst hodnot pH_{in} v buňkách *S. cerevisiae* v čase po přidání glukózy do suspenze. Podle jejich měření během hladovění (více než 1 h) klesla hodnota cytosolického pH v buňkách až na 5,7. Tento jev jsem nepozorovala, neboť buňky hladověly pouze několik desítek minut. Během prvních 20 s po přidání glukózy dochází k rychlému okyselení až na hodnotu 5,3, poté cytosolické pH lineárně narůstá a během 100 s dosáhne hodnoty 6,5.

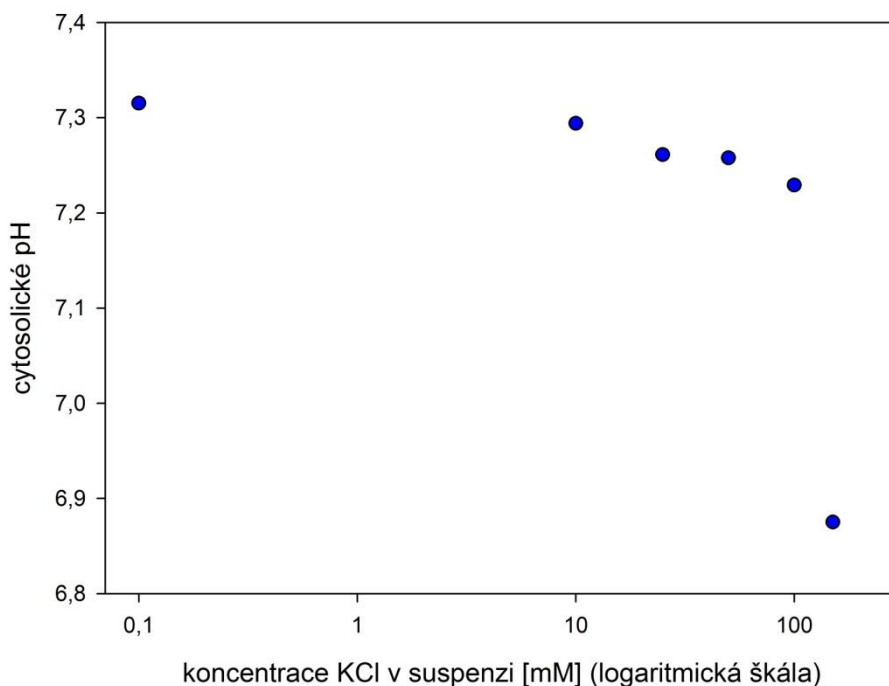
Martinez-Munoz a Kane [10] kromě celkového nárůstu pH_{in} po přidání glukózy do suspenze pozorovali také větší odolnost buněk vůči změnám vnějšího pH. Ve vzorcích s přidavkem glukózy se pH_{in} buněk pohybovalo od 6,7 při vnějším pH 5 k hodnotě 7,1 při vnějším pH 7,5.

4.2.5. Vliv KCl na cytosolické pH

Nejen navýšení vnější koncentrace H^+ iontů způsobuje depolarizaci buněčné membrány kvasinek a tím ovlivňuje hodnotu cytosolického pH. Podobný efekt mají i další ionty – například K^+ .

V poslední sérii experimentů jsem sledovala schopnost kvasinkových buněk udržet si stále vnitřní pH při různé koncentraci KCl v suspenzi. Byla provedena měření pro tyto koncentrace KCl: 1, 10, 20, 50, 100 a 150 mM. Iontová síla suspenze byla při nízkých koncentracích KCl dorovnána cholin chloridem. Tedy ve vzorcích byla různá pouze koncentrace iontů K^+ , avšak koncentrace Cl^- zůstala stejná. Naměřené hodnoty pH_{in} získané ze SF experimentů jsou zobrazeny na Obr.4.15.

I přes celkově klesající tendenci cytosolického pH byla pozorována překvapivě velká odolnost buněk vůči narůstající koncentraci KCl v suspenzi. Až do koncentrace KCl 100 mM byly studované buňky schopny si udržet pH_{in} na hodnotách 7,2 – 7,3. Teprve při nárůstu na 150 mM nastal signifikantní pokles hodnoty pH_{in} na 6,9.



Obr.4.15 – Závislost vnitrobuněčného pH v buňkách *S. cerevisiae* na koncentraci KCl v okolní suspenzi.

Podle [64] začíná depolarizace buněčné membrány u vnější koncentrace KCl 10 mM. Při koncentraci 50 mM je již 30 mV a při koncentraci 100 mM roste potenciál na membráně až ke zmiňované hodnotě 53 mV. Při nižších koncentracích než 10 mM je vtok K^+ pravděpodobně elektricky vykompenzován zvýšeným výtokem protonů přes H^+ -ATPázu na vnější membráně buňky. Při koncentracích vyšších však již tato pumpa nemůže vtok kladných iontů vykompenzovat a dochází k depolarizaci buňky.

Pokles cytosolického pH po přidání KCl do suspenze byl pozorován také v pracích [59] a [65]. Acidifikace pozorovaná nad koncentrací KCl 50 mM koresponduje také s depolarizací kvasinek s přidanou glukózou, která byla pozorována v experimentech provedených J. Pláškem, M. Hoferem a kol. (soukromé sdělení – publikace v přípravě).

5. ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá měřením vnitrobuněčné koncentrace iontů v mikroorganismech pomocí fluorescenčních sond. Jako první krok práce jsem provedla přehled již existujících fluorescenčních sond použitelných v mikrobiálních buňkách. Zaměřila jsem se zejména na geneticky kódované sondy obsahující zelený fluorescenční protein (GFP).

Pro lepší porozumění spektrálním změnám pozorovaným v experimentální části práce u vybrané sondy jsem dále prostudovala literaturu zabývající se strukturou fluoroforu GFP, jeho spektrálními charakteristikami a jevy ovlivňujícími tyto charakteristiky. V excitačním spektru GFP se vyskytují dva pásy odpovídající neutrální a deprotonované formě fluoroforu, mezi kterými může molekula fluoroforu přecházet. Ustanovení rovnováhy neutrální a anionické formy je i u divokého typu GFP závislé na okolním pH, avšak tyto změny nejsou dobře kvantifikovatelné. Bodovými mutacemi divokého typu byl nalezen mutant, označovaný jako poměrový pHluorin, reagující na změny pH ve svém okolí poklesem intenzity fluorescence jednoho excitačního pásu a současným nárůstem intenzity pásu druhého. Tento senzor byl vybrán pro experimentální část práce.

Experimenty byly prováděny na bakteriích *Escherichia coli* a kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Používané mutantní kmeny obou druhů organismů obsahují plazmid s genetickou informací pro expresi pHluorinu.

V excitačních spektrech bakterií *E. coli* nebyl pozorován žádný problém s pozadím, které by zasahovalo do oblasti fluorescence pHluorinu. Kalibrační křivku odezvy sondy bylo možné získat přímo z hrubých excitačních spekter. Pomocí odečtu poměru intenzity dvou fluorescenčních pásů pHluorinu lze odečítat vnitrobuněčné pH (pH_{in}) v bakteriích v rozmezí 5,5 – 9 s maximální chybou $\pm 0,4$. Při nižších hodnotách pH v okolí sondy než 5,5 již téměř zmizí krátkovlnný pás v excitačním spektru a pozorovaná změna poměru intenzity je tak malá, že nelze s jistotou pH_{in} odečíst.

V bakteriích byla pomocí pHluorinu dále pozorována schopnost buněk držet si stále vnitrobuněčné pH při různém pH a rozlišném chemickém složení okolí – v MES a CP pufrách při teplotě 31°C. Za stejných podmínek byla měřena také pufráční kapacita (β) buněk. Buňky si v CP pufrách udržují relativně stálou hodnotu

$\text{pH}_{\text{in}} = 7,5 - 7,6$. V MES pufru však hodnota cytosolického pH stálá není, β však ano. Bylo navíc zjištěno, že v MES pufru je β buněk o mnoho větší (průměrně 123 mM/l při pH 5,5) než v CP pufrch (průměrně 18 mM/l při pH 5,5). V tomto pufru je pravděpodobně přítomen větší tok H^+ než v CP pufrch zapříčiněný nižší iontovou silou MES pufru. Této skutečnosti odpovídá nestálá hodnota pH_{in} a důsledkem je zesílení pufracních mechanismů buněk. Schopnost pufrace buněk byla dále studována při různém pH okolní suspenze v CP pufrch. Nejnižší pufracní schopnost jsem pozorovala u buněk v kyselém prostředí (pH 4,7 – 6,2), kde β činí průměrně 25 mM/l. V okolí neutrálního pH (pH 6,5 – 7,5) je průměrná naměřená hodnota 46 mM/l. Největší schopnost pufrace byla pozorována právě pro neutrální hodnotu pH, při těchto podmínkách byla změřena průměrná hodnota 51 mM/l.

Při práci s kvasinkovými buňkami byl předpokládán problém s odstraněním autofluorescence ze získaného signálu. Literatura nabízí množství možností, jak tyto nechtěné příspěvky odstranit. Jednou z možností je zvýraznění požadovaných rysů z fluorescenčních spekter pomocí synchronně skenované fluorescenční spektroskopie (SF spektroskopie) s konstantní vzdáleností vlnových délek excitace a emise ($\Delta\lambda$). V diplomové práci jsem otestovala možnost využití této techniky pro získání čistého signálu fluoroforu GFP. V přímých excitačních spektrech se autofluorescence vyskytuje přímo pod krátkovlnným pásem pHluorinu. K jeho intenzitě tedy přispívá tento parazitní signál více než k druhému excitačnímu pásu a tím nepříznivě ovlivňuje odečítaný poměr intenzit fluorescence. V SF spektrech nabíraných při offsetu $\Delta\lambda = 30$ nm je zvýrazněn dlouhovlnný pás a při $\Delta\lambda = 110$ nm krátkovlnný pás fluoroforu pHluorinu. Ve spektrech je příspěvek fluorescence proteinů a NAD(P)H dobře oddělený od signálu GFP. Signál pocházející z celulární autofluorescence je zcela potlačen. Ověřila jsem, že při odečtu spektra kontrolního vzorku obsahujícího příbuzný kmen *S. cerevisiae* bez pHluorinu získám stejné hodnoty poměru pásů jako při odečtu přímky od pásů sondy. Zpracování synchronních spekter je tedy jednoduché a nevyžaduje aditivní proměňování kontrolních vzorků pro odečet pozadí.

Provedla jsem srovnání kalibrační křivky provedené z přímých excitačních spekter po odečtu signálu referenčního vzorku a kalibrační křivky získané ze SF spekter při offsetech $\Delta\lambda = 30$ a 110 nm. U klasické metody kalibrace jsem pozorovala stejný problém jako u kalibrace provedené na bakteriích *E. coli* – odečet

pH_{in} pomocí kalibrační křivky je při $pH < 5$ díky malé strmosti nespolehlivý. Oproti tomu spektrální změny pásů pozorované v SF spektrech umožňují určit pH_{in} na celé studované škále pH. V SF spektrech je navíc snížen pozorovaný poměr signálu k šumu. Tím je určení pH_{in} oproti přímým excitačním spektrům ještě zvýšeno. Chyba kalibrační křivky je určena hlavně rozptylem naměřených hodnot, v rozmezí pH 5,0 – 5,5 a 7,5 – 8,0 byla tato chyba určena $\pm 0,2$, při pH 5,5 – 7,5 pak pouze $\pm 0,1$.

S využitím SF metodiky jsem dále pozorovala schopnost kvasinkových buněk udržet si stále vnitrobuněčné pH při měnícím se pH okolní suspenze. Buňky jsou velmi odolné v rozmezí okolního pH 5 – 7. Udržují si relativně stabilní hodnotu pH_{in} kolem 7,0. Vysoká schopnost pufrace kvasinek *S. cerevisiae* byla již dříve pozorována dokonce v rozmezí pH 3 – 7,5 [3]. U všech pozorovaných vzorků je patrný mírný nárůst pH_{in} při rostoucím pH suspenze, rostoucí trend je silnější při $pH > 7,5$. Vliv zvýšené koncentrace H^+ iontů v okolí je tedy patrný, ale relativně malý.

Odolnost buněk vůči výkyvům okolního pH se navýší po přidání výživy v podobě 2% glukózy, neboť nárůst pH_{in} s navyšující se hodnotou vnějšího pH pozorovaný v hladovějících buňkách po přidání glukózy zmizí. Hodnota pH_{in} je navíc celkově posunuta oproti hladovějícím buňkám výše. V experimentu jsem pozorovala systematický posun pH_{in} půl hodiny po přidání 2% glukózy do suspenze z průměru 6,7 na 7,5.

Poslední série experimentů se zabývala měřením změn pH_{in} kvasinek při depolarizaci buněk po přidání KCl do suspenze v koncentracích 1 – 150 mM. Buňky mají velmi dobrou odolnost až do koncentrace 100 mM. Za těchto podmínek si buňky udržují hodnotu pH_{in} v rozmezí 7,2 – 7,3. Při překročení hraniční koncentrace 100 mM byl pozorován pokles na hodnotu $pH_{in} = 6,9$. Pozorovaný pokles pH_{in} koresponduje s dosud nepublikovanými výsledky měření depolarizace buněk naměřenou J. Pláškem, M. Hoferem a kol.

Hlavní přínos diplomové práce vidím v rozvoji metodiky synchronně skenované fluorescence. Důsledkem jejího použití je nejen potlačení nežádoucích příspěvků od fluorescenčního signálu, ale také zlepšení citlivosti používané sondy na celé studované škále pH. Tato metoda byla konfrontována s klasickým přístupem a použita na pozorování cytosolického pH kvasinek. Získané výsledky jsou ve velmi dobré shodě s již publikovanými hodnotami.

Seznam použité literatury

1. **Orij, P. J.** *On the intracellular pH of baker's yeast*. Amsterdam, 2010. Dizertační práce na Faculty of Science, University of Amsterdam, Vedoucí práce Dhr. Prof. Dr. Stanley Brul.
2. **Orij, R., Brul, S., Smits, G. J.** Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. Oct 2011, **1810**(10), 933-944.
3. **Orij, R., Postmus, J., Beek, A. T., Brul, S., Smits, G. J.** In vivo measurements of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology-SGM*. 2009, **155**, 268-278.
4. **Courville, P., Chaloupka, R., Cellier, M. F. M.** Recent progress in structure-function analyses of Nrap proton-dependent metal-ion transporters. *Biochemistry and Cell Biology*. Dec 2006, **84**(6), 960-978.
5. **Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A.** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. Aug 2001, **13**(4), 399-404.
6. **Poznanski, J., Szczesny, P., Rusczyńska-Bartnik, K., Zielenkiewicz, P., Paczek, L.** Proteins contribute insignificantly to the intrinsic buffering capacity of yeast cytoplasm. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013, **430**(2), 1090-2104.
7. **Straková, E.** *Studium faktorů ovlivňujících transport protonů transportním proteinem MntH*. Praha, 2007. Diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze, Vedoucí práce: RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.
8. **Marešová, L., Hošková, B., Urbánková, E., Chaloupka, R., Sychrová, H.** New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast*. Feb 2010, **27**, 317-325.
9. **Doležalová, I.** *Stechiometrie transportu membránovým transportním proteinem MntH bakterie E. coli*. Praha, 2010. Diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.
10. **Martinez-Monez, G. A., Kane, P.** Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. Jul 2008, **283**(29), 20309-20319.
11. **Haeming, H.A.H., Moen, P.J., Brooker, R. J.** Evidence that highly conserved residues of transmembrane segment 6 of *Escherichia coli* MntH are important for transport activity. *Biochemistry*. 2010, **49**, 4662-4671.
12. **Prosser, Václav a col.** *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3.
13. **Bagatoli, L. A.** To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. Oct 2006, **1758**(10), 1541-1556.

14. **Gaus, K., Zech, T., Harder, T.** Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy (Review). *Molecular Membrane Biology*. Jan/Feb 2006, **23**(1), 41-48.
15. **Domaille, D. W., Que, E. L., Chang, C. J.** Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nature Chemical Biology*. Mar 2008, **4**(3), 168-175.
16. **Hemmilä, I., Laitala, V.** Progress in lanthanides as luminiscent probes. *Journal of Fluorescence*. Jul 2005, **15**(4), 529-542.
17. **Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., Mattanovich, D.** Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. Mar 2005, **71**(3), 1515-1521.
18. **Lin, H., Herman, P., Lakowicz, J., R.** Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry Part A*. Apr 2003, **52A**(2), 77-89.
19. **Beranová, Lenka.** *Studium funkce bakteriálních transportérů dvojmocných kovů*. Praha, 2007. Diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze, Vedoucí práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.
20. **Shimomura, O.** Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Letters*. Aug 1979, **104**(2), 220-222.
21. **Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., Tsien, R. Y.** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. Nov 1995, **20**, 448-455.
22. **Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. Feb 1994, **263**(5148), 802-805.
23. **Bizzarri, R., Serresi, M., Luin, S., Beltram, F.** Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Feb 2009, **393**(4), 1107-1122.
24. **Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N. Jr.** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. Oct 1996, **14**(10), 1096-1246.
25. **Brejc, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M., Remington, S. J.** Structural basis for dual excitation and photoisomeration of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Biophysics*. Mar 1997, **94**, 2306-2311.
26. **Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J.** Crystal structure of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Science*. Sep 1996, **273**(5280), 1392-1395.
27. **Goodsell, David.** RCSB Protein Data Bank. [Online] [Citace: 28. 6. 2012.] <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=42>. doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2003_6.
28. **Voityuk, A. A., Michel-Beyerle M.-E., Rösch, N.** Protonation effects on the chromophore of green fluorescent protein. Quantum chemical study of the absorption spectrum. *Chemical Physics Letters*. Jun 1997, **272**(3-4), 162-167.

29. **Jonda, S.** The Chromophore of GFP. [Online] [Citece: 27. 12. 2012.] <http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/jonda/chromoph.htm>.
30. **Matsuura, A., Hazashi, T., Sato, H., Takahashi, A., Sakurai, M.** Theoretical study on the absorption maxima of real GFPs. *Chemical Physics Letters*. 2010, **484**, 324-329.
31. **Creemers, T. M. H., Lock, A. J., Subramaniam, V., Jovin, T. M., Völker S.** Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning. *Nature structural biology*. Jun 1999, **6**(6), 557-560.
32. **Fang, Ch., Frontiera, R. R., Tran, R., Mathies, R. A.** Mapping GFP structure evolution during proton transfer with femtosecond Raman spectroscopy. *Nature*. Nov 2009, **462**(7270), 200-204.
33. **Billinton, N., Knight, A. W.** Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry*. 2001, **291**, 175-197.
34. **Swaminathan, R., Hoang, C. P., Verkman, A. S.** Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal*. Apr 1997, **72**(4), 1900-1907.
35. **Knight, A. W., Goddard, N. J., Fielden, P. R., Gregson, A. L., Billinton, N., Barker, M. G., Walmsley, R. M.** The application of fluorescence polarisation for the enhanced detection of green fluorescent protein (GFP) in the presence of cellular auto-fluorescence and other green fluorescent compounds. *Analyst*. 2000, **125**(3), 499-506.
36. **Scharnagl, C., Raupp-Kossmann, R., Fischer, S. F.** Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in green fluorescent protein: protonation and conformational substates from electrostatic calculations. *Biophysical Journal*. Oct 1999, **77**(4), 1839-1857.
37. **Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., Piston, D. W.** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*. Nov 1997, **73**(5), 2782-2790.
38. **Miyawaki, A., Griesbeck, O., Tsien, R. Y.** Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. Mar 1999, **96**(5), 2135-2140.
39. **Palmer, A. E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S. A., Lev-Ram, V., Baker, D., Tsien, R. Y.** Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chemistry & Biology*. May 2006, **13**(5), 521-530.
40. **Mank, M., Reiff, D. F., Heim, N., Friedrich, M. W., Borst, A., Griesbeck, O.** A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophysical Journal*. Mar 2006, **90**(5), 1790-1796.
41. **Vinkenburg, J. L., Van Duinhoven, S. M. J., Merckx, M.** Reengineering of a fluorescent zinc sensor protein yields the first genetically encoded cadmium probe. *Chemical Communications*. 2011, **47**(43), 11879-11881.

42. **Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., Verkman, A. S.** Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal*. Mar 1998, **74**, 1591-1599.
43. **Miesenbock, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E.** Visualising secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. Jul 1998, **394**(6689), 192-195.
44. **Vijayvergiya, C., De Angelis, D., Walther, M., Kuhn, H., Duvoisin, R. M., Smith, D. H., Wiedmann, M.** High-level expression of rabbit 15-lipoxygenase induces collapse of the mitochondrial pH gradient in cell culture. *Biochemistry*. Dec 2004, **43**(48), 15296-15302.
45. **Jankowski, A., Kim, J. H., Collins, R. F., Daneman, R., Walton, P., Grinstein, S.** In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin. *Journal of Biological Chemistry*. Dec 2001, **276**(52), 48748-48753.
46. **Chaineau, M., Danglot, L., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T.** Role of HRB in Clathrin-dependent Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. Dec 2008, **283**(49), 34365-34373.
47. **Machen, T. E., Leigh, M. J., Taylor, C., Kimura, T., Asano, S., Moore, H. P. H.** pH of TGN and recycling endosomes of H⁺/K⁺-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Jul 2003, **285**(1), C205-C214.
48. **Schneckenburger, H., Gessler, P., Pavenstädt-Grupp, I.** Measurements of mitochondrial deficiencies in living cells by microspectrofluorometry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Oct 1992, **40**(10), 1573-1578.
49. **Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S., Rao, R.** The yeast endosomal Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular Biology of the Cell*. Mar 2005, **16**, 1396-1405.
50. **Goldring, E. S., Grossman, L. I., Marmur, J.** Petite mutatuin in yeast. II. Isolation of mutants containing mitochondrial deoxyribonucleic acid of reduced size. *Journal of Bacteriology*. 1971, **107**(1), 377-&.
51. **Steinkamp, J. A., Stewart, J. A.** Dual-laser, differential fluorescence correction method for reducing cellular background autofluorescence. *Cytometry*. Nov 1986, **7**(63), 566-574.
52. **Patra, D., Mishra, A. K.** Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. Dec 2002, **21**(12), 787-798.
53. **Andrade-Eiroa, Á., de-Armas, G., Estela, J.-M., Cerdà, V.** Critical approach to synchronous spectrofluorimetry I. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **29**(8), 885-901.
54. **Lloyd, J. B. F.** Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature-Physical Science*. 1971, **231**(20), 64-&.
55. **Vo-Dinh, T.** Multicomponent analysis by synchronous luminiscence spectrometry. *Analytical Chemistry*. Mar 1978, **50**(3), 396-401.

56. **Liu, Q., Grant, G., Vo-Dinh, T.** Investigation of synchronous fluorescence methods in multicomponent analysis in tissue. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. Jul/Aug 2010, **16**(4), 927-940.
57. **Plášek, J., Gášková, D., Večeř, J., Siegler, K.** Use of synchronously excited fluorescence to assess the accumulation of membrane potential probes in yeast cells. *Folia Microbiologica*. 2000, **45**(3), 225-229.
58. **Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., Cellier, M. F.** Determination of Transmembrane Topology of the Escherichia coli Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog. *Journal of Biological Chemistry*. Jan 2004, **279**(5), 3318-3326.
59. **Hošková, B.** *Vnitřní pH kvasinek a vliv transportu draselných iontů na jeho regulaci*. Praha, 2009. Diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.
60. **Zalom, P.** *Regulation of intracellular pH in yeast - influence of selected transport proteins*. Praha, 2011. Diplomová práce na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.
61. **Mocz, G.** The Use of Fluorescence in Research into Protein Structures. [Online] [Citace: 30. 3. 2013.]
<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pps99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/index.htm>.
62. **Vasilyeva, E., Forgacs, M.** Interaction of the clathrin-coated vesicle V-ATPase with ADP and sodium azide. *The Journal of Biological Chemistry*. Sep 1998, **273**(37), 23823-23829.
63. **Bagar, T., Altenbach, K., Read, N. D.** Live-cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using genetically encoded ratiometric probe. *Eukaryotic Cell*. May 2009, **8**(5), 703-712.
64. **Plášek, J., Gášková, D., Lichtenberg-Fraté, H.** Monitoring of real changes of plasma membrane potential by diS-C3(3) fluorescence in yeast cell suspensions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. Oct 2012, **44**(5), 559-569.
65. **Sychrová, H., Ramírez, J., Peña, A.** Involvement of Hna 1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. Feb 1999, **171**(2), 197-172.

Seznam použitých zkratk

β	pufrační kapacita
$\Delta\lambda$	offset, vzdálenost excitační a emisní vlnové délky při synchronně skenované fluorescenci s konstantní vzdáleností vlnových délek
$\Delta\Psi$	membránový potenciál
ΔG	změna Gibbsovy volné energie během reakce
$\lambda_{ex}, \lambda_{em}$	excitační, resp. emisní vlnová délka
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone; protonofor
CP pufr	citrát-fosfátový pufr (směs 25 mM kyseliny citrónové a 50 mM K_2HPO_4 nebo 50 mM KH_2PO_4 a 50 mM K_2HPO_4)
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
GFP	zelený fluorescenční protein
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
K_a	disociační konstanta
$k_B T$	k_B – Boltzmannova konstanta, T – termodynamická teplota; škálovací faktor pro hodnoty energie na molekulární úrovni
LB médium	médium Luria-Bertani
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
Me^{2+}	dvojmocné kovové ionty
MES	pufr 100 mM MES, 30 mM KCl, pH 5,5
MntH	Manganese Proton-dependent Transporter, transmembránový protein z rodiny Nramp
Nramp	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein, rodina membránových proteinů
OD	optická hustota
pH_{in}	vnitrobuněčné (cytosolické) pH
pK_a	$-\log(K_a)$, záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
RPM	počet otáček za minutu
SF	synchronně skenovaná fluorescence
SIGMA	Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement Without Uracil; směs aminokyselin
W22	molekula vody s největším stupněm konektivity v síti vodíkových můstků v GFP
YNB médium	růstové médium obsahující YNB (0,17%), ammonium sulfát (0,5%), glukózu (2%) a případně agar (2%)