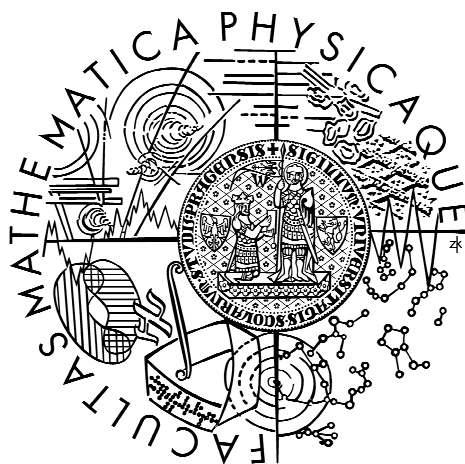


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCA



Andrea Drietomská

**Štúdium činnosti kvasinkových MDR púmp pomocou fluorescenčných
sond: účinok potenciálnych inhibítorov**

Fyzikální ústav UK

Vedúca diplomovej práce: *Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.*

Študijný program: *Fyzika, Biofyzika a chemická fyzika, Biofyzika*

1. Úvod

V súčasnosti je veľká pozornosť v oblasti medicíny venovaná *mnohonásobnej liekovej rezistencii* buniek (z angl. MDR - multidrug resistance) sprostredkovanej špecifickými proteínmi v cytoplazmatickej membráne bunky, MDR transportérmi, ktoré sú prítomné od bakteriálnych až po ľudské bunky. V prítomnosti MDR transportérov (MDR púmp), ktoré intenzívne odstraňujú cudzorodé látky z bunky, sa bunka stáva rezistentnou voči širokému spektru štruktúrne a funkčne odlišných látok (inhibítorov, liekov atď.). Mnohé lieky tak strácajú svoj účinok na bunky, čo predstavuje problém najmä pri rakovinových ochoreniach. V súčasnosti sa preto hľadajú inhibítory MDR transportérov, ktoré by inaktivovali hlavné MDR pumpy a umožnili liekom pôsobiť na bunky. Mnoho inhibítorov MDR transportérov v ľudských bunkách je už známych (napr. cyklosporín, verapamil), ale pre ich nepriaznivé vedľajšie účinky sa stále hľadajú nové, menej toxické inhibítory.

Hlavnou náplňou diplomovej práce bolo štúdium vplyvu lyzozomotropných látok (látky ničiace bunky napadnutím lyzozómov vo vnútri buniek) na aktivitu dvoch hlavných MDR transportérov v bunkách *S. cerevisiae* - Pdr5p a Snq2p - s cieľom nájsť látky, ktoré by účinne inhibovali činnosť týchto púmp. Vplyv látok bol skúmaný pomocou fluorescenčnej metódy vyvinutej v oddelení biofyziky na FÚ UK v Prahe, ktorá umožňuje s vysokou citlivosťou sledovať zmeny v aktivite týchto púmp v intaktných bunkách relatívne veľmi dobre definovaného fyziologického stavu v reálnom čase bezprostredne po pridaní potenciálnych inhibítorov. Metóda je založená na použití redistribučnej potenciometrickej fluorescenčnej sondy diS-C₃(3), ktorá je zároveň substrátom púmp Pdr5p a Snq2p. Spočiatku táto metóda slúžila na meranie membránového potenciálu a jeho zmien v bunkách kvasiniek, až neskôr sa začala používať i na sledovanie zmien aktivity MDR púmp spôsobených pridaním chemického stresoru k bunkám *S. cerevisiae*. Výhodou použitej fluorescenčnej metódy oproti štandardne používaným biologickým technikám je výrazne kratšia doba experimentu, nenáročnosť prípravy vzorky a najmä možnosť monitorovať činnosť MDR púmp pri fyziologicky nezmenenom stave buniek.

V diplomovej práci bola aktivita púmp Pdr5p a Snq2p sledovaná u rôznych mutantov kvasiniek *S. cerevisiae* - mutanty sa navzájom líšili v tom, či dané pumpy obsahovali alebo nie. Na základe pozorovania inhibičného účinku skúmanej látky na jednotlivé mutanty bolo možné určiť, ktorú z púmp Pdr5p, Snq2p skúmaná látka inhibuje. Výsledky získané fluorescenčnou metódou bolo potrebné overiť biologickými testami

(zónový a výsevový test), ktoré nám popri overení správnosti výsledkov umožňujú zistiť, či ide o kompetitívnu alebo nekompetitívnu inhibíciu MDR pumpy.

2. Teoretická časť

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinkový druh *Saccharomyces cerevisiae*, patriaci medzi vreckovýtrusé huby (*Ascomycotina*), slúži ako jednoduchý model eukaryotických organizmov. Nachádza veľké využitie v potravinárstve (v pekárstve, pri výrobe piva a vína), pri výrobe liekov atď. Výhodou pri skúmaní kvasiniek *S. cerevisiae* je ich značná odolnosť, rýchla reprodukcia a nenáročnosť kultivácie. Vďaka svojmu rozsiahlemu použitiu je *S. cerevisiae* jedným z najpreskúmanejších organizmov - stal sa prvým eukaryotom, ktorého genóm bol úplne rozlúštený. Mnohé deje prebiehajú v ľudských bunkách analogicky ako v bunkách kvasiniek, a preto štúdium kvasiniek významne prispieva k pochopeniu základných mechanizmov v bunkách človeka.

2.1.1 Stavba bunky

Kvasinky sa vyznačujú veľkou diverzitou, čo sa týka tvaru i veľkosti buniek. Bunky *S. cerevisiae* sú spravidla elipsoidného tvaru s priemerom 5 - 10 μm na veľkej osi a 1 - 7 μm na menšej osi [1]. *S. cerevisiae* majú podobne ako iné eukaryoty na povrchu bunky cytoplazmatickú membránu, ale na rozdiel od vyšších organizmov je bunka obalená i bunkovou stenou. Vnútri bunky sa nachádza vakuola, jadro, mitochondrie a ďalšie organely (obr.2.1).

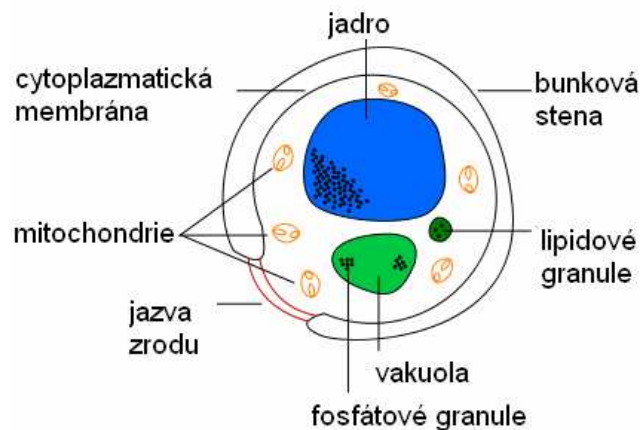
• **Bunková stena**

Bunková stena chráni bunku pred mechanickým poškodením a osmotickými vplyvmi, určuje tvar bunky a zohráva významnú úlohu pri flokulácii (zhlukovanie buniek). Bunková stena má hrúbku 150 - 450 nm a je tvorená najmä polysacharidmi (približne 80 % sušiny steny) a proteínmi (6 - 10 % sušiny steny). *S. cerevisiae* obsahuje vo svojej bunkovej stene na rozdiel od rastlinných a bakteriálnych buniek jazvy (štruktúry vznikajúce ako následok pučania), ktorých počet udáva relatívny vek bunky.

• **Cytoplazmatická membrána**

Cytoplazmatická membrána tvorí elastický obal bunky nachádzajúci sa pod bunkovou stenou. Umožňuje transport živín a produktov metabolizmu, je osmotickou bariérou a podieľa sa na vytváraní a udržovaní elektrochemického gradientu. Membrána

má štruktúru fluidnej mozaiky tvorenej dvojitoú vrstvou fosfolipidov, ktoré obsahujú polárne hydrofilné hlavičky mieriace smerom k vonkajšej časti membrány a nepolárne hydrofóbne konce orientované dovnútra membrány. Hlavnou stavebnou zložkou membrány sú popri fosfolipidoch proteíny, ktoré majú mnoho špecifických funkcií - sprostredkovávajú transport látok cez membránu, katalyzujú priebeh chemických reakcií, prípadne pôsobia ako receptory.



Obr.2.1: Stavba bunky *Saccharomyces cerevisiae* [2].

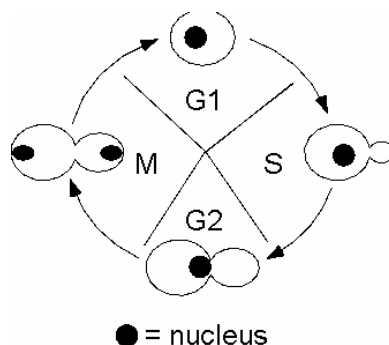
2.1.2 Rozmnožovanie *S. cerevisiae*

Kvasinky *S. cerevisiae* sa rozmnožujú vegetatívne - pučaním, ale za určitých podmienok sa môžu rozmnožovať i pohlavne. Pri **pučaní** sa na materskej bunke vytvorí púčik, ktorý sa postupne zväčšuje, až sa oddelí od materskej bunky a vznikne samostatná dcérska bunka. *S. cerevisiae* patrí medzi multipolárne pučiace kvasinky, tj. púčik môže vzniknúť na ktoromkoľvek mieste povrchu bunky. Na materskej i dcérskej bunke vznikne po oddelení dcérskej bunky jazva.

Pri **pohlavnom rozmnožovaní** splynú dve haploidné bunky opačného párovacieho typu. Jadrá buniek sa spoja a vznikne diploidná bunka - zygota, ktorá sa môže ďalej vegetatívne deliť alebo prejsť sporuláciou spojenou s meiotickým delením jadra za vzniku štyroch haploidných buniek. K sporulácii dochádza najmä pri nedostatku prísune živín (bez zdroja dusíku a s chudobným zdrojom uhlíka) [3].

Bunkový cyklus *S. cerevisiae* pozostáva zo štyroch fáz: G_1 , S, G_2 a M fáza (obr.2.2). Fázy G_1 , S, G_2 predstavujú spoločne interfázu, počas M fázy prebieha mitotické delenie a cytokinéza. Bunkový cyklus je regulovaný veľkým množstvom špecifických proteínov (cyklíny a cyklín-dependentné proteínkinázy). Kľúčovým bodom bunkového cyklu je tzv. Štart, v ktorom sa rozhoduje o prechode z G_1 do S fázy. V prípade, že nie sú počas G_1 fázy splnené podmienky pre úspešný priebeh bunkového cyklu, bunka vstúpi do

stacionárnej fázy G_0 . Ak bunka štartom prejde, prebehnú i ďalšie fázy cyklu (S, G_2 a M fáza). Pri vstupe bunky do S fázy dochádza k duplikácii jadrovej DNA, následne bunka prejde G_2 fázou spojenou s kondenzáciou chromozómov a tvorením mitotického vretienka. Potom nastáva M fáza, kedy sa bunka mitoticky delí, DNA sa rozdeľuje medzi materskú a dcérsku bunku a nasleduje cytokinéza, kedy sa dcérska bunka oddelí od materskej. Počas G_1 fázy bunka rastie a duplikuje svoje cytoplazmatické organely. Keď bunka nadobudne veľkosť materskej bunky a okolité podmienky sú priaznivé, môže dôjsť k ďalšiemu deleniu bunky.



Obr.2.2: Bunkový cyklus *S. cerevisiae* [4].

2.1.3 Rast kvasinkovej kultúry v tekutom médiu

Pri raste buniek *S. cerevisiae* v tekutom médiu s fermentovateľným substrátom (napr. glukóza) bez ďalšieho pridávania živín možno rozoznať šesť fáz a ich priebeh možno vyjadriť rastovou krivkou znázorňujúcou časový vývoj optickej hustoty suspenzie (O.D.), ktorá je úmerná počtu buniek (obr.2.3).

Fázy rastu :

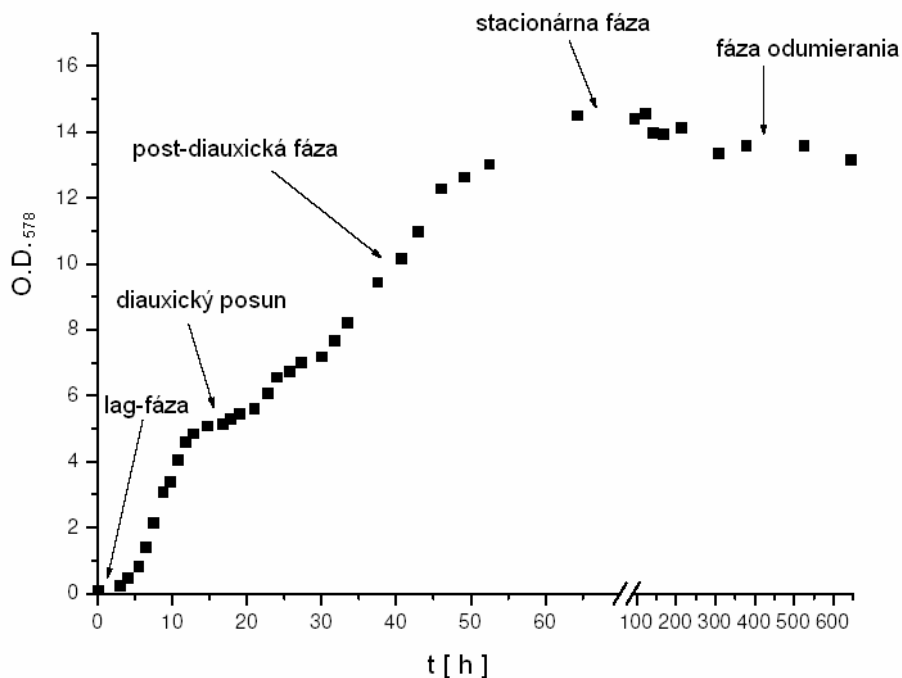
- **Lag-fáza**

Bunky sa prispôbujú podmienkam v novom živnom prostredí a získavajú energiu pre rozmnožovanie. Počet buniek zostáva konštantný, ale množstvo biomasy sa zväčšuje. Doba, ktorú bunková kultúra strávi v tejto adaptačnej fáze, závisí na vhodnosti nového prostredia pre rast a tiež na veku buniek. Lag-fáza pozostáva z dvoch fáz: z fázy skutočného klúdu charakterizovanej nemenným počtom buniek a z fázy fyziologickej mladosti, kedy kultúra obsahuje najväčšie množstvo buniek s malými púčikmi.

- **Exponenciálna fáza**

Je to fáza najrýchlejšieho rastu a rozmnožovania buniek, ktoré nestačia dorásť do veľkosti materskej bunky. Priemerná veľkosť bunky sa tak počas exponenciálnej fázy

zmenšuje. Keďže sú bunky metabolicky aktívne, sú veľmi citlivé voči vonkajším faktorom. Počas tejto fázy sa znižuje obsah glykogénu a trehalózy v bunke, v dôsledku čoho klesá rezistencia bunky voči osmotickému stresu a znižuje sa odolnosť bunkovej steny. V neskoršej exponenciálnej fáze začínajú bunkám dochádzať živiny, rozmnožovanie sa preto spomaľuje a bunky dorastajú do svojej konečnej veľkosti.



Obr.2.3: Rastová krivka *Saccharomyces cerevisiae* [5].

- ***Diauxický posun (shift)***

Po vyčerpaní glukózy z média vstupujú bunky do krátkej "adaptívnej" fázy, počas ktorej prebudovávajú svoj metabolizmus na iný zdroj uhlíka (etanol, glycerol) [6]. Prechodne sa zastaví rast buniek a kultúra sa adaptuje na oxidatívny metabolizmus. Počas diauxického posunu dochádza k tvorbe glykogénu a trehalózy, pričom glykogén začína bunka syntetizovať ešte pred úplným vyčerpaním glukózy [7]. Trehalóza zohráva dôležitú úlohu pri odolnosti buniek voči hladovaniu [8-10]. Na základe diauxického posunu možno normalizovať fázy u rôznych kmeňov.

- ***Post-diauxická fáza***

Po adaptácii na nové rastové podmienky sa obnoví rozmnožovanie kultúry, avšak prebieha omnoho pomalšie ako v exponenciálnej fáze. Bunky si robia zásoby trehalózy, ktorej koncentrácia je najväčšia na začiatku stacionárnej fázy [7,11]. Zvyšuje sa odolnosť

buniek voči teplotnému šoku, ktoré je dôsledkom oxidatívneho metabolizmu uhľíkatých zdrojov.

- **Stacionárna fáza**

Bunky vstupujú do stacionárnej fázy 4 - 7 dní po inokulácii [12], počet buniek v kultúre sa už nemení. Kvasinky sa pripravujú na dlhodobé prežívanie bez živín, tj. prebieha adaptácia na stres hladovaním. Trehalóza je postupne degradovaná, následkom čoho je strata životaschopnosti buniek [7,11]. Bunky v stacionárnej fáze sú oproti exponenciálnym bunkám odolnejšie voči niektorým druhom stresu a majú silnejšiu bunkovú stenu, ktorá ich chráni pred pôsobením lytických enzýmov [13].

- **Fáza odumierania**

Nedostatok živín spôsobí postupné odumieranie buniek. Táto fáza nastáva približne po desiatich dňoch.

2.2 Mnohonásobná lieková rezistencia

Dôležitú úlohu v obrane buniek proti účinku chemických stresorov hrajú tzv. MDR transportéry - membránové proteíny zaisťujúce mnohonásobnú liekovú rezistenciu (MDR –Multi Drug Resistance), u kvasiniek taktiež nazývanú PDR (Pleiotropic Drug Resistance). MDR transportéry (pumpy) aktívne odstraňujú cudzorodé látky z buniek a tým umožňujú rezistenciu buniek voči širokému spektru štruktúrne a funkčne odlišných látok (inhibítorov, liekov atď).

Mnohonásobná lieková rezistencia kvasiniek *S. cerevisiae* proti rôznym toxickým látkam je kontrolovaná dvoma regulačnými sieťami PDR a YAP, tvorenými génmi *PDR1*, *PDR3* a *YAP1*, *YAP2*, ktoré kódujú transkripčné aktivačné proteíny, a cieľovými génmi týchto proteínov. Obe siete sú navzájom funkčne prepojené, tj. niektoré prvky či funkcie jednej regulačnej siete môžu byť ovplyvnené či dokonca v niektorých prípadoch (napr. teplotný šok) zastúpené druhou regulačnou sieťou.

2.2.1 Regulačná sieť YAP

Najlepšie preskúmanými transkripčnými faktormi regulačnej siete YAP u *S. cerevisiae* je proteín Yap1p kódovaný génom *YAP1* a proteín Yap2p kódovaný génom *YAP2* [14].

Transkripčný aktivátor Yap1p sa spolu s ďalšími proteínmi podieľa na odpovedi buniek na oxidatívny stres a na vytváraní fenotypu mnohonásobnej liekovej rezistencie kvasiniek *S. cerevisiae* proti metabolickým inhibítorm. Gén *YAP1* nie je pre bunku esenciálny. Jeho prerušenie vedie k zvýšeniu citlivosti buniek na niektoré látky (napr. 4-nitrochinolín-N-oxid, N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidín, cykloheximid, trenimon, kadmium), k neschopnosti rastu pri pH vyššom ako 7 a k hypersenzitívite na oxidatívny stres spôsobený peroxidom vodíka.

Druhým známym transkripčným aktivátorom regulačnej siete YAP je proteín Yap2p kódovaný génom *YAP2*. Podobne ako u génu *YAP1*, zvýšenie expzie génu *YAP2* vedie k fenotypu mnohonásobnej liekovej rezistencie proti kadmiu, cykloheximidu a chelátom železa a zinku. Zatiaľ čo bunky s prerušeným génom *YAP1* sú hypersenzitívne na kadmium, neprítomnosť funkčného génu *YAP2* v bunke neovplyvní jej citlivosť na kadmium. Gén *YAP2* sa spolu s *YAP1* účastní indukcie adaptácie na stres u *S. cerevisiae* spôsobený peroxidom vodíka.

2.2.2 Regulačná sieť PDR

Gény *PDR1* a *PDR3* regulačnej siete PDR kontrolujú u *S. cerevisiae* rezistenciu voči širokému spektru bunkových inhibítorm [15]. Gén *PDR1* sa podieľa na vzniku fenotypu MDR kvasiniek *S. cerevisiae* tým, že jeho produkt – transkripčný aktivačný proteín Pdr1p – ovplyvňuje expziu génov kódujúcich membránové transportné proteíny, ktorých substráty sú okrem iného i metabolické inhibítory. Mutácie *pdr1-1*, *pdr1-2*, *pdr1-3* v géne *PDR1* u *S. cerevisiae* vyvolávajú rezistenciu proti rôznym inhibítorm mitochondriálnych procesov (antimycín A, oligomycín, tetracyklín) a proti cykloheximidu, ktorý je inhibítorm cytoplazmatickej proteosyntézy.

Proteín Pdr1p je vysoko homologický s proteínom Pdr3p (ich aminokyselinové sekvencie sú z 36 % identické) a ich funkcia je podobná. Prerušenie génu *PDR3* kódujúceho proteín Pdr3p nie je pre bunky letálne a v porovnaní s rodičovským kmeňom výrazne neovplyvňuje citlivosť hostiteľského kmeňa na oligomycín, cykloheximid, chloramfenikol a mucidín (podobne ako prerušenie samotného génu *PDR1*). K výraznému zvýšeniu citlivosti dochádza po prerušení oboch génov *PDR1* a *PDR3* súčasne [15,16].

V regulačnej sieti PDR hrá dominantnú úlohu v kontrole fenotypu MDR pravdepodobne gén *PDR1*, ktorý funguje ako transkripčný aktivátor okrem iných génov i pre gén *PDR3*. Gén *PDR3* je súčasne aktivovaný i sám sebou. Pri vytváraní fenotypu

MDR má *PDR1* primárnu úlohu v odpovedi bunky na prítomnosť toxickej látky a *PDR3* zabezpečuje, aby táto odpoveď bola dostatočne rýchla a výrazná.

2.2.3 Cieľové gény regulačných proteínov sietí YAP a PDR

Rezistencia kvasiniek *S. cerevisiae* proti rôznym toxickým látkam a oxidatívne stresu je zabezpečená kontrolou expície cieľových génov transkripčných aktivátorov Yap1p a Yap2p (regulačná sieť YAP). Cieľovými génmi transkripčných aktivátorov Yap1p a Yap2p sú :

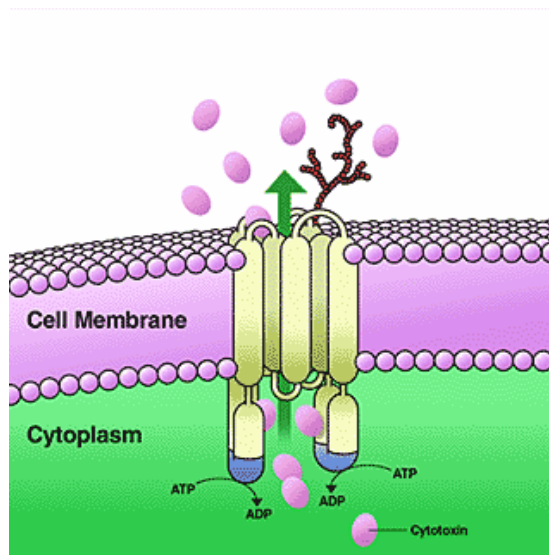
1. niektoré gény kódujúce membránové transportné proteíny typu MFS (Major Facilitator Superfamily) a ABC (ATP-Binding Cassette).
2. gény, ktorých produkty zabezpečujú odolnosť kvasiniek *S. cerevisiae* proti látkam toxickým pre bunku.

Podobne ako u regulačnej siete YAP i u siete PDR sú za rezistenciu voči inhibítorom zodpovedné gény kódujúce membránové transportéry typu MFS a ABC spolu s ďalšími cieľovými génmi transkripčných aktivátorov Pdr1p a Pdr3p.

Membránové transportéry typu MFS tvoria veľkú skupinu štruktúrne a funkčne homologických membránových transportérov vyskytujúcich sa u prokaryotických i eukaryotických organizmov. Ich funkciou je transport rôznych látok (jednoduché cukry, oligosacharidy, aminokyseliny, nukleotidy atď.) za využitia energie z chemiosmotického gradientu protónov.

Membránové transportéry typu ABC sa podobne ako MFS proteíny vyskytujú u všetkých organizmov od baktérií až po človeka a pre transport látok cez membránu využívajú energiu z hydrolýzy ATP. U kvasiniek sú lokalizované na bunkovej membráne a účastia sa kontroly rezistencie buniek proti toxickým látkam a oxidatívne stresu, bunkovej detoxikácie, sekrécie feromónov, mitochondriálnych a peroxizomálnych funkcií.

ABC transportér sa zvyčajne skladá z dvoch transmembránových a dvoch ATP-viažucich domén (obr.2.4). Transmembránové domény obsahujú α -hélixy, ktoré niekoľkokrát prechádzajú membránou a na vonkajšej strane transportéra medzi doménami sa nachádza miesto, kde sa viaže substrát. ATP-viažuce domény sa nachádzajú na vnútornej strane bunkovej membrány a sú zväčša dve. Keď sa ATP naviaže na ATP-viažucu doménu, zmení sa konformácia ABC transportéra – vytvorí sa dutinka, cez ktorú môže molekula substrátu prejsť membránou do vnútra bunky [17].



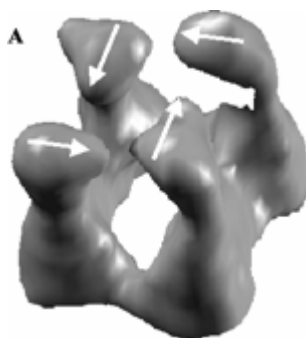
Obr.2.4: Schematické znázornenie štruktúry a funkcie ABC transportéra [18].

Najlepšie preštudovanými ABC transportérmi u kvasiniek *S. cerevisiae* sú MDR proteíny kódované génmi *PDR5*, *SNQ2* (ich expresia je kontrolovaná transkripčnými aktívátormi regulačných sietí PDR a YAP) a *YOR1*. Tieto transportéry sú zodpovedné za rezistenciu buniek voči širokému spektru metabolických inhibítorov. Ich substrátmi sú mnohé antibiotiká, fungicídy, detergenty a iné látky.

2.2.3.1 Gén *PDR5*

Gén *PDR5* bol prvým identifikovaným cieľovým génom transkripčného aktívátora Pdr1p. Produktom génu *PDR5* je transmembránový proteín typu ABC, Pdr5p, homologický s proteínom Snq2p (37 % identita) ako i s ľudským P-glykoproteínom. Nedávno bola technikou negatívneho farbenia poodhalená možná 3D-štruktúra Pdr5p s rozlíšením 25 Å (obr.2.5, [19]). Proteín Pdr5p obsahuje dve hydrofóbne domény, pričom každá z nich je tvorená šiestimi transmembránovými segmentami, a ďalej dve ATP-viažuce domény nachádzajúce sa na intracelulárnej strane membrány. Organizácia domén je podobná ako u Snq2p, ale opačná ako u P-glykoproteínu.

Pdr5p je proteín je lokalizovaný v plazmatickej membráne a má krátku životnosť – polčas rozpadu je 60 až 90 minút. Z cytoplazmatickej membrány sa endocytózou dostáva do vakuoly a jeho degradácia vyžaduje vakuolárnu proteolýzu [20].



Obr.2.5 : Trojrozmerná štruktúra MDR transportéra Pdr5p. Proteín má dimérnu štruktúru a skladá sa z troch častí: (1) z membránovo zakotvených domén, (2) zo štyroch oddelených vyčnievajúcich stonkových domén, (3) zo štyroch lalokov tvoriacich ATP-viažuce domény. Šípky ukazujú rozdielne orientácie ATP-viažucich domén, z čoho možno predpokladať, že počas katalytického cyklu dochádza k ich rotácii [19].

Substrátmi Pdr5p sú etylové, propylové a butylové zlúčeniny, v menšej miere i metylové a pentylové zlúčeniny. Disociácia zlúčeniny ako i veľkosť jej molekuly sú pri určovaní, či je látka substrátom Pdr5p, dôležité, zatiaľ čo hydrofobicita a aniónové zloženie molekúl skúmanej látky nehrajú žiadnu úlohu [21].

Gén *PDR5* nie je pre bunku esenciálny a jeho prerušenie vedie k hypersenzitivite na mnohé štruktúrne odlišné bunkové inhibítory (cykloheximid, sulfometuronmetyl, chloramfenikol, antimycín A, erytromycín atď.). Zvýšenie expresie génu *PDR5* naopak vedie k zvýšeniu rezistencie bunky proti týmto inhibítorm. V sekvencii proteínu Pdr5p boli identifikované aminokyseliny dôležité pre jeho substrátovú špecifitu, pre transport inhibítorov a pre špecifickú inhibíciu transportného proteínu Pdr5p, ktoré sú lokalizované v ATP-viažucich a v transmembránových doménach, ako aj v extracelulárnej hydrofilnej časti proteínu.

Transkripcia génu *PDR5* a iných génov kódujúcich MDR transportéry je počas mitózy veľmi intenzívna - u väčšiny génov je to opačne. *ELM1*, gén kódujúci proteínkinázu, ktorá riadi mnohé iné kinázy účastniace sa bunkového delenia, sa podieľa na regulácii MDR v *S. cerevisiae* - riadi napr. mieru transkripcie génu *PDR5*. Mutácia v *ELM1* potláča MDR a znižuje transkripciu *PDR5*. Bola teda zistená spojitosť medzi reguláciou MDR a prebiehajúcim bunkovým cyklom v *S. cerevisiae* [22].

2.2.3.2 Gén *SNQ2*

Prítomnosť génu *SNQ2* v bunke vo viacerých kópiách spôsobuje zvýšenie rezistencie kvasiniek *S. cerevisiae* proti rôznym bunkovým inhibítorm ako napr. 4-nitrochinolín-N-oxid (odtiaľ pochádza i názov génu - Sensitivity to 4-NitroQuinoline-N-

oxide), triaziquon a sulfometuronmetyl. Produktom génu *SNQ2* je membránový transportný proteín typu ABC, Snq2p.

Gén *SNQ2* je kontrolovaný transkripčnými aktivátormi Pdr1p a Pdr3p. Prerušenie génu *PDR3* nespôsobuje také výrazné zníženie hladiny mRNA génu *SNQ2* a hladiny proteínu Snq2p ako prerušenie génu *PDR1*. Najvýraznejšie sa prejaví prerušenie oboch génov *PDR1* a *PDR3* súčasne, ale na rozdiel od génu *PDR5* sa gén *SNQ2* v kmeni s prerušenými génmi *PDR1* a *PDR3* exprimuje, i keď slabo; expresia *SNQ2* je totiž takisto kontrolovaná transkripčným faktorom Yrr1p a v podmienkach teplotného šoku i proteínmi Yap1p a Yap2p [23].

Gén *SNQ2*, podobne ako *PDR5*, nie je pre bunku esenciálny a jeho prerušenie vedie k hypersenzitivite na metabolické inhibítory. Prítomnosť funkčných génov *PDR5* a *SNQ2* je potrebná pre normálny rast buniek. Proteíny Pdr5p a Snq2p kódované týmito génmi sú nielen štruktúrne ale i funkčne podobné, ich substrátová špecificita sa čiastočne prekrýva.

2.2.3.3 Gén *YORI*

Gén *YORI* je potrebný pre vytvorenie rezistencie kvasiniek *S. cerevisiae* proti oligomycínu (YOR - Yeast Oligomycin Resistance), rezistencia je podmienená mutáciami v génoch *PDR1* a *PDR3*. Ak je gén *YORI* prítomný v bunke vo viacerých kópiách, dôjde k výraznému zvýšeniu rezistencie proti oligomycínu, mutácia alebo prerušenie tohto génu naopak vedie k hypersenzitivite na oligomycín. Gén *YORI* je taktiež zodpovedný za rezistenciu proti reveromycínu A, aureobazidínu A a za detoxikáciu organických aniónov obsahujúcich karboxylové skupiny.

Produktom génu *YORI* je membránový transportný proteín typu ABC, Yor1p, ktorého expresia je kontrolovaná proteínmi Pdr1p a Pdr3p a jeho ATP-ázová aktivita *in vitro* je pätnásťkrát nižšia ako u Pdr5p.

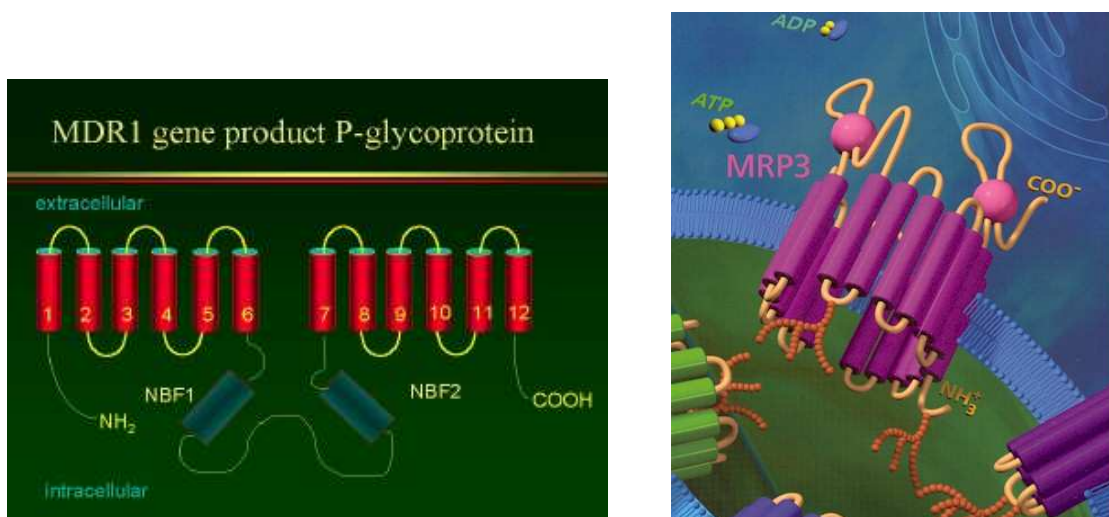
2.2.4 Význam štúdia MDR púmp u *S. cerevisiae*

Štúdium odpovede buniek na oxidatívny stres u kvasiniek *S. cerevisiae* má význam i v medicíne. Predpokladá sa, že oxidatívny stres sa podieľa na vzniku niektorých vážnych ochorení ako je rakovina alebo ateroskleróza. Podobný mechanizmus rezistencie proti bunkovým inhibítorm ako u kvasiniek *S. cerevisiae* bol identifikovaný u mnohých patogénov rastlín, živočíchov i človeka.

Výskum vplyvu potenciálnych inhibítorov na MDR transportéry v bunkách *S. cerevisiae* prispieva k pochopeniu mechanizmov MDR v ľudských bunkách. Odhalenie

molekulárných mechanizmov mnohonásobnej liekovej rezistencie kvasiniek nájde využitie pri genetických manipuláciách v biotechnológiách a môže pomôcť v boji proti rezistentným patogénom človeka a rastlín.

Medzi najdôležitejšie MDR pumpy u človeka patrí **P-glykoproteín** (Pgp) kódovaný *MDR1* génom. Tento gén reguluje kinetiku i mnohých iných liekov v bunke. Pgp pozostáva z 1280 aminokyselín a dvoch homológnych symetrických sekvencií obsahujúcich šesť transmembránových domén a dve ATP-viažuce domény (obr.2.6, [24]).



Obr.2.6: Štruktúra MDR transportéru v ľudských bunkách: (A) P-glykoproteín [25], (B) MRP3 [26].

Pgp má širokú substrátovú špecificitu – transportuje z bunky mnohé lieky, napr. chemoterapeutiká. V súčasnosti je známych niekoľko substrátov Pgp, ktoré kompetitívne inhibujú jeho funkciu a umožňujú tak pôsobenie chemoterapeutík v nádorových bunkách (napr. verapamil, cyklosporín), vid' [24]. Mnohé z týchto inhibítorov sú komerčne dostupné.

Ďalším významným MDR transportérom popri Pgp je **MRP1** patriaci do rodiny proteínov MRP (Multidrug Resistance-associated Proteins). MRP1 sa podobne ako Pgp významne podieľa na odstraňovaní liekov proti rakovine. Na rozdiel od proteínu Pgp, ktorý transportuje neutrálne alebo kladne nabité, hydrofóbne molekuly, transportuje MRP1 organické anióny (napr. leukotrien) [27].

2.3 Meranie membránového potenciálu

2.3.1 Membránový potenciál

Membránový potenciál vzniká ako dôsledok mnohých transmembránových procesov súvisiacich s polopriepustnosťou membrány; závisí na distribúcii náboja, ktorého nositeľmi sú ióny. Jeho existencia je nevyhnutná pre udržanie metabolických pochodov a tým i pre život bunky.

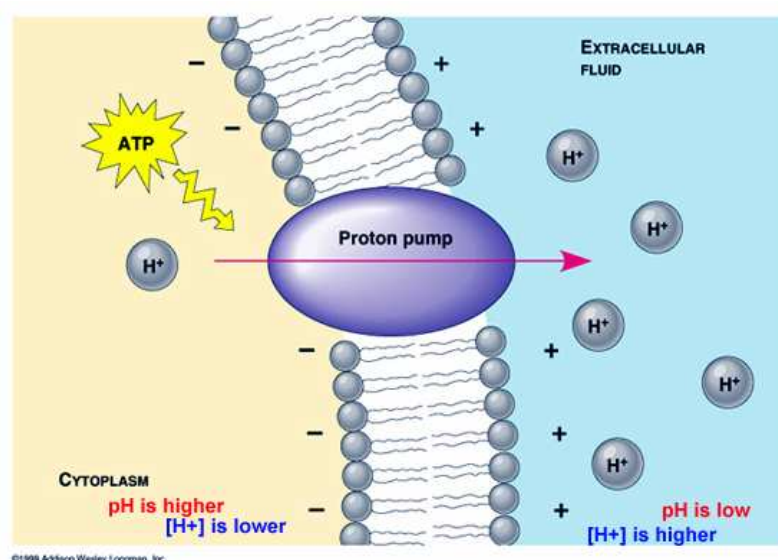
Pohyb iónov ovplyvňujú elektrické i koncentračné gradienty. Keď sa vyrovná veľkosť elektrického a koncentračného gradientu pre určitý ión, vravíme, že nastala dynamická rovnováha. Membránový potenciál, pri ktorom sa dynamická rovnováha vytvorí, označujeme ako rovnovážny (Nernstov) potenciál ψ a platí preň **Nernstova rovnica**:

$$\Psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c^{out}}{c^{in}} \quad (2.1)$$

kde R ... univerzálna plynová konštanta, T ... teplota, z ... valencia iónu, F ... Faradayova konštanta, c^{in} ... koncentrácia daného iónu vnútri bunky a c^{out} ... koncentrácia daného iónu mimo bunky.

Rozdiel elektrických napätí na vnútornej (ψ^{in}) a vonkajšej (ψ^{out}) strane membrány sa nazýva **kľudový membránový potenciál** $\Delta\psi$, ktorý je súčtom rovnovážnych potenciálov všetkých iónov, a platí: $\Delta\psi = \psi^{in} - \psi^{out}$. $\Delta\psi$ je u buniek záporný, jeho hodnota je -9 až -100 mV. Zníženie membránového potenciálu (menej záporná hodnota $\Delta\psi$) vedie k depolarizácii membrány, jeho zvýšenie (zápornejšia hodnota $\Delta\psi$) naopak vedie k hyperpolarizácii membrány.

V cytoplazmatickej membráne buniek *S. cerevisiae*, ako i u iných húb a rastlín, zohráva dôležitú úlohu protónová pumpa **H⁺-ATPáza**, ktorá určuje veľkosť membránového potenciálu v bunke a kontroluje dôležité fyziologické procesy prebiehajúce vnútri bunky. H⁺-ATPáza transportuje protóny von z buniek (obr.2.7) za využitia energie z hydrolýzy ATP a tým reguluje membránový potenciál a pH v bunke. Udržiava vnútri bunky zápornejší potenciál ako v jej okolí. Aktivita H⁺-ATPázy závisí od okolitých podmienok - napr. v prítomnosti glukózy sa jej výkonnosť zvyšuje, zatiaľ čo určité chemické látky (napr. lyzozomotropné látky - [28]) môžu naopak H⁺-ATPázu inhibovať.



Obr 2.7: Schematické znázornenie funkcie H^+ -ATPázy v bunkách kvasiniek [29].

2.3.2 Metódy pre meranie membránového potenciálu

Membránový potenciál možno merať priamo, zavedením mikroelektrod do bunky. U kvasinkových buniek je ale meranie membránového potenciálu touto metódou veľmi obtiažne - rozmery buniek kvasiniek sú malé a navyše je u nich prítomná bunková stena, ktorá bráni preniknutiu elektródy do bunky. Navyše prípadný prienik elektródy bunkovou stenou spôsobí rozsiahle poškodenie bunky.

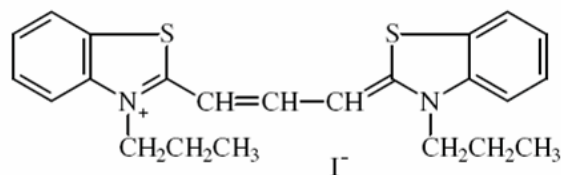
Pre meranie zmien membránového potenciálu u kvasiniek sa preto používajú nepriame metódy, napr. meranie pomocou potenciometrických sond, ktoré je neinvazívne a zároveň predstavuje relatívne rýchly spôsob sledovania zmien membránového potenciálu.

Fluorescenčná sonda diS-C₃(3)

Použitím fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) možno sledovať zmenu aktivity púmp Pdr5p a Snq2p u kvasiniek *S. cerevisiae* prostredníctvom monitorovania vstupu sondy do buniek v závislosti na veľkosti membránového potenciálu.

Fluorescenčná sonda diS-C₃(3), tj. 3,3'-dipropylthiakarboxycyanín jodid (obr.2.8), ktorá bola zvolená pre naše experimenty, patrí medzi cyanínové farbivá, ktoré sú kladne nabité a lipofilné, vďaka čomu ľahko vstupujú do bunky - prostou difúziou.

Sonda diS-C₃(3) patrí medzi redistribučné potenciometrické sondy - jej prerozdelenie cez membránu trvá dovtedy, kým nenastane rovnováha v distribúcii sondy vnútri a mimo bunku (tento proces trvá sekundy až desiatky minút), ustáľovanie rovnováhy sa riadi Nernstovou rovnicou (viď kapitola 2.3.1).



Obr. 2.8: Fluorescenčná sonda diS-C₃(3).

2.4 Metóda pre sledovanie zmien aktivity MDR púmp (Pdr5p a Snq2p) pomocou fluorescenčnej potenciometrickej sondy diS-C₃(3)

Metóda pre sledovanie zmien aktivity MDR púmp (Pdr5p a Snq2p) pomocou fluorescenčnej potenciometrickej sondy diS-C₃(3) (ďalej nazývaná skrátene fluorescenčná metóda) vyvinutá na našej fakulte (FÚ UK v Prahe, [30]) nám umožňuje skúmať aktivitu púmp a zmeny membránového potenciálu v reálnom čase a pri fyziologicky nezmenenom stave buniek. Fluorescenčná sonda diS-C₃(3) (kapitola 2.3.2) je substrátom púmp Pdr5p a Snq2p, hlavných MDR transportérov u *S. cerevisiae*.

Štandardne používanými metódami pri skúmaní aktivity púmp sú biologické testy (napr. zónový a výsevový test - kapitola 3.5), ktoré sú na rozdiel od fluorescenčnej metódy časovo náročné a neumožňujú sledovať kinetiku púmp. Fluorescenčná metóda bola úspešne použitá pri štúdiu vplyvu chemických stresorov na aktivitu MDR púmp v kvasinkových bunkách [30, 31].

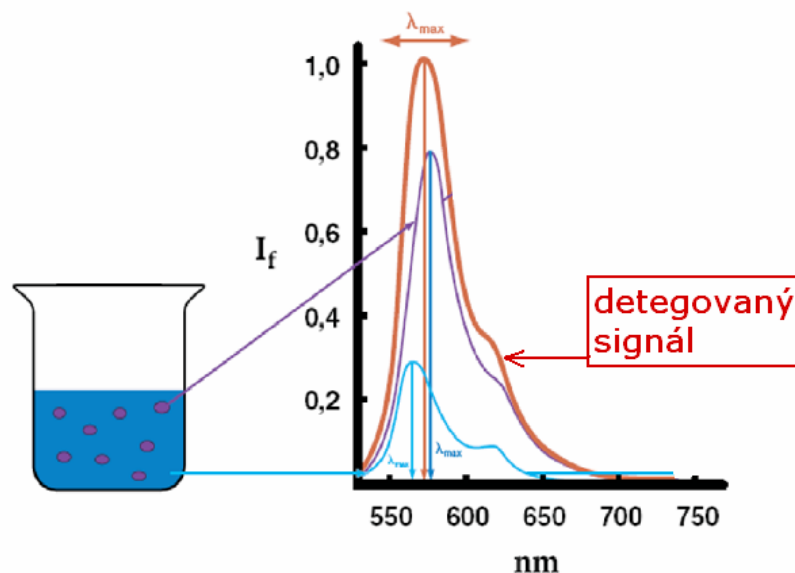
Metóda farbenia fluorescenčnou sondou diS-C₃(3) nám umožňuje zaznamenávať zmeny jej koncentrácie vnútri bunky prostredníctvom zmien spektroskopických vlastností sondy, konkrétne zmien λ_{max} (λ_{max} - vlnová dĺžka, pre ktorú je intenzita fluorescenčného signálu, I_{max} , maximálna). Vnútri bunky sa sonda diS-C₃(3) môže viazať na niektoré intracelulárne komponenty (albumín, RNA, lipidy a iné bunkové štruktúry). Výsledný fluorescenčný signál od sondy diS-C₃(3) (obr.2.9A - červená farba) sa skladá z niekoľkých zložiek:

- **sonda v médiu** - zväčša len vo voľnej forme, tj. sonda sa neviaže na zložky média. Fluorescenčné spektrum je charakterizované polohou maxima $\lambda_{max} = 569$ nm a intenzita fluorescenčného signálu od sondy zostáva konštantná, pretože pri riedkych bunkových suspenziách možno zanedbať úbytok intenzity fluorescence spojený so vstupom sondy do bunky (obr.2.9A - modrá farba).

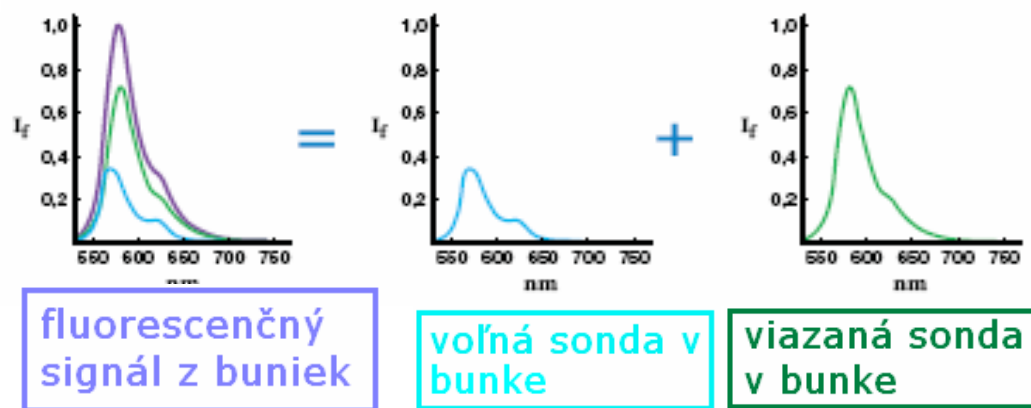
• **sonda v bunke:**

- **voľná** - poloha maxima fluorescenčného signálu λ_{max} je charakterizovaná hodnotou 569 nm (obr.2.9B - modrá farba).
- **viazaná** - hodnota λ_{max} je posunutá oproti signálu voľnej sondy o 10 nm do červenej oblasti spektra. Dochádza k zvýšeniu kvantového výťažku fluorescence a teda i intenzity fluorescence v porovnaní s voľnou sondou (obr.2.9B - zelená farba).

A



B



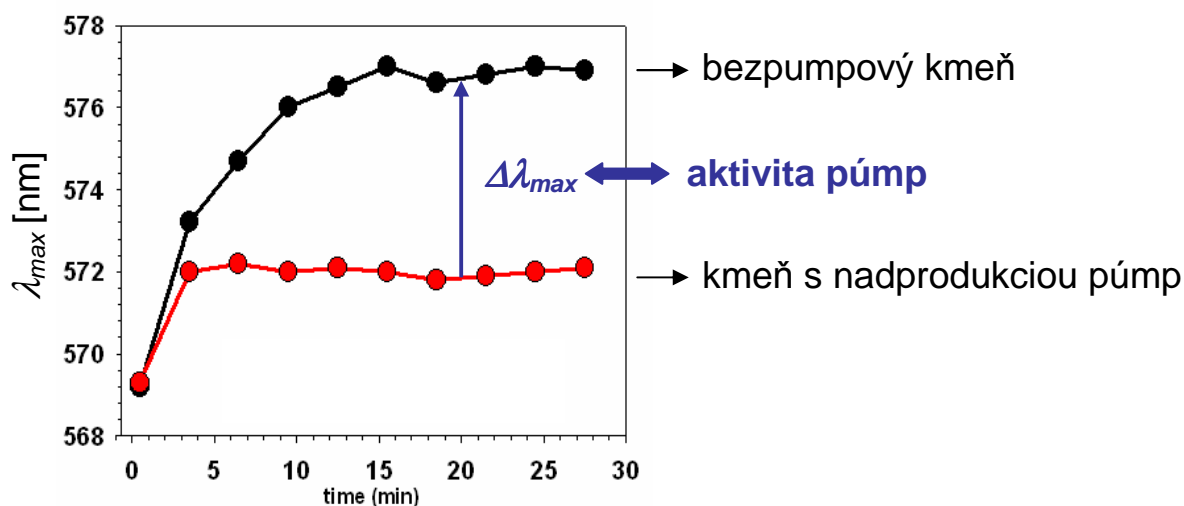
Obr.2.9:

- (A) Celkový fluorescenčný signál sondy diS-C₃(3) po interakcii s bunkovou suspenziou (červená) sa skladá zo signálu z buniek (fialová) a z média (modrá).
- (B) Jednotlivé zložky fluorescenčného signálu sondy diS-C₃(3) z buniek (fialová) sú tvorené signálom voľnej sondy (modrá) a signálom viazanej sondy (zelená) v bunkách (podľa [32]).

Vstup sondy diS-C₃(3) do bunky je určený membránovým potenciálom $\Delta\psi$ a aktivitou púmp Pdr5p a Snq2p. Čím je $\Delta\psi$ väčší, tým viac sondy vstupuje do bunky a dochádza k červenému posunu v λ_{max} . Ak sú v membráne prítomné i pumpy odstraňujúce diS-C₃(3), prejaví sa to znížením množstva sondy v bunke a odpovedajúcim modrým

posunom. K modrému posunu v λ_{max} dochádza i pri depolarizácii membrány alebo pri inhibícii H^+ -ATPázy.

Farbiaca krivka predstavuje časovú závislosť vlnovej dĺžky λ_{max} po pridaní sondy diS-C₃(3) do bunkovej suspenzie. Odčítaním farbiacich kriviek pumpových kmeňov od farbiacej krivky bezpumpového kmeňa možno získať hodnoty aktivity púmp (Pdr5p a/alebo Snq2p) a porovnaním aktivity púmp daného kmeňa bez a s pridaním potenciálneho inhibítora možno vyhodnotiť vplyv skúmanej látky na aktivitu danej pumpy (púmp), viď obr.2.10.



Obr.2.10: Farbiaca krivka kmeňa s nadprodukciou púmp je oproti bezpumpovému kmeňu posunutá do modrej oblasti v dôsledku aktivity jeho púmp.

3. Materiál a metódy

3.1 Chemikálie a materiál

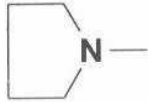


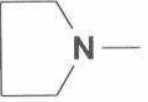


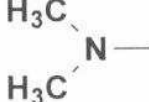
Tab.3.1: Prehľad použitých chemikálií

<i>chemikália</i>	M_w [g. mol ⁻¹]	<i>výrobca</i>	<i>rozpúšťadlo</i>
kvasinkový extrakt	- - -	Fluka	destilovaná voda
peptón	- - -	Sigma	
agar	- - -	Roth	
glukóza (bezvodá) p.a.	180,16	Lach-Ner, s.r.o.	
hydrogénfosforečnan sodný p.a.	358,14		
kyselina citrónová (bezvodá)	192,13	Lachema, Brno	
nigericín (sodná soľ)	746,9	Sigma-Aldrich	etanol
NQO (4-nitrochinolín-N-oxid)	150,16		
MRG -12 *	349,5		
MRG -14 *	377,5		
PPG -12 *	347,5		
PPG -14 *	375,5		
PYG -14 *	415,0		
MRAL -12s *	417,0		
MRAL -14s *	445,0		
PPAL -12s *	415,0		
PPAL -14s *	443,0		
PYAL -12s *	401,0		
PYAL -14s *	429,0		
DMAL -12s *	307,5		
diS-C ₃ (3) (3,3'- dipropylthiakarboxycyanín jodid)	520,5		

* lyzozomotropné látky, ktoré pôsobia na kvasinky tým, že inhibujú činnosť vakuolárnej ATPázy, prípadne ďalších ATPáz a tým blokujú vitálne životné pochody buniek [33,34]

Zásobné roztoky glukózy (40 %) a citrát-fosfátového pufru (10 mM) boli uchovávané pri teplote 4°C. Roztoky lyzozomotropných látok (*), nigericínu, NQO a fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) (10⁻⁴ M) boli uchovávané pri teplote -18°C.

Tab.3.2: Štruktúrne vzorce skúmaných lyzozomotropných látok

$\text{R}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n+1} \quad n = 12, 14$				
R:	 PYG-n	 PPG-n	 MRG-n	
$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n+1} \quad n = 12, 14$				
R:	 PYAL-n	 PPAL-n	 MRAL-n	 DMAL-n

3.2 Kultivačné médiá a roztoky

• **Kultivačné médium YP**

kvasinkový extrakt	10 g
peptón	10 g
destilovaná voda	1000 ml

• **YPD agar 1%**

kvasinkový extrakt	10 g	peptón	10 g
peptón	10 g	agar	20 g
agar	10 g	glycerol	20 g
glukóza	20 g	destilovaná voda	1000 ml
destilovaná voda	1000 ml		

• **YPG agar 2%**

kvasinkový extrakt	10 g
--------------------	------

- **Citrát-fosfátový pufer** (C-P pufer)

Na₂HPO₄ · 12 H₂O 3,6 g
 destilovaná voda 1000 ml

Pridaním vhodného množstva koncentrovaného roztoku kyseliny citrónovej nastavíme pH C-P pufru na hodnotu pH = 6,0.

- **Glukóza 40 %**

glukóza 40 g
 destilovaná voda 60 ml

3.3 Séria použitých izogénnych kvasinkových kmeňov *S. cerevisiae*

Tab.3.3: Prehľad použitých kmeňov a ich genetické charakteristiky

kmeň	genotyp	poznámka
US 50-18C	<i>MAT α, PDR1-3, ura3, his1</i>	nadprodukcia púmp Pdr5p, Snq2p a Yor1p
AD 12	<i>MAT α, PDR1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG</i>	nadprodukcia pumpy Pdr5p
AD 13	<i>MAT α, PDR1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, pdr5Δ::hisG</i>	nadprodukcia pumpy Snq2p
AD 23	<i>MAT α, PDR1-3, ura3, his1, snq2Δ ::hisG, pdr5Δ::hisG</i>	nadprodukcia pumpy Yor1p
AD1-3	<i>MAT α, PDR1-3, ura3, his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG, pdr5Δ::hisG</i>	neprítomnosť púmp Pdr5p, Snq2p a Yor1p

- Zdroj kvasinkových kmeňov *S. cerevisiae*: zbierka UCL (Université catholique de Louvain, Faculté des sciences agronomiques, Louvain-la-Neuve, Belgie)

3.4 Príprava a uchovávanie kvasinkových kultúr

3.4.1 Príprava a uchovávanie zásobných kvasinkových kultúr

Bunkové kultúry boli uchovávané pri teplote -80°C (v médiu obsahujúcom 60 g glycerolu, 10 g glukózy, 2 g peptónu, 1 g kvasinkového extraktu na 100 ml). Sterilnou

kľučkou boli kvasinky prenesené na 1 % YPD agar a kultivované dva dni pri teplote 30°C v inkubátore Raven 2. Misky s kvasinkovou kultúrou boli potom uchovávané pri teplote 4 °C maximálne po dobu jedného mesiaca.

3.4.2 Príprava buniek pre meranie

Malé množstvo zásobnej kultúry bolo prenesené sterilnou kľučkou do sterilného tekutého YP média s 2 % glukózou. Bunky boli aeróbne kultivované v trepacej lázni 20 – 24 h pri 30°C.

Do 10 ml YP média s 2 % glukózou bolo pridané také množstvo inokula, aby výsledná koncentrácia buniek bola $2,5 \cdot 10^6$ buniek / ml (odpovedajúca hodnota $O.D._{578} = 0,1$ *). Kvasinky boli kultivované v trepacej lázni po dobu 20 – 22 h pri 30°C, čím boli získané bunky v post-diauxickej fáze rastu (doba kultivácie bola volená v závislosti na požadovanej rastovej fáze kultúry). Po danej dobe kultivácie bola odobraná vzorka bunkovej suspenzie pre stanovenie kultúry. Bunky boli dvakrát premyté destilovanou vodou a resuspendované v C-P pufri.

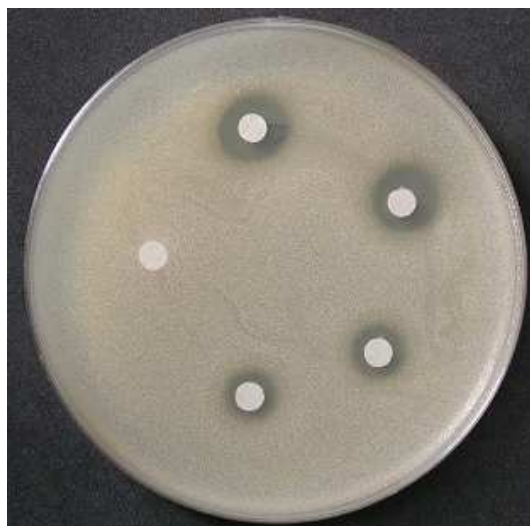
* Optická hustota bola meraná pri vlnovej dĺžke $\lambda = 578$ nm ($O.D._{578}$) na spektrofotometri Novaspec II.

3.5 Biologické metódy pre stanovenie špecificity MDR púmp

Biologické testy (zónový a výsevový test) boli robené v sterilnom prostredí za použitia sterilného materiálu.

3.5.1 Zónový test

Bunky boli pripravené podľa kapitoly 3.4.2. Do 1 % YPD agar bol pridaný taký objem kvasinkovej suspenzie, aby výsledná koncentrácia buniek bola $2,5 \cdot 10^6$ buniek / ml. Na Petriho misku (priemer 10 cm) s pevným 2 % YPG agarom bol nanosený 1 % agar so zaočkovanou kultúrou (teplota agaru by mala byť približne 45 °C). Misky boli ponechané 20 min pootvorené, na stuhnutý povrch agaru boli umiestnené krúžky filtračného papiera, na ktoré boli nanosené 2 μ l skúmanej látky. Pri nanášaní dvoch látok na jeden krúžok bola druhá látka (takisto 2 μ l) pridaná 15 min po aplikácii prvej látky. Misky boli kultivované dva dni pri 30 °C. Ukážka výsledku zónového testu je na obr.3.1.



Obr. 3.1: Výsledok zónového testu. Veľkosť zóny sa zväčšuje v závislosti na zvyšujúcej sa koncentrácii skúmanej látky.

3.5.2 Výsevový test

Bunky boli pripravené podľa kapitoly 3.4.2 a resuspendované v C-P pufri (pH = 6,0) tak, aby výsledná optická hustota suspenzie bola 0,1. Bunková suspenzia bola rozdelená do mikroskúmaviek typu Eppendorf. Jedna vzorka bola použitá ako kontrola a do druhej vzorky bola pridaná testovaná látka so zvolenou koncentráciou. Za občasného miešania boli bunky s danou látkou inkubované jednu hodinu pri pokojovej teplote.

Potom boli vzorky stokrát nariedené v destilovanej vode, 10 μ l bunkovej suspenzie bolo nanesených na Petriho misku (priemer 6 cm) s 1 % YPD agarom a rozotretých sterilnou kľučkou. Každá vzorka bola vysiata na tri misky pre získanie väčšieho štatistického súboru. Misky boli kultivované dva dni pri 30 °C. Množstvo prežívajúcich buniek vystavených účinku testovanej látky v porovnaní s kontrolnou vzorkou vypovedá o letálnom účinku skúmanej látky na bunky (neschopnosť tvoriť kolónie). Výsledok výsevového testu je zobrazený na obr.3.2.



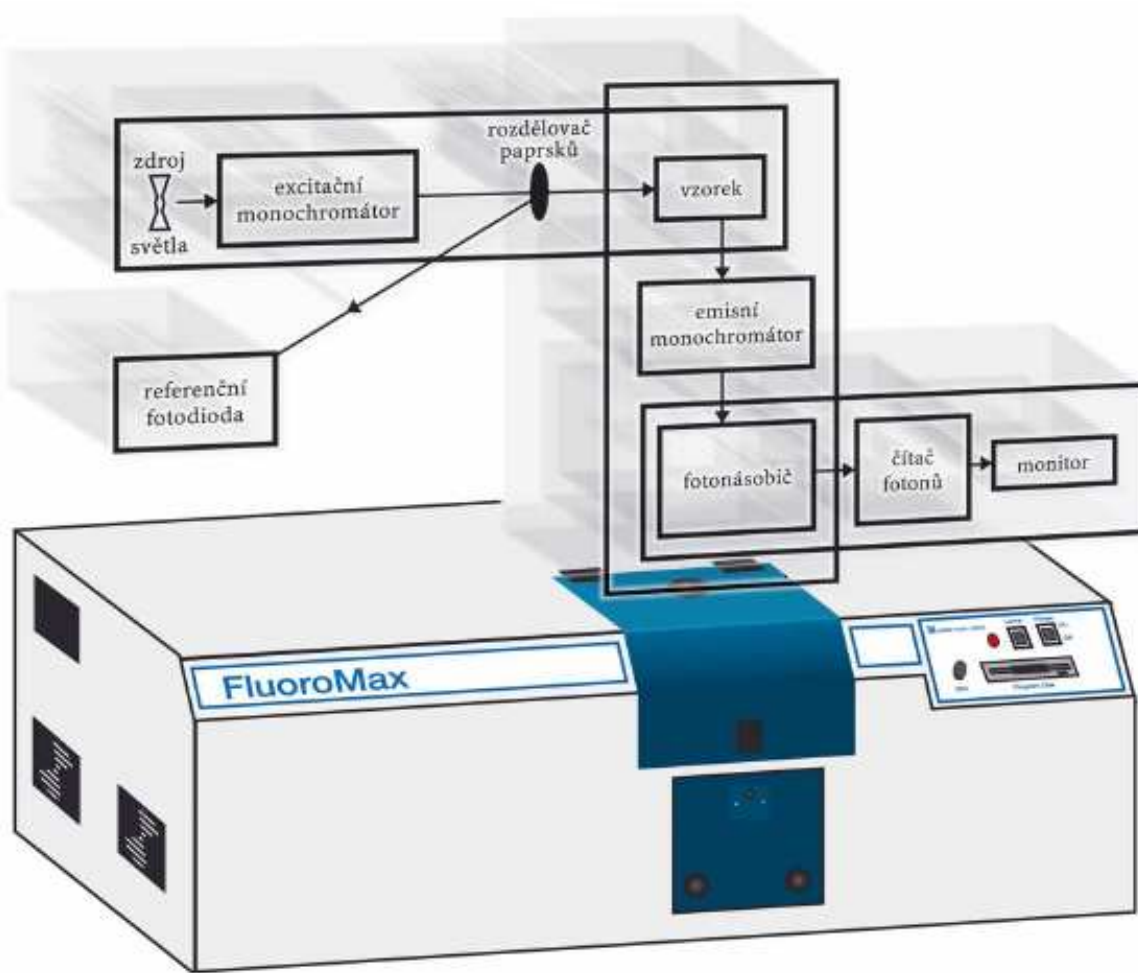
Obr. 3.2: Výsledok výsevového testu. Na misku vpravo boli vysiata bunky, ktoré boli vystavené účinku testovanej látky, na misku vľavo bola vysiata kontrolná vzorka.

3.6 Meranie farbenia buniek fluorescenčnou sondou diS-C₃(3) - metóda farbiacich kriviek

Kladne nabitá fluorescenčná sonda diS-C₃(3) vstupuje do bunky vďaka prítomnosti záporného potenciálu vnútri bunky a interaguje s cytozolickými komponentami. Zvyšovanie koncentrácie sondy v bunke je opticky detegovateľné; je sprevádzané nárastom celkovej intenzity fluorescencie za súčasného posunu emisného spektra do červenej oblasti vďaka väzbe sondy na cytozolické komponenty v bunke. Proces ustáľovania rovnovážneho rozdelenia sondy medzi vnútorným a vonkajším prostredím bunky v závislosti na veľkosti membránového potenciálu je vzhľadom k prítomnosti bunkovej steny pomalý (20 min a viac) a rovnovážna intracelulárna koncentrácia sondy neodpovedá v mnohých prípadoch veľkosti membránového potenciálu (je podstatne nižšia). Za túto skutočnosť sú zodpovedné MDR pumpy Pdr5p a Snq2p, u ktorých bolo dokázané, že odstraňujú fluorescenčnú sondu z buniek [35, 36].

Bunky kvasinkových kmeňov boli pripravené podľa kapitoly 3.4.2 a resuspendované v C-P pufri (pH = 6,0) tak, aby výsledná optická hustota bola 0,1. Do kyviat s bunkovou suspenziou bola pridaná sonda diS-C₃(3) s výslednou koncentráciou $2 \cdot 10^{-8}$ M. Meranie prebiehalo na spektrofluorimetri Fluoromax 3 (obr.3.3) pri pokojovej teplote za občasného miešania vzorky. Fluorescenčné spektrá boli opakovane zaznamenávané po dobu 15 - 20 min. Potom bola do kyviat pridaná testovaná látka so zvolenou koncentráciou a spektrum bolo zaznamenávané po dobu ďalších 30 – 40 min. Zo získaných dát boli zostavené farbiace krivky, ktoré predstavujú časovú závislosť λ_{max} , prípadne I_{max} (λ_{max} je vlnová dĺžka, pre ktorú je intenzita fluorescenčného signálu, I_{max} , maximálna) od pridania fluorescenčnej sondy k bunkovej suspenzii.

Spektrofluorimeter FluoroMax 3 (firma Jobin Yvon-Spex) obsahuje ako zdroj excitačného žiarenia xenónovú lampu a je riadený pomocou programu DataMax. Excitačná vlnová dĺžka bola 541 nm a emisné spektrum bolo zaznamenávané v oblasti 560 - 590 nm. Pri meraní spektier bolo rozptýlené žiarenie eliminované pomocou emisného filtra (cut off 540 nm). Premeranie jedného fluorescenčného spektra trvalo 20 s.



Obr.3.3: Schéma spektrofluorimetra Fluoromax 3 (prevzaté z [32]).

4. Výsledky a diskusia

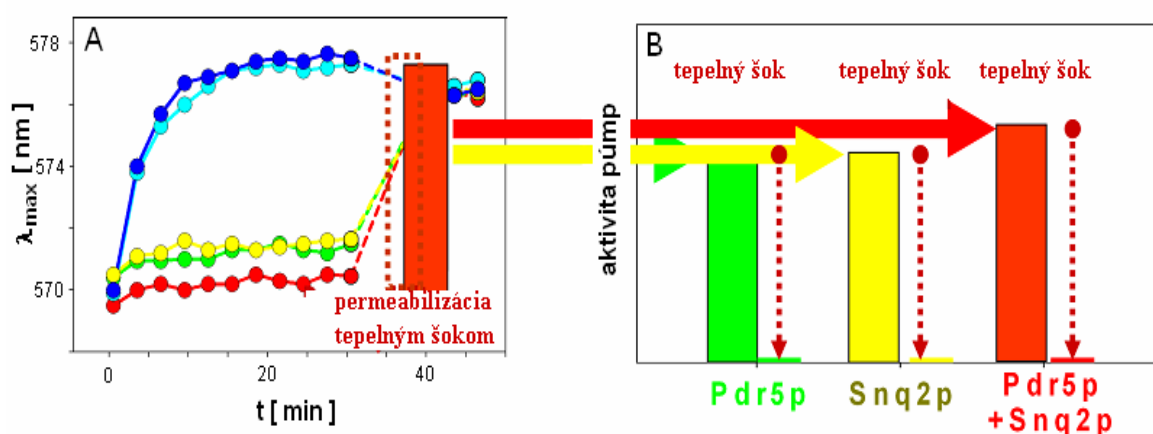
Pre štúdium vplyvu rôznych chemických stresorov na aktivitu dvoch hlavných MDR púmp (Pdr5p a Snq2p) kvasiniek *S. cerevisiae* bola na oddelení biofyziky FÚ UK v Prahe vyvinutá fluorescenčná metóda, ktorá umožňuje s vysokou citlivosťou sledovať zmeny v aktivite týchto púmp u intaktných buniek v relatívne dobre definovanom fyziologickom stave a v reálnom čase po pridaní potenciálneho inhibítora. Metóda je založená na použití redistribučnej potenciometrickej fluorescenčnej sondy diS-C₃(3), ktorá je súčasne substrátom púmp Pdr5p a Snq2p. Hlavným cieľom výskumu je nájsť látky, ktoré by inhibovali činnosť týchto púmp. Vývoj metódy je popísaný v [32] a v súčasnej dobe dokončovanej dizertačnej práci Mgr. Tomáša Hendrycha ("Ovlivnění činnosti membránových transportních systémů kvasinek stresovými faktory").

4.1 Princíp vyvíjanej fluorescenčnej metódy pre vyhľadávanie potenciálnych inhibítorov MDR púmp Pdr5p a Snq2p

Pozitívne nabitá sonda diS-C₃(3) ľahko prechádza plazmatickou membránou a u buniek s nulovou aktivitou púmp Pdr5p a Snq2p je jej vstup ako i rovnovážna koncentrácia určená veľkosťou membránového potenciálu. U buniek s vysokým (neovplyvneným) membránovým potenciálom je intracelulárna koncentrácia sondy vysoká, výsledkom čoho je intenzívne farbenie buniek. V spomínanej metóde boli ako bunky s nulovou aktivitou púmp použité bunky kmeňov *S. cerevisiae* AD1-3 a AD23, ktoré majú deletované gény kódujúce tieto dve pumpy a ich farbiace krivky predstavujú bezpumpové negatívne kontroly pre určenie aktivity púmp (obr.4.1A).

Farbenie buniek obsahujúcich aktívne pumpy Pdr5p a/alebo Snq2p (v tejto metóde reprezentovaných kmeňmi AD12 - Pdr5p, AD13 - Snq2p, US50-18C - Pdr5p a Snq2p), je i napriek ich rovnako veľkému potenciálu ako u bezpumpových kmeňov veľmi nízke vďaka nízkej intracelulárnej koncentrácii sondy, ktorá je výsledkom aktívneho odstraňovania sondy z cytozolu. Vzhľadom na to, že membránový potenciál buniek pumpových a bezpumpových kmeňov, nachádzajúcich sa v rovnakej rastovej fáze, je rovnaký [35], je rozdiel vo farbení pumpových a bezpumpových mutantov odrazom miery aktívneho odstraňovania sondy z buniek, teda aktivity danej pumpy (Pdr5p - AD12, Snq2p - AD13), resp. daných púmp (Pdr5p a Snq2p - US50-18C).

Spôsob, akým je možné pomocou vyvíjanej metódy detegovať inhibíciu týchto púmp, možno demonštrovať pomocou zmien vo farbení buniek po **permeabilizácii plazmatickej membrány tepelným šokom**. Splynutie farbiacich kriviek pumpových a bezpumpových mutantov po účinku šoku indikuje rovnakú intracelulárnu koncentráciu sondy u buniek všetkých kmeňov (obr.4.1A), čo je dôkazom nulovej transportnej aktivity oboch púmp a teda ich inhibície (obr.4.1B). Nová hodnota farbenia buniek bezpumpových kmeňov, ktorá je nižšia oproti farbeniu buniek pred pôsobením tepelného šoku, je dôsledkom zníženia ich membránového potenciálu. V prípade permeabilizácie však dochádza k inhibícii púmp "triviálnym" spôsobom (nekontrolovane rýchly vstup sondy do buniek s porušenou membránou, prípadne bunkovou stenou, alebo denaturácia proteínov a najmä výtok ATP, čo je zdroj energie pre činnosť púmp).



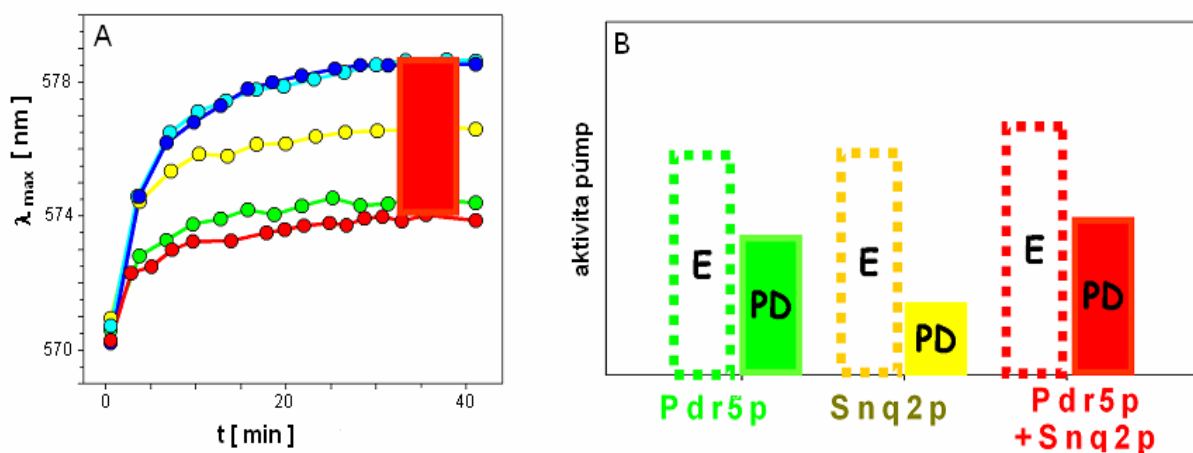
Obr.4.1:

- (A) Vplyv permeabilizácie cytoplazmatickej membrány tepelným šokom na intracelulárnu koncentráciu sondy u buniek kmeňov AD12 (●), AD13 (●), AD23 (●), AD1-3 (●) a US50-18C (●). Koncentrácia sondy: $3 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3). Bunky z exponenciálnej fázy rastu boli premyté a resuspendované v C-P pufrí (pH = 6,0) na O.D.₅₇₈ = 0,1.
- (B) Vplyv permeabilizácie na aktivitu púmp. Aktivita púmp bola získaná odčítaním farbiacich kriviek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) od farbiacej krivky kmeňa AD1-3 pred a po tepelnom šoku.

Aby bolo možné metódu použiť pre stanovenie skutočnej inhibičnej schopnosti príslušného stresoru, bolo nutné naopak nájsť také experimentálne podmienky, pri ktorých pôsobením týchto látok k permeabilizácii buniek nedochádza.

Prvým krokom pri zavedení nového testovacieho protokolu pre štúdium interakcie stresorov s pumpami bola voľba vhodnej **rastovej fázy**. Boli vybrané bunky z ranno post-diauxickej fázy rastu, i keď aktivita ich púmp je nižšia ako u exponenciálnych buniek (obr. 4.2). Dôvodom výberu bola skutočnosť, že post-diauxické bunky sú všeobecne menej citlivé na pôsobenie chemických látok ako exponenciálne bunky a k ich permeabilizácii

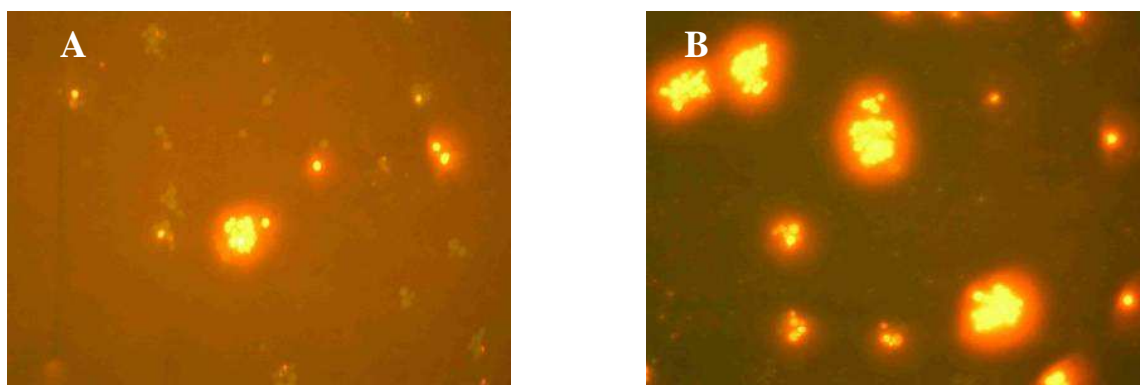
dochádza pri podstatne vyšších koncentráciách. Pôsobenie týchto látok vo veľmi nízkych koncentráciách by totiž nemuselo byť dostatočné pre prejav ich prípadného inhibičného účinku.



Obr.4.2:

- (A) Porovnanie farbenia buniek kmeňov AD12(●), AD13(●), AD23(●), AD1-3(●) a US50-18C(●) v post-diauxickej fáze rastu. Koncentrácia sondy: $3 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3). Bunky boli premyté a resuspendované v C-P pufri (pH = 6,0) na $O.D._{578} = 0,1$.
- (B) Vplyv rastovej fázy na aktivitu púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p). Aktivita púmp buniek v exponenciálnej fáze rastu (E) bola určená odčítaním farbiacich kriviek týchto kmeňov od farbiacej krivky kmeňa AD1-3 z grafu na obr. 4.1A, aktivita púmp u buniek v post-diauxickej fáze rastu (PD) bola stanovená z farbiacich kriviek na obr. 4.2A.

Druhým krokom bola **voľba optimálnych koncentrácií** použitých stresorov. U každého stresoru bola testovaná široká škála koncentrácií v rozsahu 0,1 až 100 μ M. Pre stanovenie hornej hranice použiteľných koncentrácií (teda koncentrácií, pri ktorých je už účinok látok sprevádzaný permeabilizáciou, príp. deštrukciou buniek), bola použitá fluorescenčná sonda diS-C₃(3) (obr.4.3A), ako i fluorescenčne mikroskopické sledovanie vstupu propidium jodidu do buniek s porušenou plazmatickou membránou (obr.4.3B).



Obr.4.3: Stanovenie podielu permeabilizovaných (intenzívne fluoreskujúcich) buniek v suspenzii pomocou (A) fluorescenčnej sondy diS-C₃(3) a (B) propidium jodidu.

V minulosti bol vplyv chemických stresorov na MDR pumpy sledovaný u dvoch skupín látok s popísaným a overeným letálnym účinkom na kvasinky a iné mikroorganizmy [32, 37, 38]. Prvú skupinu tvorili **lyzozomotropné látky** (reprezentované napr. DM-11), ktoré okrem iného pôsobia na kvasinky tým, že inhibujú činnosť vakuolárnej ATPázy, prípadne ďalších ATPáz a tým blokujú vitálne životné pochody buniek.

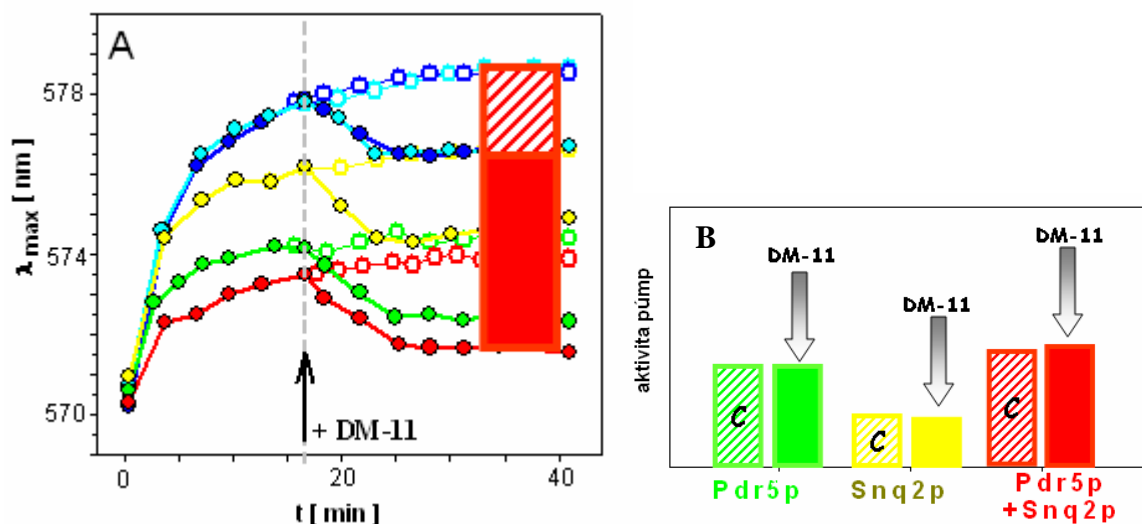
Druhá skupina zahŕňala komerčne vyrábané a prakticky široko používané **biocidy** (látky BAC a ODDC), ktoré sú súčasťou napr. dezinfekčných a farmakologických prostriedkov (ústnych vôd, očných kvapiek, prostriedkov proti zubnému povlaku atď.). Mechanizmus ich pôsobenia na bunky nie je často známy a ich použitie sa sústreďuje na potlačenie bakteriálnych kontaminácií.

Zatiaľ čo zástupca prvej skupiny (DM-11) neinteragoval s pumpou Pdr5p, u oboch látok z druhej skupiny bolo pozorované výrazné ovplyvnenie aktivity pumpy Pdr5p pri transporte sondy [30]. Akým spôsobom možno na základe fluorescenčnej odpovede rozlíšiť látky, ktoré interagujú alebo neinteragujú s pumpami Pdr5p a Snq2p, je vidno z nasledujúcich dvoch príkladov:

A) Vplyv DM-11 na aktivitu MDR púmp (látka neinteragujúca s pumpami)

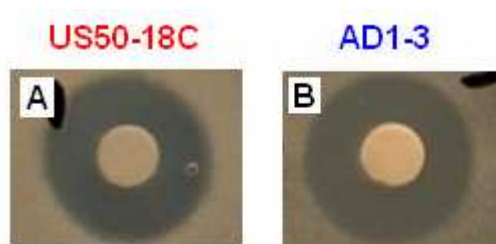
Účinkom DM-11 (2-dodekanoyloxyetyl-dimetylamónium bromid) dochádza k zníženiu membránového potenciálu u buniek bezpumpových kmeňov AD1-3 a AD23, ako aj u buniek s aktívnymi pumpami Pdr5p a/alebo Snq2p, tj. u kmeňov US50-18C, AD12 a AD13, čo je vidieť z poklesu λ_{max} u týchto kmeňov na obr.4.4A. Diferencia medzi pumpovými a bezpumpovými kmeňmi je rovnaká ako u kontrolných neopôsobených buniek (obr.4.4B), tj. pri pôsobení látky DM-11 zostáva aktivita púmp zachovaná a táto látka neinteraguje s pumpami v zmysle kompetitívnej ani inaktivačnej inhibície transportu sondy z cytozolu.

Pre dôkaz vierohodnosti výsledkov získaných fluorescenčnou metódou bol urobený analogický biologický test - **zónový test**, v ktorom možno interakciu študovanej látky s pumpou (pumpami) vedúcou k jej (ich) inhibícii stanoviť na základe zväčšenia inhibičnej zóny u pumpového kmeňa (US50-18C). Ako vidieť na obr.4.5, zóna inhibície rastu u pumpového kmeňa US50-18C je rovnaká ako u bezpumpového kmeňa AD1-3, čo znamená, že sa pumpy Pdr5p a Snq2p rovnako ako Yor1p nepodieľajú na odstraňovaní tejto látky z buniek. Testovaná látka DM-11 teda nie je substrátom ani jednej z týchto púmp.



Obr.4.4:

- (A) Vplyv pridania DM-11 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 17. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $3 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 5 μ M DM-11.
- (B) Znáznorenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) s neovplyvneným $\Delta\Psi$ (C - kontrola) a s nižším $\Delta\Psi$ (po pridaní DM-11).



Obr.4.5: Veľkosť inhibičných zón u buniek (A) US50-18C a (B) AD1-3 po pridaní DM-11 na papierový terčik (2 μ l 50 μ M DM-11).

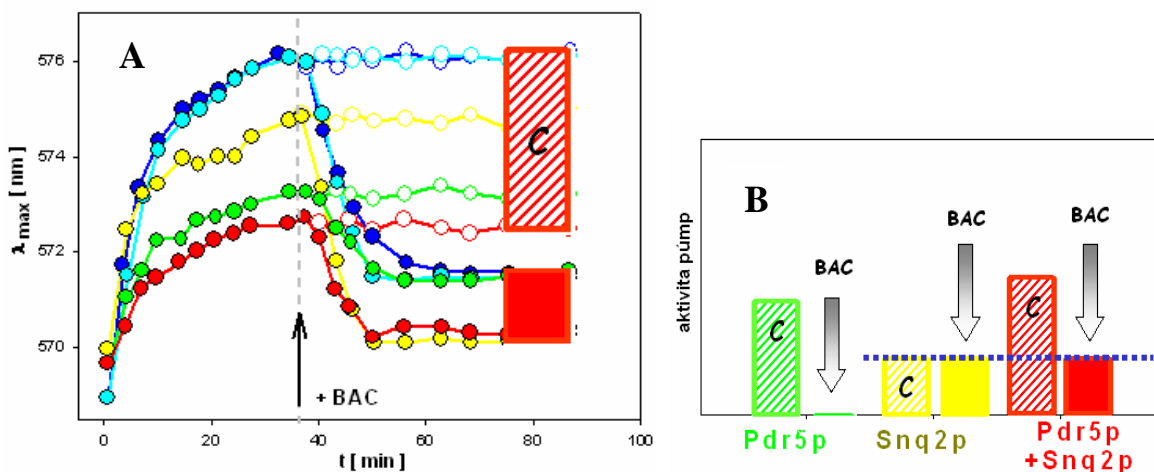
B) Vplyv BAC na aktivitu MDR púmp (látka interagujúca s pumpou Pdr5p)

Pridanie BAC (benzalkónium chlorid) k bezpumpovým kontrolným bunkám vedie k pomerne výraznému poklesu ich membránového potenciálu (obr.4.6A). U buniek všetkých pumpových kmeňov je taktiež pozorovaný pokles λ_{max} , ale na rozdiel od pôsobenia predchádzajúcej látky nezostáva vo všetkých prípadoch diferencia medzi farbením bezpumpových a pumpových kmeňov vzhľadom na kontrolu zachovaná. Iba u buniek AD13, u ktorých je prítomná len pumpa Snq2p, je diferencia po pridaní látky rovnaká ako u kontroly, čo vypovedá o tom, že transportná aktivita tejto pumpy sa účinkom BAC nemení. U buniek AD12, ktoré majú len pumpu Pdr5p, dochádza po pridaní BAC k splynutiu farbiacej krivky AD12 s farbením oboch bezpumpových kmeňov. Diferencia

odrážajúca schopnosť pumpy Pdr5p aktívne exportovať sondu z buniek je teda rovná nule (obr.4.6B). Navyiac, farbiaca krivka buniek US50-18C, majúcich súčasne obe pumpy, splyva s farbiacou krivkou buniek AD13; po pôsobení BAC zostáva teda i u buniek US50-18C zachovaná len aktivita pumpy Snq2p. Z výsledkov fluorescenčného testu vyplýva, že BAC interaguje len s pumpou Pdr5p a že táto interakcia vedie k strate schopnosti transportovať sondu z buniek. Nedochoádza tu k permeabilizácii, a preto môže byť príčinou pozorovaného javu len jedna z nasledujúcich možností:

- a) Dochádza k skutočnej inhibícii aktivity pumpy Pdr5p (inaktivácia pumpy) - BAC je skutočný inhibítor.
- b) BAC je rovnako ako sonda diS-C₃(3) substrátom Pdr5p a dochádza ku kompetícii sondy a testovanej látky o transport - BAC je kompetitívny inhibítor.

Pre zistenie, ktorá z týchto dvoch možností je príčinou pozorovaného efektu, bol použitý **zónový test**, pomocou ktorého možno sledovať vplyv koncentrácie BAC na veľkosť inhibičných zón pumpových i bezumpových kmeňov. Pri porovnaní veľkosti inhibičných zón u jednotlivých kmeňov (obr.4.7) pri identickej koncentrácii (3 mM), ktorá bola vybraná ako najvhodnejšia, bola zistená absencia inhibičnej zóny u kmeňa US50-18C (Pdr5p a Snq2p) a AD12 (Pdr5p). Znamená to, že BAC je substrátom pumpy Pdr5p a k pozorovanej inhibícii pumpy dochádza v dôsledku kompetície dvoch substrátov tejto pumpy (BAC a sondy).



Obr.4.6:

- (A) Vplyv pridania BAC na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 37. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $3 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 2 μ M BAC.
- (B) Znárodnenie zmeny aktivity púmp buniek u kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridání BAC, (C - kontrola).



Obr.4.7: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní BAC na papierový terčik (2 μ l 3 mM BAC).

4.2 Testovanie účinku lyzozomotropných látok na činnosť MDR púmp u *S. cerevisiae*

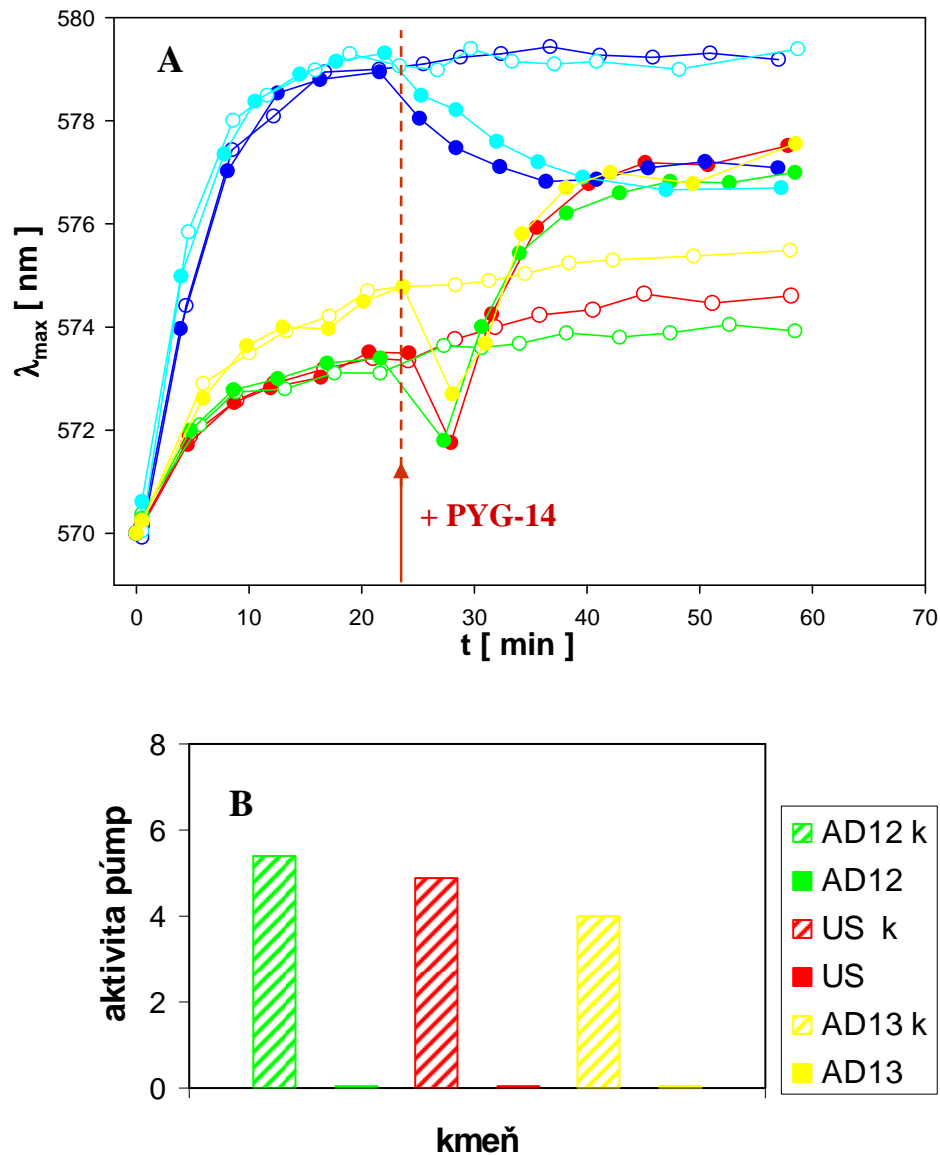
Hlavnou úlohou diplomovej práce bolo pomocou fluorescenčnej metódy otestovať sadu 12 štruktúrne podobných lyzozomotropných látok (vid' kapitola 3.1) a zistiť, či niektorá z daných zlúčenín nie je inhibítorom púmp Pdr5p a/alebo Snq2p a v kombinácii s biologickými testami (zónový a výsevový test) rozhodnúť, o aký typ inhibície (kompetitívna/ nekompetitívna) ide. Prehľad výsledkov, ktoré sme získali pri testovaní týchto látok, zahájime analýzou fluorescenčných odpovedí, ktoré boli pozorované pri pôsobení látok PYG-14 a DMAL-12. U oboch látok bolo už predtým na základe rozdielov vo veľkosti zón u kmeňov AD1-3 a US50-18C zistené, že sú substrátmi niektorej(ych) z trojice púmp Pdr5p, Snq2p a Yor1p [38].

4.2.1 Vplyv **PYG-14** a **DMAL-12** na aktivitu MDR púmp

A) **PYG-14**

Účinok látky PYG-14 (50 μ M) na bunky *S. cerevisiae* študovaný fluorescenčnou metódou (vid' referencia v [38]) bol doteraz testovaný len na kmeňoch US50-18C a AD1-3. Vzhľadom na súčasné znalosti (pozorované splynutie farbiacich kriviek kmeňov AD1-3 a US50-18C indikuje permeabilizáciu buniek) sme sa rozhodli vplyv tejto látky preskúmať pri použití nižších koncentrácií (40, 25, 18 a 10 μ M), a to ako u spomenutých dvoch kmeňov, tak i u jednopumpových kmeňov (AD12, AD13 a AD23). Najvyššiu koncentráciu testovanej látky sme zvolili 40 μ M, tj. blízku koncentrácii použitej v práci [38]. Ako vidno z obr.4.8A, dochádza pri tejto koncentrácii k splynutiu farbiacich kriviek všetkých kmeňov, čo indikuje nulovú aktivitu oboch študovaných púmp Pdr5p a Snq2p (obr.4.8B), ktorá je daná triviálnou inhibíciou púmp spôsobenou permeabilizáciou buniek. Pomocou

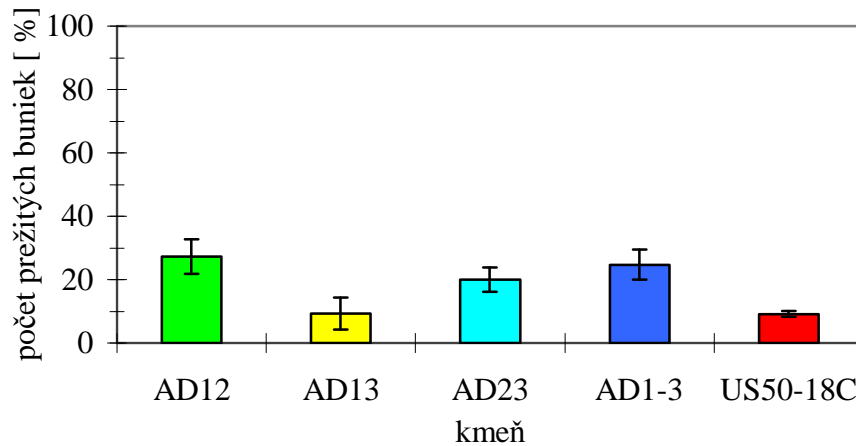
výsevového testu sme dokázali, že táto koncentrácia je pre bunky letálna, tj. percento prežívajúcich buniek je približne 20 % (obr.4.9).



Obr.4.8:

(A) Vplyv pridania PYG-14 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 22. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 40 μ M PYG-14.

(B) Znáznorenie zmeny aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridání PYG-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



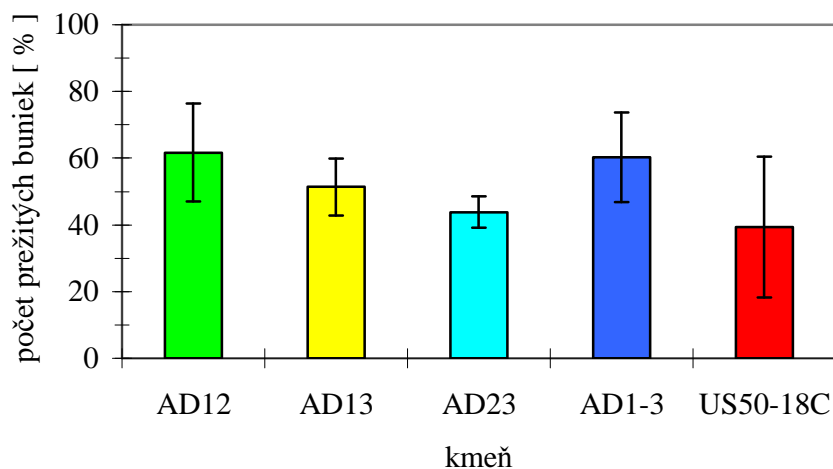
Obr.4.9: Vplyv pridania PYG-14 ($40 \mu\text{M}$) na počet prežívajúcich kvasiniek *S. cerevisiae* kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v postdiauxickej fáze (21 h rastu). Bunky kultivované pri 30°C po dobu 48 h, doba pôsobenia PYG-14: 1 h.

Zníženie koncentrácie látky vedie k zníženiu počtu permeabilizovaných buniek vo vzorke, čo vidno z výsevového testu (obr.4.10), v ktorom pri použití $20 \mu\text{M}$ PYG-14 prežíva už okolo 50 % buniek. Z fluorescenčnej odpovede na pridanie látky s koncentráciou $25 \mu\text{M}$ PYG-14 vyplýva, že pri nižšom počte permeabilizovaných buniek vo vzorke nedochádza k splynutiu farbiacich kriviek pumpových a bezpumpových kmeňov, obr.4.11A. Pozorovaný rozdiel $\Delta\lambda_{max}$ (obr.4.11B) svedčí o tom, že pri pôsobení látky s touto koncentráciou zostáva aktivita púmp u intaktných buniek aspoň čiastočne zachovaná. Z týchto výsledkov však nemožno jednoznačne rozhodnúť, či je transport sondy jednotlivými pumpami účinkom látky ovplyvnený, pretože zvyšková aktivita púmp u jednotlivých kmeňov je veľmi nízka, teda príspevok intenzívne sa farbiacich permeabilizovaných buniek k celkovému fluorescenčnému signálu je stále veľmi vysoký.

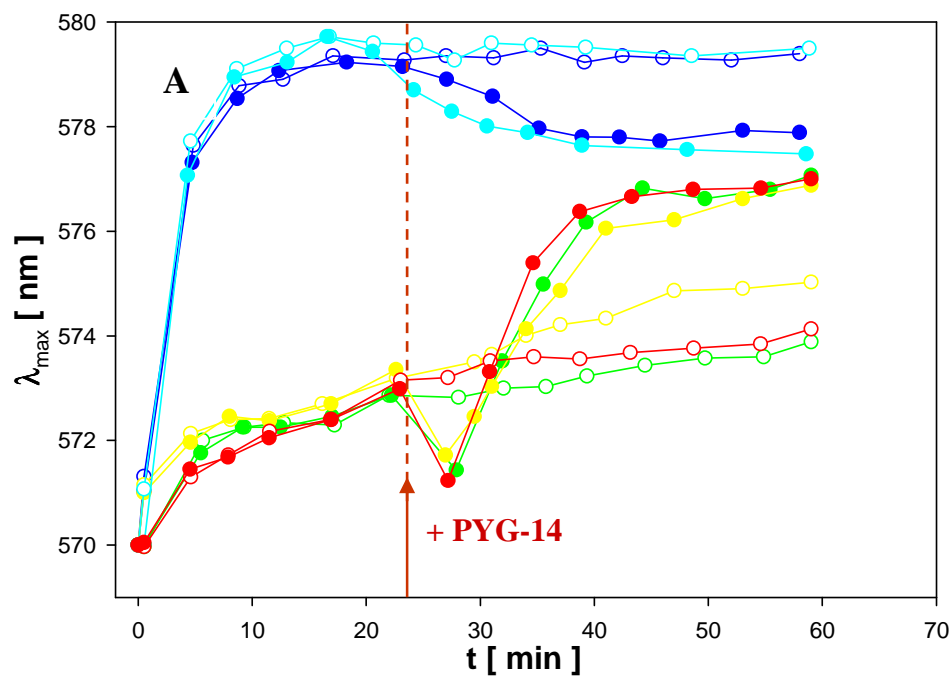
Pri použití koncentrácie $18 \mu\text{M}$ PYG-14 je pozorovaný väčší rozdiel medzi farbením pumpových a bezpumpových mutantov ako v predchádzajúcom prípade (obr.4.12A) vďaka nižšiemu počtu permeabilizovaných buniek vo vzorke. Ako vyplýva z obr. 4.12B, možno už pri použití tejto koncentrácie PYG-14 vyvodit' závery o jeho vplyve na schopnosť jednotlivých púmp transportovať sondu. Zatiaľ čo u buniek AD13 nie je aktivita pumpy Snq2p ovplyvnená, účinkom PYG-14 dochádza k zníženiu aktivity Pdr5p (pokles aktivity pozorovaný u buniek kmeňa AD12 a US50-18C).

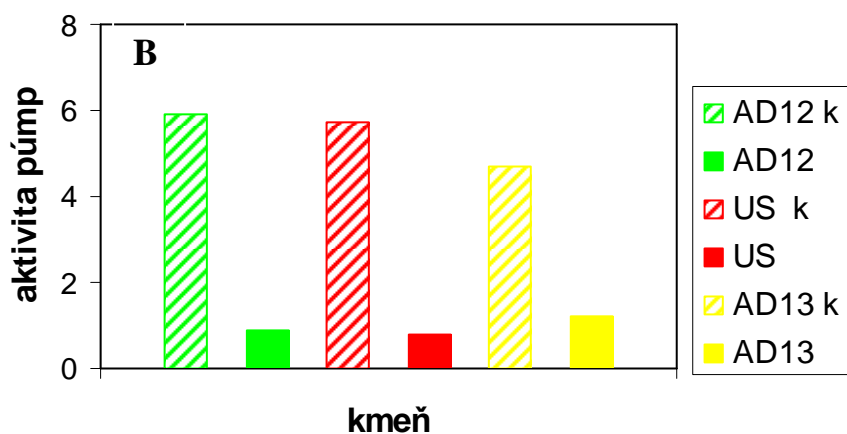
Pri koncentrácii $10 \mu\text{M}$ PYG-14 možno pozorovať výrazný depolarizačný efekt tejto látky na bunky, obr. 4.13A, vďaka zanedbateľnému príspevku mŕtvych buniek [31]. Vzhľadom na to, že pri tejto koncentrácii nie je pozorované zníženie aktivity ani jednej z

testovaných púmp, obr. 4.13B, je pravdepodobné, že použitá koncentrácia nestačí na ovplyvnenie schopnosti púmp transportovať sondu.



Obr.4.10: Vplyv pridania PYG-14 ($20 \mu\text{M}$) na počet prežívajúcich kvasiniek *S. cerevisiae* kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v postdiauxickej fáze (21 h rastu). Bunky kultivované pri 30°C po dobu 48 h, doba pôsobenia PYG-14: 1 h.

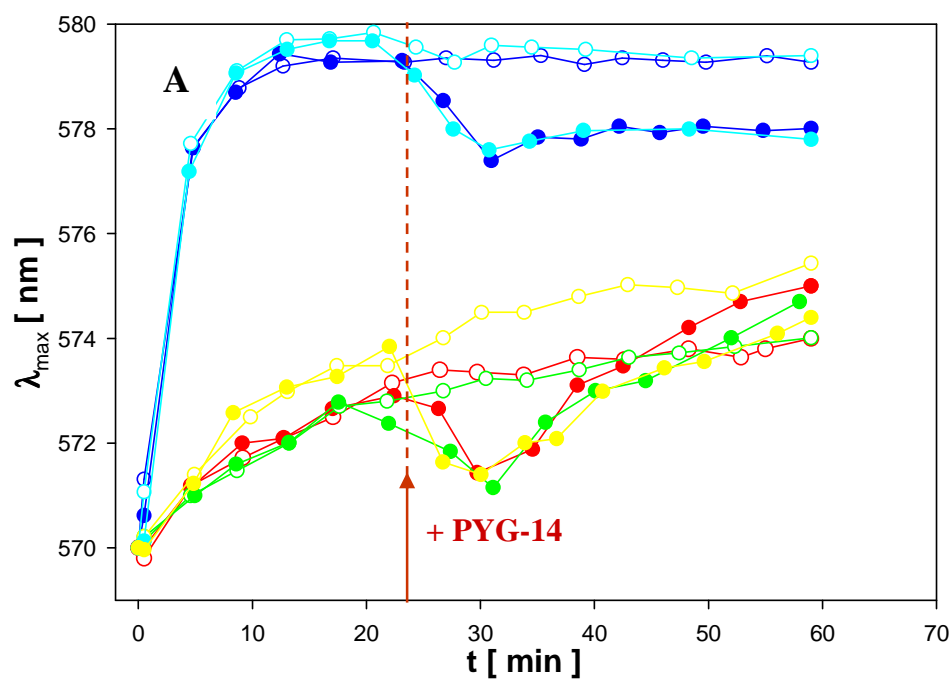


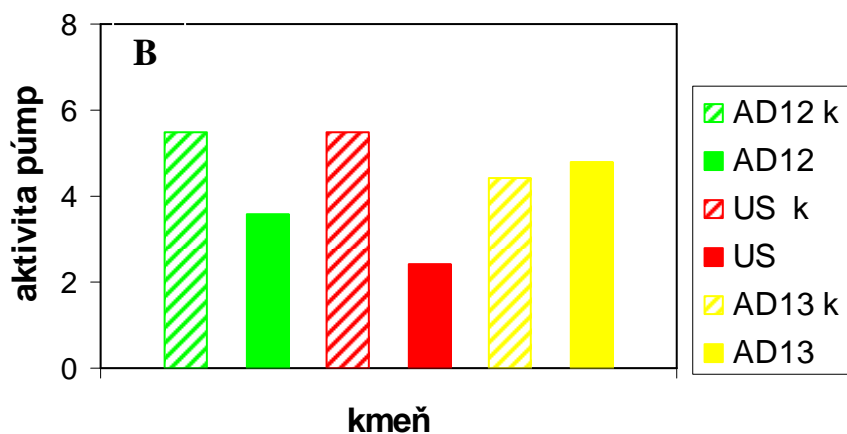


Obr.4.11:

(A) Vplyv prídania PYG-14 na farbenie buniek kmeňov **AD12**, **AD13**, **AD23**, **AD1-3** a **US50-18C** v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 22. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), **25 μM** PYG-14.

(B) Znáznornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (**Pdr5p**), AD13 (**Snq2p**) a US50-18C (**Pdr5p a Snq2p**) po pridaní PYG-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).

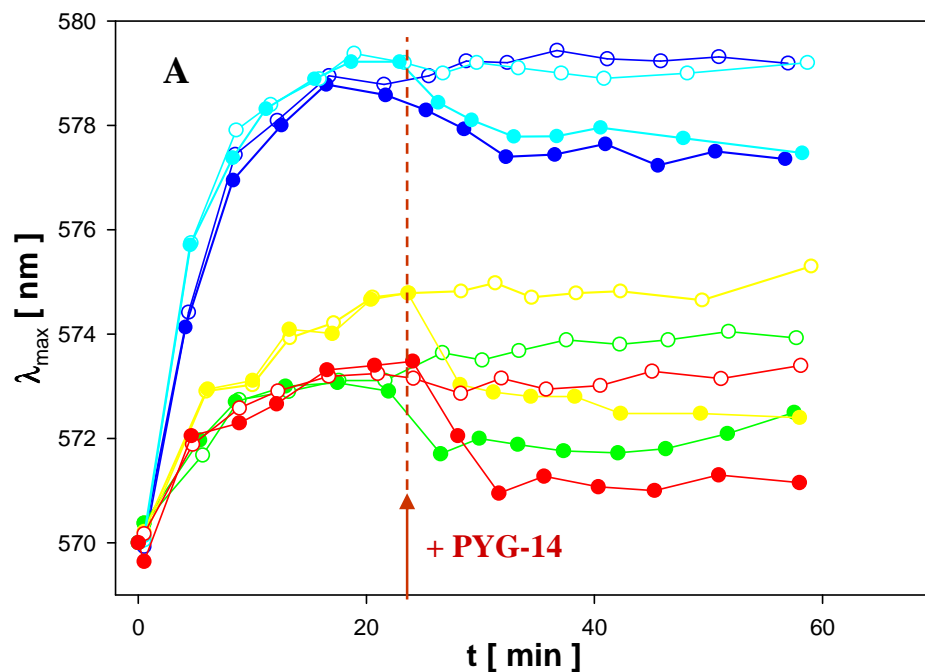


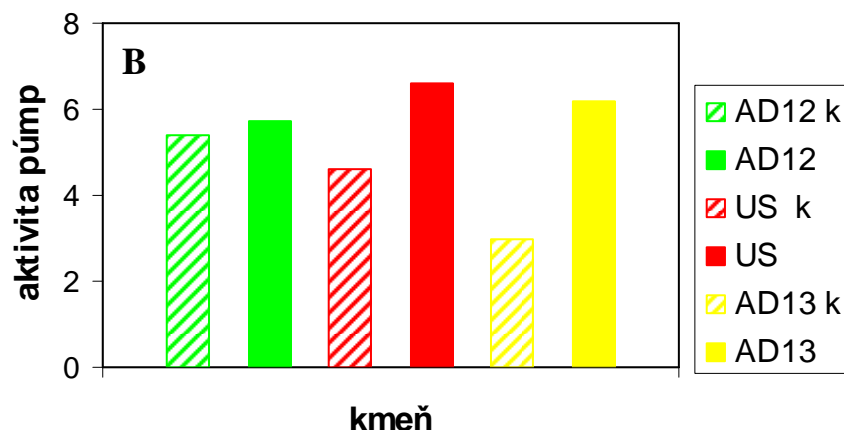


Obr.4.12:

(A) Vplyv pridania PYG-14 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 22. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdné symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 18 μ M PYG-14.

(B) Znáznornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridaní PYG-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).





Obr.4.13:

- (A) Vplyv pridania PYG-14 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD23, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 22. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 10 μ M PYG-14.
- (B) Znárodnenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridaní PYG-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).

Aby sme mohli rozhodnúť, či čiastočná inhibícia pumpy Pdr5p, pozorovaná pri koncentrácii 18 μ M PYG-14, je dôsledkom toho, že:

- 1) PYG-14 je skutočný inhibítor - neúplná inhibícia aktivity pumpy Pdr5p je dôsledkom nízkej koncentrácie látky alebo
 - 2) PYG-14 je kompetitívny inhibítor - neúplná inhibícia aktivity pumpy Pdr5p je dôsledkom kompetície sondy a látky o transport,
- bolo potrebné porovnať veľkosť inhibičných zón nielen u kmeňov AD1-3 a US50-18C, ale i u jednopumpových kmeňov AD12, AD13 a AD23.

Ad 1) V prípade, že by rozdiel vo veľkosti inhibičných zón u kmeňov AD1-3 a US50-18C, pozorovaný v práci [38], bol spôsobený aktívnym odstraňovaním PYG-14 pumpou Yor1p a nie Pdr5p, znamenalo by to, že zníženie schopnosti pumpy Pdr5p transportovať sondu je spôsobené čiastočným inaktivačným účinkom PYG-14.

Ad 2) Ak však je za rozdiel vo veľkosti zón u AD1-3 a US50-18C zodpovedná pumpa Pdr5p, je pozorovaná čiastočná inhibícia transportu sondy dôsledkom kompetície dvoch substrátov.

Z porovnania inhibičných zón u jednotlivých kmeňov vyplýva, obr. 4.14, že PYG-14 je substrátom nielen Pdr5p, ale i Snq2p. Schopnosť odstraňovať PYG-14 z buniek je u pumpy Snq2p podstatne menšia ako u pumpy Pdr5p (zóna u AD13 je menšia ako u AD1-3,

ale väčšia ako u AD12). Rovnaká veľkosť inhibičných zón u kmeňov AD23 a AD1-3 naznačuje, že táto látka nie je substrátom pumpy Yor1p.

Na základe výsledkov zónového testu môžeme konštantovať, že pozorovaná čiastočná inhibícia pumpy Pdr5p je dôsledkom kompetície fluorescenčnej sondy a PYG-14 o transport.



Obr.4.14: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PYG-14 na papierový terčík (2 μ l 50 mM PYG-14).

Otázkou zostáva, prečo:

- 1) Po pridaní PYG-14 (18 μ M*) nepozorujeme úplnú inhibíciu transportu sondy pumpou Pdr5p, ako je tomu pri pôsobení biocidu BAC (viď kapitola 4.1), i keď použitá koncentrácia PYG-14 je podstatne vyššia ako u BAC (2 μ M).
- 2) U najnižšej použitej koncentrácii PYG-14 (10 μ M) nie je pozorovaná žiadna inhibícia pumpy Pdr5p.
- 3) U pumpy Snq2p, pre ktorú je PYG-14 takisto substrátom, nie je u žiadnej z použitých koncentrácií pozorovaný inhibičný efekt tejto látky na schopnosť pumpy transportovať sondu.

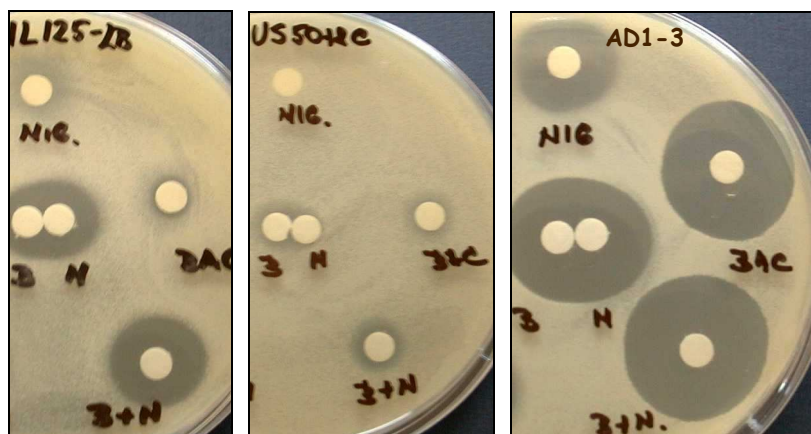
Pravdepodobným vysvetlením týchto zistení sa zdá byť rôzna afinita púmp Pdr5p a Snq2p k rôznym substrátom. Z tohto hľadiska by bola fluorescenčná sonda substrátom s vysokou afinitou k pumpe Pdr5p i k Snq2p.

- Afinita pumpy Pdr5p k BAC je zrejme porovnateľná s afinitou k sonde (príp. trochu nižšia), pretože použitie stokrát vyššej koncentrácie BAC ($2 \cdot 10^{-6}$ M) vzhľadom ku koncentrácii sondy ($2 \cdot 10^{-8}$ M) stačí k úplnej inhibícii transportu sondy pumpou Pdr5p (viď kapitola 4.1).

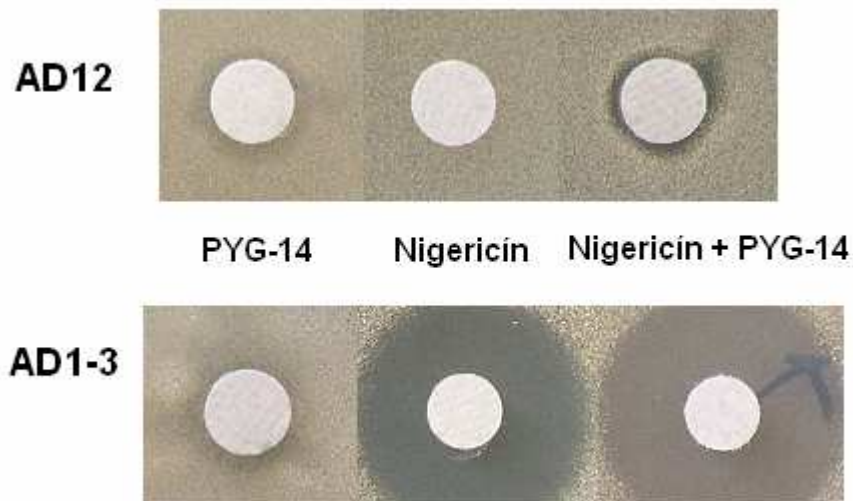
*U vyšších koncentrácií PYG-14 nemožno vzhľadom na permeabilizáciu buniek určiť, či sú tieto koncentrácie dostatočné pre úplnú inhibíciu transportu sondy

- Afinita pumpy Pdr5p k PYG-14 je podstatne nižšia ako afinita k sonde, pretože použitie tisíckrát vyššej koncentrácie PYG-14 ($\sim 2 \cdot 10^{-5}$ M) v porovnaní s koncentráciou sondy ($2 \cdot 10^{-8}$ M) spôsobuje len čiastočnú inhibíciu transportu sondy touto pumpou. Koncentrácia PYG-14 päťstokrát vyššia ako koncentrácia sondy nie je dostatočná k pozorovaniu akéhokoľvek ovplyvnenia schopnosti pumpy transportovať sondu.
- Afinita pumpy Snq2p k PYG-14 je zrejme ešte nižšia ako afinita Pdr5p k tejto látke, pretože ani u jednej z testovaných koncentrácií, pri ktorých bolo možné sledovať zmeny v aktivite púmp (permeabilizácia buniek), nebol transport sondy touto pumpou ovplyvnený.

Aby sme naše vysvetlenie potvrdili, urobili sme nezávislý biologický experiment zavedený v práci [38]. Tento „dvojsubstrátový test“ bol úspešne použitý pre dôkaz kompetície dvoch substrátov (BAC a nigericín) o transport pumpou Pdr5p, vid' obr. 4.15 použitý z práce [38]. Ako je zrejme z obrázku, pri súčasnom pridaní oboch substrátov, voči ktorým vykazuje pumpa Pdr5p vysokú afinitu, k tomu istému alebo k príbuznému terčiku, je zrejme prekročená horná medza kapacity pumpy Pdr5p (najmä u divokého kmeňa IL125-2B s menším počtom púmp v membráne vzhľadom ku kmeňu US50-18C s nadprodukciou púmp), čo vedie ku zvýšeniu vnútrobunkovej koncentrácie týchto látok a k podstatnej inhibícii rastu (zväčšenie inhibičných zón).



Obr. 4.15: Vizualizácia kompetície dvoch substrátov pumpy Pdr5p o transport pomocou zónového testu: vplyv súčasného pridania oboch substrátov (BAC a nigericín) na veľkosť inhibičných zón u buniek *S. cerevisiae* AD1-3, US50-18C a IL125-2B. Použité koncentrácie zásobných roztokov: 3 mM BAC, 1 mM nigericín. **Použité z práce [38].**



Obr. 4.16: Vizualizácia kompetície dvoch substrátov pumpy Pdr5p o transport pomocou zónového testu: vplyv súčasného pridania oboch substrátov s rozdielnou afinitou k pumpe (PYG-14 a nigericín) na veľkosť inhibičných zón u buniek *S. cerevisiae* AD12 a AD1-3. Použité koncentrácie zásobných roztokov: 50 mM PYG-14, 1mM nigericín.

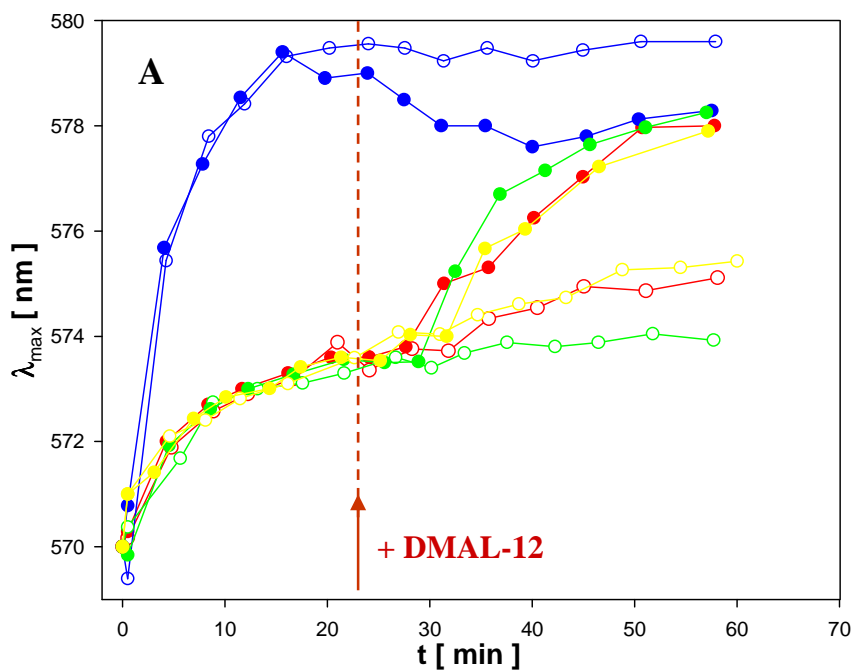
Ako vyplýva z výsledku dvojsubstrátového testu, obr. 4.16, v ktorom bol použitý nigericín ako substrát, ku ktorému má pumpa Pdr5p vysokú afinitu (koncentrácia zásobného roztoku: 1 mM) a PYG-14, ku ktorému (ako predpokladáme) má Pdr5p nízku afinitu (koncentrácia zásobného roztoku: 50 mM), nedochádza pri súčasnom pridaní oboch substrátov u kmeňa AD12 k vytvoreniu inhibičných zón v dôsledku kompetície týchto substrátov. Vďaka nízkej afinite pumpy Pdr5p k PYG-14 tak nie je pri použitej koncentrácii (päťdesiatkrát vyššia ako u nigericínu) prekročená saturačná kapacita pumpy vedúca k nárastu vnútrobunkovej koncentrácie nigericínu a k zväčšeniu inhibičných zón. Tento výsledok potvrdil naše vysvetlenie výsledkov získaných pomocou fluorescenčnej metódy.

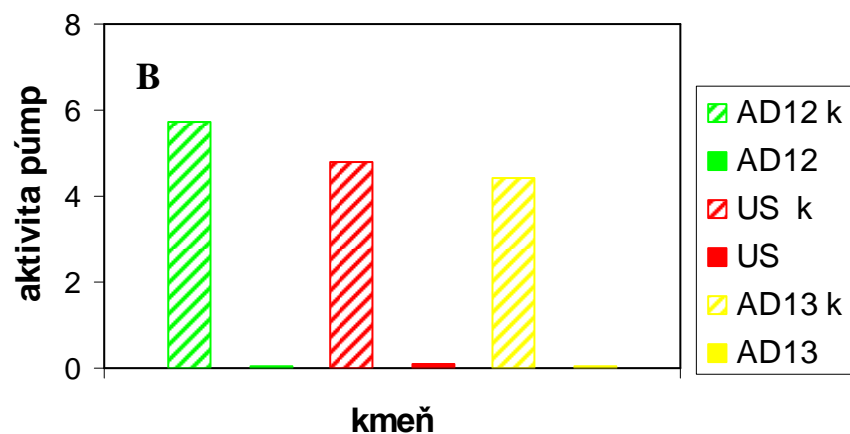
B) DMAL-12

Látka DMAL-12 sa svojím účinkom na bunky *S. cerevisiae* veľmi podobá pôsobeniu PYG-14. Pri najvyššej použitej koncentrácii (40 μM) je pôsobenie oboch látok rovnaké - dochádza k permeabilizácii buniek (porovnaj obr.4.8, 4.17). Vplyv DMAL-12 na aktivitu MDR pŕpump je možno zistiť až pri použití nižších koncentrácií (27 μM , a dokonca i 10 μM , na rozdiel od PYG-14), pri ktorých nezostáva diferenciacia medzi farbením pumpových kmeňov (AD12 a US50-18C) a bezpumpového kmeňa AD1-3 zachovaná

vzhľadom na kontrolu (obr.4.18A, 4.19A). V tomto experimente, rovnako ako vo všetkých ďalších, nebola už meraná druhá negatívna bezpumpová kontrola - kmeň AD23.

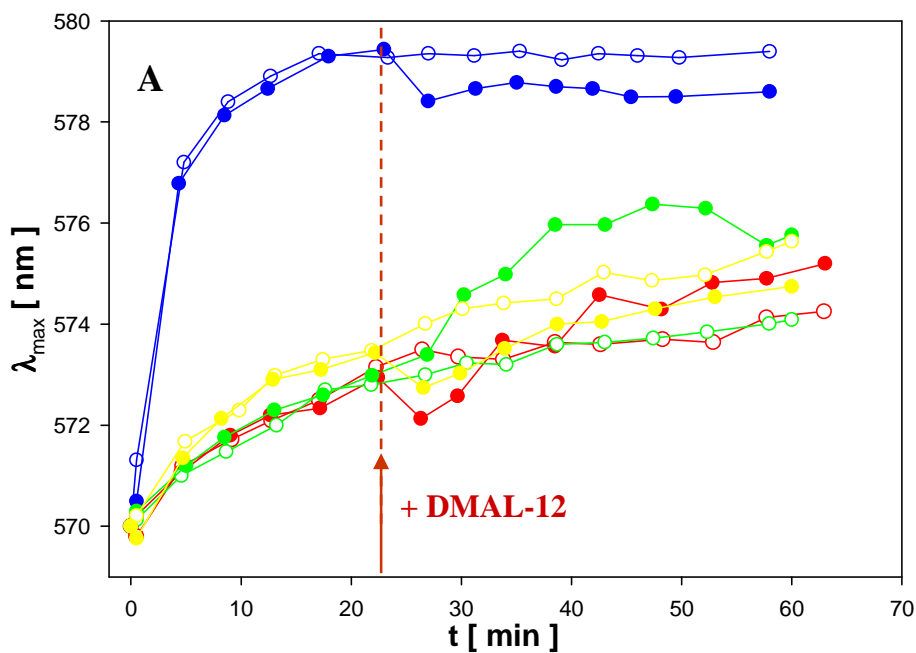
U buniek AD12, ktoré majú len pumpu Pdr5p, dochádza po pridaní DMAL-12 k posunu λ_{max} do červenej oblasti spektra smerom k úrovni farbenia bezpumpových mutantov, čo indikuje zníženie transportnej aktivity tejto pumpy (obr.4.18B, 4.19B). Farbiace krivky buniek US50-18C, majúcich obe pumpy, pritom splývajú s farbením buniek AD13 (Snq2p), čo spolu so skutočnosťou, že aktivita pumpy Snq2p nie je účinkom DMAL-12 ovplyvnená, svedčí o tom, že DMAL-12 interaguje len s pumpou Pdr5p. Táto interakcia vedie k čiastočnej strate schopnosti pumpy Pdr5p transportovať sondu z buniek. Nejde tu o permeabilizáciu (pri týchto koncentráciách prežíva viac ako 70 % buniek, obr.4.20) a preto príčinou pozorovanej čiastočnej absencie transportu môže byť (rovnako ako u PYG-14) len to, že DMAL-12 je buď skutočný alebo kompetitívny inhibítor.

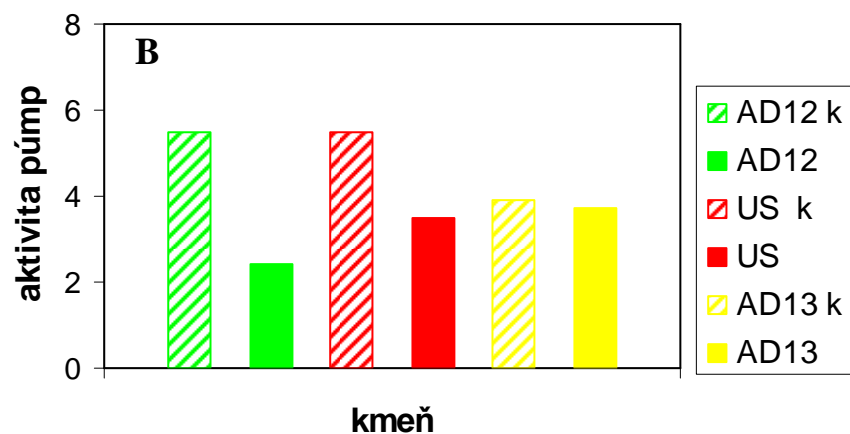




Obr.4.17:

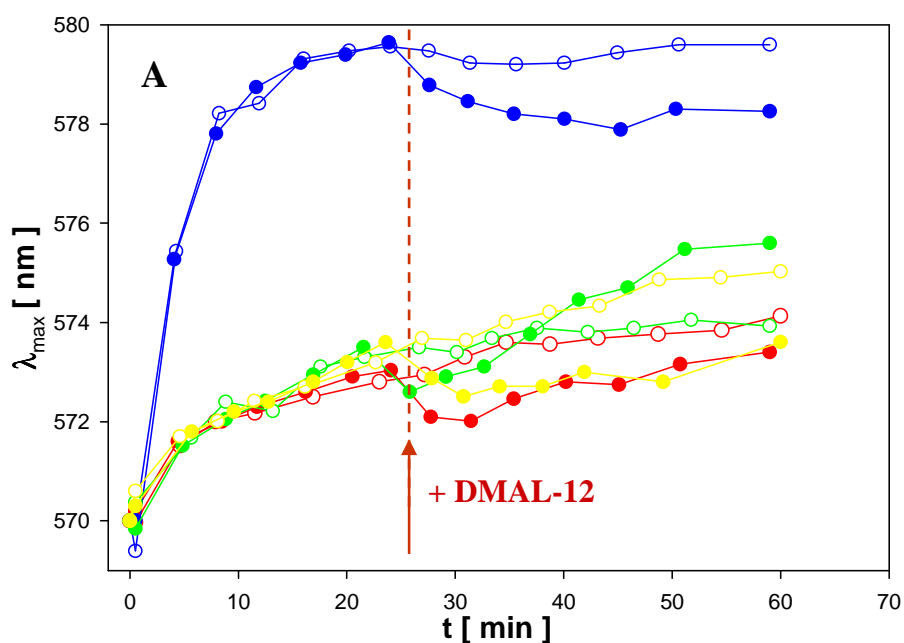
- (A) Vplyv pridania DMAL-12 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 23. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 40 μ M DMAL-12.
- (B) Znáznorenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridaní DMAL-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).

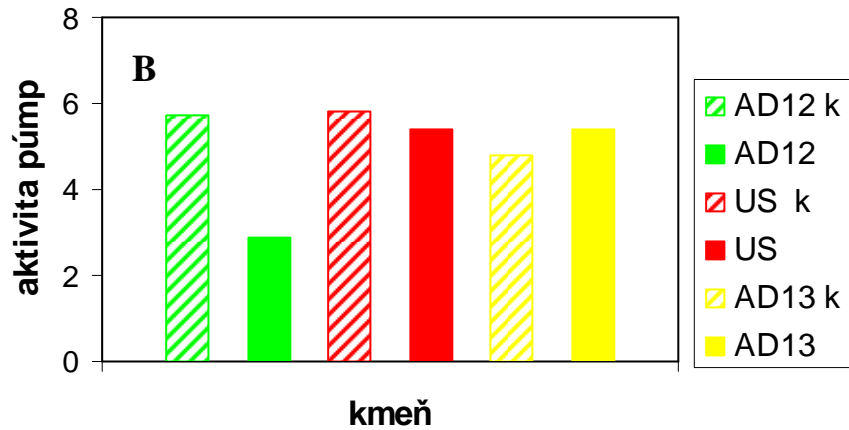




Obr.4.18:

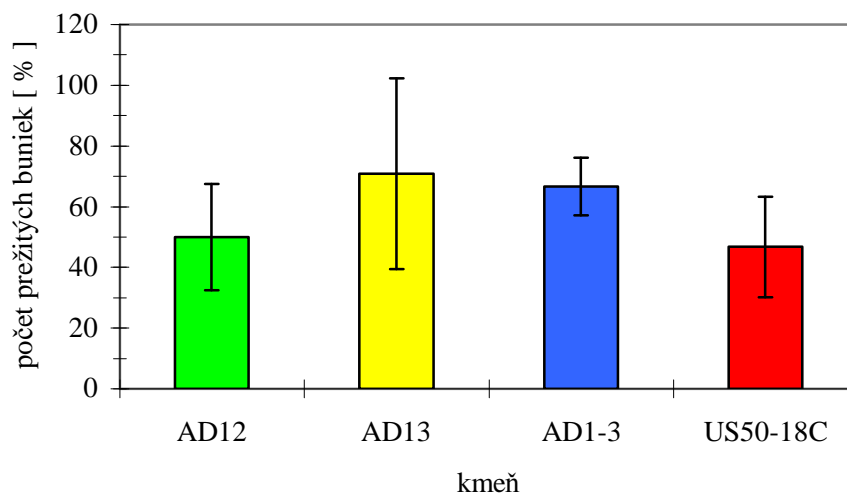
- (A) Vplyv pridania DMAL-12 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 23. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 27 μ M DMAL-12.
- (B) Znáozornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridaní DMAL-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).





Obr.4.19:

- (A) Vplyv pridania DMAL-12 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 23. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 10 μ M DMAL-12.
- (B) Znáznornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridaní DMAL-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.20: Vplyv pridania DMAL-12 (30 μ M) na počet prežívajúcich kvasiniek *S. cerevisiae* kmeňov AD12, AD13, AD1-3 a US50-18C v postdiauxickej fáze (21 h rastu). Bunky kultivované pri 30°C po dobu 48 h, doba pôsobenia DMAL-12: 1 h.

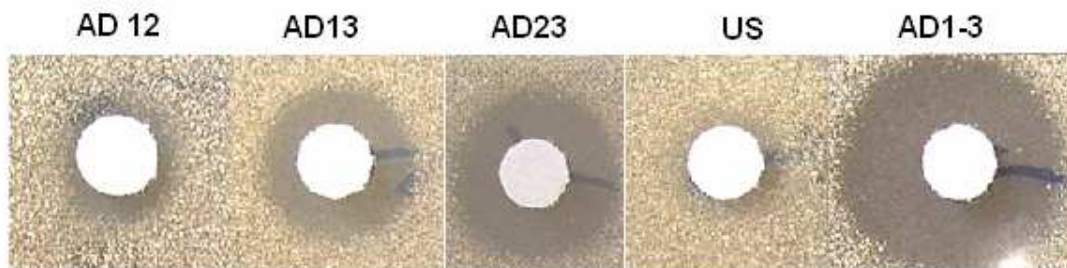
Pre zistenie, ktorá z týchto dvoch možností je príčinou pozorovaného efektu, bol použitý **zónový test**, pomocou ktorého bol sledovaný vplyv koncentrácie DMAL-12 na veľkosť inhibičných zón pumpových a bezumpových kmeňov. Porovnaním veľkosti inhibičných zón u jednotlivých kmeňov (obr.4.21) pri identickej koncentrácii (50 mM), ktorá bola vybraná ako najvhodnejšia, bola zistená absencia inhibičnej zóny u kmeňa US50-18C (Pdr5p a Snq2p). U AD12 (Pdr5p) bola pozorovaná nepatrná inhibičná zóna, u

ostatných jednopumpových mutantov (AD13 a AD23) sú zóny takisto menšie ako u bezpumpového kmeňa AD1-3, ale podstatne väčšie ako u AD12. Znamená to, že DMAL-12 je substrátom všetkých troch študovaných púmp, najmä však pumpy Pdr5p. Pozorovaná čiastočná inhibícia pumpy Pdr5p je dôsledkom kompetície DMAL-12 a sondy o transport.

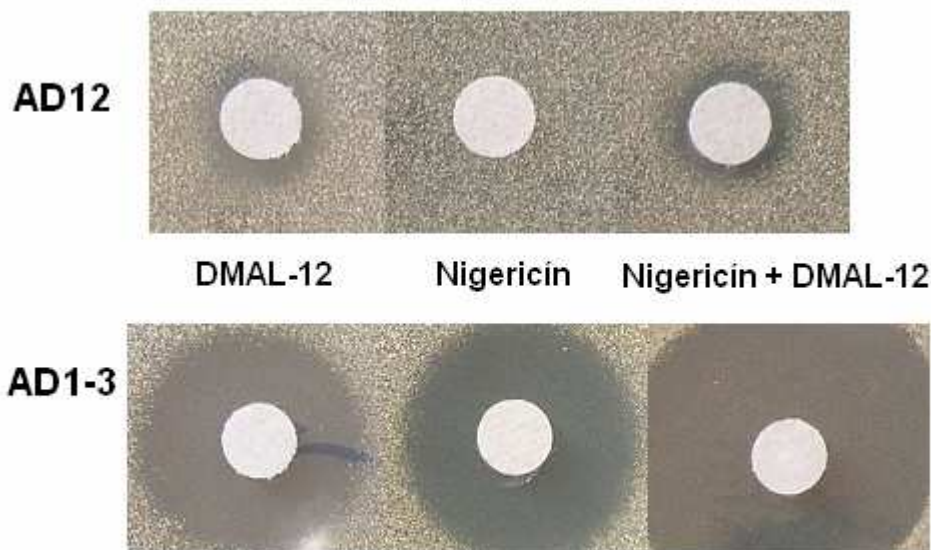
Z rovnakých dôvodov ako pri rozbere fluorescenčnej odozvy na prídanie PYG-14 k bunkám testovaných kmeňov, teda:

- 1) Po pridaní DMAL-12 (27 a 10 μM) nepozorujeme úplnú inhibíciu transportu sondy pumpou Pdr5p, i keď použité koncentrácie sú podstatne vyššie ako u BAC (2 μM),
- 2) U pumpy Snq2p, pre ktorú je PYG-14 takisto substrátom, nie je u žiadnej z použitých koncentrácií pozorovaný inhibičný efekt tejto látky na schopnosť pumpy transportovať sondu,

sme dospeli k záveru, že afinita púmp Pdr5p a Snq2p k DMAL-12 je podstatne menšia ako afinita týchto púmp k fluorescenčnej sonde, rovnako ako v prípade PYG-14. Toto naše tvrdenie sme potvrdili pomocou dvojsubstrátového testu, obr. 4.22.



Obr.4.21: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní DMAL-12 na papierový terčik (2 μl 50 mM DMAL-12).



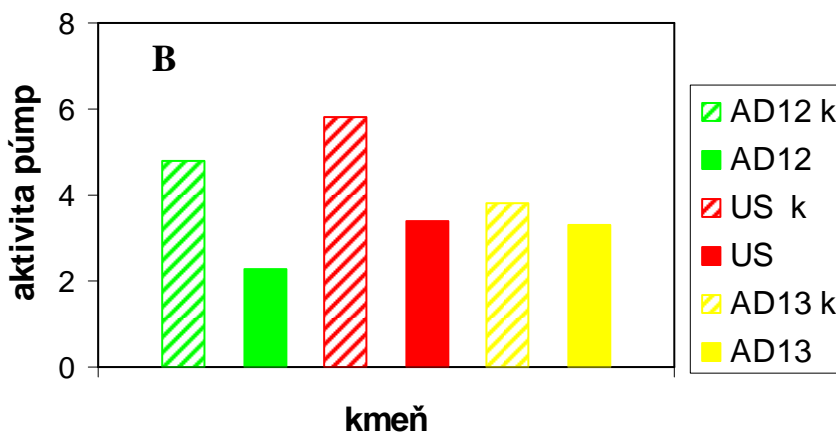
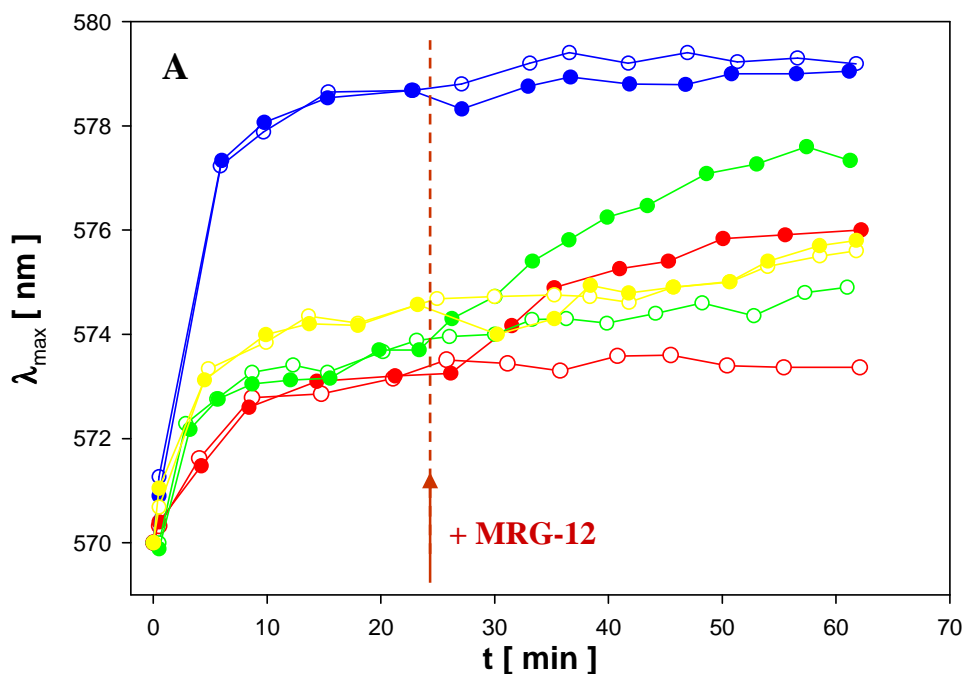
Obr.4.22: Vizualizácia kompetície dvoch substrátov pumpy Pdr5p o transport pomocou zónového testu: vplyv súčasného pridania oboch substrátov s rozdielnou afinitou k pumpe (DMAL-14 a nigericín) na veľkosť inhibičných zón u buniek *S. cerevisiae* AD12 a AD1-3. Použité koncentrácie zásobných roztokov: 50 mM DMAL-12, 1mM nigericín.

4.2.2 Vplyv látok typu **MRG-n** na aktivitu MDR púmp

A) MRG-12

Ovplyvnenie aktivity MDR púmp látkou MRG-12 je veľmi podobné pôsobeniu látok PYG-14 a DMAL-12, i keď vplyv na veľkosť membránového potenciálu ($\Delta\Psi$) je u MRG-12 nižší ako u predtým testovaných látok. Pridanie MRG-12 (10 μM) k bezpumpovým kontrolným bunkám AD1-3 totiž vedie k podstatne menšiemu poklesu λ_{max} ako u PYG-14 a DMAL-12, porovnaj obr.4.23A s obr.4.13A a obr.4.19A. Pri výslednej koncentrácii vo vzorke 3 μM MRG-12 je depolarizačný účinok tejto látky zanedbateľný, obr.4.24A. Vďaka malej zmene membránového potenciálu (ku ktorej dochádza rovnako u buniek všetkých testovaných kmeňov) je omnoho názornejšie vidieť už zo samotného priebehu farbiacich kriviek čiastočná inhibícia transportu sondy pumpou Pdr5p. V tomto prípade je totiž zblížovanie farbiacich kriviek buniek AD12 a bezpumpových buniek, odrážajúce nižšiu aktivitu pumpy Pdr5p, obr.4.23B a obr.4.24B, sprevádzané výrazným posunom λ_{max} do červenej oblasti spektra. Taktiež u buniek kmeňa US50-18C je pridanie MRG-12 sprevádzané miernym nárastom λ_{max} na rovnakú úroveň farbenia ako u buniek

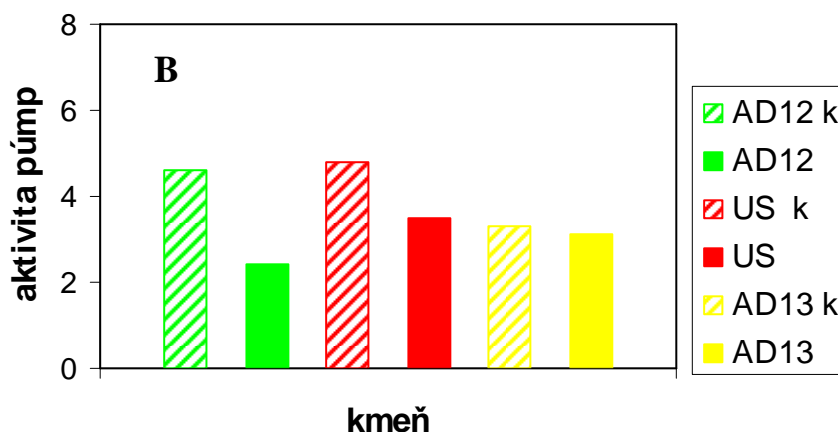
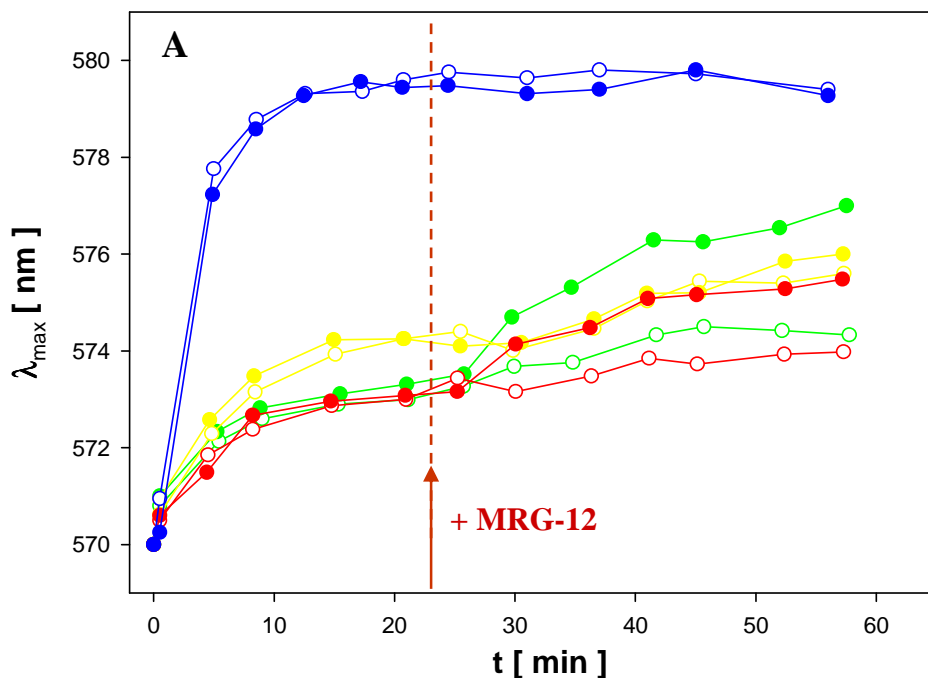
AD13, u ktorých nie je vidieť žiadny rozdiel medzi kontrolou a vzorkou po pridaní testovanej látky. Rozdiel vo farbení buniek AD13 a bezpumpových buniek po pôsobení MRG-12 je pritom rovnaký ako u kontroly, vid' obr.4.23B a obr.4.24B, čo svedčí o tom, že transportná aktivita tejto pumpy sa účinkom MRG-12 nemení (rovnako ako u PYG-14 a DMAL-12). Diferencia medzi farbením US50-18C a bezpumpových kmeňov klesá na úroveň diferencie pozorovanej u buniek AD13; u buniek US50-18C tak zostáva po pôsobení MRG-12 zachovaná aktivita pumpy Snq2p. Z výsledkov fluorescenčného testu teda vyplýva, že MRG-12 interaguje len s pumpou Pdr5p a že táto interakcia vedie k čiastočnému zníženiu aktivity transportu sondy z buniek touto pumpou.



Obr.4.23:

(A) Vplyv pridaní MRG-12 na farbenie buniek kmeňov **AD12**, **AD13**, **AD1-3** a **US50-18C** v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 23. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), **10 μ M** MRG-12.

(B) Znáznorenie aktivity púmp buniek kmeňov **AD12** (**Pdr5p**), **AD13** (**Snq2p**) a **US50-18C** (**Pdr5p** a **Snq2p**) po pridaní MRG-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.24:

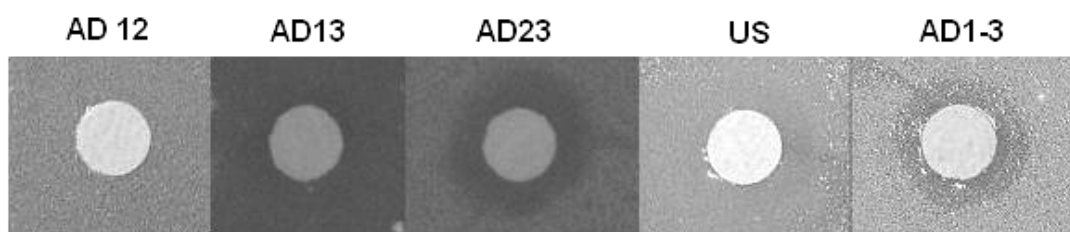
(A) Vplyv pridaní MRG-12 na farbenie buniek kmeňov **AD12**, **AD13**, **AD1-3** a **US50-18C** v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 23. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdne symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), **3 μ M** MRG-12.

(B) Znáznorenie aktivity púmp buniek kmeňov **AD12** (**Pdr5p**), **AD13** (**Snq2p**) a **US50-18C** (**Pdr5p** a **Snq2p**) po pridaní MRG-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).

Z výsledkov zónového testu vyplynulo, že (na rozdiel od PYG-14 a DMAL-12) je MRG-12 substrátom len pumpy Pdr5p (obr.4.25). Znamená to teda, že k pozorovanej čiastočnej inhibícii transportu sondy pumpou dochádza v dôsledku kompetície dvoch substrátov tejto pumpy (MRG-12 a sondy).

Pri porovnaní zvyškových aktivít pumpy Pdr5p pri pôsobení doposiaľ testovaných lyzozomotropných látok s koncentráciou 10 μM (obr.4.13B, obr.4.19B a obr.4.23B) sa zdá, že pumpa Pdr5p má zo skúmanej trojice látok najvyššiu afinitu k MRG-12. Aj napriek tomu však ani v tomto prípade nie je afinita k MRG-12 porovnateľná s afinitou k BAC.

Vzhľadom na zistenie, že afinita púmp Pdr5p a Snq2p k látkam, ktoré sú ich substrátmi, sa môže vďaka odlišnej chemickej štruktúre látok výrazne líšiť, a požiadavku, aby nájdené potenciálne inhibítory (substráty) mohli byť podávané spoločne s liekmi vo veľmi nízkych koncentráciách, rozhodli sme sa používať pre testovanie ďalších látok koncentráciu 5 μM . Ak nebude pri tejto koncentrácii látok pozorovaný ich výrazný inhibičný účinok na aktivitu púmp, nejde o látky, ktoré by mohli byť z medicínskeho hľadiska významné.

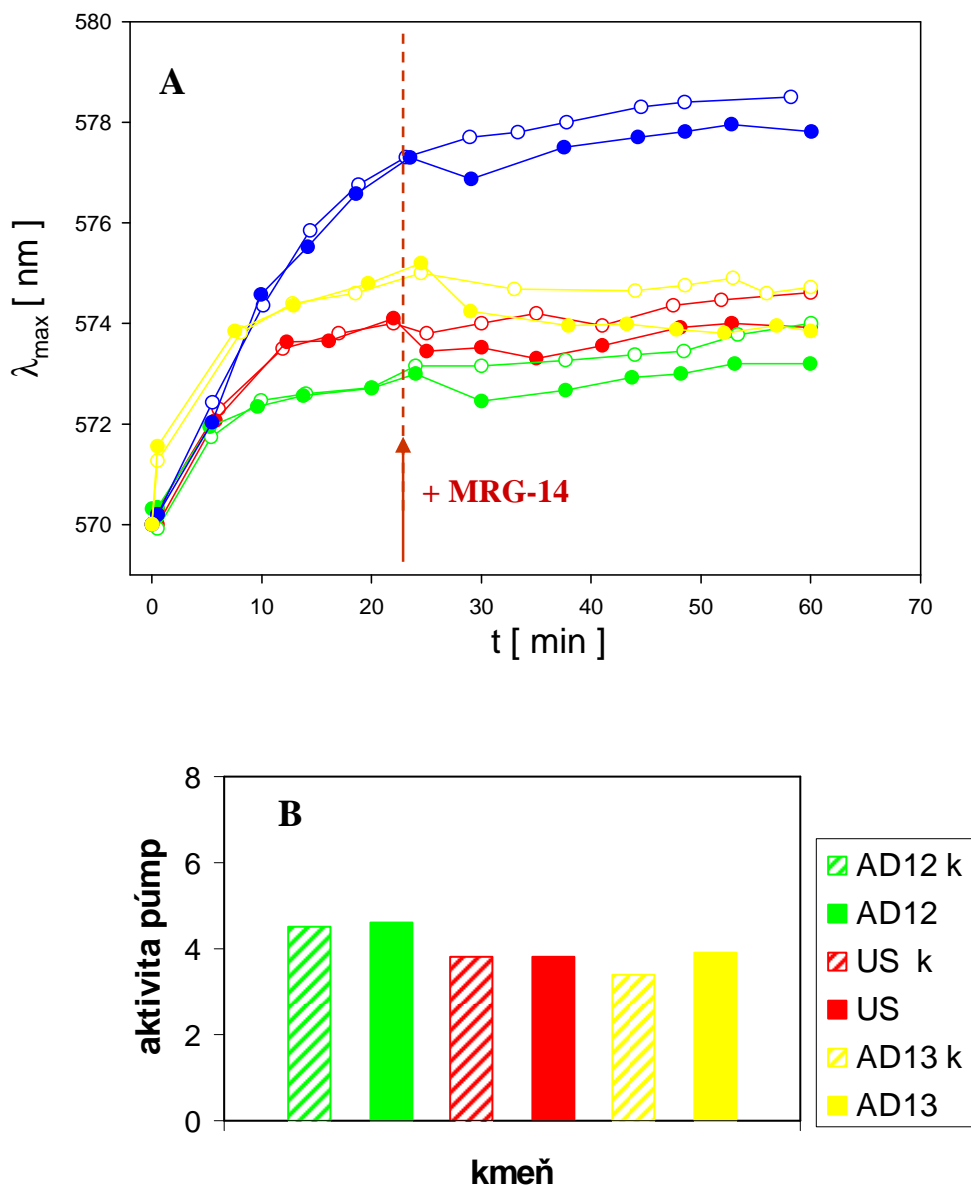


Obr.4.25: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní MRG-12 na papierový terčik (2 μl 70 mM MRG-12).

B) MRG-14

Ako vyplýva z priebehu farbiacich kriviek buniek pumpových kmeňov po pridaní látky MRG-14 (výsledná koncentrácia vo vzorke: 5 μM) nedochádza jej pôsobením k ovplyvneniu aktivity MDR púmp, ktoré bolo pozorované s látkou MRG-12 (dokonca pri použití nižšej koncentrácie: 3 μM), porovnaj obr. 4.26A (5 μM MRG-14) a obr. 4.24A (3 μM MRG-12). Pôsobenie MRG-14 sa u všetkých testovaných kmeňov prejavuje poklesom λ_{max} , čo naznačuje len depolarizačný účinok tejto látky na membránu buniek. Ako je vidno

z obr. 4.26B, schopnosť púmp Pdr5p a Snq2p transportovať sondu zostáva pri interakcii buniek s MRG-14 s touto koncentráciou zachovaná.



Obr.4.26:

(A) Vplyv pridania MRG-14 na farbenie buniek kmeňov AD12, AD13, AD1-3 a US50-18C v post-diauxickej fáze rastu. Látka bola pridaná v 23. min farbenia (plné symboly), kontrola (prázdné symboly). Koncentrácie: $2 \cdot 10^{-8}$ M diS-C₃(3), 5 μ M MRG-14.

(B) Znáznornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) po pridaní MRG-14 (plná výplň), kontrola (průzkovaná výplň).

Ako vyplýva z výsledku zónového testu (obr.4.27), v ktorom bola použitá koncentrácia MRG-14 (zásobný roztok: 50 mM) mnohonásobne prevyšujúca koncentráciu potrebnú na zabitie buniek (testované výsevom, dáta nie sú ukázané), je absencia inhibičných zón u všetkých kmeňov (na rozdiel od PYG-14, DMAL-12 a MRG-12) dôsledkom zlej difúzie MRG-14 agarom. Tento jav bol pozorovaný už skôr v práci [38] pri

štúdiu vplyvu biocidu ODDC na aktivitu MDR púmp. Vzhľadom na zvolené kritériá pre výber potenciálnych inhibítorov MDR púmp (vid' posledný odstavec predchádzajúceho paragrafu, str. 51) nehrá nemožnosť stanovenia, či je MRG-14 substrátom študovaných púmp, žiadnu úlohu. Pri pôsobení MRG-14 (koncentrácia 5 μM) totiž nie je ani u jednej z dvojice púmp (Pdr5p, Snq2p) pozorovaná ani čiastočná strata schopnosti transportovať sondu.

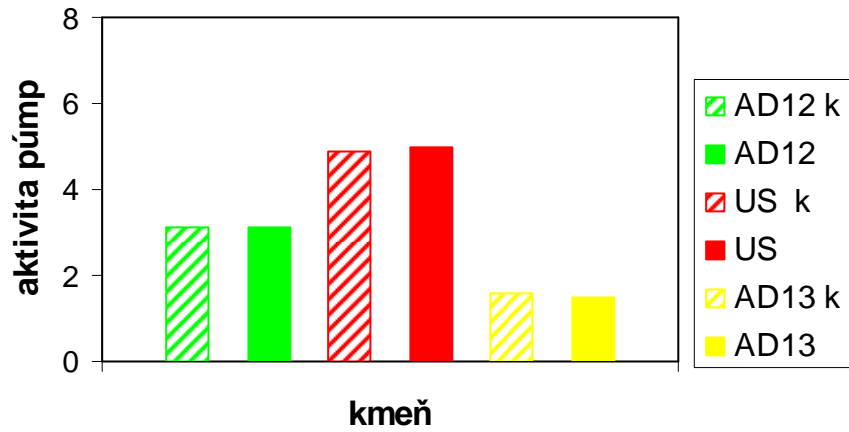


Obr.4.27: Absencia inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní MRG-14 na papierový terčik (2 μl 50 mM MRG-14).

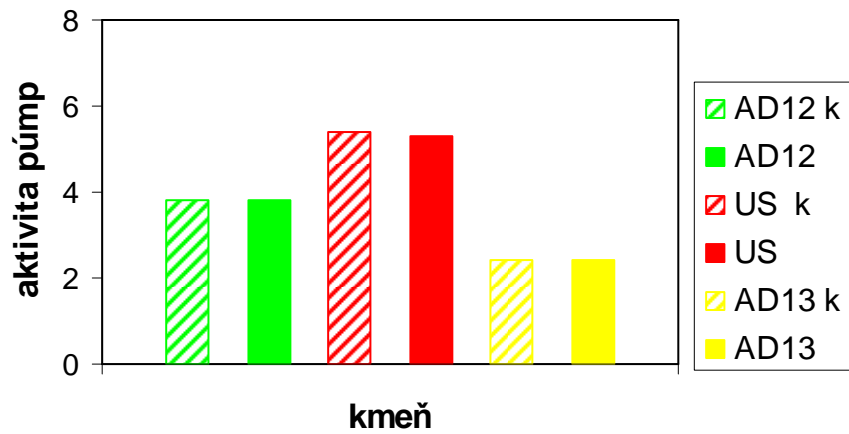
4.2.3 Vplyv látok typu **PYAL-n** na aktivitu MDR púmp

U látok tohto typu, rovnako ako u zostávajúcich testovaných látok (typ PPAL-n, MRAL-n a PPG-n) sa ich vplyv na úroveň farbenia bunkovej suspenzie prejavil poklesom λ_{max} u všetkých kmeňov, indikujúcim depolarizačný efekt týchto látok. I keď sa veľkosť depolarizácie u jednotlivých látok líšila, u žiadnej z látok pri použitej koncentrácii (5 μM) nebolo zaznamenané ovplyvnenie aktivity púmp Pdr5p a Snq2p. Pre prehľadnosť sme sa preto rozhodli ďalej neuvádzať farbiace krivky, ale len porovnanie aktivity púmp kontrol a buniek po pôsobení testovaných látok.

Ako je vidieť z obr. 4.28 a 4.29, neovplyvňuje PYAL-12 ani PYAL-14 transport sondy ani u jednej z dvojice púmp Pdr5p a Snq2p. Zatiaľ čo PYAL-12 nie je substrátom týchto púmp, obr. 4.30, zo zónového testu na obr. 4.31 vyplýva, že PYAL-14 je substrátom pumpy Pdr5p a zrejme i Snq2p. Rovnako ako v predchádzajúcich prípadoch ide zrejme o substrát, ku ktorému vykazujú pumpy nízku afinitu, pretože kompetícia tejto látky so sondou o transport sa pri použitej koncentrácii neprejaví znížením aktivity púmp definovanej ako $\Delta\lambda_{max}$.



Obr.4.28: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (*Pdr5p*), AD13 (*Snq2p*) a US50-18C (*Pdr5p* a *Snq2p*) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M PYAL-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.29: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (*Pdr5p*), AD13 (*Snq2p*) a US50-18C (*Pdr5p* a *Snq2p*) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M PYAL-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



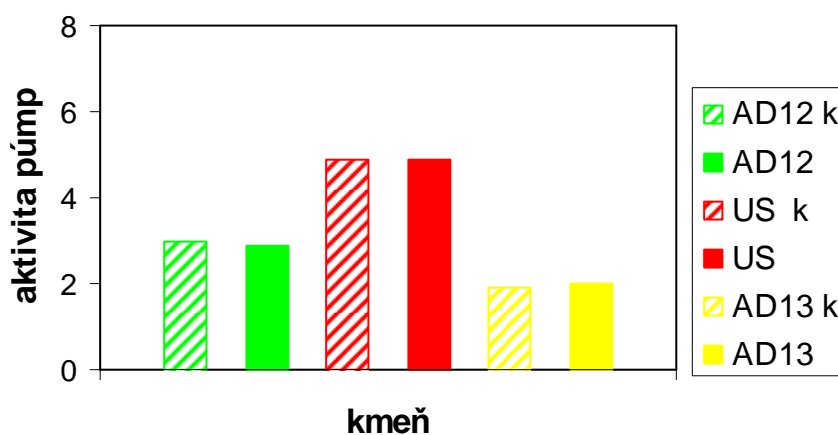
Obr.4.30: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PYAL-12 na papierový terčík (2 μ l 50 mM PYAL-12).



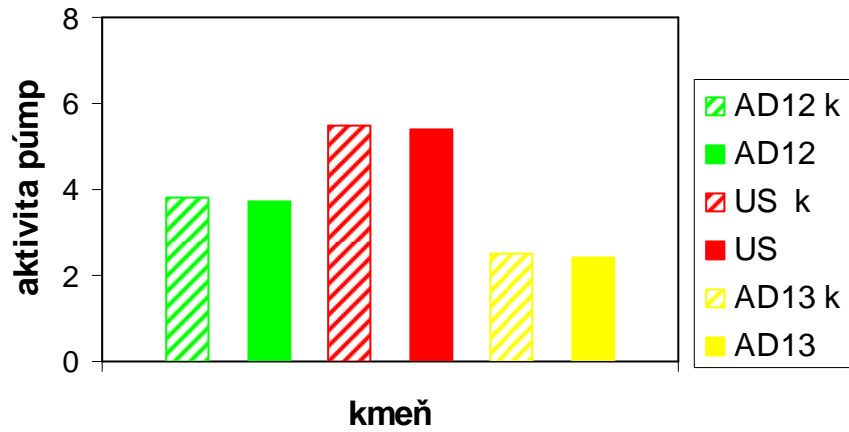
Obr.4.31: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PYAL-14 na papierový terčik (2 μ l 50 mM PYAL-14).

4.2.4 Vplyv látok typu **PPAL-n** na aktivitu MDR púmp

Rovnako ako v predchádzajúcom prípade, nedochádza pri pôsobení PPAL-12 ani PPAL-14 k ovplyvneniu transportu sondy pumpou Pdr5p a Snq2p, obr.4.32 a 4.33. Z veľkosti inhibičných zón po pridaní PPAL-12, obr. 4.34, vyplýva, že táto látka je substrátom pumpy Pdr5p i slabým substrátom Snq2p. U PPAL-14 nemôžeme rozhodnúť, či táto látka je či nie je substrátom púmp, rovnako ako v prípade MRG-14, v dôsledku zlej difúzie PPAL-14 agarom, obr. 4.35. Podobne ako v predchádzajúcich prípadoch, ani látky tohto typu nespĺňajú kritériá kladené na potenciálne inhibítory MDR púmp.



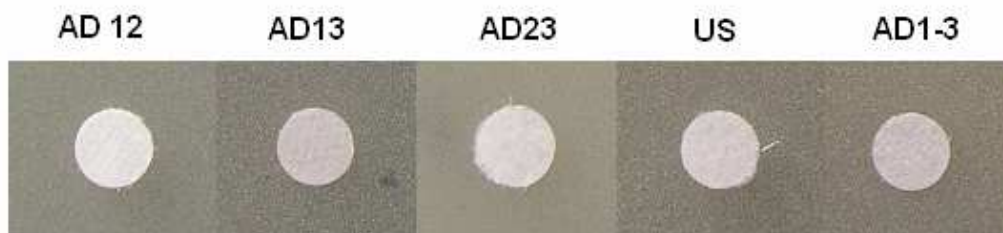
Obr.4.32: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M PPAL-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.33: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (*Pdr5p*), AD13 (*Snq2p*) a US50-18C (*Pdr5p* a *Snq2p*) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M PPAL-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



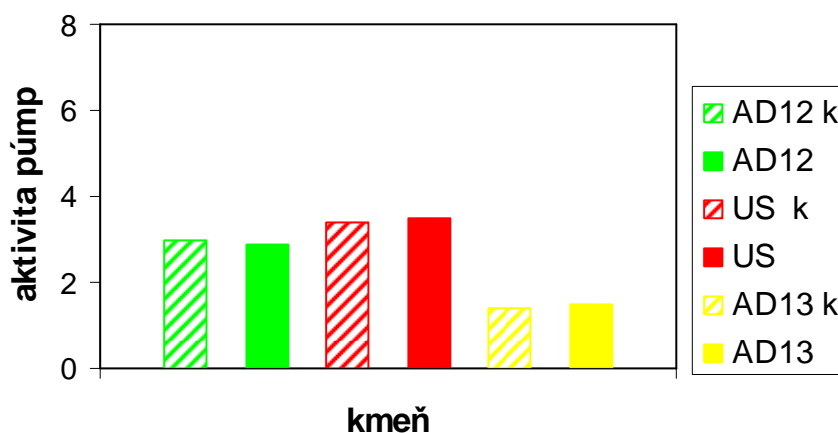
Obr.4.34: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PPAL-12 na papierový terčik (2 μ l 50 mM PPAL-12).



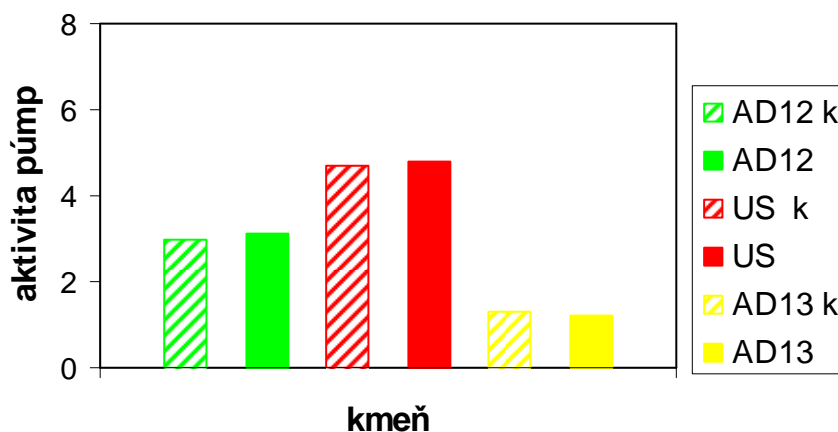
Obr.4.35: Absencia inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PPAL-14 na papierový terčik (2 μ l 50 mM PPAL-14).

4.2.5 Vplyv látok typu MRAL-n na aktivitu MDR púmp

Ako je vidno z obr. 4.36 a 4.37, neovplyvňuje MRAL-12 ani MRAL-14 transport sondy pumpami Pdr5p a Snq2p. Zo zónových testov urobených s týmito látkami, obr.4.38 a 4.39, nemožno určiť, či ide o substráty púmp, pretože nedifundujú voľne agarom.



Obr.4.36: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M MRAL-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.37: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (Pdr5p), AD13 (Snq2p) a US50-18C (Pdr5p a Snq2p) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M MRAL-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



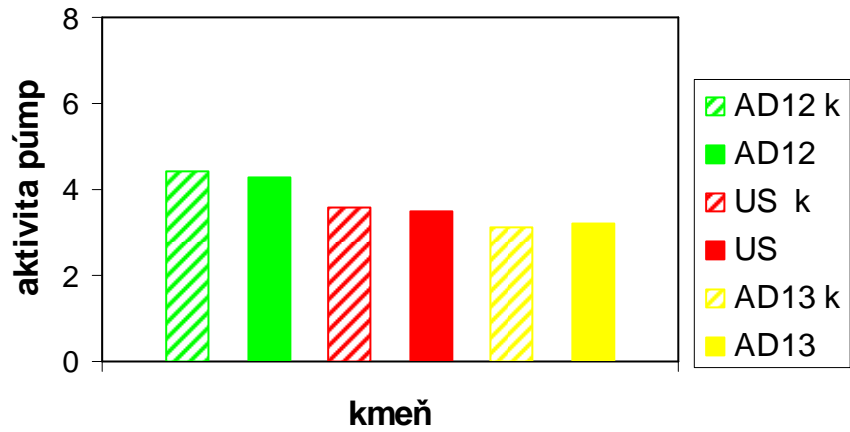
Obr.4.38: Absencia inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní MRAL-12 na papierový terčik (2 μ l 50 mM MRAL-12).



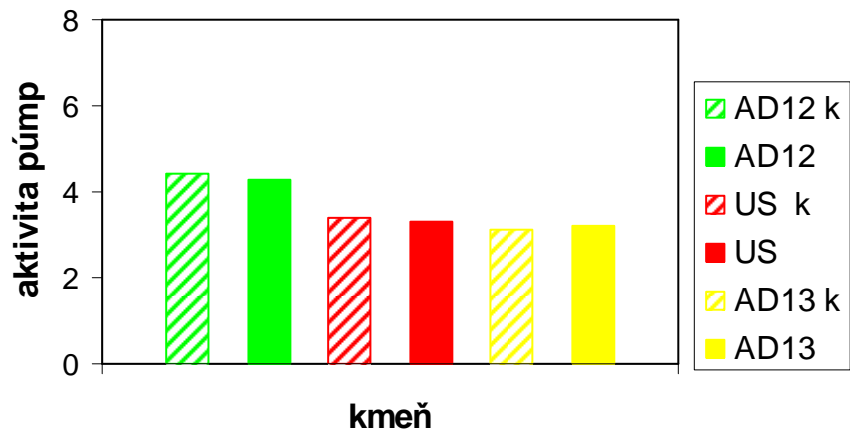
Obr.4.39: Absencia inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní MRAL-14 na papierový terčik (2 μ l 50 mM MRAL-14).

4.2.6 Vplyv látok typu **PPG-n** na aktivitu MDR púmp

I u poslednej testovanej dvojice látok (PPG-12 a PPG-14) sme nezaznamenali žiadny vplyv na aktivitu púmp Pdr5p a Snq2p. Ako je vidieť z obr. 4.40 a 4.41, schopnosť púmp transportovať sondu z buniek po pôsobení týchto látok je rovnaká ako u kontroly. Zo zónových testov vyplýva, že PPG-12 je substrátom oboch púmp, obr. 4.42; u PPG-14 nie je možné vďaka zlej difúzii tejto látky agarom rozhodnúť, či je substrátom púmp, obr. 4.43.



Obr.4.40: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (*Pdr5p*), AD13 (*Snq2p*) a US50-18C (*Pdr5p* a *Snq2p*) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M PPG-12 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.41: Znázornenie aktivity púmp buniek kmeňov AD12 (*Pdr5p*), AD13 (*Snq2p*) a US50-18C (*Pdr5p* a *Snq2p*) v post-diauxickej fáze rastu po pridaní 5 μ M PPG-14 (plná výplň), kontrola (prúžkovaná výplň).



Obr.4.42: Veľkosť inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PPG-12 na papierový terčik (2 μ l 50 mM PPG-12).



Obr.4.43: Absencia inhibičných zón u buniek pumpových a bezpumpových kmeňov po pridaní PPG-14 na papierový terčik (2 μ l 50 mM PPG-14).

5. Záver

Z analýzy výsledkov získaných v diplomovej práci pri štúdiu vplyvu lyzozomotropných látok na aktivitu púmp Pdr5p a Snq2p vyplynula jedna veľmi dôležitá skutočnosť, ktorá významným spôsobom prispela k zdokonaleniu vyvíjanej diagnostickej fluorescenčnej metódy pre vyhľadávanie účinných inhibítorov týchto púmp. Z hľadiska lekárskeho použitia skúmaných inhibítorov v podstate nezáleží na tom, či k inhibícii transportu liekov z buniek dochádza vďaka inaktivácii púmp (reálny inhibítor) alebo v dôsledku kompetície s iným substrátom (kompetitívny inhibítor). Dôležitým kritériom pre takýto inhibítor je, aby bol účinný už pri veľmi nízkych koncentráciách. Z tohto pohľadu je v prípade použitia kompetitívneho inhibítora nevyhnutné, aby afinita MDR púmp voči inhibítoru (substrátu) bola vysoká, pretože možno predpokladať, že lieky, ktoré sú pumpami odstraňované z buniek, sú taktiež „silnými“ substrátmi púmp.

Ako sa podarilo v práci ukázať, možno veľmi rýchlo pomocou vyvíjanej fluorescenčnej diagnostickej metódy vylúčiť z kategórie potenciálnych inhibítorov látky, ktoré, i keď sú substrátmi týchto púmp, nespĺňajú potrebné kritérium, tj. musia už vo veľmi nízkych koncentráciách zabrániť transportu sondy z buniek týmito pumpami. Vzhľadom na to, že afinita púmp Pdr5p a Snq2p k fluorescenčnej sonde je veľmi vysoká, možno pomocou jej transportu simulovať odstraňovanie liekov z buniek. Len tie látky, ktoré už pri veľmi nízkych koncentráciách zabránia transportu sondy z buniek, môžu byť považované za účinné inhibítory týchto púmp.

6. Literatúra

- [1] Janderová B., Bendová O. (1999): Úvod do biologie kvasinek, Karolínium.
- [2] http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Yeast_cell_cs.svg
- [3] Kocková-Kratochvílová A.(1982): Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Vydavatelství Alfa.
- [4] <http://www.dbsr.duke.edu/yeast/Info%20and%20Protocols/Cell%20Cycle.htm>
- [5] Drápalová H. (2005): Studium vlivu stresových faktorů na intracelulární pH kvasinek pomocí fluorescenčních sond. Diplomová práce. MFF UK, Praha.
- [6] Francois J.M., Eraso P., Gancedo C. (1987): Changes in the concentration of cAMP, fructose-2,6-biphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *European Journal of Biochemistry* **164**, 369-373.
- [7] Lillie S.H., Pringle J.R., (1980): Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of bacteriology* **143**, 1384-1394.
- [8] Werner-Washbourne M., Becker J., Kosc-Smithers J., Craig E.A. (1989): Yeast *Hsp70* RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *Journal of bacteriology* **171**, 2680-2688.
- [9] Tanaka K., Matsumoto K., Toh-e A, (1988): Dual regulation of the expression of the polyubiquitin gene by cyclic AMP and heat shock in yeast. *EMBO Journal* **7**, 495-502.
- [10] Praekelt U.M., Maecock P.A., (1990): HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Molecular & general genetics* **223**, 97-106.
- [11] Werner-Washbourne M., Braun E., Johnston G. C., Singer R. A. (1993): Stationary phase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **57**, 383-401.
- [12] Werner-Washbourne M., Braun L.E., Crawford M.E., Peck M.,V. (1996): Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **19**, 1159-1166.
- [13] DeNobel J.G., Klis F.M., Priem J., Munnik T., van den Ende H., (1990): The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**, 491-499.

- [14] Micháľková-Papáľová D., Šubík J. (2001): Molekulárne mechanizmy mnohonásobnej rezistencie kvasiniek. Regulačná sieť YAP. *Biologické listy* **66**, 253-282.
- [15] Micháľková-Papáľová D., Šubík J. (2001): Regulačná sieť PDR v mnohonásobnej rezistencii kvasiniek. *Biologické listy* **67**, 101-136.
- [16] Decottignies A., Rogers B., Kolaczkowski M., Carvajal E., Balzi E., Conseil G., Niimi K., di Pietro A., Monk B. C., Goffeau A. (2002): The Pleiotropic Drug ABC Transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Multidrug Efflux. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- [17] Schneider E., Hunke S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS. Microbiological Reviews* **22**, 1-20.
- [18] http://www.glycoscience.org/glycoscience/document_viewer.wm?FILENAME=D004
- [19] Ferreira-Perreira A., Marco S., Decottignies A., Nader J., Goffeau A., Riquad J. L. (2003): Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11995-11999.
- [20] Egner R., Kuchler K. (1996): The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole.. *FEBS Letters* **378**, 177-181.
- [21] Golin J., Barkatt A., Cronin S., Eng G., May L. (2000): Chemical specificity of the PDR5 multidrug resistance gene product of *Saccharomyces cerevisiae* based on studies with tri-n-alkyltin chlorides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 134-138.
- [22] Soud A. K., Gao C., Wang L., Milgrom E., Shen W. C. (2006): ELM1 is required for multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **173**, 1919-1937.
- [23] Miyahara K., Hirata D., Miyakawa T. (1996) : YAP-1- and YAP-2-mediated, heat shock-induced transcriptional activation of the multidrug resistance ABC transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **29**, 103-105.
- [24] Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2004): Mechanizmy mnohočetné ľékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR. (http://www.linkos.cz/vzdelavani/zv12_00/03.php)
- [25] <http://www.altcorp.com/AffinityLabeling/pglycoprotein.htm>
- [26] http://www.geocities.com/ResearchTriangle/Lab/5540/MDR_link.html

- [27] de Jong M. C., Slootstra J. W., Scheffer G. L., Schroeijers A. B., Puijk W. C. (2001): Peptide transport by the multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Research* **61**, 2552-2557.
- [28] Witek S., Goffeau A., Nader J., Luczynski J., Lachowicz T. M., Kuta B., Oblak E. (1997): Lysosomotropic aminoesters act as H⁺(-)ATPase inhibitors in yeast. *Folia Microbiologica* **42**, 252-254.
- [29] <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/memb/electrogenic.jpg>
- [30] Gášková D., Chládková K., Hendrych T., Maláč J., Sigler K. (2005): A new test system for identifying interactions of potential inhibitors of *S. cerevisiae* MDR pumps: pump inhibition or competition for transport? *Proceedings of 23rd Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, New Delhi, India, 23.9. 2005.
- [31] Chládková K., Hendrych T., Gášková D., Goroncy-Bermes P., Sigler K. (2004): Effect of Biocides on *S. cerevisiae*: Relationship between Short-Term Membrane Affliction and Long-Term Cell Killing. *Folia Microbiologica* **49**, 718-724
- [32] Čadek R. (2004): Odpověď kvasinkové buňky na stres: úloha iontových gradientů při udržování integrity membrány. Disertační práce. MFF UK, Praha.
- [33] Krasowska A., Chmielewska L., Luczyński J., Witek S. and Sigler K. (2003): The dual mechanism of the antifungal effect of new lysosomotropic agents on the *Saccharomyces cerevisiae* RXII strain. *Cellular & Molecular Biology Letters* **8**, 111-120.
- [34] Krasowska A., Chmielewska L., Adamski R., Luczyński J., Witek S. and Sigler K. (2004): The sensitivity of of yeast and yeast-like cells to new lysosomotropic agents. *Cellular & Molecular Biology Letters* **9**, 675-683.
- [35] Čadek R., Chládková K., Sigler K., Gášková D. (2004): Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. *Biochimica et Biophysica Acta* **1665**, 111-117.
- [36] Gášková D., Čadek R., Chaloupka R., Vacata V., Gebel J. and Sigler K. (2002): Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane MDR transporters by diS-C₃(3) fluorescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**, 931-937.
- [37] Hendrych T. (2002): Studium oxidativního stresu v kvasinkách pomocí fluorescenčních sond. Diplomová práce. MFF UK, Praha.

- [38] Chládková-Moquin K. (2004): Závislost poškození kvasinkové buňky chemickým stresem na stavu buněčného obranného systému MDR pump. Disertační práce. MFF UK, Praha.

Názov práce: Studium činnosti kvasinkových MDR púmp pomocí fluorescenčných sond: účinok potenciálnych inhibitorů

Autor: Andrea Drietomská

Katedra (ústav): Fyzikální ústav MFF UK, Odd. biofyziky

Vedúci diplomovej práce: Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.

e-mail vedúceho: gaskova@karlov.mff.cuni.cz

ABSTRAKT

Použitím sady piatich izogénnych mutantných kmeňov sme skúmali vplyv sady dvanástich aminoesterov mastných kyselín, patriacich medzi lyzozomotropné fungicídy (LF), na membránový potenciál a aktivitu MDR púmp Pdr5p, Snq2p a Yor1p v bunkách *S. cerevisiae* pomocou nedávno vyvinutej metódy, ktorá je kombináciou metódy využívajúcej fluorescenčnú sondu diS-C₃(3) a biologických testov [1]. V závislosti na chemickej štruktúre a koncentrácii vykazujú LF tieto účinky na bunky: (a) depolarizáciu membrány, (b) interakciu s MDR pumpami a (c) poškodenie membrány vedúce k permeabilizácii buniek. Depolarizácia membrány bola pozorovaná takmer u všetkých LF, zatiaľ čo len tri z testovaných látok interagovali s MDR pumpami, konkrétne šlo o čiastočnú kompetitívnu inhibíciu MDR pumpy(púmp). Zistilo sa, že pomocou vyvíjanej fluorescenčnej diagnostickej metódy možno vylúčiť z kategórie potenciálnych inhibitorov tie látky, ktoré, i keď sú substrátmi púmp Pdr5p a Snq2p, nespĺňajú potrebné kritérium, že už vo veľmi nízkych koncentráciách musia zabrániť transportu sondy z buniek týmito pumpami.

Kľúčové slová: MDR, ABC pumpy, Pdr5p, *Saccharomyces cerevisiae*

Title: Study of the performance of yeast MDR pumps by fluorescent probes: effect of potential inhibitors

Author: Andrea Drietomská

Department: Institute of Physics MFF UK, Department of biophysics

Supervisor: Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.

Supervisor's e-mail address: gaskova@karlov.mff.cuni.cz

ABSTRACT

Using a set of five isogenic mutant strains, we tested the effects of a set of twelve aminoesters of fatty acids belonging to two structural groups, which have been previously classified among lysosomotropic antifungals (LA), on membrane potential and the activity of MDR pumps Pdr5p, Snq2p and Yor1p in *S. cerevisiae* by a newly developed assay - a combination of the diS-C₃(3) method and biological tests [1]. Depending on their chemical structure and concentration, the LA displayed several effects: (a) membrane depolarization, (b) interaction with MDR pumps, and (c) membrane damage leading to cell permeabilization. Membrane depolarization was observed with nearly all LA while only three of the tested compounds interacted with the MDR pumps - a competitive inhibition was detected. The above diagnostic fluorescence method using the cationic redistribution probe diS-C₃(3) can readily be employed to exclude from the group of potential inhibitors those compounds (even though they can be substrates of Pdr5p and Snq2p) that do not satisfy the necessary condition of inhibiting MDR pumps Pdr5p and Snq2p already at low concentration.

Keywords: MDR, ABC pumps, Pdr5p, *Saccharomyces cerevisiae*

[1] Gášková D., Chládková-Moquin K., Hendrych T., Maláč J., Sigler K.: *23th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, p. 28, New Delhi, India, 2005.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČASŤ	3
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1.1 Stavba bunky	3
2.1.2 Rozmnožovanie <i>S. cerevisiae</i>	4
2.1.3 Rast kvasinkovej kultúry v tekutom médiu	5
2.2 Mnohonásobná lieková rezistencia	7
2.2.1 Regulačná sieť YAP	7
2.2.2 Regulačná sieť PDR	8
2.2.3 Cieľové gény regulačných proteínov sietí YAP a PDR	9
2.2.3.1 Gén <i>PDR5</i>	10
2.2.3.2 Gén <i>SNQ2</i>	11
2.2.3.3 Gén <i>YORI</i>	12
2.2.4 Význam štúdia MDR púmp u <i>S. cerevisiae</i>	12
2.3 Meranie membránového potenciálu	14
2.3.1 Membránový potenciál	14
2.3.2 Metódy pre meranie membránového potenciálu	15
2.4 Metóda pre sledovanie zmien aktivity MDR púmp (Pdr5p a Snq2p) pomocou fluorescenčnej potenciometrickej sondy diS-C ₃ (3)	16
3. MATERIÁL A METÓDY	19
3.1 Chemikálie a materiál	19
3.2 Kultivačné médiá a roztoky	20
3.3 Sériá použitých izogénnych kvasinkových kmeňov <i>S. cerevisiae</i>	21
3.4 Príprava a uchovávanie kvasinkových kultúr	21
3.4.1 Príprava a uchovávanie zásobných kvasinkových kultúr	21
3.4.2 Príprava buniek pre meranie	22
3.5 Biologické metódy pre stanovenie špecificity MDR púmp	22
3.5.1 Zónový test	22
3.5.2 Výsevový test	23

3.6 Meranie farbenia buniek fluorescenčnou sondou diS-C ₃ (3) - metóda farbiacich kriviek	24
4. VÝSLEDKY A DISKUSIA	26
4.1 Princíp vyvíjanej fluorescenčnej metódy pre vyhľadávanie potenciálnych inhibítorov MDR púmp Pdr5p a Snq2p	26
4.2 Testovanie účinku lyzozomotropných látok na činnosť MDR púmp u <i>S. cerevisiae</i>	32
4.2.1 Vplyv PYG-14 a DMAL-12 na aktivitu MDR púmp	32
4.2.2 Vplyv látok typu MRG-n na aktivitu MDR púmp	47
4.2.3 Vplyv látok typu PYAL-n na aktivitu MDR púmp	52
4.2.4 Vplyv látok typu PPAL-n na aktivitu MDR púmp	54
4.2.5 Vplyv látok typu MRAL-n na aktivitu MDR púmp	56
4.2.6 Vplyv látok typu PPG-n na aktivitu MDR púmp	57
5. ZÁVER	60
6. LITERATÚRA	61