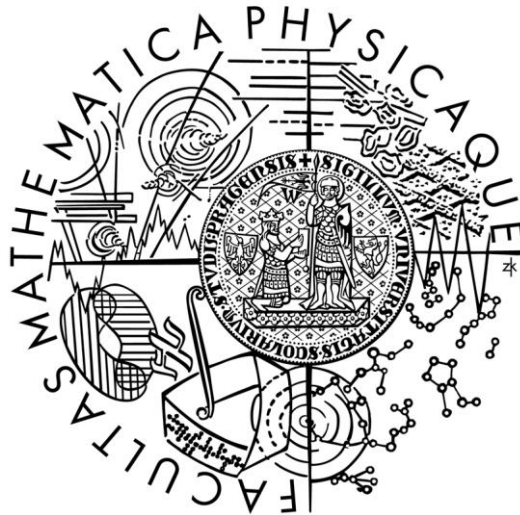


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Eva Straková

***Studium faktorů ovlivňujících transport protonů
transportním proteinem MntH***

Fyzikální ústav University Karlovy

Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.*

Studijní program: *Biofyzika a chemická fyzika*

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda poděkovala RNDr. Evě Urbánkové, Ph.D. za trpělivé vedení mé diplomové práce a pomoc při vytváření textu. Poděkování patří také RNDr. Romanu Chaloupkovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace a také kolektivu z oddělení biofyziky za poskytnutí příjemného pracovního prostředí.

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

V Praze dne 20.4.2007

Eva Straková

Obsah

1	Úvod	6
1.1	Transportéry kovů – rodina Nramp	7
1.2	Bakteriální transportéry MntH	8
1.2.1	Topologie MntH	8
1.2.2	Transport kovů.....	9
1.3	Jak byl studován transport proteiny Nramp.....	10
1.3.1	Metody sledování transportu kovů	10
1.3.2	Metody sledování transportu protonů.....	10
1.4	Vztah mezi transportem protonů a vnitřním pH u bakterií.....	12
1.5	Pufrační kapacita	13
1.5.1	Měření pufrační kapacity pomocí slabých kyselin a zásad	13
1.5.2	Další metody stanovení vnitrobuněčné pufrační kapacity.....	16
1.5.3	Kvantifikace transportu	16
2	Experimentální metody a materiál.....	18
2.1	Materiál.....	18
2.2	Použité bakteriální kmeny	18
2.3	Uchovávání a pěstování buněk	18
2.3.1	Příprava vzorků	19
2.4	Měření vnitřního pH bakterií.....	19
2.5	Stanovení pufrační kapacity	21
3	Výsledky a diskuze.....	22
3.1	Pufrační kapacita bakterií	22
3.1.1	Výběr vhodné slabé kyseliny.....	22
3.2	Vliv vnějšího pH na pufrační kapacitu a vnitřní pH v bakteriích.....	24
3.2.1	Srovnání s kmenem s mutací MntH N401G.....	29
3.2.2	Porovnání pufrační kapacity s publikovanými výsledky.....	32
3.3	Kvantifikace kovem indukovaného transportu protonů	34
3.3.1	Závislost transportu protonů na koncentraci kovu	34
3.3.2	Vliv kovů na pufrační kapacitu	36
3.3.3	Srovnání dvou způsobů zpracování dat.....	37
3.3.4	pH závislost transportu	40
3.4	Inhibice dýchacího řetězce bakterií	42
3.4.1	Vliv inhibitorů na vnitřní pH v bakteriích.....	43

3.4.2	Vliv inhibitorů na pufrací kapacitu.....	45
3.4.3	Změny experimentálních podmínek	48
4	Závěr.....	50
5	Seznam zkratk.....	52
6	Literatura	53

Název práce: *Studium faktorů ovlivňujících transport protonů transportním proteinem MntH*

Autor: *Eva Straková*

Katedra (ústav): *Fyzikální Ústav University Karlovy*

Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.*

e-mail vedoucího: *Eva.Urbankova@mff.cuni.cz*

Abstrakt:

Proteiny z rodiny Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein) představují sekundárně aktivní membránové transportéry napomáhající buňkám v přenosu dvojmocných kovových iontů (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) přes biologické membrány. Bakteriální proteiny patřící do této rodiny, MntH (Proton-dependent Manganese Transporter), byly popsány jako transportéry manganu závislé na protonovém gradientu. V této práci byl použit homolog MntH z *E. coli* představující vhodný modelový systém pro studium vztahu struktury a funkce. Transport protonů tímto proteinem indukovaný kovy byl měřen postupem stanovujícím změny vnitřního pH užitím pH citlivého fluorescenčního proteinu pHluorinu. Takto určenými změnami $\Delta[H^+]$ však nelze zjistit skutečné množství transportovaných protonů, protože buňka hodnotu vnitřního pH aktivně reguluje. Pro lepší kvantifikaci transportu byla měřena pufráční kapacita bakterií pomocí detekce změn pH po přidání kyseliny propanové. Pro transport protonů indukovaný kadmíem byly změny $\Delta[H^+]$ přepočítány přes pufráční kapacitu a to pro divoký typ MntH a jeho jednobodovou mutaci N401G, o níž je známo, že ovlivňuje vnitřní pH buněk. Bylo ukázáno, že způsob zpracování podstatně ovlivňuje výsledky a promítne se také do závislosti transportu na vnějším pH. Možný vliv kadmia na respiraci byl imitován použitím inhibitorů dýchacího řetězce (KCN, NaN_3) v měřeních s netoxickým manganem.

Klíčová slova: *MntH, pufráční kapacita, membránový transport protonů, pH, pHluorin*

Title: *Study of factors influencing proton transport mediated by MntH protein.*

Author: *Eva Straková*

Department: *Institute of Physics of Charles University*

Supervisor: *RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.*

Supervisor's e-mail address: *Eva.Urbankova@mff.cuni.cz*

Abstract:

The natural resistance-associated macrophage proteins (Nramp) form a family of secondary active transporters facilitating the transport of divalent metal ions (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) across biomembranes. Bacterial proteins belonging to the Nramp family were described as proton-dependent manganese transporters - MntH. MntH homolog from *E. coli* representing a model system for structure function relationship was used in this study. Metal-induced proton transport mediated by MntH was measured by means of changes in intracellular proton concentrations using pH sensitive fluorescent protein pHluorin. This approach does not allow proper estimation of real quantity of transported protons, since the internal pH is tightly regulated. The cellular buffering capacity was calculated from measured pH changes induced by addition of propanoic acid, in order to better quantify the transport. The changes in $[H^+]$ induced by cadmium were recalculated using buffering capacity for the wild type MntH and its single-point mutation N401G, known to influence intracellular pH. It was shown that the chosen approach significantly influences results, including the dependence of transport on external pH. Potential influence of cadmium to respiration was imitated by using inhibitors of respiratory chain (KCN, NaN_3) in measurements with nontoxic manganese.

Keywords: *MntH, buffering capacity, membrane proton transport, pH, pHluorin*

1 Úvod

Bakteriální membránový transportér MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) z rodiny Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) hraje důležitou roli v homeostáze kovových iontů. Homology proteinů z této rodiny byly objeveny u zástupců všech organismů, od archebakterií, bakterií až po eukaryota (1). I přes klíčovou fyziologickou roli není mechanismus transportu dvojmocných iontů tímto proteinem příliš objasněn (2;3).

Předpokládá se, že transport probíhá jako symport dvojmocných kovových iontů s protony přičemž přesná stechiometrie není známá a u některých zástupců rodiny Nramp se může v závislosti na vnějších podmínkách měnit (3).

Kvantifikace transportu protonů přináší experimentální problémy - je možno měřit změny vnějšího pH (které však jsou velmi malé), nebo změny vnitřního pH buněk (případně organel nebo membránových váček), na jejichž membráně transport probíhá. Objev pHluorinu (4) usnadnil měření vnitřního pH v bakteriích v reálném čase (na rozdíl od technik využívajících distribuce značených kyselin a zásad), čehož bylo použito pro charakterizaci transportu protonů proteinem MntH indukovaného dvojmocnými kovovými ionty (5).

Touto metodou však není možné přímo určit, kolik protonů bylo transportováno, protože změny vnitrobuněčného pH mohou být buňkami aktivně kompenzovány či ovlivněny pufrací kapacitou cytosolu. Dalším zatím nedořešeným problémem je rozdílná aktivita transportu protonů indukovaného různými dvojmocnými kovy - není totiž zřejmé, zda jsou rozdíly dány substrátovou specifitou transportéru, nebo jejich toxickým působením a následným ovlivněním pufrací kapacity buněk.

Úkolem této diplomové práce bylo pokusit se kvantifikovat transport protonů zprostředkovaný proteinem MntH a případně na základě získaných poznatků optimalizovat experimentální podmínky pro jeho měření tak, aby bylo možné měřit i transport indukovaný netoxickými kovy. Bylo proto nutné stanovit pufrací kapacitu bakterií za daných experimentálních podmínek pro kmen exprimující MntH a jeho jednobodový mutant N401G. Studována byla také její závislost na vnějším (a částečně i na vnitřním) pH a přítomnosti kovových iontů. Dále jsme se pokusili stanovit příspěvek dýchacího řetězce k pufrací kapacitě pomocí inhibitorů respirace.

Dalším úkolem bylo proměřit podrobněji závislost transportu protonů indukovaného kadmíem na vnějším pH, použít změřenou pufrací kapacitu a srovnat výsledky takto získané s jinými způsoby zpracování.

1.1 Transportéry kovů – rodina Nramp

V každé buňce existuje specifická skupina proteinů, které zajišťují rovnováhu aktivity transportu přes membránu a napomáhají tak dosažení homeostáze v organismu. Byl vytvořen klasifikační systém pro třídění membránových proteinů TCDB (Transport Classification Database)¹.

Kovy jsou pro každou živou buňku nepostradatelnými prvky, protože se podílejí na množství životně důležitých procesů. Díky své schopnosti přecházet mezi oxidačními stavy jsou důležitými kofaktory enzymů účastnících se redoxních reakcí, např. základních metabolických dějů, dýchacího řetězce, fotosyntézy atd. Zachování homeostázy dvojmocných kovových iontů je proto zásadní pro život. Jakékoli vybočení z homeostatické koncentrace kovů může zapříčinit nedostatek životně důležitých metabolitů nebo způsobit jejich porušení a vést k buněčné smrti nebo řadě nemocí.

Transportéry kovových iontů tak pro buňku představují důležitý nástroj k získávání potřebného množství kovů a zároveň regulaci v případě, kdy vlivem změny vnějších podmínek dojde k abnormálnímu zvýšení jejich koncentrace (6). Některé kovy jsou pro buňku ve vyšších koncentracích škodlivé. Například železo za přítomnosti aktivních forem kyslíku dokáže produkovat volné radikály, které ničí buněčnou strukturu (7).

Jednou z rodin proteinů, které transportují dvojmocné kovové ionty je rodina Nramp - dle klasifikace TCDB označena jako 2.A.55. The Metal Ion (Mn²⁺-iron) Transporter (Nramp) Family. Rodina Nramp zahrnuje integrální membránové proteiny, které fungují jako symportéry dvojmocných kovových iontů s protony. Hnací silou transportu je elektrochemický protonový gradient, který existuje na mnoha typech biologických membrán.

Existují dva známé roteiny Nramp u savců -Nramp1 a Nramp2 (DMT1, DCT). Nramp2 se účastní absorpce železa, jeho mutace v myším genu *Nramp2* způsobuje mikrocytární anémii (8). Také kvasinkové homology Nramp2 jsou potřebné k absorpci kovů jak přímo přes plazmatickou membránu, tak v endosomech nebo lysosmálních vakuolách (9).

O proteinu Nramp1 se již dlouho ví, že je důležitý pro správnou odpověď imunitního systému na infekci intracelulárními parazity (7), není však zatím zcela jasné, jaké procesy při tom probíhají. Jedna z teorií hovoří o funkci Nramp1 při obraně fagozómu v makrofágu proti mikrobiální infekci. Jak bakteriální membrána, tak membrána fagozómu (kam je parazitní bakterie fagocytována) obsahují transportéry z rodiny Nramp, avšak směr transportu H⁺/kov

¹ www.tcdb.org

je opačný. Zatímco bakterie čerpá H^+ /kovy do svého cytosolu (kovy jsou nutné pro produkci obraných látek proti oxidativnímu stresu, kterému je bakterie ve fagozómu vystavena), fagozóm se jí v tom snaží zabránit odčerpáváním H^+ /kovů ze svého lumenu ven pomocí Nramp1. Tak nastává soutěž mezi bakterií a fagozómem o limitní množství kovů, které se ve fagozomálním lumenu nacházejí. Výsledek potom rozhodne o přežití resp. smrti parazitní bakterie (10).

Podle jiné hypotézy by mohl Nramp1 fungovat jako antiportér a naopak přenášet dvojmocné kovy do fagozomálního lumenu, kde by jejich akumulace generovala vysoce reaktivní hydroxylové radikály, které přispívají k bakteriostatickému efektu makrofágu (11).

Jak plyne z předchozího, bakterie též potřebují transportní protein pro dvojmocné kovové ionty. Bakteriální proteiny patřící do rodiny Nramp byly skutečně nalezeny a popsány jako transportéry manganu závislé na protonovém gradientu MntH (Proton-dependent Manganese Transporter) (3). Studium činnosti bakteriálních MntH transportérů může tudíž značnou měrou přispět k pochopení interakce makrofág-patogen a k hlubšímu poznání transportních mechanismů u bakterií.

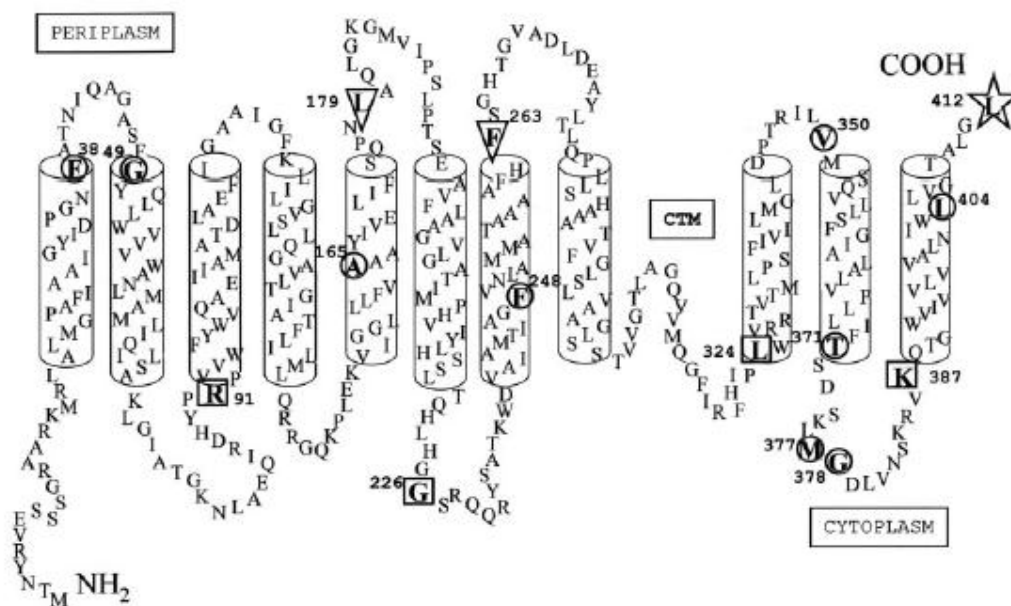
1.2 Bakteriální transportéry MntH

Bakteriální MntH proteiny patří do jedné ze tří bakteriálních fylogenetických skupin (MntH A, B, C), přičemž MntH A zahrnuje homolog vyskytující se v bakterii *Escherichia coli*, který z důvodu příbuznosti k eukaryotním proteinům Nramp představuje vhodný modelový systém pro strukturně-funkční studie a byl použit i v této práci (5).

1.2.1 Topologie MntH

Topologie proteinu MntH z *E. coli* byla navržena pomocí analýzy sekvence, částečně potvrzená pomocí tvorby fúzních proteinů. Výsledky naznačují (12) že je protein složen z 11 transmembránových domén, přičemž N-konec se nachází v cytoplazmě a C-konec je na periplazmatické straně membrány, což je v dobrém souladu s navrženou topologií eukaryotních proteinů Nramp (*obr. 1*) (5).

E. coli MntH A Transmembrane Topology



Obrázek 1: Transmembránová topologie MntH proteinu z *Escherichia coli* (5)

1.2.2 Transport kovů

MntH byl primárně charakterizován jako symportér Mn^{2+} (a Fe^{2+}) s protony. Transportuje však ještě další dvojmocné kovové kationty – Cd^{2+} , Co^{2+} a Zn^{2+} (3). Při hyperexpresi MntH se transport kovů do cytosolu zvýší natolik, že se pro buňku stanou toxické. Z měřených kinetik transportu (pomocí inhibice absorpce Mn^{2+} jinými kationty) na bakteriích *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* (2) vyplývá, že největší afinitu má MntH k Mn^{2+} . Afinita pro Mn^{2+} odpovídá koncentracím Mn^{2+} srovnatelným s fyziologickými podmínkami v biologických systémech. Na rozdíl od toho pro Fe^{2+} odpovídá afinita koncentracím překračující fyziologické podmínky. V obou případech je afinita nezávislá na pH, ale rychlost transportu roste se snižujícím se pH, z toho lze usuzovat, že transport je závislý na pH gradientu.

Stechiometrie kotransportu protonů s kovovými ionty byla určována pro eukaryotní Nramp2 (DCT1) (13), pro bakteriální MntH zatím není známa. Pro eukaryotní homology byl vztah struktury a funkce proteinů rodiny Nramp studován pomocí specifických jednobodových mutací, především sekvenčně konzervovaných kyselých reziduí (14), histidinového páru v 6. transmembránovém úseku (15) a na některých dalších pozicích, kde se sekvence odlišila od proteinů pokládaných za předky rodiny Nramp (16).

1.3 Jak byl studován transport proteiny Nramp

Pro studium transportu proteiny z rodiny Nramp byly použity různé přístupy. Přímé metody zahrnují sledování změny koncentrace kovů uvnitř buňky (14-16) a nebo změny vnitřního pH indukovaných přidáním kovu (5;16). Třetí možností je využití elektrofyziologických metod (hlavně patch-clampu), při kterém se měří transport elektrického náboje. V případě proteinů z rodiny Nramp byla tato metoda uplatněna hlavně u eukaryotických homologů (17). Nepřímé metody zahrnují použití různých biologických testů využívajících např. toxicity transportovaných kovů (3).

1.3.1 Metody sledování transportu kovů

Pro stanovení akumulace kovů buňkami byly použity ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spektrometry) (16) a radioaktivně značené kovy (14).

Alternativní metoda, umožňující měřit změnu vnitrobuněčné koncentrace kovů v reálném čase je využití fluorescenčních sond, které reagují na přítomnost dvojmocných kovů. Zatím byla použita sonda calcein-AM, ve studii zabývající se transportem Fe^{2+} a Co^{2+} přes Nramp2 (DCT1) exprimovaném ve vaječnickové buňce čínského křečka (15).

1.3.2 Metody sledování transportu protonů

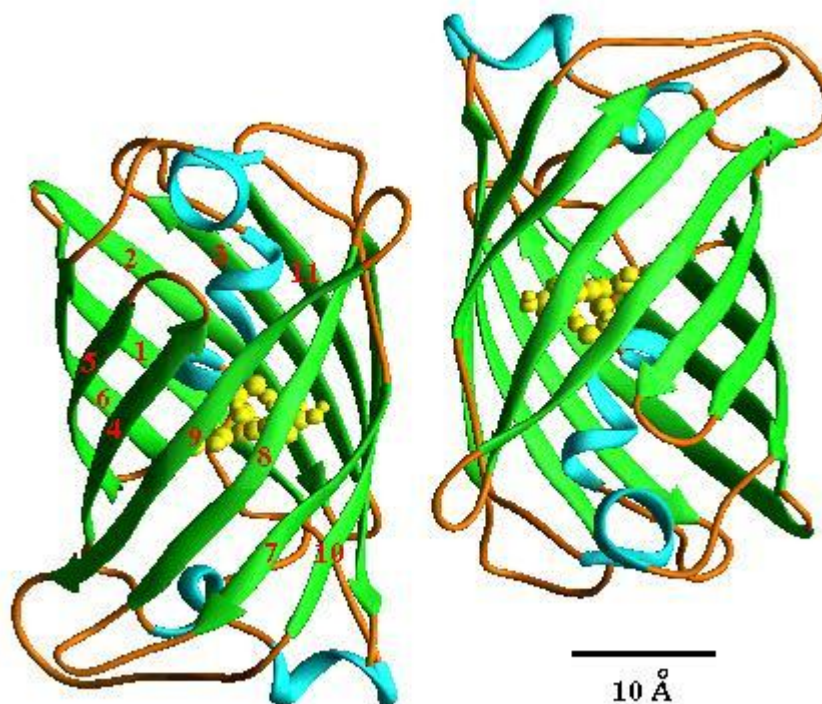
Přenesením protonů do cytosolu buněk dojde ke změně vnitřního pH. Transport protonů se tedy nejčastěji zkoumá metodami, které stanovují změny vnitrobuněčného pH.

Lze použít radioaktivní značení slabých kyselin nebo zásad a měřit jejich akumulaci v buňce (18) – tento způsob však není příliš pohodlný (neměří se časový průběh a zůstávají problémy s kalibrací). Další možností měření vnitrobuněčné pH je použít ^{31}P nukleární magnetická rezonance fosfátu, jehož spektrum je pH závislé (19) nebo pro větší buňky aplikovat mikroelektrody. Množství transportovaných protonů lze stanovit také ze změny vnějšího pH a jeho známé pufrační kapacity, za předpokladu zastavení dýchání (20).

Vnitrobuněčné pH se často určuje užitím fluorescenčních metod, využívajících některou z širokého spektra fluorescenčních sond. Průchod sond do cytosolu bakterií je však poměrně obtížný a to kvůli přítomnosti buněčné stěny a dalších povrchových struktur, u gram-negativních bakterií navíc průnik sond komplikuje přítomnost vnější membrány. Nejnovější

možností, jak stanovit vnitrobuněčné pH v bakteriích v reálném čase, je použit fluorescenční metoda využívající zelený fluorescenční protein (GFP) citlivý na změny pH.

GFP (původně objeven v medúze *Aequorea victoria*) se skládá z 11 antiparalelních skládaných listů, které tvoří β -barel. Uvnitř této struktury je chráněný α -helix, který nese fluorofor (*obr. 2*).



Obrázek 2: Struktura GFP (21).

Aktivní forma fluoroforu vzniká přibližně hodinu po expresi proteinu autokatalytickou cyklizací a oxidací tří aminokyselin Ser65, Tyr 66, Gly67 (21).

Systematickým mutováním v oblasti sedmi klíčových reziduí (Gln 94, Arg 96, His 148, Ile 167, Thr 203, Ser 205 a Glu 222), které se podílejí na přenosu protonů, byl nalezen mutant GFP, který reaguje na změnu pH tak, že je možné měřit poměrově. Tato pH citlivá forma byla označena pHluorin (4).

Excitační spektrum pHluorinu má dva pásy, jeden odpovídající protonované formě (maximum leží na vlnové délce 395nm) a jeden deprotonované formě (maximum na vlnové délce 475nm). Poměr intenzit na vhodných vlnových délkách (např. 410nm a 470nm) umožňuje měřit pH v rozmezí přibližně 5,5 – 8,5.

Výhodou fluorescenčního proteinu je, že může být exprimován přímo v cytosolu buněk, kam je umístěn plazmid nesoucí genetickou informaci kódující tento protein. Jedná se tedy o

neinvazivní metodu. Odezva na změny vnitřního pH je rychlá, takže umožňuje sledovat okamžité změny (22).

Tato metoda byla použita k přímému sledování kinetiky transportu protonů proteinem MntH (16) indukovaného přidáním kovu ke vzorku. Při interpretaci výsledků se však objevuje problém jak kvantifikovat transport protonů přes protein MntH, a očistit výsledky od procesů regulujících vnitřní pH (což by bylo třeba pro stanovení stechiometrie transportu H^+ /kov). Bylo by potřeba vědět, jak zjistit vztah mezi cytosolickým pH a množstvím transportovaných protonů.

1.4 Vztah mezi transportem protonů a vnitřním pH u bakterií

Mezi mechanismy, kterými buňka reaguje na přítok protonů (v případě MntH indukovaného kovem) patří kromě cytosolické pufrací kapacity také vliv dýchacího řetězce (ten mají bakterie na plazmatické membráně) a dalších transmembránových přenašečů protonů (např. K^+/H^+ , Na^+/H^+ ...).

Dýchací řetězec je systém oxidoreduktas a mobilních přenašečů protonů a elektronů, který na úkor exergonické reakce aktivně transportuje protony ven z buňky (23), čímž generuje protonmotivní sílu. Domníváme se, že zvýšení aktivity dýchacího řetězce může alespoň částečně kompenzovat protony přitekly přes MntH.

V případě, že se buňka potřebuje zbavit (nebo naopak přijmout) protonů, nemůže to dělat čistě protonovým transportem - v tom by jí brzy zamezil vzniklý el. potenciál. Protony tedy musí začít vyměňovat za jiný náboj. V kompenzaci protonového náboje hraje dominantní roli absorpce draslíku, který patří k majoritním buněčným kationtům. Tak je buňce umožněno transportovat daleko víc protonů za cenu, že pozmění koncentraci draslíku. Z literatury je známo (24), že koncentrace draslíku v pufru ovlivňuje nastavení vnitřního pH v bakteriích.

Jedna možnost, jak by se dal počet přenesených protonů v buňce okalibrovat, je usmrtit ji, a tak zastavit všechny aktivní procesy. U liposomů se kalibruje pomocí ionoforů (např. Valinomycin, Nigericin) a přidáváním vhodné zásady/kyseliny (např. KOH). To ale u buněk není vždy možné, protože ionofory nemusí snadno procházet buněčnou stěnou, kromě toho mohou být aktivně vypuzovány. Kromě experimentálních problémů by navíc ve většině případů zanikla hnací síla transportu.

Druhou možností (kterou jsme vyzkoušeli) je změřit celkovou pufrací kapacitu intaktních buněk a použít ji pro kvantifikaci transportu. Dále se pokusit hodnotu pufrací

kapacity snížit zeslabením odezvy některých procesů (inhibicí dýchacího řetězce, změnou koncentrace draslíku).

1.5 Pufrační kapacita

Fyzikálně-chemické pufrování roztoků znamená schopnost udržovat v jistém rozmezí stabilní pH po přidání kyseliny či zásady do systému, protože malá množství přidaných iontů H^+ resp. OH^- reagují s přítomnými konjugovanými bázemi A^- resp. kyselinami HA bez výrazného vlivu na pH. Protože vlastnosti biologických molekul se mění s kyselostí roztoku jsou intracelulární kapaliny silně pufrovány, aby napomáhaly zajistit stálost prostředí (23).

Pufry charakterizuje pufrační kapacita (β) obecně definována jako

$$\beta = \frac{\Delta[A^-]}{\Delta pH} \quad (1)$$

kde $\Delta[A^-]$ reprezentuje množství silné disociované kyseliny, kterou musíme přidat do roztoku, aby došlo ke změně ΔpH . (Analogicky platí pro přidání silné báze.)

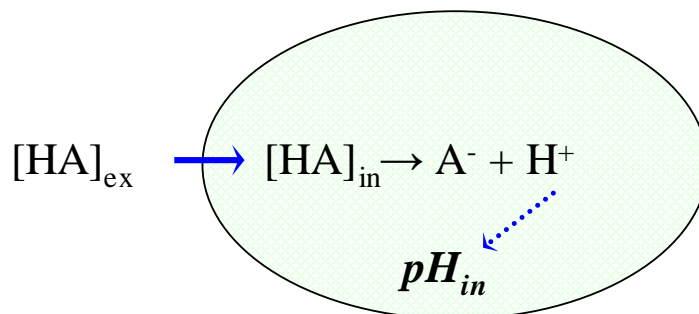
Vztah (1) byl původně omezen na fyzikálně-chemickou pufrační kapacitu v *in vitro* systémech, ale aplikováním na buňky může být rozšířen i na biochemické a organelové pufrování. V pojmu vnitrobuněčné pufrování vystupují tři mechanismy. Jednak jsou to iontové reakce související s pufrační vlastností cytoplazmy (nejrychlejší, probíhají v řádu sekund. Dále je to odezva na metabolické a transportní procesy, které jsou však pomalejší (řádově desítky sekund), případně vliv pufrace organel (25).

Pufrační kapacita cytosolu zahrnuje aktivní procesy homeostázy snažící se minimalizovat změny vnitrobuněčného pH, čímž je zkresleno námi sledované měření transportu protony/dvojmocné kovové ionty.

1.5.1 Měření pufrační kapacity pomocí slabých kyselin a zásad

Pro změření pufrační kapacity buněk potřebujeme tedy uvnitř způsobit definovaný puls v koncentraci protonů a změřit následnou změnu pH. Jednou z metod, jak toto udělat a přitom příliš neporušit fyziologický stav buňky, je vystavit buňky působení slabých kyselin nebo zásad. Ty procházejí v nenabitě formě membránou a jsou tak schopny přenést protony přes

membránu (obr. 3). V našem případě bylo použito slabé kyseliny, protože $pH_{in} > pH_{ex}$ a kyselina se bude mnohem snadněji ionizovat ve vyšším pH uvnitř buňky než ve vnějším prostředí.



Obrázek 3: Schématické znázornění přenesení protonu kyselinou přes membránu.

Disociace obecné kyseliny HA je popsána rovnicí



Reakce (2) probíhající vně buněk je charakterizována disociační konstantou K_a

$$K_a = \frac{[H^+]_{ex}[A^-]_{ex}}{[HA]_{ex}} \quad (3)$$

Přidáme-li k suspenzi buněk slabou kyselinu o známé koncentraci $[HA]_{celk}$, dojde k částečné disociaci

$$[HA]_{celk} = [A^-]_{ex} + [HA]_{ex} \quad (4)$$

Z rovnic (3) a (4) dostaneme koncentraci nedisociované kyseliny $[HA]_{ex}$, které zůstalo v extracelulárním prostoru.

$$[HA]_{ex} = \frac{[HA]_{celk}[H^+]_{ex}}{K_a + [H^+]_{ex}} \quad (5)$$

Bakteriální membrána je nepropustná pro nabité molekuly, ale nenabité molekuly kyseliny HA_{ex} jsou schopné membránou projít. Předpokládá se, že dojde k nastavení rovnováhy mezi vnitřní a vnější stranou buňky, takže

$$[HA]_{ex} = [HA]_{in} \quad (6)$$

Disociační konstanta popisující ionizaci kyseliny uvnitř buňky je potom

$$K_a = \frac{[H^+]_{in}[A^-]_{in}}{[HA]_{ex}} \quad (7)$$

z čehož vyjádřením $[A^-]_{in}$ a dosazením výrazu (5) vychází

$$[A^-]_{in} = \frac{K_a [HA]_{celk} [H^+]_{ex}}{[H^+]_{in} (K_a + [H^+]_{ex})} \quad (8)$$

kde $[H^+]_{ex}$ určíme ze známé hodnoty pH_{ex} pufru a $[H^+]_{in}$ z naměřené hodnoty rovnovážného pH_{in} (které se po přidání kyseliny skokově sníží a dosáhne tak nové rovnovážné hodnoty) podle definice pH

$$pH = -\log[H^+] \quad (9)$$

Za předpokladu, že se uvnitř buněk disociuje dle rovnice (7) všechna prošlá kyselina, odpovídá potom $[A^-]_{in}$ uvolněným protonům a vnitrobuněčná pufrací kapacita se počítá jako

$$\beta = \frac{[A^-]_{in}}{\Delta pH} \quad (10)$$

Skoková změna ΔpH se určí jako rozdíl počátečního pH_{in} v bakteriích a nového rovnovážného pH_{in} po přidání kyseliny.

Koncentraci přidané kyseliny $[HA]_{celk}$ vypočítáme ze znalosti objemu přidávané kyseliny V_{kys} , její hustoty ρ , molární hmotnosti M a celkového objemu V_{celk} v květu podle rovnice

$$[HA]_{\text{celk}} = \frac{V_{\text{kys}} \rho}{MV_{\text{celk}}} \quad (11)$$

1.5.2 Další metody stanovení vnitrobuněčné pufrací kapacity

Částečná nebo úplná permeabilizace buněk umožňuje určit vnitrobuněčnou pufrací kapacitu β_i jako rozdíl celkové pufrací kapacity β_T (tedy vnější a vnitřní fáze) a pufrací kapacity vnější fáze β_0 ($\beta_i = \beta_T - \beta_0$). Pufrací kapacita vnější fáze β_0 je dána okamžitou změnou pH na přidání kyseliny k nepufrované suspenzi buněk. Celková pufrací kapacita β_T se určí také jako změna pH po přidání kyseliny, avšak membrána buněk je v tomto případě propustná pro protony přidáním vhodného ionoforu. pH se měří pomocí elektrody (26).

Jinou metodou využívající elektrody pro měření vnějšího pH je užití tzv. kyselých pulsů. Buňky se titrují pomocí malých množství kyseliny a měří se časový průběh změny vnějšího pH, ze kterého je potom určena celková a vnější pufrací kapacita (27).

Existují studie, ve kterých byla měřena pufrací kapacita vnitrobuněčné tekutiny *in situ* přímým vstříknutím kyseliny nebo zásady. Tento postup byl aplikován například na hlemýžďi neurony. Ionty byly do buňky dopraveny iontoforézou za použití mikroelektrod, které také měřily změnu pH (25).

1.5.3 Kvantifikace transportu

Pokud známe změnu pH_{in} během transportu protonů a hodnotu pufrací kapacity (za předpokladu, že je konstantní během pokusu), můžeme určit množství transportovaných protonů. Pufrací kapacitu (11) lze ekvivalentně vyjádřit jako

$$\beta = \frac{d[H^+]}{dpH} \quad (12)$$

Rychlost přenesení transportovaných protonů v za jednotku času t vyjádříme vztahem

$$v = \frac{d[H^+]}{dt} \quad (13)$$

z rovnic (12) a (13) dostaneme

$$dpH = \frac{v}{\beta} dt \quad (14)$$

Tento vztah lze integrovat pro daný časový interval. Předpokládáme-li v nejjednodušším přiblížení, že rychlost transportu se během sledovaného časového intervalu nemění ($v = konst$). Potom po integraci vztahu (14) získáme vztah pro výpočet rychlosti transportu protonů ze znalosti pufrační kapacity a změny pH za jednotku času.

$$v = \frac{\Delta pH \beta}{\Delta t} \quad (15)$$

2 Experimentální metody a materiál

2.1 Materiál

Pro většinu měření se užívaly citrát-fosfátové pufrы o pH 4,7; 5,0; 5,3 a 5,7. Jednotlivá pH byla nastavena mícháním 25mM kyseliny citronové a 50mM K₂HPO₄ v různých poměrech a měřena pH elektrodou. Dále byl používán pufr MES-Na 0,1M a přidáním KCl byly nastaveny různé koncentrace draslíku.

Kovy (Cd, Co, Mn, Zn) byly uchovány v roztocích jako chloridové soli. Inhibitory dýchacího řetězce kyanid draselný (KCN) a azid sodný (NaN₃) byly rovněž uchovávány v roztocích. Všechny roztoky a byly uchovávány v ledničce při teplotě 4°C.

2.2 Použité bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny byly získány od Prof. M.F.M. Celliera (INRS, Laval, Kanada). Jejich příprava je popsána v (5). V krátkosti: Byly používány geneticky upravené bakterie *Escherichia coli* kmen DH11S s delecí *mntH* namísto něj byl vložen gen pro rezistenci na kanamycin. Buňky byly transformovány plazmidem pBAD nesoucí gen pro divoký typ MntH a rezistenci na ampicilin. Expresi genu do proteinu MntH indukuje arabinóza. Dále byl používán kmen bakterií nesoucí plazmid kódující jednobodový mutant MntH N401G. Od divokého typu MntH se tato mutace liší zaměněním 401rezidua asparaginu za glycin. Jako negativní kontrola byl používán kmen bakterií, které obsahovaly plazmid pBAD bez genu pro MntH. Všechny zmiňované bakteriální kmeny byly zároveň transformovány plazmidem pGBM6-pHL (5) se sekvencí kódující pHLuorin a rezistencí na spectinomycin.

Značení: Pro většinu experimentů byl používán kmen bakterií *Escherichia coli* s hyperexprimovaným divokým typem proteinu MntH. Není-li v textu zdůrazněno jinak, jedná se vždy o tento bakteriální kmen.

2.3 Uchovávání a pěstování buněk

Buňky byly ze zásobního roztoku přeočkovány na agarovou misku (4% agar v LB médiu = Luria-Bertani médium: 1% Bacto-trypton, 0,5% bacto-yeast extrakt, 0,5% NaCl, kanamycin 30 µg/ml, ampicilin 100µg/ml, spectinomycin 100µg/ml), Kultivací přes noc ve 37°C se

vytvoří na misce kolonie buněk. Každá miska byla pro přípravu vzorků používána maximálně jeden měsíc a uchovávána v lednici při teplotě 4°C.

Buňky byly kultivovány ve 2ml LB média s antibiotiky ampicilinem (100µg/ml), kanamycinem (30µg/ml) a spectinomycinem (100µg/ml) vůči nimž jsou používané kmeny rezistentní. Inkubace probíhala aerobně při teplotě 37°C cca 16-20 hodin, za stálého třepání (250 RPM).

Narostlé buňky byly v poměru 1:100 přeočkovány do 10ml resp 20ml LB média s antibiotiky a za stejných podmínek kultivovány 2 hodiny, kdy k nim byla přidána L-arabinoza na celkovou koncentraci 0,06%-ní, s níž inkubace pokračovala ještě 1 hodinu. Přidání L-arabinozy indukuje expresi proteinů MntH. Pro zajištění sterility byly manipulace s buňkami prováděny v blízkosti kahanu.

2.3.1 Příprava vzorků

Narostlé bakterie byly centrifugovány při frekvenci 5000 otáček/minutu po dobu 2 minut nebo v menší centrifuze při frekvenci 10 000 otáček/minutu po dobu 1 minuty. Promytí buněk proběhlo dvakrát a to vždy v tom pufru, který byl zvolen pro daný experiment. Po každém promytí byly buňky opět centrifugovány a nakonec resuspendovány v pufru.

Celkový objem v měřících kyvetách byl 3ml. Aby byl zajištěn přibližně stejný počet buněk v každém vzorku, byla nastavena optická hustota – zkratka OD – při vlnové délce 600 nm na hodnotu 0,2. Měření OD byla prováděna na absorpčním spektrometru Novaspec III.

2.4 Měření vnitřního pH bakterií

Vnitřní pH_{in} bylo měřeno pomocí fluorescence pHluorinu. Měření byla prováděna na fluorescenčním spektrometru Fluoromax-2. Zdrojem záření byla xenonová lampa.

Aby bylo stanovení pH nezávislé na koncentraci pHluorinu v jednotlivých buňkách, je výhodné měřit poměrově. Poměr intenzit R byl měřen na dvou excitačních vlnových délkách – 410nm a 470nm. Emise je na vlnové délce 520nm. Aby se v měřeních eliminoval vliv případných nestabilit zdroje záření, byly intenzity signálů z měřených excitačních vlnových délek poděleny příslušnou intenzitou signálu z lampy.

K získání kalibrační křivky pro přepočet R_{410/470} na pH byly buňky obsahující pHluorin permeabilizovány pomocí protonoforu CCCP (carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazone),

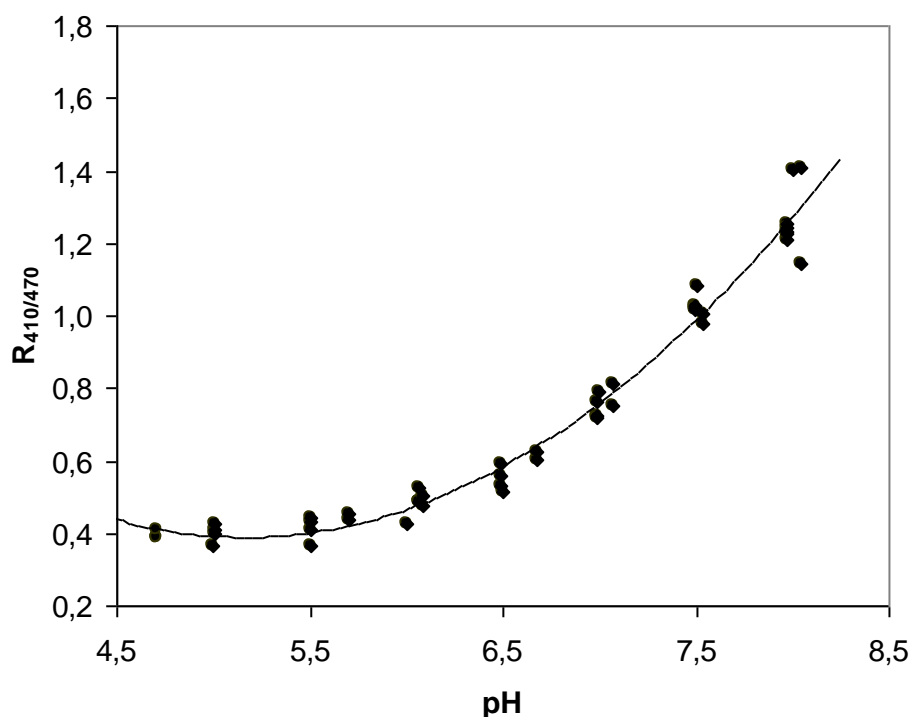
čímž byla narušena membrána a začala být propustná pro protony, což mělo za následek vyrovnání vnitřního pH_{in} známému vnějšímu pH_{ex} (28). Hodnoty pro stanovení kalibrační křivky (obr. 4) byly naměřeny ve třech nezávislých měřeních v letech 2004-2006. Rovnice kvadratického fitu

$$R_{410/470} = 0,1103pH^2 - 1,1395pH + 3,3336 \quad (16)$$

relativní odchylky parametrů fitu jsou uvedeny v tabulce 1.

tabulka 1: Relativní odchylky parametrů kalibrace pro pHluorin.

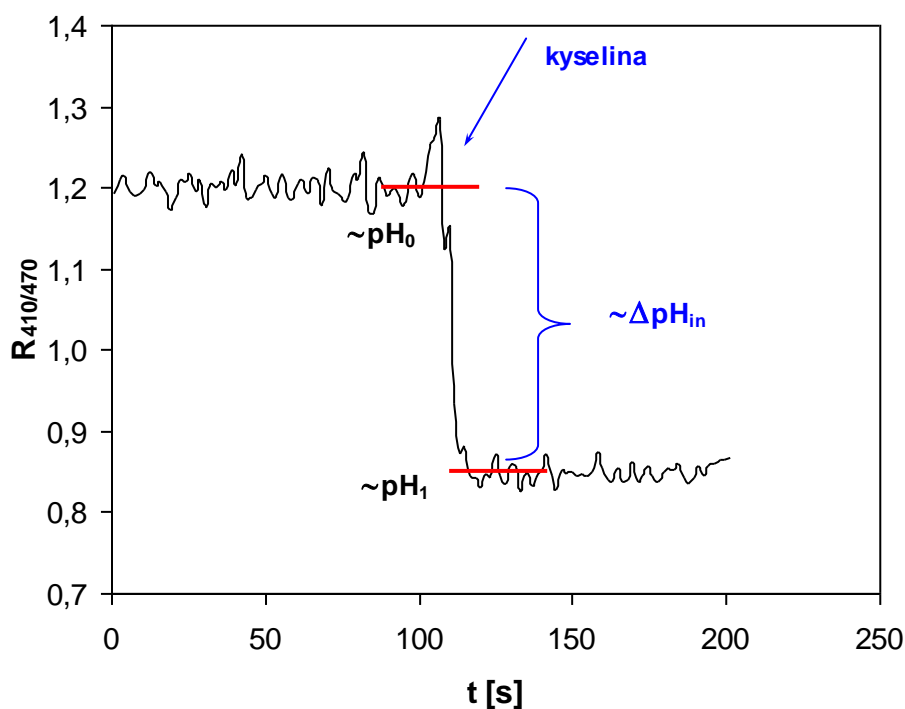
parametr		relativní odchylka
A	0,1103	1,20%
B	-1,1395	0,90%
C	3,3336	0,40%



Obrázek 4: Kalibrační křivka pro pHluorin

2.5 Stanovení pufrací kapacity

Vnitrobuněčná pufrací kapacita byla měřena metodou přidávání slabých kyselin. Následkem dodání kyseliny do vzorku došlo ke skokovému snížení pH_{in} , což pozorujeme jako pokles poměru intenzit fluorescence pHluorinu na vlnových délkách 410nm a 470nm (obr. 5)



Obrázek 5: Ukázka snížení poměru intenzit fluorescence pHluorinu ve spektrometru následkem přidání slabé kyseliny.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Pufrační kapacita bakterií

Pro měření pufrační kapacity bakterií jsme chtěli použít metodu popsanou v kapitole 1.5.1 využívající slabých kyselin pro přenos protonů do buněk. Bylo proto třeba nejprve nalézt vhodné experimentální podmínky.

3.1.1 Výběr vhodné slabé kyseliny

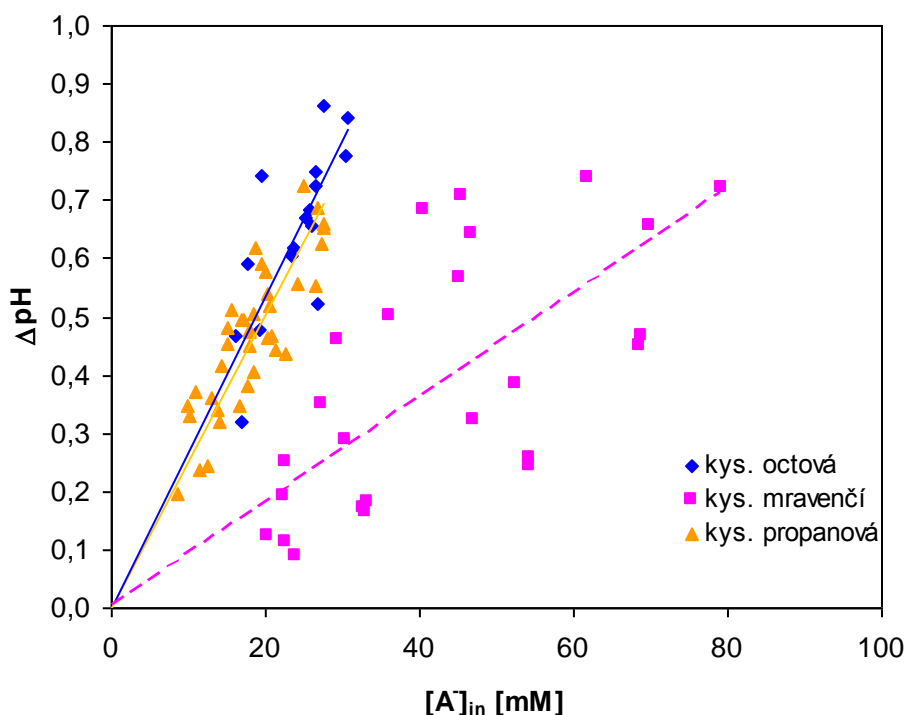
Pro měření pufrační kapacity cytosolu bylo nejprve nutné zvolit vhodnou kyselinu a koncentraci pro měření. Vyzkoušeli jsme kyselinu octovou CH_3COOH o výsledné koncentraci v intervalu 38-286 μM , kyselinu mravenčí HCOOH o koncentraci 26-434 μM a kyselinu propanovou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ o koncentraci 45-223 μM . Vlastnosti kyselin podle (36;37) jsou shrnuty v tabulce 2.

tabulka 2: Vlastnosti kyselin

kyselina	ρ [g/dm ³]	M [g/mol]	K_a	$\text{p}K_a$
mravenčí	1220	46,03	$1,7 \cdot 10^{-4}$	3,752
octová	1049	60,05	$1,8 \cdot 10^{-5}$	4,756
propanová	993	74,08	$1,3 \cdot 10^{-5}$	4,874

Používaným bakteriálním kmenem byl kmen exprimující MntH. Tato měření probíhala ve fosfát-citrátovém pufru o pH 4,7.

Jednou z kontrol správné volby používané koncentrace kyseliny je linearita závislosti změny pH na množství uvolněných protonů (tj. $[\text{A}^-]_{\text{in}}$). Převertáčená hodnota pufrační kapacity je konstantou úměrnosti mezi skokem ΔpH a množstvím disociované kyseliny uvnitř buňky $[\text{A}^-]_{\text{in}}$ podle rovnice (11). Jak pro kyselinu octovou, tak pro kyselinu propanovou je tato závislost lineární jak je patrné z obr. 6. Naopak kyselina mravenčí nevykazuje téměř žádnou závislost a hodnoty pufrační kapacity jsou značně rozptýlené. Pro měření pufrační kapacity za těchto experimentálních podmínek tedy kyselina mravenčí není vhodná.



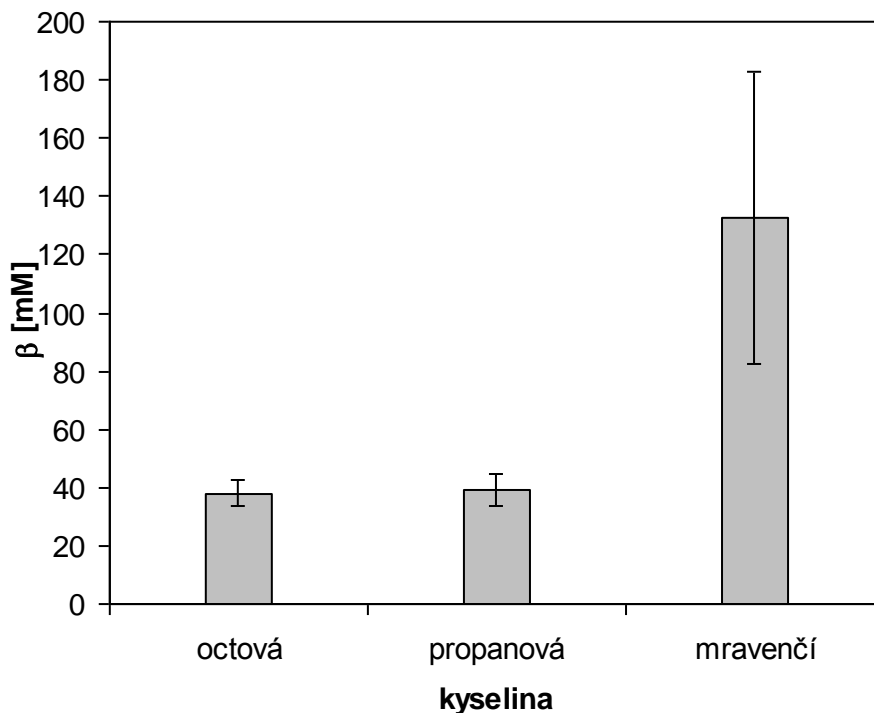
Obrázek 6: Závislost změny pH na množství protonů přenesených do cytosolu. Převrácená hodnota směrnice přímek odpovídá pufrální kapacitě. Zobrazené výsledky pocházejí ze 4 kultivací pro kys. octovou, 3 kultivací pro kys. mravenčí a 11 kultivací pro kys. propanovou.. U kyseliny propanové nebyla závislost lineární pro koncentrace $[A^-]$ větší než 30mM, tyto body proto nebyly brány v úvahu (nejsou ukázány) a následující měření byla prováděna při menší koncentraci kys. propanové

Průměrné hodnoty pufrální kapacity spočítané podle rovnice (11) jsou na obr. 7 a v tabulce 3. Uvedené chyby jsou určeny jako průměry absolutních hodnot odchylek od střední hodnoty. Pro bakteriální kmen neobsahující protein MntH byla naměřena pufrální kapacita 39mM pomocí 179 μ M kyseliny propanové, čili stejně jako pro kmen buněk s divokým typem proteinu. Přítomnost proteinu MntH tedy pufrální kapacitu buněk neovlivňuje.

Pro kyselinu octovou a propanovou vychází hodnoty pufrální kapacity v rámci chyby stejně, pro měření se tyto kyseliny zdají být ekvivalentní. Shodnost dat byla testována Studentovým t-testem. Hladina významnosti p je 48%, což je nad hraniční hladinou významnosti (5%) a data se interpretují jako shodná. V dalších experimentech jsme se rozhodli používat kyselinu propanovou v koncentracích 45-286 μ M.

Všechny tři kyseliny mohou být teoreticky buňkou metabolizovány, ale jelikož skok vnitřního pH byl měřen okamžitě po přidání kyseliny, předpokládáme, že se vliv metabolických procesů nestihne projevit. Pro kyselinu propanovou a octovou je tento

předpoklad ještě podpořen tím, že hodnoty pufrční kapacity získané jejich pomocí se neliší a není příliš pravděpodobné, že by obě byly metabolizovány stejnou rychlostí.



Obrázek 7: Průměrné hodnoty pufrční kapacity pro tři kyseliny v pH 4,7.

tabulka 3: Průměrné hodnoty pufrční kapacity v pH 4,7.

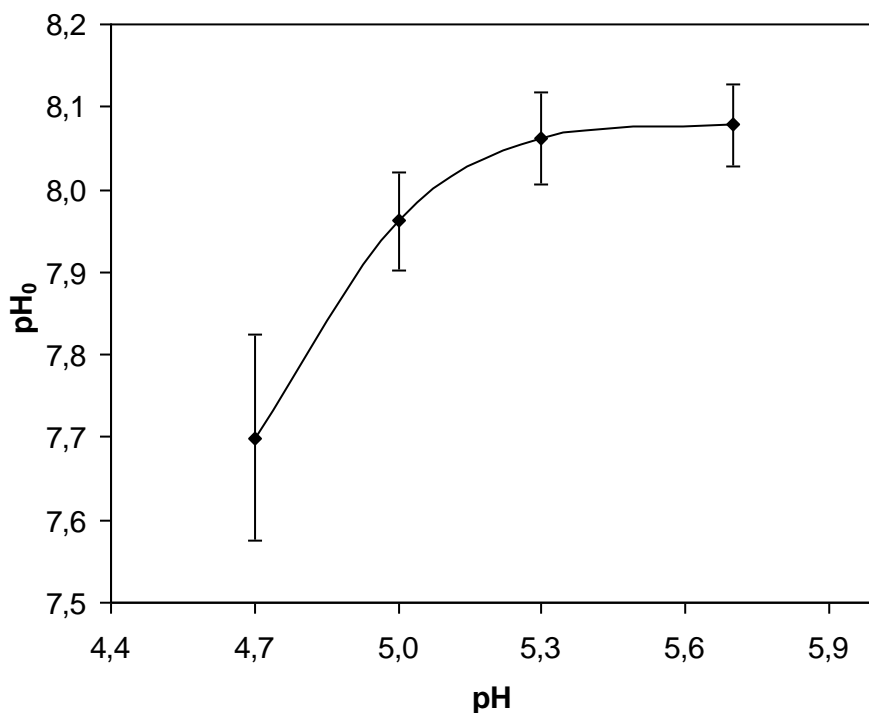
kyselina	β [mM]	$\Delta\beta$ [mM]
octová	38	4
mravenčí	133	50
propanová	39	5

3.2 Vliv vnějšího pH na pufrční kapacitu a vnitřní pH v bakteriích

Zvolený experimentální postup pro měření pufrční kapacity jsme aplikovali na bakterie *E. coli* exprimující MntH za stejných experimentálních podmínek, za jakých je studován kovem indukovaný transportu protonů.

Vzhledem k tomu, že vnitřní pH bakterií se mění v závislosti na použitém fosfát-citrátovém pufru o pH 4,7; 5,0; 5,3 a 5,7, sledovali jsme i jeho hodnoty, abychom stanovili

jejich případný vliv na pufrací kapacitu. Průměrné hodnoty vnitřního pH uvádí obr. 8 a tabulka 4.



Obrázek 8: Průměrné hodnoty počátečního pH_0 uvnitř bakterií v závislosti na pH_{ex} pufru. Hodnoty jsou z 11 kultivací pro pH 4,7 a ze 4 kultivací pro pH 5,0; 5,3 a 5,7. Chyba určena jako průměrná odchylka od střední hodnoty. Data jsou proložena křivkou jen pro přehlednost, nejedná se o fit.

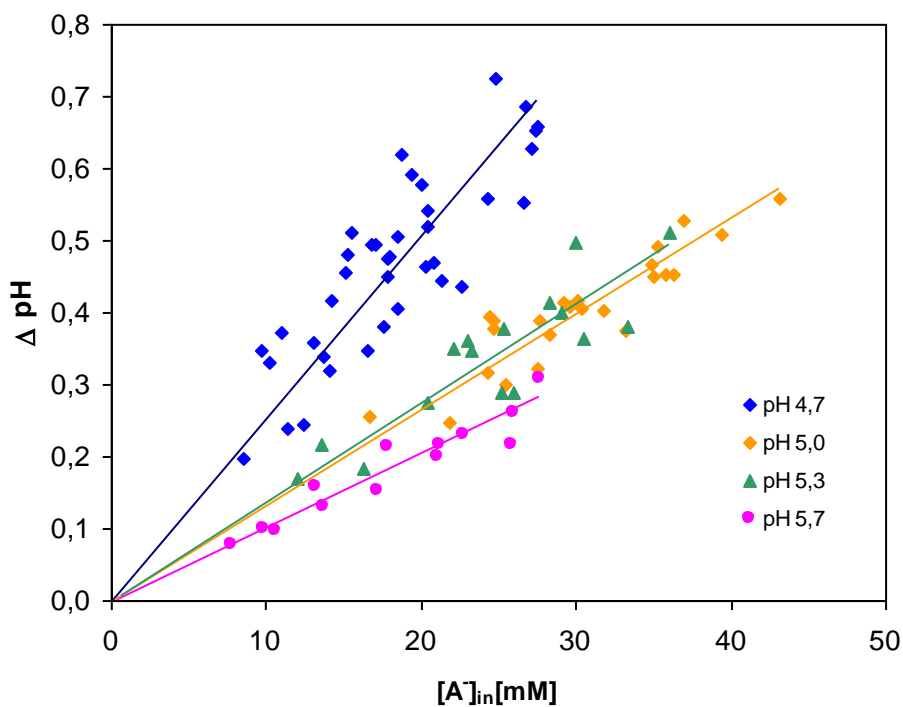
Vnější pH 4,7 je pro bakterii příliš nízké a procesy homeostáze nedokáží za dané koncentrace draslíku (přibližně 50 mM) cytosolické pH udržet na optimální hodnotě, takže sledujeme jeho mírný pokles. Dochází také k největšímu rozptylu hodnot od průměru. Ve vyšších vnějších pH se hodnota vnitřního pH tolik nemění. Přestože jsme dodržovali stejný postup kultivace a přípravy vzorků, pozorujeme jistou fluktuaci hodnot v rámci jednotlivých kultivací.

tabulka 4: Průměrné hodnoty vnitrobuněčného pH a pufrací kapacity v různých vnějších pH .

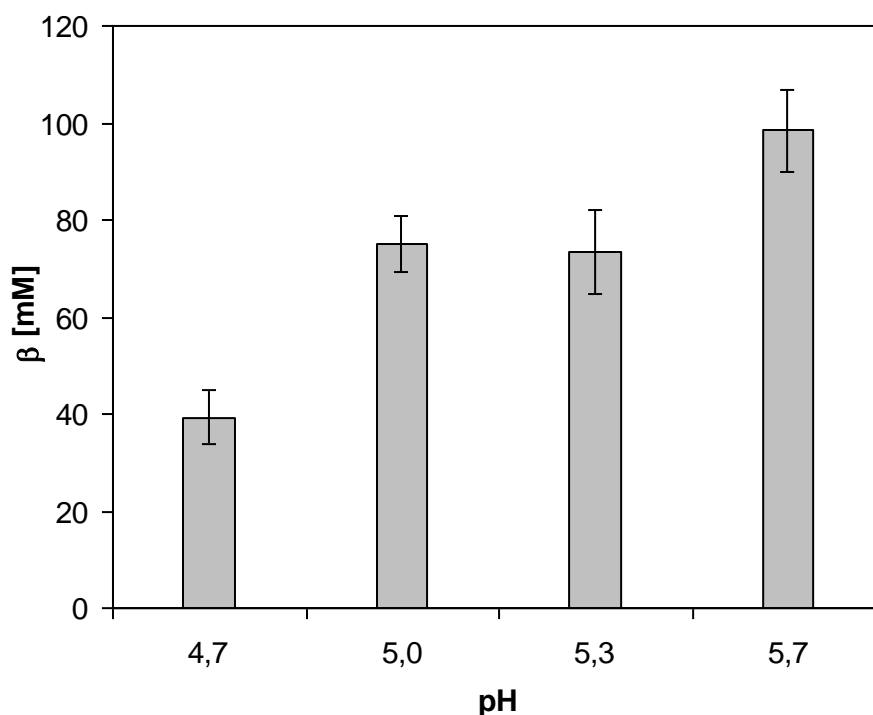
pH_{ex}	pH_0	ΔpH_0	β [mM]	$\Delta\beta$ [mM]
4,7	7,70	0,12	39	5
5,0	7,96	0,06	75	6
5,3	8,06	0,06	74	9
5,7	8,08	0,05	98	8

Dále byla měřena pufrací kapacita v jednotlivých pH a to za použití kyseliny propanové o konečné koncentraci 45-286 μM . Přímkový na obr. 9 odpovídají převráceným hodnotám

pufrační kapacity v jednotlivých pH. Hodnoty jsou uvedeny v *tabulce 4* a na *obr. 10*. Pufrační kapacita se stoupajícím pH roste, což odpovídá tomu, že ve vyšším pH jsou buňky blíže svému optimálnímu vnitřnímu pH a snáze si tuto hodnotu udržují. Uvedené chyby odpovídají průměrným hodnotám odchylek od střední hodnoty.



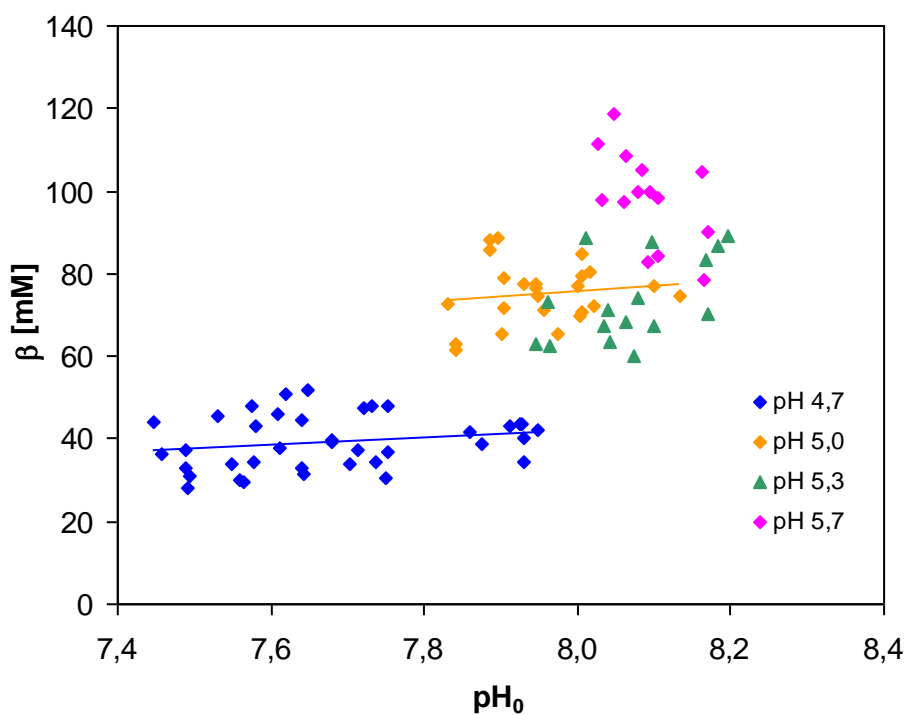
Obrázek 9: Závislost změny pH na množství protonů přenesených do cytosolu. Převrácená směrnice přímek odpovídá pufrační kapacitě pro jednotlivá pH. Data pocházejí z 11 kultivací pro pH 4,7 a ze čtyř kultivací pro pH 5,0; 5,3 a 5,7.



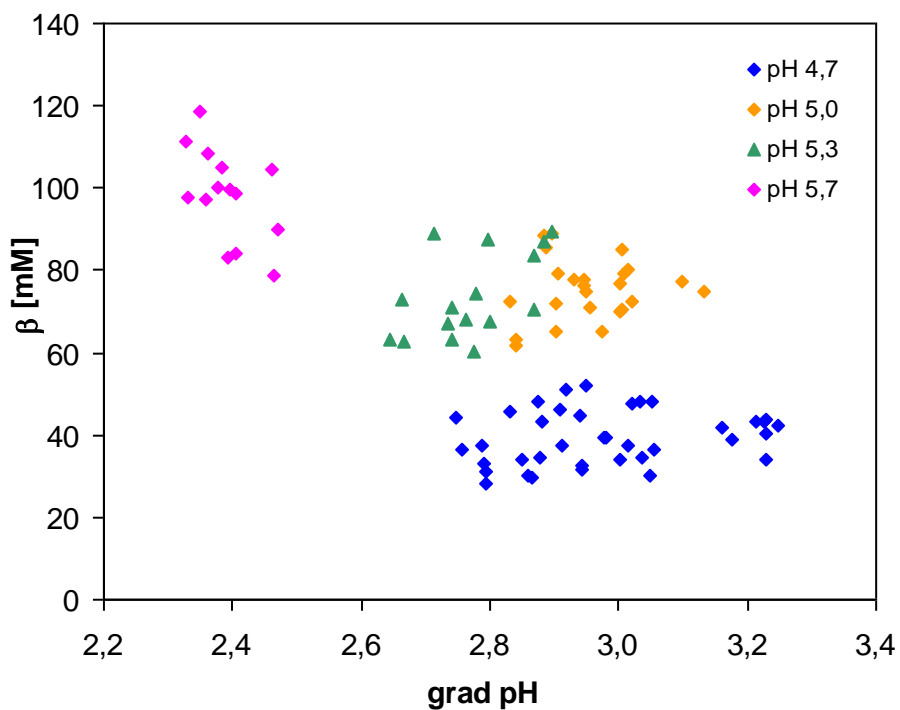
Obrázek 10: Průměrné hodnoty pufrční kapacity v různých vnějších pH

Vzhledem k tomu, že (zvláště v pH 4,7) mají buňky poměrně velký rozptyl v hodnotách vnitřního pH mezi jednotlivými kultivacemi, zajímalo nás, jak tyto změny ovlivňují pufrční kapacitu. To je důležité pro pozdější kvantifikaci transportu protonů, kterou mohou různé hodnoty výchozího vnitřního pH také ovlivnit.

Obr. 11 ukazuje, že v pH 4,7 a 5,0 pufrční kapacita na počátečním pH nezávisí. Pro pH 5,3 a 5,7 se zřejmá závislost neprojevuje, ale data jsou více rozptýlená. Bylo by zajímavé změřit tuto závislost pro ještě nižší vnitřní pH, nastává však problém, jak jich docílit a zároveň nenarušit fyziologický stav buněk. Nabízí se také otázka, zda rozdíly v pufrční kapacitě pro různá vnější pH nejsou dány spíše gradientem pH přes membránu. Překreslení obr. 11 do obr. 12 pro závislost na gradientu pH ($=pH_{in}-pH_{ex}$), ale ponechává oddělené skupiny dat podle původního vnějšího pH. Zdá se tedy, že to, co ovlivňuje velikost pufrční kapacity, je hodnota vnějšího pH (v podmínkách našich pokusů pro *E. coli* relativně nízká).



Obrázek 11: Vliv počátečního vnitřního pH_0 v bakteriích na pufrací kapacitu se neprojevil.



Obrázek 12: Pro závislost pufrací kapacity na gradientu pH přes membránu zůstávají oddělené skupinky bodů pro jednotlivá vnější pH.

3.2.1 Srovnání s kmenem s mutací MntH N401G

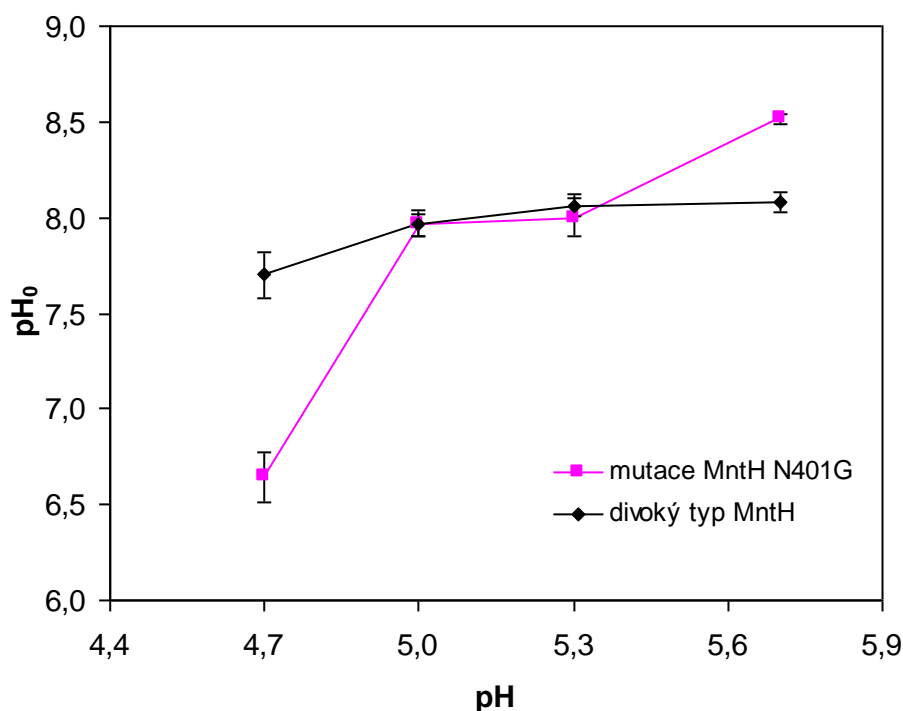
Bylo zjištěno, že jednobodová mutace MntH N401G může mít vliv na nastavení vnitřního pH v bakteriích. Z měření transportu dále dle (11) vychází, že kadmium indukuje výraznější změnu koncentrace protonů v cytosolu než je pozorováno u divokého typu MntH proteinu.

Zajímalo nás srovnání hodnot vnitřního pH a pufrací kapacity kmene s mutací MntH N401G a nemutované formy. Měření byla prováděna ve fosfát-citrátovém pufru o pH 4,7; 5,0; 5,3 a 5,7. Průměrné hodnoty uvádí *tabulka 5*.

tabulka 5: Průměrné hodnoty vnitrobuněčného pH a pufrací kapacity pro kmen bakterií s mutantem MntH N401G

pH	pH₀	ΔpH₀	β [mM]	Δβ [mM]
4,7	6,64	0,14	28	3
5	7,97	0,07	71	5
5,3	8,00	0,10	77	4

Jednobodová mutace MntH N401G značně ovlivňuje nastavení cytosolického pH v bakteriích ve vnějším pH 4,7 (*obr. 13*). Oproti kmeni s divokým typem proteinu MntH je vnitřní pH o 1,06 jednotek nižší. V pH 5,0 a 5,3 se data v rámci chyby shodují. Data naměřená v pH 5,7 představují extrapolaci nad změřenou kalibrační křivku a je tedy potřeba je brát jenom jako (spodní) odhad.



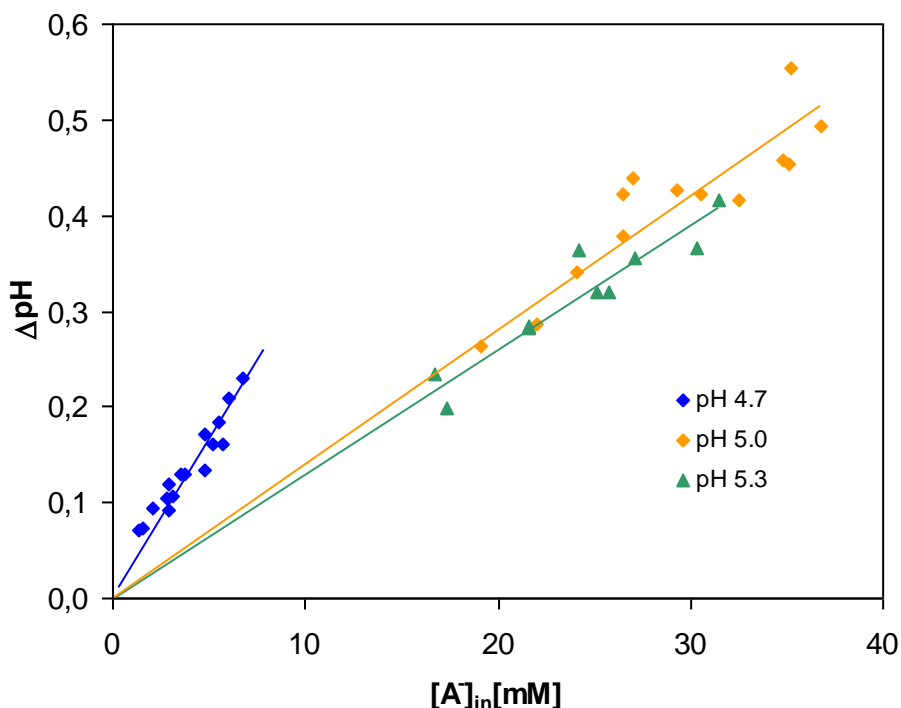
Obrázek 13: Srovnání průměrných hodnot cytosolických pH_0 pro kmen s divokým typem MntH a kmene s jednobodovou mutací MntH N4014G v závislosti na vnějším pH_{ex} . Pro mutovaný kmen pocházejí výsledky ze tří kultivací v pH 4,7 a ze dvou kultivací pro pH 5,0; 5,3 a 5,7. Přičemž v pH 5,7 je potřeba brát data jen jako odhad, protože jde o extrapolaci nad změřenou kalibrační křivku. Pro divoký typ viz obr. 8. Data byla spojena křivkou jen pro přehlednost, nejedná se o fit.

Pufrační kapacita byla měřena opět pomocí kyseliny propanové, použité koncentrace v rozmezí 67-220 μ M. Koncentrace disociované kyseliny uvnitř buňky $[A^-]_{in}$ je úměrná ΔpH , konstantou úměrnosti je převrácená hodnota pufrační kapacity (obr. 14). Hodnoty jsou v tabulce 5 a porovnání s kmenem s divokým typem MntH na obr. 15. Pufrační kapacita se shoduje s profilem pro vnitřní pH. Je tedy nižší v pH 4,7 pro ostatní měřená pH se v rámci chyby neliší.

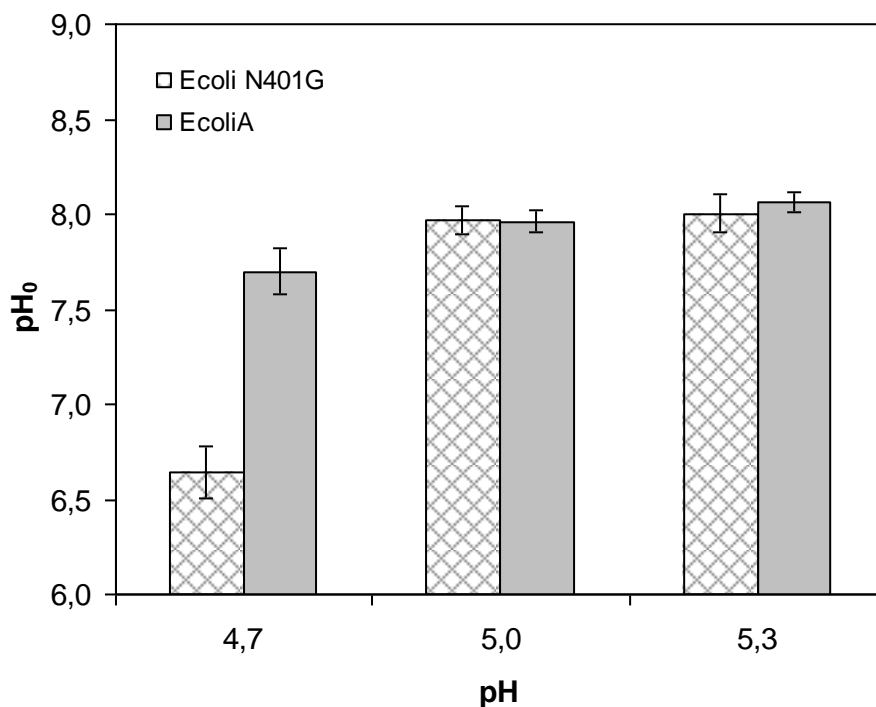
Změřená pufrační kapacita pro kmen N401G byla použita pro kalibraci změřeného kadmíem indukovaného transportu (kapitola 3.3.3). Jedno z možných vysvětlení porušené regulace vnitřního pH u mutace N401G (v nepřítomnosti dvojmocných kovů) je, že u této mutace MntH došlo k rozpražení transportu protonů od transportu kovů. Tento jev byl popsán u MntH variant u kvasinek, kde se zřejmě uplatňuje v ochraně před transportem příliš velkého množství kovů (ve velkých koncentracích toxických) za podmínek nepřiměřeně velké

protonmotivní síly (29). Vzhledem k tomu, že u bakterií zatím neexistuje metoda, jak měřit stechiometrii transportu H^+ /kov, nelze nyní tuto hypotézu dokázat.

Z našich výsledků není možné jednoznačně určit důvod, proč je pufrací kapacita kmene s N401G mutací v pH 4,7 menší - jsou možné dvě příčiny: i) celkově nižší pH cytosolu, tak nízké pH se nám nepodařilo pozorovat u kontrolního kmene (*obr. 11*) ii) účast vlastního proteinu MntH N401G, pokud je schopen fungovat jako protonový kanál.



Obrázek 14: Závislost změny pH_{in} na množství protonů přenesených do cytosolu u kmene exprimujícího MntH N401G. Směrnice přímek odpovídá převrácené hodnotě pufrací kapacity. Data pocházejí ze 3 kultivací v pH 4,7 a 3 kultivací v pH 5,0 a 5,3. Důvod pro rozdílné oblasti hodnot $[A^-]_{in}$ je v rozdílném počátečním pH - použité koncentrace kys. propanové byly stejné. Vyšších hodnot $[A^-]_{in}$ by bylo možné dosáhnout pro pH 4.7 jen za cenu podstatného zvýšení množství přidávané kyseliny.



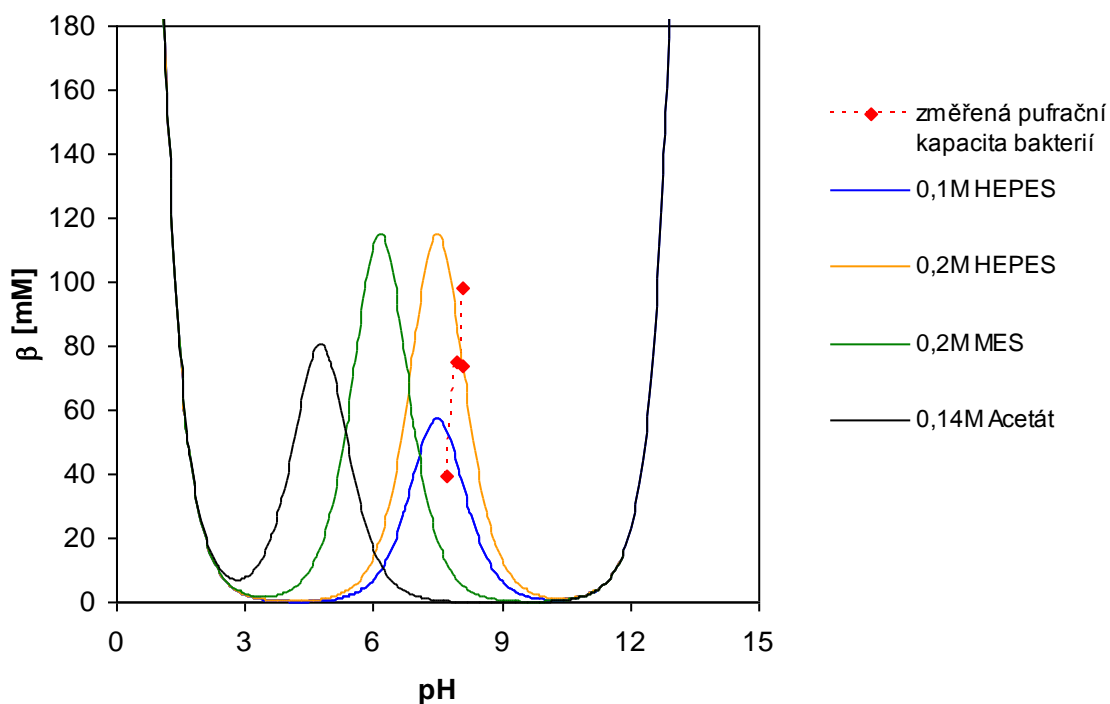
Obrázek 15: Srovnání průměrných hodnot pufrací kapacity pro nemutovaný MntH a jednobodovou mutaci N401G. Pro stanovení shodnosti dat v jednotlivých vnějších pH byl použit Studentův t-test a určena hladina významnosti p : hodnoty vycházejí nad hranici významnosti (5%) v pH 5,0 ($p=7\%$) a pH 5,3 ($p=25\%$) a lze je tedy podle tohoto srovnání považovat za shodná, hodnoty v pH 4,7 se liší ($p<0,01\%$)

3.2.2 Porovnání pufrací kapacity s publikovanými výsledky

Ačkoliv je velice pravděpodobné, že na pufrování cytosolického pH se podílí více látek, je zajímavé srovnat změřenou pufrací kapacitu bakterií s hodnotami pufrací kapacity standardně užívaných pufrů (obr. 16), kterou lze teoreticky spočítat (38) dle vzorce

$$\beta = 2,303 \left(\frac{K_w}{[H^+]} + [H^+] + \frac{c_{buf} K_a [H^+]}{(K_a + [H^+])^2} \right) \quad (17)$$

kde K_w značí ionizační konstantu vody, K_a je disociační konstanta, c_{buf} označuje koncentraci pufru. Pufrování je zhruba stejně silné jako pro pufrы s pK_a kolem 9 o koncentracích 0,1-0,2mM.



Obrázek 16: Teoreticky spočítaná pufrací kapacita pro běžně užívané pufrý, srovnání s naměřenou hodnotou.

Existuje jen několik studií zabývajících se pufrací kapacitou *E. coli*, využívány byly různé metody (viz kapitola 1.5.2.). Publikované hodnoty pufrací kapacity bakterií v (30;31) jsou udávány jako počet molů protonů na jednotku pH na mg proteinu. K porovnání hodnot musely být námi používané jednotky (koncentrace protonů na jednotku pH) přepočteny. Podle dat zveřejněných na CCDB (CyberCell Database) (39) lze určit přibližný obsah proteinů v buňce *E. coli* ($2 \cdot 10^{-6}$ mg). V našem případě, máme-li v kyvetě se 3ml buněčné suspenze při OD 0,2 obsah proteinu $0,18 \pm 0,06$ mg (určeno Lowryho metodou dle (32)) pak počet buněk v kyvetě je $9 \cdot 10^8$, což znásobené objemem bakterie udává celkový objem buněk ($9 \cdot 10^{-7}$ l). Vynásobením námi určené pufrací kapacity celkovým objemem buněk a podělením obsahem proteinu v kyvetě dostáváme pufrací kapacitu v požadovaných jednotkách (tabulka 6).

tabulka 6: Přibližné přepočítání hodnot pufrací kapacity pro jednotlivá pH

pH	β [mM]	β [nmol H ⁺ /pH/mg proteinu]
4,7	39	195
5,0	75	375
5,3	74	375
5,7	98	490

S publikovanými daty (30;31) se hodnoty řádově shodují, zatímco závislost na vnějším pH_{ex} nikoli. Měřili jsem ovšem pouze v malém intervalu pH_{ex} a úplně jinou metodou, takže přímé porovnání s jinými metodami (kde detaily měření neznáme) je obtížné. Pro přepočítání jednotek vycházíme pouze z odhadů (obsah proteinu, objem bakterie, počet buněk), takže je třeba ho brát pouze jako odhad.

3.3 Kvantifikace kovem indukovaného transportu protonů

Jedním z cílů práce bylo srovnat různé způsoby vyhodnocení transportu protonů detekovaného pomocí změn vnitrobuněčného pH. Sledovali jsme proto transport protonů proteinem MntH indukovaný kovem pomocí měření změn vnitrobuněčného pH bakterií tak, jak je popsáno v kapitole 2.4. Dívali jsme se jak na vliv koncentrace různých kovů na změnu koncentrace protonů uvnitř buňky, tak na ovlivnění transportu vnějším pH. V další fázi nás zajímal vliv přítomnosti transportovaných kovů na pufrací kapacitu.

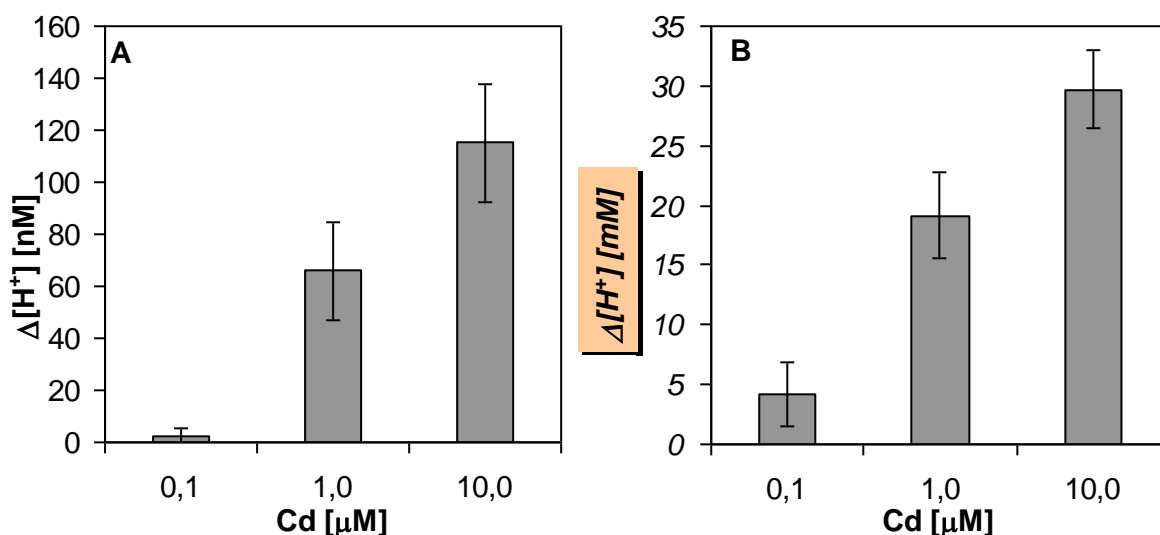
3.3.1 Závislost transportu protonů na koncentraci kovu

Cílem této práce bylo použít změřenou pufrací kapacitu pro kvantifikaci transportu protonů proteinem MntH. Do této doby byl používán postup (5;16), při kterém se transport protonů proteinem MntH určuje tak, že se po změření počátečního pH přidá k suspenzi buněk kov a za stálého míchání se vzorek nechá definovanou dobu inkubovat (většinou 1000s), aby byl poté změřen pokles pH_{in} , ze kterého je určena změna koncentrace protonů uvnitř buňky (*obr. 17A*) jako

$$\Delta[H^+] = 10^{-pH_i} - 10^{-pH_0} \quad (18)$$

V tomto zpracování se jedná o celkovou změnu koncentrace protonů, která ale neodpovídá množství transportovaných protonů. Pokud vezmeme v úvahu pufrací kapacitu (změřenou v kapitole 3.2) která se snaží změny koncentrace protonů kompenzovat, můžeme se pokusit o nový způsob přepočtu změn koncentrace protonů a to pomocí znalosti změny pH_{in} a pufrací kapacity. Data přepočtená přes pufrací kapacitu užitím $\Delta[H^+] = v\Delta t$ ukazuje *obr. 17B*. Toto platí pro dva zjednodušující předpoklady: i) předpoklad konstantní rychlosti transportu (viz výše) ii) předpoklad pouze "okamžité" složky pufrací kapacity. Ten zřejmě

není vždy splněn - v některých případech jsme při jejím měření pozorovali po skokové změně pomalý návrat k nové rovnovážné hodnotě pH. Pokud by se měl do rovnice 15 přidat tento vliv, musela by v integraci rovnice 14 vystupovat ještě konvoluce s funkcí popisující časový průběh pH_{in} po změně $\Delta[H^+]$ o dH (= v.dt). To by ovšem vše značně komplikovalo a pro takto detailní teoretický popis bychom pravděpodobně nebyli schopni získat vstupní parametry s dostatečnou přesností.



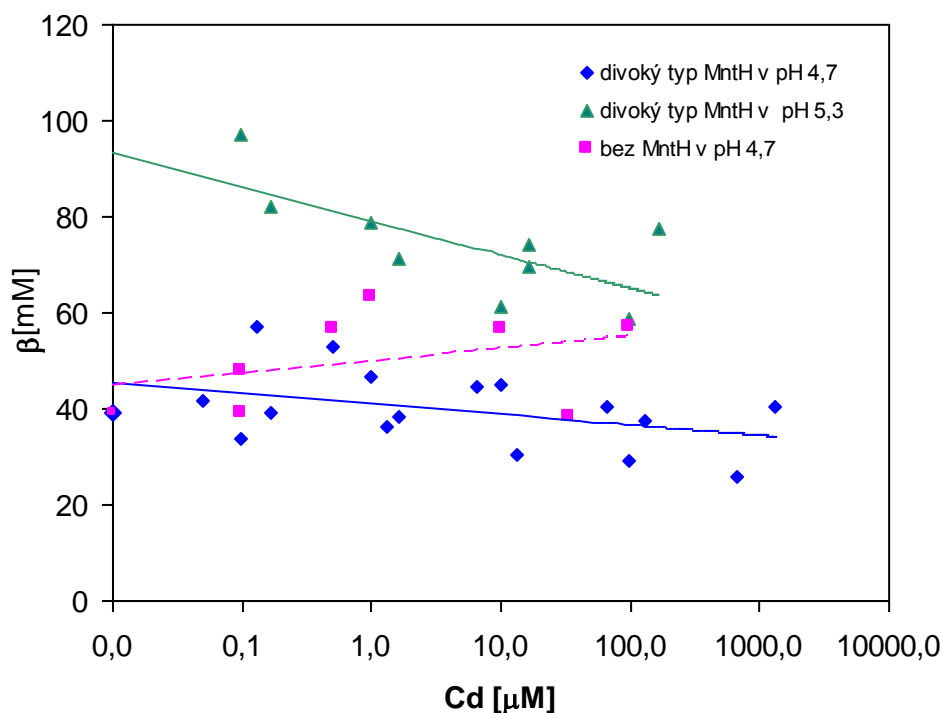
Obrázek 17: Změna koncentrace protonů indukovaná kadmiiem v citrát-fosfátovém pufru pH 4,7. Pro koncentrace kadmia 0,1 μM a 1 μM je zobrazen průměr $\Delta[H^+]$ ze čtyř kultivací, pro koncentraci 10 μM průměr ze dvou kultivací. (A) publikovaný způsob zpracování dat. (B) nový způsob přepočtu $\Delta[H^+]$ přes změnu pH_{in} a pufráční kapacitu (určenou v kapitole 3.2).

Mangan za těchto experimentálních podmínek měření nevyvolal žádný transport protonů, ačkoliv je zřejmě transportován podle (16) kde se porovnával transport indukovaný kadmiiem a manganem jak na základě změny koncentrace protonů uvnitř buňky, tak na základě změny koncentrace kovu. Podle (16) tedy indukuje mangan uvnitř buňky výrazně menší změnu koncentrace protonů než je tomu u kadmia a není tedy za daných experimentálních podmínek (pH 4.7) metodou užívající pHluorin příliš viditelný.

Předpokládali jsme, že důvodem, proč je metoda více citlivá pro kadmium než pro mangan (nebo některé další dvojmocné kovy jako zinek, kobalt, železo), by mohla být toxicita kadmia. Kadmium způsobuje v buňkách oxidativní stres (33) – čili stav, kdy dojde k narušení redoxní rovnováhy v buňce – což je příčinou jeho toxicity. Není vyloučen ani vliv na dýchací řetězec, protože to je sled redoxních reakcí (34).

3.3.2 Vliv kovů na puфраční kapacitu

V předchozí kapitole byla použita hodnota puфраční kapacity změřená na buňkách bez inkubace s kovem. Je však možné, že kadmium samo ovlivňuje puфраční kapacitu poté, co vstoupí do buňky. Tuto hypotézu jsme chtěli ověřit. Pro měření puфраční kapacity byl zvolen stejný postup jako v kapitole 3.2, s tím rozdílem, že kyselina propanová (používaná koncentrace 179 μM) byla ke vzorku přidána až po 1000s trvající inkubaci s kovem (tedy v okamžiku, ve kterém byl měřen transport) – obr. 18.

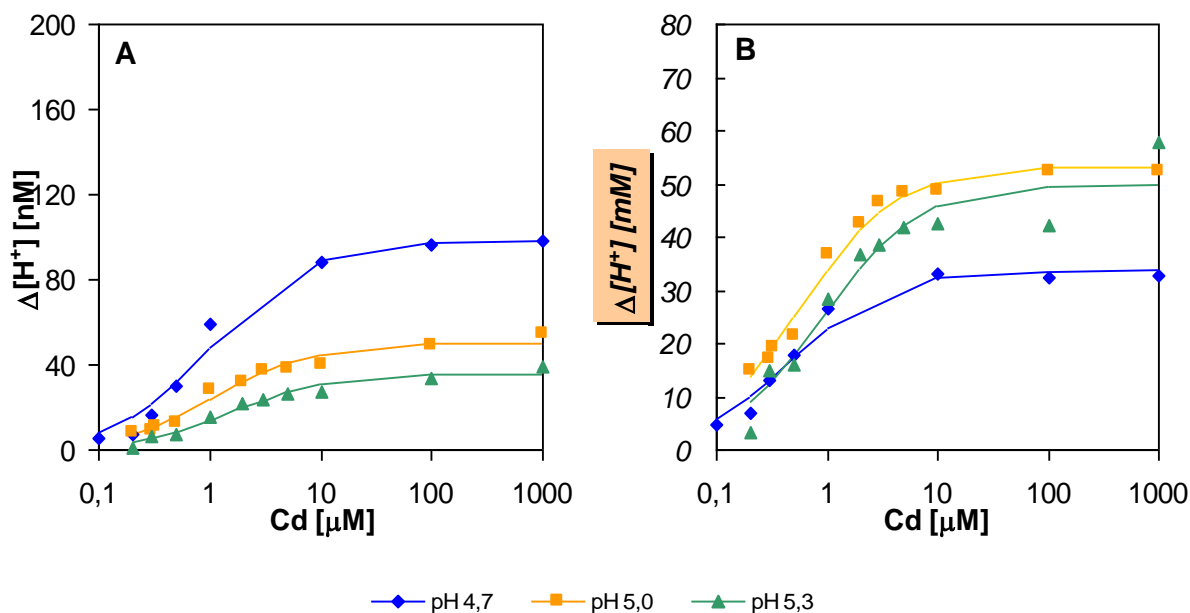


Obrázek 18: Puфраční kapacita v závislosti na koncentraci kadmia. Měřeno v 1000s po přidání kadmia, pomocí 179 μM kyseliny propanové. Data pocházejí ze sedmi kultivací v pH 4,7 a pro body odpovídající jedné koncentraci kovu je zobrazena průměrná hodnota puфраční kapacity. V pH 5,3 jsou data ze dvou kultivací. Bakteriální kmen bez proteinu MntH byl měřen z jedné kultivace.

Mírně klesající závislost puфраční kapacity na koncentraci kadmia ve vzorku (obr. 18) znamená, že buňka se v přítomnosti Cd hůře vyrovnává s transportovanými protony. Toto by mohlo souviset právě s toxicitou kadmia a jeho případným vlivem na dýchací řetězec. Závislost ale není příliš výrazná a zdá se, že nevysvětluje plně rozdíl mezi změnami pH_{in} indukovanými přidáním kadmia a manganu.

3.3.3 Srovnání dvou způsobů zpracování dat

Změřená pufrací kapacita byla použita pro přepočítání hodnot transportu protonů z dříve naměřených dat. Na obr. 19 jsou znázorněny získané hodnoty pro divoký typ proteinu MntH podle původního zpracování $\Delta[H^+]$ (A) podle rovnice 18 a nového zpracování $\Delta[H^+]$ (B) podle rovnice 12.



Obrázek 19: Kinetika transportu pro bakteriální kmen s divokým typem proteinu MntH. Měření transportu probíhala v citrát-fosfátovém pufru o třech pH (4,7; 5,0; 5,7). Dříve naměřená data byla zpracována jak z určení změny koncentrace protonů ze změny pH_{in} (A), tak přepočtem přes pufrací kapacitu (B). Fit proveden podle rovnice Michaelise a Mentenové (rovnice 19).

Při přepočtu byly použity průměrné hodnoty pufrací kapacity stanovené v kapitole 3.2 (tabulka 3). Zvyšující se koncentrace kovu sice způsobuje její mírný pokles (obr. 18), ale jak bylo ověřeno, ten má na přepočet kinetiky s protony jen minimální vliv. Pufrací kapacita tedy byla brána konstantní a vliv kovu byl zanedbán.

Díky závislosti pufrací kapacity na vnějším pH_{ex} se vzájemné velikosti transportu změní a pro pH 4,7 jsou hodnoty transportu protonů nejnižší. Znamená to, že vyšší pufrací kapacita umí lépe udržet hodnotu vnitřního pH_{in} , a tak jsou přitekly protony více kompenzovány. Změna v koncentraci protonů, kterou pozorujeme při standardním způsobu zpracování je tedy nižší ve vyšších pH, ale skutečné množství transportovaných protonů (s ohledem na pufrací kapacitu) je vlastně vyšší právě ve vyšších pH.

Změřený transport je možné v prvním přiblížení popsat rovnicí Michaelise a Mentenové

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (19)$$

používané pro popis enzymové kinetiky (35). Zde se místo enzymové reakce substrát \rightarrow produkt jedná o reakci substrát-vně \rightarrow substrát-uvnitř. $[S]$ značí koncentraci substrátu (v našem případě kovu), v resp. v_{\max} značí rychlost resp. maximální rychlost transportu (v našem případě odpovídá změně koncentrace protonů $\Delta[H^+]$ v buňce), K_m je Michaelisova konstanta a je rovna koncentraci substrátu při poloviční v_{\max} . Rovnice (20) lze tedy pro transport přes membránu přepsat do tvaru

$$\Delta[H^+] = \frac{\Delta[H^+]_{\max} [kov]}{K_m + [kov]} \quad (20)$$

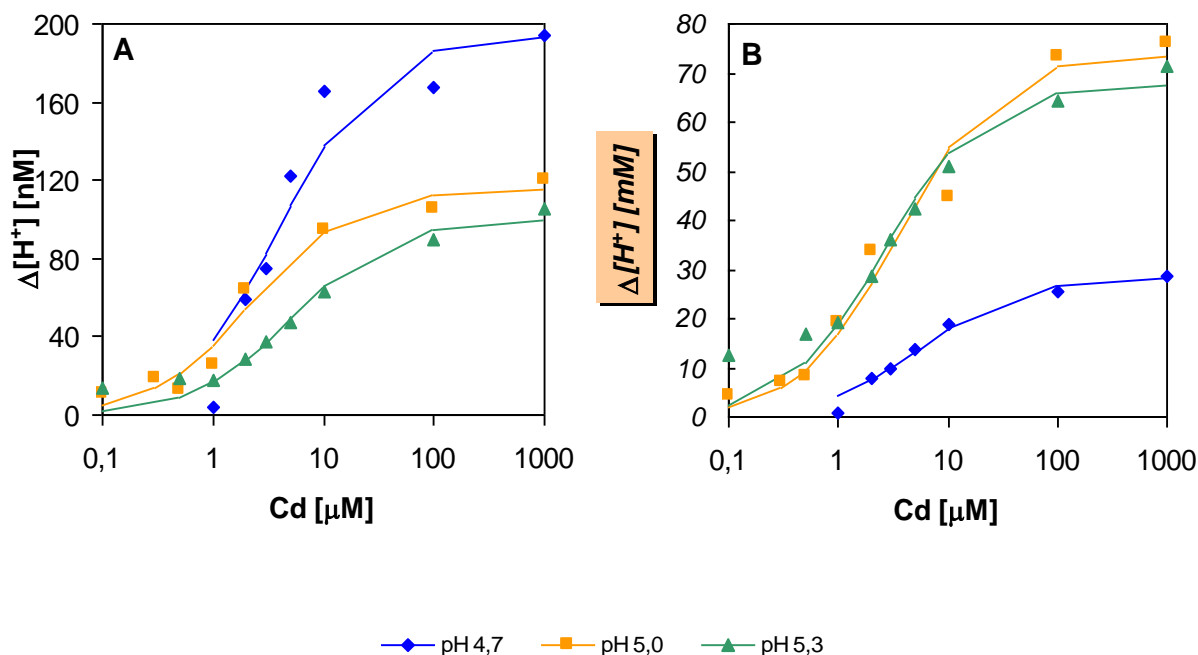
Bez hlubší analýzy a přesné kvantifikace však není možné přesně interpretovat změřené konstanty a mechanismus může být ve skutečnosti podstatně složitější², je tak ale možné alespoň hrubě srovnávat transport za různých podmínek (nebo např. různé mutace transportéru).

Hodnoty K_m pro oba typy zpracování uvádí *tabulka 7*. Jak je vidět, při kvantifikaci transportu pomocí pufrální kapacity vychází tyto hodnoty pro divoký typ proteinu MntH menší. Zdá se tedy, že tento parametr je na způsob zpracování dat citlivý.

tabulka 7: Hodnoty K_m pro dvě zpracování dat a dva typy proteinů MntH. ΔK_m značí směrodatnou odchylku fitu.

protein	zpracování	pH 4,7		pH 5,0		pH 5,3	
		K_m [μ M]	ΔK_m [μ M]	K_m [μ M]	ΔK_m [μ M]	K_m [μ M]	ΔK_m [μ M]
divoký typ	standardní	1,05	0,18	1,16	0,17	1,62	0,26
MntH	přes β	0,47	0,07	0,57	0,05	0,90	0,22
mutace	standardní	4,03	1,25	2,26	0,45	5,11	0,91
MntH N401G	přes β	5,74	0,96	3,38	0,78	2,57	0,48

² V našem případě se další nepřesnosti dopouštíme tím, že neměříme počáteční rychlost transportu, ale stav pH_{in} po 1000 s.



Obrázek 20: Kinetika transportu měřena na bakteriálním kmeni s mutací MntH N401G v citrát-fosfátovém pufru o třech pH (4,7; 5,0; 5,7). Data byla v laboratoři naměřena dříve a poskytnuta pro srovnání standardního zpracování (A) a přepočtu přes pufrací kapacit (B). Fit podle rovnice Michaelise a Mentenové (rovnice 19).

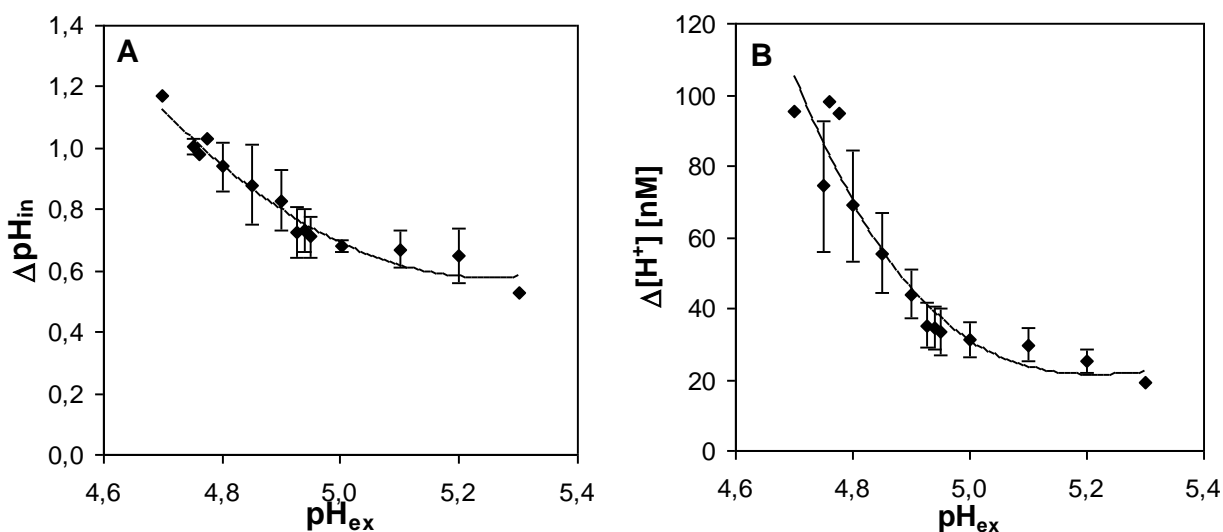
Srovnání obou typů zpracování transportu byla provedena i pro mutaci MntH N401G (obr. 20). Trend transportu protonů po přepočtu přes pufrací kapacitu je stejný jako pro divoký typ MntH. I zde došlo k poklesu hodnoty $\Delta[H^+]$ v pH 4,7 oproti dvěma vyšším pH. Maximální hodnoty $\Delta[H^+]$ jsou vyšší pro mutovanou formu, K_m roste (tabulka 7) a to v obou případech zpracování.

Je tedy vidět, že způsob zpracování může ovlivnit podstatně výsledky (a to jak rychlost transportu, tak jeho K_m) hlavně tam, kde srovnáváme transport, který začal při různých hodnotách vnitřního pH_{in} - ať už při srovnávání různých mutantů MntH, nebo při závislosti na vnějším pH (které ovlivňuje hodnotu pH_{in}).

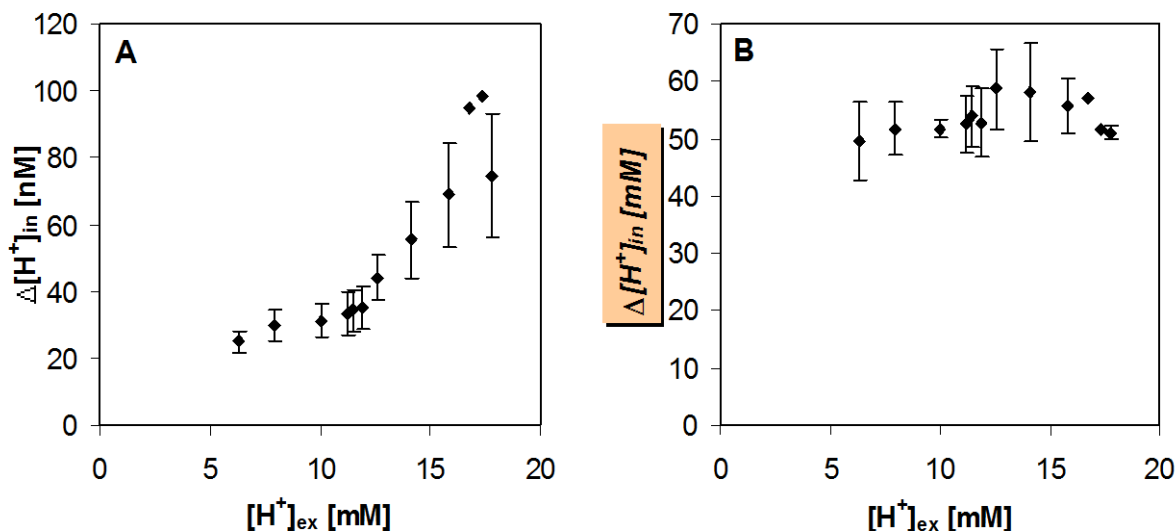
Mutant N401G je v této souvislosti zajímavý ještě v jednom ohledu - jak bylo diskutováno v kapitole 3.2.1, je teoreticky možné, že se přímo podílí na snížené pufrací kapacitě v pH 4.7 tím, že je schopen transportovat protony bez účasti kovu (tj. v rozpřaženém stavu). Potom by ovšem změřený transport $\Delta[H^+]$ zohledňoval jen tu část transportovaných protonů, která je spřažena s transportem kovu (odpřažená část by byla zahrnuta v pufrací kapacitě).

3.3.4 pH závislost transportu

Kadmiem indukovaný transport u kmene exprimujícího divoký typ MntH byl dále proměřen podrobně v závislosti na vnějším pH v rozmezí 4,7 – 5,3 (obr. 21). Podle (29) lze Kinetiku Michaelise a Mentenove aplikovat také pro závislost na koncentraci protonů (v našem případě pH_{ex}) jako substrátu (obr. 22). Podle standardního způsobu zpracování (obr. 22A) nebyla pozorována ani tendence k dosažení saturace a přepočítání $\Delta[\text{H}^+]$ přes pufracní kapacitu jsou hodnoty víceméně nezávislé na vnějším pH (obr. 22B) a je tedy možné, že vidíme oblast saturace. Způsob zpracování tedy výrazně ovlivňuje změřenou závislost. Přepočet hodnot pufracní kapacity v jednotlivých pH_{ex} byl však určován z velice přibližného fitu závislosti pufracní kapacity na pH_{ex} (podle polynomu třetího stupně). Je také potřeba brát v úvahu, že role pH je komplexnější, a jeho hodnotu nelze redukovat na pouhou koncentraci substrátu.

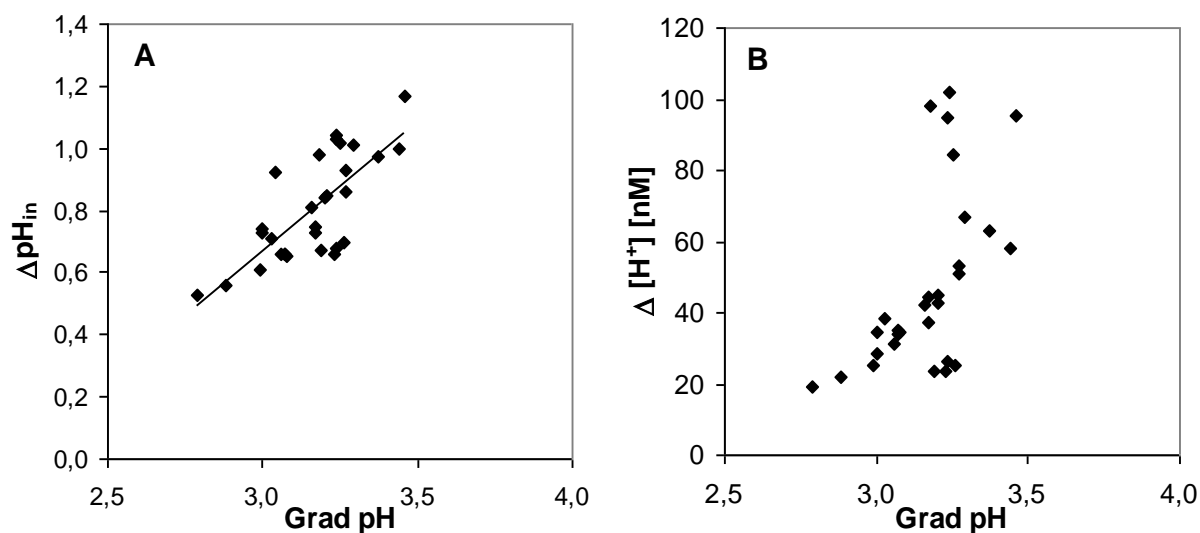


Obrázek 21: Průměrné hodnoty $\Delta\text{pH}_{\text{in}}$ (A) a $\Delta[\text{H}^+]$ (B) v závislosti na pH_{ex} pufru byly spočteny ze tří experimentů. Změna $\Delta[\text{H}^+]$ v nižších pH je v porovnání s ΔpH výraznější vlivem logaritmické závislosti koncentrace protonů na pH. (A) hodnoty jsou proloženy kvadratickou křivkou, hodnota spolehlivosti fitu je 0,95 (B) data jsou proložena polynomem třetího stupně, hodnota spolehlivosti fitu je 0,91



Obrázek 22: Kinetika transportu v citrát-fosfátovém pufru, pH 4,7 v závislosti na koncentraci protonů (pH_{ex}). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty ze tří kultivací. V případě standardního zpracování dat (A) nebyla pozorována žádná saturace. (B) Pro data zpracována druhým způsobem (přepočít přes pufráční kapacitu) je saturace pozorována.

U bakterií je hnací silou transportu elektrochemický protonový gradient (protonmotivní síla), který je tvořen membránovým potenciálem a gradientem pH přes membránu. Membránový potenciál neznáme, stejně je ale zajímavé podívat se na závislost změny pH v bakteriích ΔpH_{in} a změny koncentrace protonů $\Delta[H^+]$ na gradientu pH přes membránu (obr. 23).



Obrázek 23: Zvětšení gradientu pH přes membránu (zvětšení hnací síly transportu) má za následek větší změny ΔpH_{in} (A) resp. $\Delta[H^+]$ (B). Ke všem vzorkům bylo přidáváno $100\mu M$ kadmium, délka inkubace byla 1000s. Zobrazené hodnoty pocházejí ze tří kultivací.

Skupina pěti bodů na *obr. 23B*, pro které není závislost lineární a hodnoty $\Delta[\text{H}^+]$ jsou nad 80nM odpovídá vzorkům inkubovaných v pH 4,7 – pH 4,8 tedy nejnižším použitým hodnotám pH pufru. V těchto nízkých hodnotách pH jsou také nejnižší hodnoty pH_{in} (a v jednom z pokusů byly nižší, než ve zbylých dvou). Projevuje se zde vliv logaritmické závislosti koncentrace protonů na pH (rovnice 9). Díky tomu se pro stejnou změnu v jednotkách pH bude po přepočítání lišit změna koncentrace protonů v závislosti na tom, z jakého počátečního pH_{in} tento skok proběhl. Srovnáme-li analogickou závislost $\Delta\text{pH}_{\text{in}}$ (*obr. 21A*) a $\Delta[\text{H}^+]$ (*obr. 21B*) na vnějším pH pozorujeme pro $\Delta[\text{H}^+]$ strmější závislost než pro $\Delta\text{pH}_{\text{in}}$. V nižších pH se tedy změny koncentrace protonů projeví pro stejnou hodnotu změny pH_{in} markantněji než ve vyšších pH.

3.4 Inhibice dýchacího řetězce bakterií

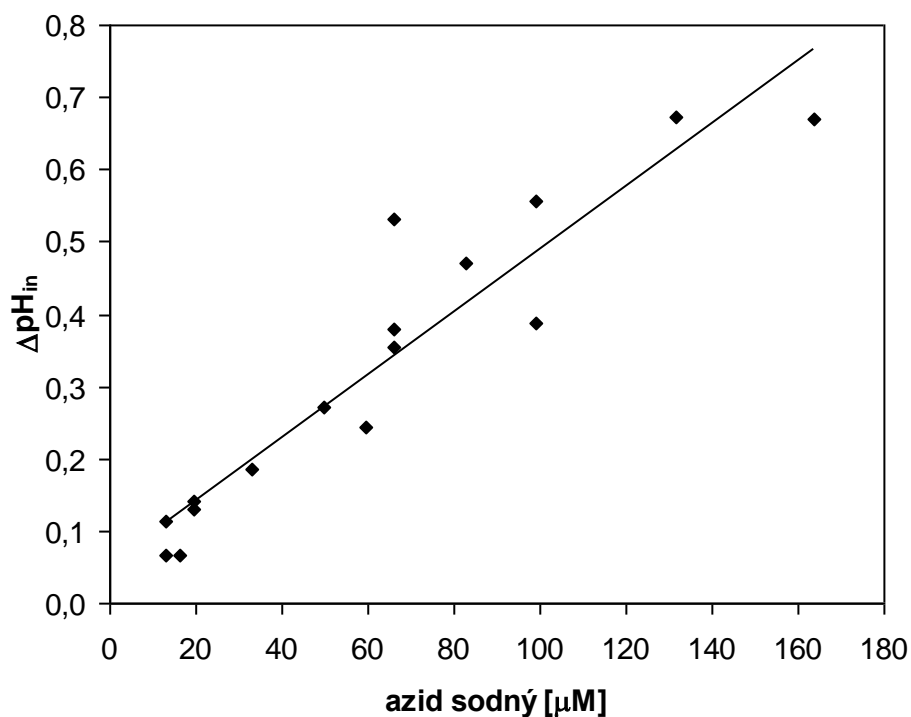
Možný vliv kadmia na dýchací řetězec nás přivedl na myšlenku imitovat vliv kadmia u méně toxických kovů tak, že oslabíme vliv dýchacího řetězce pomocí inhibitorů. Tím bychom alespoň částečně kompenzovali vliv tohoto mechanismu na změny vnitrobuněčného pH jak je popsáno v kapitole 1.4 a kovem indukovaný transport protonů by mohl být snáze měřitelný i v případě manganu (případně dalších kovů).

Pro inhibici dýchacího řetězce byl použit azid sodný (NaN_3) a kyanid draselný (KCN). Bohužel daný postup má též významnou nevýhodu - samy inhibitory dýchacího řetězce ovlivňují vnitrobuněčné pH. Protože námi sledovaný transport závisí na protonmotivní síle (kterou dýchací řetězec tvoří), nesmí být dýchací řetězec inhibován úplně. Bylo tedy třeba nejdříve stanovit vliv inhibitorů na pH_{in} a najít jejich vhodné koncentrace.

Provedli jsme také několik pokusů s DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide), což je inhibitor bakteriální H^+ -ATPázy (která může za určitých podmínek přispívat k tvorbě protonmotivní síly při současném štěpení ATP), ale nepozorovali jsme ani vliv na vnitřní pH, ani vliv na velikost transportu protonů.

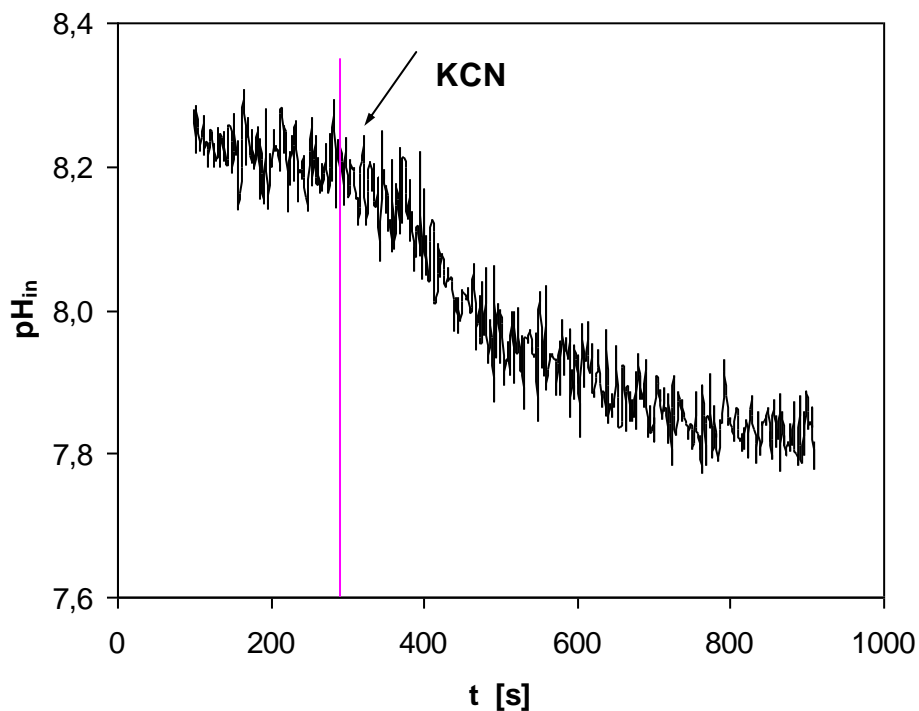
3.4.1 Vliv inhibitorů na vnitřní pH v bakteriích

Jelikož azid sodný je sám o sobě slabá kyselina, docházelo při jeho přidání k bakteriím ke skokovému poklesu pH stejně jako při použití kyselin octové, mravenčí a propanové v kapitole 3.1.1. Závislost změny pH_{in} na koncentraci azidu je znázorněna na obr. 24.



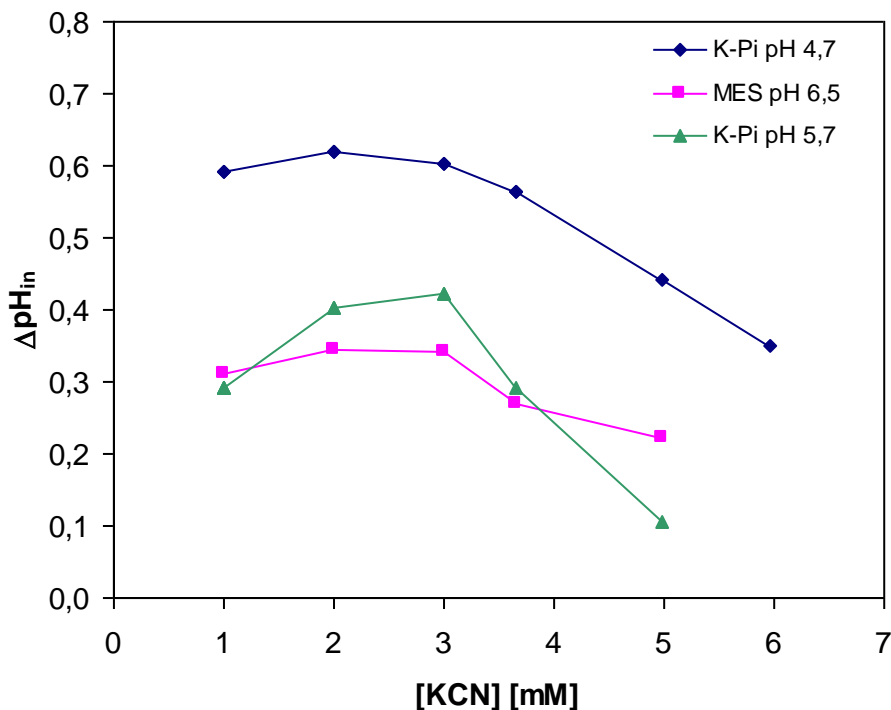
Obrázek 24: Pokles vnitřního pH_{in} způsobený přidáním azidu sodného byl měřen po 1,5min trvající inkubaci. Hodnoty jsou ze čtyř kultivací, měřeno v citrát fosfátovém pufru pH 4,7.

Kyanid draselný také ovlivňoval vnitřní pH, jeho změny ale měly pomalejší průběh (obr. 25).



Obrázek 25: Ukázka průběhu poklesu vnitřního pH_{in} v bakteriích přidáním 1mM kyanidu draselného. Vzorek měřen v citrát-fosfátovém pufru o pH 5,7 po dobu 10min od přidání KCN, přibližně po 400s s inhibitorem zůstává pH_{in} konstantní.

Pokles vnitřního pH v závislosti na koncentraci kyanidu (obr. 26) byl měřen po pětiminutové inkubaci s tímto inhibitorem.

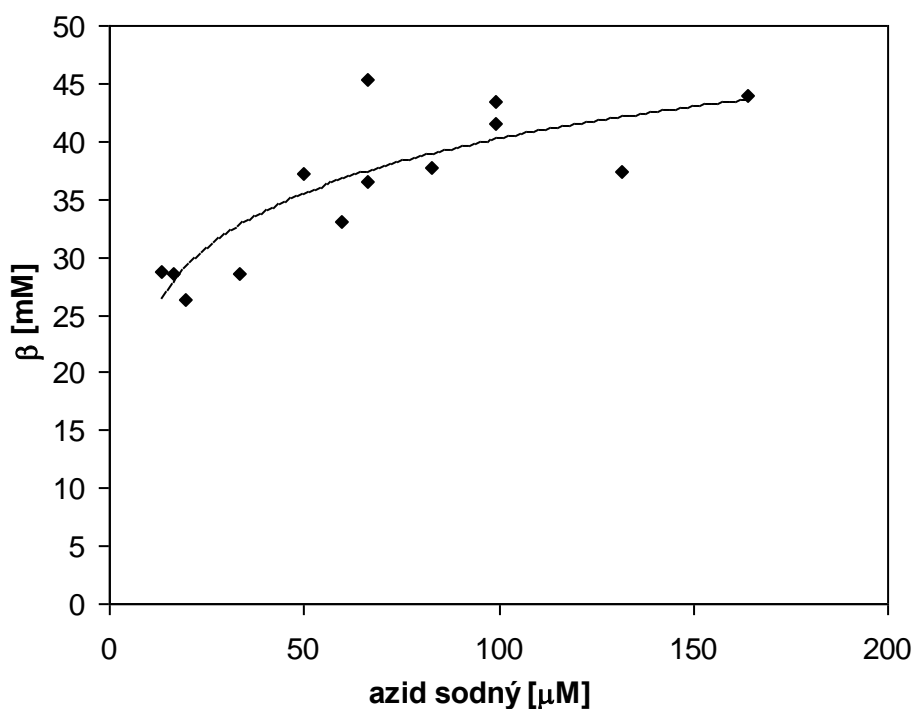


Obrázek 26: Pokles vnitřního pH_{in} způsobený přidáním kyanidu draselného. K-Pi značí fosfát-citrátový pufr. V pH 4,7 byl pokles pH pro každou hodnotu změřen dvakrát z jedné kultivace bakterií, zobrazena je průměrná hodnota. V pH 5,7 je zobrazen průměr ΔpH_{in} ze dvou kultivací. Data pro pH 6,5 pocházejí z jednoho experimentu, pufr MES-Na 0,1M; 30mM KCl

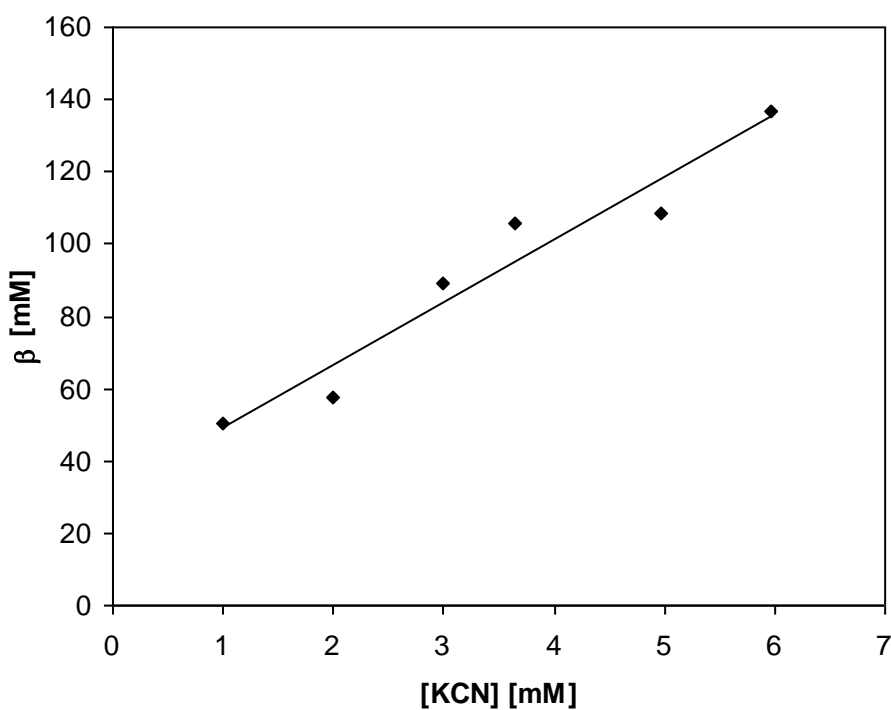
Pro další měření se ukázaly jako vhodné koncentrace azidu do $180\mu\text{M}$. Vyšší koncentrace totiž příliš sníží pH_{in} , často až na hranici citlivosti pHluorinu. Pro kyanid se zdála nejvhodnější koncentrace 1mM, při které je ještě možné měřit transport sekundárně aktivními transportéry (podobně jako v (20)). Při vyšších koncentracích sice pH_{in} po 5 minutách klesne méně, klesá ale (jako na obr. 25) delší dobu a nakonec také dosahuje příliš nízkých hodnot.

3.4.2 Vliv inhibitorů na pufráční kapacitu

Pufráční kapacita byla proměřena výše popsáním postupem pro různé koncentrace azidu sodného (po 90s inkubaci) a kyanidu draselného (po 5 min inkubaci).



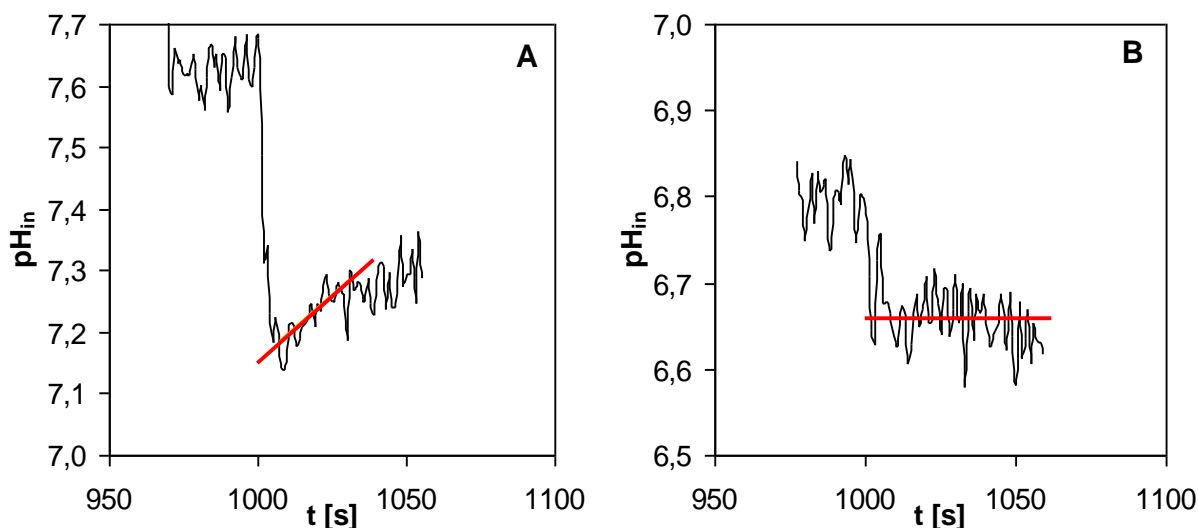
Obrázek 27: Závislost pufrální kapacity na azidu sodném, měřeno v citrát-fosfátový pufru pH 4,7. Pufrální kapacita měřena užitím $179\mu\text{M}$ kyseliny propanové po 1,5min inkubaci s azidem sodným. Data pocházejí ze čtyř kultivací.



Obrázek 28: Závislost pufrální kapacity na kyanidu draselné. Pufrální kapacita měřena pomocí $179\mu\text{M}$ kyseliny propanové po 5min inkubaci vzorku s kyanidem draselným. Data pocházejí z jedné kultivace, použit citrát-fosfátový pufr pH 4,7.

Předpokládali jsme, že inhibicí dýchacího řetězce dojde k omezení výtoku protonů z buňky. Buňka pak bude obtížněji kompenzovat narůstající koncentraci protonů a pufrací kapacita by se tedy měla snižovat. Jak je patrné z *obr. 27* a *obr. 28* a tento předpoklad se ani pro azid ani pro kyanid nepotvrdil.

Možným vysvětlením by bylo, že inhibitory neovlivní pufrací kapacitu hned, ale až v delších časech. Když byl pozorován skok pH po přidání kyseliny propanové ke vzorku s kovem (v 1000s po přidání kovu) povšimli jsme si návratu pH_{in} v závislosti na koncentraci kadmia. Při nižších koncentracích kadmia (přibližně do $1\mu M$) začne pH po přidání kyseliny znovu narůstat (*obr. 29A*) kdežto pro vyšší koncentrace kadmia než $1\mu M$ už návrat pH nepozorujeme (*obr. 29B*). Tento návrat by mohl odpovídat právě příspěvku dýchacího řetězce.



Obrázek 29: Ukázka průběhu pH_{in} po přidání $179\mu M$ kyseliny propanové ke vzorku inkubovaného 1000s s kadmíem (citrát-fosfátový pufr pH 4,7) (A) $0,13\mu M$ Cd, pozorujeme návrat pH_{in} (B) $662\mu M$ Cd, pH_{in} zůstává po skoku konstantní. Návrat pH pro nízké koncentrace kovu by mohl odpovídat příspěvku dýchacího řetězce, což se ale kvůli špatné reprodukovatelnosti experimentu nepodařilo přímo potvrdit. Navíc není možné provést oba experimenty při stejném výchozím pH_{in} , což dále ztěžuje interpretaci.

V dlouhých časech však byl při pozorování návratů pH problém s reprodukovatelností experimentů. Vystupuje zde řada faktorů, které se ani při dodržování stálého postupu kultivace bakterií a přípravy vzorků nepodařilo nastavit vždy na stejnou hodnotu, takže bylo obtížné provádět srovnání. Jedná se např. o různé počáteční pH v bakteriích, které dále může ovlivňovat rychlost transportu. U vyšších koncentrací kadmia navíc pH_{in} po 1000s klesne poměrně nízko, což samo o sobě může negativně ovlivnit životní funkce v buňce. Výsledky

v delších časech může ovlivnit také metabolizace propanové kyseliny, kterou nemůžeme vyloučit.

Pozorovaný vzrůst pufrací kapacity při částečné inhibici dýchacího řetězce má ještě jedno možné vysvětlení - počáteční pH při těchto měřeních byla nižší než u buněk bez použití inhibitoru. Je možné, že v těchto hodnotách vnitřního pH pufrací kapacita vzrůstá. Jak je ale poznamenáno v kapitole 3.2, je těžké provést kontrolní měření bez inhibice, protože buňky tak nízkého vnitřního pH samovolně nedosáhnou.

Ovlivnění okamžité pufrací kapacity inhibicí dýchacího řetězce nebylo prokázáno, v delších časech se nám nepodařilo reprodukovatelně změřit. Rozhodli jsem se zkusit inhibovat dýchací řetězec a sledovat jak bude ovlivněn transport protonů indukovaný kadmíem a především manganem, přičemž při interpretaci bylo třeba brát v úvahu omezení měření v delších časech.

3.4.3 Změny experimentálních podmínek

Cílem bylo najít takové experimentální podmínky, díky kterým by se zvýraznily rozdíly pHin při sledování transportu indukovaného netoxickými kovy jako je např. mangan.

Byly měněny různé parametry měření a sledován jejich vliv na transport protonů indukovaný kadmíem a manganem. Kromě částečné inhibice dýchacího řetězce byla též snižována koncentrace draslíku. Shrnutí testovaných experimentálních podmínek obsahuje *tabulka 8*.

tabulka 8: Shrnutí vlivu změn experimentálních podmínek na transport protonů indukovaný Cd a Mn. Transport byl měřen v 1000s po přidání kovu. K-Pi značí citrát-fosfátový pufr. V pufru MES-Na 0,1M byla pomocí KCl nastavena koncentrace draslíku.

Experiment	pufr	pH	KCl	inhibitor	koncentrace inhib. [μ M]	inkubace s inhibitorem	kov	transport v $\Delta[H^+]$
1	K-Pi	4,7		azid	20	1,5min	Cd	stejně jako bez inhibitoru
2	K-Pi	4,7		azid	66	1,5min	Cd	cela křivka transportu posunuta k vyšším hodnotám
3	MES	5,5	30mM	azid	66	1,5min	Cd	přibližně 2x větší hodnoty oproti kontrole bez azidu
4	MES	5,5	5mM	KCN	1000	7min	Cd	s KCN netransportuje, kontrola ano, ale malé hodnoty
5	MES	5,5	30mM	KCN	1000	1min	Cd	transport s KCN srovnatelný s kontrolou bez KCN
6	K-Pi	5,7		KCN	1000	7min	Cd	netransportuje
7	MES	6,5	15mM	azid	66	1,5min	Cd	netransportuje
8	K-Pi	4,7		azid	66	1,5min	Mn	netransportuje
9	MES	5,5	30mM	azid	66	1,5min	Mn	netransportuje
10	MES	5,5	30mM	KCN	1000	1min	Mn	netransportuje
11	MES	5,5	5mM	KCN	1000	7min	Mn	netransportuje
12	K-Pi	5,7		KCN	1000	7min	Mn	netransportuje
13	MES	6,5	15mM	azid	66	1,5min	Mn	netransportuje

Kromě citrát-fosfátového pufru o různých pH jsme použili také pufr MES-Na 0,1M, který umožňuje definovaně nastavit koncentraci draslíku pomocí KCl. (Vliv draslíku zmiňuje kapitola 1.4). Předpoklad byl, že snížení koncentrace draselných iontů v pufru omezí iontový transport K^+/H^+ a protony nebudou moci být tolik odčerpávány z cytosolu.

Pro inhibici dýchacího řetězce jsme použili azid i kyanid. Pro 20 μ M azid odpovídají hodnoty změny koncentrace protonů indukované kadmiem transportu bez inhibitoru. Usoudili jsme proto, že při této koncentraci není inhibice dýchacího řetězce dostatečná a pro další měření jsme zvolili koncentraci vyšší (66 μ M).

Pro lepší zviditelnění transportu protonů indukovaného kadmiem se ukázaly jako nejvhodnější z použitých podmínek ty v experimentu č.3 viz *tabulka 8*. Oproti kontrole, kde nebyl použit inhibitor, došlo k přibližně dvojnásobnému zvýšení hodnoty $\Delta[H^+]$. Ukázalo se také, že pokud se bakteriím příliš sníží koncentrace draslíku (experiment č.4 v *tabulce 8*) transport je negativně ovlivněn. Důvodem je nejspíš nastavení nižšího pH_{in} (vlivem nízké koncentrace draslíku) než by byla optimální hodnota. Pro mangan se nepodařilo najít podmínky, za kterých bychom byli schopni transport lépe detekovat.

Závěrem je nutno poznamenat, že problematika vlivu inhibice dýchacího řetězce na pufrační kapacitu buněk je komplexnější, než jsme se původně domnívali, hlavně díky tomu, že inhibice ovlivní zároveň vnitřní pH buněk. Je dále možné, že aktivita dýchacího řetězce ovlivňuje spíše "pozdější fázi" pufování změn pH a tu není námi použitá metoda schopna uspokojivě změřit. Hledání příhodných podmínek pro měření transportu zprostředkovaného proteinem MntH ukázalo, že je třeba se pohybovat ve velice úzké oblasti, ve které je stále udržena dostatečná hnací síla pro transport (tj. protonmotivní síla) a vnitřní pH je v oblasti, ve které je stále možné měřit pomocí pHluorinu.

4 Závěr

Abychom se mohli pokusit o lepší kvantifikaci transportu protonů zprostředkovaného proteinem MntH, bylo třeba stanovit pufrální kapacitu bakterií. Byly odvozeny příslušné vztahy pro její počítání a zvolena metoda měření, která spočívá ve vystavení buňky působení slabých kyselin. Ty v nenabitě formě procházejí membránou a přenesou tak do cytosolu protony, čímž způsobí změnu vnitřního pH, která byla detekována užitím pHluorinu. Byly vyzkoušeny tři kyseliny - octová, mravenčí a propanová. Kyselina mravenčí pro tuto metodu nevyhovovala, pro kyselinu octovou a propanovou vychází hodnoty pufrální kapacity v rámci chyby stejně. Jako nejvhodnější byla vybrána kyselina propanová v koncentracích 45-286 μ M. Bylo zjištěno, že hodnota pufrální kapacity roste (od 39mM – 98mM) se stoupajícím pH pufru (pH4,7 – pH5,7), ve kterém se také nastavení vnitřního pH blíží optimální hodnotě a buňky si tedy tuto hodnotu snáz udržují. Závislost pufrální kapacity na počátečním vnitřním pH nebyla prokázána, stejně ani závislost na gradientu pH přes membránu. Za hlavní faktor ovlivňující pufrální kapacitu tedy lze považovat hodnotu vnějšího pH. Pro srovnání byla změřena pufrální kapacita na bakteriálním kmeni exprimujícím divoký typ proteinu MntH a na kmeni s jednobodovou mutací MntH N401G. Ukázalo se, že ve vnějším pH 4,7 mutace MntH N401G snižuje nastavení cytosolického pH o 1,06 jednotek pH a také pufrální kapacita vychází nižší. Možným vysvětlením je rozpražení transportu protonů od transportu kovů u této mutace, což je zajímavá hypotéza, kterou bude třeba dále zkoumat.

Změřené pufrální kapacity obou kmenů byly použity pro kalibraci kadmíem indukovaného transportu. Tento nový způsob zpracování se oproti publikovaným metodám (které zpracovávají celkovou změnu koncentrace protonů) snaží pomocí započtení pufrální kapacity alespoň částečně kompenzovat mechanismy, kterými buňka eliminuje vliv transportovaných protonů na vnitřní pH. Pro přepočet byly použity hodnoty stanovené na buňkách bez inkubace s kovem, protože jak bylo ověřeno, závislost pufrální kapacity na koncentraci kadmia ve vzorku není příliš výrazná (mírný pokles pufrální kapacity s rostoucí koncentrací kadmia) a tento vliv na přepočet kinetiky s protony je zanedbatelný. Pro srovnání transportu za různých podmínek (různá pH pufru, jiný kmen-mutace MntH N01G) byla data fitována podle rovnice Michaelise a Mentenové a vyhodnoceny parametry K_m . Ukázalo se, že Michaelisova konstanta je způsobem zpracování dat ovlivněna. U kmene s nemutovaným proteinem MntH je Michaelisova konstanta v novém přepočtu přes pufrální kapacitu

přibližně poloviční, pro mutaci N401G se hodnoty liší podle pH pufru, předpokládáme, že zde hraje roli ještě nastavení vnitřního pH bakteriích.

Podrobným proměřením pH závislosti transportu protonů indukovaných kadmíem v intervalu vnějších pH_{ex} 4,7-5,3 bylo vidět, že změny koncentrace protonů se zmenšují s rostoucím vnějším pH. Když jsme změnu vnějšího pH pokládali za měnící se koncentraci protonů jako substrátu, chtěli jsme aplikovat kinetiku podle Michaelise a Mentenové. Tato závislost se ukázala citlivá na způsob zpracování dat - ve standardním způsobu zpracování nebyla pozorována saturace, kdežto hodnoty $\Delta[H^+]$ získané přepočtem přes pufracní kapacitu byly vidět v saturaci. Standardní zpracování je ovlivněno také tím, že v nižších pH se změny koncentrace protonů projeví pro stejnou hodnotu změny pH_{in} markantněji než ve vyšších pH.

Podezření, že kadmium jako toxický kov interaguje s dýchacím řetězcem a ovlivňuje tak transport protonů, nás inspirovalo k simulaci tohoto vlivu pomocí inhibitorů dýchacího řetězce u méně toxického manganu. Nejprve byl sledován vliv inhibice respirace na pufracní kapacitu, za použití inhibitorů azidu sodného a kyanidu draselného. Pufracní kapacita s koncentrací inhibitoru vzrůstala, což by se dalo vysvětlit tím, že se jejich vliv neprojeví hned, ale až v delších časech. Dalším determinujícím faktorem při nárůstu pufracní kapacity je fakt, že oba inhibitory snižují pH_{in} v buňkách na hodnotu, které nejsou buňky samovolně schopny dosáhnout, a je tedy obtížné provádět kontrolní měření bez narušení fyziologického stavu buňky. Dále byl zkoumán vliv inhibitorů (azidu sodného a kyanidu draselného) za současného měnění experimentálních podmínek (pufr, pH, koncentrace draslíku, různá délka inkubace s inhibitorem) na transport protonů indukovaný manganem a kadmíem. Pro zlepšení detekce transportu protonů indukovaných manganem se nepodařilo najít vhodnou kombinaci experimentálních podmínek, za kterých by byla zachována protonmotivní síla a zároveň zmenšena pufracní kapacita a transport tudíž lépe detekovatelný. Pro transport indukovaný kadmíem se podařilo zlepšit měřené hodnoty $\Delta[H^+]$ přibližně dvojnásobně a to za přítomnosti 66 μ M azidu sodného v pufru MES-Na 0,1M 30mM KCl.

Cíle práce byly splněny, byla stanovena pufracní kapacita bakterií *E. coli* za daných experimentálních podmínek a byla navržena metoda pro kvantifikaci transportu protonů, která byla dále otestována na buňkách exprimujících dvě varianty proteinu MntH. Bude zajímavé tuto metodu dále aplikovat a použít pro měření s různými mutacemi proteinu MntH ke stanovení stechiometrie H^+ /kov transportu.

5 Seznam zkratek

Δ	sybmol používán pro označení změny (koncentrace protonů, pH) v čase
DCT	Divalent cationt transporter
DMT1	Divalent metal transporter 1
GFP	Green fluorescent protein
grad pH	označuje rozdíl pH ($=\text{pH}_{\text{in}}-\text{pH}_{\text{ex}}$) přes membránu
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spektrometry
K_m	Michaelisova konstanta
K_a	afinita k substrátu
K_w	ionizační konstanta vody
MntH	Proton-dependent Manganese Transporter
Nramp	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
pH_{ex}	vnější pH pufry
pH_{in}	vnitřní pH v bakteriích
pH_0	počáteční pH v buňkách
$R_{410/470}$	poměr intenzit fluorescence na vlnových délkách 410nm a 470nm
RPM	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
OD	optická hustota (optical density)
TCDB	Transport Classification Databáze (www.tcdb.org)

6 Literatura

1. Cellier, M. F., Bergevin, I., Boyer, E., and Richer, E. (2001) Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters, *Trends Genet.* 17, 365-370.
2. Kehres, D. G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B., and Maguire, M. E. (2000) The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen, *Mol. Microbiol.* 36, 1085-1100.
3. Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., and Cellier, M. F. (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter, *Mol. Microbiol.* 35, 1065-1078.
4. Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature* 394, 192-195.
5. Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., and Cellier, M. F. M. (2004) Determination of Transmembrane Topology of the *Escherichia coli* Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog, *J. Biol. Chem.* 279, 3318-3326.
6. Nelson, N. (1999) Metal ion transporters and homeostasis, *The EMBO Journal* 18, 4361-4371.
7. Courville, P., Chaloupka, R., and Cellier, M. F. M. (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters, *Biochemistry and Cell Biology* 84, 960-978.
8. Fleming, M. D., Trenor, C. C., III, Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., and Andrews, N. C. (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene, *Nat. Genet.* 16, 383-386.
9. Portnoy, M. E., Liu, X. F., and Culotta, V. C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters, *Mol. Cell Biol.* 20, 7893-7902.
10. Nevo, Y. and Nelson, N. (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters 1, *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 609-620.
11. Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., and Nelson, N. (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5105-5110.
12. Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S., and Gros, P. (1995) Identification and characterization of a second mouse Nramp gene, *Genomics* 25, 514-525.

13. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., and Hediger, M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature* 388, 482-488.
14. Haemig, H. A. and Brooker, R. J. (2004) Importance of conserved acidic residues in mntH, the Nramp homolog of Escherichia coli, *J. Membr. Biol.* 201, 97-107.
15. Lam-Yuk-Tseung, S., Govoni, G., Forbes, J., and Gros, P. (2003) Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6, *Blood* 101, 3699-3707.
16. Chaloupka, R., Courville, P., Veyrier, F., Knudsen, B., Tompkins, T. A., and Cellier, M. F. (2005) Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport in vivo, *Biochemistry* 44, 726-733.
17. Nevo, Y. and Nelson, N. (2004) The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1, *J. Biol. Chem.* 279, 53056-53061.
18. Crawford, L. A., Bown, A. W., Breitzkreuz, K. E., and Guinel, F. C. (1994) The Synthesis of [γ]-Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH, *Plant Physiol.* 104, 865-871.
19. David White (2006) *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*, Oxford University Press 2006, New York
20. Essenberg, R. C. and Kornberg, H. L. (1975) Energy coupling in the uptake of hexose phosphates by Escherichia coli, *J Biol. Chem.* 250, 939-945.
21. Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N., Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.* 14, 1246-1251.
22. Olsen, K. N., Budde, B. B., Siegumfeldt, H., Rechinger, K. B., Jakobsen, M., and Ingmer, H. (2002) Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4145-4147.
23. Donald Voet and Judith Voet (1995) *Biochemistry Praha*: Victoria Publishing, 1995 .
24. Nakamura, T., Tokuda, H., and Unemoto, T. (1984) K⁺/H⁺ antiporter functions as a regulator of cytoplasmic pH in a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, *Biochim. Biophys. Acta* 776, 330-336.
25. Roos, A. and Boron, W. F. (1981) Intracellular pH, *Physiol Rev.* 61, 296-434.
26. Collins, S. H. and Hamilton, W. A. (1976) Magnitude of the protonmotive force in respiring Staphylococcus aureus and Escherichia coli, *J Bacteriol* 126, 1224-1231.
27. Mitchell, P. and Moyle, J. (1967) Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria. Catalysis by uncouplers, *Biochem. J* 104, 588-600.

28. Diez-Gonzalez, F. and Russell, J. B. (1997) Effects of carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and acetate on Escherichia coli O157:H7 and K-12: uncoupling versus anion accumulation, *FEMS Microbiology Letters* 151, 71-76.
29. Chen, X. Z., Peng, J. B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N., and Hediger, M. A. (1999) Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents, *J. Biol. Chem.* 274, 35089-35094.
30. Rius, N., Sole, M., Francia, A., and Loren, J. G. (1995) Buffering capacity and H+ membrane conductance of gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 103-110.
31. Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria 75, *Microbiol. Rev.* 49, 359-378.
32. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol. Chem.* 193, 265-275.
33. Adamis, P. D., Gomes, D. S., Pinto, M. L., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. (2004) The role of glutathione transferases in cadmium stress, *Toxicol. Lett.* 154, 81-88.
34. Beard, S. J., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (1995) Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in Escherichia coli K-12 by divalent metal cations, *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 205-210.
35. Marangoni, A. G. (2003) Enzyme kinetics: a modern approach John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
36. <http://ach.upol.cz/ucebnice/tab8.htm> (15.4.2007)
37. <http://www.labo.cz/mftabulky.htm> (15.4.2007)
38. www.chembuddy.com (15.4.2007)
39. <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/index.html> (15.4.2007)