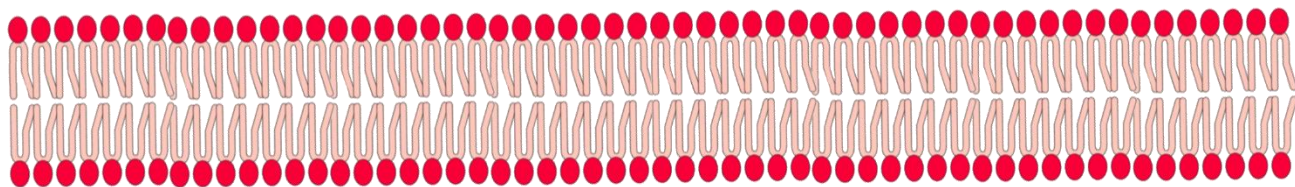


Nora Tóth Hervay

BIOMEMBRÁNY

**Metódy a postupy umožňujúce štúdium zmien vlastností
cytoplazmatickej membrány kvasiniek**



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského v Bratislave

Nora Tóth Hervay

BIOMEMBRÁNY

**Metódy a postupy umožňujúce štúdium vlastností
cytoplazmatickej membrány kvasiniek**

2021
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

© RNDr. Nora Tóth Hervay, PhD., 2021

Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského
v Bratislave

Za jazykovú a odbornú stránku tejto publikácie zodpovedá autorka.

Vyšlo ako elektronická publikácia.

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave

978-80-223-5110-2

OBSAH

Predhovor.....	6
1. Biomembrány.....	7
2. Chemické zloženie biomembrán.....	10
2.1. Lipidy biomembrán.....	10
Mastné kyseliny.....	11
Fosfolipidy.....	13
Sfingolipidy.....	17
Steroly.....	17
2.2. Proteíny biomembrán.....	24
3. Funkcie biomembrán.....	25
Transport cez biomembrány.....	25
4. Fyzikálne vlastnosti biomembrán.....	31
Membránová fluidita.....	31
Membránový potenciál.....	33
Využitie fluorescencie pre meranie vybraných membránových vlastností kvasiniek.....	34
5. Vybrané experimenty umožňujúce meranie zmien vlastností cytoplazmatickej membrány kvasiniek.....	39
5.1. Meranie efluxu rhodamínu 6G z buniek kvasiniek.....	39
5.2. Analýza zloženia sterolov v bunkách kvasiniek využitím vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.....	41
5.3. Fluidita cytoplazmatickej membrány.....	44
5.4. Membránový potenciál.....	47
5.5. Osmotická stabilita protoplastov.....	49
5.6. Agarová zried'ovacia metóda – kvapkový test.....	52
5.7. Kvalitatívne stanovenie zastúpenia fosfolipidov v kvasinkách – Tenkovrstvová chromatografia.....	54

6. Zásady bezpečnej práce v laboratóriu.....	58
7. Zoznam použitých skratiek.....	60
8. Použitá literatúra.....	62

PREDHOVOR

Bunky predstavujú základnú jednotku organizácie života vo forme, v akej ho poznáme na našej Zemi. Existencia buniek je viazaná na membrány zložené z lipidov a bielkovín, ktoré vymedzujú bunky ako individuálne entity a rozhodujú do veľkej miery o interakciách jednotlivých buniek s okolitým prostredím. Biologické membrány (biomembrány) sú vďaka svojmu zloženiu a špecifickej základnej štruktúre (lipidová dvojvrstva) nepriepustné pre väčšinu látok a predstavujú bariéru, ktorá oddeľuje vnútro buniek od okolitého prostredia. Na druhej strane, prítomnosť bielkovín v membránach umožňuje prijímať špecifické látky (živiny) z prostredia a zároveň vylučovať z buniek nepotrebné splodiny metabolismu a škodlivé látky. Takáto selektívna výmena látok, ktorú zabezpečujú transportné systémy je jednou zo základných funkcií biologických membrán a odvíjajú sa od nej mnohé životné funkcie organizmov.

Autorka

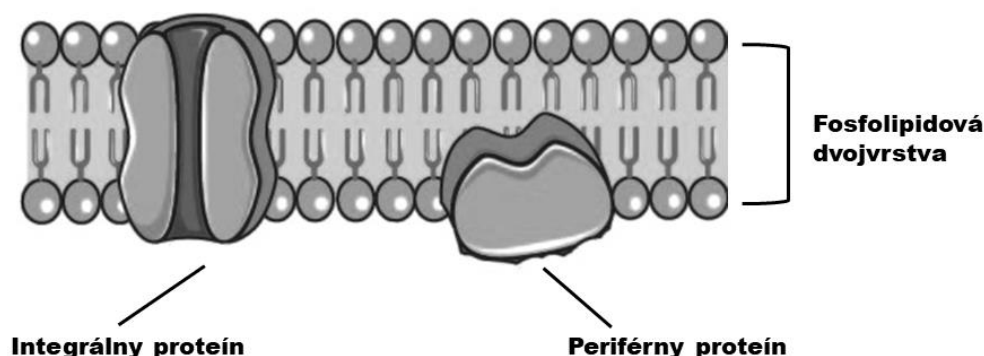
1. BIOMEMBRÁNY

Biologické membrány, nazývané tiež biomembrány, sú esenciálne pre existenciu živého systému. V evolúcii vznikli veľmi skoro, za účelom zabezpečiť oddelenie živého systému od okolitého prostredia.

Bunky prokaryotov sú od okolitého prostredia oddelené cytoplazmatickou membránou, ďalšie, membránou oddelené organely však ich bunky neobsahujú. Genetická informácia vo forme DNA je lokalizovaná v centre buniek prokaryotov, ribozómy, množstvo enzýmov a ďalších metabolitov sa nachádza vo vnútornom prostredí cytozolu. Niektoré metabolické reakcie, vrátane proteosyntézy a anaeróbnej glykolýzy sú lokalizované v cytozole, iné, ako napr. replikácia DNA a produkcia energie (ATP), sú viazané na cytoplazmatickú membránu.

V rozmermi väčších eukaryotických bunkách by bolo množstvo chemických procesov limitované difúziou malých molekúl na krátku vzdialenosť od povrchu bunky, pokiaľ by bunka nebola rozdelená na menšie jednotky, tzv. organely. Každá organela je ohraničená jednou, alebo viacerými biomembránami, pričom rôzne organely disponujú rozličným zastúpením a lokalizáciou proteínov – niektoré sú lokalizované (integrované) v membráne organely, iné v ich vnútornom prostredí, alebo v lumene organely. Zastúpenie proteínov umožňuje jednotlivým organelám zastávať charakteristické funkcie v eukaryotickej bunke.

Úlohou biomembrán, ako bolo uvedené vyššie, je vzájomné oddelenie vnútorného a vonkajšieho prostredia. V súčasnosti všeobecne akceptovaná predstava biomembrány je založená na modeli tzv. „tekutej mozaiky“, ktorý postulovali v roku 1972 Singer a Nicolson. Hoci bol odvtedy tento model doplnený o ďalšie nové poznatky, pôvodná predstava je stále platná. Podľa nej tvorí biomembránu lipidová dvojvrstva, v ktorej sú proteíny lokalizované buď na jej povrchu (periférne proteíny), alebo sú viazané v jej hydrofóbnom centre, alebo na hydrofilnom povrchu (integrálne proteíny; Obr.1).



Obr. 1 Schéma štruktúry biomembrány

Biomembrány sú jednotné. Napriek veľkej stavebnej a funkčnej variabilite v základoch stavby a funkcie biomembrán ležia jednotné princípy. Prvé membrány mohli byť vytvorené soľami mastných kyselín, až neskôr sa mohli objaviť fosfolipidy. Prestup látok cez membránu sa uskutočňoval jednoduchou difúziou a závisel od rozdeľovacích koeficientov prenášaných molekúl. Nerovnomernú distribúciu látok a vznik koncentračných gradientov podmieňovala rýchlosť metabolických reakcií a membránový potenciál. Rýchlosť a selektivita prestupu polárnych látok sa postupne zvýšili vývojom nízkomolekulových membránových ionoforov, prenášačov bielkovinnej povahy a inkorporovaním nelipidových látok do membrány, ktoré umožnili tvorbu pórov. Vytváranie a udržiavanie veľkých koncentračných gradientov sa stalo možným vďaka vzniku membránových ATPáz, premieňajúcich chemickú energiu ATP na osmotickú a elektrickú energiu protónov a iónov alkalických kovov a vývojom symportu látok s takto generovanými protónmi alebo iónmi. Predpokladá sa, že takéto generovanie osmotickej a elektrickej energie bolo pôvodne vypracované pre efektívny transport látok do bunky a z bunky. Dnes je však jeho rozhodujúca úloha v tom, že predstavuje hlavný mechanizmus získavania energie nutnej pre bunkové syntézy a funkcie. Biomembrány sú teda základnými transformátormi energie v živej bunke.

Ako už bolo spomenuté, prokaryoty nemajú okrem cytoplazmatickej membrány ďalšie membránové štruktúry. Cytoplazmatická membrána prokaryotov má rovnakú štruktúru a funkciu ako u eukaryotických buniek, ale u prokaryotov sa významnou mierou podieľa aj na metabolických funkciách bunky, lebo obsahuje enzýmy dýchacieho reťazca, enzýmy zúčastňujúce sa syntézy lipidov, prípadne je v nej lokalizovaný aparát na realizáciu

fotosyntézy. Cytoplazmatická membrána bakteriálnej bunky obsahuje steroly iba výnimočne (rod *Mycoplasma*).

Základnou charakteristikou biomembrány je dynamické, mozaikovité usporiadanie lipidov a proteínov, ktoré zabezpečuje optimálnu fluiditu biomembrány. Lipidické zloženie biomembrány neovplyvňuje len jej tvar a funkciu, ale zohráva dôležitú úlohu aj v ukotvení proteínov v biomembráne, má vplyv na aktivitu membránových proteínov a prenos signálov z vonkajšieho prostredia do cytoplazmy bunky.

Vďaka schopnosti molekúl lipidov formovať membránové domény s unikátnym lipidovým a proteínovým zložením a ich interakciami s ďalšími lipidmi a špecifickými proteínmi je bunka schopná regulovať a oddeľovať niektoré biologické procesy. V biomembráne eukaryotickej bunky sa nachádza viacero štruktúr, z ktorých každú charakterizuje jedinečné zastúpenie jednotlivých druhov lipidov v závislosti od funkcie príslušnej organely. Ďalšou vlastnosťou biomembrán je ich asymetria. Väčšinu lipidov je možné nájsť vo vonkajšej aj vnútornej vrstve biomembrány, výskyt niektorých je však špecifický pre vonkajšiu alebo vnútornú vrstvu biomembrány. Rozmiestnenie a usporiadanie lipidov súvisí s ich funkciou v bunke.

Izolačná funkcia cytoplazmatickej membrány je rozhodujúca pre zachovanie bunkovej homeostázy, ako aj pre interakcie buniek s vonkajším prostredím. Aktivita enzýmov, transportných proteínov a receptorov lokalizovaných v lipidovej dvojvrstve cytoplazmatickej membrány je nevyhnutná pre dôležité vitálne funkcie bunky, ako je syntéza bunkovej steny, rast, rozmnožovanie a adaptácia na zmeny prostredia. Akákoľvek zmena lipidového zloženia cytoplazmatickej membrány môže mať vplyv na distribúciu, reguláciu, aktivitu a signálnu funkciu membránových proteínov, čo má nepriaznivé dôsledky na celkový „fitnes“ bunky živých organizmov. Cytoplazmatická membrána je teda selektívne permeabilnou bariérou, ktorá kontroluje vstup a výstup látok z bunky resp. do bunky. Základné vlastnosti cytoplazmatickej membrány možno zhrnúť nasledovne: ochrana vnútorného prostredia bunky, kontrola osmotického stability, biosyntéza komponentov bunkovej steny, miesto ukotvenia cytoskeletu, miesto lokalizácie proteínov zúčastňujúcich sa signálnej transdukcie, účasť v procesoch endocytózy a exocytózy, v rozpoznávaní buniek a v bunkovej adhézii.

Základná biologická lipidová membrána sa tvorí spontánne. Špecifický charakter dávajú každej membráne jej bielkovinové komponenty. Hlavnými zložkami membrán sú proteíny a lipidy. Sacharidy môžu tvoriť až 10% hmotnosti niektorých biomembrán, ale vždy sú viazané vo forme glykolipidov alebo glykoproteínov.

2. CHEMICKÉ ZLOŽENIE BIOMEMBRÁN

2.1. Lipidy biomembrán

Lipidy sú jednými zo základných stavebných jednotiek bunky, sú definované ako organické zlúčeniny rozpustné v nepolárnych organických rozpúšťadlách, ale nerozpustné vo vode. Sú to pomerne malé biomolekuly, ktoré sa navzájom líšia chemickými vlastnosťami. Niektoré z lipidov môžu byť vysoko hydrofóbne, iné sú amfipatické. Na základe štruktúry a funkcie sa lipidy rozdeľujú do ôsmich skupín: mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, steroly a ich deriváty, sfingolipidy, prenoly, glykolipidy a polyketidy. Okrem toho, že lipidy tvoria hlavnú súčasť biomembrán, môžu byť tiež uskladnené v špecifických organelách eukaryotickej bunky, kde zastávajú rôzne funkcie, slúžia napr. ako zdroje energie, štruktúrne elementy, signálne molekuly, alebo sprostredkujú fúziu membrán a apoptózu.

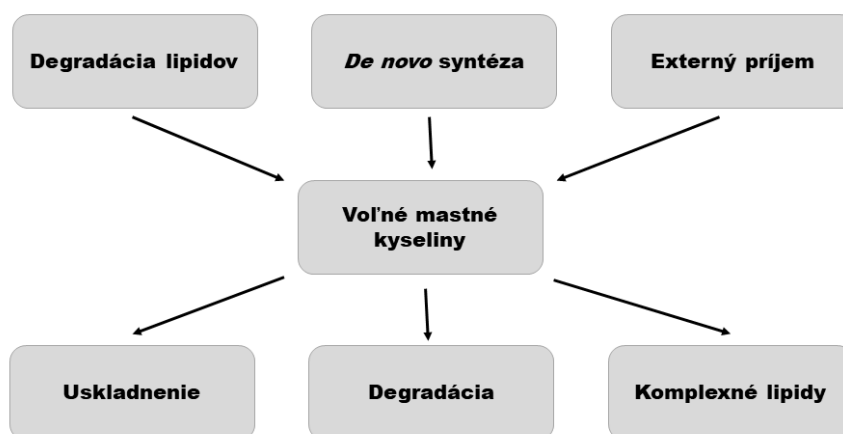
V bunkách kvasiniek sa uskutočňuje *de novo* syntéza lipidov, príjem lipidov z externého prostredia, ako aj turnover (remodelácia) lipidových molekúl. Základnými organelami eukaryotických buniek v ktorých sa uskutočňuje syntéza lipidov sú endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie. Z týchto organel sú následne lipidy a ich prekursori transportované viacerými mechanizmami na miesto ich finálnej lokalizácie. Veľká časť transportu lipidov je zabezpečená pomocou vezikulárneho transportu, pri ktorom transportné vezikuly splývajú s membránami cieľových organel. V cytoplazmatickej membráne nedochádza k *de novo* syntéze lipidov. Všetky lipidy nachádzajúce sa v cytoplazmatickej membráne sú buď produktom degradácie alebo turnoveru lipidových molekúl syntetizovaných v iných častiach bunky. V bunkách existujú výrazné rozdiely v lipidovom zložení membrán jednotlivých organel, ako aj rozdiely medzi vonkajšou a vnútornou vrstvou biomembrány, či oblasťami jednotlivých biomembrán. Optimálne fungovanie biomembrán závisí od správneho lipidového zloženia, ktoré je zabezpečené selektívnym transportom jednotlivých lipidov na miesto ich určenia.

Nadbytok lipidov v bunke je pre bunku škodlivý a môže viesť k tzv. lipotoxicite. Aby nedošlo k tomuto nežiadúcemu stavu, lipidy sa v bunkách uskladňujú vo forme tzv. lipidových

kvapôčok. Takto uskladnené lipidy môžu byť podľa potreby využité buď pre produkciu energie, alebo na syntézu komplexných lipidov. Zrelé lipidové kvapôčky majú veľkosť cca 300-400 nm, sú obklopené monovrstvou fosfolipidov (zastúpené sú najmä fosfatidylcholín, fosfatidylinozitol, fosfatidyletanolamín), ktorá obsahuje nepatrné množstvo proteínov. Prítomné proteíny nemajú transmembránové domény, mnohé z nich môžu byť lokalizované tak v lipidových kvapôčkach, ako aj v endoplazmatickom retikule. Ak je syntéza triacylglycerolov (neutrálnych tukov) a sterylerov (zásobná forma sterolov) v bunke inhibovaná, nedochádza k tvorbe lipidových kvapôčok a proteíny lipidových kvapôčok ostávajú v endoplazmatickom retikule.

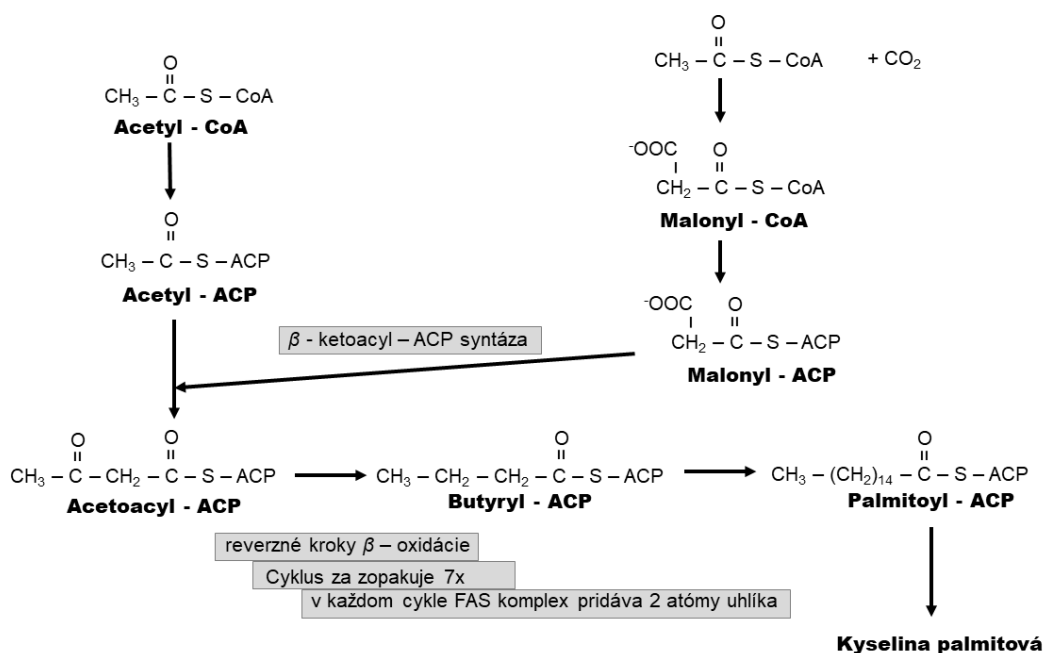
Mastné kyseliny

Základné elementy komplexných lipidov sú mastné kyseliny, ktoré sú štruktúrnou súčasťou fosfolipidov, sfingolipidov, ale aj triacylglycerolov a sterylerov lokalizovaných v lipidových kvapôčkach, slúžiacich ako rezervoár energie. Mastné kyseliny sa môžu uplatňovať ako transkripčné regulátory, signálne molekuly a môžu byť tiež zahrnuté v posttranslačnej modifikácii proteínov. Voľné mastné kyseliny majú uhl'ohydrátový reťazec rôznej dĺžky a rôzneho stupňa nasýtenia, čím vzniká široké spektrum mastných kyselín využiteľné v syntéze rôznych druhov lipidov. Bunky kvasiniek syntetizujú mastné kyseliny buď *de novo*, alebo sa mastné kyseliny uvoľňujú hydrolýzou komplexných lipidov, príp. delipidáciou proteínov (Obr. 2). *De novo* syntéza mastných kyselín sa uskutočňuje v cytozole a v mitochondriách kvasiniek. K elongácii mastných kyselín dochádza v endoplazmatickom retikule. V endoplazmatickom retikule dochádza tiež k desaturácii a hydroxylácii mastných kyselín. Okrem *de novo* syntézy mastných kyselín sú bunky kvasiniek schopné prijímať mastné kyseliny z prostredia, buď jednoduchou difúziou alebo za účasti transportérov. Zastúpenie mastných kyselín varíruje v závislosti od rastových podmienok buniek, je rôzne aj v jednotlivých biomembránach v rámci bunky. Základnými mastnými kyselinami v bunkách kvasiniek *Saccharomyces. cerevisiae* sú z nasýtených mastných kyselín kyselina palmitová (C16 : 0) a kyselina stearová (C18 : 0), z nenasýtených mastných kyselín kyselina palmitolejová (C16 : 1) a kyselina olejová (C18 : 1), ktoré obsahujú jednu dvojité väzbu v molekule.



Obr. 2 Schéma toku mastných kyselín v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

Syntéza mastných kyselín vychádza z acetyl-CoA. Reakcia je katalyzovaná multifunkčným enzýmovým komplexom – syntáza mastných kyselín, tzv. FAS (fatty acid synthase) komplex. Za katalýzy acetyl-CoA-ACP-transacylázy je fragment acetyl-CoA prenášaný na tzv. ACP (acyl carrier protein) proteín komplexu FAS za vzniku reaktívnejšieho substrátu acetyl-ACP. Druhý krok je katalyzovaný enzýmom malonyl CoA-ACP-transacyláza pričom dochádza k prenosu malonylu z malonyl-CoA na ACP. Vzniknutý malonyl-ACP je pomocou konjugačných enzýmov pripojený na komplex FAS, ktorý obsahuje acetyl pochádzajúci z acetyl-CoA. Kondenzáciou acetylu a malonylu vzniká acetoacetyl-ACP. Pôvodný acetyl-CoA obsahujúci 2 uhľíky sa uvedenou reakciou predĺžil o dva uhľíky. Následnými reakciami je acetoacetyl-CoA ako súčasť komplexu FAS spracovávaný ďalej. Hlavnou funkciou komplexu FAS je predlžovanie reťazca acetyl-CoA o dva uhľíky (Obr. 3).

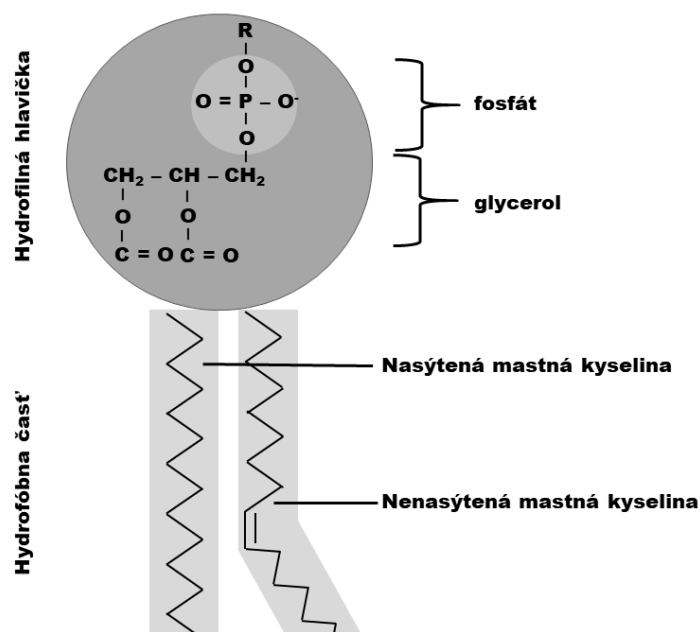


Obr. 3 Biosyntéza mastných kyselín

Fosfolipidy

Fosfolipidy, nazývané aj glycerofosfolipidy sa považujú za základné štrukturálne elementy biomembrán. Fosfolipidy sú amfipatické molekuly s hydrofóbnou aj hydrofilnou časťou, ktorých štrukturným základom je 1,2-diacylglycerol 3-fosfát. Kostru diacylglycerolu tvorí glycerol, ktorý je esterifikovaný dvomi mastnými kyselinami (hydrofóbná časť molekuly) a fosfátovou skupinou (hydrofilná časť; Obr. 4). Na zvyšok anorganického fosfátu sa viaže serín, cholín, príp. iný aminoalkohol.

Formovanie biomembrán je dôsledkom amfipatického charakteru fosfolipidových molekúl, pre ktoré je energeticky nevýhodné vytvárať voľné rozhranie s vodným prostredím. Na základe uvedeného sa fosfolipidy organizujú do uzavretých dvojvrstiev s hydrofóbnou nepolárnou časťou molekúl orientovanou do vnútra dvojvrstvy a s hydrofilnou časťou orientovanou do vodného prostredia. Vo vodnom prostredí vytvárajú fosfolipidy spontánne tri rôzne typy štruktúr – lipozóm, micelu alebo fosfolipidovú dvojvrstvu. To, do akej štruktúry sa fosfolipidy zoskupia ovplyvňuje počet jednoduchých a dvojítych väzieb v reťazcoch mastných kyselín, ich dĺžka a teplota prostredia. Pri každej z uvedených štruktúr je orientácia molekúl fosfolipidov taká, aby sa zabránilo kontaktu hydrofóbnej časti molekuly s vodným prostredím.



Obr. 4 Štruktúra molekuly fosfolipidu

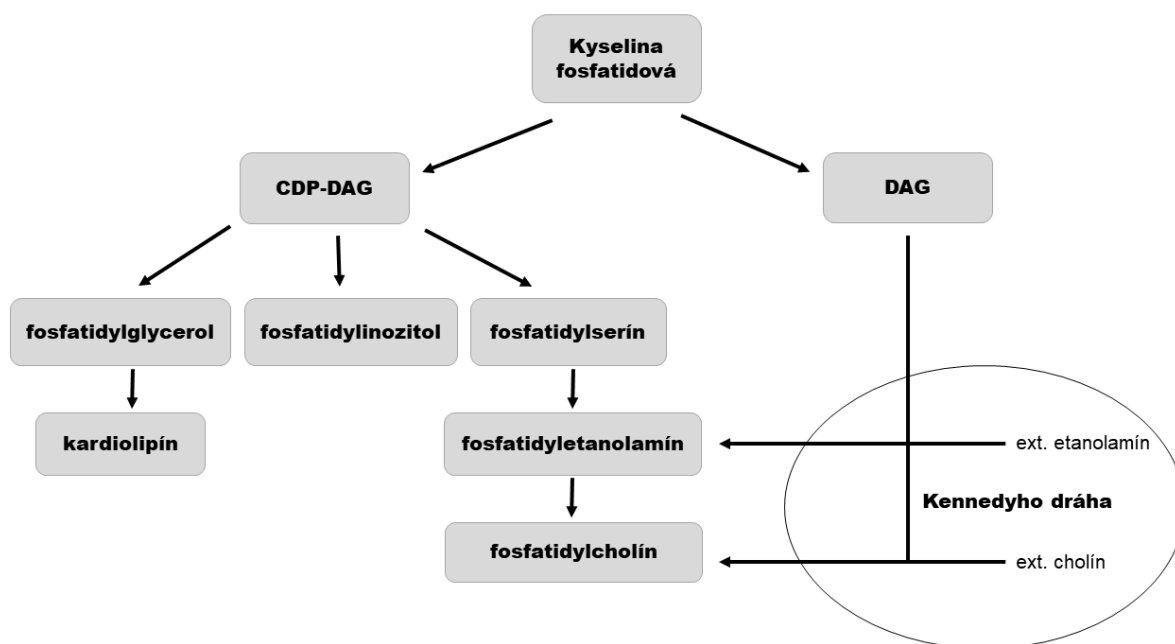
Voľne sa nachádzajúce fosfolipidy zriedka vytvárajú micely, pretože reťazce ich mastných kyselín sú prídlhé na to, aby sa zmestili do vnútra takejto štruktúry. Molekuly fosfolipidov, ktoré obsahujú mastné kyseliny s dlhým reťazcom majú tendenciu pri agregácii vytvárať pevnejšiu, gélu podobnú štruktúru. Ak sú mastné kyseliny nenasýtené a majú kratší acylový reťazec, vzniknuté štruktúry sú voľnejšie. Je to spôsobené tým, že v dôsledku kratších reťazcov sú van der Waalsove sily medzi molekulami fosfolipidov slabšie, vďaka čomu sú schopné ľahšie interagovať s ostatnými lipidmi a proteínmi biomembrány. Veľkosť „hlavičiek“ (hydrofilných oblastí) a dĺžka reťazcov mastných kyselín (hydrofóbných častí) fosfolipidov podmieňuje aj zakrivenie biomembrány. Molekula fosfolipidu s dlhším reťazcom a veľkou „hlavičkou“ má cylindrický tvar, čo spôsobuje zakrivenie biomembrány. Fosfolipidy s malými „hlavičkami“ a kratšími acylovými reťazcami vytvárajú membrány, ktoré sú takmer rovné. Vďaka tejto vlastnosti môže na základe špecifického fosfolipidového profilu dochádzať k formovaniu zakrivení, ako napríklad pri pučiacej kvasinkovej bunke, alebo pri vzniku vezikúl. Na zakrivení biomembrány sa podieľajú aj niektoré interakcie s proteínmi.

Rozmanitosť fosfolipidov je zabezpečená kombináciou rôznych mastných kyselín s glycerolom. Konkrétny typ glycerofosfolipidu je daný charakterom molekuly, ktorá esterifikuje fosfátovú skupinu: cholín, etanolamín, serín, glycerol alebo inozitol. Podľa charakteru ďalšej

molekuly, asociovanej s fosfátom, sa klasifikujú rôzne druhy fosfolipidov, ktoré sa líšia aj fyzikálnymi vlastnosťami. Fosfolipidový profil v biomembránach jednotlivých bunkových organel môže byť rozdielny. V biomembránach eukaryotických buniek je najviac zastúpeným fosfolipidom fosfatidylcholín. Druhým, najhojnejšie zastúpeným fosfolipidom v biomembránach kvasiniek je fosfatidyletanolamín, ktorý je esenciálny pre rast buniek. Fosfatidylinozitol spolu so svojimi fosforylovanými derivátmi tvorí tzv. rodinu fosfoinozitidov. Fosfoinozitidy zohrávajú okrem štruktúrnej aj významnú regulačnú úlohu, najmä v procesoch membránového transportu, pri ktorom slúžia ako regulátory. Fosfatidylserín je fosfolipid lokalizovaný vo vnútorných vrstvách cytoplazmatickej membrány eukaryotov, vrátane kvasiniek, zohráva významnú úlohu v štruktúre biomembrány a v bunkovej signalizácii. Fosfolipidy nesúce záporný náboj, tzv. anionické fosfolipidy - fosfatidylglycerol a kardiolipín, sú významné pre bunkové funkcie u všetkých eukaryotov, ako aj niektorých prokaryotov. V cicavčích bunkách je fosfatidylglycerol minoritným fosfolipidom. V intracelulárnych biomembránach tvorí menej ako 1% všetkých fosfolipidov. Je lokalizovaný prevažne v mitochondriách a mikrozomálnych membránach. Kardiolipín predstavuje cca 0,2 - 15% všetkých fosfolipidov kvasiniek. Väčšina kardiolipínu je lokalizovaná vo vnútornej membráne mitochondrií, vo vonkajšej mitochondriálnej membráne bolo detegované iba stopové množstvo kardiolipínu. Popri funkcii kardiolipínu a fosfatidylglycerolu v zabezpečovaní homeostázy bunkových biomembrán, zohrávajú tieto dva fosfolipidy úlohu mediátorov v molekulárnej signalizácii mnohých bunkových procesov.

V eukaryotických bunkách je hlavným miestom biosyntézy fosfolipidov endoplazmatické retikulum, s výnimkou kardiolipínu, ktorý sa syntetizuje v mitochondriách. Spoločným prekursorom pri *de novo* syntéze fosfolipidov je kyselina fosfatidová. Kyselina fosfatidová je súčasťou dvoch hlavných biosyntetických dráh (Obr. 5). V rámci prvej dráhy dochádza k odštiepeniu fosfátu za vzniku diacylglycerolu a stáva sa súčasťou dráhy pre tvorbu zásobných lipidov. V rámci druhej dráhy sa kyselina fosfatidová podieľa na biosyntéze fosfolipidov, pričom je v prvom kroku aktivovaná na cytidindifosfodiacylglycerol (CDP-DAG). Táto reakcia je katalyzovaná buď CDP-DAG syntázou, ktorá je lokalizovaná v endoplazmatickom retikule alebo mitochondriálnou CDP-DAG syntázou. CDP-DAG je prekursorovou molekulou pre syntézu všetkých hlavných druhov fosfolipidov, môže vstupovať do reakcie so serínom, inozitolom alebo s glycerol-3-fosfátom. CDP-DAG sa využíva pri biosyntéze fosfatidylinozitolu, fosfatidylserínu a fosfatidylglycerolu. Inozitol sa získava buď z glukózo-6-fosfátu alebo je importovaný z externého prostredia pomocou inozitol permeázy. Na vznik molekuly fosfatidylserínu využíva fosfatidylserín syntáza, CDP-DAG a

serín. Fosfatidylserín môže byť v ďalšej reakcii dekarboxylovaný na fosfatidyletanolamín. V rámci aminoglycerofosfolipidovej dráhy vzniká z fosfolipidov ako posledný fosfatidylcholí. Je syntetizovaný z fosfatidyletanolamínu tromi postupnými metylačnými reakciami. Ďalšou dráhou pre biosyntézu fosfatidyletanolamínu a fosfatidylcholínu je tzv. Kennedyho dráha. Tá využíva pre syntézu fosfatidyletanolamínu a fosfatidylcholínu ako substrát exogénny etanolamín a cholín. Oba substráty sú do bunky transportované prostredníctvom príslušného etanolamínového/cholínového transportéra, a následne sú v cytoplazme fosforylované špecifickými kinázami. Fosforylovaný etanolamín a cholín sú aktivované reakciou s CTP na cytidíndifosfoetanolamín a cytidíndifosfocholín. V poslednej reakcii tejto dráhy vzniká z diacylglycerolu a cytidíndifosfoetanolamínu fosfatidyletanolamín a z diacylglycerolu a cytidíndifosfocholínu fosfatidylcholí. Diacylglycerol využívaný v Kennedyho dráhe pochádza z degradácie kyseliny fosfatidovej. Táto reakcia je reverzibilná a kyselina fosfatidová môže spätne vznikať z dvoch molekúl diacylglycerolu.



Obr. 5 Schéma biosyntézy fosfolipidov. CDP-DAG - cytidíndifosfodiacylglycerol, DAG – diacylglycerol

Sfingolipidy

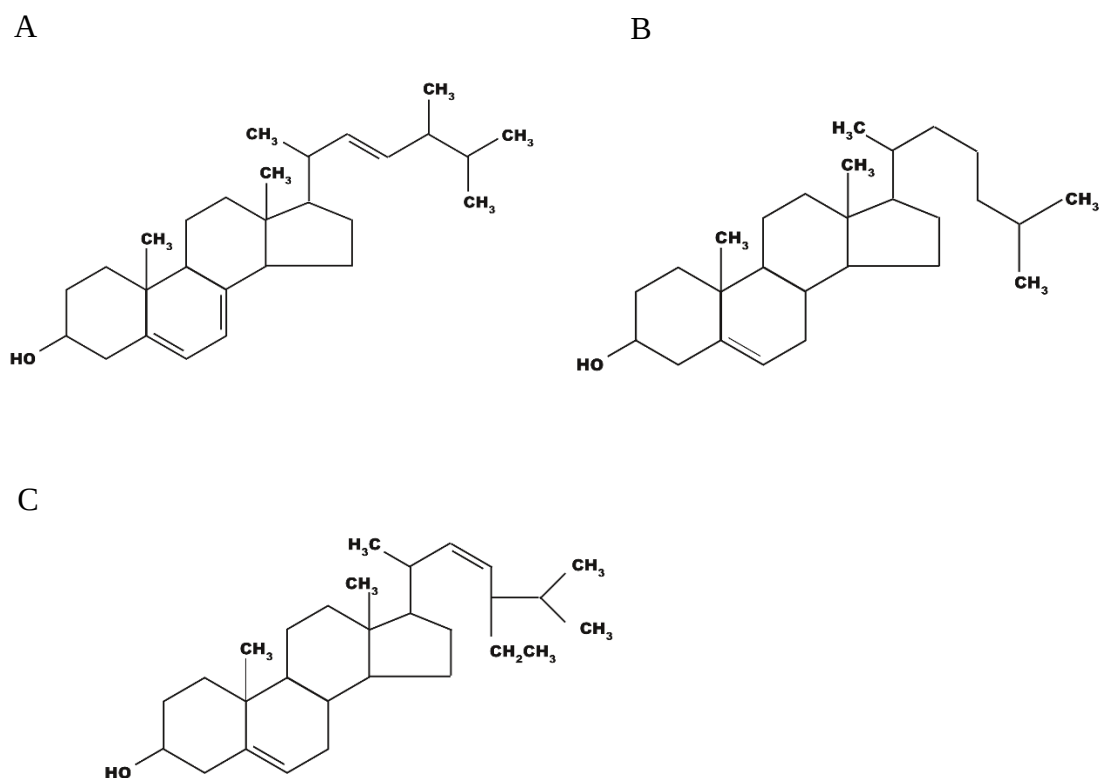
Sfingolipidy sú ďalšie, esenciálne komponenty eukaryotickej cytoplazmatickej membrány, ktoré sa v menších množstvách vyskytujú aj v membránach iných organel. Sfingolipidy, spolu so sterolmi, zabezpečujú a udržujú rigiditu membrány. Popri svojej štruktúrnej úlohe sa sfingolipidy, spolu so svojimi prekurzormi, zúčastňujú regulácie niektorých metabolických aktivít eukaryotickej bunky. Základným štruktúrnym elementom sfingolipidov je ceramid, pozostávajúci z dlhého reťazca sfingoidu, na ktorý je amidovou väzbou viazaná mastná kyselina. Polárnu hlavičku molekuly sfingolipidu tvorí inozitol. V kvasinkách sú známe dva druhy sfingolipidov: fytosfingozín (PHS) s dĺžkou reťazca 16 až 20 uhlíkov a dihydrosfingozín (DHS) s reťazcom pozostávajúcim s 18-20 uhlíkov. Viac ako 90% sfingolipidov kvasiniek je lokalizovaných v cytoplazmatickej membráne, pričom sfingolipidy tvoria približne 30% všetkých lipidov. Prvé kroky v metabolickej dráhe biosyntézy sfingolipidov (po vznik ceramidu), sú vysoko konzervované u kvasiniek, rastlín aj živočíchov. Biosyntéza sfingolipidov zahŕňa 11 reakcií a uskutočňuje sa v endoplazmatickom retikule a v Golgiho aparáte, odtiaľ sú sfingolipidy prostredníctvom sekrečných vezikúl transportované ďalej v rámci bunky. Zatiaľ čo v cicavčích bunkách, kroky nasledujúce po tvorbe ceramidu vedú k produkcii množstva rozdielnych komplexných sfingolipidov, v kvasinkách druhu *Saccharomyces cerevisiae* boli identifikované iba tri: inozitolfosfoceramid (IPC), manozylinozitolfosfoceramid (MIPC) a manóza diinozitol difosfoceramid [M(IP)2C]. Výsledky viacerých experimentálnych štúdií naznačujú úzke prepojenie medzi biosyntézou sfingolipidov a fenoménom mnohonásobnej rezistencie (MDR) buniek kvasiniek voči cytotoxicky pôsobiacim a zlúčeninám.

Steroly

Steroly sú cyklické zlúčeniny alkoholu, ktoré sú v prírode hojne rozšírené. Steroly sú charakteristické lipidy pre eukaryotické bunky, u prokaryotov sa nenachádzajú. K ich vzniku pravdepodobne došlo po zvýšení koncentrácie kyslíka v atmosfére. Steroly mohli prispieť k rozvoju ríše eukaryotov v aeróbných podmienkach tým, že im poskytli jeden z prvých obranných mechanizmov pred toxickými formami kyslíka.

Steroly sú súčasťou cytoplazmatickej membrány eukaryotických buniek, zastávajú dôležitú úlohu v regulácii jej fluidity a permeability, podieľajú sa aj na regulácii aktivity

niektorých proteínov lokalizovaných v membráne. Steroly patria medzi amfipatické molekuly, ktoré sú schopné tvorby dvojvrstvových štruktúr, avšak neobsahujú fosfátovú hlavičku, preto ich nemôžeme zaradiť medzi fosfolipidy. Spoločným znakom všetkých sterolov je nasýtená väzba medzi uhlíkmi v pozícii C-5, 6 a hydroxylová skupina v pozícii C-3. Práve hydroxylová skupina určuje amfipatický charakter sterolov a zabezpečuje ich správnu orientáciu v membráne. Okrem týchto spoločných znakov sa medzi jednotlivými sterolmi nachádza množstvo štruktúrnych rozdielov, ktoré sú závislé od toho či sa jedná o rastlinné, živočíšne alebo fungálne steroly.



Obr. 6 Chemická štruktúra sterolov.

A: živočíšny sterol - cholesterol, B: fungálny sterol - ergosterol, C: rastlinný sterol – stigmasterol

Eukaryotické bunky živočíšneho pôvodu syntetizujú cholesterol (Obr. 6A), ktorý je dôležitým a nevyhnutným komponentom ich buniek. Cholesterol nie je zahrnutý len vo formovaní bunkových membrán, ale je tiež nevyhnutným prekursorom pre syntézu žlčových

kyselín, vitamínu D a steroidných hormónov. K rastlinným sterolom patrí stigmasterol (Obr. 6C), sitosterol a kampesterol. V rastlinných bunkách sú steroly nevyhnutné nielen pre rast a vývoj organizmu, sú tiež dôležité pre adaptáciu buniek na stres. Hlavným sterolom v membránach vlákňitých húb a kvasiniek je **ergosterol** (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol; Obr. 6B). V čistej forme je bielou kryštalickou látkou, ktorá je dobre rozpustná v tukoch a nerozpustná vo vode. Ergosterol bol prvýkrát izolovaný zo sklerócií parazitickej huby *Claviceps purpurea*, parazitujúcej na žite. Jeho izolácia sa podarila v roku 1889 parížskemu lekárnikovi Charlesovi Tanretovi, ktorý ho pomenoval podľa choroby ergotizmus, ktorú námel' na žite u ľudí spôsoboval. O niekoľko rokov neskôr, v roku 1895 Gérard popísal výskyt ergosterolu v bunkách kvasiniek. Ergosterol je tiež provitamínom pre vitamín D₂, ktorý je známy pod názvom ergokalciferol. Po expozícii UV žiarením, sa ergosterol fotochemickou reakciou transformuje na ergokalciferol cez prekursor nazývaný viosterol. Takto pripravený vitamín D je jediným dostupným zdrojom vitamínu D pre ľudí, ktorých strava neobsahuje žiadne zložky živočíšneho pôvodu.

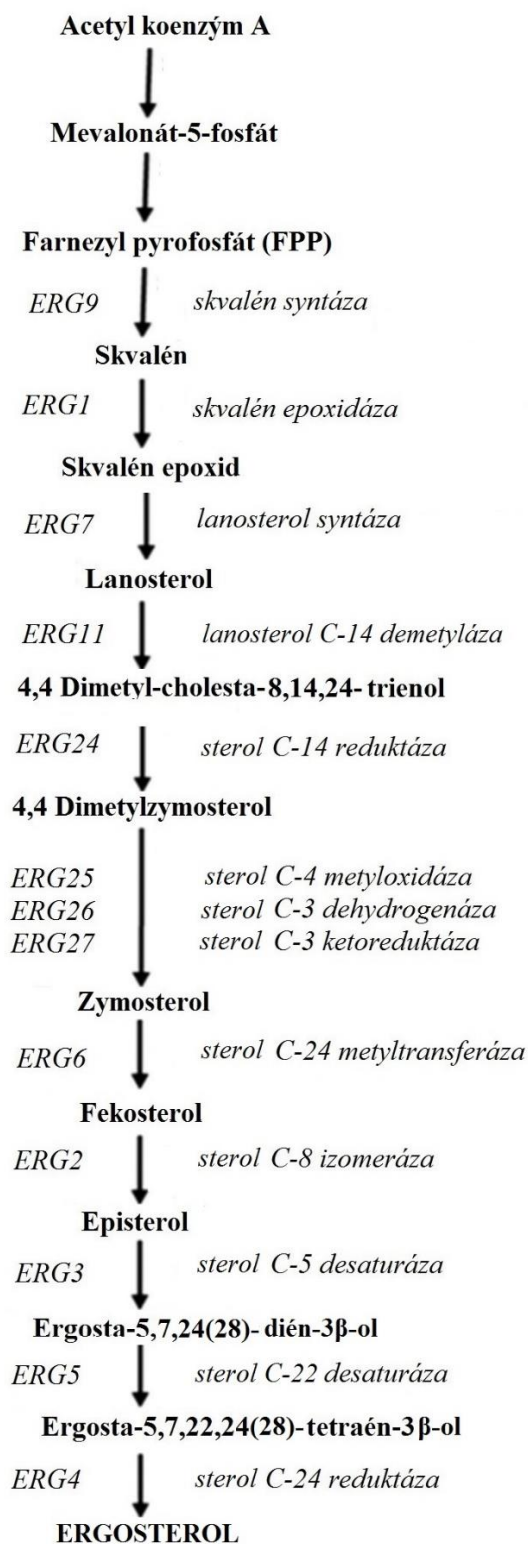
Ergosterol zastáva v bunkách kvasiniek rôzne funkcie, vrátane zabezpečovania optimálnej fluidity cytoplazmatickej membrány a správnej funkcie integrálnych membránových proteínov. Okrem plazmatickej membrány je prítomnosť ergosterolu esenciálna aj pre membrány mitochondrií, pričom sa koncentruje vo vnútornej membráne organely. Spolu so sfingolipidmi sa ergosterol zúčastňuje formovania mikrodomén v plazmatickej membráne, nazývaných lipidové rafty, v ktorých sú lokalizované mnohé, biologicky dôležité proteíny, ako sú efluxné pumpy, sodík a draslík transportujúce proteíny, receptory a transportéry rôznych živín. V lipidových raftoch sa uskutočňujú dôležité reakcie pre funkciu bunky, vrátane odpovede buniek na stres. Lipidové rafty zohrávajú tiež úlohu v adaptácii buniek na podmienky vonkajšieho prostredia. Nadbytok ergosterolu v bunkách sa uchováva vo forme sterylesteroov v lipidových kvapôčkach v cytozole buniek, ktoré slúžia ako zásobáreň sterolov pre udržanie potrebnej homeostázy sterolov v bunkách. Zistilo sa, že schopnosť kvasiniek tolerovať stres úzko súvisí s množstvom ergosterolu v ich bunkách. Bunky kvasiniek, ktoré sú rezistentné voči chladu majú vyšší obsah ergosterolu ako bežné kvasinky. Zvýšená koncentrácia alkoholu v kultivačnom médiu vedie rovnako k zvýšenej produkcii ergosterolu a jeho množstva v cytoplazmatickej membráne, čím sa kvasinky *S. cerevisiae* snažia eliminovať poškodenie cytoplazmatickej membrány a zachovať jej normálnu permeabilitu. Kvasinky *S. cerevisiae* s narušenou biosyntetickou dráhou ergosterolu sú citlivejšie na laktóny a oxidačný stres.

Biosyntéza ergosterolu je komplexný proces, ktorý zahŕňa množstvo enzýmov, vyžaduje značné množstvo energie a prítomnosť kyslíka. V bunkách kvasiniek vyžaduje biosyntéza jednej molekuly ergosterolu najmenej 24 molekúl ATP a 16 molekúl NADPH. Biosyntéza ergosterolu sa uskutočňuje v membráne endoplazmatického retikula zložitou kaskádou vyše 20-tich reakcií, ktoré sú katalyzované 25 rôznymi enzýmami (Obr. 7). Podľa medziproduktov biosyntetickej dráhy ergosterolu, môžeme jeho biosyntézu rozdeliť na 3 fázy – biosyntéza mevalonátu, biosyntéza farnezylpyrofosfátu (FPP) a biosyntéza ergosterolu. Prvá fáza pozostáva z troch krokov, a je konzervovaná u všetkých eukaryotov. Biosyntéza ergosterolu začína kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Druhá fáza biosyntézy ergosterolu zahŕňa syntézu farnezylpyrofosfátu z mevalonátu. Tretia fáza biosyntézy ergosterolu zahŕňa 15 krokov od FPP po ergosterol. V porovnaní s prvými dvomi fázami je tretia fáza komplexnejšia a vyžaduje účasť viacerých enzýmov. Vytvorený ergosterol je následne transportovaný z miesta syntézy do cytoplazmatickej membrány. Transport sterolov medzi organelami eukaryotickej bunky je na energii (ATP) závislý proces uskutočňujúci sa vezikulárnym, alebo nevezikulárnym spôsobom. Vzhľadom na nerozpustnosť sterolov vo vodnom roztoku teda aj v cytozole, je ich transport pravdepodobne viazaný na kontaktné miesta membrán organel, alebo na lipid viažuce/transferujúce proteíny.

Obsah ergosterolu je v bunkách kvasiniek prísne regulovaný. Regulácia množstva ergosterolu je sprostredkovaná na transkripčnej, translačnej a posttranslačnej úrovni. Predpokladá sa, že enzýmy biosyntetickej dráhy ergosterolu pri regulácii množstva ergosterolu v bunkách vzájomne spolupracujú.

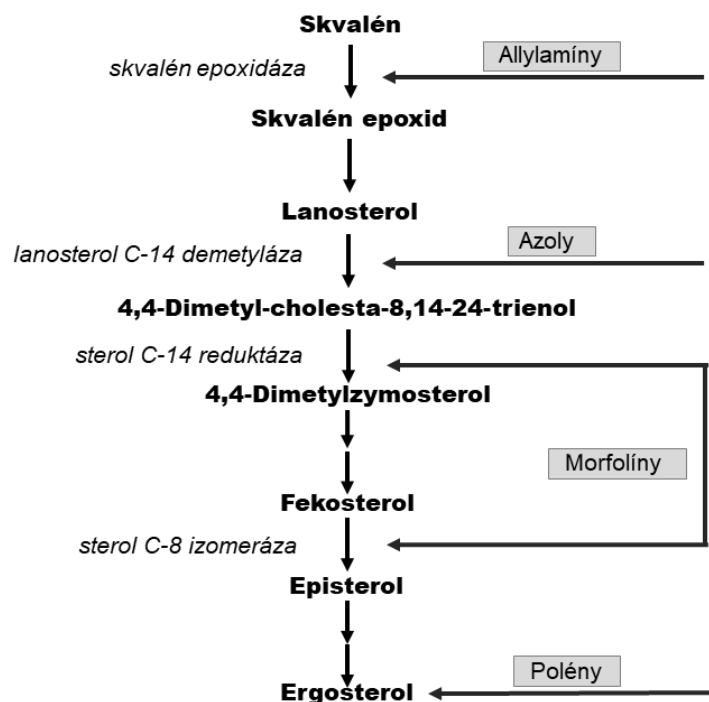
Proces biosyntézy sterolov vyžaduje prítomnosť kyslíka. V podmienkach hypoxie bunky kvasiniek *S. cerevisiae* ergosterol nesyntetizujú, ich životaschopnosť je závislá na príjme sterolov z vonkajšieho prostredia. K biosyntéze ergosterolu nedochádza ani v prípade, keď kvasinky *S. cerevisiae* rastú v médiu s nedostatkom železa. V týchto podmienkach dochádza k akumulácii prekursorov biosyntézy ergosterolu - skvalénu a lanosterolu.

S ohľadom na to, že bunky kvasiniek nie sú schopné degradovať steroly, je homeostáza sterolov, ako aj eliminácia toxického vplyvu nadmerného množstva sterolov v bunke, zabezpečovaná premenou sterolov na sterylestery, ktoré sa uskladňujú v lipidových kvapôčkach, príp. sa z buniek vylučujú.



Obr. 7 Biosyntéza ergosterolu u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

Cicavčie bunky ergosterol neobsahujú, syntetizujú štruktúrne príbuznú molekulu cholesterol. Táto skutočnosť je dôvodom, že samotný ergosterol a dráha jeho biosyntézy v rôznych krokoch sa stávajú významným cieľom pre pôsobenie existujúcich a nových antifungálnych látok (Obr. 8), ktoré by sa dali použiť v terapii fungálnych infekcií u ľudí, zvierat aj rastlín. V súčasnosti sa v klinike najčastejšie používajú antimykotiká zo skupiny azolov a polyénov. Azolové antimykotiká pôsobia prostredníctvom kompetitívnej inhibície enzýmu C14 lanosterol demetylázy, kódovanej génom *ERG11*. V prípade inhibície Erg11p sa v bunkách kvasiniek aktivuje alternatívna biosyntetická dráha. V dôsledku toho dochádza v bunkách k akumulácii lanosterolu a fungistatických na uhlíku C14 metylovaných toxických prekursorov (14- α -metylergosta 8-24 (28) dienol) a poklesu množstva ergosterolu. Polyény (nystatín a amfotericín B) selektívne interagujú s ergosterolom v membránach kvasiniek, v ktorých vytvárajú póry a tým bunky usmrcujú. Allylamíny fungujú podobne ako azoly, inhibujú enzým skvalénepoxidázu, ktorá je kódovaná génom *ERG1*, čím dochádza k hromadeniu medziproduktu - skvalénu na úkor ergosterolu a následne k porušeniu integrity membrán buniek kvasiniek. Enzýmy C14-sterol reduktáza, kódovaná génom *ERG24*, a C8-sterol izomeráza, kódovaná génom *ERG2*, sú cieľovými miestami pre morfolíny (napr. amorolfín). Pôsobením morfolínov dochádza v bunkách kvasiniek k nahromadeniu ignosterolu (ergosta-8,14-dienol) na úkor ergosterolu. Vzhľadom na významné postavenie ergosterolu ako cieľovej štruktúry mnohých liečiv, je pochopenie funkcie génov podieľajúcich sa na metabolizme ergosterolu dôležité pre efektívny boj s neustále narastajúcou rezistenciou patogénnych kvasiniek voči cytotoxickým zlúčeninám.



Obr. 8 Cieľové miesta antifungálnych látok v biosyntetickej dráhe ergosterolu

Mnohé patogénne kvasinky sú rezistentné voči aplikovaným terapeutikám, pričom za jeden z hlavných mechanizmov rezistencie voči antifungálnym látkam sa považuje nadexpresia membránových transportérov patriacich do rodiny ABC a MFS transportérov, ktoré zabezpečujú zníženie intracelulárnej hladiny liečiva v bunke. U klinických izolátov patogénnych kvasiniek sa často pozoruje zvýšená expresia génov, špecifikujúcich uvedené transportné proteíny, resp. proteíny, z uvedených skupín transportérov majú zvýšenú efluxnú aktivitu. Rezistencia buniek voči azolom môže byť tiež dôsledkom zmien v biosyntetickej dráhe ergosterolu, ako je nadexpresia, príp. bodové mutácie v génoch *ERG11*, *ERG2*, *ERG3* a *ERG6*, ktoré vedú k inkorporácii štruktúrne modifikovaných sterolov do membrán kvasiniek. V bunkách kvasiniek *Candida albicans* rezistentných voči flukonazolu bola pozorovaná aj zvýšená expresia génov *CDR1* a *CDR2*, kódujúcich ABC membránové transportéry, a taktiež sa pozorovali znížené hladiny ergosterolu v bunkách a znížená fluidita membrány. Napriek uvedenému bola popísaná rezistencia buniek kvasiniek voči polyénom bez akejkoľvek zmeny v biosyntetickej dráhe ergosterolu. To by mohlo naznačovať, že zmeny v biosyntéze lipidov sú len jedným z mechanizmov pozorovanej rezistencie buniek kvasiniek voči polyénom.

2.2. Proteíny biomembrán

Jedinečná funkcia každej biomembrány je determinovaná prevažne zastúpením integrálnych a s membránou asociovaných proteínov. Percentuálne zastúpenie proteínov sa líši v závislosti od funkcie danej biologickej membrány. Membránové proteíny, na rozdiel od lipidov, majú svoje špecifické miesto v membráne, kde vykonávajú svoje funkcie. Odhaduje sa, že 20-30% genómu eukaryotov tvoria gény kódujúce membránové proteíny, ktoré zabezpečujú transdukciiu informácie cez dvojvrstvu lipidov, čím umožňujú komunikáciu buniek s vonkajším prostredím. Transmembránové domény proteínov sú vnorené do membrány a interagujú s prítomnými lipidmi dvojvrstvy. Lipidy sú schopné regulovať funkciu proteínov lokalizovaných v membráne buď priamou moduláciou ich funkcie, alebo nepriamo, zmenou fyzikálnych vlastností membránovej dvojvrstvy. Niektoré membránové proteíny vykazujú špecifitu k určitým druhom lipidov, ktoré sú rozhodujúce pre determinovanie vlastností príslušného proteínu. Proteínové molekuly vykazujú odlišné kinetické vlastnosti v prípade, keď sú obklopené fosfolipidmi v usporiadanom alebo v neusporiadanom stave.

Do skupiny integrálnych bielkovín patria také, ktoré nemôžeme oddeliť od lipidovej dvojvrstvy napríklad pôsobením vyššej teploty alebo silných detergentov. Vyznačujú sa tým, že často prestupujú naprieč lipidovou dvojvrstvou. Oblasti integrálnych bielkovín prechádzajúce cez membránu majú na svojom povrchu hydrofóbne bočné reťazce aminokyselín, ktoré interagujú s reťazcami mastných kyselín fosfolipidov membrány. Zníženie vnútramolekulej energie uhl'ohydrátového reťazca aminokyselín v nepolárnej časti membrány zabezpečuje sekundárna štruktúra proteínu. Najčastejšie je to α -helix. Integrálne bielkoviny membrány môžu tiež asociovať uplatňovaním elektrostatických síl, na základe ktorých sú schopné vytvárať v membráne zložitejšie kvartérne štruktúry. Druhým typom proteínov biomembrán sú tzv. periférne bielkoviny viazané na membránu nekovalentnou väzbou. Periférne proteíny sa viažu tak k hydrofilným častiam lipidov ako aj k integrálnym bielkovinám membrány. Periférne bielkoviny sa nachádzajú prevažne na extracelulárnej strane biologickej membrány, sú vo vode rozpustné a izolujú sa prostredníctvom roztokov s vysokou iónovou silou, alebo pri extrémnych hodnotách pH.

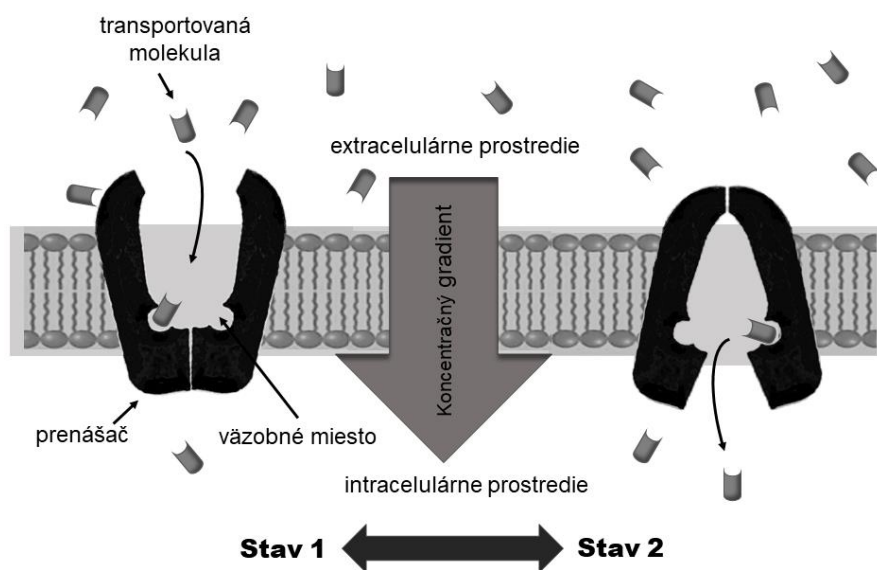
3. FUNKCIE BIOMEMBRÁN

Transport cez biomembrány

Cytoplazmatická membrána oddeľuje vnútro bunky od vonkajšieho prostredia, ale neizoluje bunku úplne. Pre zachovanie existencie bunky musí byť zabezpečený tesný kontakt medzi bunkou a vonkajším prostredím. Látky, dôležité pre životné procesy do bunky vstupujú, a odpadové produkty metabolizmu bunka vylučuje. Transport veľkých hydrofilných molekúl (napr. glukózy) alebo iónov (Na^+ , K^+), ktorých difúzia naprieč membránou je výrazne obmedzená, zabezpečujú membránové transportné proteíny dvoch základných typov: prenášače a kanály. Transportéry cytoplazmatickej membrány zabezpečujú vylúčenie intracelulárnych zložiek do média, kým ostatné transportéry, lokalizované vo vnútrobunkových membránach, katalyzujú eflux látok z/do organel: mitochondrií, vakuol, peroxizómov. V prípade transportu prostredníctvom prenášača sa špecifická molekula naviaže na prenášač na jednej strane membrány a sériou jeho konformačných zmien sa preniesie cez dvojvrstvu na druhú stranu membrány. Kanál naopak vytvára v membráne mikroskopický vodou vyplnený pór, ktorý v otvorenom stave umožňuje určitému druhu molekúl, napr. iónov určitej veľkosti a náboja prechod naprieč membránou. Transport prostredníctvom kanálov je výrazne rýchlejší než transport zabezpečovaný prenášačmi. Nízka transportná rýchlosť prenášačov je daň za špecifickosť ich transportného mechanizmu.

Z hľadiska nutnosti energie pre transport rozlišujeme **pasívny** a **aktívny** transport. Kanály môžu realizovať výlučne pasívny transport, zatiaľ čo prenášače sú v princípe schopné aktívneho i pasívneho transportu. Pri pasívnom transporte je hnacou silou gradient koncentrácie transportovanej molekuly naprieč membránou. K pasívnemu transportu zaraďujeme difúziu, osmózu a uľahčenú difúziu. Pasívny transport látok sa môže uskutočňovať priamo cez membránu, alebo prostredníctvom rôznych iónových kanálov. Poznáme kanály ovládané napätím, ligandom, mechanicky alebo náhodne otvárané. Na prenos vody zvyčajne slúžia kanály nazývané aquaporíny. Na tento typ transportu nie je potrebná energia. Látky sa samovoľne pohybujú podľa svojho koncentračného, osmotického alebo elektrického gradientu. Difúzia sa uskutočňuje vždy po koncentračnom spáde difundovanej látky, čiže smer pohybu je určený snahou vyrovnať koncentráciu látky v oboch kompartmentoch. Semipermeabilná

membrána priepustná len pre rozpúšťadlo oddeľuje roztoky s rôznymi koncentraciami. Rozpúšťadlo prestupuje z prostredia s nižšou koncentráciou do prostredia s vyššou koncentráciou rozpustených látok. Tento jav pokračuje, až kým sa koncentrácie rozpustených látok nevyrovnejú. Osmotický tlak je definovaný ako tlak potrebný na zastavenie osmózy. Pri uľahčenej difúzii sa na transport látky využívajú bielkovinové prenášače zakotvené v membráne. Od jednoduchej difúzie sa odlišuje hlavne v tom, že pri neustálom zvyšovaní koncentrácie difundovanej látky sa kapacita prenášačov môže nasýtiť a rýchlosť uľahčenej difúzie prestáva byť pri vysokých koncentráciách priamo úmerná koncentrácii difundovanej látky. Príkladom uľahčenej difúzie je transport jednej molekuly prostredníctvom tzv. uniportéra. **Uniportér** (pasívny prenášač) vykazuje dva základné konformačné stavy – v jednom sú väzobné miesta prístupné látke z extracelulárneho prostredia, v druhom je prístupný z intracelulárneho prostredia (Obr. 9).



Obr. 9 Pasívny transport (uľahčená difúzia sprostredkovaná uniportérom)

Prestup molekúl a iónov cez membránu proti ich koncentračnému alebo elektrickému gradientu za spotreby energie nazývame aktívny transport. Uskutočňuje sa buď prostredníctvom transportných proteínov s ATP-ázovou aktivitou alebo transportérov, ktoré využívajú elektrochemický gradient protónov na membráne. V prvom prípade daný prenášač alebo iónový kanál dokáže využiť energiu z hydrolýzy adenosíntrifosfátu (ATP), ktorý sa

transformuje na adenosín-difosfát (ADP). Ak je transportný proteín v priamom kontakte so zdrojom energie, hovoríme o primárnom aktívnom transporte. Odhliadnuc od transportnej funkcie proteínu, ide v podstate o enzým katalyzujúci hydrolýzu ATP na ADP, v odbornej literatúre súhrne označovaný skratkou ATPáza. ATPázy sa na základe lokalizácie, funkcie, štruktúry, reakčnej schémy a typu iónov, ktoré transportujú, rozdeľujú na nasledujúce základné skupiny: P-ATPázy, F-ATPázy, V-ATPázy a superrodinu ABC transportérov.

P-ATPázy, tvoriace fosforylovaný makroenergetický intermedát, sú prítomné v cytoplazmatickej membráne, ale aj v membránach endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu eukaryotických buniek, ako aj v baktériách. F-ATPázy syntetizujúce ATP, sú prítomné hlavne v mitochondriách a v cytoplazmatickej membráne baktérií. Sú primárnym producentom ATP za použitia protónového gradientu, ktorý vzniká v procese oxidačnej fosforylácie pri transporte elektrónov na finálny akceptor. V-ATPázy lokalizované vo vakuolách eukaryotických buniek, katalyzujú hydrolýzu ATP za účelom transportu molekúl a zníženia pH v organelách eukaryotických buniek. ABC transportéry majú funkciu podobnú F-ATPázam.

V prípade sekundárneho aktívneho transportu, hybnou silou pre transport molekuly proti koncentračnému gradientu je pasívny transport iónov H^+ v smere elektrochemického gradientu, t.j. sekundárny aktívny transport vyžaduje existenciu iného aktívneho transportu. Ak sa transport špecifickej molekuly (napr. sacharidov) aj H^+ iónov uskutočňuje v tom istom smere – z vonkajšieho prostredia do vnútra bunky/organely, prenášač, ktorý takýto transport uskutočňuje, nazývame **symportér**. Ak sa prenos jednotlivých transportovaných molekúl uskutočňuje v navzájom opačných smeroch, ide o **antiport**. Antiportéry sa podieľajú najmä na exporte tých molekúl, ktorých pokojová koncentrácia vo vnútrobunkovom prostredí alebo vnútornom prostredí bunkových organel nesmie prekročiť určitú hornú hranicu. Antiportéry sú často spolu so symportérmi a pumpami pod kontrolou komplexných regulačných mechanizmov, ktoré udržiavajú koncentráciu dôležitých molekúl v bunke v optimálnom rozmedzí.

Transport látok cez membránu nemusí byť sprostredkovaný len proteínovými molekulami. Môže tiež dochádzať k vytvoreniu hydrofilného póru z fosfolipidov, ktorého prítomnosť zabezpečí priepustnosť membrány pre vodu a v menšej miere aj pre ióny a iné hydrofilné molekuly. V prípade zlyhania kontroly prenosu látok cez bunkové membrány často dochádza k smrti bunky.

Transportné proteíny kvasiniek je možné rozdeliť do dvoch základných typov – primárne a sekundárne. Primárne transportéry označované ako ABC transportné proteíny

získavajú energiu potrebnú pre transport látok von z bunky hydrolýzou ATP. Sekundárne transportéry (MFS transportné proteíny) využívajú na transport látok cez membránu koncentračný gradient protónov vodíka alebo kationov sodíka.

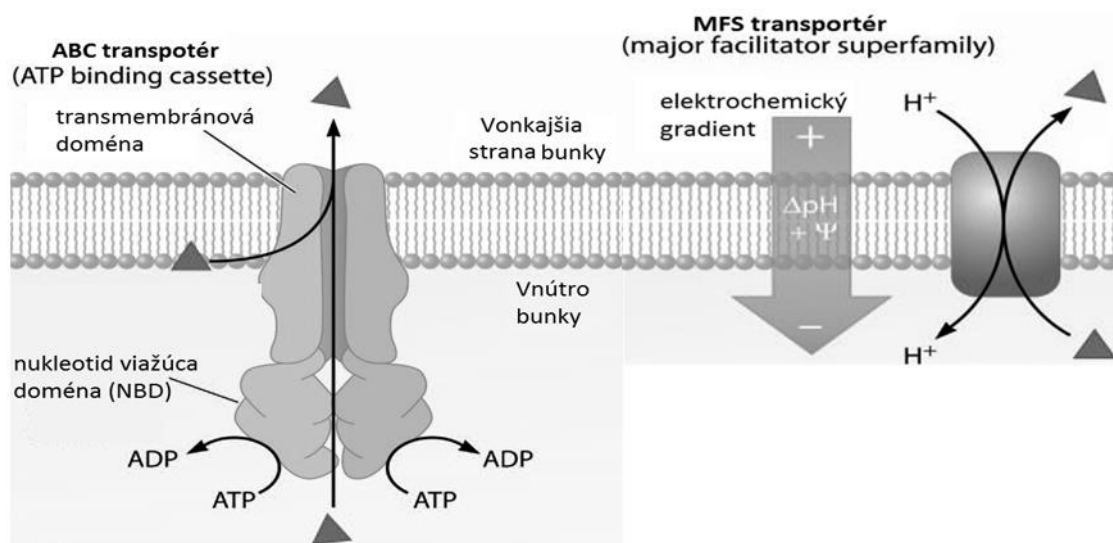
Rodina ABC transportérov je najväčšia a pravdepodobne aj najdôležitejšia z rodín membránových transportérov. Skratka ABC pochádza z anglického označenia ATP binding cassette (ATP viažuca kazeta), ktorej prítomnosť v proteíne je znakom určujúcim jeho príslušnosť k tejto rodine. ABC motív je silne konzervovaný a nachádza sa u zástupcov všetkých foriem života od baktérií až po človeka. ATP väzbové miesta ABC transportérov pre optimálnu činnosť vyžadujú prítomnosť Mg^{2+} iónov. Pre ATPázy je charakteristickou črtou možnosť modulovať svoju aktivitu prostredníctvom rôznych inhibítorov. ABC transportéry sa klasifikujú podľa štrukturálnych a funkčných parametrov do 7 skupín: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG.

Evolučne konzervované transportné proteíny z rodiny ABC zabezpečujú transport veľkého množstva štrukturálne odlišných hydrofóbných substrátov cez biologické membrány. Membránové transportné proteíny typu ABC sa u kvasiniek nachádzajú v rôznych bunkových membránach, kde sa zúčastňujú na kontrole rezistencie buniek voči cytotoxickým látkam a oxidatívne stresu, v procese bunkovej detoxifikácie, rovnako sa podieľajú aj na kontrole mitochondriálnych a peroxizomálnych funkcií, udržiavaní homeostázy organizmu a pri sekrécii feromónov. S ohľadom na význam rôznych druhov lipidov v bunkovej fyziológii živých organizmov je v bunkách nevyhnutná ich správna distribúcia. Niektoré ABC transportné proteíny zabezpečujú homeostázu membránových lipidov a zároveň aj reguláciu permeability membrány svojou účasťou na distribúcii fosfolipidov v membráne. Efluxné pumpy sa môžu tiež podieľať na odstraňovaní poškodených oxidovaných foriem lipidov z membrány.

ABC proteíny sú schopné translokácie rôznych zlúčenín, obsahujúcich ióny ťažkých kovov, steroidy, mykotoxíny, antibiotiká, protinádorové liečivá, ale aj celé proteíny. V sekvencii genómu *S. cerevisiae* bolo identifikovaných 32 génov kódujúcich membránové transportné proteíny typu ABC, ktoré sú klasifikované do 6 skupín: ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG. V štruktúre ABC proteínov rozoznávame nukleotid-viažucu doménu (NBD), ktorá viaže a hydrolyzuje ATP, čím získava energiu na eflux transportovanej molekuly cez membránu a hydrofóbnu doménu, ktorá sa skladá z transmembránových segmentov/domén (TMS/TMD), determinujúcich substrátovú špecificitu ABC proteínov. Transmembránové domény tvorí spravidla 6 transmembránových helixov.

Topológia ABC transportérov. Rozoznávame tzv. úplné transportéry, ktoré sú najčastejšie tvorené sekvenciou: N-koniec -TMD1 - NBD1 - TMD2 - NBD2 -C-koniec (Obr.

ABC transportéry z rodiny ABCG, ktorá je známa aj ako rodina PDR (pleiotropic drug



Obr. 11 Schéma mechanizmu fungovania ABC a MFS transportérov. Protónový gradient sa vytvára translokáciou protónov (H^+) pomocou ATPázy v membráne

MFS (major facilitator superfamily) transportné proteíny boli pôvodne definované ako superrodina permeáz, ktoré pozostávajú z niekoľkých transmembránových a α -helikálnych segmentov spojených cytoplazmatickou slučkou. Proteíny patriace do rodiny MFS tvoria veľkú skupinu homologických membránových transportérov, vyskytujúcich sa u prokaryotických aj eukaryotických organizmov. Fungujú ako sekundárne aktívne transportéry, využívajúce symport, uniport a antiport na vylučovanie štruktúrne aj funkčne odlišných látok (Obr. 11). MFS transportéry majú v porovnaní s ABC transportérmi užšiu substrátovú špecificitu. MFS proteín obsahuje spravidla 12 alebo 14 transmembránových hydrofóbnych oblastí.

4. FYZIKÁLNE VLASTNOSTI BIOMEMBRÁN

Membránová fluidita

Biologická membrána je vysoko dynamická štruktúra. Vodné prostredie vnútri bunky a mimo nej znemožňuje lipidom opustiť dvojvrstvu, ale uvedeným molekulám nič nebráni v tom, aby sa pohybovali v samotnej membráne a vymieňali si navzájom svoje miesta v priestore dvojvrstvy. Membrána sa preto chová ako dvojrozmerná tekutina. Jednotlivé typy pohybu majú rozdielnu početnosť výskytu. Membránová fluidita teda predstavuje schopnosť membrány správať sa ako dvojrozmerná tekutina, čo znamená, že v rámci dvojvrstvy sa môžu lipidy pohybovať a vymieňať si svoje miesta. Pohyby, ktoré vykonávajú fosfolipidy v membráne sú nasledovné:

- laterálna difúzia – výmena miesta so susediacimi molekulami (časté)
- preklápanie (flip-flop) z jednej monovrstvy membrány na druhú (veľmi zriedkavé),
- rotácia okolo pozdĺžnej osi molekuly (rýchle).

Asymetria proteínov je absolútna - neexistuje teda preklápanie proteínov z jednej strany membrány na druhú. Orientácia proteínov v membráne je podmienená ich biologickou funkciou. Pre cytoplazmatickú membránu kvasiniek je typická pomalá difúzia lipidov a proteínov.

Stupeň tekutosti bunkovej membrány (ľahkosť s akou sa prítomné molekuly lipidov pohybujú v rovine dvojvrstvy) je dôležitý pre funkciu samotnej membrány a musí byť udržiavaný v určitých medziach. Pri znížení teploty spôsobí pokles tepelnej energie zníženie rýchlosti pohybu lipidov, v dôsledku čoho sa dvojvrstva stáva menej tekutou. Miera tekutosti pri danej teplote závisí na druhu fosfolipidov, z ktorých sa dvojvrstva skladá a na povahe uhl'ohydrátových reťazcov mastných kyselín (najmä na ich dĺžke a stupni nenasýtenosti). Čím tesnejšie a pravidelnejšie sa môže reťazec mastnej kyseliny v membráne usporiadať, tým viskóznejšia a menej tekutá dvojvrstva bude.

Tekutosť membrány je pre bunku dôležitá z viacerých dôvodov:

- Umožňuje membránovým proteínom rýchle difundovať v rovine membrány a navzájom interagovať, čo má význam pri bunkovej signalizácii.

- Poskytuje jednoduchý spôsob distribúcie membránových lipidov a proteínov z miest, kde boli po svojej syntéze začlenené do membrány, do iných miest v bunke.
- Umožňuje membránam vzájomnú fúziu, ktorá vedie k zmiešaniu molekúl rôznych membrán a zaisťuje rovnomerné rozdelenie zložiek membrány medzi dcérske bunky pri bunkovom delení.

Fluiditu, resp. usporiadanosť lipidovej dvojvrstvy membrány ovplyvňujú mnohé faktory. Z fyzikálnych faktorov je najvýznamnejšia teplota prostredia, v ktorom sa membrána nachádza. Závisí aj od mechanických zmien membrány pri zmršťovaní a zväčšovaní sa bunky, čo sa prejavuje zmenami vo vzdialenosti medzi molekulami dvojvrstvy a súvisí teda aj s ich špecifickým objemom. S narastajúcim špecifickým objemom molekúl lipidov usporiadanosť membrány klesá. Objem molekúl súvisí aj s hydrostatickým tlakom, ktorý pôsobí na membránu. Keďže molekuly proteínov sú relatívne nestlačiteľné, efekt tlaku sa prejavuje hlavne na lipidovej zložke dvojvrstiev membrány. S narastajúcim tlakom fluidita membrány klesá po určitú hraničnú hodnotu, od ktorej pri ďalšej zmene tlaku už nedochádza k jej zmenám. Hoci malý, ale pozorovateľný nárast v usporiadanosť lipidovej dvojvrstvy spôsobuje aj vznik membránového potenciálu naprieč lipidovou dvojvrstvou. Tento efekt je pravdepodobne spojený so vznikom elektrickej energetickej bariéry pôsobiacej proti pohybu molekúl. Podobným spôsobom fluiditu membrány ovplyvňuje aj pH prostredia, s nárastom ktorého vznikajú na membráne povrchové náboje, čo vedie k poklesu usporiadanosť lipidovej dvojvrstvy. Uvedený efekt sa vysvetľuje vychýľovaním acylových reťazcov fosfolipidov pôsobením povrchového náboja.

Z chemických modulátorov fluidity membrány zastávajú významné miesto steroly, ktoré za fyziologických podmienok vystupujú ako membránne „stužovače“. Ich efekt je sprostredkovaný jednak v celkovom náraste mikrofluidity, ako aj v náraste parametra usporiadanosť lipidovej dvojvrstvy. Tvar molekúl sterolov umožňuje ich vkladanie medzi acylové reťazce polárnych lipidov tak, že zvyšujú usporiadanosť v tekutej fáze (kondenzujúci efekt) a v tuhej fáze ju zas znižujú (skvapalňujúci efekt). Ďalším významným modulátorom fluidity membrány je charakter acylových reťazcov lipidov membrány, konkrétne stupeň ich nasýtenosti a v menšej miere aj celková dĺžka acylového reťazca. Prítomnosť dvojitej (nenasýtenej) väzby v molekule mastnej kyseliny zvyšuje špecifický objem molekuly lipidu, čo vedie k zmene (zníženiu) usporiadanosť v danom elemente. Mikroorganizmy majú schopnosť meniť acylové zloženie lipidov svojich membrán v snahe kompenzovať „stužujúci“ účinok nízkych teplôt prostredia a takto udržiavať viac-menej konštantný stupeň fluidity membrány

(homoviskózna adaptácia). Za týmto účelom disponujú enzýmami nazývanými saturázy a dehydrázy, aktivitou ktorých sú schopné zvýšiť počet dvojitých (nenасыtených) väzieb medzi uhlíkmi v molekule mastnej kyseliny, resp. skrátiť dĺžku acylových reťazcov. Homoviskóznú adaptáciu využívajú kvasinky aj pri obrane pred účinkami cytotoxických látok. Ako príklad možno uviesť zvýšenú koncentráciu etanolu v prostredí, ktorá vedie k zvýšenej fluidite a permeabilite membrán mikroorganizmov. Bunky kvasiniek znižujú fluiditu svojich membrán zvyšovaním nasýtenosti acylových reťazcov mastných kyselín v membránových lipidoch.

Fosfatidyletanolamín taktiež ovplyvňuje fluiditu membrán. Jeho polárna aminoskupina má schopnosť vytvárať vodíkové väzby s okolitými fosfátovými skupinami, čo prispieva k zvyšovaniu usporiadanosti membrány. Fosfatidylcholín a ostatné glycerofosfolipidy na druhej strane spôsobujú skôr znižovanie usporiadanosti membrány. Proteíny sa v membránach správajú podobne ako steroly - znižujú usporiadanosť lipidov v tuhej fáze a naopak, v tekutej fáze ju zasa zvyšujú. Lipidy v blízkosti proteínov sú čiastočne imobilizované a ich usporiadanosť sa s narastajúcou vzdialenosťou od proteínov znižuje.

Membránový potenciál

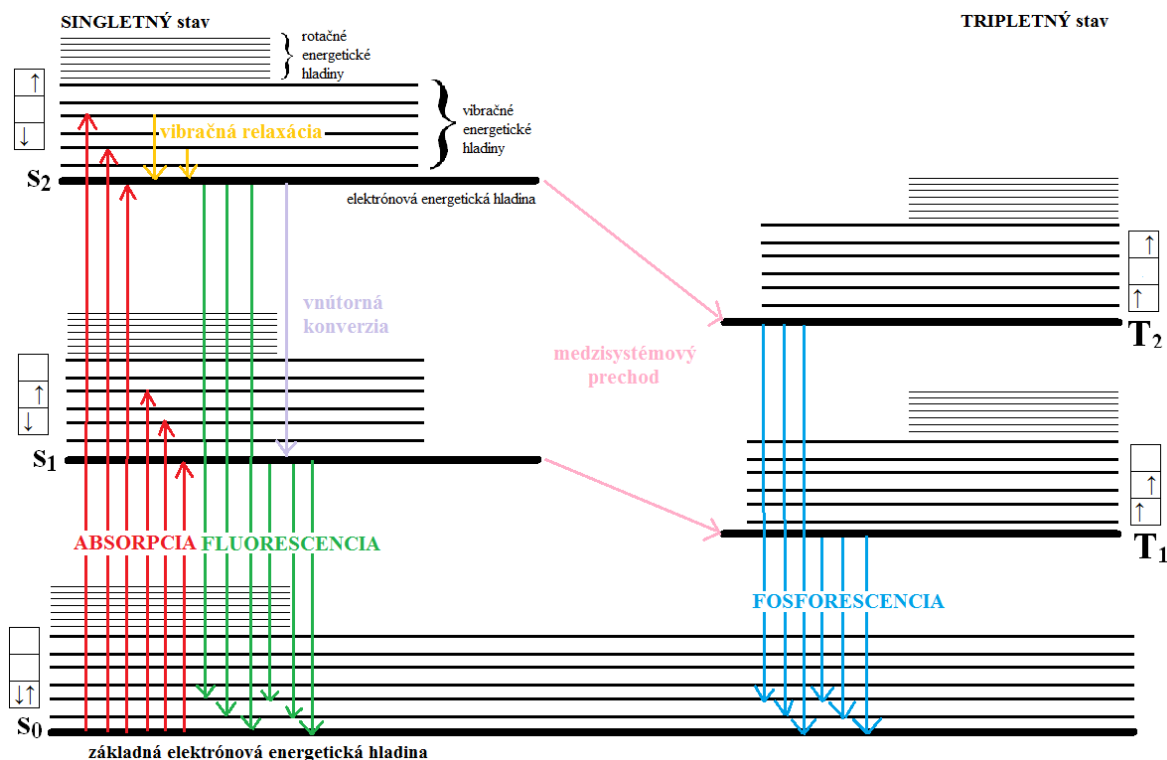
Ďalšou vlastnosťou spojenou s cytoplazmatickou membránou, ktorej stav je nevyhnutný pre prežitie bunky, je membránový potenciál. Cytoplazmatická membrána vystupuje ako bariéra, ktorá udržiava medzi extra- a intracelulárnym prostredím koncentračný gradient mnohých malých iónov, hlavne K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} a H^+ . V dôsledku nerovnakej koncentrácie iónov vznikajú na oboch stranách membrány rozdiely v elektrickom náboji, ktorý sa označuje ako membránový potenciál. Udržanie koncentračného gradientu iónov naprieč membránou je kľúčové pre zachovanie osmotickej rovnováhy bunky. Keďže centrálna časť lipidovej dvojvrstvy membrány je hydrofóbna a neprepúšťa polárne látky, cytoplazmatická membrána za svoju permeabilitu pre ióny vďaka prítomným proteínom - selektívnym iónovým kanálom. Hoci sú za vznik koncentračného gradientu iónov (a v konečnom dôsledku teda aj membránového potenciálu) zodpovedné iónové pumpy, práve iónové kanály zodpovedajú za nastavenie konečnej hodnoty pokojového potenciálu prostredníctvom ustálenej hodnoty iónových prúdov, ktoré smerujú k zrušeniu iónových gradientov a dosiahnutiu termodynamicky rovnovážneho stavu. Zatiaľ čo v živočíšnych bunkách je hlavnou iónovou pumpou Na^+/K^+ -ATPáza, v bunkách kvasiniek je hlavnou iónovou pumpou H^+ -ATPáza. U kvasiniek *S. cerevisiae* sa hodnota membránového potenciálu pohybuje okolo - 71 mV, táto hodnota je

porovnateľná s hodnotou membránového potenciálu ľudských buniek (okolo - 90 mV). U patogénnych kvasiniek druhu *Candida albicans* je hodnota membránového potenciálu okolo - 120mV, ktorá je porovnateľná s hodnotou membránového potenciálu patogénnych baktérií (- 130 – - 150 mV). Bunky kvasiniek *C.albicans* sú schopné aktívne meniť membránový potenciál, ako odpoveď na zmenené rastové podmienky, taktiež sa táto hodnota mení v závislosti od rastovej fázy buniek. V prípade, že je aktuálna hodnota membránového potenciálu pozitívnejšia ako je pokojový potenciál, hovoríme o depolarizácii membrány. Naopak, ak je membránový potenciál negatívnejší ako pokojový potenciál, membrána je hyperpolarizovaná. Pojmom repolarizácia označujeme návrat membránového potenciálu na pokojovú hodnotu po predchádzajúcej depolarizácii alebo hyperpolarizácii.

Využitie fluorescence pre meranie vybraných membránových vlastností kvasiniek

Luminiscencia je jav, pri ktorom dochádza k emisii fotónov z molekúl v excitovanom stave. Excitovaný stav je stav kedy sa elektrón / elektróny molekuly excitáciou prenesú zo základného energetického stavu molekuly do vyššieho energetického stavu. Ak je excitácia molekuly spôsobená fotónmi, hovoríme o fotoluminiscencii. Elektrónové prechody v molekule môže sprevádzať emisia žiarenia (tzv. žiarivé prechody) alebo nie (tzv. nežiarivé prechody). Pri žiarivých prechodoch dochádza ku vyžiareniu fotónu a následnému návratu elektrónu do základného energetického stavu. Pri nežiarivých prechodoch dochádza ku premene energie excitovaného stavu na tepelnú energiu, ktorá je vyžiarená do okolia a následnému návratu elektrónu do základného energetického stavu.

- Nežiarivé prechody:
 - Vibračná relaxácia – prechod v rámci vibračných hladín jednej elektrónovej hladiny
 - Vnútna konverzia – prechod medzi elektrónovými hladinami pri zachovávaní energie aj multiplicity
 - Medzisystémová konverzia – medzisystémový prechod, kde sa zachováva energia, ale dochádza k zmene multiplicity
- Žiarivé prechody, využívané v spektroskopii sú znázornené na obrázku 12. Patria medzi ne:
 - Absorpcia (A) dochádza k zvýšeniu energie a zachovaniu multiplicity
 - Fluorescencia (F) dochádza k zníženiu energie pri zachovaní multiplicity
 - Fosforescencie (P) dochádza k zníženiu energie a zmene multiplicity.



Obr. 12 Schéma Jablonského diagramu

Jablonského diagram popisuje rôzne molekulárne procesy, ku ktorým dochádza po absorpcii fotónov. Absorpciou fotónu je molekula excitovaná do singletových stavov S1 alebo S2. Pri excitácii do vyššej vibračnej hladiny stavu S2 sa elektróny procesom vibračnej relaxácie dostanú na najnižšiu vibračnú hladinu stavu S2. Následnou vnútornou konverziou dochádza ku prechodu molekuly do stavu S1. Vnútorná konverzia je zvyčajne ukončená pred začiatkom emisie (doba trvania 10-12 s). Dôsledkom emisie do vyšších vibračných základných stavov je zrkadlový obraz emisného a absorpčného spektra (S0 na S1). Táto podobnosť sa vyskytuje, pretože excitácia nemení jadrovú geometriu a rozstup úrovní vibračných stavov excitovaného stavu je podobný rozstupu úrovní základného stavu. Molekuly v stave S1 môžu podstúpiť medzisystémovú konverziu do tripletového stavu T1, pri ktorom dôjde ku zmene spinu. Emisia fotónu z T1, označovaná ako fosforescencia je charakterizovaná v porovnaní s fluorescenciou nižšou energiou (dlhšie vlnové dĺžky). Prechod z T1 do singletového základného stavu je zakázaný a výsledkom je, že rýchlostné konštanty pre emisiu z tripletového stavu sú o niekoľko rádov menšie ako hodnoty pre fluorescenciu. Štandardná doba života fluorescencie je v milisekundách až sekundách.

Optická spektroskopia sa sústreďuje na štúdium elektrónových prechodov medzi energetickými hladinami elektrónov, pričom sa energia fotónu zhoduje s energetickým rozdielom určitých dvoch stacionárnych stavov v molekule. Spektroskopia sa zaoberá všetkými vlastnosťami svetelnej vlny ako sú: frekvencia, vlnová dĺžka, fáza, amplitúda, intenzita, energia

a polarizácia. Keď svetlo interaguje s látkou, jeden z uvedených parametrov svetla sa mení. Obyčajne je to vlnová dĺžka absorbovaného žiarenia, ktorá je charakteristická pre absorbujúcu vzorku alebo chromofór. Chromofór predstavuje skupinu atómov, viazanú špecifickými väzbami, ktoré sú schopné absorbovať fotóny z UV a VIS oblasti elektromagnetického žiarenia. Takto sme schopní rozlíšiť jednotlivé látky, pretože každá má unikátne spektrum. Svetlo môže interagovať s látkou tromi spôsobmi: môže byť absorbované, dochádza k jeho transmisii (prechádza) alebo sa odrazí (reflektované). Na to, aby bola látka schopná fluorescencie musí obsahovať tzv. fluorofóry, t.j. skupiny schopné absorbovať svetlo určitej vlnovej dĺžky a následne emitovať svetlo inej vlnovej dĺžky. Fluorofóry sa delia na dve hlavné skupiny: exogénne a endogénne. Endogénne fluorofóry sa vyskytujú v bunkách prirodzene (napr. aromatické aminokyseliny, NADH, flavíny, deriváty pyridoxylu, chlorofyl), na rozdiel od exogénnych fluorofórov. Exogénne fluorofóry sa pridávajú ku vzorkám v prípade ak vzorka nefluoreskuje, alebo je potrebné upraviť jej fluorescenčné vlastnosti. Podľa spôsobu väzby ku skúmanému substrátu rozoznávame fluorescenčné sondy a značky. Fluorescenčné značky sa viažu na substrát kovalentnými väzbami, na druhej strane fluorescenčné sondy sa viažu ku substrátu nekovalentnými väzbami. Jednou z hlavných oblastí využitia fluorescenčných sond je štúdium lipidových štruktúr a membrán. Lokalizácia sondy v skúmanom substráte závisí od jej chemických vlastností, hlavne vo vzťahu ku vode (hydrofilné, amfifilné, hydrofóbne) a ich schopnosti zabudovávať sa do biomembrán.

Fluorescenčná sonda 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién (**DPH**) je pre svoje vlastnosti jednou z najčastejšie používaných fluorescenčných membránových sond. Je to hydrofóbna molekula, k biologickej vzorke sa viaže nekovalentnými väzbami. Hodí sa na štúdium fyzikálnych vlastností hydrofóbnej časti fosfolipidových membrán z toho dôvodu, že má hydrofóbny charakter – vykazuje vysokú afinitu k hydrofóbnym častiam, v membráne sa zabudováva do oblasti uhl'ohydrátových zvyškov. Vlastnosti, ako sú jej ľahká zabudovateľnosť do membrány, ktorá je sprevádzaná silným zvýšením fluorescencie sondy, a jej zanedbateľná fluorescencia vo vode, viedli k rozsiahlemu použitiu DPH sondy pre merania membránovej fluidity. Dôležitý je tiež fakt, že absorbuje v tej oblasti vlnových dĺžok, v ktorej neabsorbujú iné zložky biomembrán, neviaže sa na proteíny a je chemicky stabilná. V biologických membránach zastúpenie a charakter fosfolipidov obmedzuje pohyb sondy, ktorá kmitá zároveň s membránovými fosfolipidmi, čo je základom využitia sondy na meranie fluidity (tekutosti) biomembrán. Pre DPH sa volí excitačná vlnová dĺžka v oblasti 360 nm (kde dosahuje maximum absorpcie), emisné maximum je najčastejšie registrované v oblasti 430 nm. Uloženie fosfolipidov v biologických membránach obmedzuje pohyb sondy. Sonda kmitá zároveň

s membránovými fosfolipidmi. Ak je obmedzená rotácia sondy je fluorescenčná anizotropia DPH relatívne vysoká. Ak sonda môže voľne rotovať (v prípade voľnejšej štruktúry) dochádza k zníženiu príp. strate fluorescenčnej anizotropie.

Na zlepšenie lokalizácie sondy DPH v membráne a na ďalšie aplikácie sa vytvorilo niekoľko jej ďalších derivátov, ako sú sondy TMA-DPH a TMAP-DPH. **TMA-DPH** (4-trimetyl-amino-1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién) sa syntetizovala s úmyslom snímať usporiadanejšie povrchové hydrofilné oblasti dvojvrstvy (glycerolová kostra a horné segmenty dvojvrstvy). Jej vlastnosti sú veľmi podobné sonde DPH. Rovnako ako DPH sa aj TMA-DPH ľahko zabudováva do membrán, čo je sprevádzané silným zvýšením fluorescencie. TMA-DPH sa používa na monitorovanie fluidity v blízkosti povrchu bunkovej membrány. Polárna časť tejto sondy je ukotvená na rozhraní lipid-voda, zatiaľ čo uhlíhydrátová časť vstupuje do lipidovej časti. Substitúcia molekuly zodpovedá nielen za zvýšenú rozpustnosť sondy TMA-DPH vo vode v porovnaní s DPH, ale aj za omnoho rýchlejšie zabudovávanie do membrány v porovnaní so sondou DPH.

Sonda **DiS-C₃(3)** patrí do skupiny karbocyanínov, ktoré sú podskupinou cyanínových farbív. Karbocyaníny patria medzi prvé používané potenciometrické fluorescenčné sondy. Tieto kationové farbivá sa akumulujú na hyperpolarizovaných membránach a sú translokované do lipidovej dvojvrstvy. Hydrofóbnejšie sondy s dlhším alkylovým reťazcom prechádzajú cez bunkové membrány rýchlejšie. 3-propyl-2-(3-(3-propyl-2(3H)benzotiazolylidén)-1-propenyl)benzotiazolium jodid, (DiS-C₃(3)) je pomalá potenciometrická kationová fluorescenčná sonda. Náboj je rozptýlený po celej molekule, čo umožňuje rýchly prestup do bunky a dosiahnutie elektrochemickej rovnováhy, ktorá závisí od typu a vlastností bunky. Pomalé sondy poskytujú informácie o rozdieli elektrochemického potenciálu medzi intracelulárnou a extracelulárnou vodnou fázou a ich rozdelenie závisí od rozdielu napätia medzi extracelulárnym médiom a cytosolom. Pri zmene potenciálu sa mení koncentrácia sondy v bunke. Pri kationových farbivách sa hyperpolarizácia bunkovej membrány prejaví akumuláciou farbiva v bunkách, zatiaľ čo znížená akumulácia odráža depolarizáciu. Sonda sa v cytosole buniek viaže na proteíny, ale môže sa viazať aj na lipidy a nukleové kyseliny, v lipozómoch sa nekovalentne viaže na nepolárne časti membrány. V dôsledku nekovalentného naviazania sondy na nepolárne časti membrány stúpa kvantový výťažok fluorescencie a dochádza k červenému posunu emisného spektra. Voľná sonda má emisné maximum pri vlnovej dĺžke 569 nm. Hodnoty posunu polohy maxima emisného spektra sú pre každý druh buniek iné. Tento maximálny posun závisí od hrúbky bunkovej steny, od fázy rastu bunky, veľkosti bunky a relatívnej koncentrácie buniek a farbiva. Depolarizácia membrány je

sprevádzaná zníženou akumuláciou sondy a spôsobuje posun vlnových dĺžok emisného maxima (λ_{max}) k nižším hodnotám, zatiaľ čo hyperpolarizácia spôsobuje vychytávanie sondy bunkou a výrazný posun vlnových dĺžok emisného maxima (λ_{max}) k vyšším hodnotám. Sonda DiS-C₃(3) neposkytuje exaktnú hodnotu membránového potenciálu, ale len údaj, či ku zmene membránového potenciálu dochádza. Zmena potenciálu alebo ovplyvnenie transportérov, ktorých je sonda jedným zo substrátov, sa prejaví zmenou polohy emisného maxima v spektre.

5. VYBRANÉ EXPERIMENTY UMOŽŇUJÚCE MERANIE ZMIEN VLASTNOSTÍ CYTOPLAZMATICKEJ MEMBRÁNY KVASINIEK

5.1. Meranie efluxu rhodamínu 6G z buniek kvasiniek

Zmeny v zložení plazmatickej membrány môžu negatívne ovplyvniť lokalizáciu a funkciu membránových transportných proteínov zahrnutých vo fenoméne mnohonásobnej rezistencie (MDR) buniek kvasiniek voči cytotoxickým látkam. ABC transportné proteíny zabezpečujú v bunke rôzne fyziologické funkcie: zúčastňujú sa transportu lipidov, peptidov a cholesterolu, apoptózy, sú zahrnuté v biogenéze peroxizómov, v odpovedi buniek na stres, v homeostáze lipidov plazmatickej membrány a v regulácii translácie. Efluxné pumpy buniek kvasiniek sú zodpovedné aj za eflux cytotoxických látok z buniek, a takto prispievajú k vzniku fenoménu mnohonásobnej rezistencie. Gén kódujúci ABC transportnú pumpu Pdr5p identifikovali u viacerých druhov kvasiniek. Jedným zo substrátov pre Pdr5p pumpu je aj fluorescenčná farbička rhodamín 6G, ktorá sa často používa na určenie transportnej aktivity membránových efluxných púmp u kvasiniek. Metódy, ktoré slúžia na určenie/meranie efluxnej aktivity púmp zahŕňajú sledovanie množstva vylúčeného substrátu, alebo meranie koľko daného substrátu sa akumuluje v bunke. Množstvo akumulovaného substrátu inverzne koreluje s hodnotami exprese mRNA sledovaných ABC transportných púmp u viacerých druhov kvasiniek.

Inkubácia buniek kvasiniek v prítomnosti 2-deoxy-glukózy (nemetabolizovateľný analóg glukózy) a rhodamínu 6G vedie ku zníženiu množstva ATP v bunke, ktorá je potrebná pre aktivitu efluxnej pumpy. S pridaním glukózy, ako zdroja energie, a sledovaním fluorescenčného signálu môžeme sledovať aktivitu efluxnej pumpy.

Postup:

1. Pripraví sa nočná kultúra testovaných kmeňov kvasiniek v 10 ml YPD média.
2. Z nočnej kultúry sa zaočkuje 100 ml YPD média a bunky sa kultivujú za aerácie pri 28 °C do exponenciálnej fázy rastu (1×10^7 b/ml).
3. Vyraštená kultúra sa scentrifuguje 5 min, 3000 g pri izbovej teplote.

4. Sediment sa 2x premyje 50 ml sterilnej deionizovanej vody.
5. Supernatant sa odstráni a sediment sa premyje 50 ml 50 mmol/l roztoku HEPES.
6. Po centrifugácii za rovnakých podmienok sa sediment rozsuspenderuje v 50 ml 50 mmol/l roztoku HEPES, ktorý obsahuje 2 mmol/l 2-deoxyglukózu a 10 μ mol/l rhodamín 6G.
7. Pripravené bunky sa inkubujú pri 150 rpm 2 hod za aerácie pri 28 °C a následne sa sedimentujú centrifugáciou 5 min, 3000 g pri izbovej teplote.
8. Získaný sediment sa premyje 50 ml sterilnej deionizovanej vody a následne s 50 ml 50 mmol/l roztoku HEPES.
9. Supernatant sa odstráni a sediment sa rozsuspenderuje v 10 ml 50 mmol/l roztoku HEPES na výslednú koncentráciu 1×10^8 b/ml.
10. Pripravená suspenzia buniek sa rozdelí na dve časti (cca 5 ml).
11. K prvej vzorke sa pridá 2 mmol/l glukóza ako induktor efluxu rhodamínu 6G, druhá vzorka slúžila ako negatívna kontrola.
12. Ihneď po pridaní glukózy sa v pravidelných časových intervaloch (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min) odoberá 400 μ l suspenzie, ktorá sa ihneď sцентрифугuje 1 min, 10 000 g, 4 °C.
13. 100 μ l supernatantu sa pipetuje do jamky mikrotitračnej platničky.
14. Množstvo vylúčeného rhodamínu 6G sa stanoví v supernatante spektrofotometricky pri excitačnej vlnovej dĺžke 515 nm a emisnej vlnovej dĺžke 555 nm (spektrofotometer Varioscan Flash, ThermoFisher Scientific, USA). Koncentrácia rhodamínu 6G v meranej vzorke sa odčíta z kalibračnej krivky.

Roztoky:

Kultivačné médium YPD: 20 g/l glukóza, 20 g/l peptón, 10 g/l kvasničný autolýzát

Zásobný roztok glukózy 200 mmol/l (36 g/100ml).

50 mmol/l HEPES pH 7,0 upravené s roztokom 1N NaOH.

Zásobný roztok 10 mmol/l rhodamínu 6G.

5.2. Analýza zloženia sterolov v bunkách kvasiniek využitím vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie

Vysokoúčinnná kvapalinová chromatografia (HPLC) je technika široko používaná k oddeľovaniu, identifikácii, čisteniu a kvantifikácii jednotlivých zložiek zo zmesí. Proces HPLC je automatizovaný, výsledky z HPLC sú ľahko čitateľné s vysokým rozlíšením a analýzy je možné podľa potreby opakovať. Medzi hlavné výhody HPLC analýzy patrí možnosť kvalitatívnej, ako aj kvantitatívnej analýzy. Kvalitatívna analýza slúži k identifikácii jednotlivých zložiek analyzovanej zmesi, zatiaľ čo kvantitatívna analýza nám dáva možnosť stanoviť množstvo danej látky v analyzovanej zmesi.

Steroly patria medzi esenciálne lipidy eukaryotických buniek zabezpečujúce rôzne funkcie v bunke. Určenie sterolového zloženia buniek kvasiniek je dôležité pri štúdiu rôznych mutantných kmeňov za účelom odhaliť úlohu (funkciu) jednotlivých typov sterolov v kvasinkách. Ergosterol a dráha jeho biosyntézy je terčom pre mnohé antifungálne látky. Vzhľadom na významné postavenie ergosterolu ako cieľovej štruktúry mnohých liečiv je pochopenie funkcie jednotlivých génov podieľajúcich sa na metabolizme ergosterolu dôležité pre efektívny boj s rezistenciou buniek patogénnych kvasiniek.

Izolácia celkových bunkových sterolov kvasiniek

Postup:

1. Bunky analyzovaných kmeňov kvasiniek sa zaočkujú do 100 ml YPD média a kultivujú za aerácie pri 28 °C do exponenciálnej fázy rastu (1×10^7 b/ml).
2. Množstvo kultúry zodpovedajúce koncentrácii 1×10^9 buniek sa dvakrát premyje sterilnou destilovanou vodou.
3. Bunky sa sedimentujú pri 3000 g, 5 min pri izbovej teplote.
4. Získaný sediment sa rozsuspenderuje v 1 ml sterilnej destilovanej vody.
5. Suspenzia sa po pridaní 3 g sklenených guľčiek homogenizuje 6-krát po 1 min, pričom medzi jednotlivými krokmi sa vzorky na 1 min chladia v ľade.
6. K rozbitým bunkám sa pridajú 3ml čerstvo pripraveného roztoku 60 % KOH v 50 % metanole, zmes sa dôkladne premieša a suspenzia sa inkubuje 2 hod pri 70 °C.

7. Po ochladení vzoriek sa k suspenzii pridajú 3 ml hexánu a zmes sa dôkladne premieša (vortexuje).
8. Po centrifugácii 5 min, 2000 g sa horná hexánová vrstva preniesie do čistej sklenenej skúmavky s kónickým dnom a teflónovou zátkou.
9. K spodnej vodnej fáze sa pridajú 2 ml hexánu, zmes sa vortexuje a sцентрифугuje 5 min, 2000 g.
10. Vrchná fáza sa následne pridá ku vzorke z predchádzajúcej extrakcie.
11. Zmes sa následne odparí v dusíkovej atmosfére, k zvyšku sa pridá 300 µl acetónu. Takto pripravená zmes v HPLC nádobke s teflónovou zátkou sa použije na analýzu nezmydeliteľných lipidov metódou HPLC.

Izolácia cytoplazmatickej membrány kvasiniek

Postup:

1. Bunky analyzovaných kmeňov kvasiniek sa zaočkujú do 100 ml YPD média a kultivujú za aerácie pri 28 °C 16 hodín.
2. Bunky sa sedimentujú pri 3000 g, 5 min pri izbovej teplote.
3. Vyrašená kultúra sa dvakrát premyje sterilnou destilovanou vodou.
4. Na izoláciu cytoplazmatickej membrány sa použije 15 g vlhkej hmoty buniek.
5. Bunky sa rozsuspendujú v o vode tak, aby výsledný objem bol 100 ml.
6. Suspenzia sa po pridaní 170 ml sklenených guľčiek homogenizuje 6-krát po 1 min, pričom medzi jednotlivými krokmi sa vzorky na 1 min chladia v ľade.
7. Po odobratí homogenátu sa guľčky premyjú glycerolom (20 %) v TED tlmivom roztoku.
8. Po centrifugácii 10 min, 700 g sa získaný supernatant sцентрифугuje 20 min pri 20000g.
9. Pelet sa rozsuspenduje v 20 % glycerole v TED roztoku s PMSF (50 ml na 100 g mokrých buniek).
10. 14 ml zo suspenzie sa naniesie na gradient pozostávajúci z 8 ml 53% sacharózy a 16 ml 43 % sacharózy a stočí sa na ultracentrifúge 6 hodín pri 25000g.
11. Cytoplazmatické membrány nachádzajúce sa na rozhraní 53% a 43% sacharózy sa opatrne odoberú Pasterovou pipetou.
12. Po prenesení vzorky do čistej centrifugačnej skúmavky sa membrány rozsuspendujú v štvornásobnom objeme deionizovanej vody.

13. Po centrifugácii 20 min, 8000g, sa pelet rozsuspenderuje v 20% glycerole (20ml na 100g buniek) a zamrazí sa na ďalšie použitie.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Na kvantitatívnu analýzu jednotlivých nezmydeliteľných lipidov sa môže použiť metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie RP-HPLC (reverse-phase high-performance liquid chromatography) v zariadení Agilent 1100 HPLC s využitím separačnej kolóny Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies, USA), diódového UV detektora DAD (diode array detector, Agilent Technologies, USA) a detektora CAD (corona charged aerosol detector, ESA Inc., USA). Na analýzu sa použije 7 μ l vzorky, ktoré sa nanesú na kolónu v reverznej fáze. Lipidy sa premývajú 95 % metanolom pri 40 °C, rýchlosť prietoku 1 ml/min. Získané signály sa identifikujú na základe použitých štandardov – ergosterolu a lanosterolu (Serva, Germany) využitím programu Agilent ChemStation.

Roztoky:

Organické rozpúšťadlá používané pri extrakcii lipidov majú byť najvyššej kvality.

Kultivačné médium YPD: 20 g/l glukóza, 20 g/l peptón, 10 g/l kvasničný autolýzát.

Roztok 60 % KOH v 50 % metanole (6g KOH, 5 ml metanol vo vode do objemu 10 ml)

TED tlmivý roztok: 10 mmol/l Tris (pH 7,5); 0,2 mmol/l EDTA; 0,2 mmol/l DTT.

20 % glycerol v TED tlmivom roztoku : 20 ml glycerol v roztoku TED do objemu 100 ml.

53% sacharóza: 53 g sacharóza v roztoku TED do objemu 100 ml.

43% sacharóza: 43 g sacharóza v roztoku TED do objemu 100 ml.

PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride je inhibítor proteáz) 0,2 mol/l v metanole.

5.3. Fluidita cytoplazmatickej membrány

Steroly sú hlavné nepolárne lipidy prítomné v biomembránach eukaryotických organizmov. Rôzne štúdie poukazujú na významnú úlohu sterolov v zabezpečovaní fluidity a permeability membrány, v zabezpečovaní správnej funkcie proteínov, ako aj na úlohu sterolov pri formovaní špecifických mikrodomén v membráne. V dôsledku delécie génov, ktoré sú zahrnuté v biosyntéze sterolov sa dajú pozorovať zmeny vybraných biofyzikálnych vlastností membrán kvasiniek ako sú membránová fluidita a membránový potenciál. Na sledovanie týchto vlastností biomembrán sú vhodné metódy fluorescenčnej spektroskopie.

Anizotropia je jav, pri ktorom sa merané vlastnosti látky menia v závislosti od smeru v ktorom ich meriame. Ak vzorku excitujeme polarizovaným žiarením, emitované žiarenie je polarizované tiež. Rozsah polarizácie emisie vzoriek sa opisuje pomocou anizotropie r . Meranie anizotropie fluorescencie sa používa ku štúdiu stavu biologických membrán. Hodnoty polarizácie sú citlivé na prítomnosť sterolu, ktorý má tendenciu zvyšovať tuhosť membrán a eliminovať ostrý fázový prechod. Hodnoty anizotropie nemusia odrážať rýchlosť rotácie sondy v membránach, ale skôr rozsah, v akom sú pohyby sondy obmedzené prostredím resp. zložením príslušnej biomembrány.

Fluidita plazmatickej membrány sa dá analyzovať meraním anizotropie fluorescenčnej sondy, pričom sa používajú rôzne sondy – DPH a TMA-DPH. Sonda DPH sa inkorporuje do hydrofóbných oblastí fosfolipidovej dvojvrstvy a anizotropia stanovená použitím DPH poskytuje predstavu o integrite membrány a usporiadaní lipidov. Sonda TMA-DPH je kladne nabitý derivát DPH, ktorá poskytuje informácie o povrchových oblastiach plazmatickej membrány. Polárna sonda TMA-DPH sa ukotvuje na rozhraní medzi membránou a vodným prostredím, pričom jej uhl'ohydrátová časť ostáva v lipidovej časti plazmatickej membrány. Pri experimente sa vzorka excituje lineárne polarizovaným svetlom a následne sa kolmo na smer tohto excitačného lúča meria fluorescencia. Excitačný aj emisný polarizátor sú schopné prepúšťať polarizované žiarenie vertikálne alebo horizontálne. Takýmto spôsobom je možné zmerať intenzitu fluorescencie pri štyroch rôznych nastaveniach v závislosti od polohy polarizácie žiarenia. Ich označenie je uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1 Označenie intenzity fluorescence pri štyroch rôznych nastaveniach polarizátorov

Označenie	Excitačný polarizátor	Emisný polarizátor
I_{vv}	vertikálne	vertikálne
I_{vh}	vertikálne	horizontálne
I_{hv}	horizontálne	vertikálne
I_{hh}	horizontálne	horizontálne

Polarizátory (excitačný aj emisný) prepúšťajú vertikálne polarizované svetlo s inou citlivosťou ako svetlo horizontálne polarizované. Preto je dôležité stanoviť korekčný faktor G , zohľadňujúci túto skutočnosť a určujúci podiel citlivosti aparatury na vertikálne polarizované svetlo S_v , k citlivosti na horizontálne polarizované svetlo S_h . Pri stanovovaní G faktora je vzorka budená horizontálne polarizovaným svetlom a intenzita fluorescence sa zaznamenáva pri vertikálnej (I_{hv}) aj horizontálnej (I_{hh}) polohe emisného polarizátora:

$$\frac{S_v}{S_h} = G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

Následne pre hodnotu stacionárnej anizotropie platí vzťah :

$$r_s = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2G \cdot I_{vh}}$$

Časový vývoj stacionárnej anizotropie fluorescence sondy DPH sa meria približne 2000 sekúnd, pričom intenzita sa zaznamenáva každých 10 sekúnd. Využíva sa konštantná excitačná vlnová dĺžka 360 nm (sonda pri nej dosahuje absorpčné maximum) a konštantná emisná vlnová dĺžka 430 nm (maximum fluorescence).

Fluorescenčná anizotropia použitých sond je v nepriamom pomere s fluiditou plazmatickej membrány.

Postup:

1. Analyzované kmene kvasiniek sa kultivujú v 8 ml komplexného YPD média za aerácie pri 28 °C do skorej exponenciálnej fázy.
2. Vyrastená kultúra kvasiniek sa sedimentuje centrifugáciou 2 min, 3500 g, pri izbovej teplote.
3. Sediment buniek sa premyje 1x 20 ml sterilnej destilovanej vody a 2 x 10 mmol/l roztokom Tris-Cl (pH 7,0).
4. Sediment buniek sa rozsuspenderuje v 10 mmol/l roztoku Tris-Cl na optickú hustotu OD600nm 0,25.
5. Vzorka s bunkami sa kvôli efektu vnútorného filtra pred označením s fluorescenčnou farbičkou nariedi tak, aby absorpčné spektrum kvasiniek bolo pod hodnotou absorbancie 0,1 pri 360 nm. Pracuje sa pri teplote 22 °C.
6. Pripravené bunky sa označia s fluorescenčnou farbičkou DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién, Sigma-Aldrich, USA), resp. TMA-DPH (4-trimetyl-amino-1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién, Sigma-Aldrich, USA) Finálna koncentrácia sondy DPH a TMA-DPH v suspenzii buniek bola nastavená na $1,5 \times 10^{-7}$ mol/l, resp. $1,875 \times 10^{-7}$ mol/l.
7. Fluorescenčná anizotropia sondy DPH a TMA-DPH sa meria použitím luminiscenčného spektrometra (napr. PerkinElmer LS 45) pri excitačnej vlnovej dĺžke 360 nm a emisnej vlnovej dĺžke 430 nm. Samotné meranie fluorescenčnej anizotropie sa uskutočňuje pri teplote 22 ± 1 °C a jednotlivé hodnoty sa zaznamenávajú každých 10 sek v priebehu 40 min inkubácie buniek s DPH, resp. TMA-DPH.
8. Získané hodnoty sa analyzujú a sa vyjadrujú ako priemer z 10 nezávislých experimentov pre každú vzorku. Štatistická analýza sa vykonáva na hladine významnosti $\alpha < 0,05$.

Roztoky:

Kultivačné médium YPD: 20 g/l glukóza, 20 g/l peptón, 10 g/l kvasničný autolýzát.

10 mmol/l Tris pH 7,0 upravené s roztokom HCl.

Zásobný roztok DPH 5×10^{-4} mol/l v acetóne.

Zásobný roztok TMA-DPH $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l v acetóne.

5.4. Membránový potenciál

Cytoplazmatická membrána predstavuje bariéru, ktorá udržiava medzi extra- a intracelulárnym prostredím koncentračný gradient malých iónov. V dôsledku nerovnakej koncentrácie iónov vzniká na oboch stranách membrány elektrický potenciál, pričom rozdiel v hodnote náboja označujeme ako membránový potenciál. Zmeny v koncentrácii iónov na oboch stranách membrány sa tak môžu odraziť v hodnote membránového potenciálu, ktorý je rozhodujúci pre transport živín do bunky. Fluorescenčná sonda diS-C₃(3), sa akumuluje v cytozole buniek v závislosti od potenciálu cytoplazmatickej membrány, ku ktorému prispieva aktivita transportných proteínov lokalizovaných v membráne. Akumulácia sondy v bunkách sa zaznamenáva ako posun vlnovej dĺžky emisného maxima ($\lambda_{\max}$) použitej sondy.

Postup:

1. Analyzované kmene kvasiniek sa kultivujú v 10 ml komplexného YPD média 20 hod pri 28 °C pokiaľ koncentrácia buniek nedosiahne hodnotu $1-5 \times 10^8$ b/ml.
2. Vyrastené bunky sa sedimentujú centrifugáciou 5 min, 5000 g pri izbovej teplote.
3. Sediment sa 2x premyje destilovanou vodou a rozsuspenderuje sa v 10 mmol/l citrát-fosfátovom tlmivom roztoku (pH 6,0).
4. K 3 ml suspenzie buniek sa pridá fluorescenčná sonda diS-C₃(3) (3,3'-dipropyltiakarboxycyanín) na konečnú koncentráciu 3×10^{-8} mol/l (koncentrácia sa dá znížiť podľa typu analyzovaných buniek a v závislosti od citlivosti prístroja).
5. Fluorescenčné emisné spektrá sa zhotovia na základe meraní v časových intervaloch 2-5 min počas 70 min použitím Fluoro-Max 4 spektrofluorimetra (napr. Jobin Yvon-Horiba), s excitačnou vlnovou dĺžkou 531 nm; emisné spektrum nastavené v rozmedzí vlnových dĺžok 560-590 nm.
6. 45 min po pridaní sondy diS-C₃(3) sa k suspenzii pridáva diagnostický CD koktail, ktorý obsahuje 5M CCCP (karbonylkyanid m-chlórphenylhydrazín - protonofór) a 5 mol/l DM-11 (2-dodekanoyloxyetyl-dimetylamónium chlorid - inhibítor Pma1p H⁺-ATPázy).
7. Na zablokovanie vylučovania aktívnej próby z buniek efluxnou pumpou sa použije 1 mol/l oligomycín A, ktorý sa k bunkovej suspenzii pridá 13 min po inkubácii buniek so sondou diS-C₃(3).

Roztoky:

Kultivačné médium YPD: 20 g/l glukóza, 20 g/l peptón, 10 g/l kvasničný autolýzát.

10 mmol/l citrát-fosfátový tlmivý roztok: 3 mmol/l kyselina citrónová, 7 mmol/l fosforečnan sodný, pH 6,0

Zásobný roztok diS-C₃(3) 5x10⁻⁴ mol/l v etanole.

Zásobný roztok oligomycínu A 100 mol/l v etanole.

5.5. Osmotická stabilita protoplastov

Cytoplazmatická membrána, ako semipermeabilná bariéra, umožňuje bunke odolať osmotickému stresu, predovšetkým vďaka jej fosfolipidového zloženiu. Stresom môže byť vyšší obsah etanolu, prítomnosť zvýšenej koncentrácie solí v médiu, alebo nízka teplota. Zmeny prostredia, v ktorom sa bunka nachádza, ovplyvňujú organizáciu a dynamiku membránových komponentov, ktoré sa prejavujú zmenami vo fluidite plazmatickej membrány. Fosfolipidové zloženie a následne fluidita cytoplazmatickej membrány ovplyvňujú aj osmotickú stabilitu protoplastov.

Protoplasty sú bunky zbavené bunkovej steny. Vznikajú v izotonických médiách po úplnom odstránení bunkovej steny. Najnápadnejšou zmenou, ktorá sprevádza transformáciu bunky na protoplast je premena druhovo špecifického tvaru bunky na útvar sférický a strata osmotickej tolerancie protoplastu. V osmoticky nevyváženom prostredí vznikajúce protoplasty okamžite lyzujú. Príprava protoplastov vyžaduje odstránenie bunkovej steny a zabezpečenie osmotickej stability uvoľneného protoplastu.

Bunková stena kvasiniek tvorí 15-30 % suchej váhy bunky, pričom 90% tvoria polysacharidy a 5-10% proteíny. Minoritnou zložkou bunkovej steny sú lipidy a anorganické soli. Hlavnými komponentami sú β -1,3 glukán, β -1,6 glukán, chitín a manoproteíny. Tieto komponenty sú navzájom viazané kovalentnými väzbami. Vonkajšia časť bunkovej steny je tvorená polymermi glykolyzovaných manoproteínov. Manoproteín tvorí na povrchu bunkovej steny radiálne orientované fibrily. Z chemického hľadiska ide o komplexný glykoproteín, pozostávajúci z manózových polymérov a oligomérov viazaných na polypeptid. Povrch bunkovej steny sa vyznačuje štetinovou štruktúrou a môže byť od bunky oddelený proteolýzou. Vnútorňa vrstva bunkovej steny sa v mikroskope javí transparentnejšie a pozostáva hlavne z polysacharidovej glukánovej siete. Odstránená môže byť enzymaticky pôsobením glukánáz.

Bunkovú stenu mikroorganizmov je možné šetrne a selektívne narušiť účinkom lytických enzýmov. Pre každý typ mikroorganizmu je potrebné zvoliť vhodný typ a dobu pôsobenia lytického enzýmu, rovnako ako aj typ a koncentráciu osmotického stabilizátora. Na odstránenie bunkovej steny kvasiniek sa najčastejšie využívajú komerčné preparáty lytických enzýmov (zymolýza, lytikáza), prípadne laboratórne pripravený výťažok z hepatopankreasu slimáka záhradného (slimakáza). Osmotická stabilizácia prostredia sa u kvasiniek

Saccharomyces cerevisiae zabezpečí použitím vhodnej koncentrácie KCl, sorbitolu, alebo MgSO_4 . Vhodnými experimentálnymi podmienkami je možné navodiť regeneráciu bunkovej steny u protoplastov kvasiniek.

Úlohou experimentu je vytvoriť protoplasty kvasiniek enzymatickou lýzou ich bunkovej steny pomocou glukonáz. Po skontrolovaní prítomnosti protoplastov vo vzorke sa stanoví ich osmotická stabilita v hyper-, hypo- a izotonickom prostredí KCl a určí sa, ktorá koncentrácia KCl je prostredím vhodným na ich uskladnenie.

Postup:

1. Pripraví sa nočná kultúra kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DTXII v 10 ml YPD média.
2. Na druhý deň sa 100 ml YPD média zaočkuje 2,5 ml nočnej kultúry a nechá sa kultivovať do exponenciálnej fázy rastu (cca $2\text{--}5 \cdot 10^7$ b/ml).
3. Bunky z celého objemu kultúry sa sedimentujú pri 3000 g, 5 min, 22 °C.
4. Supernatant sa odstráni a sediment sa 2x premyje deionizovanou vodou.
5. Supernatant sa odstráni a stanoví sa váha sedimentu.
6. K sedimentu sa pridá 20 ml roztoku PB s 80 mg ditiotreitolu a jemne premieša.
7. Suspenzia sa preleje do erlenmeyerovej banky a inkubuje 30 min pri 30 °C za trepania.
8. Následne sa suspenzia sedimentuje pri 3000 g, 5 min, 22 °C a supernatant sa odstráni.
9. K sedimentu sa pridá 26 ml 1,5 mol/l roztoku sorbitolu.
10. Bunky sa premiešajú na vortexe a centrifugujú pri 3000 g, 5 min, 22 °C.
11. Supernatant sa odstráni a k sedimentu sa pridá ďalších 26 ml 1,5 mol/l roztoku sorbitolu.
12. Suspenzia sa opäť sedimentuje pri 3000 g 5 min, 22 °C a supernatant sa odstráni.
13. Do novej skúmavky sa pridá práškový lytický enzým “slimakáza” v množstve 200 mg enzýmu na 1 g buniek a pridá sa 1 ml roztoku pre slimakázu. Zmes sa jemne rozsuspenduje použitím pipety.
14. Vzniknutá suspenzia sa opatrne premieša a nechá inkubovať 20 - 30 minút pri laboratórnej teplote za občasného miešania.
15. Po uplynutí času sa vyhodnotí vznik protoplastov nasledovne:
Do jednej tentostennej skúmavky sa pridá 1 ml roztoku sorbitolu, do druhej 1 ml destilovanej vody. Tvorba protoplastov sa kontroluje mikroskopicky (protoplasty sú sférické) alebo na základe zmeny zákalu suspenzie vo vode oproti zákalu suspenzie v roztoku sorbitolu (po pridaní kvapky suspenzie protoplastov do destilovanej vody

nastáva zväčšovanie ich objemu a osmotická lýza protoplastov, čo sa prejaví znížením OD600).

16. Suspenzia v lytickom roztoku sa centrifuguje pri 450 g 10 min pri 22 °C.
17. Supernatant sa odstráni a k sedimentu sa pridajú 2 ml roztoku sorbitolu.
18. Bunky sa jemne premiešajú a centrifugujú pri 450 g 10 min pri 22 °C.
19. Supernatant sa opäť odstráni a k sedimentu sa pridajú ďalšie 2 ml sorbitolového roztoku.
20. Do tenkostenných skúmaviek sa pripraví séria roztokov so stúpajúcou koncentráciou KCl (0; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 1,5; 2 a 2,5 mol/l).
21. 200 µl suspenzie protoplastov sa pridá k 1800 µl roztoku KCl rôznej koncentrácie.
22. Po 10 min sa obsah skúmaviek preleje do kyviet a odmeria sa absorbancia pri 600 nm.
23. Namerané hodnoty sa vpišu do tabuľky a spracujú graficky os x – čas, os y – absorbancia suspenzie. V grafe sa vyznačia body pre jednotlivé koncentrácie KCl a na základe najvyššej absorbancie sa určí, ktoré koncentrácie KCl predstavujú pre protoplasty hypotonické, izotonické a ktoré hypertonické prostredie.

Roztoky:

Sorbitol 1,5 mol/l.

PB roztok: 0,02 mol/l HEPES; 0,2 mol/l Tris; 10 g/l kvasničný autolýzát; 10 g/l glukóza..

Roztok pre slimakázu: 0,05 mol/l citrát-fosfátový tlmivý roztok; 1,35 mol/l sorbitol,
pH 5,8.

KCl 1,5 mol/l.

Kultivačné médium YPD: 20 g/l glukóza, 20 g/l peptón, 10 g/l kvasničný autolýzát.

5.6. Agarová zried'ovacia metóda – kvapkový test

Na testovanie odolnosti buniek mikroorganizmov voči rôznym chemickým, cytotoxicky pôsobiacim látkam existujú viaceré metódy, ktoré umožňujú pomerne presnú detekciu mechanizmov, ktoré sa uplatňujú v odpovedi mikroorganizmu na zmeny prostredia. Medzi najčastejšie metódy používané v klinických a výskumných laboratóriách patria tzv. zried'ovacie metódy. Základom je príprava série agarových platní obsahujúcich presnú koncentráciu cytotoxického zlučenia (antimykotika) v médiu, na ktoré sa v kvapkách nanáša niekoľko riedení suspenzie analyzovaných buniek. Dôležitou pri tejto metóde je príprava agarových platní spôsobom, ktorý zabezpečí čo najpresnejšie požadované koncentrácie antimykotík v médiu. Pomocou kvapkového testu môžeme analyzovať rast kvasiniek v prítomnosti inhibítorov biosyntetickej dráhy sfingolipidov myriocínu (inhibitor serín palmitoyltransferázy) alebo aureobazidínu A (inhibitor syntézy inozitol fosforylceramidu). Rozsah koncentrácie testovaných látok závisí od vlastností použitých buniek a danej chemickej látky.

Funkcia mnohých transportných proteínov lokalizovaných v plazmatickej membráne, závisí od množstva a distribúcie sterolov v membráne. K takýmto proteínom patria aj proteíny zabezpečujúce homeostázu kationov alkalických kovov v bunkách. Analýzou schopnosti buniek kvasiniek rásť v prítomnosti rôznych koncentrácií solí alkalických kovov NaCl, KCl, LiCl / teda schopnosti buniek tolerovať osmotický stres, možno overiť uvedenú skutočnosť.

Slabé organické kyseliny vstupujú do buniek prostredníctvom jednoduchšej difúzie. V cytoplazme disociujú, a vzniknuté záporne nabité ióny nie sú schopné voľne prechádzať membránou von z buniek. Zmena v sterolovom zložení membrány môže ovplyvniť funkciu transportných púmp, ktoré sú nevyhnutné pre vylučovanie karboxylových aniónov z buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Analýzou citlivosti kvasiniek voči slabým organickým kyselinám možno túto hypotézu overiť.

Postup:

1. Bunky analyzovaných kmeňov sa zaočkujú do 5 ml YPD média a kultivujú cez noc za trepania pri teplote 30 °C príp. teplote 37 °C.
2. V mikrotitračnej platničke sa vyrastené kultúry kvasiniek nariedia v sterilnej destilovanej vode na koncentrácie $1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^4$ buniek/ml.

3. Po 5 μ l týchto suspenzií sa vykvapká pomocou multikanálovej pipety na pevné YPD média, ktoré obsahujú vzostupné koncentrácie inhibítora.
4. Po zaschnutí sa bunky kultivujú v závislosti od testovaného kmeňa 24 – 48 hodín príp. 48 – 72 hodín pri teplote 28°C.

Roztoky:

Kultivačné médium sa pripraví podľa rozpisu, príp. odporúčaní výrobcu. Po sterilizácii autoklávaním sa médium ochladí na 50 °C. Po 20 ml vytemperovaného média sa naleje do sterilnej centrifugačnej skúmavky a pridá sa požadované množstvo roztoku testovanej látky. Nádoba sa uzavrie, médium sa dôkladne premieša jej opatrným prevracaním a následne vyleje do vopred označených sterilných Petriho misiek. Ako kontrolné médium sa použije médium, ktoré neobsahuje antimykotikum. Média sa nechajú stuhnúť na vodorovnom povrchu a 2 - 3 dni presušiť pri laboratórnej teplote tak, aby na povrchu agaru nezostávali žiadne kvapky vody.

Zásobné roztoky látok pridávaných do kultivačných médií po sterilizácii:

Myriocín 1mg/ml v DMSO.

Aureobazidin A 1 mg/ml v etanole.

5.7. Kvalitatívne stanovenie zastúpenia fosfolipidov v kvasinkách - Tenkovrstvová chromatografia

Jednou z najrozšírenejších analytických metód je chromatografia, ktorá umožňuje účinnú separáciu látok nutnú pre spoľahlivú identifikáciu a kvantifikáciu zložiek sledovanej vzorky. K rozdeleniu látok dochádza na základe rôznej pohyblivosti v systéme dvoch fáz – stacionárnej (nepohyblivej) a mobilnej (pohyblivej).

Veľmi jednoduchou a rýchlou metódou na kvalitatívnu, ale aj kvantitatívnu (po miernej modifikácii) analýzu fosfolipidov je metóda chromatografie na tenkej vrstve (TLC thin layer plate analysis). Veľmi často slúži aj na získanie optimálnych podmienok pre analýzu metódou HPLC. Chromatografia na tenkej vrstve je jednou z najbežnejších experimentálnych metód na odhadnutie čistoty organických zlúčenín. Čistota zlúčeniny sa určuje na základe množstva prítomných signálov (škvŕn) na platničke. TLC metóda sa používa na potvrdenie štruktúry neznámej zlúčeniny na základe porovnania jej pohyblivosti so známou vzorkou. TLC využíva tenkú vrstvu práškoveho adsorbentu (zvyčajne SiO_2 alebo Al_2O_3) na pevnom podklade (zvyčajne sklo, hliníková platnička alebo plast). Dôležitý je charakter adsorbentu a vyvíjacej/elučnej zmesi. TLC platnička sa kladie do takmer vertikálnej polohy. Elučná zmes (mobilná fáza), do ktorej je platnička ponorená na základe kapilárnych síl vzliína smerom hore. Zlúčenina dobre rozpustná v danej zmesi bude vzliínať s ňou. Naopak zlúčenina slabo rozpustná zaostane, resp. sa bude pohybovať pomalšie. Inými slovami, ako ďaleko sa daná zlúčenina dostane závisí na tom, ako silno je adsorbovaná na povrch (stacionárnu fázu) v porovnaní s tým, ako dobre sa rozpúšťa v mobilnej fáze.

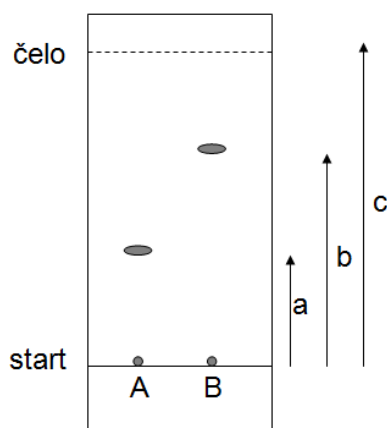
Najbežnejšie mobilné fázy na separáciu lipidov sú:

- chloroform:metanol:voda (65:25:4, alebo 48:47:3) (v/v/v) na separáciu fosfolipidov podľa polaritu hlavičky,
- chloroform:metanol:hydroxid amónny (65:25:4) na separáciu fosfolipidov podľa polaritu a náboja hlavičky,
- chloroform:hexán:metanol:kyselina octová (50:30:10:5) na separáciu kardiolípinu a fosfatidylglycerolu,
- toluén:pyridín:voda (60:60:10) na separáciu fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu,

- cyklohexán:etyl acetát (3:2) na separáciu neutrálnych lipidov (mastné kyseliny, triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly),
- toluén:chloroform:metanol (85:15:5) na separáciu diacylglycerolov,
- toluén:metanol (7:3) na separáciu ceramidu od ostatných sfingolipidov.

Na kvalitatívnu tenkovrstvovú chromatografiu sa v súčasnosti najviac využívajú hotové tenké vrstvy, ktoré možno kúpiť pod názvom Silufol alebo Alufol. V oboch prípadoch ide o tenkú vrstvu silikagélu alebo oxidu hlinitého so škrobovým spojivom nanesenú na hliníkovú fóliu. Chromatogram sa vyvoláva v uzavretej nádobe (vyvíjacej komore) s vhodným elučným činidlom, ktorého výška dosahuje 0,5 – 1,0 cm, nasýtenej jeho parami. Nasýtenosť komory sa dosahuje obalením vnútorného povrchu filtračným papierom namočeným v elučnom činidle. Filtračný papier siaha do výšky 1 cm pod horný okraj komory.

Pre každú látku je na chromatograme charakteristická jej poloha, ktorá je vyjadrená hodnotou RF (retardation factor). Je vyjadrením pomeru vzdialenosti škvrny od štartu ku vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (Obr. 13). Hodnoty RF sa pohybujú od 0 do 1. Pre látky, ktoré zostávajú blízko štartu sa hodnota RF blíži k nule. Látky, ktoré idú takmer s čelom mobilnej fázy sa hodnota RF blíži k 1.



Obr. 13 Znázornenie výpočtu hodnoty RF . Štart – miesto nanesenie vzorky, čelo – čelo mobilnej fázy

Postup:

1. Bunky analyzovaných kmeňov kvasiniek sa zaočkujú do 100 ml YPD média a kultivujú za aerácie pri 28 °C do exponenciálnej fázy rastu.

2. Množstvo kultúry zodpovedajúce koncentrácii 3×10^8 b/ml sa dvakrát premyje sterilnou destilovanou vodou. Bunky sa sedimentujú pri 3000 g, 5 min pri izbovej teplote.
3. Bunky sa zmrazia pri -75°C .
4. K bunkám sa pridá 5 ml vychladeného (4°C) roztoku chloroform:metanol 2:1 (v/v).
5. Suspenzia sa preniesie do skúmavky s teflónovou zátkou a po pridaní 1ml sklenených guľičiek sa homogenizuje 6-krát po 1 min, pričom medzi jednotlivými krokmi sa vzorky 1 min chladia v ľade.
6. K rozbitým bunkám sa pridá 1ml 0,034 % roztoku MgCl_2 (4°C).
7. Suspenzia sa mieša pri maximálnej rýchlosti 10 min pri 4°C .
8. Po centrifugácii 3 min, 1000 g sa horná vrstva odstráni. (Spodná organická fáza obsahuje extrahované lipidy).
9. K spodnej fáze sa pridajú 2 ml roztoku chloroform:metanol:voda (48:47:3), zmes sa vortexuje a scentrifuguje 3 min, 1000 g pri izbovej teplote.
10. Odstráni sa vrchná fáza.
11. Spodná organická fáza sa prepipetuje do novej skúmavky.
12. Sklenené guľičky sa premyjú 2 ml roztoku chloroform:metanol (2:1) a 1 ml roztoku chloroform:metanol:voda (48:47:3).
13. Suspenzia sa vortexuje a po centrifugácii 3 min, 1000 g sa horná fáza odstráni.
14. Spodná fáza sa pipetuje ku vzorke z prvej extrakcie (krok číslo 11).
15. Kroky 12-14 sa zopakujú ešte raz.
16. Zmes sa následne odparí pod prúdom dusíka, pridá sa 1 ml zmesi chloroform:metanol (2:1).
17. 10 μl takto pripravenej zmesi sa nanesie na tenkú vrstvu silikagélu spolu so vzorkami štandardných lipidov. Silikagél musí byť „aktivovaný“ pred nanášaním vzoriek (30-60 min pri 100°C).
18. Silikagel so vzorkami sa vloží do vopred nasýtenej vyvolávacej komory (30-60 min s roztokom chloroform:metanol:voda 32,5:12,5:2).
19. Vzorku vytiahneme z komory, keď už elučná zmes siaha po horný okraj (1 cm od vrchu) papiera a vysušíme (napr. fénom).
20. Silikagél so vzorkami sa na 10 sekúnd ponorí do vizualizačného roztoku.



TG SE wt wt PE PC PI PS PA

Obr. 14 Fosfolipidy kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* rozdelené TLC
 TG- triacylglycerol, SE sterylester, PE fosfatidyletanolamin, PC fosftidylcholín, PI
 fosfatidylinozitol, PS fosftidylserín, PA kyselina fosfatidová, wt – vzorka extrahovaných
 lipidov z kvasiniek.

Roztoky:

Organické rozpúšťadlá používané pri extrakcii lipidov majú byť najvyššej kvality.

Kultivačné médium YPD: 20 g/l glukóza, 20 g/l peptón, 10 g/l kvasničný autolýzát.

Odporúča sa používať čerstvo pripravené roztoky chloroform:metanol (2:1),
 chloroform:metanol:voda (48:47:3; 32,5:12,5:3).

Koncentrácia štandardov lipidov 0,5mg/ml v roztoku chloroform:metanol 2:1.

Roztok na vizualizáciu lipidov: 50% etanol; 3,2 % H₂SO₄; 0,5% MnCl₂ vo vode.

6. ZÁSADY BEZPEČNEJ PRÁCE V LABORATÓRIU

1. Na praktickom cvičení sa pracuje so živými mikroorganizmami, preto základnou požiadavkou bezpečnej práce je opatrnosť a čistota. Z tohto dôvodu sa pri práci používa ochranný odev – laboratórny plášť a prezuvky, ak je potrebné, aj ochranné prostriedky (rukavice, okuliare, rúška a pod.).
2. Na praktických úkonoch sa nezúčastňovať v prípade vážnych poranení rúk a nekrytých častí tela.
3. Do laboratória treba nosiť iba najnutnejšie pomôcky určené pre vlastnú prácu.
4. Pracovný stôl udržiavať v poriadku, pracovať rozvážne a neponáhľať sa. Dodržiavať pracovné postupy a riadiť sa pokynmi pedagóga, ktorý vedie cvičenie.
5. Počas celej práce je zakázané jesť, piť, fajčiť, užívať návykové látky a dotýkať sa rukami slizníc úst, nosa, očí, prípadne ostatných častí tela.
6. Použité laboratórne sklo odkladať do nádob s dezinfekčným roztokom alebo do pripravených nádob (transportných košov) určených na dezinfekciu. Očkovacie nástroje odkladať vždy až po vyžihnutí v plameni.
7. Pracovať s vyšetrovaným materiálom tak, aby nedošlo k jeho rozliatiu a kontaminácii pracovného prostredia. Pri kontaminácii pracovného stola, dlážky, stien a pod. zasiahnuté prostredie dekontaminovať: dezinfikovať pokrytím papierovou vatou nasiaknutou dezinfekčným roztokom a jeho opätovným umytím vhodným dezinfekčným roztokom (ajatín, 70% alkohol, formalín a pod.). Infikovanú papierovú vatú treba za dodržania bezpečnostných opatrení spáliť. Pracovný odev, ktorý bol kontaminovaný, musí byť pred praním dekontaminovaný.
8. Pri kontaminácii rúk, prípadne iných častí tela alebo odevu treba hneď pristúpiť k dezinfekcii infikovaného miesta.
9. Pri očkovaní nehovoriť, zamedziť prievanu. Nasávanie tekutého infekčného materiálu je dovolené iba automatickými pipetami alebo sklenenými pipetami vybavenými pipetovacou pomôckou. Pri očkovaní treba dodržiavať pravidlá aseptického práce: okraje banky, skúmavky, bakteriologickú zátku alebo klobúčik vždy opaľovať v plameni kahana.

10. Pri práci s autoklávom: po sterilizácii autokláv otvárať až po vyrovnaní tlaku a čiastočnom vychladnutí.
11. Pri práci s organickými rozpúšťadlami nepracovať v blízkosti otvoreného plameňa.
12. Úraz, poranenie, prípadnú kontamináciu materiálom počas práce na cvičení ihneď oznámiť pedagógovi, ktorý vedie cvičenie.
13. Počas práce dbať na osobnú hygienu. Pred odchodom z laboratória si umyť ruky mydlom, prípadne ich dezinfikovať vhodným dezinfekčným prostriedkom.
14. Z priestorov laboratória nevynášať kultúry živých mikroorganizmov, s ktorými sa pracovalo.
15. Pri odchode z laboratória vypnúť elektrinu a plyn, zastaviť vodu.

7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABC	ATP viažuca kazeta (<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette)
Acetyl-CoA	acetyl koenzýmA
ACP	acyl prenášajúci proteín (<u>a</u> cyl <u>c</u> arrier <u>p</u> rotein)
ADP	adenozíndifosfát
ATP	adenozíntrifosfát
ATPáza	adenozíntrifosfát syntáza
CDP-DAG	citidíndifosfodiacylglycerol
DAG	diacylglycerol
DiS-C ₃ (3)	sonda 3-propyl-2-(3-(3-propyl-2(3H)benzotiazolylidén)-1-propenyl)benzotiazolium jodid
DMSO	dimetylsulfoxid, organické rozpúšťadlo
DPH	fluorescenčná sonda 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién
DTT	ditriotreitol
FAS	syntáza mastných kyselín (<u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>s</u> ynthase)
FPP	farnezyľpyrofosfát
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
MDR	mnohonásobná rezistencia voči cytotoxickým látkam (<u>m</u> ultid <u>r</u> ug <u>r</u> esistance)
MFS	rodina membránových transportérov (<u>m</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily)
NADPH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP)
NDB	nukleotid viažuca doména (<u>n</u> ucleotid <u>b</u> inding <u>d</u> omain)
PDR	pleiotropná rezistencia (<u>p</u> leiotropic <u>d</u> rug <u>r</u> esistance)
TLC	tenkovrstvová chromatografia
TMA-DPH	fluorescenčná sonda 4-trimetyl-amino-1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién
TMD	transmembránová doména proteínu (<u>t</u> rans <u>m</u> embrane <u>d</u> omain)
TMS	transmembránový segment v rámci TMS (<u>t</u> rans <u>m</u> embrane <u>s</u> egment)

UV	ultrafialové svetlo
VIS	viditeľné svetlo

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aguilar-Uscanga, B., Francois, J. M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 268–274.
- Buehler, L. K. (2015) Cell membranes. 1th edition. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC. New York, USA, 400 s.
- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., Dickson, R. C. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1471–1510.
- Escribá, P.V., Gonzalez-Ros, J. M, Goni, F.M., Kinnunen, P. K., Vigh, L., Sánchez-Magraner, L., Fernández, A. M., Busquets, X., Horváth, I., Barceló-Coblijn, G. (2008) Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell Mol. Med.* 12: 829-875.
- Fagone, P., Jackowski, S. (2009) Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* 50: 311-316.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S. (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta.* 1811: 637–647.
- Feldmann, H. (ed.) (2012) Yeast: Molecular and Cell Biology, 2nd edition. Wiley-VCH Verlag Co. Weinheim, Germany, 464 s.
- Gášková, D., Brodská, B., Heřman, P., Večeř, J., Malínský, J., Sigler, K., Benada, O., Plášek, J. (1998) Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14: 1189–1197.
- Gbelska, Y., Toth Hervay, N, Dzugasova, V., Konecna, A. (2017) Measurement of energy-dependent Rhodamine 6 G efflux in yeast species. *Bio-protocol* Vol 7. Iss 15.
- Gbelska, Y., Toth Hervay, N, Morvová, M., Konecna, A. (2017) Sterol analysis in *Kluyveromyces lactis*. *Bio-protocol* Vol 7. Iss 17.
- Hammond, C. (2015) Ionic gradients, membrane potential and ionic currents. V: Cellular and Molecular Neurophysiology. 4th edition, B.m.: Elsevier, 444: 39–54.
- Hannich, J. T., Umebayashi, K., Riezman, H. (2011) Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb perspect biol.* 3(5): a004762.

- Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67–113
- Holland, I. B. (2019) Rise and rise of the ABC transporter families. *Research in Microbiology* 170 (8): 304-320.
- Jungwirth, H., Kuchler, K. (2006) Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS. Lett.* 580: 1131-1138.
- Knittelfelder, O.L., Kohlwein, S. D. (2017) Lipid Extraction from Yeast Cells. *Cold Spring Harb Protoc* doi: 10.1101/pdb.prot085456.
- Kodedova, M., Sychrova, H. (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 10(9): e0139306.
- Kohlwein, S. D. (2017) Analyzing and Understanding Lipids of Yeast: A Challenging Endeavor. *Cold Spring Harbor Protocols*, *pdb.top078956*.
- Klug, L., Daum, G. (2014) Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* 14: 369-388.
- Kuhry, J. G., Fonteneau, P., Duportail, G., Maechling, C., Laustriat, G. (1983) TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys.* 5: 129-140.
- Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition. Springer, Baltimore, USA. 954 s.
- Obeid, L. M., Okamoto, Y., Mao, C. (2002) Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585: 163-171.
- Parks, L. W., Mclean-Bowen, C., Taylor F. R., Hough S. (1978) Sterols in yeast subcellular fractions. *Lipids.*13: 730-735.
- Peña, A., Sánchez, N. S., Calahorra, M. (2010) Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42 (5): 419–432.
- Plášek, J., Sigler, K. (1996) Slow fluorescent indicators of membrane potential: A survey of different approaches to probe response analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 33 (2): 101–124.

Proszynski, T. J., Klemm, R. W., Gravert, M., Hsu, P. P., Gloor, Y., Wagner, J., Kozak, K., Grabner, H., Walzer, K., Bagnat, M., Simons, K. Walch-Solimena, A. C. (2005) A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102 (50): 17981–17986.

Sharma, S. C. (2006) Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6: 1047-10451.

Shinitzki, M. (1984) Chapter 1: Membrane fluidity and cellular functions. V: Physiology of membrane fluidity, Volume I. 2–39.

Shinitzky, M., Barenholz, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *BBA - Reviews on Biomembranes*. 515 (4): 367–394.

Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720-731.

Suchodolski, J., Krasowska, A. (2019) Plasma Membrane Potential of *Candida albicans* Measured by Di-4-ANEPPS Fluorescence Depends on Growth Phase and Regulatory Factors. *Microorganisms*. 7 (4): 110.

Swan, T. M., Watson, K. (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* 169(1): 191-197.

Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S. D. (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*. 1771: 255-270.

Valeur, B., Berberan-Santos, M. N. (2012) *Molecular fluorescence: principles and applications*, 2nd edition. B.m.: Weinheim: WILEY-VCH. 592 s.

van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W. N. (1995) The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. *Microb. Rev.* 59(2):304–322.

van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 112–124.

Obrázok 12 používaný so súhlasom jeho autorky RNDr. Marcely Morvovej, PhD

RNDr. Nora Tóth Hervay, PhD.

BIOMEMBRÁNY

Metódy a postupy umožňujúce štúdium vlastností cytoplazmatickej membrány kvasiniek

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK

Korigovala autorka.

Rozsah 65 strán, 3,7 AH, prvé vydanie

Vyšlo ako elektronická publikácia.

978-80-223-5110-2