Vplyv Pdr16p na vlastnosti cytoplazmatickej membrány kvasiniek *Kluyveromyces lactis*

Alexandra Konečná[1], Alexandra Svrbická[1], Marcela Morvová[2], Nora Tóth Hervay[1], Libuša Šikurová[2], Yvetta Gbelská[1]

[1]Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina 842 15 Bratislava 4,Slovenská republika; alexandra.konecna@gmail.com
[2]Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, Mlynská dolina 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika

Abstract

Pdr16p influences the plasma membrane properties in *Kluyveromyces lactis.*

*Kl*Pdr16p, also called Sfh3p, is a homologue of Sec14p which belongs to the phosphatidylinositol transfer proteins (PITPs) family. *KlPDR16* is involved in the control of *Kluyveromyces lactis* susceptibility to antifungal azols and polyenes. Previous work has shown that the *KlPDR16* gene controls the amount of ergosterol in *Kluyveromyces lactis* cell membranes that could influence the membrane properties. Our present work shows that deletion of *KlPDR16* gene leads to membrane hyperpolarization and decrease in membrane fluidity. These observations correlate with the observed susceptibility of *Klpdr16*Δ deletion mutant to antifungal azoles and polyenes.

Keywords: *Kluyveromyces lactis; lipid metabolism; Kl*Pdr16p; anisotropy; fluidity

Úvod a formulácia cieľa

Evolučne konzervovaný fenomén mnohonásobnej rezistencie MDR (multidrug resistance) predstavuje schopnosť buniek tolerovať prítomnosť rôznych cytotoxických zlúčenín. MDR vzniká často ako dôsledok aktivity membránových vylučovacích púmp z rodiny ABC (ATP- Binding Cassette) alebo MFS (Major Facilitator Superfamily) transportných proteínov, ktoré tak zabezpečujú ochranu bunky pred škodlivým účinkom xenobiotík. Fyziologická funkcia väčšiny efluxných púmp nie je známa. Posledné štúdie, uskutočnené využitím modelového organizmu *Saccharomyces cerevisiae* naznačujú možnú fyziologickú funkciu niektorých efluxných púmp. V rodine MFS-MDR transportérov napr. Tpo1-4p a Qdr3p zabezpečujú export polyamínov [1,2] zatiaľ čo, Qdr2p katalyzuje vstup K^+ iónov do buniek [3]. Výsledky týchto autorov naznačujú, že chemoprotekcia, ktorá je úlohou týchto transportných proteínov môže byť dôsledkom ich vplyvu na potenciál cytoplazmatickej membrány resp. dôsledkom kontroly ΔpH, čo môže mať vplyv na akumuláciu xenobiotík [4]. Niektoré transportné proteíny z ABC rodiny, ktoré boli charakterizované ako determinanty MDR súčasne kontrolujú inkorporáciu lipidov do membrán bunky [5]. *Sc*Pdr5p a jeho homológy Cdr1p a Cdr2p patogénnej kvasinky *C. albicans* zabezpečujú translokáciu

fosfolipidov [6,7]. Delécia ďalšieho génu - *ScPDR16*, funkcia ktorého súvisí s MDR viedla k zmenám v zložení sterolov cytoplazmatickej membrány [8]. Zdá sa teda, že MDR fenotyp zabezpečovaný transportnými proteínmi môže byť tiež dôsledkom zmien, v štruktúre membrány, ktoré môžu spätne ovplyvniť transport cytotoxických zlúčenín.

Nedávno bol izolovaný ortológ génu *ScPDR16* v biotechnologicky významnej kvasinke *Kluyveromyces lactis.* Na základe identifikovaných PDRE-like elementov v promótorovej oblasti génu *KlPDR16* bol podobne ako jeho ortológ *ScPDR16* zaradený do regulónu *Kl*Pdr1p [9]. Delečný mutant *Klpdr16Δ* vykazuje v porovnaní s delečným mutantom *Scpdr16Δ S. cerevisiae* zvýšenú citlivosť voči širšiemu spektru cytotoxických zlúčenín. Popri zvýšenej citlivosti voči antifungálnym azolom bola u delečného mutanta *Klpdr16Δ* pozorovaná zvýšená citlivosť voči oligomycínu, rhodamínu 6G, 4-NQO a katiónom alkalických kovov. Bunky *Klpdr16Δ* mutanta obsahovali znížené množstvo ergosterolu [10].

V predkladanej práci sme sa zamerali na analýzu vplyvu *Kl*Pdr16p na niektoré vlastnosti cytoplazmatickej membrány kvasiniek *K. lactis.*

Materiál a metódy

V práci boli použité nasledovné kmene kvasiniek *K. lactis:* rodičovský kmeň CBS2359 *ku80Δ* (*MATα ku80::loxP)*, jeho izogénny delečný mutant *Klpdr16Δ* (*MATα ku80::loxP pdr16::kanMX)* a transformant *Klpdr16Δ* + pRS306K/*KlPDR16* obsahujúci gén *KlPDR16* na multikópiovom plazmide pRS306K (2µm *URA3 ARS1 KARS2 ori* Amp^R).

Fenotyp uvedených kmeňov bol analyzovaný kvapkovými testami na pevných komplexných médiách, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie antifungálnych azolov (mikonazol, itrakonazol, ketokonazol, flukonazol), ako aj diskovou difúznou metódou s použitím polyénov (amfotericín B, nystatín a pimaricín).

Membránový potenciál bol sledovaný pomocou fluorescenčnej sondy diS-C_3(3) (3,3´-dipropylthiacarboxycyanine). Bunky, vyrastené do exponenciálnej fázy (1-5 x 10^7 b/ml sa dvakrát premyli destilovanou vodou a resuspendovali v 10 mM citrát-fosfátovom tlmivom roztoku (pH 6,0). 3 ml suspenzie buniek sa označili diS-C_3(3)v konečnej koncentrácii 3 x 10^{-8} mol/dm^3. Fluorescenčné emisné spektrá sa zaznamenávali použitím spektrofluorometra Fluoro-Max 4 (Jobin Yvon-Horiba) v rozsahu λ 560-590 nm.

Pri meraní fluidity cytoplazmatickej membrány bola použitá fluorescenčná sonda DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene). Bunky vyrastené do exponenciálnej fázy rastu sa dvakrát premyli tlmivým roztokom Tris-Cl pH 7,0, a resuspendovali v tomto roztoku na koncentráciu odpovedajúcu OD = 0,25 pri 600 nm. Bunky sa označili DPH v konečnej koncentrácii 1,5 x

10^{-7} mol/dm^3. Anizotropia sa merala pri 25 °C na luminiscenčnom spektrometri Perkin-Elmer LS 45 pri excitačnej vlnovej dĺžke 360 nm resp. 430 nm. Namerané hodnoty anizotropie r_s sa použili na stanovenie fluidity membrány podľa vzťahu: $r_s = (I_{VV}-GI_{VH})/(I_{VV+}2GI_{VH})$, kde I je intenzita fluorescencie buniek označených DPH, indexy VV resp. VH označujú polohu excitačného a emisného polarizátora, G je tzv. Grating faktor $G=I_{HV}/I_{HH}$ kontrolných, neoznačených buniek. Indexy HV a HH označujú opačnú polohu polarizátorov k VH resp. VV. Meranie sa uskutočnilo počas 60 min inkubácie buniek v prítomnosti DPH. Hodnoty, získané v 7 nezávislých experimentoch boli spracované softvérom FL Winlab.

Výsledky a diskusia.

Fenotypová analýza testovaných kmeňov *K. lactis,* uskutočnená kvapkovými testami na pevných rastových médiách ukázala, že delečný mutant *Klpdr16Δ* vykazuje zvýšenú citlivosť voči všetkým antifungálnym azolom. Prítomnosť génu v bunkách na multikópiovom plazmide vedie k zvýšenej rezistencii voči všetkým testovaným látkam (Tab.1).

Tab. 1. Citlivosť *Kluyveromyces lactis* voči antifungálnym azolom

kmeň	Minimálna inhibičná koncentrácia (μg/ml^{-1})			
	ITR	KET	MIK	FLC
CBS2359ku80 (wt)	0,025	0,025	>0,02	2,5
Klpdr16Δ	<0,01	<0,015	<0,01	<1
Klpdr16Δ + pRS306K/*KlPDR16*	>0,05	0,1	>0,02<0,03	2,5

*ITR -itrakonazol, KET- ketokonazol, MIK- mikonazol, FLC- flukonazol

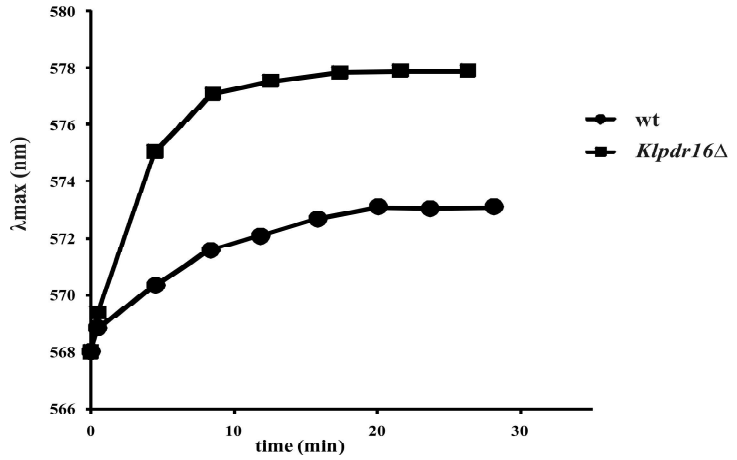
Susceptibilitu analyzovaných kmeňov *K. lactis* voči polyénom sme stanovili diskovou difúznou metódou. Ako demonštruje Tab.2., zvýšená citlivosť delečného mutanta *Klpdr16Δ* v porovnaní s izogénnym štandardným kmeňom resp. transformantom, ktorý obsahoval gén *KlPDR16* na multikópiovom plazmide sa pozorovala pri všetkých použitých polyénoch: amfotericíne B, pimaricíne a nystatíne.

Tab. 2. Citlivosť *Kluyveromyces lactis* voči polyénom

kmeň	Priemer zóny inhibície rastu (mm)		
	AMB	PIM	NYS
CBS2359ku80 (wt)	**15**	**19**	**29**
Klpdr16Δ	**9**	**21**	**22**
Klpdr16Δ* + pRS306K/*KlPDR16	**14**	**18**	**25**

*AMB- amfotericín B, PIM- pimaricín, NYS- nystatín

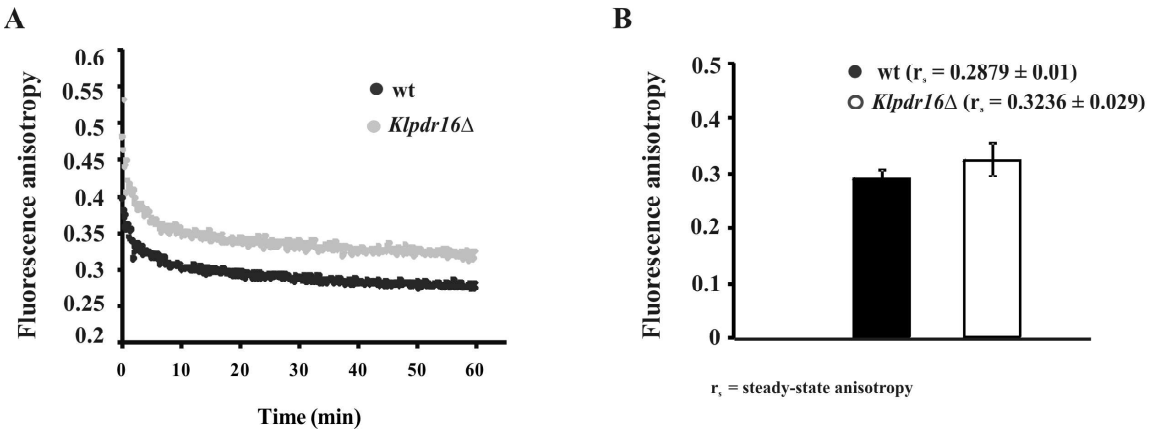
V ďalších experimentoch sa sledoval vplyv mutácie *Klpdr16Δ* na vlastnosti cytoplazmatickej membrány delečného mutanta. V kmeňoch štandardného typu *K. lactis* a izogénneho delečného mutanta *Klpdr16Δ* sa stanovila hladina membránového potenciálu buniek využitím fluorescenčnej sondy diS-C_3(3) (3,3´-dipropylthiacarboxycyanine).



Obr. 1. Fluorescenčné stanovenie membránového potenciálu v bunkách *K. lactis* použitím diS-C3(3)

Ako demonštruje Obr.1., v bunkách delečného mutanta *Klpdr16Δ* dochádza k hyperpolarizácii cytoplazmatickej membrány, čo podporuje predchádzajúce zistenie, že delečný mutant *K. lactis Klpdr16Δ* vykazuje v porovnaní s kmeňom štandardného typu zvýšenú citlivosť voči soliam alkalických kovov (Goffa *et al.,* 2014).

Fluidita cytoplazmatickej membrány študovaných kmeňov kvasiniek *K. lactis* sa sledovala meraním rovnovážnej hodnoty anizotropie použitím fluorescenčnej sondy DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene).



Obr. 2 Časový priebeh fluorescenčnej anizotropie DPH (A). Hodnoty anizotropie v bunkách *Klpdr16*Δ mutanta a izogénneho štandardného typu (B).

Obr. 2. demonštruje časový priebeh anizotropie a rozdiel hodnôt anizotropie v bunkách štandardného kmeňa CBS2359*ku80* a izogénneho delečného mutanta *Klpdr16Δ.* Z nameraných hodnôt anizotropie vyplýva, že fluidita cytoplazmatickej membrány delečného mutanta *K. lactis Klpdr16*Δ je nižšia v porovnaní s fluiditou cytoplazmatickej membrány štandardného kmeňa CBS2359*ku80*. Získané výsledky naznačujú, že príčinou pozorovanej zvýšenej citlivosti delečného mutanta *Klpdr16*Δ voči cytotoxickým zlúčeninám môžu byť zmeny vlastností cytoplazmatickej membrány v dôsledku delécie génu *PDR16*.

Záver

Získané výsledky demonštrujú, že produkt génu *KlPDR16* ovplyvňuje vlastnosti cytoplazmatickej membrány kvasiniek *K. lactis*. Okrem zníženej hladiny ergosterolu so súčasnou akumuláciou prekurzorov sterolov v membráne buniek delečného mutanta *Klpdr16*Δ, ktorú pozoroval Goffa et al. (2014) má delécia génu *KlPDR16* za následok zvýšenú citlivosť mutantných buniek voči rôznym cytotoxickým zlúčeninám. V dôsledku delécie génu *KlPDR16* sa zmení nielen zloženie cytoplazmatickej membrány, ale aj jej vlastnosti. Ukázali sme, že delécia génu *KlPDR16* vedie k hyperpolarizácii cytoplazmatickej membrány v bunkách mutanta a zároveň k zníženiu fluidity membrány v týchto bunkách. Uvedené zistenia sú v súlade s pozorovanou zvýšenou citlivosťou buniek delečného mutanta

K. lactis Klpdr16Δ na cytotoxické látky, pravdepodobne v dôsledku pozorovaných zmien cytoplazmatickej membrány v bunkách delečného mutanta.

Poďakovanie

Práca vznikla s finančnou podporou grantov APVV–0282–10, VEGA 1/0077/14 a GUK 246/2014.

Zoznam použitej literatúry

[1] Tomitori H., Kashiwagi K., Asakawa T., et al. (2001) Biochem. J. 353, p. 681

[2] Teixeira M. C., Cabrito T. R., Hanif Z. M., et al. (2011) Microbiology 157, p. 945

[3] Vargas R. C., Garcia-Salcedo R., Tenreiro S., et al. (2007) Eukaryot. Cell 6, p. 134

[4] Sa- Correia I., Santos S., Teixeira M., et al. (2009) Trends Microbiol. 17, p. 22

[5] Jungwirth H. and Kuchler K. (2006) FEBS Lett. 580, p. 1131

[6] Smriti, Krishnamurthy S., Dixit B. L., et al. (2002) Yeast 19, p. 303

[7] Schuller C., Mammun Y. M., Wolfger H., et al. (2007) Mol. Biol. Cell 18, p. 4932

[8] van den Hazel H. B., Pichler H., do Valle Matta M. A., et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, p. 1934

[9] Balková K., Sarinová M., Hodúrová Z., et al. (2009) FEMS Yeast Res 9, p 321

[10] Goffa E., Balazfyová Z., Toth Hervay N., et al. (2014) FEMS Yeast Res 14, p. 337