

tých modifikací PCR vedoucích k vyšší citlivosti jsme byli schopni získat specifický PCR produkt již při použití pouhých 5 chromosomů. Zjistili jsme, že geny specificky exprimované v samčích pohlavních orgánech se nacházejí jak na pohlavních chromosomech, tak i na autosomech (Kejnovský *et al.* 2001). Dále jsme prokázali duplikativní přenos homeotického rostlinného genu na chromosom Y u *S. latifolia* (Matsunaga *et al.* 2003).

Literatura

- Bůžek, J., Koutníková, H., Houben, A., Říha, K., Janoušek, B., Šíroky, J., Grant, S., Vyskot, B. 1997. - *Chromosome Res.* **5**: 57.
 Kejnovský, E. 2000. - *Biol. listy* **65**: 181.
 Kejnovský, E., Vrána, J., Matsunaga, S., Souček, P., Šíroky, J., Doležel, J., Vyskot, B. 2001. - *Genetics* **158**: 1269.
 Keller, B., Feuillet, C. 2000. - *Trends Plant Sci.* **5**: 246.
 Lapitan, N., Brown, S.E., Kennard, W., Stephens, J.L., Knudson, D.L. 1997. - *Plant J.* **11**: 149.
 Matsunaga, S., Isono, E., Kejnovský, E., Vyskot, B., Doležel, J., Kawano, S., Charlesworth, D. 2003. - *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1062.
 Macas, J., Doležel, J., Lucretti, S., Pich, U., Meister, A., Fuchs, J., Schubert, I. 1993. - *Chromosome Res.* **1**: 107.
 Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. 1998. - *Trends Plant Sci.* **3**: 195.
 Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiri, Y., Simon, M. 1992. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8794.
 Zweick, M.S., Islam-Faridi, M.N., Czeschin, D.G., Wing, R.A., Hart, G.E., Stelly D.M., Price H.J. 1998. - *Genetics* **148**: 1983.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována GAČR (521/02/0427).

Fluorometrická metoda pro *in vitro* měření ligandem otevíraných iontových kanálů pro Ca^{2+} v rostlinách

ONDŘEJ KRINKE¹, ZUZANA NOVOTNÁ¹, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6, ²Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, (tel.: 296 780 416, e-mail: martinec@ueb.cas.cz)

Úvod

Přenos signálů založený na změnách cytosolické koncentrace Ca^{2+} je dobře popsán v živočišných (Bootman *et al.* 2001) i v rostlinných buňkách (Sanders *et al.* 1999). Aktivitou enzymů signálních drah vznikají v buňce molekuly druhých posílů, např. D-*myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát (InsP_3), který pak otevírá specifické iontové kanály pro Ca^{2+} a zvyšuje tak koncentraci Ca^{2+} v cytosolu, která dále ovlivňuje enzymy v signální kaskádě.

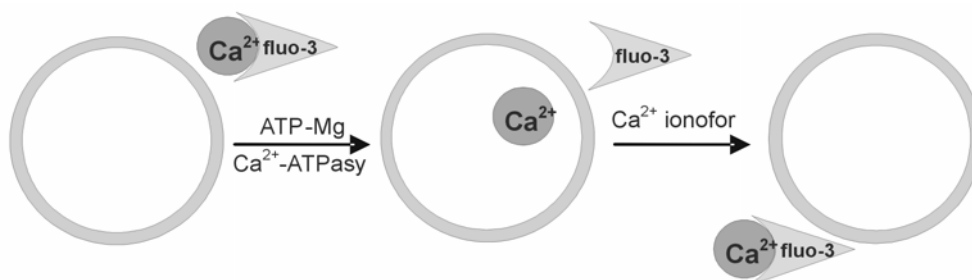
Pro *in vitro* studium iontových kanálů pro Ca^{2+} na rekonstituovaných membránových váčcích existuje několik principiálně odlišných metod. Relativně jednoduchá provedením a nenáročná na vybavení je filtrační radiometrická metoda (Brosnan a Sanders 1990), kde je v odebíraných vzorcích reakční směsi měřen obsah $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uvnitř rekonstituovaných

membránových váčků. Velkou nevýhodou tohoto uspořádání je jeho diskontinualita, která neúnosně zvyšuje experimentální chybu. Mezi nejspolehlivější metody patří *patch-clamp* metoda měření vodivosti jednotlivého iontového kanálu (Allen a Sanders 1994) nebo superfuzní komora (Finch *et al.* 1991), která umožňuje převést diskontinuální radio-metrickou metodu s $^{45}\text{Ca}^{2+}$ do semikontinuálního uspořádání. Obě metody vyžadují speciální přístroje a jejich zavedení je tedy finančně náročné.

Poměrně nenáročné a citlivé je měření pomocí fluorescenčních indikátorů pro Ca^{2+} , které je možno snadno provést kontinuálně v kyvetě spektrofotometru.

Experimentální provedení

Princip metody je znázorněn na obr. 1. V přítomnosti ATP-Mg jsou vápenaté ionty nasáty dovnitř rekonstituovaných membránových váčků působením specifických iontových pump (Ca^{2+} -ATPasy) a po dosažení ustáleného stavu mohou být uvolněny přidavkem Ca^{2+} ionoforu nebo přidavkem specifického ligandu, který otevře iontové kanály pro Ca^{2+} . Vně membránových váčků je přítomen fluorescenční indikátor pro Ca^{2+} , který citlivě reaguje na malé změny $[\text{Ca}^{2+}]$ způsobené nasáváním nebo uvolňováním Ca^{2+} .



Obr. 1. Princip fluorometrické metody (vysvětlení v textu).

Vnitřní objem rekonstituovaných membránových váčků tvoří pouze zlomek celkového objemu reakční směsi v kyvetě, a proto Ca^{2+} uvolněné otevřením specifických iontových kanálů zvyšují koncentraci v okolí váčků jen velmi málo. Výhodou proto jsou citlivé fluorescenční indikátory s nízkou K_d ($\sim 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$). Další komplikací tohoto uspořádání je nutnost pracovat v poměrně úzkém rozsahu koncentrací volných vápenatých iontů ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$) během celého měření ($10^{-7} - 5 \times 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$). Spodní hranice vyplývá z nutnosti zachovat takovou $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$, při které jsou stále dostatečně aktivní Ca^{2+} -ATPasy, které vytváří potřebný koncentrační rozdíl vně a uvnitř váčku. Horní hranice zase plyne z K_d použitého fluorescenčního indikátoru (čím vyšší je měřená koncentrace Ca^{2+} než K_d fluorescenčního indikátoru, tím méně citlivé a přesné je dané měření). Hladinu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ mohou ovlivnit dva jevy: množství kontaminujících Ca^{2+} v reakční směsi a přítomnost a koncentrace látek chelatujících Ca^{2+} - především samotného fluorescenčního indikátoru, ale také ATP nebo EGTA (kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová).

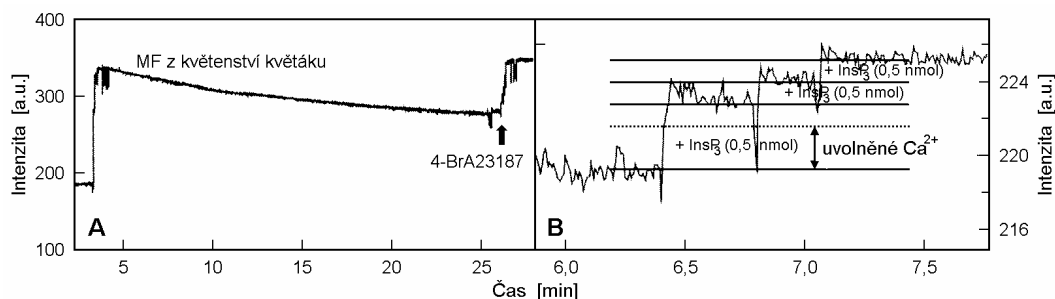
Jako vhodný fluorescenční indikátor pro Ca^{2+} se ukázal fluo-3 (Molecular Probes; Hirota *et al.* 1995; $\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$), jehož K_d umožňuje použít dostatečnou koncentraci indikátoru, která pak zajišťuje stabilní intensitu fluorescence a dobrý poměr

signálu k šumu. Jeho K_d v daném systému se snadno určí pomocí sady Ca^{2+} -EGTA pufrů připravených v daném reakčním pufru a sestavených např. pomocí volně dostupného programu Sliders (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>).

Celková koncentrace Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$) v používaných roztocích je většinou příliš velká ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} \sim 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) a je nutno ji snižovat přečištěním přes specifický ionex. Jako dostatečný pro daný účel se ukázal katex Chelex 100 (BioRad) v 1 ml kolonce. Nejprve je nutno přečistit základní pufr ($0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ glycerol, 50 mmol.l^{-1} KCl, 10 mmol.l^{-1} HEPES-KOH pH 7,4). Z tohoto pufru se pak připraví reakční pufr (6 mmol.l^{-1} ATP v základním pufru $2,5 \times$ ředěném deionizovanou vodou, pH upravit na 7,40 pomocí KOH).

Měření probíhá v míchané fluorescenční kyvetě při 25°C a při pH 7,4. Reakční směs obsahuje $2 \times$ ředěný reakční pufr, $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ fluo-3, 3 mmol.l^{-1} MgCl_2 (v případě použití Na_2ATP) a membránové vložky ($60 \mu\text{g}$ (proteinů). ml^{-1}). Přenos Ca^{2+} do membránových vložek probíhá do dosažení stacionárního stavu (cca 20 min; obr. 2A). Ligand je nutno přidat v malém objemu $3 \times$ po sobě. 2. a 3. přidavek umožní určit nespecifické zvýšení fluorescence (měly by být stejné či nižší než první a odpovídat množství Ca^{2+} obsažených v zásobním roztoku ligandu), které je pak třeba odečíst od prvního zvýšení (obr. 2B).

Celý systém byl testován na receptoru pro InsP_3 (InsP_3 -R; Krinke 2003). Koncentrace InsP_3 v reakční směsi by v daném případě neměla významně překročit 500 nmol.l^{-1} (100 nmol.l^{-1} pro jeho účinnější funkční analog adenophostin A (APA); Beecroft *et al.* 1999), aby pufování uvolněných Ca^{2+} přítomným ligandem nebylo významné. Zároveň by tato koncentrace měla být dostatečná na to, aby hned prvním přidavkem ligandu byly téměř úplně vyprázdněny membránové vložky citlivé na tento ligand. V případě InsP_3 -R uvedené koncentrace ligandů tuto podmínku splňují.



Obr. 2. Průběh nasávání Ca^{2+} mikrosomální frakcí (MF) z květenství kvěťáku a uvolnění Ca^{2+} přidavkem nefluorescenčního Ca^{2+} ionoforu (A). Efekt přidavku InsP_3 (0,5 nmol) na MF z krysích hepatocytů po ukončení nasávání Ca^{2+} (B).

Celkové uvolnitelné množství Ca^{2+} lze určit přidavkem $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ nefluorescenčního ionoforu 4-Br A23187 (Molecular Probes; $2 \times$ po sobě, 2. přidavek opět pro určení nespecifického zvýšení fluorescence). Na konci každého měření je třeba zjistit, jaká je maximální fluorescence indikátoru v daném vzorku přidavkem $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ CaCl_2 . Hodnota maximální fluorescence umožňuje korigovat naměřené hodnoty fluorescence na vnitřní filtrační efekt vzorku (jedná se o suspensi, která sama absorbuje a rozptyluje světlo). Naměřené hodnoty fluorescence je možno použít pro výpočet látkového množství uvolněných Ca^{2+} s pomocí následujících bilančních a rovnovážných vztahů:

$$[Ca^{2+}]_{free} = K_d' (fluo - 3 - Ca) \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

$$[Mg^{2+}]_{total} = [Mg^{2+}]_{free} + [ATP - Mg] \quad K_d (fluo - 3 - Ca) = \frac{[fluo - 3]_{free} [Ca]_{free}}{[fluo - 3 - Ca]}$$

$$[Ca^{2+}]_{total} = [Ca^{2+}]_{free} + [ATP - Ca] + [fluo - 3 - Ca] \quad K_d (ATP - Mg) = \frac{[ATP]_{free} [Mg]_{free}}{[ATP - Mg]}$$

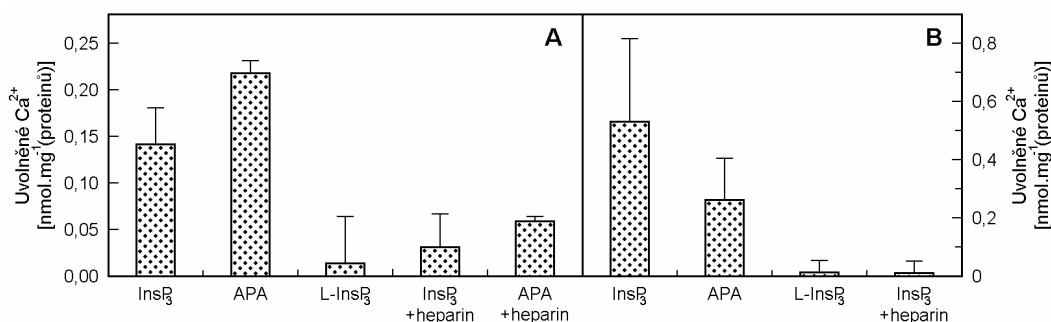
$$[ATP]_{total} = [ATP]_{free} + [ATP - Ca] + [ATP - Mg] \quad K_d (ATP - Ca) = \frac{[ATP]_{free} [Ca]_{free}}{[ATP - Ca]}$$

$$[fluo - 3]_{total} = [fluo - 3]_{free} + [fluo - 3 - Ca]$$

Hodnota fluorescence je nejprve přepočtena na hodnotu $[Ca^{2+}]_{free}$ a ta posléze na $[Ca^{2+}]_{total}$, která teprve odráží skutečné poměry v systému. Rozdíl dvou jejích hodnot před a po přidavku ligandu udává množství Ca^{2+} uvolněných otevřením iontového kanálu.

Použitelnost

Věřitelnost prezentované metody byla ověřena na membránových váčcích MF z krysích hepatocytů, u kterých bylo popsáno uvolňování Ca^{2+} indukované $InsP_3$ (Surroca a Wolff 2000; obr. 3A). Metoda byla dále testována na vybraných rostlinných materiálech, z nichž jako nejvhodnější pro další studie $InsP$ -R se ukázalo květenství kvěťáku (Muir a Sanders 1997; obr. 3B).



Obr. 3. Přehled výsledků pro jednotlivé ligandy u MF z krysích hepatocytů (A) a u MF z květenství kvěťáku (B). Ligandy byly přidány v následujících látkových množstvích: $InsP_3$ (0,5 nmol), APA (0,1 nmol), L- $InsP_3$ (0,5 nmol) jako neaktivní strukturní analog $InsP_3$ (Polokoff *et al.* 1988) a nízkomolekulární heparin ($M_r = 3000$) (3 nmol) jako inhibitor vazby $InsP_3$ na $InsP_3$ -R (Bultynck *et al.* 2003). Objem reakční směsi byl 1 ml. Výsledky představují průměr $\pm$ výběrová směrodatná odchylka ze dvou nebo tří paralel. $InsP_3$ - D-*myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát, L- $InsP_3$ - L-*myo*-inositol 1,4,5-trisfosfát, APA - adenophostin A.

Praktické postřehy

Pro přípravu reakčního pufru je vhodnější použít dražší MgATP než Na_2ATP , protože se tím sníží počáteční koncentrace Ca^{2+} , čímž se zvýší citlivost metody. Reakční pufr je

vhodné připravit vždy čerstvý, protože ATP v reakčním pufru samovolně hydrolyzuje a tento proces zvyšuje pozadí měření už po 8 hod od přípravy roztoku. Reakční pufr nelze zbavit Ca^{2+} pomocí Chelex 100, protože ATP má v tomto pufru vyšší afinitu k Ca^{2+} než Chelex 100. Na počáteční koncentraci Ca^{2+} má také významný vliv kvalita vody (vhodné je používat dvakrát deionizovanou vodu).

Důležitá pro průběh celého měření je kyveta, která musí být dostatečně účinně míchaná a temperovaná. Vhodná byla 10 mm kyveta s výbrusem pro míchadlo s 1 ml reakční směsí. Kyvetu je nutno před každým měřením důkladně vypláchnout denaturovaným ethanolom pro odstranění zbytků ionoforu, deionizovanou vodou, $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ EGTA pro odstranění zbytků Ca^{2+} z předchozího měření maximální fluorescence a nakonec opět deionizovanou vodou.

Nasávání Ca^{2+} dovnitř membránových váček se v případě použití fluo-3 projevuje poklesem fluorescence, který je zpočátku rychlý a později se zpomaluje. I když není ustáleného stavu dosaženo ani po 20 min, není dobré tuto fázi více prodlužovat, aby se zabránilo případné denaturaci iontového kanálu.

Problémy mohou způsobovat zelené rostlinné materiály, protože fluo-3 fluoreskuje v zelené spektrální oblasti. Množství proteinů v reakční směsi je třeba upravit zvlášť pro každý použitý biologický materiál, vodítkem může být pokles maximální fluorescence, který by neměl přesáhnout 10 % hodnoty maxima pro čirý roztok.

Správnost bilančních výpočtů je možno ověřit přidávkem vnitřního standardu ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ CaCl_2) po druhém přidávku ionoforu a podle změřeného zvýšení fluorescence zpětně dopočítat tuto hodnotu.

Literatura

- Allen, G.J., Sanders, D. 1994. - Plant J. **6**: 687.
- Beecroft, M.D., Marchant, J.S., Riley, A.M., van Straten, N.C.R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Potter, B.V.L., Taylor, C.W. 1999. - Mol. Pharmacol. **1**: 109.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F., Lip, P. 2001. - Semin. Cell Dev. Biol. **12**: 3.
- Brosnan, J.M., Sanders, D. 1990. - FEBS Lett. **260**: 70.
- Bultynck, G., Sienaeert, I., Parys, J.B., Callewaert, G., De Smedt, H., Boens, N., Dehaen, W., Missiaen, L. 2003. - Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. **445**: 629.
- Finch, E.A., Turner, T.J., Goldin, S.M. 1991. - Science **252**: 443.
- Hirota, J., Michikawa, T., Miyawaki, A., Furuichi, T., Okura, I., Mikoshiba, K. 1995. - J. Biol. Chem. **270**: 19 046.
- Krinke, O. 2003. - Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Muir, S.R., Sanders, D. 1997. - Plant Physiol. **114**: 1511.
- Polokoff, M.A., Bencen, G.H., Vacca, J.P., de Solms, S.J., Young, S.D., Huff, J.R. 1988. - J. Biol. Chem. **263**: 11 922.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. 1999. - Plant Cell **11**: 691.
- Surroca, A., Wolff, D. 2000. - J. Membrane Biol. **177**: 243.

Poděkování. Za výbornou technickou spolupráci patří poděkování Olze Štajnrtové. Tato práce byla finančně podporována grantem LN00A081 MŠMT.