

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Michaela Hrášková**

Úloha proteinu Erv14 v udržování homeostáze kationtů alkalických kovů  
v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*

Role of the Erv14 protein in the maintenance of alkali-metal-cation  
homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Klára Papoušková, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 4. 2018

Podpis

Tato diplomová práce byla vypracována v Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v. v. i. v rámci grantových projektů:

GA ČR 16-03398S

Transportéry patogenních kvasinek rodu *Candida* jako možný cíl vývoje nových antimykotik.

GA ČR 17-01953S

Fyziologická úloha kation/proton antiportních systémů v homeostázi monovalentních kationtů, signalizaci  $\text{Ca}^{2+}$  a v regulaci vnitrobuněčného pH.

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Kláře Papouškové, Ph.D. za odborné vedení této práce, veškeré rady a vědomosti, které mi předala a čas, který mi věnovala. Dále děkuji všem členům Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR v. v. i. za jejich rady a vytváření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své nejbližší rodině, mámě, babičce Janě, dědovi Honzovi a mému nejdražšímu příteli Radkovi za veškerou jejich podporu během celé doby studia.

## Abstrakt

Protein Erv14 působí v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* jako cargo receptor ve váčcích COPII. Velké množství membránových proteinů, včetně Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru plazmatické membrány Nha1, který se podílí na udržování homeostáze kationtů alkalických kovů, vyžaduje pro svůj transport z ER protein Erv14. V nepřítomnosti Erv14 je Nha1 částečně zadržován uvnitř buněk, a tím je ovlivněna i jeho celková měřitelná transportní aktivita v plazmatické membráně. Přestože Erv14 interaguje s transmembránovými doménami antiporteru, ukázalo se, že zkrácená verze antiporteru Nha1, postrádající dlouhý hydrofilní C-konec, není v transportu do plazmatické membrány na přítomnosti Erv14 závislá.

Tato práce přispívá k porozumění úloze proteinu Erv14 v udržování homeostáze kationtů alkalických kovů v buňkách *S. cerevisiae*. Byly připraveny dva kmeny *S. cerevisiae* postrádající gen *ERV14* a byl studován vliv této delece na růst buněk a jejich toleranci vůči solím. Dále byla pomocí heterologní exprese proteinů NHA z různých druhů kvasinek, výrazně se lišících délkou hydrofilního C-konce, studována lokalizace a funkce těchto antiporterů v buňkách *S. cerevisiae* za přítomnosti či nepřítomnosti proteinu Erv14. Naše výsledky naznačily, že by délka C-konce antiporterů mohla hrát roli v jejich požadavku na přítomnost Erv14 pro průchod sekreční dráhou. Proto byly dále vytvořeny tři plazmidy obsahující sekvence kódující zkrácené verze proteinu ScNha1 lišící se délkou svého hydrofilního C-konce a byla studována lokalizace, funkce a aktivita těchto verzí proteinu v přítomnosti a nepřítomnosti Erv14. Potvrdili jsme, že délka C-koncové části antiporteru souvisí s požadavkem na přítomnost Erv14 pro efektivní transport Nha1 do plazmatické membrány. Studován byl i vliv přítomnosti Erv14 na lokalizaci a aktivitu dalšího exportéru kationtů alkalických kovů, ATPázy Ena1. Nutnost přítomnosti Erv14 pro správnou lokalizaci a aktivitu ATPázy Ena1 však nebyla žádným z použitých přístupů prokázána.

**Klíčová slova:** homeostáze kationtů, *NHA1*, *ENA1*, *ERV14*, *Saccharomyces cerevisiae*

## Abstract

The Erv14 protein works as a cargo receptor in the COPII vesicles. Many proteins, including Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1, which participates in the maintenance of cell alkali-metal-cation homeostasis, need Erv14 for their trafficking from the ER. When Erv14 is missing, the Nha1 antiporter is partially retained in the ER and its overall transport activity is affected. Although Erv14 interacts with the antiporter through Nha1's transmembrane domains, a shortened version of Nha1 lacking its long hydrophilic C-terminus does not require Erv14 for its efficient trafficking to plasma membrane.

This thesis contributes to the understanding of the role of the Erv14 protein in the maintenance of alkali-metal-cation homeostasis in *S. cerevisiae* cells. Two *S. cerevisiae* strains lacking *ERV14* gene were prepared and the effect of this deletion on the growth and salt tolerance of cells was studied. Using heterologous expression of NHA antiporters from various yeast species with variable lengths of their hydrophilic C-termini we studied localisation and function of these antiporters in *S. cerevisiae* cells in the presence and in the absence of Erv14 protein. Our results suggested that the length of the antiporter's C-terminus might play a role in its requirement of Erv14 presence for its trafficking through the secretory pathway. Thus three new plasmids containing sequences coding truncated versions of the Nha1 protein differing in the lengths of their hydrophilic C-terminus were constructed and localisation, function and activity of the shortened versions were studied in the presence and in the absence of Erv14. We confirmed that the length of the antiporter's C-terminal part is linked to its requirement of Erv14 for efficient transport to the plasma membrane. The effect of presence and absence of Erv14 on localisation, function and activity of another exporter of alkali metal cations, Ena1 ATPase, was also studied, but used different approaches did not reveal any dependence of Ena1 biogenesis on the presence of Erv14.

**Keywords:** cation homeostasis, *NHA1*, *ENA1*, *ERV14*, *Saccharomyces cerevisiae*

# Obsah

## Seznam zkratk

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>2</b>
2.1	Transportéry kationtů alkalických kovů plazmatické membrány.....	3
2.1.1	H <sup>+</sup> -ATPáza plazmatické membrány.....	3
2.1.2	Transportéry zajišťující import kationtů alkalických kovů.....	4
2.1.2.1	Importéry K <sup>+</sup> Trk1 a Trk2.....	4
2.1.2.2	Ostatní transportéry zajišťující import draselných kationtů.....	5
2.1.2.3	Fosfátový transportér Pho89.....	6
2.1.3	Transportéry zajišťující export kationtů alkalických kovů.....	6
2.1.3.1	Iontový kanál Tok1.....	7
2.1.3.2	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter Nha1.....	7
2.1.3.2.1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery plazmatické membrány v dalších kvasinkách..	10
2.1.3.3	ATPázy Ena.....	11
2.2	Transportéry kationtů alkalických kovů lokalizované uvnitř buňky.....	13
2.2.1	Vnitrobuněčná H <sup>+</sup> -ATPáza.....	13
2.2.2	Transport přes vnitřní mitochondriální membránu.....	13
2.2.3	Endozomální transportér Nhx1.....	14
2.2.4	Transportér Golgiho aparátu Kha1.....	15
2.2.5	Vakuolární transportéry kationtů alkalických kovů.....	15
2.3	Sekreční dráha.....	16
2.3.1	Váčky COPII.....	17
2.3.2	Cargo receptory.....	17
2.4	Protein Erv14.....	19
2.4.1	Vlastnosti proteinu Erv14 a jeho úloha v buňkách.....	19
2.4.2	Interakce proteinu Erv14 s antiporterem Nha1.....	21
<b>3</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Materiál.....</b>	<b>25</b>
4.1	Kmeny kvasinek a bakterií.....	25
4.1.1	Kvasinky.....	25
4.1.2	Bakterie.....	25
4.2	Primery.....	25
4.3	Vektory.....	27
4.4	Chemikálie.....	28
4.5	Kultivační média.....	29

4.5.1	Média pro kultivaci kvasinek.....	29
4.5.2	Média pro kultivaci bakterií.....	30
4.6	Přístroje a pomůcky.....	30
4.7	Počítačové programy a databáze.....	31
<b>5</b>	<b>Metody.....</b>	<b>32</b>
5.1	Sterilizace materiálu.....	32
5.2	Kultivace a uchovávání buněk.....	32
5.2.1	Kvasinky.....	32
5.2.2	Bakterie.....	32
5.3	Měření optické denzity..	33
5.4	Transformace bakterií.....	33
5.5	Transformace kvasinek.....	33
5.6	Izolace plazmidové DNA z bakterií.....	34
5.7	Izolace plazmidové DNA z kvasinek.....	35
5.8	Restrikční analýza.....	36
5.9	Elektroforetická analýza.....	36
5.10	PCR.....	37
5.11	Colony PCR.....	38
5.12	Precipitace DNA..	39
5.13	Sledování růstu pomocí kapkového testu.....	39
5.14	Měření růstových křivek v tekutém médiu. ....	40
5.15	Stanovení obsahu sodných kationtů v buňkách pomocí AAS.....	41
5.16	Fluorescenční mikroskopie.....	42
<b>6</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>43</b>
6.1	Příprava kmenů W303-1A <i>erv14Δ</i> a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	43
6.2	Vliv delece genu <i>ERV14</i> na růst kmenů W303-1A a BW31.....	48
6.3	Vliv delece genu <i>ERV14</i> na funkci a lokalizaci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek..	50
6.3.1	Vliv delece genu <i>ERV14</i> na funkci a lokalizaci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek v kmeni BYT45 a BYT45 <i>erv14Δ</i> .....	52
6.3.1.1	Růst buněk BYT45 a BYT45 <i>erv14Δ</i> s heterologně exprimovanými antiportery NHA za přítomnosti solí.....	52
6.3.1.2	Lokalizace heterologně exprimovaných proteinů z rodiny NHA v buňkách BYT45 a BYT45 <i>erv14Δ</i> .....	54
6.3.2	Vliv delece genu <i>ERV14</i> na funkci a lokalizaci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek v kmeni BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	56
6.3.2.1	Růst buněk BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> s heterologně exprimovanými antiportery NHA za přítomnosti solí.....	56

6.3.2.2	Lokalizace heterologně exprimovaných proteinů z rodiny NHA v buňkách BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	58
6.4	Studium vlivu délky C-konce proteinu ScNha1 na jeho lokalizaci, funkci a aktivitu v buňkách BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	60
6.4.1	Tvorba plazmidů pGRU1 nesoucích zkrácené verze ScNHA1 pomocí homologní rekombinace.....	61
6.4.2	Růst buněk BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> transformovaných plazmidy pGRU1 nesoucími zkrácené verze ScNha1.....	66
6.4.3	Lokalizace zkrácených verzí transportéru ScNha1, v přítomnosti a nepřítomnosti <i>ERV14</i> .....	67
6.4.4	Studium funkce zkrácených verzí transportéru ScNha1 v přítomnosti a nepřítomnosti <i>ERV14</i> pomocí kapkového testu.....	68
6.4.5	Měření výstupu sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> , produkujících zkrácené verze ScNha1, pomocí AAS.....	71
6.5	Studium lokalizace a funkce ATPázy ScEna1 a jejího homologu z kvasinky <i>Candida glabrata</i> , CgEna1, v kmeni BYT45 a BYT45 <i>erv14Δ</i> .....	73
6.5.1	Topologické modely proteinů ScEna1 a CgEna1.....	73
6.5.2	Ověření funkčnosti proteinů ScEna1 a CgEna1 v buňkách BYT45 a BYT45 <i>erv14Δ</i> .....	75
6.5.3	Lokalizace proteinů ScEna1 a CgEna1 v buňkách BYT45 a BYT45 <i>erv14Δ</i> .....	76
6.6	Studium lokalizace, funkce a aktivity proteinu ScEna1 v kmeni BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	77
6.6.1	Ověření funkčnosti ATPázy ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	77
6.6.2	Lokalizace ATPázy ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 <i>erv14Δ</i> .....	78
6.6.3	Měření výstupu sodných kationtů z buněk produkujících protein ScEna1 pomocí AAS.....	79
<b>7</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>81</b>
7.1	Studium vlivu delece genu <i>ERV14</i> na růst kmenů W303-1A a BW31.....	82
7.2	Studium vlivu delece genu <i>ERV14</i> na lokalizaci a funkci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek.....	83
7.3	Studium vlivu delece genu <i>ERV14</i> na lokalizaci, funkci a aktivitu zkrácených verzí antiporteru ScNha1 v buňkách kmene BW31.....	86
7.4	Studium funkce, lokalizace a aktivity proteinu Ena1 v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu <i>Erv14</i> .....	91
<b>8</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>96</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>112</b>

## Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AHLW	směs adenin, histidin, leucin, tryptofan
AK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
ATPáza	enzym katalyzující hydrolýzu adenosintrifosfátu
bp	pár nukleotidů v DNA (base pair)
COPI, COPII	obalové proteiny I/II (coat proteins I/II)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleid acid)
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
GTPáza	enzym katalyzující hydrolýzu guanosintrifosfátu
HMLU	směs histidin, methionin, leucin, uracil
kDa	kilodalton
médium LB	médium Luria-Bertani
MPM	membránové segmenty (Membrane – Pore – Membrane)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleid acid)
OD	optická denzita
PAIRS	párovací analýza cargo receptoru s nákladem (pairing analysis of cargo receptors)
pDNA	plazmidová DNA
P <sub>i</sub>	fosforečnanové anionty (inorganic phosphate)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PM	plazmatická membrána
rpm	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný (sodiumdodecylsulfát)
TMD	transmembránová doména

U	jednotka enzymové aktivity (1 enzyme <b>u</b> nit = 1 $\mu$ mol substrátu/min)
UV	ultrafialové záření ( <b>u</b> ltraviole <b>t</b> light)
YNB	minimální kvasinkové růstové médium ( <b>y</b> east <b>n</b> itrogen <b>b</b> ase)
YPD	bohaté kvasinkové růstové médium ( <b>y</b> east <b>p</b> eptone <b>d</b> extrose)

# 1 Úvod

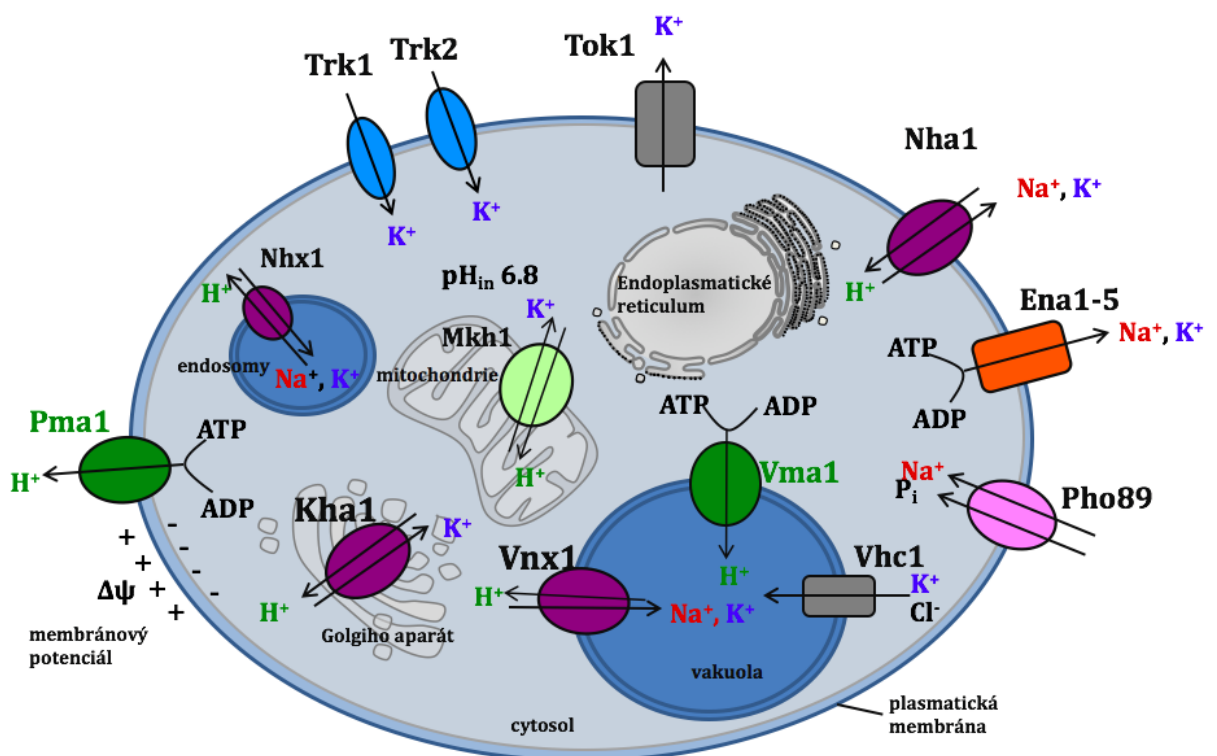
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jednobuněčný eukaryotní organismus patřící mezi vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*), který je využíván v mnoha odvětvích průmyslu, jako je potravinářství, farmacie či biotechnologie. Hojně se využívá také jako modelový organismus ve vědě, jelikož mnohé fyziologické děje v kvasinkách jsou podobné těm probíhajícím v buňkách vyšších eukaryot. *S. cerevisiae* se snadno kultivuje, má krátkou generační dobu (v médiu bohatém na živiny 90 minut) a dokáže růst dlouhodobě jako haploid. Kromě těchto vlastností, které ji staví do role ideálního modelového organismu, byl navíc její genom, nesoucí více než 6200 genů na 16 chromozomech, kompletně sekvenován (Goffeau et al., 1996) a je dostupných mnoho nástrojů k jeho úpravám. Nástroje genové manipulace zahrnují možnost delecí či mutací genů kvasinky a velmi účinná homologní rekombinace *S. cerevisiae* umožňuje vkládání vlastní či cizí DNA do genomu.

Jednou z důležitých podmínek pro přežití všech buněk, včetně kvasinkových, je schopnost udržování homeostáze kationtů alkalických kovů. Zatímco draselné kationty jsou vyžadovány k mnoha buněčným funkcím a jsou tak udržovány uvnitř buňky v relativně vysokých koncentracích (200 mM – 300 mM), jsou sodné kationty pro buňky toxické a je nezbytné jejich hladinu v buňkách udržovat na co nejnižší úrovni.

Transportéry kationtů alkalických kovů plazmatické membrány, stejně jako další proteiny plnící své funkce v plazmatické membráně (PM), endoplazmatickém retikulu (ER), Golgiho aparátu (GA), vakuole, buněčné stěně či extracelulárním prostoru, jsou transportovány do místa svého působení sekreční dráhou, za jejíž popis byla udělena v roce 2013 Nobelova cena za fyziologii a medicínu Randymu Schekmanovi. Proteiny sekreční dráhy jsou nejprve transportovány do ER, odkud dále pokračují ve váčcích COPII do GA. Proteiny se stávají součástí váčku COPII díky interakci s komplexem proteinů tvořících váček COPII či díky vazbě s tzv. cargo receptorem, který interakci s komplexem COPII zprostředkuje. Jedním z těchto cargo receptorů je i protein Erv14, na jehož přítomnosti závisí průchod sekreční dráhou velkého množství proteinů, avšak přesný mechanismus, kterým Erv14 rozpoznává tyto proteiny, není dosud plně objasněn. Výsledky prezentované v této diplomové práci rozšiřují vědomosti o úloze proteinu Erv14 v udržování homeostáze kationtů alkalických kovů v kvasince *S. cerevisiae* a vlivu proteinu Erv14 na lokalizaci a funkci transportérů kationtů alkalických kovů, antiporteru Nha1 a ATPázy Ena1.

## 2 Literární přehled

Pro všechny živé organismy je nezbytné udržovat si stálé vnitřní prostředí. Na udržování stálé hladiny kationtů alkalických kovů buňky vynakládají velké množství energie, jelikož jejich přítomnost ovlivňuje mnoho buněčných funkcí a je proto důležité jejich import a export regulovat (Arino et al., 2010). Zatímco sodné kationty jsou pro buňku toxické, jsou draselné kationty nezbytné např. k udržování membránového potenciálu, regulaci vnitrobuněčného pH a objemu buňky, funkci některých enzymů a neutralizaci negativního náboje makromolekul. Díky efektivním transportérům kationtů alkalických kovů dokáží buňky *Saccharomyces cerevisiae* růst ve velkém rozpětí koncentrací draselných i sodných kationtů. Zatímco extracelulární koncentrace pro život nezbytných draselných kationtů, která je uvnitř buňky za obvyklých růstových podmínek od 200 mM do 300 mM, se může pohybovat od 10  $\mu$ M do 2,5 M, je *S. cerevisiae* schopna růst obvykle při koncentracích toxických  $\text{Na}^+$  do 1,5 M (Arino et al., 2010). Mezi transportéry, zajišťující tuto přizpůsobivost, patří jak transportéry plazmatické membrány, tak i transportéry vnitrobuněčné (Obr.1).



Obr. 1: Transportéry kationtů alkalických kovů a protonové ATPázy Pma1 a Vma1 kvasinky *S. cerevisiae* (Oddělení membránového transportu, FGÚ, AV ČR).

## 2.1 Transportéry kationtů alkalických kovů plazmatické membrány

### 2.1.1 H<sup>+</sup>-ATPáza plazmatické membrány

H<sup>+</sup>-ATPáza plazmatické membrány Pma1 zajišťuje primární aktivní transport protonů ven z buňky a vytváří tak elektrochemický gradient protonů, který je následně využíván sekundárně aktivními transportéry k transportu iontů a živin proti jejich koncentračnímu gradientu (Serrano, 1978; de la Pena et al., 1982; Arino et al., 2010). Pma1 je také nezbytná pro regulaci vnitrobuněčného pH (Serrano et al., 1986), odolnost vůči osmotickému stresu a buněčný růst (McCusker et al., 1987). Díky všem těmto úlohám je pro buňku nezbytně důležitá a buňky s delecí genu kódujícího protein Pma1 nejsou životaschopné (Serrano et al., 1986). Vzhledem k tomu se stávají inhibitory Pma1, ovlivňující elektrochemický potenciál plazmatické membrány buněk, také vhodným cílem pro antimykotickou léčbu (Kjellerup et al., 2017).

Pma1 patří do rodiny ATPáz P-typu (Serrano et al., 1978; Serrano et al., 1986), stejně jako savčí Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup>-ATPázy, se kterými sdílí vysokou podobnost na úrovni sekvence aminokyselin (Serrano et al., 1986). Protein Pma1 o velikosti 100 kDa a délce 918 AK je kódován genem lokalizovaným na chromozomu VII (Serrano et al., 1986). Strukturní model Pma1 kvasinky *S. cerevisiae* je založen na modelu vytvořeném pro H<sup>+</sup>-ATPázu plísně *Neurospora crassa* (Kuhlbrandt et al., 2002). ScPma1 má deset transmembránových domén, N a C-konec směřující do cytosolu a velkou vnitrobuněčnou smyčku mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem, která obsahuje motiv pro vazbu ATP a fosforylaci (Kuhlbrandt et al., 2002).

Kvůli svým nepostradatelným funkcím je H<sup>+</sup>-ATPáza Pma1 přísně regulována a to jak na úrovni transkripce (Rao et al., 1993), tak na úrovni posttranslačních modifikací (Serrano et al., 1983; Goossens et al., 2000). Pro regulaci biogeneze, stability a aktivity je nezbytný C-konec proteinu (Mason et al., 2014). Aktivita Pma1 je mimo jiné regulována přítomností glukózy (Serrano et al., 1983), která výrazně zvyšuje její aktivitu, zatímco v nepřítomnosti glukózy je C-konec proteinu složen tak, že je ATPázová aktivita proteinu inhibována (Mason et al., 2014). Aktivita Pma1 se zvyšuje také při snížení vnitrobuněčného pH a i při zvýšeném příjmu draselných kationtů (Seto-Young and Perlin, 1991).

Genom *S. cerevisiae* obsahuje i další gen kódující H<sup>+</sup>-ATPázu plazmatické membrány, PMA2 (Schlessner et al., 1988). Protein Pma2 je z velké části homologní s Pma1, ale je v buňkách produkován v mnohem menší míře, má odlišné enzymatické vlastnosti a není pro buňku esenciální (Supply et al., 1993).

## **2.1.2 Transportéry zajišťující import kationtů alkalických kovů**

K udržování relativně vysoké vnitrobuněčné koncentrace draselných kationtů využívají buňky *S. cerevisiae* vysokoafinitní (Kap. 2.1.2.1) i nízkoafinitní (Kap. 2.1.2.2) transportní systémy. Pro aktivní specifický import toxických sodných kationtů žádný transportér v plazmatické membráně neexistuje (Arino et al., 2010). Výjimku tvoří protein Pho89 (Martinez and Persson, 1998), kterým se do buněk, pouze za specifických podmínek vnějšího prostředí, mechanismem symportu se sodným kationtem, transportují anorganické fosforečnanové anionty (Kap. 2.1.2.3). Sodné kationty se mohou do buněk dostávat i přes importéry draselných kationtů, Trk1 (Gaber et al., 1988) a Trk2 (Ko et al., 1990), ale jsou transportovány s mnohem nižší afinitou, než kationty draselné (Ramos et al., 1985). Další možností, jak se sodné kationty mohou do buňky dostat, jsou nespecifické transportéry (Gomez et al., 1996), jako je např. nespecifický kationtový kanál NSC1 (nonspecific cation channel) (Bihler et al., 1998 a 2002).

### **2.1.2.1 Importéry K<sup>+</sup> Trk1 a Trk2**

Trk1 a Trk2 jsou proteiny plazmatické membrány zajišťující příjem většiny draselných kationtů z vnějšího prostředí do buňky, a hrají tak důležitou roli v udržování homeostáze K<sup>+</sup> (Arino et al., 2010). Zároveň jsou však důležité i pro regulaci vnitrobuněčného pH (Madrid et al., 1998; Yenush et al., 2002, 2005; Navarrete et al., 2010) a udržování membránového potenciálu (Madrid et al., 1998; Mulet et al., 1999).

Trk1 je 180 kDa velký protein tvořený 1235 AK, kódovaný genem umístěným na chromozomu X (Gaber et al., 1988). Předpokládá se, že je tvořen čtyřikrát se opakujícím motivem MPM, kde každý tento motiv tvoří dva membránové segmenty (M1 a M2) propojené  $\alpha$  - šroubovicí (P), a velkou hydrofilní smyčkou mezi prvním a druhým motivem MPM (Gaber et al., 1988; Durell et al., 1999). Trk2 (Ko et al., 1990), kódovaný genem lokalizovaným na chromozomu XI, je o něco kratší. Jeho celková délka činí 889 AK a topologie je shodná s topologií proteinu Trk1 (Ko et al., 1990; Durell et al., 1999). Na úrovni

aminokyselinové sekvence jsou transportéry z 55 % identické, přičemž nejvyšší shoda byla nalezena v rámci transmembránových segmentů a největší variabilita v hydrofilní smyčce (Ko and Gaber, 1991).

Dříve se předpokládalo, že Trk1 funguje jako vysokoafinitní transportér (Gaber et al., 1988), zatímco Trk2 jako nízkoafinitní transportér (Ko et al., 1990). Novější výzkumy ale ukazují, že ačkoliv je Trk1 dominantní importér  $K^+$  a buňky postrádající gen *TRK2* nevykazují téměř žádný fenotyp (Ramos et al., 1994; Petrezselyova et al., 2011), jsou buňky s delecí genu *TRK1* a zároveň *TRK2* mnohem citlivější vůči nízkým extracelulárním koncentracím draselných kationtů než buňky, kterým v genomu chybí pouze gen *TRK1* (Petrezselyova et al., 2011). Zdá se, že Trk2 dokáže transportovat draselné kationty také s vysokou afinitou, ale exprese genu, kterým je kódován, je za normálních podmínek mnohem nižší, než v případě *TRK1* (Ramos et al., 1994; Michel et al., 2006; Petrezselyova et al., 2011). Role proteinů Trk1 a Trk2 v udržování membránového potenciálu a regulaci pH byla prokázána při pokusech s dvojitými mutanty *trk1Δtrk2Δ*, jejichž buňky jsou hyperpolarizované (Madrid et al., 1998) a mají nižší vnitrobuněčné pH ve srovnání s buňkami divokého typu, což pravděpodobně souvisí se sníženou funkcí  $H^+$ -ATPázy Pma1 v důsledku hyperpolarizace (Navarrete et al., 2010). K funkci obou proteinů je také nutné dodat, že jsou schopny ven z buňky exportovat chloridové anionty a je možné, že je tato funkce důležitá k importu draselných kationtů a zároveň i k regulaci membránového potenciálu (Kudora et al., 2004; Rivetta et al., 2011).

### **2.1.2.2 Ostatní transportéry zajišťující import draselných kationtů**

Proteiny Trk1 a Trk2 nejsou pro buňku esenciální a draselné kationty se tak musí do buňky dostávat i jiným způsobem (Ko and Gaber, 1991). Za pomoci elektrofyziologických experimentů byla objevena existence nespecifického iontového kanálu, nazvaného NSC1, ale gen kódující tento transportér nebyl dosud nalezen (Bihler et al., 1998 a 2002). Dalšími systémy, které se účastní udržování homeostáze kationtů alkalických kovů, jsou proteiny Kch1 a Kch2. Mohly by fungovat jako nízkoafinitní transportéry  $K^+$  lokalizované v plazmatické membráně (Stefan et al., 2013). Jejich vliv na buněčné děje je závislý na extracelulární koncentraci  $K^+$  a na hlavních importérech draselných kationtů, Trk1 a Trk2 (Felcmanova et al., 2017).

### 2.1.2.3 Fosfátový transportér Pho89

Úkolem proteinu Pho89 (Martinez and Persson, 1998) je transportovat do buňky anorganické fosforečnanové anionty ( $P_i$ ) mechanismem symportu se sodnými kationty a je tak jediným transportérem v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, kterým se specificky do buňky sodné kationty dostávají.

Pho89 je protein plazmatické membrány kódovaný genem lokalizovaným na chromozomu II, o celkové velikosti 63 kDa a délce 575 AK. Topologické modely předpokládají, že dvanáctkrát prochází membránou, mezi sedmou a osmou transmembránovou doménou má smyčku o délce 110 AK a jeho C i N-konec směřují do cytoplazmy (Martinez and Persson, 1998; Person et al., 1998).

Transportér Pho89 není aktivní stále, ale pouze za specifických podmínek okolního prostředí, kterými jsou alkalické pH, přítomnost sodných kationtů a nedostatek anorganického fosfátu (Martinez and Persson, 1998; Serrano et al., 2002). Zatímco Pho89 zajišťuje při vysokém extracelulárním pH import  $P_i$  společně s ionty  $Na^+$ , tak ATPáza plazmatické membrány Ena1 (Haro et al., 1991; Benito et al., 2002), aktivovaná také při vysokém pH, naopak exportuje sodné kationty ven z buňky. Zdá se, že jsou tyto dva transportéry funkčně propojeny a díky této kooperaci se udržuje stálá nízká intracelulární koncentrace toxických sodných kationtů (Serra-Cardona et al., 2014).

### 2.1.3 Transportéry zajišťující export kationtů alkalických kovů

Stejně jako jsou pro buňku důležité transportní systémy zajišťující import kationtů alkalických kovů, tak jsou také důležité systémy zajišťující jejich export. Na exportu kationtů alkalických kovů se v buňce *S. cerevisiae* podílí tři systémy, mezi které patří ATPázy Ena (Haro et al., 1991; Benito et al., 2002), které za využití energie molekul ATP exportují sodné a draselné kationty ven z buňky, antiporter Nha1 (Prior et al., 1996; Banuelos et al., 1998), který využívá energii elektrochemického gradientu protonů k exportu sodných i draselných kationtů, a napěťově ovládaný kanál Tok1, zajišťující export draselných kationtů (Bertl et al., 1993; Ketchum et al., 1995).

### 2.1.3.1 Iontový kanál Tok1

Tok1 (Ketchum et al., 1995) je jediným exportérem plazmatické membrány, který zajišťuje export pouze draselných iontů a ne zároveň i iontů sodných. Hraje důležitou roli při udržování membránového potenciálu (Bertl et al., 1993; Ketchum et al., 1995; Maresova et al., 2006), jelikož se aktivuje při depolarizaci plazmatické membrány, transportuje kladně nabitě draselné ionty ven z buňky a napomáhá tak zvýšení membránového potenciálu.

Tok1 je 77,4 kDa velký transmembránový protein o celkové délce 691 AA, který je kódovaný genem lokalizovaným na chromozomu X (Miosga et al., 1994; Ketchum et al., 1995). Tvoří ho osm transmembránových domén a dvě P-domény (Ketchum et al., 1995; Zhou et al., 1995), z nichž každá formuje samostatný pór, kudy prochází draselné kationty. C-konec proteinu je důležitý pro regulaci, protože zajišťuje udržování kanálu v otevřeném stavu (Loukin and Saimi, 2002).

Aktivita Tok1 je ovlivněna nejen výše zmíněným membránovým potenciálem, ale také vysokou extracelulární koncentrací draselných kationtů (Ketchum et al., 1995; Vergani et al., 1997), nízkým vnitrobuněčným pH (Lesage et al., 1996) a fosforylací kinázou Hog1 (Proft and Struhl, 2004; Ke et al., 2013), které jeho aktivitu snižují.

Ačkoliv primární funkcí kanálu Tok1 je export draselných kationtů ven z buňky, bylo prokázáno, že za určitých podmínek je schopen draselné kationty také importovat (Fairman et al., 1999).

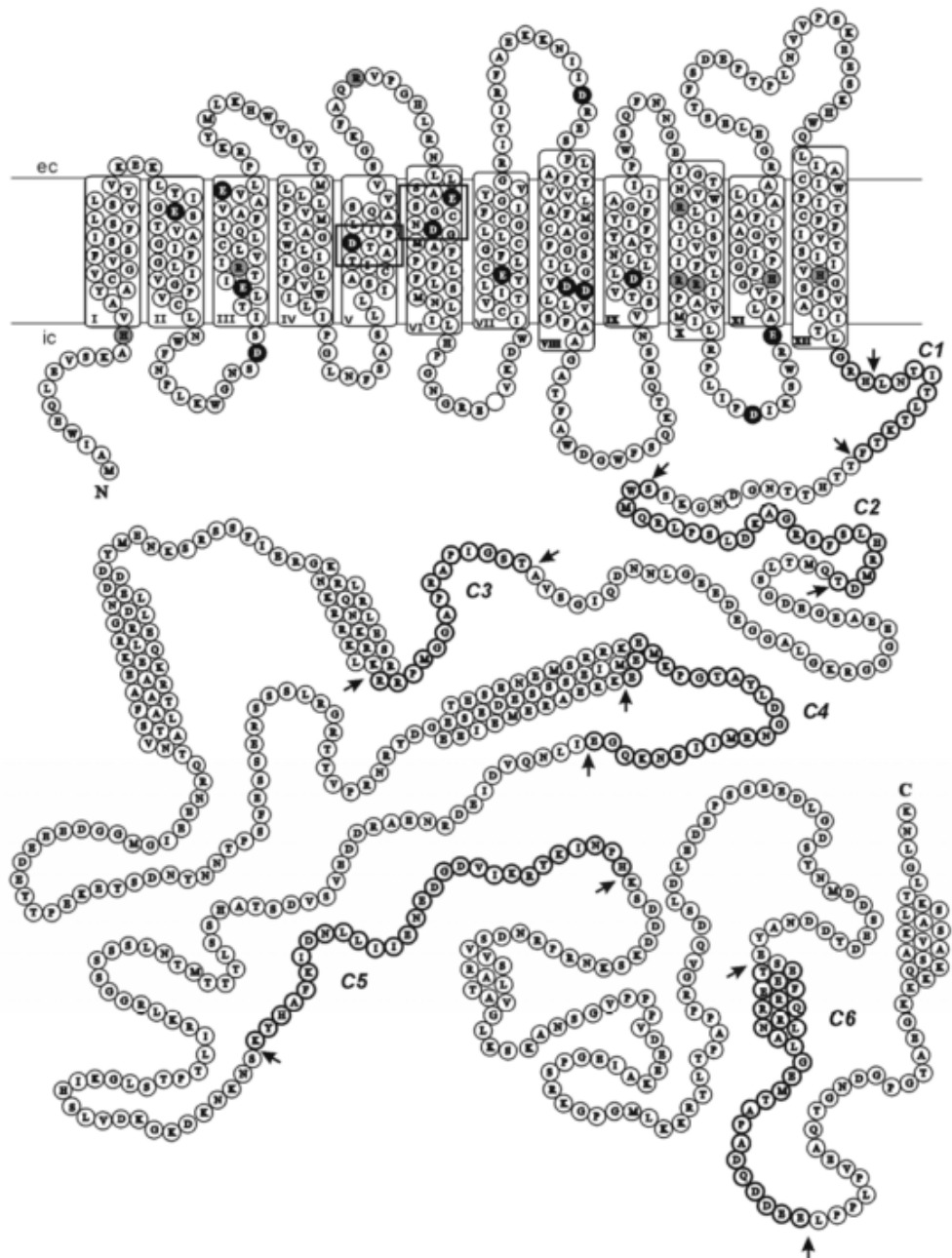
### 2.1.3.2 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter kvasinky *S. cerevisiae* patří do rodiny proteinů CPA (monovalent cation/proton antiporter), což je rodina antiporterů transportujících monovalentní kation výměnou za proton (Brett et al., 2005a). Transportéry této rodiny se nachází u všech organismů od bakterií až po člověka, což svědčí o jejich fyziologickém významu. U člověka byly nalezeny dva transportéry NHA a devět transportérů NHE (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> hydrogen exchangers), jejichž dysfunkce je spojována s epilepsií, vysokým krevním tlakem a postischemickou arytmií myokardu, onemocněním zažívacího traktu a ledvin, ale i s dalšími onemocněními (Brett et al., 2005a).

Antiporter Nha1 kvasinky *S. cerevisiae* využívá energii protonového gradientu vytvářeného ATPázou Pma1 k exportu jak toxických sodných, tak draselných kationtů ven z buňky (Prior et al., 1996; Banuelos et al., 1998). Jeho exprese je nízká a konstitutivní, svou

aktivitou zvyšuje toleranci buněk vůči solím v prostředí s kyselým pH a díky schopnosti exportovat draselné kationty se podílí i na udržování membránového potenciálu (Kinclova – Zimmermannova et al., 2006), regulaci vnitrobuněčného pH a objemu buňky (Banuelos et al., 1998; Sychrova et al., 1999), hraje roli v odpovědi buňky na osmotický šok (Kinclova et al., 2001c; Proft and Struhl, 2004; Kinclova – Zimmermannova and Sychrova, 2006) a také v regulaci buněčného cyklu (Simon et al., 2001, 2003). Nadprodukce Nha1 také zlepšuje schopnost růstu buněk v prostředí s nízkým obsahem draselných kationtů o nízkém pH (Banuelos et al., 2002). Mechanismus je pravděpodobně takový, že se v důsledku exportu draselných kationtů pomocí antiporteru Nha1 zvyšuje aktivita proteinu Trk1, který naopak zajišťuje příjem draselných kationtů (Kap. 2.1.2.1), což ve výsledku vede k lepšímu růstu buněk v těchto podmínkách.

Nha1 je 109 kDa velký a 985 AK dlouhý protein kódovaný genem lokalizovaným na chromozomu XII (Prior et al., 1996). V plazmatické membráně se nachází jako dimer a je pravděpodobné, že k dimerizaci dochází v ER (Mitsui et al., 2005). Efektivitu dimerizace zvyšuje přítomnost proteinu Erv14 (Powers and Barlowe, 1998), který zároveň slouží i jako cargo receptor pro antiporter Nha1, což znamená, že napomáhá jeho začlenění do váčku COPII, kterým je protein transportován dále sekreční dráhou do GA (Herzig et al., 2012; Rosas – Santiago et al., 2015). Podle topologického modelu má protein ScNha1 krátký hydrofilní N - konec směřující do cytosolu, 12 TMD propojených smyčkami a C – konec o délce 552 AK, který také směřuje do cytosolu a můžeme v něm najít šest domén typických pro C - konec kvasinkových antiporterů Nha (C1 - C6)(Prior et al., 1996; Kinclova et al., 2001c; Kamauchi et al., 2002; Pribylova et al., 2006)(Obr. 2). Bylo zjištěno, že C – konec antiporteru, kromě domény C1 (434. AK – 454. AK) nacházející se hned za transmembránovými doménami (Obr. 2), není nezbytný pro správnou lokalizaci proteinu v membráně a není nezbytný ani pro jeho substrátovou specifitu a schopnost exportovat kationty (Kinclova et al., 2001c; Kamauchi et al., 2002; Mitsui et al. 2004). Domény C2 (465. AK – 487. AK) a C3 (526. AK – 540. AK) mají pozitivní vliv na aktivitu antiporteru, zatímco domény C4 (694. AK – 717. AK), C5 (787. AK – 815. AK) a C6 (919. AK – 944. AK) snižují transportní aktivitu proteinu a mají tedy inhibiční funkci (Kamauchi et al., 2002; Mitsui et al. 2004). Už dříve bylo ukázáno, že zkrácení C-konce proteinu až o 70 AK zvyšuje odolnost buněk, které tento antiporter produkují, vůči Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> a Rb<sup>+</sup>, v porovnání s buňkami s plnou verzí proteinu (Kinclova et al., 2001c) a objev konzervovaných inhibičních domén tyto výsledky potvrdil.



**Obr. 2: Topologický model antiporteru Nha1 kvasinky *S. cerevisiae*.** Na topologickém modelu antiporteru Nha1 můžeme vidět vyznačených 12 TMD propojených smyčkami se zvýrazněnými nabitými AK zbytky, které jsou konzervovány mezi antiportery NHA z různých druhů kvasinek. Konzervované motivy v rámci transmembránových domén jsou ohraničeny rámečkem a konzervované domény C-konce proteinu (C1-C6) jsou vyznačeny pomocí šipek (Pribylova et al., 2006).

C – konec proteinu Nha1 je důležitý pro odpověď buňky na osmotický šok, protože je cílem kinázy Hog1, která ho fosforyluje a moduluje tak aktivitu proteinu (Kinclova et al., 2001c; Proft and Struhl, 2004; Kinclova – Zimmermannova and Sychrova, 2006). Dále je také C – konec, konkrétně jeho úsek na pozici 800. AK – 948. AK, důležitý pro průchod buněk buněčným cyklem (Simon et al., 2001, 2003). Funkce Nha1 v buněčném cyklu pravděpodobně nesouvisí nijak s jeho transportní funkcí a autoři zabývající se touto problematikou navrhli teorii, že Nha1 získává signály z membrány a přenáší je prostřednictvím svého dlouhého C - konce dále do buňky a tím ovlivňuje průchod buněčným cyklem (Simon et al., 2001, 2003). Absence C – konce ovlivňuje i schopnost Nha1 regulovat vnitrobuněčné pH při náhlé alkalizaci cytosolu (Kinclova et al., 2001c).

#### **2.1.3.2.1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery plazmatické membrány v dalších kvasinkách**

Homology ScNha1 jsou konzervovány i u dalších druhů kvasinek. Některé z nich byly funkčně charakterizovány a podle substrátové specifity rozděleny do dvou rodin (Kinclova et al., 2002). Do první rodiny řadíme antiportery, které velice efektivně transportují sodné a lithné kationty, ale draselné a rubidiové kationty nerozpoznávají a jejich funkcí je pravděpodobně pouze eliminace toxických sodných a lithných kationtů ven z buňky. Patří sem *ZrSod2-22 Zygosaccharomyces rouxii* (Kinclova et al., 2001a) a *SpNHE1 Schizosaccharomyces pombe* (dříve *Spsod2*, Jia et al., 1992; Dutta et al., 2018). Do druhé rodiny řadíme transportéry, které rozpoznávají všechny čtyři substráty (Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>). Tyto antiportery sice nezvyšují odolnost vůči sodným a lithným kationtům tak výrazně, jako ty z první rodiny, ale mají pravděpodobně ve fyziologii buněk více komplexní funkci, jelikož regulují vnitrobuněčný obsah draselných kationtů, objem buňky a také intracelulární pH. Do této skupiny řadíme např. antiporter *Cnh1 Candida albicans* (Kinclova et al., 2001b), *Nha1 Debaryomyces hansenii* (Velkova and Sychrova, 2006) a také *Nha1 S. cerevisiae* (Prior et al., 1996; Banuelos et al., 1998). Některé kvasinky ale nemají pouze jeden Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Yarrowia lipolytica* nese dva geny kódující antiportery NHA, které se mezi sebou liší svou afinitou k jednotlivým substrátům a také svou funkcí (Papouskova and Sychrova, 2006; Papouskova and Sychrova, 2007a). Zatímco *YNha2* transportuje zejména sodné kationty a umožňuje tak buňce růst v prostředí s vysokými koncentracemi těchto pro buňku toxických kationtů, tak hlavním substrátem *YNha1* jsou ionty draselné, jejichž transportem se *YNha1* podílí na regulaci základních buněčných funkcí, jako je regulace buněčného objemu a

vnitrobuněčného pH. Stejně tak mají dva antiportery Nha plazmatické membrány s odlišnou substrátovou specifitou a funkcí i kvasinky *S. pombe* (Papouskova and Sychrova, 2007b) a *Z. rouxii* (Pribylova et al., 2008).

Všechny tyto antiportery mají předpovězenou shodnou topologii. Podle modelu navrženého pro ScNha1 (Obr. 2) jsou tvořeny krátkým, hydrofilním N-koncem, dvanácti transmembránovými helixy, které jsou propojeny krátkými hydrofilními smyčkami, a hydrofilním C – koncem různé délky (Kinclova et al., 2001c; Pribylova et al., 2006). Část proteinu procházející membránou je nejvíce konzervovaná mezi antiportery Nha z různých druhů kvasinek a nachází se zde aminokyseliny, které jsou důležité pro transportní funkci proteinu. Naopak nejméně konzervovanou částí je C – konec proteinu, který se mezi jednotlivými druhy liší jak sekvencí, tak i délkou. I přes nízkou podobnost nacházíme v C – konci naprosté většiny těchto proteinů šest konzervovaných domén nazvaných C1 – C6 (Kap. 2.1.3.2) (Kamauchi et al., 2002; Mitsui et al. 2004).

### 2.1.3.3 ATPázy Ena

Kvasinka *S. cerevisiae* nese ve svém genomu několik kopií genu *ENA* uspořádaných na chromozomu IV v tandemu za sebou (Haro et al., 1991). Množství kopií se liší v závislosti na kmenu kvasinky. Kmeny použité v této diplomové práci, W303-1A a BY4741, nesou čtyři kopie genu *ENA* v případě W303-1A (Garcia-deblas et al., 1993; Rodriguez - Navarro et al., 1994) a pět kopií v případě BY4741 (Wieland et al., 1995). I přes to, že si jsou sekvenčně velice podobné a proteiny kódované těmito geny pravděpodobně zastávají stejnou funkci, tak je *ENA1* pro buňky nejdůležitější, jelikož se exprese tohoto genu zvyšuje v prostředí s vysokým pH a také v prostředí s vysokými koncentracemi solí (Garcia-deblas et al., 1993; Mendoza et al., 1994; Marquéz and Serrano, 1996; Lamb et al, 2001).

Ena1 je protein plazmatické membrány patřící do rodiny ATPáz P-typu, který využívá energii získanou při štěpení ATP k exportu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Li}^+$  kationtů ven z buňky (Haro et al., 1991). Na rozdíl od antiporteru Nha1 není aktivita ATPázy Ena1 závislá na gradientu protonů, což umožňuje export kationtů alkalických kovů z buňky i v prostředích o zásaditém pH (Banuelos et al., 1998).

Podle topologického modelu navrženého pro ATPázy P-typu desetkrát prochází membránou a má dvě velké cytoplazmatické smyčky, kde se nachází tři domény nezbytné pro vlastní funkci proteinu (Rodriguez-Navarro and Benito, 2010). Jedna z těchto smyček je

lokalizována mezi čtvrtou a pátou transmembránovou doménou a nese doménu N (nucleotide binding) s motivy pro vazbu ATP a doménu P (phosphorylation) s motivem fosforylačním, kde dochází k fosforylaci a defosforylaci aspartátového AK zbytku, což je důležité pro transportní aktivitu proteinu. Druhá smyčka se nachází mezi druhou a třetí transmembránovou doménou a nese doménu A (actuator) s motivem fosfatázovým, který během transportního cyklu defosforyluje aspartátový AK zbytek v doméně P.

ATPáza *Ena1* je regulována zejména na úrovni exprese. Ta je indukovaná jak vysokým pH prostředí, tak i zvýšenou přítomností kationtů alkalických kovů v médiu a na tomto procesu se podílí hned několik odlišných signálních drah (Arino et al., 2010). Jednou z nich, která je aktivována při osmotickém stresu a vede mimo jiné k aktivaci exprese genu *ENA1*, je dráha kinázy Hog1 (Marquez and Serrano, 1996). Jak již bylo dříve zmíněno, kináza Hog1 také reguluje aktivitu antiporteru *Nha1* (Kap. 2.1.3.2) a zároveň i aktivitu kanálu *Tok1* (Kap. 2.1.3.1) a podílí se tak na odpovědi buňky na osmotický stres více způsoby. Další důležitou signální dráhou je dráha fosfatázy kalcineurinu. Vlivem solného stresu dochází ke zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu, což vede k aktivaci fosfatázy kalcineurinu (Matsumoto et al., 2002), která také pozitivně ovlivňuje expresi genu *ENA1* (Mendoza et al., 1994; Marquez and Serrano, 1996; Petrezselyova et al., 2016). Pozitivním regulátorem exprese je i transkripční faktor *Rim101*, který zvyšuje expresi genu *ENA1* v prostředí s vysokým pH (Lamb et al., 2001) či kináza *Snf1* (Alepez et al., 1997), jejíž aktivita je důležitá pro adaptaci buněk v prostředí s nízkou koncentrací glukózy. Naopak negativně reguluje expresi genu *ENA1* proteinkináza A (Marquez and Serrano, 1996) či serin/threoninové kinázy *Ppz1* a *Ppz2* (Posas et al., 1995).

## 2.2 Transportéry kationtů alkalických kovů lokalizované uvnitř buňky

V cytosolu buňky se nachází velké množství organel, které se mezi sebou liší svým vnitřním prostředím podle toho, jakou funkci vykonávají. Ani množství kationtů alkalických kovů v jednotlivých organelách není shodné a jejich transport přes membrány organel je důležitý jak pro sekvestraci toxických sodných kationtů, tak i pro udržování homeostáze draselných kationtů v cytosolu (Arino et al., 2010). Většina z dosud popsaných vnitrobuněčných transportérů, které se na tomto procesu podílejí, fungují jako antiportery využívající energii protonového gradientu a svou aktivitou se tak podílejí i na regulaci pH a objemu organel. Vhodné pH je zároveň nezbytné i pro váčkový transport, který je důležitý pro zajištění fyziologického stavu buňky (Bowers et al., 2000; Brett et al., 2005b; Arino et al., 2010).

### 2.2.1 Vnitrobuněčná H<sup>+</sup>-ATPáza

H<sup>+</sup> - ATPázy plazmatické membrány Pma1 a Pma2 (Kap. 2.1.1) nejsou jediné protonové ATPázy v buňce *S. cerevisiae*. Ve vnitřních membránách se nachází vakuolární H<sup>+</sup> - ATPáza (V - ATPáza), která je na rozdíl od těch v plazmatické membráně tvořena mnoha proteiny formujícími dvě hlavní domény, do membrány vázanou doménu V<sub>o</sub> a katalytickou solubilní doménu V<sub>1</sub> (Stevens and Forgac, 1997; Zhang et al., 2008; Oot et al., 2017). I přes svůj název se nenachází pouze ve vakuolární membráně, ale i v endozomech či Golgiho aparátu, jejichž lumen okyseluje a podílí se tak na zajištění pH ideálního pro funkci dané organely (Kane et al., 2006). Díky tvorbě protonového gradientu umožňuje i aktivitu sekundárních transportérů kationtů alkalických kovů lokalizovaných ve vnitrobuněčných organelách a spolu s ATPázou Pma1 se podílí na regulaci cytosolického pH (Martinez-Munoz and Kane, 2008; Arino et al., 2010).

### 2.2.2 Transport přes vnitřní mitochondriální membránu

Už v roce 1961 (Mitchell, 1961) byla předpovězena existence K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transportního systému ve vnitřní mitochondriální membráně, který využívá energii gradientu protonů k exportu nadbytečných draselných kationtů ven z mitochondrie. Dnes jsou známy tři proteiny, které jsou pro tento transportní systém důležité. Patří sem proteiny Mdm38 (Dimmer et al., 2002), Mrs7 (Nowikovsky et al., 2004) a Ydl183c (Zotova et al., 2010). Bylo ukázáno, že ačkoliv jsou funkčně zastupitelné, jsou proteiny Mrs7 a Ydl183c běžně v buňce

důležité spíše pro plnou aktivitu transportního systému, zatímco protein Mdm38 je pro funkčnost systému zásadní (Zotova et al., 2010). V nepřítomnosti proteinu Mdm38 se ztrácí schopnost mitochondrií exportovat draselné kationty výměnou za proton, což vede k tomu, že mitochondrie mají zvýšený obsah draselných kationtů v matrix, nižší membránový potenciál a celkově zvětšený objem (Dimmer et al., 2002; Nowikovsky et al., 2004). Dále postupně dochází k fragmentaci mitochondriálního retikula, asociaci mitochondrií s vakuolou a nakonec i pohlcení mitochondrií vakuolou (Nowikovsky et al., 2007). Ačkoliv bylo prokázáno, že zmíněné tři proteiny hrají roli v transportu, stále není známo, jakým způsobem se na transportu podílejí. Bylo navrženo, že mohou fungovat buď jako podjednotky komplexního transportního systému nebo mohou fungovat jako kofaktory nezbytné k funkci dosud neobjeveného mitochondriálního  $K^+/H^+$  antiporteru (Zotova et al., 2010).

### **2.2.3 Endozomální transportér Nhx1**

Nhx1 je protein dvanáctkrát procházející membránou, který byl poprvé nalezen v membránách pozdních endozomů (u kvasinek nazývány také jako prevakuolární kompartment) (Nass et al., 1997; Nass and Rao, 1998) a později i v trans - Golgiho aparátu a recyklujících endozomech (Kojima et al., 2012). Celý protein, kódovaný genem lokalizovaným na chromozomu IV, je dlouhý 633 AA a na C - konci je modifikován N – glykosylací (Nass et al., 1997; Wells and Rao, 2001).  $H^+$  - ATPáza, lokalizovaná také v pozdních endozomech, aktivně vytváří protonový gradient, který je využíván antiporterem Nhx1 k importu  $Na^+$  či  $K^+$  do lumen organely výměnou za proton (Nass and Rao, 1998; Quintero et al., 2000; Brett et al., 2005b). Nhx1 tak sekvstruje nadbytečné draselné a také sodné kationty do pozdních endozomů, čímž snižuje jejich množství v cytoplazmě a zároveň svou činností reguluje pH cytosolu i pH organely (Nass and Rao, 1998; Brett et al., 2005b). Svou úlohou v regulaci pH také zajišťuje správnou funkci vesikulárního transportu, který je na vhodném pH závislý (Nass and Rao, 1998; Bowers et al., 2000; Brett et al., 2005b). Bylo ukázáno, že Nhx1 přímo interaguje svým C – koncem s proteinem Gyp6, což je aktivující protein GTPázy Ypt6, která hraje roli v retrográdním transportu z pozdních endozomů do GA, a transportní činnost Nhx1 inhibuje (Ali et al., 2004). Buňky bez Nhx1 jsou oproti buňkám divokého typu více citlivé vůči solím a kyselému pH prostředí, mají narušený vesikulární transport a snížené pH cytosolu (Nass et al., 1997; Bowers et al., 2000; Brett et al., 2005b).

## 2.2.4 Transportér Golgiho aparátu Kha1

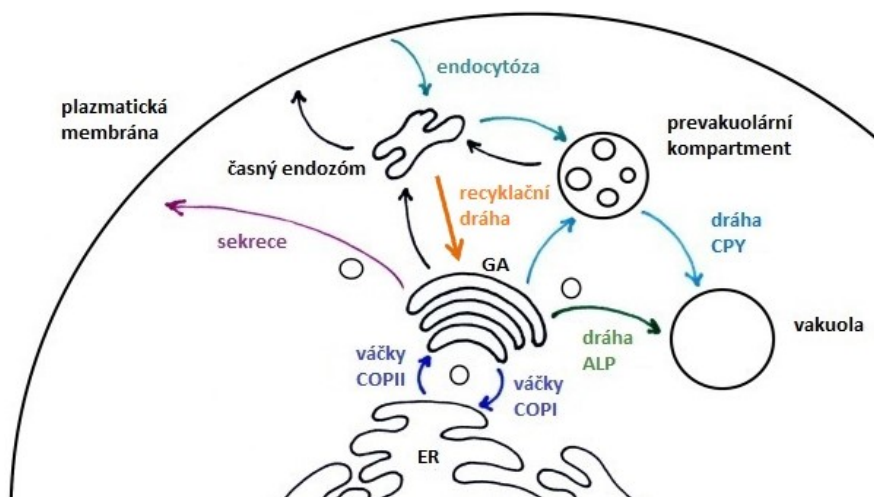
Kha1 je transmembránový protein o velikosti 97 kDa a délce 873 AK, kódovaný genem umístěným na chromozomu X (Ramirez et al., 1998; Flis et al., 2005). Je lokalizovaný v Golgiho aparátu, kde zastává podobné funkce jako výše popsáný transportér Nhx1 (Flis et al., 2005). Předpokládá se, že funguje jako antiporter schopný transportovat  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Li^+$  kationty dovnitř organely výměnou za proton, čímž se podílí na udržování homeostáze kationtů alkalických kovů v buňce a zároveň i reguluje pH Golgiho aparátu (Maresova and Sychrova, 2005, 2010). Na těchto funkcích pravděpodobně spolupracuje s chloridovým kanálem Gef1, lokalizovaným také v membráně GA (Flis et al., 2005). Dále bylo také ukázáno, že je společně s GTPázami Arl1 a Ypt6 a také endozomálním transportérem Nhx1 důležitý pro správné fungování váčkového transportu mezi trans-Golgiho aparátem a pozdními endozomy, který je důležitým předpokladem pro růst buněk ve stresových podmínkách (Maresova and Sychrova, 2010; Maresova et al., 2012).

## 2.2.5 Vakuolární transportéry kationtů alkalických kovů

Za sekvestraci sodných a draselných kationtů do vakuoly je zodpovědný zejména antiporter Vnx1, což je 102,5 kDa velký a 908 AK dlouhý protein, kódovaný genem lokalizovaným na chromozomu XIV, který třináctkrát prochází vakuolární membránou (Cagnac et al., 2007). Na základě sekvenční podobnosti byl zařazen do rodiny CAX (calcium exchangers), což je rodina transportérů transportujících  $Ca^{2+}$  výměnou za proton, i když on sám se na transportu kationtů  $Ca^{2+}$  nepodílí. Využívá stejně jako Nhx1 a Kha1 gradient protonů vytvořený vakuolární  $H^+$  - ATPázou k transportu sodných a draselných kationtů do vakuoly a také stejně jako Nhx1 a Kha1 reguluje svou činností jejich množství v cytosolu a transportem protonů i vnitrobuněčné pH. Při delecí *VNX1* byla ale stále pozorována nízká  $K^+/H^+$  transportní aktivita ve vakuolární membráně a ukázalo se, že je za ni zodpovědný antiporter Vcx1, o kterém se doposud myslelo, že transportuje do vakuoly pouze  $Ca^{2+}$  (Cagnac et al., 2010). Další transportér regulující množství cytosolických draselných kationtů je před několika lety objevený Vhc1 (Petrezsejlova et al., 2012). Je to 1120 AK dlouhý, dvanáctkrát membránou procházející protein, který zajišťuje elektroneutralní transport  $K^+$  a  $Cl^-$  do vakuoly, čímž se zároveň i podílí na udržování její morfologie (Petrezsejlova et al., 2012).

## 2.3 Sekreční dráha

Sekreční dráha zajišťuje v eukaryotické buňce syntézu, úpravu a transport proteinů, jejichž finálním místem působení je endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA) vakuolární kompartment, plazmatická membrána (PM), buněčná stěna či extracelulární prostor. Nově vznikající proteiny, určené k průchodu sekreční dráhou, jsou kotranslačně či posttranslačně transportovány do ER. Tam dochází k jejich úpravám a poté jsou posílány dále sekreční dráhou pomocí váčků COPII do Golgiho aparátu, kde jsou proteiny dále upravovány a tříděny (Obr. 3). Proteiny určené pro funkci v GA zde zůstávají, proteiny patřící do ER jsou posílány zpět ve váčcích COPI, a ostatní proteiny jsou přepravovány prostřednictvím váčků buď do vakuoly, nebo do plazmatické membrány (Barlowe and Miller, 2013; Hecht et al., 2014; Feyder et al., 2015).



**Obr. 3: Sekreční dráha.** Na obrázku je schématicky zobrazen anterográdní transport proteinů z ER do GA ve váčcích COPII a retrográdní transport proteinů z GA do ER ve váčcích COPI (tmavě modrá). Dále jsou vyobrazeny cesty proteinů z GA do plazmatické membrány, přičemž jedna vede z GA přímo do PM (fialová) a druhá z GA přes endozomální kompartment do PM (černá). Proteiny určené do vakuoly také mohou být transportovány dvěma způsoby, a to buď přímou dráhou ALP (nazvaná podle alkalické fosfatázy, která je tímto způsobem transportována do vakuoly) (zelená) či nepřímou dráhou CPY přes prevakuolární kompartment (nazvána podle karboxypeptidázy Y) (světle modrá). Zobrazen je i osud endocytovaných proteinů, které jsou nejprve transportovány do endozomálního kompartmentu, odkud buď pokračují směrem do vakuoly k degradaci (tyrkysová) nebo recyklují dráhou do GA (oranžová) (převzato od Hecht et al., 2014 a upraveno podle Feyder et al., 2015).

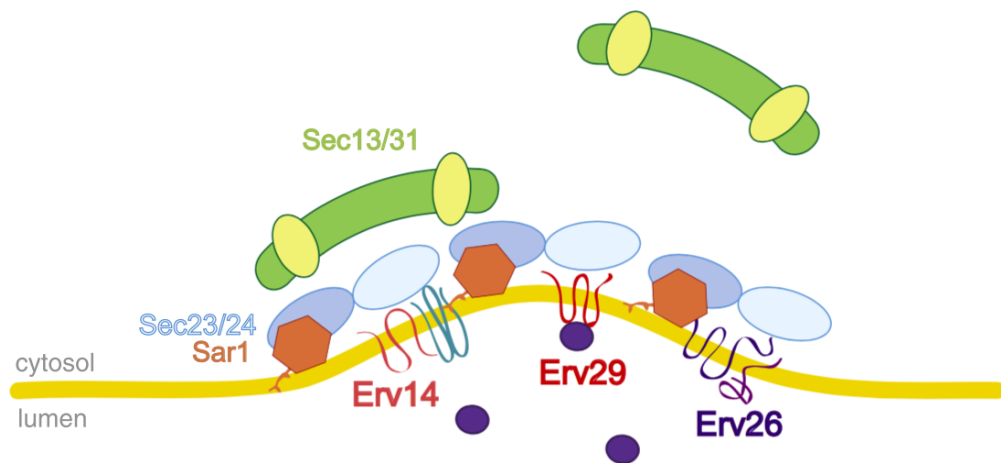
### 2.3.1 Váčky COPII

Váčky COPII, zajišťující transport proteinů z ER do GA, jsou pojmenovány podle komplexu proteinů COPII, které tvoří jejich základní strukturu (Barlowe et al., 1994). Strukturu váček COPII a mechanismu jejich vzniku z membrány ER jsem se detailně věnovala ve své bakalářské práci (Hrášková, 2016), a proto bych zde chtěla pouze shrnout základní fakta. Součástí komplexu COPII je GTPáza Sar1 (Nakano and Muramatsu, 1989), GTPázu Sar1 aktivující protein Sec23 (Yoshihisa et al., 1993), protein Sec24 zprostředkovávající navázání proteinu určeného k přepravě (Miller et al., 2002) a proteiny Sec13 a Sec31, které společně vytváří vnější obal váčku COPII (Bi et al., 2007). Interakce těchto proteinů je dostačující pro vznik váčku COPII, ale kompletní proteinové složení váčku není vždy stejné a liší se podle toho, jaké proteiny jsou zrovna přepravovány (Manzano-Lopez et al., 2015). Pro transport některých proteinů mohou být vyžadovány proteiny Iss1 či Lst1, což jsou homology proteinu Sec24 (Roberg et al., 1999; Kurihara et al., 2000; Shimoni et al., 2000). Jedním z příkladů je transport  $H^+$  - ATPázy plazmatické membrány, Pma1, pro který je důležitý právě protein Lst1 (Roberg et al., 1999; Shimoni et al., 2000; Miller et al., 2002). Váčky jsou také variabilní díky přítomnosti cargo receptorů (Dancourt et al., 2010), což jsou proteiny, které mají za úkol napomáhat začlenění konkrétních nově vznikajících proteinů do váček COPII.

### 2.3.2 Cargo receptory

Sec24 je protein komplexu COPII odpovědný za interakci s přepravovanými proteiny (Miller et al., 2002). Obsahuje několik nezávislých domén, kterými může nově vzniklé proteiny navazovat a koncentrovat je tak do váčku (Mossesova et al., 2003; Miller et al., 2003). Některé proteiny však neobsahují signál rozpoznávaný proteinem Sec24 a vyžadují proto prostředníka, který by jim interakci se Sec24 umožnil (Dancourt et al., 2010). Těmito prostředníky jsou proteiny zvané cargo receptory, které mají jak sekvenci rozpoznávanou proteinem Sec24, tak i sekvenci rozpoznávanou proteinem určeným k přepravě. Existují také proteiny, které nesou sekvenci rozpoznávanou proteinem Sec24, ale i přes to interagují s cargo receptorem, pravděpodobně kvůli zvýšení efektivity transportu (Pagant et al., 2015). Cargo receptory s navázaným proteinem se začlení do váčku a jsou spolu se zbylými proteiny tvořícími váček COPII transportovány do GA, odkud jsou poté tříděny a posílány zpět do ER ve váčkách COPI (Dancourt et al., 2010). Pokud požadovaný cargo receptor není v buňce přítomen, jsou proteiny na něm závislé částečně zadržovány v ER a nemohou plnit své

funkce (Herzig et al., 2012). Bylo objeveno mnoho proteinů plnicích funkci cargo receptoru, mezi které patří i v této práci studovaný protein Erv14 (Powers and Barlowe, 1998, 2002) či protein Exp1, nově identifikovaný jako cargo receptor  $H^+$  - ATPázy plazmatické membrány Pma1 (Geva et al., 2017).

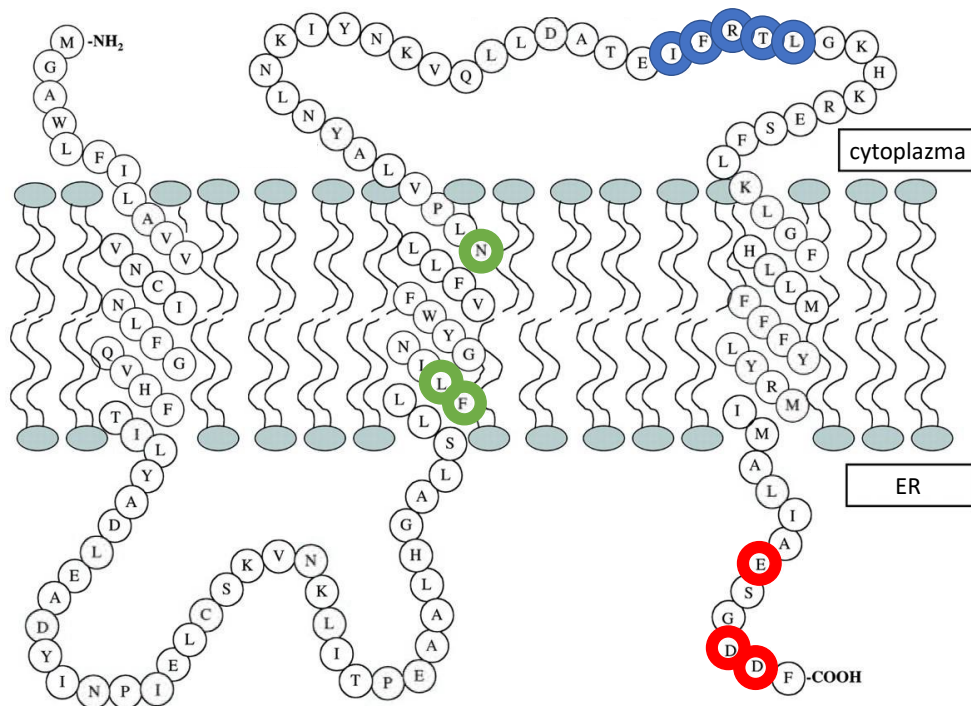


**Obr. 4: Váčky COPII.** Interakce proteinů komplexu COPII (Sar1, Sec23/24, Sec13/31) s přepravovanými proteiny a cargo receptory (Erv14, Erv29, Erv26) (převzato od D'Arcangelo et al., 2013).

## 2.4 Protein Erv14

### 2.4.1 Vlastnosti proteinu Erv14 a jeho úloha v buňkách

Erv14 je 14 kDa velký a 138 AK dlouhý transmembránový protein, kódovaný genem umístěným na chromozomu VII, který je lokalizován v membránách ER, váčků COPII a GA (Powers and Barlowe, 1998). Homology proteinu Erv14 jsou konzervované od kvasinek až po člověka, což napovídá tomu, že má pro buňky zásadní význam (Roth et al., 1995; Utku et al., 1999; Rosas-santiago et al., 2015). Erv14 působí jako cargo receptor (Kap. 2.3.2) v ER (Powers and Barlowe, 1998), který pomáhá transmembránovým proteinům v začlenění do váčků COPII (Herzig et al., 2012), díky čemuž mohou být dále transportovány sekreční dráhou do místa svého působení. Není zcela zřejmé, jak Erv14 rozpoznává proteiny, pro které slouží jako cargo receptor. Protože proteiny na něm závislé nesdílí žádný společný sekvenční motiv, tak se zdá pravděpodobné, že svůj náklad rozpoznává na základě struktury (Herzig et al., 2012). V nepřítomnosti Erv14 jsou tyto proteiny zadržovány v ER a nedostávají se efektivně do místa svého působení, což má za následek narušení některých buněčných funkcí, jako je axiální pučení (Powers and Barlowe, 1998), sporulace (Nakanishi et al., 2007), tvorba chitinu (Sacristan et al., 2013) a také udržování homeostáze kationtů alkalických kovů, jelikož slouží i jako cargo receptor pro antiporter Nha1 (Herzig et al., 2012; Rosas-Santiago et al., 2015). Kromě funkce cargo receptoru byla navržena i možnost, že by mohl působit jako chaperon pro nově vznikající proteiny (Herzig et al., 2012). Také je možné, že působí i na formování váčku samotného, což může být dáno tím, že funguje jako cargo receptor pro velké transmembránové proteiny, které jeho strukturu ovlivňují (Powers and Barlowe, 2002; D'Arcangelato et al., 2015).



**Obr. 5: Topologický model proteinu Erv14.** Modře vyznačeny jsou aminokyseliny, kterými protein Erv14 interaguje s proteinem váčku COPII, Sec24. Zeleně a červeně jsou vyznačeny aminokyseliny, které jsou důležité pro interakci proteinu Erv14 s přepravovanými proteiny (Převzato z Powers and Barlowe, 2002 a upraveno podle informací z Pagant et al., 2015 a Rosas-Santiago et al., 2017).

Erv14 je tvořen třemi transmembránovými doménami, smyčkami propojujícími transmembránové domény, N-koncem směřujícím do cytosolu a C-koncem lokalizovaným v lumen kompartmentu (Powers and Barlowe, 1998, 2002). Dosud bylo identifikováno několik aminokyselin proteinu Erv14, které jsou důležité pro jeho interakci s přepravovanými proteiny. Patří mezi ně tři aminokyseliny druhé transmembránové domény proteinu Erv14, F<sub>62</sub>, L<sub>63</sub> a N<sub>74</sub>, (Pagant et al., 2015) a také kyselý motiv (E<sub>133</sub>, D<sub>136</sub>, D<sub>137</sub>) lokalizovaný na C-konci proteinu (Rosas-Santiago et al., 2017). Ve své cytosolické smyčce má Erv14 aminokyseliny na pozici 97–101 (motiv IFRTL), které jsou nezbytné pro jeho navázání se ke komplexu proteinů COPII, konkrétně k proteinu Sec24 (Powers and Barlowe, 2002; Pagant et al., 2015). Místo na Sec24, které interaguje s IFRTL motivem proteinu Erv14, se nazývá místo D. Pravděpodobně ale existuje i další interakční místo pro protein Erv14 na Sec24, jelikož při mutaci místa D se Erv14 stále zčásti dostává do váček COPII (Pagant et al., 2015).

Přepřavované proteiny jsou při zabudování do váčku COPII závislé buď pouze na interakci s proteinem Erv14, případně zároveň interagují i s proteinem Sec24 (Pagant et al., 2015).

Nedávno bylo objeveno, že protein Exp1, působící jako cargo receptor pro H<sup>+</sup>-ATPázu plazmatické membrány Pma1 (Kap. 2.1.1), interaguje s proteinem Erv14 (Geva et al., 2017), avšak o významu této interakce nebylo dosud nic zjištěno. Zajímavé také je, že buňky, které protein Erv14 postrádají, mají zpomalený buněčný cyklus, což se ukázalo, že ve výsledku vede ke stabilnějšímu genomu (Vinton et al., 2017).

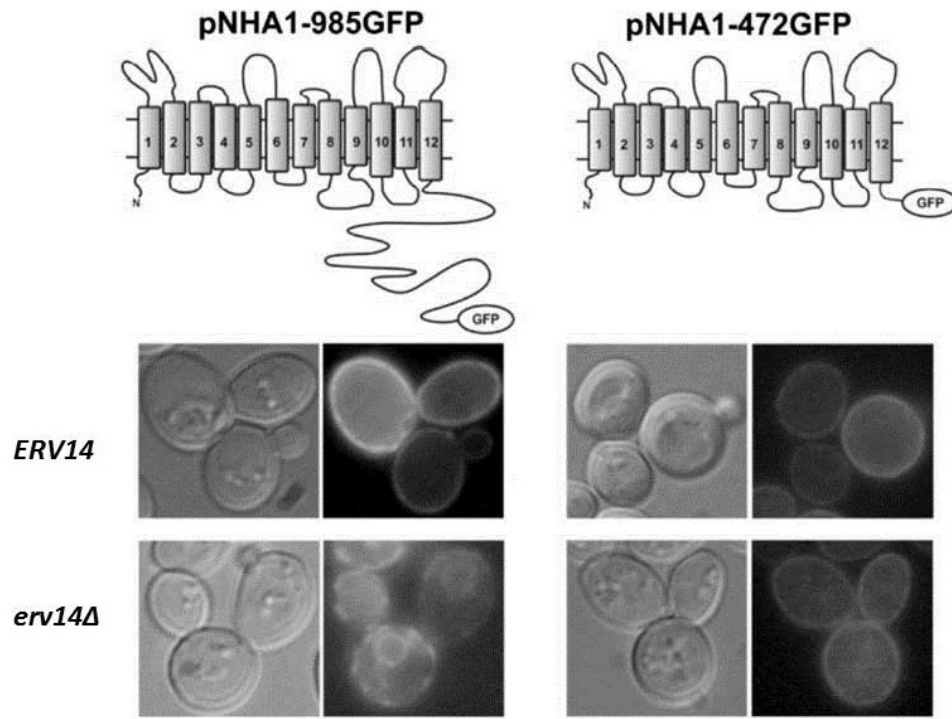
Genom *S. cerevisiae* obsahuje paralog proteinu Erv14, protein Erv15 (Powers and Barlowe, 1998), který v některých případech dokáže zčásti funkci proteinu Erv14 zastat (Nakanishi et al., 2007; Pagant et al., 2015).

#### **2.4.2 Interakce proteinu Erv14 s antiporterem Nha1**

Interakce mezi proteinem Erv14 a antiporterem plazmatické membrány Nha1 byla objevena pomocí metody PAIRS (pairing analysis of cargo receptors) (Herzig et al., 2012), při které se pomocí fluorescenční mikroskopie sleduje lokalizace proteinu značeného pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v buňkách postrádajících konkrétní cargo receptor. Díky tomu bylo zjištěno, že v buňkách, které nemají *ERV14*, se nedostává antiporter Nha1 efektivně do plazmatické membrány a je z části zadržován v perinukleárním ER, což ukazuje na to, že je Erv14 vyžadován pro export antiporteru Nha1 z ER (Herzig et al., 2012). Při pokusech s buňkami postrádajícími Erv14 bylo zjištěno, že jsou více citlivé vůči přítomnosti NaCl a KCl v médiu, což odpovídá tomu, že je Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru Nha1 v plazmatické membráně méně a buňky jsou tak méně odolné vůči těmto solím (Rosas-Santiago et al., 2015).

Pro interakci proteinu Erv14 s Nha1 je důležitá přítomnost tzv. kyselého motivu na C-konci Erv14 (E<sub>133</sub>, D<sub>136</sub> a D<sub>137</sub>)(Rosas-Santiago et al., 2017). Pokud jsou tyto AK zaměněny za alaniny (A<sub>133</sub>, A<sub>136</sub> a A<sub>137</sub>), pak je možné opět pozorovat částečné zadržování fluorescenčně značeného proteinu Nha1 v ER a také zvýšenou citlivost těchto buněk vůči solím (Rosas-Santiago et al., 2017). I mutace motivu FLN (F<sub>62</sub>, L<sub>63</sub> a N<sub>74</sub>) ve druhé TMD proteinu Erv14, který byl rovněž ukázán jako důležité místo pro vazbu některých proteinů (Kap. 2.4.1), narušuje efektivní transport proteinu Nha1 sekreční dráhou (Pagant et al., 2015) a je tak pravděpodobné, že se na vazbě antiporteru Nha1 podílí obě tato místa proteinu Erv14.

Přestože Erv14 interaguje s transmembránovými doménami antiporteru Nha1, má na jeho transport a lokalizaci v plazmatické membráně vliv i přítomnost dlouhého hydrofilního C-konce antiporteru (Rosas-Santiago et al., 2015).



**Obr. 6: Lokalizace proteinu Nha1 a proteinu Nha1 zkráceného o C-konec, značených GFP, v buňkách s *ERV14* a v buňkách *erv14Δ*.** V levé části je zobrazen topologický model antiporteru Nha1 se značkou GFP a jeho lokalizace v buňkách, které mají protein Erv14 a v buňkách, které protein Erv14 postrádají. V pravé části je pak ukázán topologický model proteinu Nha1, který je zkrácen o C-konec a označen GFP, a jeho lokalizace v buňkách s proteinem Erv14 a v buňkách bez Erv14 (Převzato z Rosas-Santiago et al., 2015).

Pomocí fluorescenční mikroskopie byla sledována lokalizace celého proteinu Nha1 o délce 985 AK, značeného pomocí GFP, a lokalizace proteinu Nha1 postrádajícího C-koncovou část, o celkové délce 472 AK, značeného pomocí GFP, a to buď v buňkách s *ERV14* nebo v buňkách *erv14Δ* (Obr. 6). Ačkoliv se celý protein i jeho zkrácená verze bez C-konce dostávaly v přítomnosti proteinu Erv14 bez potíží do plazmatické membrány, v buňkách bez Erv14 byla jejich lokalizace rozdílná. Protein Nha1 o celé délce byl v buňkách *erv14Δ* částečně zadržován v perinukleárním ER, jak již bylo publikováno dříve (Herzig et al., 2012), ale na protein Nha1 postrádající C-konec neměla nepřítomnost proteinu Erv14 vliv, protein

byl lokalizován v plazmatické membráně stejně jako v přítomnosti Erv14 (Rosas-Santiago et al., 2015). Měřen byl i export sodných kationtů z buněk s *ERV14* a z buněk *erv14Δ* produkujících buď celý Nha1 protein či protein Nha1 zkrácený o svůj C-konec. Schopnost buněk se zkrácenou verzí proteinu Nha1 transportovat Na<sup>+</sup> kationty ven se nijak nelišila mezi buňkami nesoucími Erv14 a buňkami Erv14 postrádajícími. Na druhou stranu buňky s plnou verzí proteinu transportovaly Na<sup>+</sup> kationty v přítomnosti proteinu Erv14 efektivněji než ty buňky, které nesly plnou verzi proteinu, ale Erv14 neměly. Tyto výsledky potvrdily předchozí pozorování, že v nepřítomnosti proteinu Erv14 se nedostává protein o celé délce tak efektivně do membrány, jako v jeho přítomnosti (Rosas-Santiago et al., 2015).

Jak již bylo řečeno (Kap. 2.1.3.2), protein Nha1 se nachází v plazmatické membráně jako dimer (Mitsui et al., 2005) a bylo ukázáno, že pro efektivní dimerizaci a průchod vzniklých dimerů sekreční dráhou je také potřebný protein Erv14 (Rosas et al., 2015). V buňkách, které mají protein Erv14, byl nalezen antiporter Nha1 v plazmatické membráně jako dimer a v ER se vyskytoval jak v monomerní, tak i dimerní formě, přičemž dimery převažovaly. V buňkách *erv14Δ* byly v ER nalezeny také dimery i monomery antiporteru Nha1, ale naopak zde převažovala jeho monomerní forma a v plazmatické membráně byly identifikovány pouze monomery proteinu Nha1, což potvrzuje roli proteinu Erv14 v procesu dimerizace (Rosas et al., 2015).

### 3 Cíle práce

1. Studovat vliv delece genu *ERV14* na růst kmenů W303-1A a BW31 kvasinky *S. cerevisiae*.
2. Studovat vliv delece genu *ERV14* na lokalizaci a funkci homologů antiporteru ScNha1 z různých druhů kvasinek v *S. cerevisiae*.
3. Studovat vliv délky C-konce proteinu ScNha1 na jeho lokalizaci, funkci a aktivitu v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14.
4. Studovat lokalizaci, funkci a aktivitu proteinu Ena1 v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14.

## 4 Materiál

### 4.1 Kmeny kvasinek a bakterií

#### 4.1.1 Kvasinky

V tabulce jsou uvedeny laboratorní kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které byly při práci využity. Kmen kvasinky BYT45 (Navarrete et al., 2010) je odvozen od kmene BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) (Brachmann et al., 1998), který v této práci však použit nebyl.

**Tab. 1: Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* použité v této diplomové práci.**

Kmen	Genotyp	Zdroj
BYT45	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 nha1Δ::loxP ena1-5Δ::loxP</i>	Navarrete et al., 2010
BYT45 <i>erv14Δ</i>	<i>BYT45 erv14Δ::loxP</i>	Rosas-Santiago et al., 2015
W303-1A	<i>MATa leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade 2-1 can1-100 GAL SUC2 mal10</i>	Wallis et al., 1989
W303-1A <i>erv14Δ::kanMX</i>	<i>W303-1A erv14Δ::kanMX</i>	Josef Škoda, nepublikovaný výsledek
BW31	<i>W303-1A ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2</i>	Kinclova-Zimmermannova et al., 2005
BW31 <i>erv14Δ::kanMX</i>	<i>BW31 erv14Δ::kanMX</i>	Josef Škoda, nepublikovaný výsledek

#### 4.1.2 Bakterie

V této práci byly používány bakteriální buňky *Escherichia coli*, kmen XL1 – Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F [proAB<sup>+</sup> lac1<sup>q</sup>lacZΔM15 Tn10 (ter<sup>r</sup>)*]; Stratagene).

### 4.2 Primery

Používané primery byly dodávány firmou Sigma.

Primery použité pro colony PCR, pomocí které byla testována úspěšnost odstranění kazety *kanMX* z genomu.

**Přímý primer kanMX – F1**

ATTTGATGCTCGATGA

**Zpětný primer kanMX – R1**

CTCTGGCGCATCGGGC

**Zpětný primer D – R1**

TTTCACAGTCATGCTCTCCC

**Přímý primer UP – F1**

CCCATTTCTCACATTTATC

**Přímý primer F2**

GCATGGTGCTTTGTCATTAC

**Zpětný primer R2**

GATACAGTTGACAACAACAGC

Primery použité pro amplifikaci různě dlouhých fragmentů genu *NHA1* pomocí PCR, následně využitých k vložení do vektoru pGRU1 pomocí kvasinkové homologní rekombinace.

**Přímý primer – PNHA1fw**

TGTACATTATAAAAAAAAAATCCTGAACTTAGCTAGATATTATGGCTATCTGGGAGCAACTAG

**Zpětný primer – PNHA1-928r**

TAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATAACCTTCTTTGTCTTTTCTGA

**Zpětný primer – PNHA1-680r**

TAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATGATCTTTCACTTTCATTTTCC

**Zpětný primer – PNHA1-568r**

TAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAAGATCTTGATGAAAATATTTCTCTACC

Primery použité pro ověření a sekvenaci nově vyrobených konstruktů, ověřených pomocí PCR.

**Přímý primer PNHA1-1**

CAACTCTGTGTGATATAG

**Přímý primer PSI10**

CTGCAATGATGGTATGG

**Přímý primer PSI12**

AAGACCTTATACCTGA

**Přímý primer PSI15**

CACCGGAAAAGGAATATAGCGAT

**Přímý primer PSI20**

CCTGCGCCACCGAGAGGA

**Zpětný primer PSI10R**

TCAAGATTTACCTTGC

**Zpětný primer RGFP1**

TCTGGGTATCTAGCAAAAC

### 4.3 Vektory

V této práci byly použity mnohokopiové vektory pGRU1 (NCBI, Accession no. AJ249649), YEp352 (Hill et al., 1986) a vektory od nich odvozené, které mají vložené geny kódující transportéry kationtů alkalických kovů za promotorem *NHA1*, který zajišťuje slabou a konstitutivní expresi genu. Vektor pGRU1 obsahuje sekvenci kódující protein GFP, tato sekvence je připojena k 3' konci genů kódujících kvasinkové transportéry.

**pGRU1** - 5,7 kbp, *ScURA3*, *GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (NCBI, Accession no. AJ249649)

**pScNHA1-985GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Kinclova et al., 2001c)

**pScNHA1-472GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 472-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Kinclova et al., 2001c)

**pCaCNH1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-CaCNH1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Kinclova et al., 2001b)

**pCdCNH1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-CdCNH1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Krauke and Sychrova, 2008)

**pCgCNH1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-CgCNH1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Krauke and Sychrova, 2011)

**pCpCNH1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-CpCNH1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Krauke and Sychrova, 2008)

**pDhNHA1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-DhNHA1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Velkova and Sychrova, 2006)

**pYINHA1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-YINHA1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Papouskova and Sychrova, 2006)

**pYINHA2-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-YINHA2-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Papouskova and Sychrova, 2006)

**pZrNHA1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ZrNHA1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Lenka Přibylová, nepublikovaný výsledek)

**pScENA1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ScENA1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Olga Zimmermannova, nepublikovaný výsledek)

**pCgENA1-GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-CgENA1-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Krauke and Sychrova, 2011)

**YEp352** - 8,8 kbp, *ScURA3*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori* (Hill et al., 1986)

**pNHA1-985** - *ScURA3, NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1, 2μ, Amp<sup>R</sup>, ori* (Kinclova et al., 2001c)  
**pNHA1-928** - *ScURA3, NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 928, 2μ, Amp<sup>R</sup>, ori* (Kinclova et al., 2001c)  
**pNHA1-680** - *ScURA3, NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 680, 2μ, Amp<sup>R</sup>, ori* (Kinclova et al., 2001c)  
**pNHA1-568** - *ScURA3, NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 568, 2μ, Amp<sup>R</sup>, ori* (Kinclova et al., 2001c)  
**pNHA1-472** - *ScURA3, NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 472, 2μ, Amp<sup>R</sup>, ori* (Kinclova et al., 2001c)  
**pScENA1** - *ScURA3, NHA1<sup>P</sup>-ScENA1, 2μ, Amp<sup>R</sup>, ori* (Olga Zimmermannova, nepublikovaný výsledek)  
**pSH47** - 7,0 kbp, *ScURA3, Amp<sup>R</sup>, ori, Cre* (Guldener et al., 1996) - multikopiový vektor, který za galaktózovým promotorem *GAL1* nese gen kódující Cre rekombinázu.

#### 4.4 Chemikálie

Tab. 2: Seznam použitých chemikálií.

CHEMIKÁLIE	VÝROBCE
Adenin	Sigma
Agar	Dr. Kulich Pharma
Agaróza	SERVA
Ampicilin	Biotika
Barvička na DNA - Midori Green Advance	Genetics
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
D-galaktóza	Sigma
D-glukóza	Lach-Ner
DNA away	MBP
Dodecylsírán sodný (SDS)	Bio - Rad
EDTA	Lach-Ner
Ethanol	Lach-Ner
Fenol – chloroform – isoamylalkoholová směs (25:24:1)	Sigma
G418S (geneticin) – 50 mg/ml	Formedium
Glycerol	Sigma
Hydroxid sodný	Riedel – de Haën
Hydroxid vápenatý	MP Biomedicals
Chlorid draselný	Lach-Ner
Chlorid hořečnatý	Fluka
Isopropanol	Fluka
Kit pro izolaci pDNA z bakterií GenElute™ HP	Sigma
Kyselina citrónová	Lach-Ner
Kyselina chlorovodíková – 35%	PENTA
Kyselina octová (HAc)	PENTA
LB broth	Sigma

L-Histidin	Sigma
Lithium acetát (LiAc)	Sigma
L-Leucin	Sigma
L-Methionin	Sigma
Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
Mix deoxynukleotidů - 10 mM	Sigma
Octan sodný	Lach-Ner
Phusion High – Fidelity DNA Polymerase (2U/μl)	Thermo Fisher Scientific
PPP Mastermix	Top-Bio
Primery	Sigma
Pufr – Phusion HF	Thermo Fisher Scientific
Restrikční endonukleázy + pufrы XmaII, BglII, PstI, XbaI	Fermentas, Thermo Fisher Scientific
Sacharóza	PENTA
Sodík-standardní roztok 1000 mg/l	Merck
Tris (hydroxymethyl) – aminomethan	SERVA
Triton X - 100	Sigma
L-Tryptofan	Sigma
Trizma hydrochloride solution, pH 7,4	Sigma
Trizma hydrochloride solution, pH 8	Sigma
Uracil	Sigma
Velikostní DNA markery MassRuler™ DNA Ladder Mix a O' GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific
YNB (w/o AAs) Difco	BD
YPD agar	Formedium
YPD broth	Formedium

## 4.5 Kultivační média

Všechna používaná kultivační média byla sterilizována v autoklávu při 121 °C a tlaku 120 kPa po dobu 20 minut.

### 4.5.1 Média pro kultivaci kvasinek

#### Médium YNB

Médium YNB, které bylo používáno, obsahovalo 0,67% směs YNB (w/o AAs), 2% D-glukózu/2% D-galaktózu a v případě přípravy pevného média byl přidáván navíc 2% agar. Jak do tekutého média (před kultivací), tak do média pevného (do vychlazeného média těsně před naléváním do Petriho misek) byly přidávány auxotrofní přísady, které kvasinky vyžadují pro růst. V případě kmenů odvozených od kmene BY4741 to byl histidin,

leucin, methionin a uracil (20 µg/ml) a v případě kmenů odvozených od kmene W303-1A to byl adenin, histidin, leucin, tryptofan a uracil (15 µg/ml).

#### **Tekuté médium YPD**

Tekuté médium YPD bylo vyráběno ze směsi YPD broth, která se používá v koncentraci 5 g na 100 ml deionizované vody. Pro kultivaci kvasinek odvozených od kmene W303-1A bylo médium doplněno o adenin přidávaný v koncentraci 15 µg/ml.

#### **Pevné médium YPD**

Pevné médium YPD bylo připravováno ze směsi YPD agar v koncentraci 7 g na 100 ml deionizované vody. Stejně jako do tekutého média YPD, tak i do toho pevného se v případě pěstování buněk s mutací *ADE2* přidávalo 15 µg/ml adeninu.

### **4.5.2 Média pro kultivaci bakterií**

#### **Médium LB**

Pro kultivaci bakterií bylo používáno médium LB, které bylo připravováno rozpuštěním 2 g směsi LB broth ve 100 ml deionizované vody. Při výrobě pevných půd byl navíc přidáván 2% agar. Jak pevná, tak tekutá média obsahovala ampicilin v koncentraci 100 µg/ml. V případě tekutého média byl ampicilin přidáván před kultivací, v případě média pevného po vychlazení média těsně před naléváním do Petriho misek.

### **4.6 Přístroje a pomůcky**

**Tab. 3: Seznam použitých přístrojů a pomůcek.**

<b>PŘÍSTROJE A POMŮCKY</b>	<b>VÝROBCE</b>
Aplikátor Replica plater	Sigma
Autokláv 2540 EL	Tuttnauer
Centrifuga 5430	Eppendorf
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf
Centrifuga mini – C1301P	Cleaver Scientific
Dávkovací pipety	Eppendorf
Elektroporační kyvety	M.G.P.
Elektroporátor GHT 1287-B	Jouan
Filtry pro odběr buněk – 0,8 µm	Millipore
Filtry pro sterilizaci roztoků – 0,2 µm	VWR
Fotoaparát CoolPix P7000	Nikon
Hlubokomrazící box	Sanyo
Horizontální elektroforéza	Sigma

Imerzní olej	Olympus
Inkubátor s možností třepání NB 205	N - BIOTEK
Inkubátor s možností třepání Minitron	INFORS HT
Klíčky	Biologix
Kyvety na měření OD	Kartell
Laboratorní sklo	Thermo Fisher Scientific, Merci
Magnetická míchačka	IKA
Mikrobiologický inkubátor, INCU-line	VWR
Mikroskop BX53	Olympus
Mikroskop – kamera DP73	Olympus
Mikrotitrační destička	P - LAB
PCR mastercycler pro	Eppendorf
Pipety	Gilson
Petriho misky	GAMA
pH metr	Jenway
Reader - ELx808	N - BIOTEK
Spektrofotometr BioPhotometer	Eppendorf
Spektrofotometr 211 Spekol	Carl Zeiss Jena
Spektrometr pro AAS – SOLAAR 969 AA	TJA Solutions
Skleněné kuličky, průměr 0,3 – 0,6 mm, promyté v kyselině dusičné	Sartorius
Sterilní fólie (Breathe-Easy)	Electron Microscopy Sciences
Termomixér – Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex REAX top	Heidolph
Zamrazovací zkumavky	Thermo Fisher Scientific

#### 4.7 Počítačové programy a databáze

**Lasergene 11 DNASTAR**

**EndNote X7**

**Program Protter (Omasits et al., 2014)**

<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>

**Databáze proteinových sekvencí Uniprot**

<http://www.uniprot.org/>

**Saccharomyces Genome Database (SGD)**

<https://www.yeastgenome.org/>

**Pubmed**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

## **5 Metody**

### **5.1 Sterilizace materiálu**

Pro většinu experimentů prováděných s kvasinkovými či bakteriálními buňkami je nezbytné používat sterilní materiál. Jsou sterilizována nejen kultivační média a roztoky, ale i suchý materiál, jako je laboratorní sklo, špičky na pipety či párátko. U nás v laboratoři se veškerý materiál sterilizuje v autoklávu při 121 °C a tlaku 120 kPa po dobu 20 minut. Výjimku tvoří roztoky, jako jsou například směsi aminokyselin, kterým by při vystavení takovým podmínkám hrozil rozklad, a proto jsou sterilizovány přes filtry s póry o velikosti 0,2 μm. Zvláštní typ sterilizace se využívá pro elektroporační kyvety. Ty jsou nejprve promyty v roztoku DNA away, sterilizovány namočením do ethanolu a nakonec ještě působením UV záření. Materiál na jedno použití, jako jsou Petriho misky, mikrotitrační destičky či kličky pro zaočkování kultury, dodávají firmy sterilní.

### **5.2 Kultivace a uchování buněk**

#### **5.2.1 Kvasinky**

Buňky kvasinek byly kultivovány buď v tekutém médiu v Erlenmeyerových baňkách za stálého třepání (160 rpm) při 30 °C nebo byly pěstovány na pevném médiu v Petriho miskách také při 30 °C, v mikrobiologickém inkubátoru.

Buňky byly uchovávány dlouhodobě v hlubokomrazícím boxu při - 80 °C ve 30% glycerolu v kryozkumavce. Krátkodobě byly také uchovávány kvasinky v Petriho miskách v lednici při 4 °C.

#### **5.2.2 Bakterie**

Bakterie byly kultivovány buď v tekutém či na pevném médiu LB s přidaným ampicilinem, který sloužil jako selekční marker.

Buňky bakterií byly stejně jako kvasinkové buňky uchovávány v hlubokomrazícím boxu při - 80 °C v 15% glycerolu v kryozkumavkách.

### 5.3 Měření optické hustoty buněk

Měření optické hustoty (OD) bylo využíváno k určení nárůstu buněk v suspenzi. OD se v naší laboratoři měří v 1 cm širokých plastových kyvetách při vlnové délce 600 nm a to buď pomocí spektrofotometru Spekol či BioPhotometer. Tyto přístroje udávají pro stejně narostlé kultury odlišné hodnoty OD, přičemž hodnota naměřená na spektrofotometru BioPhotometer je téměř trojnásobná, a proto bude ve výsledcích vždy uváděno, který přístroj byl k měření OD využit. Při měření hustoty buněk je důležité buněčnou suspenzi naředit na hodnotu OD 0,5 či menší (Spekol), kdy jsou naměřené hodnoty OD přímo úměrné koncentraci buněk v suspenzi. Před vlastním měřením se nejprve odečte pozadí (tedy vloží se kyveta s čistým médiem) a poté se měří samotná hustota buněk (kyveta s narostlou suspenzí), která se následně přepočítá podle ředění.

### 5.4 Transformace bakterií

K transformaci byly používány předem připravené kompetentní buňky, které se uchovávají dlouhodobě v hlubokomrazícím boxu při - 80 °C. Buňky byly vyndány z boxu a ponechány k roztátí v ledu. Do každé z předem vychlazených elektroporačních kyvet bylo napipetováno 40 µl buněk a přidáno 0,1 ng příslušné plazmidové DNA. Poté byly buňky elektroporovány pomocí elektroporátoru Jouan po dobu 8 ms pulzem o napětí 1250 V. Po vlastní elektroporaci bylo nutné okamžitě přidat 100 µl ledového média LB a po dobu následujících 20 minut nechat kyvety s buňkami stát v inkubátoru při 37 °C. Poté byly buňky vysévány na Petriho misky s médiem LB obsahujícím selekční marker, antibiotikum ampicilin, a kultivovány při 37 °C.

### 5.5 Transformace kvasinek

Den před plánovanou transformací byly kvasinky zaočkovány do 80 ml tekutého média YPD a nechaly se narůst přes noc do OD 0,6 – 0,7 (měřeno na Spekolu), což odpovídalo množství buněk potřebného na 8 elektroporací. Kultura byla stočena na centrifuze za laboratorní teploty při 4000 rpm po dobu 3 minut, byl slit supernatant, k peletě přidáno trochu vody a buňky byly zvortexovány. Poté byla zkumavka doplněna vodou a buňky znovu stočeny za stejných podmínek. Po centrifugaci byl slit supernatant, peleta resuspendována v 8 ml vody a bylo přidáno 200 µl 1M DTT. Následně byla zkumavka s buňkami vložena do třepačky na 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí 15 minut byly buňky stočeny při

4 °C 3 minuty na centrifuze při 5000 rpm. Dále byl vylit supernatant, buňky promyty ledovou vodou a opět stočeny za stejných podmínek. Supernatant byl vylit a bylo přidáno 5 ml ledového elektroporačního pufru TpEB a buňky byly znovu stočeny. Po vylití supernatantu bylo připipetováno 800 µl ledového TpEB, čímž byly buňky připraveny k elektroporaci.

Do každé z nachlazených elektroporačních kyvet bylo napipetováno 100 µl buněk a přidána pDNA v množství 0,1 – 0,3 µg. Vlastní elektroporace byla provedena elektroporátorem Juoan, kdy byly buňky vystaveny napětí 625 V po dobu 24 ms. Ihned po elektroporaci bylo nutné k buňkám přidat 100 µl ledové vody a poté je nechat stát 20 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byly buňky vysévány na Petriho misky s médiem YNB s auxotrofními přísadkami. Jako selekční marker sloužil uracil, který nebyl do média přidáván, a uměly ho syntetizovat pouze buňky, u kterých byla elektroporace plazmidem nesoucím gen *URA3* úspěšná, jelikož transformované buňky měly mutaci v genu *URA3* a nebyly tak schopny uracil bez přijatého plazmidu syntetizovat. Jako negativní kontrola sloužily buňky, ke kterým nebyla před elektroporací pDNA přidávána. Misky s vyšetými buňkami byly ponechány v inkubátoru při 30 °C po dobu dvou dnů, kdy byly rozpoznatelné kolonie buněk s plazmidem.

**Složení pufru TpEB:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 270 mM sacharóza

## 5.6 Izolace plazmidové DNA z bakterií

Izolace plazmidů z *E. coli* byla prováděna pomocí komerčně dodávaného kitu „GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit“ podle příloženého protokolu od firmy Sigma. Den před izolací byly zaočkovány bakterie do 6 ml média LB s ampicilinem do sterilních baněk a nechaly se růst při 37 °C za stálého míchání na třepačce. K izolaci bylo využito 5 ml kultury, která byla stočena při 14 500 rpm během 1 minuty. Supernatant byl vylit a buňky resuspendovány v 200 µl „Resuspension solution“ obsahujícího RNázu A a následně byly lyzovány ve 200 µl „Lysis solution“. Do 5 minut bylo nutné přidat 350 µl neutralizačního roztoku, tzv.: „Neutralization buffer“. Vznikla sraženina, která byla stáčena pomocí centrifugy při 14 500 rpm po dobu 10 minut. Po stočení byl opatrně odpipetován supernatant obsahující plazmidy a přenesen na kolonku (je součástí kitu), která byla předem promyta 500 µl „Column preparation solution“. Získaný supernatant na kolonkách byl centrifugován po dobu 1 minuty při 14 500 rpm, kdy se v kolonce zachytila plazmidová DNA,

kteřá byla následně promyta promývacím roztokem 1, tzv.: „Wash solution 1“, stočena za stejných podmínek a poté promyta promývacím roztokem 2, tzv.: „Wash solution 2“. Po ukončení procesu promývání byly kolonky přendány do nových zkumavek a bylo k nim přidáno 100 µl sterilní deionizované vody a kolonky byly naposledy stočeny na centrifuze za stejných podmínek. Tím se z kolonek do vody uvolnily izolované plazmidy. Jejich koncentrace byla změřena pomocí spektrofotometru (BioPhotometer) a jejich správnost ověřena restričním štěpením a následnou elektroforézou.

## **5.7 Izolace plazmidové DNA z kvasinek**

Den před izolací pDNA byly kvasinky zaočkovány do 5 ml média YNB s nezbytnými auxotrofními přísadkami a následně ponechány růst za stálého míchání na třepačce při 30 °C do druhého dne. Z narostlé kultury bylo odebráno 1,5 ml a buňky byly stočeny pomocí centrifugy (90 s, 5000 rpm). Vzniklý supernatant byl vylit, buňky zvortexovány a bylo k nim v rukavicích přidáno 0,2 ml roztoku TSN, 0,2 ml směsi fenol – chloroform – isoamylalkohol a 0,3 g skleněných kuliček o průměru 0,3 – 0,6 mm. Tato směs byla promíchávána pomocí vortexu 1 minutu, pak se nechala zchladit v ledu a následně se ve vortexování pokračovalo další 1 minutu. Poté byla směs centrifugována v centrifuze vychlazené na 4 °C při 14 000 rpm po dobu 5 minut. Pipetou byla odebrána vzniklá horní vrstva, přenesena do nové zkumavky a následně byl přidán stejný objem isopropanolu. Obsah byl promíchán překlopením a zkumavky byly na 20 minut umístěny do mrazáku (- 20 °C). Následovalo 15 minut centrifugace za stejných podmínek, slití supernatantu a osušení zkumavky. Dále byl přidán 1 ml 80% ethanolu a opět následovaly 2 minuty centrifugace ve vychlazené centrifuze, tentokrát při nejvyšší rychlosti (15 000 rpm). Následně byl odlit supernatant a pDNA na dně zkumavky byla sušena při 37 °C v inkubátoru. Po vysušení byla získaná DNA rozpuštěna ve 20 µl pufru TE (pH 7,6) a uchovávána v mrazáku při - 20 °C.

### **Složení roztoků:**

**TSN:** 2% Triton X – 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris - HCl pH 8, 1 mM EDTA

**Pufř TE:** 10 mM Tris – HCl (pH 8), 1 mM EDTA

## 5.8 Restrikční analýza

Štěpením pomocí restrikčních endonukleáz byla ověřována správnost plazmidů. Byla vytvořena restrikční směs o objemu 15  $\mu$ l, obsahující ověřovanou pDNA v množství 0,5  $\mu$ g, 3 U (jednotky) enzymu, 1,5  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru a sterilní deionizovanou vodu, kterou byl doplněn celkový objem do 15  $\mu$ l. Štěpení probíhalo po dobu 1,5 hodiny v inkubátoru při 37 °C a poté byla velikost získaných fragmentů DNA ověřena pomocí elektroforézy.

Dále bylo restrikční štěpení využito v případě, kdy bylo potřeba naštěpit plazmid, do kterého byl poté pomocí homologní rekombinace v kvasinkách vkládán gen. V tomto případě byl objem restrikční směsi 20  $\mu$ l, přičemž pDNA byla přidávána v množství 2  $\mu$ g, použili jsme 10 U enzymu, 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru a do celkového objemu byla opět doplňována sterilní deionizovaná voda. Štěpení probíhalo po dobu 3 hodin v inkubátoru při 37 °C.

## 5.9 Elektroforetická analýza

Pro ověření velikosti fragmentů po proběhlé PCR či po naštěpení plazmidů byla využívána horizontální gelová elektroforéza. Gel byl vytvářen z pufru TAE, 1% agarózy a 1,5  $\mu$ l barvičky Midori Green pro detekci DNA. Nejprve byl smíchán pufr TAE s agarózou a směs byla krátce povařena v mikrovlnné troubě, aby se agaróza rozpustila. Poté byla směs zchlazena na přibližně 60 °C, přidána barvička podle protokolu udávaného výrobcem (1,5  $\mu$ l) a gel byl nalit do vaničky, kde byl předem připravený hřebínek. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyndán, čímž vznikly jamky, do kterých bylo možné nanášet vzorky, ke kterým byla před nanášením přidána 1x koncentrovaná Loading Dye pro zviditelnění průchodu fragmentů gelem. Do první jamky bylo nanášeno 5  $\mu$ l markeru, který během elektroforézy vytvořil fragmenty o definované velikosti a bylo tak možné s ním fragmenty z testovaných vzorků porovnat a určit jejich přibližnou velikost.

Elektroforéza v pufru TAE probíhala při napětí 100 V, při kterém se jednotlivé fragmenty na gelu rozdělily přibližně po 30 minutách. Poté bylo fragmenty možné detekovat pomocí UV záření.

**Složení pufru TAE:** 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM kyselina octová

## 5.10 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla využita pro namnožení různě dlouhých fragmentů genu *ScNHA1*, které byly později pomocí homologní rekombinace v *S. cerevisiae* vkládány do vektoru pGRU1. Reakční směs i podmínky reakce PCR byly vytvářeny podle protokolu pro použití DNA polymerázy nazvané Phusion High – Fidelity (2U/μl).

### Složení směsi na PCR – 1 reakce = 20 μl:

1. 4 μl 5x koncentrovaného pufru HF
2. 0,4 μl směsi deoxynukleotidů (4 x 10 mM)
3. 1 μl přímého primeru o koncentraci 10 μM
4. 1 μl zpětného primeru o koncentraci 10 μM
5. 0,2 μl DNA polymerázy - Phusion High – Fidelity
6. Templátová plazmidová DNA v koncentraci 1 ng/50 μl
7. H<sub>2</sub>O pro doplnění objemu do 20 μl

Směs byla smíchána v ledu a DNA polymeráza byla přidána až jako poslední. Nakonec byly zkumavky krátce stočeny na centrifuze a vloženy do PCR přístroje. Byly nastaveny následující podmínky reakce:

1. Úvodní denaturace – 1 min., 98 °C
2. **Denaturace - 10 s, 98 °C**
3. **Nasednutí primerů - 30 s, 60 °C**
4. **Extenze - 15 s na 1 kbp, 72 °C**
5. Finální extenze – 10 min., 72 °C
6. Chlazení - ∞, 4 °C

Kroky 2 až 4 byly opakovány 30x. Po skončení programu byla velikost produktů PCR analyzována pomocí elektroforézy a ověřená DNA byla následně precipitována (Kap. 5.12).

Za pomoci PCR byla také ověřována správnost nově vytvořených plazmidů po homologní rekombinaci v kvasinkách. V tomto případě měla jedna reakce objem také 20 μl, ale bylo použito 10 μl komerčně dodávané směsi PPP Master mix, která v sobě již obsahuje DNA polymerázu Taq a směs deoxynukleotidů, a tak byla pouze smíchána s primery do finální

koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$ , s pDNA do finální koncentrace 1 ng/50  $\mu\text{l}$  a objem do 20  $\mu\text{l}$  byl doplněn vodou. Na přístroji PCR byly nastaveny následující podmínky:

1. Úvodní denaturace – 1 min., 94 °C
2. **Denaturace – 15 s, 94 °C**
3. **Nasednutí primerů – 15 s, 55°C**
4. **Extenze – 1 min. na 1 kbp, 72 °C**
5. Finální extenze – 7 min., 72 °C
6. Chlazení -  $\infty$ , 4 °C

Kroky 2 až 4 byly opakovány 30x a velikost vzniklých fragmentů byla po skončení PCR opět ověřena pomocí elektroforézy.

### 5.11 Colony PCR

Pomocí colony PCR bylo ověřeno odstranění kazety *kanMX* z genomu buněk. Nejprve byla vytvořena směs skládající se z 1200  $\mu\text{l}$  1% SDS a 300  $\mu\text{l}$  1M LiAc, která byla rozpipetována po 100  $\mu\text{l}$  do zkumavek. Do každé zkumavky, která představovala jeden vzorek, bylo párátkem přidáno malé množství čerstvě narostlých buněk z ověřované kolonie *S. cerevisiae*, které byly den předem nasazeny na nové agarové médium YPD a ponechány růst přes noc při 30 °C v inkubačním boxu. Poté byly zkumavky s buňkami vloženy do termomixéru předem vyhřátého na 70 °C, kde se nechaly 5 minut inkubovat. Po 5 minutách bylo ke směsi přidáno 300  $\mu\text{l}$  100% ethanolu a vše zvortexováno. Zkumavky byly následně stáčeny po dobu 5 minut při 15000 rpm v centrifuze vychlazené na 4 °C. Po stočení byl vylit vzniklý supernatant, bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  80% ethanolu, vše promícháno a opět centrifugováno za stejných podmínek. Supernatant byl opět vylit a pelet na dně zkumavky byl vysušen v termoboxu při 37 °C. Po vysušení bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  sterilní deionizované vody, obsah byl zvortexován a poté byly zkumavky stáčeny v centrifuze 30 s při 4 °C a 15000 rpm. Na PCR byl použit 1  $\mu\text{l}$  supernatantu, kde byla obsažena DNA k testování.

Po získání ověřované DNA byla připravena reakční směs, která měla celkem 12  $\mu\text{l}$ . K 1  $\mu\text{l}$  DNA byly dále přidány 4  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu\text{l}$  přímého 10  $\mu\text{M}$  primeru, 0,5  $\mu\text{l}$  zpětného 10  $\mu\text{M}$  primeru a 6  $\mu\text{l}$  směsi PPP Master mix. Tím bylo vše připraveno a zkumavky byly vloženy do PCR přístroje s předem nastavenými podmínkami:

1. Úvodní denaturace - 2 min., 94 °C
2. **Denaturace - 1 min., 94 °C**
3. **Nasednutí primerů - 1 min., 55 °C**
4. **Extenze - 1 min na 1 kbp, 72 °C**
5. Finální extenze - 10 min., 72 °C
6. Chlazení, ∞ 4 °C

Kroky 2 až 4 byly opakovány 30x a produkty PCR byly následně ověřeny pomocí elektroforézy.

## 5.12 Precipitace DNA

Tato metoda byla použita po PCR, při které byly pomnožovány různě dlouhé fragmenty genu *ScNHA1*, abychom získanou DNA přečistili od případných příměsí.

50 µl směsi po PCR bylo doplněno sterilní deionizovanou vodou do 150 µl, bylo přidáno 15 µl 3M NaAc (pH 5,2) a 450 µl 100% ethanolu. Převrácením byla směs promíchána a byla vložena do mrazáku do -20 °C na 20 minut. Poté byly zkumavky stáčeny v předem nachlazené centrifuze (4 °C) při 15000 rpm 15 minut. Byl slit supernatant, přidán 1 ml 80% ethanolu a opět byly zkumavky stáčeny za stejných podmínek, tentokrát po dobu 2 minut. Po slití supernatantu byla DNA na dně zkumavky vysušena v inkubátoru při 37 °C a následně rozpuštěna ve 20 µl pufru TE.

**Pufr TE:** 10 mM Tris – HCl (pH 8), 1 mM EDTA

## 5.13 Sledování růstu pomocí kapkového testu

Kapkový test je metoda, která umožňuje sledovat a porovnávat růst několika kmenů kvasinek najednou. Fotografie uvedené ve výsledcích byly pořizovány ve stejný den, pokud není uvedeno jinak.

Buňky, které byly testovány, byly vždy v pátek přesazeny na čerstvé agarové misky, inkubovány přes víkend při 30 °C a v pondělí použity k experimentu. Nejprve byly pomocí párátko nabrány buňky, resuspendovány ve sterilní vodě a poté byla OD suspenzí nastavena na stejnou hodnotu (OD = 2, BioPhotometer).

Mikrotitrační destička byla rozdělena tak, že jednomu kmeni kvasinek vždy příslušelo 5 jamek v jednom řádku. Do první jamky bylo napipetováno 200 µl buněčné suspenze o OD 2

a do zbývajících čtyřech jamek 180  $\mu$ l sterilní deionizované vody. Následně bylo odebráno 20  $\mu$ l z první jamky, které byly resuspendovány ve 180  $\mu$ l vody ve druhé jamce. Poté bylo odebráno 20  $\mu$ l z druhé jamky, které byly resuspendovány ve 180  $\mu$ l vody ve třetí jamce a takto se pokračovalo až k jamce číslo pět, čímž byla vytvořena řada pěti buněčných suspenzí, kdy každá následující suspenze byla 10x zředěná oproti té předchozí. Suspenze s postupně klesajícím množstvím buněk byly poté přeneseny pomocí aplikátoru Replica plater na agarové misky, kde každá vytvořila jednu kapku. Po zaschnutí kapek byly misky vloženy do inkubátoru s teplotou nastavenou na 30 °C a každý den byl růst buněk monitorován a fotografován po dobu 1 týdne.

#### **5.14 Měření růstových křivek v tekutém médiu**

Pro měření rychlosti růstu a porovnávání růstu jednotlivých kmenů kvasinek mezi sebou bylo v této práci využito měření růstových křivek buněk v tekutém médiu v readeru v mikrotitračních destičkách.

Buňky byly stejně jako v případě kapkového testu ponechány přes víkend růst na nové agarové půdě při 30 °C v inkubátoru a v pondělí byl s nimi proveden experiment. Do 500  $\mu$ l sterilní deionizované vody byly resuspendovány pomocí párátko čerstvě narostlé buňky, ze suspenze bylo odebráno 100  $\mu$ l pro změření OD na spektrofotometru BioPhotometer a OD zbylých 400  $\mu$ l suspenze pak byla upravena přidáním vody na hodnotu 1. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno do každé jamky po 100  $\mu$ l média a přidáno po 2  $\mu$ l buněčných suspenzí. Pro každý kmen v konkrétním médiu bylo využito 8 jamek, tedy 8 paralel, z nichž bylo možné naměřené hodnoty zprůměrovat. Destička byla přelepena sterilní fólií a umístěna do readeru. Nárůst OD při 595 nm v jamkách byl monitorován každou hodinu za stálého třepání při 30 °C po dobu 30 hodin. Díky tomu bylo možné sledovat nárůst počtu buněk v čase a na základě těchto dat vytvořit růstové křivky testovaných kmenů.

## 5.15 Stanovení obsahu sodných kationtů v buňkách pomocí AAS

Pro stanovení obsahu sodných kationtů v buňkách byla využita atomová absorpční spektrometrie (AAS). Aby nedocházelo ke kontaminaci roztoků ionty z okolí, bylo veškeré použité laboratorní sklo předem několikrát promyto deionizovanou vodou.

Buňky určené k experimentu byly zaočkovány do 50 ml tekutého média YNB a ponechány přes noc inkubovat za stálého třepání (160 rpm) při 30 °C. Když buňky dosáhly OD 0,2 (měřeno na Spekolu), byly stočeny (5000 rpm, 3 min., 24 °C), supernatant byl vylit a buňky byly následně 1 hodinu inkubovány za stejných podmínek v médiu YNB se 100 mM NaCl (pH 7) (v případě měření exportu sodných kationtů z buněk nesoucích různé verze antiporteru ScNha1) či 600 mM NaCl (v případě měření exportu sodných kationtů z buněk s proteinem ScEna1), což vedlo k akumulaci dostatečného množství sodných kationtů v buňkách. Po hodině inkubace byly buňky opět stočeny, supernatant vylit a buňky promyty 50 ml ledové deionizované vody. Po dalším stočení na centrifuze byla vylita voda, a tím byly buňky připraveny. Následně byly buňky převedeny do baněk s 50 ml inkubačního pufu, umístěny do třepačky a v předem stanovených intervalech bylo odebíráno 5 ml vzorku. Vzorek byl nanášen na filtr pro odběr buněk – 0,8 µm Millipore, přes který byl přefiltrován, a buňky zachycené na něm byly promyty dvakrát 5 ml promývacího roztoku. Poté byl filtr s buňkami přenesen do zkumavky s 5 ml extrakčního roztoku, kde došlo k rozložení buněk a uvolnění sodných kationtů do roztoku. Odebrané vzorky byly po zvortexování inkubovány přes noc při laboratorní teplotě. Následující den byly vzorky opět zvortexovány, stočeny na centrifuze (5000 rpm, 3 min., 24 °C) a poté bylo možné přímo v supernatantu měřit pomocí přístroje SOLAAR 969 AA obsah sodných kationtů. Před vlastním měřením byl přístroj nakalibrován pomocí standardů o koncentraci sodných kationtů 1 µg/ml, 2 µg/ml a 3 µg/ml, připravených ze standardního sodného roztoku (1000 mg/l) a deionizované vody.

### **Složení roztoků:**

**Inkubační roztok:** 10 mM Tris, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% glukóza, 10 mM KCl, pH upraveno pomocí kyseliny citrónové na 4,4 a poté zvýšeno pomocí hydroxidu vápenatého na 4,5

**Extrakční roztok:** 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M HCl

**Promývací roztok:** 20 mM MgCl<sub>2</sub>

## 5.16 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie byla v této práci využívána k ověření lokalizace proteinů značených zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) v buňkách *S. cerevisiae*.

Buňky byly zaočkovány do 10 ml tekutého média YNB a ponechány růst přes noc v inkubátoru při 30 °C za stálého třepání (160 rpm) do exponenciální fáze ( $OD \approx 0,2$ ). Poté byl do zkumavky odebrán 1 ml suspenze, stočen pomocí centrifugy (3 min., 4000 rpm, 24 °C) a nakonec byla vylita většina supernatantu. Na podložní sklíčko bylo nanášeno 2,5  $\mu$ l této suspenze, která byla překryta krycím sklíčkem a buňky pozorovány při stonásobném zvětšení za využití imerzního oleje pomocí mikroskopu Olympus BX53. GFP bylo vizualizováno pomocí světla LED s excitační vlnovou délkou 460 nm a emisní vlnovou délkou 515 nm a byly pořizovány i fotografie buněk za využití Nomarského kontrastu, vše pomocí kamery Olympus DP73.

## 6 Výsledky

### 6.1 Příprava kmenů W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ*

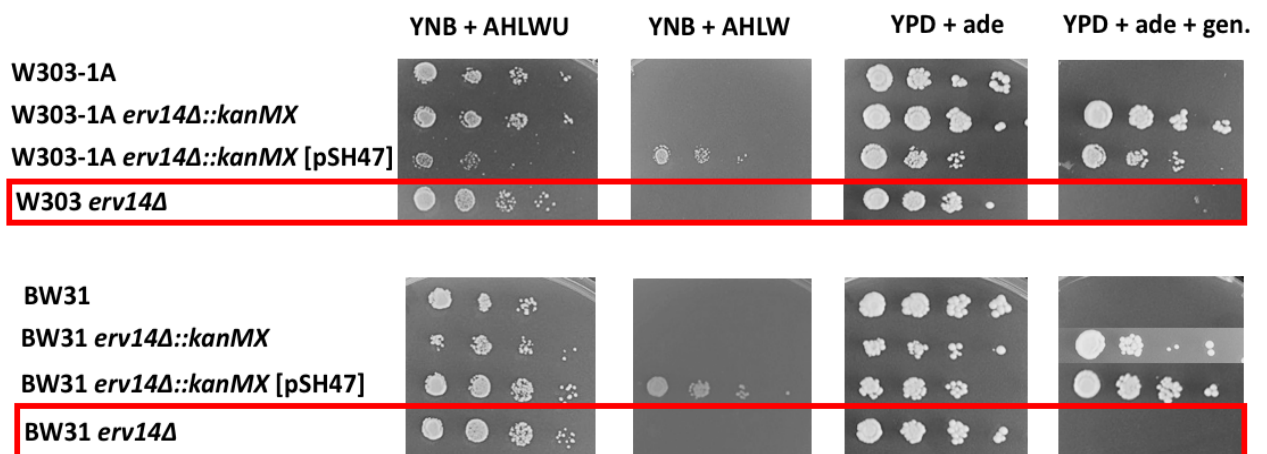
Doposud publikované výsledky o vlivu delece genu *ERV14* na toleranci buněk vůči solím byly získány v genetickém pozadí široce využívaného laboratorního kmene BY4741 a kmene BYT45, který je od BY4741 odvozen a z genomu má odstraněné geny kódující ATPázy *Ena* a antiporter *Nha1*. Dalším často využívaným laboratorním kmenem *S. cerevisiae* je kmen W303-1A, který se však od kmene BY4741 liší svou tolerancí k solím i dalšími fyziologickými parametry, jako je např. membránový potenciál (Petrezselyova et al., 2010), a proto jsme se rozhodli ověřit, jestli delece genu *ERV14* v kmeni W303-1A bude mít na buňky stejný efekt, jako na buňky kmene BY4741.

V laboratoři byly Josefem Škodou připraveny kmeny W303-1A *erv14Δ::kanMX* a BW31 (W303-1A *ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 erv14Δ::kanMX*), které sice mají z genomu odstraněný gen *ERV14*, ale stále obsahují markerový gen *kanMX* udílející buňkám rezistenci vůči geneticinu, obklopený dvěma místy *loxP*, pomocí kterého byl gen *ERV14* odstraňován (Guldener et al., 1996).

Před započítím studia vlivu delece *ERV14* jsme nejprve z genomů těchto kmenů odstranili deleční kazetu *kanMX*. Kvasinky byly transformovány plazmidem pSH47 nesoucím gen kódující Cre rekombinázu, která rozpoznává místa *loxP*, vyštěpí gen *kanMX* mezi nimi a ve výsledku zůstane v genomu pouze jedno místo *loxP*. Od kmene W303-1A *erv14Δ*, stejně jako od kmene BW31 *erv14Δ*, bylo přečárkováno na nové misky s médiem YNB + AHLW deset kolonií nesoucích plazmid a kvasinky byly ponechány růst po dobu dvou dnů při 30 °C. Jelikož Cre rekombináza se nachází na plazmidu pSH47 za galaktózovým promotorem *GAL1*, bylo nutné buňky přenést na médium YNB + AHLW, kde místo glukózy sloužila jako zdroj uhlíku 2% galaktóza, aby se spustila exprese genu kódujícího rekombinázu Cre. Po dvou dnech byly buňky přečárkovány na bohaté médium YPD + ade pro odstranění plazmidu pSH47 z buněk a během následujících čtyř dnů ještě znovu dvakrát přesazeny na čerstvé médium YPD + ade. Úspěšnost odstranění genu *kanMX* a plazmidu pSH47 byla poté ověřována pomocí kapkového testu a také colony PCR.

Kmeny byly testovány pomocí kapkového testu na médiích YNB + AHLWU a YPD + ade, kde by měly bez problémů růst, a pak na médiích YNB + AHLW a YPD + ade + geneticin, kde by růst neměly, pokud proběhlo odstranění genu *kanMX* i plazmidu pSH47 úspěšně. Pokud buňky rostly na médiu YNB + AHLW, znamenalo to, že se nezbavily plazmidu pSH47, který má *URA3* marker a umožňuje jim zde přežít. Pokud rostly na médiu YPD + ade + geneticin, pak to znamenalo, že nebyla úspěšně odstraněna kazeta *kanMX* z genomu.

K dalšímu ověřování pomocí colony PCR jsme proto vzali jen ty kmeny, které rostly na médiích YNB + AHLWU a YPD + ade a zároveň nerostly na médiích YNB + AHLW a YPD + ade + geneticin (Obr. 7).

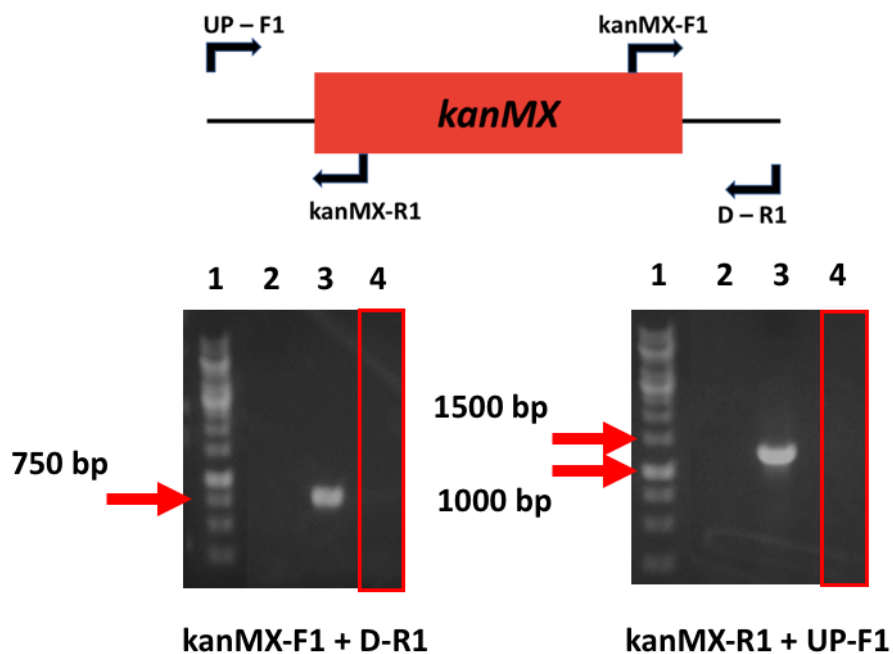


Obr. 7: Ověření odstranění kazety *kanMX* a plazmidu pSH47 z kmenů W303-1A *erv14Δ::kanMX* a BW31 *erv14Δ::kanMX*. Na kapkovém testu s použitými médii YNB + AHLWU, YNB + AHLW, YPD + ade, YPD + ade + gen. je vidět porovnání růstu (shora) divokého kmene, kmene s delecí genu *ERV14* s neodstraněným genem *kanMX*, kmene s delecí genu *ERV14* s neodstraněným genem *kanMX* transformovaným plazmidem pSH47 a růst jednoho z více nově vytvořených kmenů (červený rámeček) vybraného k dalšímu ověřování pomocí colony PCR.

Na colony PCR, která byla provedena podle protokolu popsaného v kapitole 5.11, byly využity čtyři páry primerů, abychom ověřili odstranění jak genu *kanMX*, tak *ERV14* z genomu:

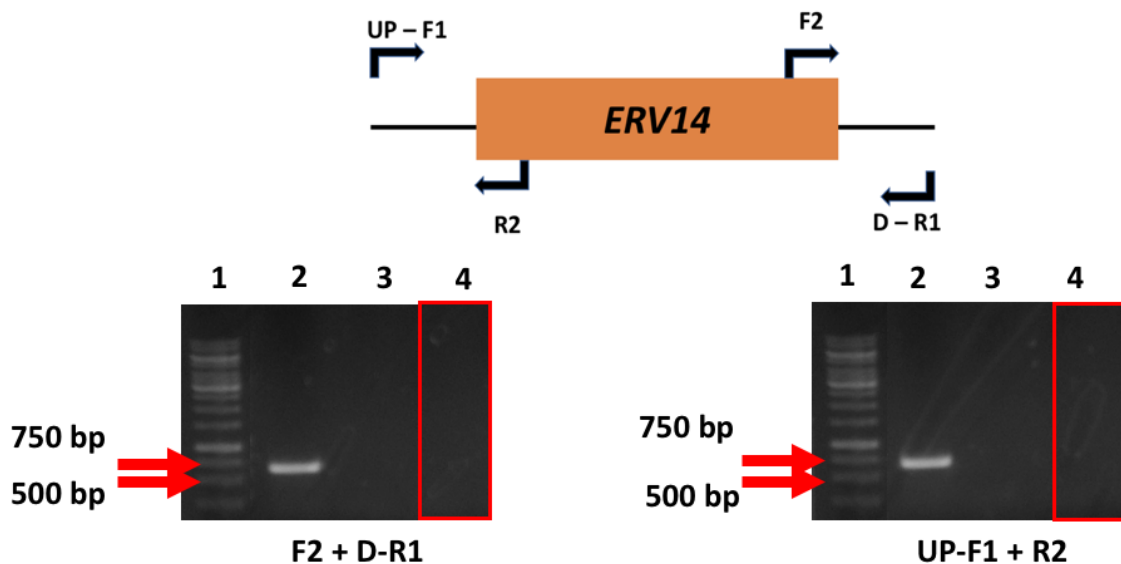
kanMX-F1 + D – R1  
 UP – F1 + kanMX-R1  
 UP – F1 + R2  
 F2 + D – R1  
 UP – F1 + D – R1

Primery kanMX-F1 a kanMX-R1 nasedají do oblasti genu *kanMX* (Obr. 8) a tudíž po provedení colony PCR s kmeny W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ* a těmito primery nebyly při následné analýze gelovou elektroforézou vidět žádné proužky. Viditelné byly podle očekávání fragmenty pouze u kontrolní PCR s kmenem s neodstraněnou kazetou. Tím byly potvrzeny výsledky kapkového testu, že testované buňky nenesou gen *kanMX*.



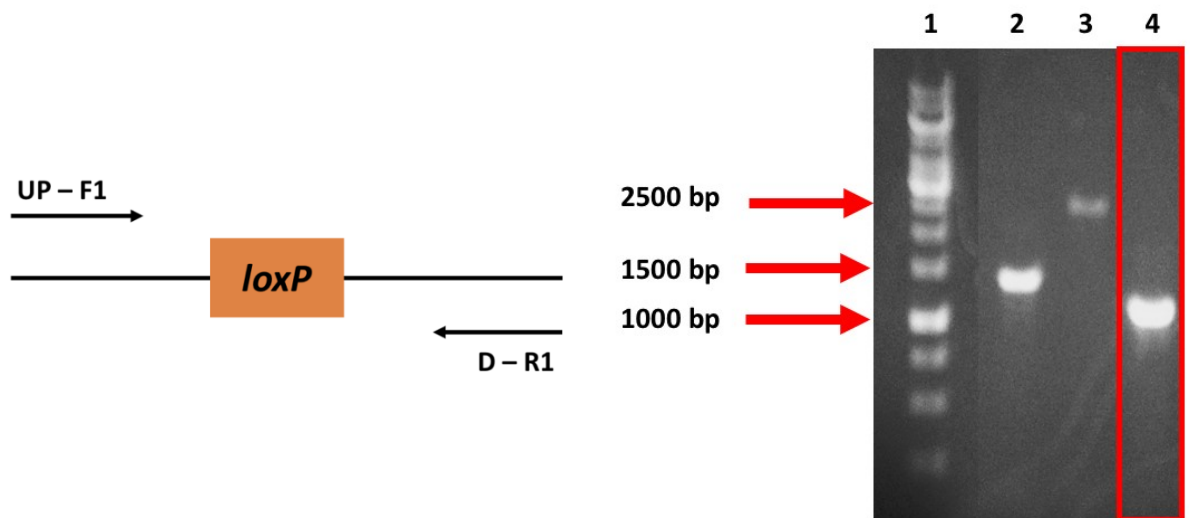
**Obr. 8:** Schéma nasedání primerů do oblasti kazety *kanMX* (nahore) a ukázka ověřování delece kazety *kanMX* z genomu kmene BW31 pomocí PCR a následnou gelovou elektroforézou (dole). Pod číslem 1 je použitý velikostní DNA marker O' GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Pod číslem 2 jsou vzorky divokého kmene BW31 a pod číslem 4 vzorky kmene BW31 *erv14Δ*, u kterých nejsou žádné fragmenty viditelné. Pod číslem 3 jsou vzorky kmene BW31 *erv14Δ::kanMX*. Očekávaná velikost fragmentů na gelu po proběhlé colony PCR byla za využití primerů kanMX-F1 + D-R1 717 bp a za využití primerů kanMX-R1 + UP-F1 1250 bp.

Negativní výsledek u testovaných kmenů *erv14Δ* byl očekáván i za využití primerů F2 a R2, které nasedají do oblasti genu *ERV14*. Pro colony PCR byly vybrány dvojice primerů F2 + D – R1 a UP – F1 + R2 a při analýze gelovou elektroforézou nebyly žádné proužky viditelné. Fragmenty byly vidět pouze u kontrolní PCR s kmeny divokého typu, které *ERV14* mají. Tím bylo potvrzeno i odstranění genu *ERV14*.



**Obr. 9:** Schéma nasedání primerů do oblasti genu *ERV14* (nahore) a ukázka ověřování delece genu *ERV14* z genomu kmene BW31 pomocí PCR a následnou gelovou elektroforézou (dole). Číslem 1 je označen použitý velikostní DNA marker O' GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Pod číslem 2 jsou vzorky kmene BW31 s očekávanou velikostí fragmentů za využití primerů F2 + D-R1 615 bp a za využití primerů UP-F1 + R2 702 bp. Pod číslem 3 jsou vzorky kmene BW31 *erv14Δ::kanMX* a pod číslem 4 vzorky kmene BW31 *erv14Δ*, u kterých nejsou patrné žádné fragmenty.

Pozitivní výsledky s kmeny *erv14Δ* jsme očekávali a také získali až při využití primerů UP – F1 + D – R1, které nasedají před, respektive za oblast genu *ERV14* (Obr. 10).

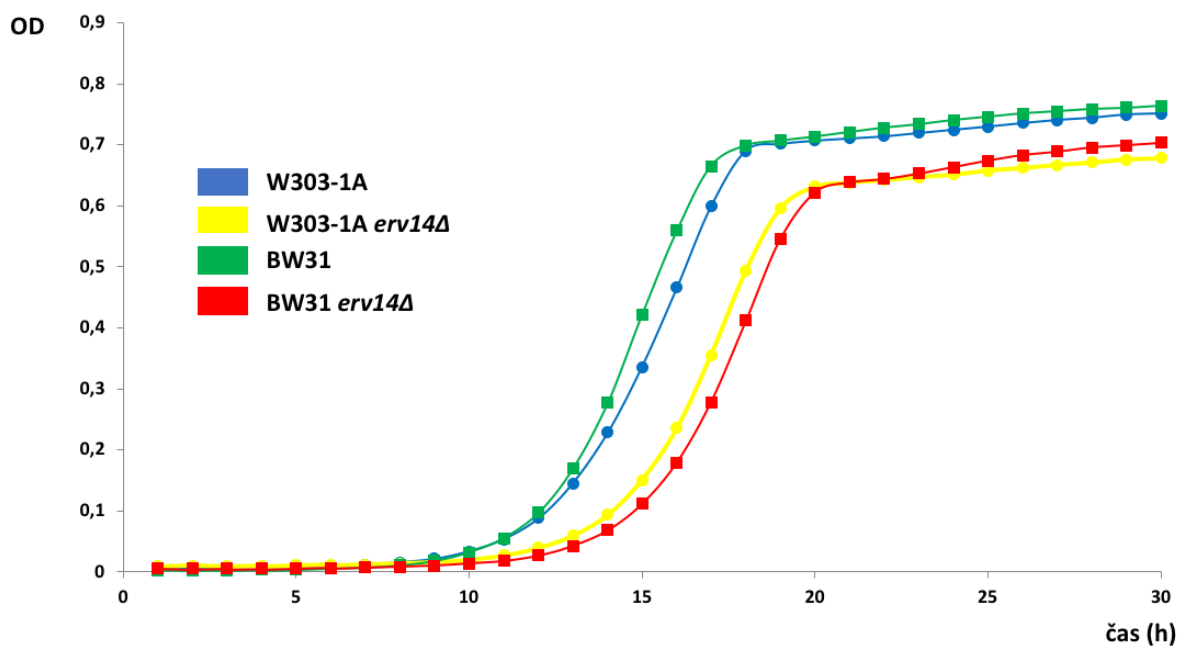


**Obr. 10:** Schéma nasedání primerů UP – F1 a D – R1 v genomu kmene s odstraněným genem *ERV14* i deleční kazetou *kanMX* (vlevo) a ukázka ověření delece genu *kanMX* a *ERV14* v kmeni BW31 pomocí colony PCR a vizualizace jejich produktů na gelové elektroforóze (vpravo). Vpravo na obrázku pod číslem 1 je marker O' GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Pod číslem 2 je vzorek divokého kmene (BW31) s očekávanou velikostí fragmentu 1434 bp. Číslo 3 nese vzorek kmene s delecí genu *ERV14* s neodstraněným genem *kanMX* (BW31 *erv14Δ::kanMX*), jehož velikost fragmentu by měla odpovídat 2620 bp. Pod číslem 4 je vzorek kmene BW31 *erv14Δ* s očekávanou velikostí fragmentů 1018 bp.

Podle výsledků PCR jsme získali a ověřili kmeny W303-1A *erv14Δ* (W303-1A *erv14Δ::loxP*) a BW31 *erv14Δ* (BW31 *erv14Δ::loxP*), které byly využity k dalším experimentům.

## 6.2 Vliv delece genu *ERV14* na růst kmenů W303-1A a BW31

Po odstranění genu *ERV14* a kazety *kanMX* z genomu kmenů W303-1A a BW31 jsme nejprve chtěli zjistit, jaký má tato delece obecně vliv na růst buněk. Proto byly po dobu 30 hodin měřeny růstové křivky kmenů W303-1A, BW31, W303-1A *erv14*Δ a BW31 *erv14*Δ v tekutém médiu YPD + ade v mikrotitrační destičce.

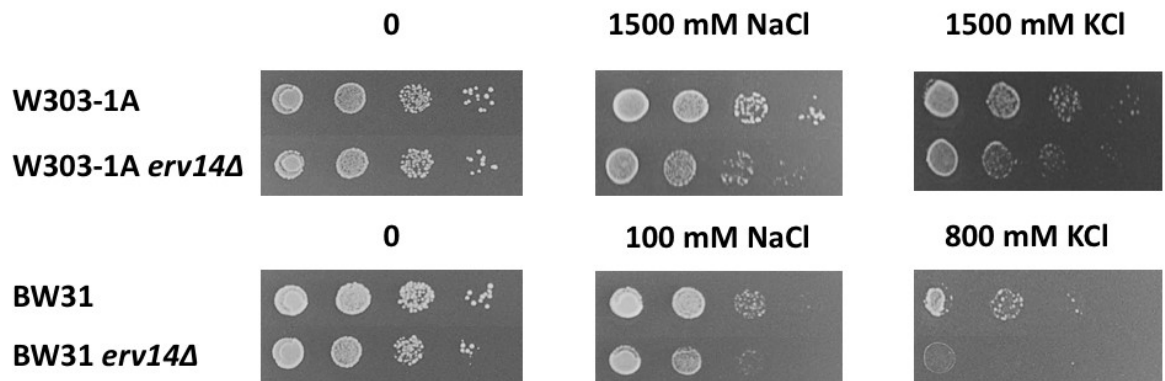


Obr. 11: Růst kmenů W303-1A, BW31, W303-1A *erv14*Δ a BW31 *erv14*Δ v tekutém médiu. Růstové křivky byly měřeny v médiu YPD + ade po dobu 30 hodin.

Z obr. 11 je patrné, že buňky kmene W303-1A *erv14*Δ a BW31 *erv14*Δ vstupují později do exponenciální fáze růstu, což se shoduje s výsledky dříve publikovanými, že buňky *erv14*Δ mají oproti buňkám s *ERV14* delší lag fázi (Powers and Barlowe, 1998). Zároveň také dorůstají i nižší finální OD, než buňky W303-1A a BW31, které *ERV14* mají. Růst buněk postrádajících *ERV14* je tedy viditelně zhoršen i pokud buňky rostou v podmínkách, které pro ně nejsou stresující.

Již dříve byla testována tolerance buněk divokého kmene a buněk postrádajících ATPázy Ena a antiporter Nha1 vůči solím v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14 v kmeni BY4741 (Rosas-Santiago et al., 2015). Výsledky ukázaly, že růst buněk divokého kmene i růst buněk postrádajících exportéry kationtů alkalických kovů (BYT45) na médiu obsahujícím soli je zhoršen v nepřítomnosti proteinu Erv14, oproti buňkám, které Erv14 mají.

Vliv delece genu *ERV14* na růst kmenů W303-1A, BW31, W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ* jsme sledovali pomocí kapkového testu na médiu YNB + AHLWU s různými koncentracemi solí. Růst buněk *erv14Δ* jak v případě kmene W303-1A, tak v případě kmene BW31 byl zhoršen v přítomnosti NaCl i KCl v porovnání s buňkami, které *ERV14* měly (Obr. 12), což se shoduje s již publikovanými výsledky (Rosas-Santiago et al., 2015) pro kmen BY4741.



**Obr. 12:** Kapkový test ukazující fenotyp delece *ERV14* z genomu kmenů W303-1A a BW31. Růst buněk na médiu YNB + AHLWU v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

### 6.3 Vliv delece genu *ERV14* na funkci a lokalizaci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek

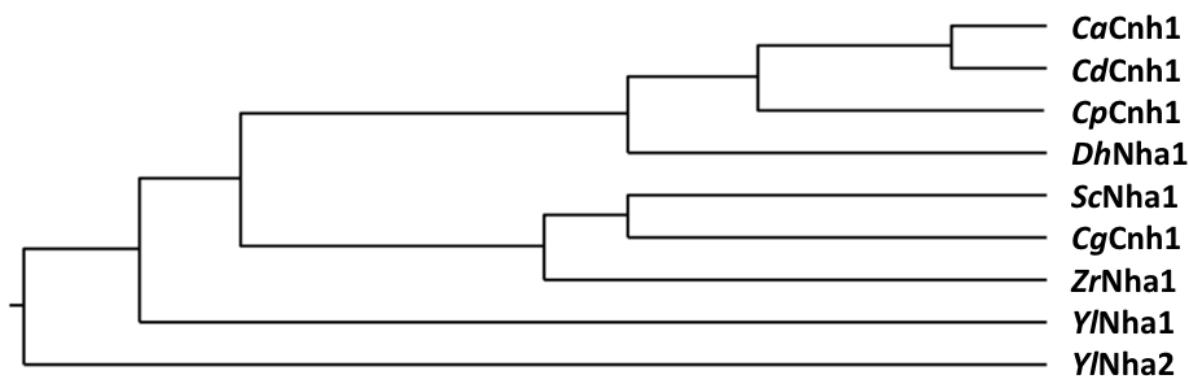
Jak bylo popsáno v teoretickém úvodu (Kap. 2.4.2), protein Erv14 působí v endoplazmatickém retikulu jako cargo receptor pro protein Nha1 a umožňuje jeho průchod sekreční dráhou (Herzig et al., 2012). Protein Nha1 je v buňkách *erv14Δ* zčásti zadržován v ER a nedostává se efektivně do plazmatické membrány. Ačkoliv cargo receptor Erv14 interaguje s transmembránovými doménami antiporteru Nha1, tak i přítomnost jeho dlouhého hydrofilního C-konce má na jeho průchod sekreční dráhou vliv (Rosas-Santiago et al., 2015). Postrádá-li antiporter Nha1 C – koncovou část, která tvoří více než polovinu celého proteinu, pak je Nha1 lokalizován v plazmatické membráně nezávisle na přítomnosti cargo receptoru Erv14 (Rosas-Santiago et al., 2015). Abychom ověřili, zda požadavek proteinu Nha1 na přítomnost Erv14 pro správný průchod sekreční dráhou souvisí s velikostí C-koncové části antiporteru, studovali jsme vliv delece genu *ERV14* na lokalizaci a funkci antiporterů rodiny NHA z různých kvasinek v buňkách *S. cerevisiae*. Řada těchto antiporterů byla dříve v naší laboratoři heterologně exprimována v buňkách *S. cerevisiae*, což umožnilo studium jejich substrátové specifity a funkce. Důležité pro tuto práci bylo, že se tyto proteiny mezi sebou výrazně liší délkou C-koncových částí a bylo tak možné sledovat, jaký vliv bude tato délka mít na jejich funkci a lokalizaci v buňkách s *ERV14* i buňkách *erv14Δ*.

Délka C – koncových částí (Tab. 4) antiporterů ScNha1, ZrNha1 z kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii*, DhNha1 z kvasinky *Debaryomyces hansenii*, YINha1 a YINha2 z kvasinky *Yarrowia lipolytica*, CaCnh1 z kvasinky *Candida albicans*, CdCnh1 z kvasinky *Candida dubliniensis*, CgCnh1 z kvasinky *Candida glabrata* a CpCnh1 z kvasinky *Candida parapsilosis* byla určena na základě porovnání aminokyselinových sekvencí těchto proteinů s modelem vytvořeným pro Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter ZrSod2-22 (Kinclova-Zimmermannova et al., 2015). Výsledný alignment je přílohou diplomové práce.

**Tab. 4: Struktura antiporterů NHA z různých druhů kvasinek.** V tabulce je u každého transportéru uveden jeho celkový počet AK a délky jednotlivých částí, které ho tvoří. N-konec/transmembránové domény/C-konec.

Antiportér	Celkový počet AK	N/TMD/C – konec
<i>ScNha1</i>	985	16/417/552
<i>ZrNha1</i>	994	15/417/562
<i>DhNha1</i>	941	15/417/509
<i>Y/Nha1</i>	854	15/416/423
<i>Y/Nha2</i>	516	13/409/94
<i>CaCnh1</i>	800	15/417/368
<i>CdCnh1</i>	819	15/417/387
<i>CgCnh1</i>	945	16/417/512
<i>CpCnh1</i>	985	15/417/553

V programu Lasergene 11 byl na základě srovnání aminokyselinových sekvencí vytvořen také fylogenetický strom (Obr. 13), ukazující příbuznost antiporterů z rodiny NHA, pomocí metody CLUSTAL W.



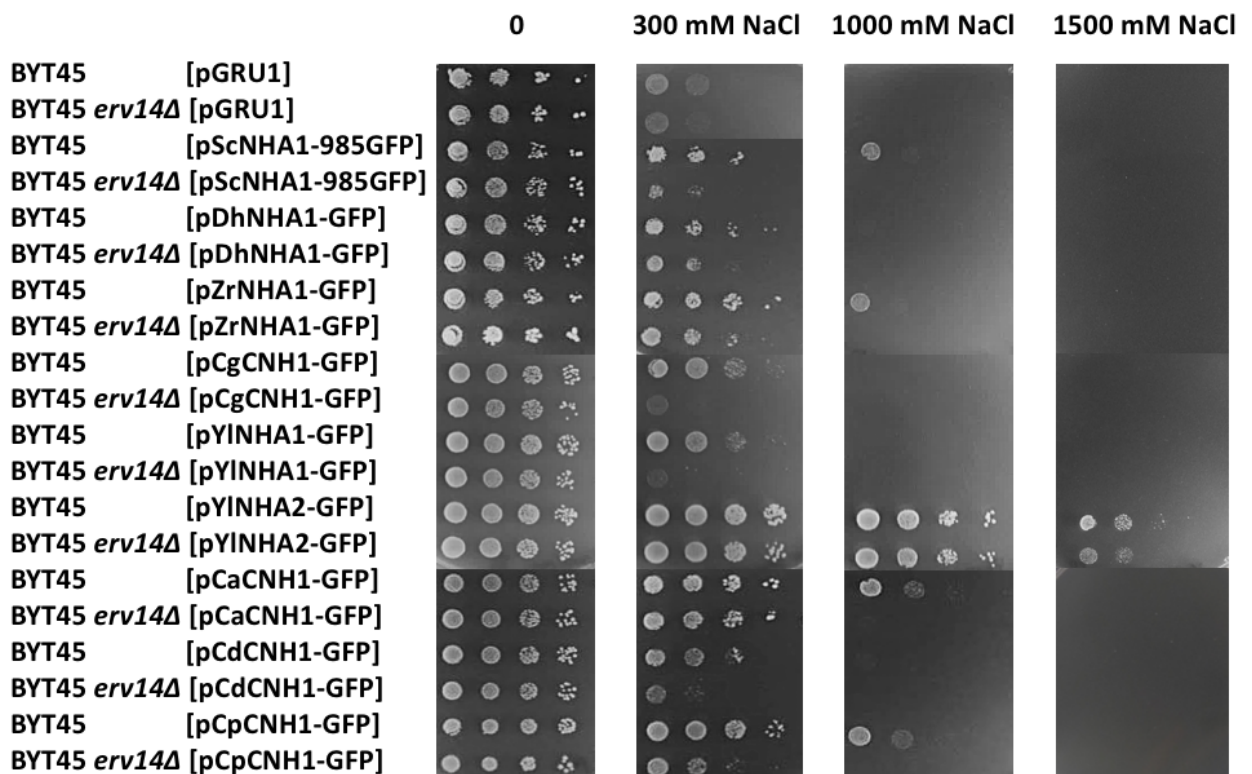
**Obr. 13: Fylogenetický strom antiporterů z rodiny NHA.**

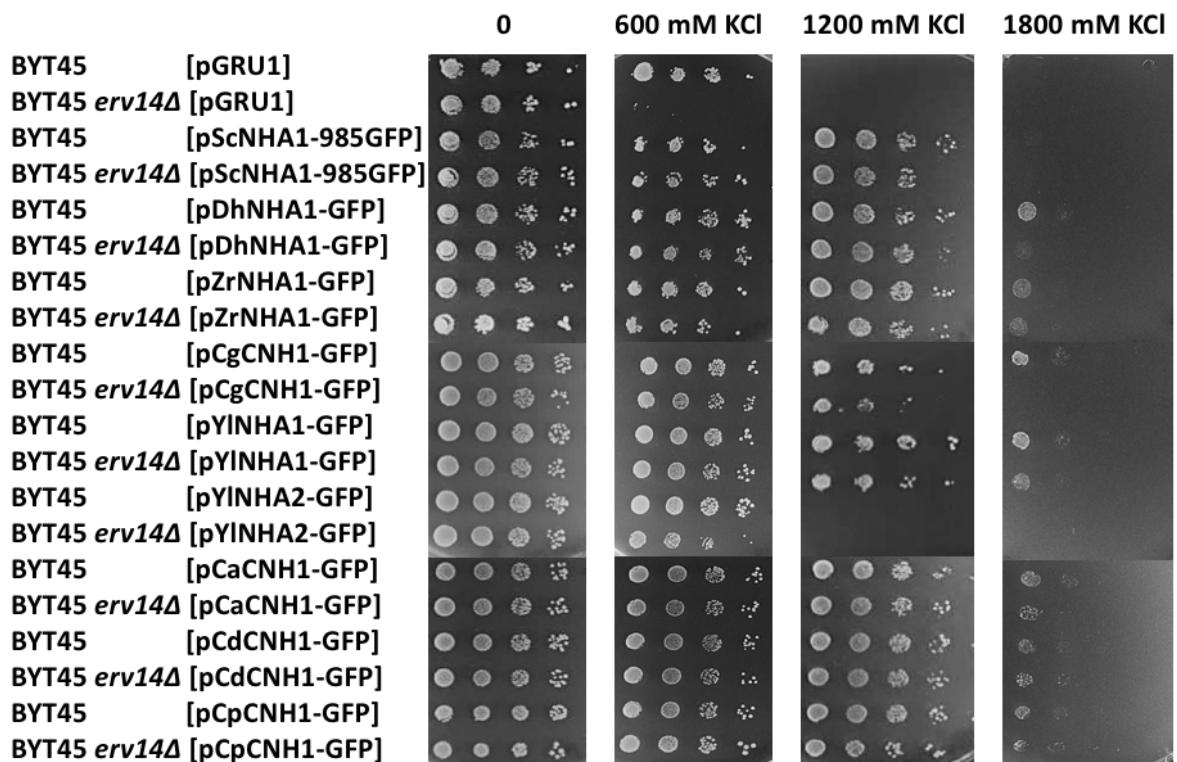
### 6.3.1 Vliv delece genu *ERV14* na funkci a lokalizaci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek v kmeni BYT45 a BYT45 *erv14Δ*

Pro první experimenty s heterologně exprimovanými antiportery NHA byly využity buňky kmene BYT45 a BYT45 *erv14Δ*, jelikož právě v tomto genetickém pozadí byl popsán vliv C-konce na lokalizaci antiporteru ScNha1 v buňkách *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015). Buňky kmene BYT45 a BYT45 *erv14Δ* byly transformovány plazmidy pGRU1 obsahujícími geny kódující antiportery z rodiny NHA z různých druhů kvasinek (Tab. 4). Následně jsme sledovali jejich funkci a díky značení GFP i jejich lokalizaci v těchto buňkách.

#### 6.3.1.1 Růst buněk BYT45 a BYT45 *erv14Δ* s heterologně exprimovanými antiportery NHA za přítomnosti solí

Pomocí kapkového testu jsme ověřili, že jsou transportéry v buňkách obou kmenů funkční.





**Obr. 14: Kapkový test ověřující funkčnost heterologně exprimovaných transportérů z rodiny NHA v buňkách kmene BYT45 a BYT45 *erv14Δ*.** Růst buněk na médiu YNB + HLM v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

Růst byl testován na médiích YNB + HLM s NaCl v rozmezí 300 mM - 1000 mM a také na médiích s KCl v rozmezí 800 mM - 1800 mM. Buňky kmene BYT45 postrádají vlastní transportéry kationtů alkalických kovů, ATPázy Ena a antiporter Nha1, díky čemuž jsou extrémně senzitivní vůči solím v prostředí a rostly na maximálních testovaných koncentracích 300 mM NaCl a 600 mM KCl. Jak je z uvedených fotografií patrné (Obr. 14), všechny transportéry byly v buňkách BYT45 i BYT45 *erv14Δ* funkční a zvyšovaly toleranci buněk vůči solím v porovnání s buňkami s prázdným vektorem.

Ve shodě s dosud publikovanými výsledky (Papouskova and Sychrova, 2006; Papouskova and Sychrova, 2007a) umožňoval protein *Y/Nha1* buňkám růst zejména na médiích s vysokými koncentracemi KCl, zatímco buňky produkující transportér *YINha2* v přítomnosti vysokých koncentrací KCl nerostly. *YINha2* ale výrazně zvýšil toleranci buněk k přítomnosti sodných kationtů. Ostatní testované transportéry patří do skupiny transportérů NHA, které rozpoznávají jak sodné, tak i draselné kationty (Kinclova et al., 2001a,b; Velkova and Sychrova, 2006; Papouskova and Sychrova, 2007a). Všechny udělovaly buňkám schopnost

růst na médiu v přítomnosti vysokých koncentrací KCl, přičemž zlepšovaly i růst v přítomnosti NaCl, ale ne tak výrazně, jako *YNha2*, jehož hlavním substrátem jsou ionty sodné. Transportéry *CgCnh1* a *YNha1* však nezvyšovaly toleranci buněk *erv14Δ* vůči sodným kationtům vůbec a jejich růst byl srovnatelný s růstem buněk *BYT45 erv14Δ* s prázdným vektorem.

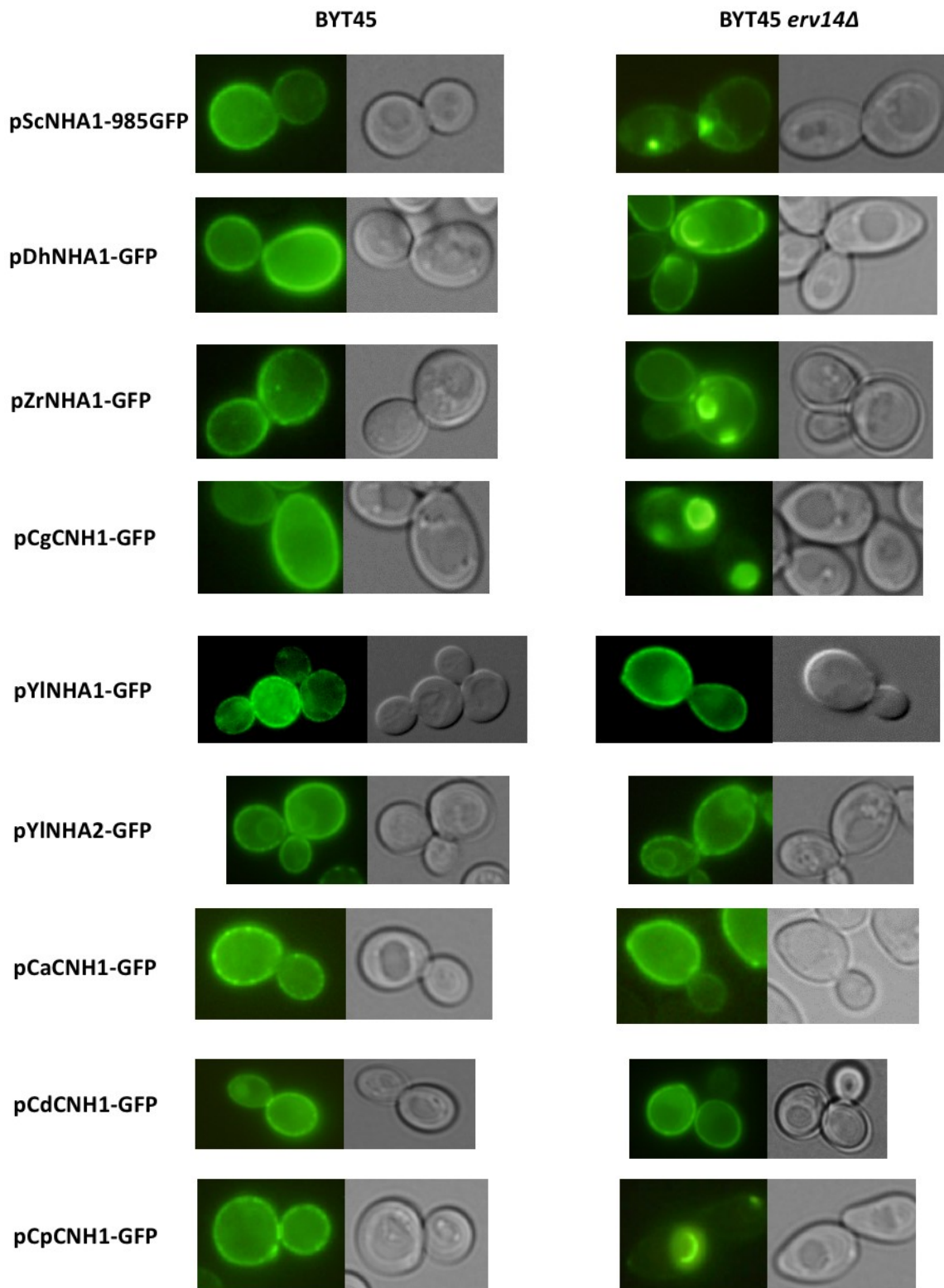
V případě produkce všech studovaných antiporterů jsme pozorovali nižší toleranci k solím buněk *erv14Δ* než buněk nesoucích gen *ERV14*. Tento fenotyp může být dán zadržováním antiporteru uvnitř buněk, může ale také souviset s nižší tolerancí samotného kmene *BYT45 erv14Δ*, jelikož je pozorovatelný i u buněk transformovaných prázdným vektorem (Rosas-Santiago et al., 2015).

### **6.3.1.2 Lokalizace heterologně exprimovaných proteinů z rodiny NHA v buňkách *BYT45* a *BYT45 erv14Δ***

Po ověření funkčnosti heterologně exprimovaných homologů *Nha1* v kmenech *BYT45* a *BYT45 erv14Δ S. cerevisiae* byla zjišťována jejich lokalizace v rámci buňky. Jak již bylo řečeno, proteiny byly značeny pomocí GFP, a tak jsme jejich lokalizaci mohli vizualizovat pomocí fluorescenční mikroskopie.

Ve shodě s dosud publikovanými výsledky byly všechny testované transportéry lokalizované v kmeni *BYT45* v plazmatické membráně, ale jejich lokalizace v kmeni *BYT45 erv14Δ* se lišila. Jak je na snímcích vidět (Obr. 15), proteiny *YNha1*, *YNha2*, *CaCnh1* a *CdCnh1* byly správně umístěny v plazmatické membráně, jejich lokalizace se nijak nelišila v buňkách *BYT45* a *BYT45 erv14Δ* a nezdálo se, že by nepřítomnost proteinu *Erv14* jejich transport do membrány ovlivnila. Ačkoliv se protein *YNha2* dostával v buňkách *BYT45* i *BYT45 erv14Δ* do plazmatické membrány a jeho lokalizace byla v obou kmenech shodná, byl také pozorovatelný fluorescenční signál uvnitř buňky, v perinukleárním ER, což je pravděpodobně známkou nadprodukce tohoto proteinu. Proteiny *ScNha1*, *DhNha1*, *ZrNha1*, *CgCnh1* a *CpCnh1*, ačkoliv se v přítomnosti *Erv14* dostávaly správně do plazmatické membrány, byly nepřítomností cargo receptoru ovlivněny a v buňkách *BYT45 erv14Δ* bylo možné pozorovat jejich částečné zadržování uvnitř buňky, pravděpodobně v ER. Zajímavé je, že všechny proteiny, u kterých bylo patrné částečné zadržování uvnitř buňky v nepřítomnosti *Erv14*, mají společné to, že jejich C-konce jsou delší než 500 AA (Tab. 4). Zdá se tedy, že požadavek na přítomnost *Erv14* pro průchod antiporterů sekreční dráhou by opravdu mohl

souviset s délkou jejich C-konce. Zároveň se nezdá, že by požadavek na *Erv14* souvisel s příbuzností studovaných antiporterů (Obr. 13).



Obr. 15: Lokalizace heterologně exprimovaných transportérů z rodiny NHA v buňkách BYT45 a BYT45 *erv14*Δ.

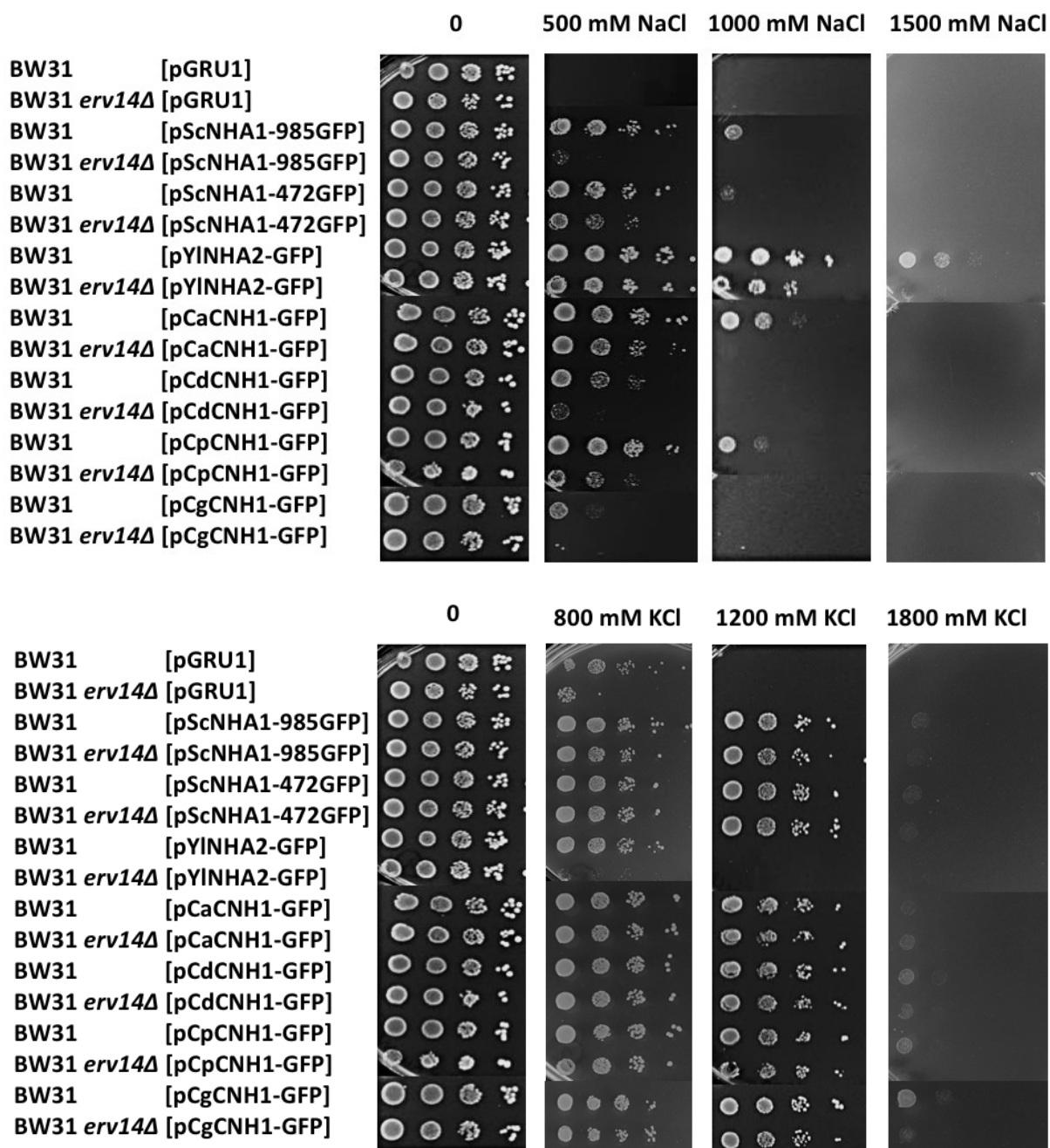
### **6.3.2 Vliv delece genu *ERV14* na funkci a lokalizaci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek v kmeni BW31 a BW31 *erv14Δ***

Experimenty popsané v kap. 6.3.1 byly prováděny s kmeny BYT45 a BYT45 *erv14Δ* odvozenými od BY4741, protože všechny dosud publikované výsledky o vlivu delece *ERV14* byly získány právě v tomto genetickém pozadí. Vzhledem k nutnosti doplnit tekuté médium YNB o bohatou směs aminokyselin a inositol (Hanscho et al., 2012) pro dosažení optimálního růstu kmenů odvozených od BY4741, rozhodli jsme se k dalším experimentům využít kmeny BW31 a BW31 *erv14Δ*, jejichž příprava byla popsána v kap. 6.1.

Nejprve jsme chtěli ověřit, zda budeme v těchto kmenech pozorovat stejný vliv přítomnosti/nepřítomnosti cargo receptoru *Erv14* na funkci a lokalizaci heterologně exprimovaných antiporterů z rodiny NHA, jako jsme pozorovali v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ*. K ověřování funkce a lokalizace proteinů v kmenech BW31 a BW31 *erv14Δ* jsme kromě proteinu *ScNha1* vybrali antiporter *YNha2*, jelikož má ze všech v této práci testovaných antiporterů nejkratší C-konec a jeho lokalizace se nezdá být absencí proteinu *Erv14* ovlivněna, antiporter *CgCnh1*, který je nejbližší příbuzný s *ScNha1* a v buňkách *erv14Δ* je částečně zadržován uvnitř buněk, a také transportéry *CaCnh1*, *CdCnh1* a *CpCnh1*, které, ačkoliv jsou vzájemně příbuzné, se liší svým požadavkem na *Erv14* pro průchod sekreční dráhou. Zjišťovali jsme také, jaký vliv má v kmeni BW31 protein *Erv14* na funkci a lokalizaci *ScNha1* zkráceného o C-konec, abychom ověřili výsledky získané v kmeni BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015).

#### **6.3.2.1 Růst buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* s heterologně exprimovanými antiportery NHA za přítomnosti solí**

Kmeny BW31 a BW31 *erv14Δ* byly transformovány plazmidy pGRU1 nesoucími geny kódující antiportery z rodiny NHA druhů *Y. lipolytica* (*YNha2*), *C. albicans* (*CaCnh1*), *C. dubliniensis* (*CdCnh1*), *C. glabrata* (*CgCnh1*), *C. parapsilosis* (*CpCnh1*) a také plazmidem pGRU1 s genem *NHA1* *S. cerevisiae*, kódujícím celý antiporter *ScNha1* anebo jeho zkrácenou verzi bez C-konce (*ScNha1-472*). Abychom ověřili funkčnost transportérů v buňkách, byl udělán kapkový test, při kterém byly buňky vystaveny různě vysokým koncentracím solí přidaným do média YNB + AHLW a po dobu jednoho týdne byl sledován jejich růst.



**Obr. 16: Kapkový test ověřující funkčnost transportérů z rodiny NHA v kvasinkách BW31 a BW31 *erv14Δ*.** Růst buněk na médiu YNB + AHLW v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

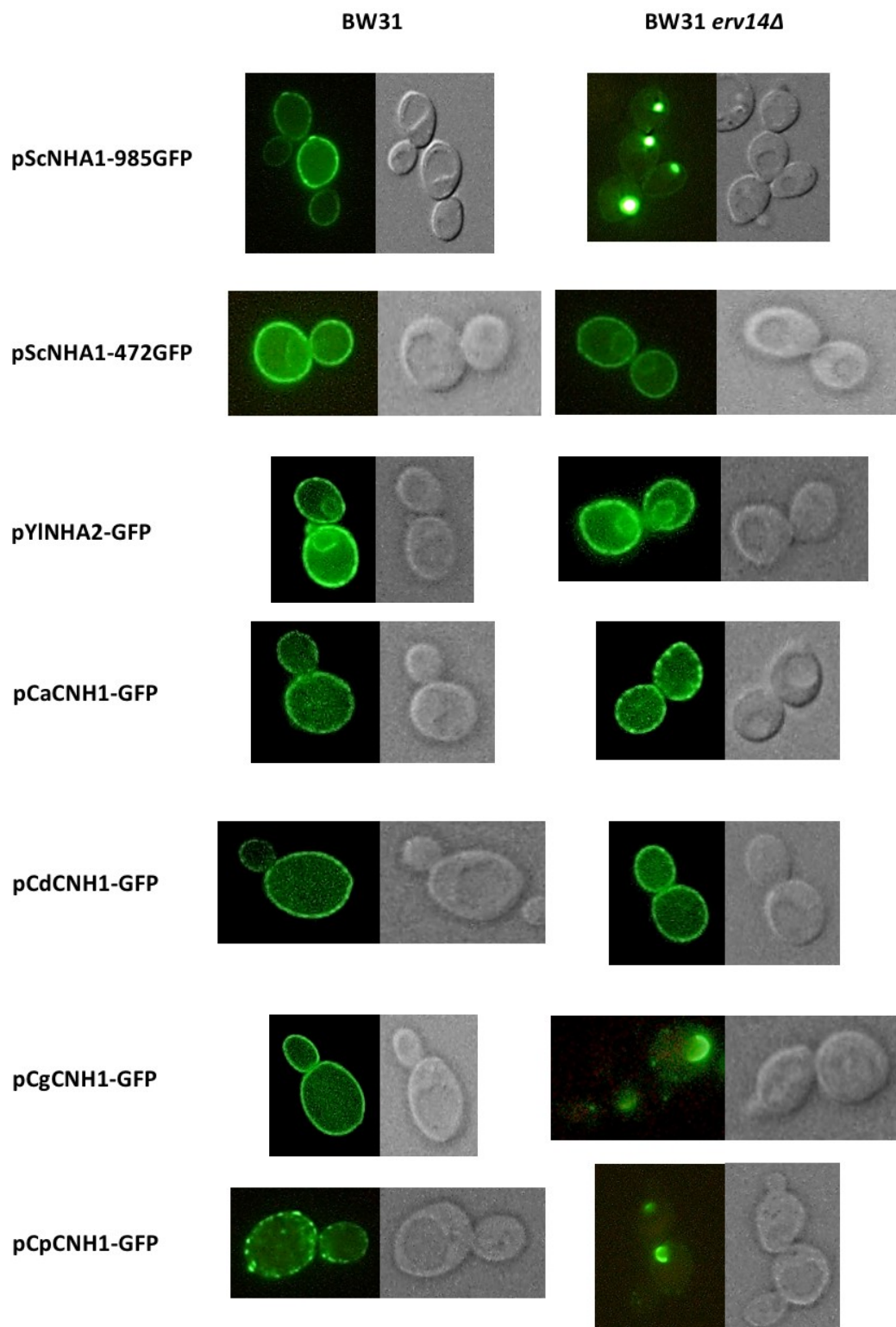
Buňky kmene BW31 transformované pouze prázdným vektorem velmi špatně rostly v přítomnosti solí, jelikož mají z genomu odstraněny geny kódující ATPázy Ena a antiporter Nha1 a nemají tak systém, kterým by se mohly kationtů alkalických kovů zbavovat. Všechny buňky produkující transportéry byly více odolné vůči solím v médiu oproti buňkám s prázdným vektorem (Obr. 16), čímž jsme potvrdili, že jsou transportéry v buňkách funkční.

Schopnost růst v přítomnosti solí byla u buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* produkujících jednotlivé transportéry obdobná jako tolerance buněk BYT45 a BYT45 *erv14Δ* produkujících tytéž antiporterů (Obr. 14). Zároveň jsme mohli pozorovat, že buňky *erv14Δ* transformované prázdným vektorem rostou hůře v přítomnosti solí než buňky s prázdným vektorem, které *ERV14* mají (možné vidět na obr. 16 na médiu s 800 mM KCl), což odpovídá výsledkům získaným pomocí kapkového testu s netransformovanými kmeny BW31 a BW31 *erv14Δ* (Obr. 12). Podobně jako v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ* jsme také mohli vidět za přítomnosti solí zhoršený růst buněk BW31 *erv14Δ* nesoucích transportéry, oproti buňkám s *ERV14*.

### **6.3.2.2 Lokalizace heterologně exprimovaných proteinů z rodiny NHA v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ***

Dále jsme zjišťovali, jestli i lokalizace transportérů v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ* bude shodná s pozorováními v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ*. Transportéry značené GFP byly vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Lokalizace proteinů *YNha2*, *CaCnh1* a *CdCnh1* se nelišila v buňkách, které mají *Erv14* a v těch, které *Erv14* postrádají, a v obou případech byly shodně lokalizovány v plazmatické membráně (Obr. 17). Stejně jako v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ*, i v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ* jsme mohli vidět, že i přes to, že se protein *YNha2* dostává nezávisle na přítomnosti *Erv14* do plazmatické membrány, tak je ale také nezávisle na přítomnosti proteinu *Erv14* zčásti lokalizován uvnitř buněk, pravděpodobně v perinukleárním ER, což si vysvětlujeme nadprodukcí tohoto proteinu. Na druhou stranu transportéry *CgCnh1*, *CpCnh1* a *ScNha1* byly v nepřítomnosti proteinu *Erv14* zčásti zadržovány uvnitř buňky a nedostávaly se tak efektivně do plazmatické membrány, jako v přítomnosti *ERV14*. Stejně jako v kmeni BYT45 *erv14Δ* byly i v buňkách BW31 *erv14Δ* zadržovány stejné transportéry, s C-koncem delším než 500 AK (Tab. 4), což naznačilo, že i v tomto kmeni požadavek na *Erv14* pro průchod sekreční dráhou souvisí s délkou C-konce antiporterů. Ačkoliv se protein *ScNha1* se svým dlouhým C-koncem nebyl schopen v nepřítomnosti proteinu *Erv14* efektivně dostat do plazmatické membrány, *Nha1* zkrácený o tento C-konec (*ScNha1-472*) se do membrány v buňkách *erv14Δ* dostával a jeho lokalizace se nelišila oproti lokalizaci v buňkách s *Erv14*, přičemž tyto výsledky se shodují s výsledky dosud publikovanými v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015). Všechny výsledky získané v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ* tak byly potvrzeny i v kmenech BW31 a BW31 *erv14Δ*, díky čemuž jsme mohli při dalších experimentech

týkajících se studia vlivu délky C-konce ScNha1 na jeho lokalizaci, funkci a aktivitu v buňkách *erv14Δ* pracovat pouze s kmeny BW31 a BW31 *erv14Δ*.



Obr. 17: Lokalizace heterologně exprimovaných antiporterů z rodiny NHA v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ*.

#### 6.4 Studium vlivu C-konce proteinu ScNha1 na jeho lokalizaci, funkci a aktivitu v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ*

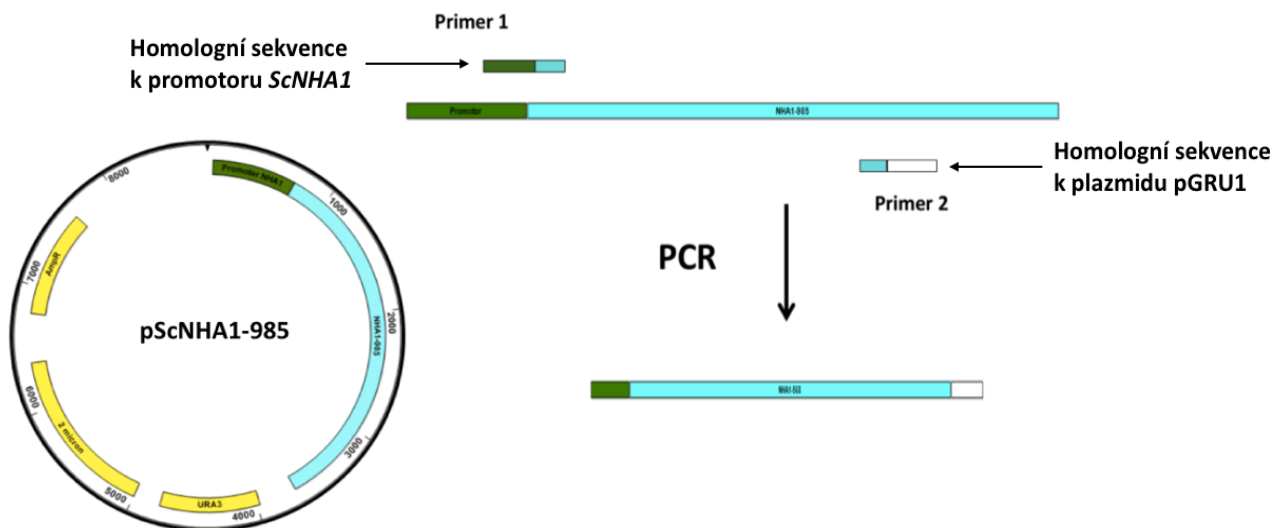
Jelikož dosud získané výsledky ukazovaly na to, že by požadavek proteinu ScNha1 na cargo receptor Erv14 pro správný průchod sekreční dráhou mohl souviset s délkou C-konce antiporteru, rozhodli jsme se vytvořit plazmidy odvozené od pGRU1 nesoucí sekvence kódující tři zkrácené verze proteinu ScNha1 o celkové délce 928 AK, 680 AK, 568 AK a sledovat, jak bude ovlivněna jejich lokalizace, funkce a aktivita absencí proteinu Erv14. Tyto konkrétní verze byly zvoleny proto, že byly již dříve využity při studiu vlivu C-konce antiporteru ScNha1 na jeho transportní funkci a plazmidy YEp352 nesoucí geny kódující tyto proteiny byly u nás v laboratoři k dispozici (Kinclova et al., 2001c). Protein o délce 928 AK, postrádající autoinhibiční doménu na C-konci, umožňuje buňkám tolerovat vyšší koncentrace sodných a lithných kationtů, než tolerují buňky nesoucí plnou verzi proteinu, a tak jsme chtěli zjistit, jestli právě tato doména hraje roli v požadavku Nha1 na přítomnost Erv14 pro transport z ER. Dále jsme chtěli studovat, zda nepřítomnost cargo receptoru Erv14 ovlivní funkci, lokalizaci a aktivitu zkrácených verzí transportéru Nha1, jejichž C-konec je přibližně o 100 AK (ScNha1-568) anebo 200 AK (ScNha1-680) delší, než C-konec proteinu ScNha1-472 (Tab. 5).

**Tab. 5: Délka C-koncové části proteinu ScNha1 a studovaných zkrácených verzí proteinu.** Tučně vyznačené jsou verze proteinu ScNha1, jejichž kódující sekvence byly vkládány do plazmidu pGRU1 v rámci této práce.

<b>Celková délka proteinu (AK)</b>	<b>Délka C – konce (AK)</b>
985	554
<b>928</b>	<b>497</b>
<b>680</b>	<b>249</b>
<b>568</b>	<b>137</b>
472	41

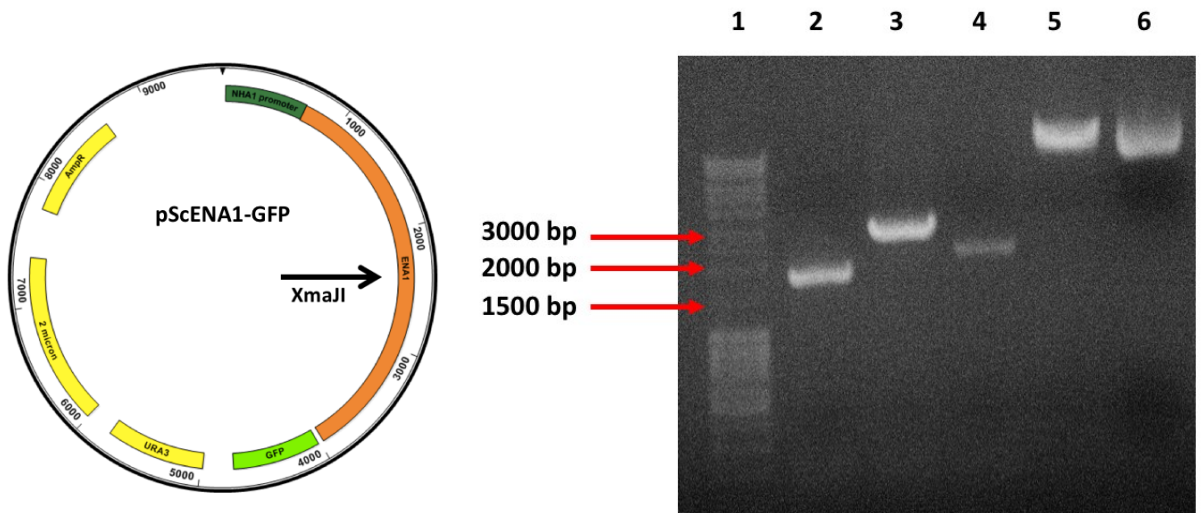
### 6.4.1 Tvorba plazmidů pGRU1 nesoucích zkrácené verze *ScNHA1* pomocí kvasinkové homologní rekombinace

Nejprve bylo potřeba vytvořit plazmidy pGRU1 nesoucí geny kódující zkrácené verze antiporteru Nha1 o délce 928 AK, 680 AK a 568 AK, značené pomocí GFP, aby bylo možné sledovat jejich lokalizaci v buňkách. Zkrácené verze genu *NHA1* byly pomnoženy pomocí PCR s využitím předem navržených primerů PNHA1fw + PNHA1-928r, PNHA1fw + PNHA1-680r nebo PNHA1fw + PNHA1-568r (Kap. 4.2), prodloužených o homologní sekvence k části promotoru *ScNHA1* a sekvenci plazmidu pGRU1 (Obr. 18). Jako templátová DNA sloužil plazmid pScNHA1-985 a pro PCR jsme využili polymerázu Phusion High – Fidelity DNA Polymerase s korekční aktivitou. Po proběhnutí PCR byla analyzována velikost vzniklých fragmentů pomocí elektroforézy (Obr. 19) a před využitím pomnožených fragmentů k homologní rekombinaci byla DNA po PCR precipitována.



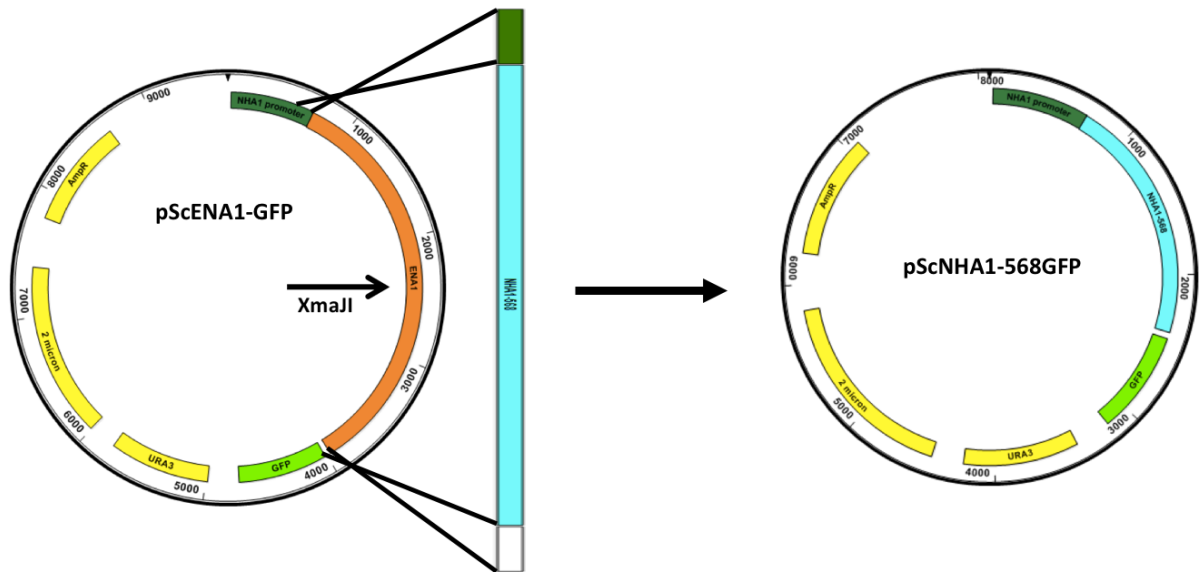
Obr. 18: Schéma plazmidu pScNHA1-985 s genem *NHA1* sloužícím jako templátová DNA při PCR a primery s vyznačenými místy jejich nasedání.

DNA kódující zkrácené verze proteinu ScNha1 byla do plazmidu pGRU1 vkládána homologní rekombinací, při níž byly tyto fragmenty DNA vyměněny za gen *ENA1* v plazmidu pScENA1-GFP (Obr. 20). Plazmid pScENA1-GFP byl před transformací kvasinek naštěpen enzymem XmaJI uvnitř genu *ENA1*. Úspěšnost štěpení enzymem byla ověřena pomocí elektroforézy (Obr. 19).



**Obr. 19: Schéma naštěpeného plazmidu pScENA1-GFP, do kterého byl pomocí homologní rekombinace v kvasinkách vkládán PCR konstrukt (vlevo) a fotografie gelové elektroforézy ověřující velikost fragmentů a naštěpení plazmidu (vpravo).** Na gelové elektroforéze je pod číslem 1 vidět velikostní DNA marker MassRuler™ DNA Ladder Mix. Pod číslem 2 je vidět fragment vzniklý za využití primerů PNHA1fw + PNHA-568r o velikosti 1704 bp, číslo 3 odpovídá fragmentu vzniklému pomocí primerů PNHA1fw + PNHA1-928r o velikosti 2784 bp a číslo 4 fragmentu s očekávanou velikostí 2040 bp, vzniklého pomocí primerů PNHA1fw + PNHA1-680r. Fragment pod číslem 5 odpovídá plazmidu pGRU1 nesoucímu gen *ENA1* po naštěpení a v dráze číslo 6 je plazmid pScENA1-GFP před naštěpením.

Buňky kmene BW31 byly transformovány 0,15  $\mu\text{g}$  pomnoženého fragmentu DNA a 0,05  $\mu\text{g}$  plazmidu pScENA1-GFP štěpeného enzymem XmaI podle protokolu uvedeného v kapitole 5.5. Následně byly kvasinky vysévány na selekční médium YNB + AHLW a po dvou dnech byly na miskách detekovatelné kolonie, u kterých homologní rekombinace proběhla úspěšně (Obr. 20). Z těchto kolonií byl plazmid vyizolován, vložen do bakterií k pomnožení a z nich opět vyizolován.



**Obr. 20: Schéma vzniku požadovaného plazmidu pomocí kvasinkové homologní rekombinace.**

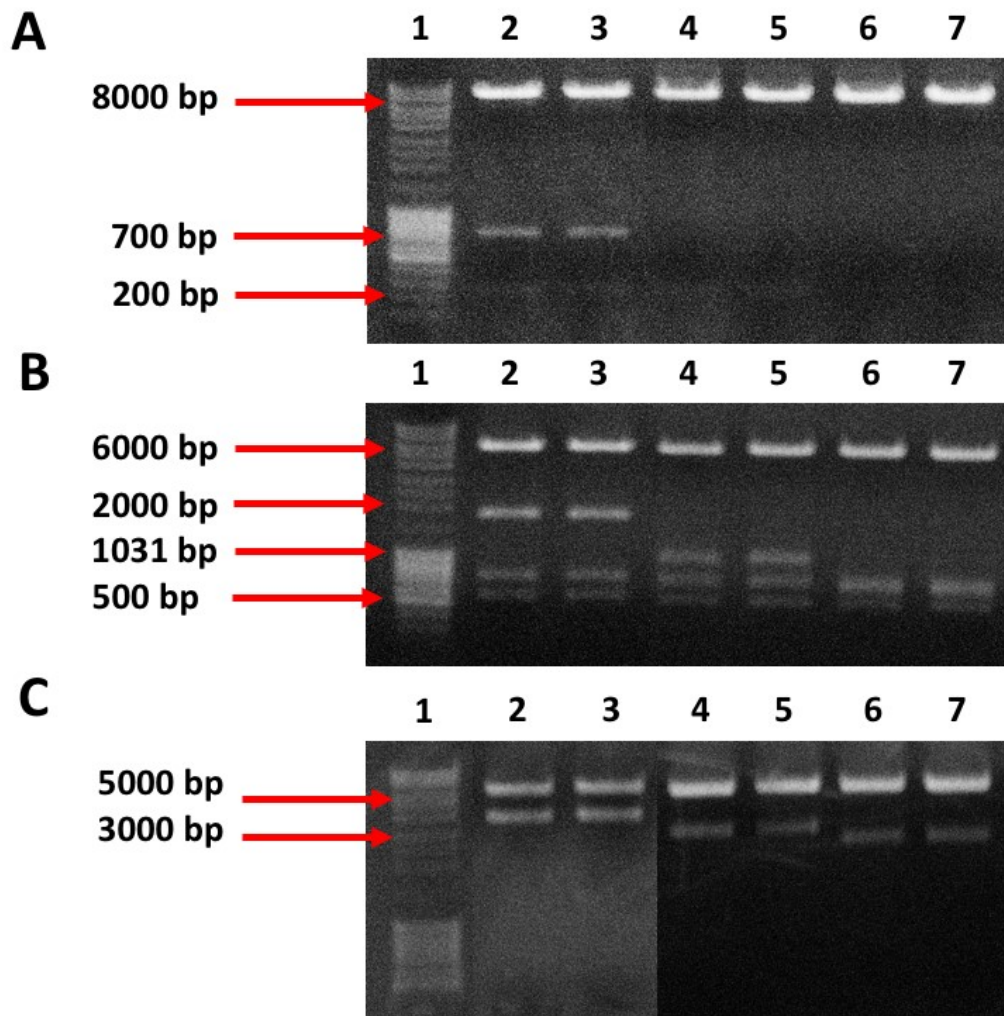
Vytvořili jsme tyto plazmidy:

**pScNHA1-928GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 928-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori*

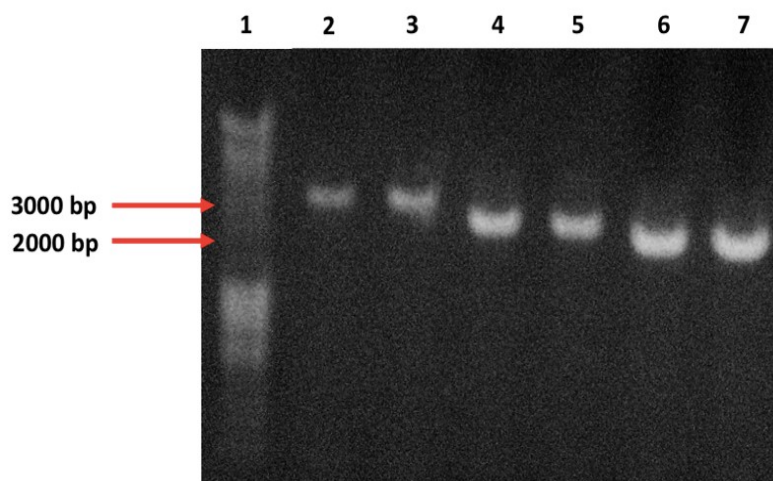
**pScNHA1-680GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 680-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori*

**pScNHA1-568GFP** - *ScURA3*, *NHA1<sup>P</sup>-ScNHA1 568-GFP*, 2 $\mu$ , *Amp<sup>R</sup>*, *ori*

Plazmidy pScNHA1-928GFP, pScNHA1-680GFP a pScNHA1-568GFP, vyizolované z bakterií, byly dále ověřovány restrikním štěpením pomocí tří různých enzymů (Obr. 21) a také pomocí PCR (Obr. 22) s využitím primerů PNHA1-1 + RGFP1, nasedajících do oblasti promotoru *NHA1* a do oblasti genu kódujícího GFP (Kap. 4.2).



**Obr. 21: Ověřování správnosti nově vytvořených plazmidů restrikním štěpením a gelovou elektroforézou.** Velikostní DNA marker pod číslem 1 je MassRuler™ DNA Ladder Mix. Vzorky pod čísly 2 a 3 jsou fragmenty vzniklé štěpením plazmidu pScNHA1-928GFP pomocí enzymů BglIII (A) (velikost fragmentů 8189, 734, 228), PstI (B) (velikost fragmentů 6113, 1766, 750, 522) a XbaI (C) (velikost fragmentů 5694, 3457). Pod čísly 4 a 5 jsou fragmenty vzniklé štěpením plazmidu pScNHA1-680GFP pomocí stejných enzymů s velikostí fragmentů 8179 a 228 (A), 6113, 1022, 750 a 522 (B), 5694 a 2713 (C) a pod čísly 6 a 7 jsou fragmenty vzniklé štěpením plazmidu pScNHA1-568GFP pomocí shodných enzymů s velikostí fragmentů 8071 (A), 6113, 750, 686 a 522 (B), 5694 a 2377 (C).

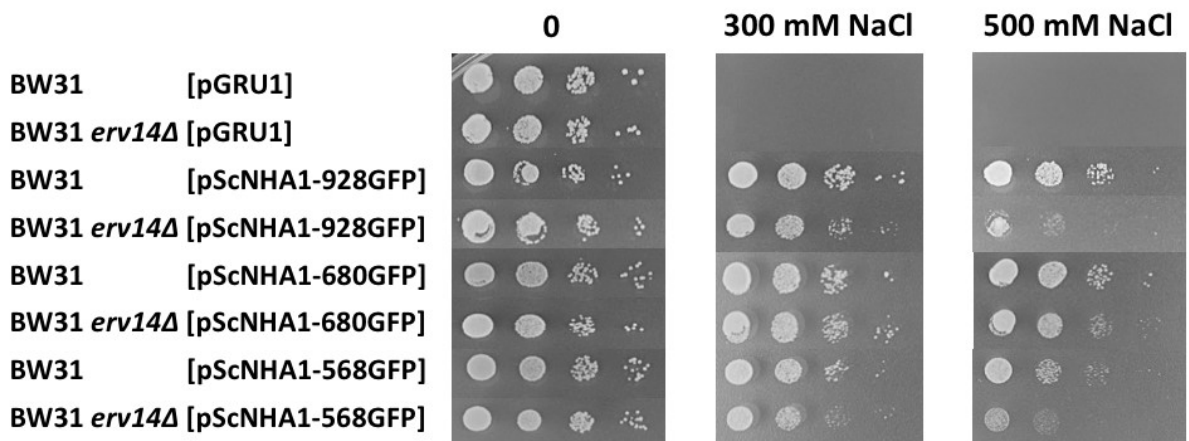


**Obr. 22: Ověřování správnosti nově vytvořených plazmidů pomocí PCR a následné gelové elektroforézy.** Velikostní DNA marker pod číslem 1 je MassRuler™ DNA Ladder Mix. Pod čísly 2 a 3 jsou amplifikované fragmenty genu *NHA1* neseného plazmidem pScNHA1-928GFP, vzniklé využitím primerů PNHA1-1 + RGFP1, s očekávanou velikostí 3200 bp. Čísly 4 a 5 jsou označeny fragmenty genu *NHA1* neseného plazmidem pScNHA1-680GFP, vzniklé využitím stejných primerů, s očekávanou velikostí 2580 bp a pod čísly 6 a 7 vidíme fragmenty genu *NHA1* z plazmidu pScNHA1-568GFP o velikosti 2200 bp.

Správná sekvence získaných plazmidů byla ověřena sekvenací firmou GATC Biotech.

#### 6.4.2 Růst buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* transformovaných plazmidy pGRU1 nesoucími zkrácené verze *ScNHA1*

Plazmidy, které byly ověřeny i sekvenací, byly vnášeny do buněk kmene BW31 a BW31 *erv14Δ*, se kterými byl proveden kapkový test na médiu YNB + AHLW s 300 mM a 500 mM NaCl k otestování funkčnosti transportérů.

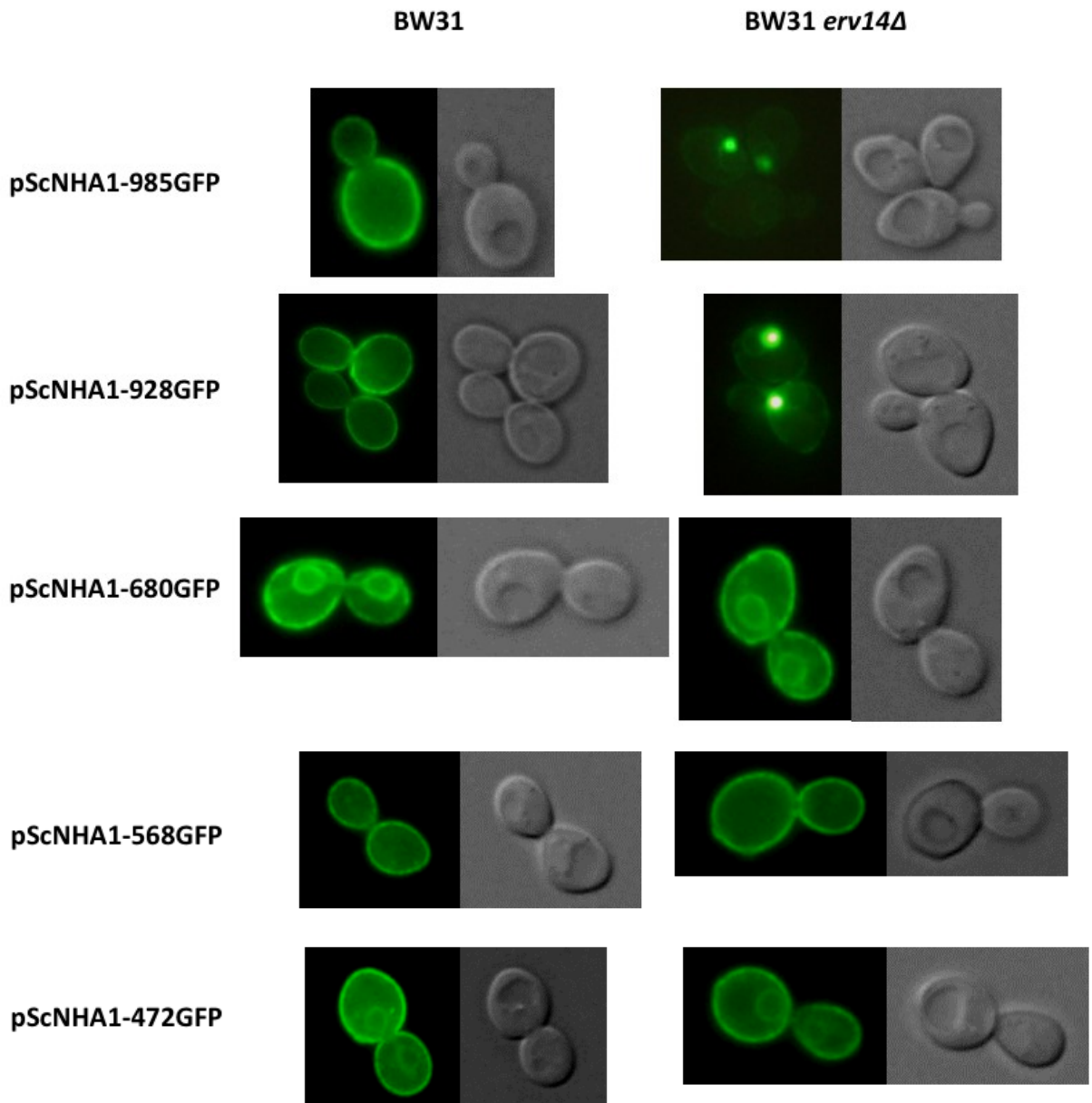


**Obr. 23: Ověření funkčnosti nově vytvořených plazmidů pGRU1 nesoucích zkrácené verze *ScNHA1* v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ*.** Růst buněk na médiu YNB + AHLW v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

Plazmidy pScNHA1-928GFP, pScNHA1-680GFP a pScNHA1-568GFP udělovaly buňkám BW31 a BW31 *erv14Δ* postrádajícím vlastní antiporter Nha1 a ATPázy Ena schopnost růst na médiu v přítomnosti solí, kde buňky s prázdným vektorem nebyly schopné růst, čímž byla potvrzena funkčnost transportérů. Stejně jako při kapkovém testu s netransformovanými buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ* (Obr. 12) a kapkovém testu s buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ* nesoucími antiportery NHA z různých druhů kvasinek (Obr. 16), i zde (Obr. 23) bylo možné za přítomnosti NaCl vidět zhoršený růst buněk *erv14Δ* oproti buňkám obsahujícím *ERV14*.

### 6.4.3 Lokalizace zkrácených verzí transportéru ScNha1, v přítomnosti a nepřítomnosti *ERV14*

Díky nově vytvořeným konstruktům (Kap. 6.4.1) jsme mohli v buňkách BW31 a BW31 *erv14*Δ pozorovat lokalizaci různě dlouhých verzí proteinu ScNha1 pomocí fluorescenční mikroskopie.

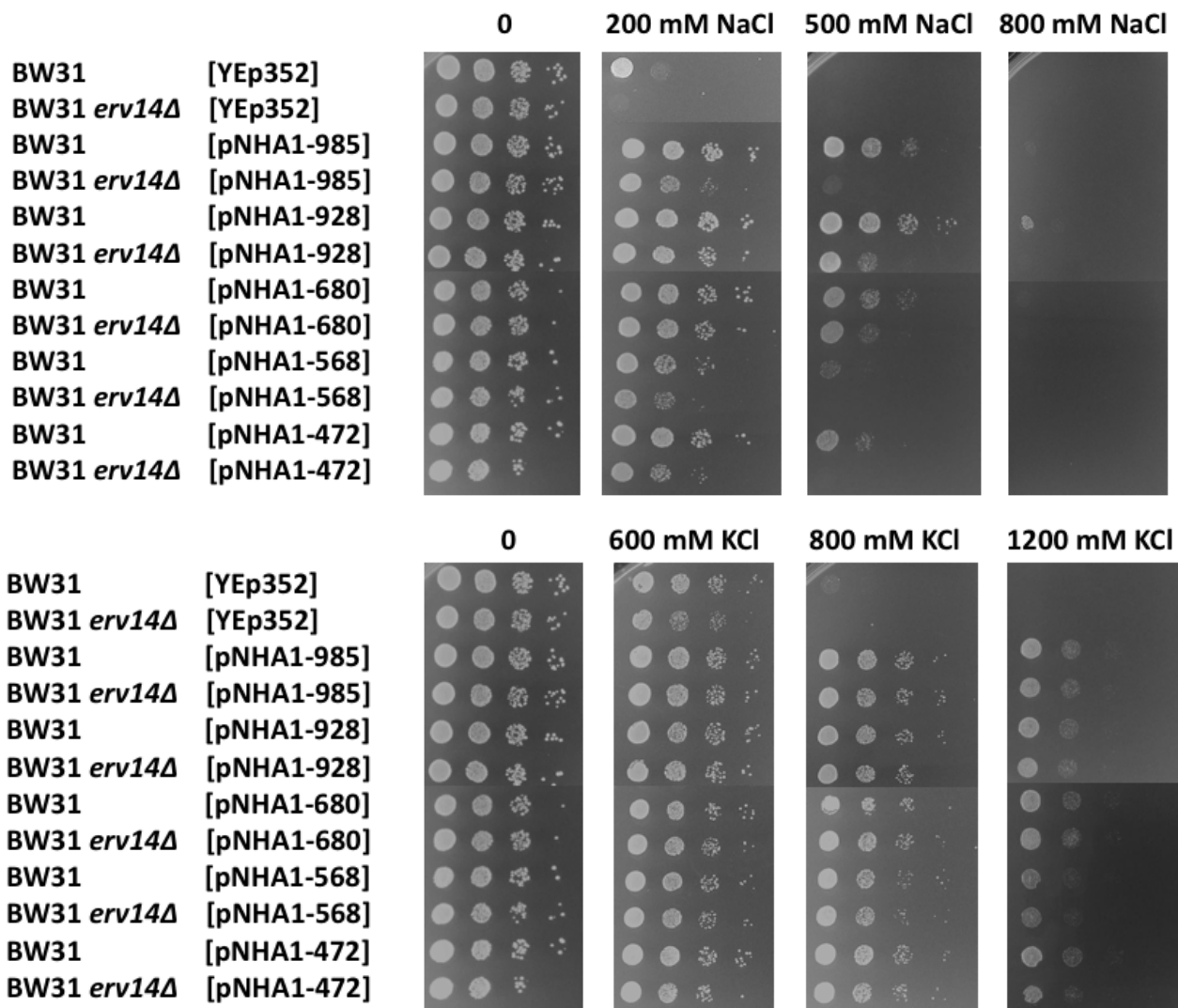


Obr. 24: Lokalizace zkrácených verzí proteinu ScNha1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14*Δ.

Všechny testované verze proteinu ScNha1 byly v buňkách BW31 lokalizovány v plazmatické membráně. V buňkách BW31 produkujících protein o délce 680 AK a 472 AK byl patrný signál GFP i v perinukleárním ER, který by mohl být dán vyšší produkcí těchto verzí v buňkách. Fluorescence pozorovaná v buňkách BW31 *erv14Δ* obsahujících plazmidy pScNHA1-680GFP, pScNHA1-568GFP a pScNHA-472GFP byla intenzitou srovnatelná a stejně lokalizovaná, jako v buňkách, které *ERV14* mají, a proto se nezdá, že by byla lokalizace zkrácených verzí ScNha1 o délce 680 AK, 568 AK a 472 AK ovlivněna nepřítomností proteinu Erv14. Fluorescence verze ScNha1-568 byla nezávisle na přítomnosti proteinu Erv14 méně intenzivní, než bylo možné pozorovat u buněk s verzemi ScNha1 o celkové délce 680 AK či 472 AK. Ačkoliv se proteiny ScNha1 s třemi nejkratšími verzemi C-konce nezdají být ovlivněny nepřítomností proteinu Erv14, byly pro protein o původní délce a protein zkrácený na C-konci o 57 AK získány jiné výsledky. Jak ScNha1-985, tak i ScNha1-928 byly lokalizovány v přítomnosti proteinu Erv14 správně v plazmatické membráně. V nepřítomnosti proteinu Erv14 bylo pozorováno jejich výrazné zadržování uvnitř buňky a také mnohem nižší intenzita fluorescence v plazmatické membráně, což ukazuje na to, že tyto proteiny nejsou schopny bez cargo receptoru Erv14 procházet efektivně sekreční dráhou.

#### **6.4.4 Studium funkce zkrácených verzí transportéru ScNha1 v přítomnosti a nepřítomnosti *ERV14* pomocí kapkového testu**

K podrobnějšímu testování funkce zkrácených verzí transportéru ScNha1 v přítomnosti a nepřítomnosti *ERV14* pomocí kapkového testu byly využity buňky BW31 a BW31 *erv14Δ*, transformované plazmidy YEp352, nesoucími geny kódující tyto proteiny. Tyto plazmidy byly u nás v laboratoři vytvořeny již dříve Ing. Olgou Zimmermannovou Ph.D. při studiu úlohy C-konce antiporteru Nha1 (Kinclova et al., 2001c) a v této práci byly využity proto, abychom mohli sledovat růst buněk s transportéry Nha1 s různou délkou C-konce, které nebudou nést navíc na C-konci připojený GFP, který C-konec prodlužuje, v přítomnosti a nepřítomnosti cargo receptoru Erv14. Růst buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* s plazmidy YEp352, pNHA1-985, pNHA1-928, pNHA1-680, pNHA1-568 a pNHA1-472 byl testován na médiích YNB + AHLW s přidavkem NaCl v rozmezí koncentrací 200 mM – 800 mM a s přidavkem KCl v rozmezí koncentrací 600 mM – 1500 mM po dobu jednoho týdne.



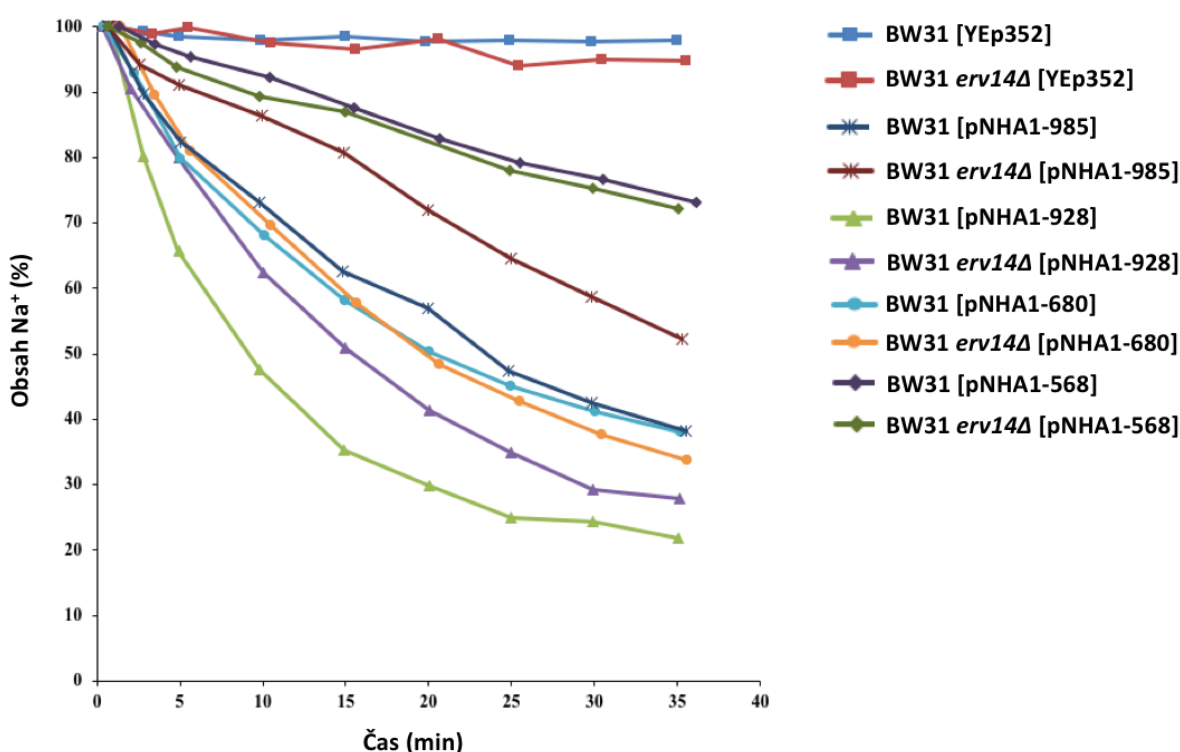
**Obr. 25: Testování funkce zkrácených verzí antiporteru ScNha1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ* pomocí kapkového testu.** Růst buněk na médiu YNB + AHLWU v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

Testované transportéry byly v buňkách funkční a zvyšovaly jejich toleranci vůči solím v porovnání s buňkami s prázdným vektorem (Obr. 25). Jak již bylo publikováno (Kinclova et al., 2001c), tak i zde na kapkovém testu můžeme vidět, že zkrácení C-konce proteinu Nha1 o 57 AK zvyšuje toleranci buněk vůči sodným kationtům, v porovnání s buňkami nesoucími plnou verzi antiporteru Nha1. Výraznější zkrácení C-konce naopak ale toleranci vůči sodným kationtům snižuje, což je také z obr. 25 patrné. Zde můžeme vidět, že nejhůře v přítomnosti NaCl rostly buňky, které produkovaly protein ScNha1-568, které rostly dokonce hůře, než buňky nesoucí nejkratší testovanou verzi proteinu Nha1, ScNha1-472. Tolerance buněk vůči

KCl ale není zkracováním proteinu téměř nijak ovlivněna, což se shoduje s publikovanými výsledky (Kinclova et al., 2001c). Růst buněk kmene BYT45 s plazmidy YEp352, pNHA1-985 a pNHA1-472 v přítomnosti a nepřítomnosti *ERV14* již byl testován dříve (Rosas-Santiago et al., 2015) a shoduje se s našimi výsledky získanými v kmenech BW31 a BW31 *erv14Δ*. Stejně jako v případě testování růstu buněk BYT45 a BYT45 *erv14Δ* či BW31 a BW31 *erv14Δ* produkujících antiportery rodiny NHA z různých druhů kvasinek, i zde můžeme vidět, že buňky postrádající *ERV14* rostou za přítomnosti solí hůře, než buňky, které *ERV14* mají, nezávisle na délce C-konce transportéru, který nesou. Nejvýrazněji je tento rozdíl vidět na růstu buněk nesoucích ScNha1 o celé délce a ScNha1-928, zkrácený o 57 AK, za přítomnosti NaCl. Tento fenotyp, ačkoliv je pozorovatelný i u buněk s prázdným vektorem (Kap. 6.3.2.1), může být zvýrazněn případným zadržováním transportéru uvnitř buňky.

#### 6.4.5 Měření výstupu sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ*, produkujících zkrácené verze ScNha1, pomocí AAS

Abychom porovnali, jak se liší transportní aktivita jednotlivých verzí proteinu ScNha1 v přítomnosti a nepřítomnosti cargo receptoru Erv14, a zjistili, zda zhoršený růst buněk *erv14Δ* na kapkovém testu v přítomnosti solí souvisí s nižší aktivitou transportérů, měřili jsme výstup sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* obsahující plazmidy pNHA1-985, pNHA1-928, pNHA1-680 a pNHA1-568 pomocí AAS.



Obr. 26: Export sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* nesoucích zkrácené verze ScNha1.

Buňky byly před začátkem experimentu inkubovány v médiu YNB + AHLW o pH 7 se 100 mM NaCl. Vzhledem k tomu, že ScNha1 je antiporter využívající k exportu sodných a draselných kationtů energii gradientu protonů (Kap. 2.1.3.2), nebyl v těchto podmínkách aktivní a mohlo tak dojít k nahromadění sodných kationtů v buňkách.

Na grafu (Obr. 26) je možné vidět výstup sodných kationtů z buněk během 40 minut měření. Hladina sodných kationtů v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ*, nesoucích prázdný vektor, se během měření nijak neměnila, protože tyto buňky nemají systém, kterým by se mohly sodných kationtů zbavovat. U všech buněk produkujících exportéry bylo možné

pozorovat úbytek sodných kationtů v čase, což odpovídá výsledku kapkového testu (Obr. 25), že jsou transportéry v buňkách funkční. Největší pokles obsahu sodných kationtů jsme pozorovali u buněk BW31 produkujících verzi ScNha1 o celkové délce 928 AK. Tyto buňky transportovaly ven rychleji a větší množství sodných kationtů, než buňky nesoucí nezkrácenou verzi ScNha1, což je v souladu s publikovanými výsledky experimentů (Kinclova et al., 2001c), které ukázaly vyšší odolnost těchto buněk vůči sodným kationtům při kapkovém testu, než buňky s plnou verzí antiporteru. Buňky produkující verzi ScNha1 o celkové délce 680 AK vykazovaly podobně aktivní transport, jako buňky BW31 nesoucí protein ScNha1 o celé délce. Buňky s proteinem ScNha1-568 vyexportovaly během měření pouze necelých 30 % obsahu sodných kationtů. Tato nízká aktivita odpovídá i relativně nízké intenzitě fluorescence proteinu pozorované fluorescenčním mikroskopem, která ukazuje na menší množství proteinu v buňkách, než je například množství proteinu ScNha1-680 v buňkách BW31 či BW31 *erv14Δ*. Nízká transportní aktivita proteinu ScNha1-568 také odpovídá horšímu růstu buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* s plazmidem pNHA1-568 při kapkovém testu v přítomnosti solí v porovnání s buňkami obsahujícími ostatní zkrácené verze ScNha1.

Výrazný rozdíl v množství vyexportovaných sodných kationtů mezi buňkami kmene BW31 a BW31 *erv14Δ* byl pozorován v případě, kdy buňky nesly transportér ScNha1 o celé délce či ScNha1-928 AK. Buňky kmene BW31 *erv14Δ* s těmito transportéry nebyly schopny exportovat tak velké množství sodných kationtů, jako buňky kmene BW31 se shodnými transportéry. Toto pozorování odpovídá výsledkům získaným pomocí fluorescenčního mikroskopu, kdy jsme pozorovali v buňkách *erv14Δ* částečné zadržování verzí ScNha1-985 a ScNha1-928 v ER (Obr. 24). Proteinů je tím pádem v membráně méně a buňky se nemohou tak efektivně zbavovat sodných kationtů, jako když je *ERV14* přítomen a transport proteinů do membrány probíhá bez problémů. V případě buněk s transportéry ScNha1-680 a ScNha1-568 nebylo žádné zhoršení exportu sodných kationtů v nepřítomnosti proteinu *Erv14* patrné. Jelikož ani pomocí fluorescenčního mikroskopu nebyl pozorován rozdíl v lokalizaci transportérů ScNha1-680 a ScNha1-568 mezi buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ*, tak se zdá, že transportér ScNha1 s C-koncem o délce 249 AK (Tab. 5) či kratším nevyžaduje k transportu do plazmatické membrány protein *Erv14*. Export sodných kationtů z buněk nesoucích ScNha1 o celé délce byl testován již dříve, v buňkách kmene BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015) a výsledky zde prezentované se s těmi publikovanými shodují.

## 6.5 Studium lokalizace a funkce ATPázy ScEna1 a jejího homologu z kvasinky *Candida glabrata*, CgEna1, v kmeni BYT45 a BYT45 *erv14*Δ

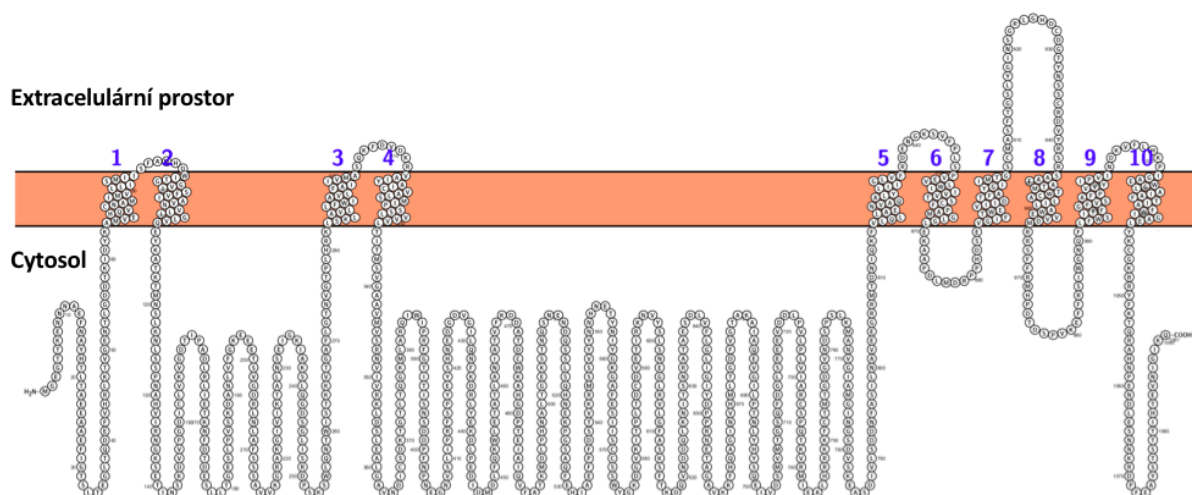
Abychom zjistili, zda nehraje cargo receptor Erv14 komplexnější roli v udržování homeostáze kationtů alkalických kovů, paralelně se studováním vlivu proteinu Erv14 na průchod sekreční dráhou antiporteru Nha1 jsme zjišťovali, zda má přítomnost Erv14 vliv na funkci a lokalizaci dalšího exportéru kationtů alkalických kovů, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPázy ScEna1 (Haro et al., 1991) či jejího homologu z kvasinky *C. glabrata*, CgEna1 (Krauke and Sychrova, 2011).

### 6.5.1 Topologické modely proteinů ScEna1 a CgEna1

Protein Erv14 rozpoznává svůj náklad pravděpodobně na základě struktury (Herzig et al., 2012). To se zdá pravděpodobné i pro rozpoznávání antiporteru ScNha1, jehož transport z ER je na přítomnosti Erv14 závislý, ale v případě zkrácení proteinu ScNha1 o dlouhý C-konec již Erv14 není k jeho transportu do plazmatické membrány potřebný (Rosas-Santiago et al., 2015). Při studiu vlivu proteinu Erv14 na funkci a lokalizaci ATPázy ScEna1 a jejího homologu CgEna1 z kvasinky *C. glabrata* jsme nejprve chtěli zjistit, jaká je topologie proteinů ScEna1 a CgEna1 a čím se mezi sebou liší.

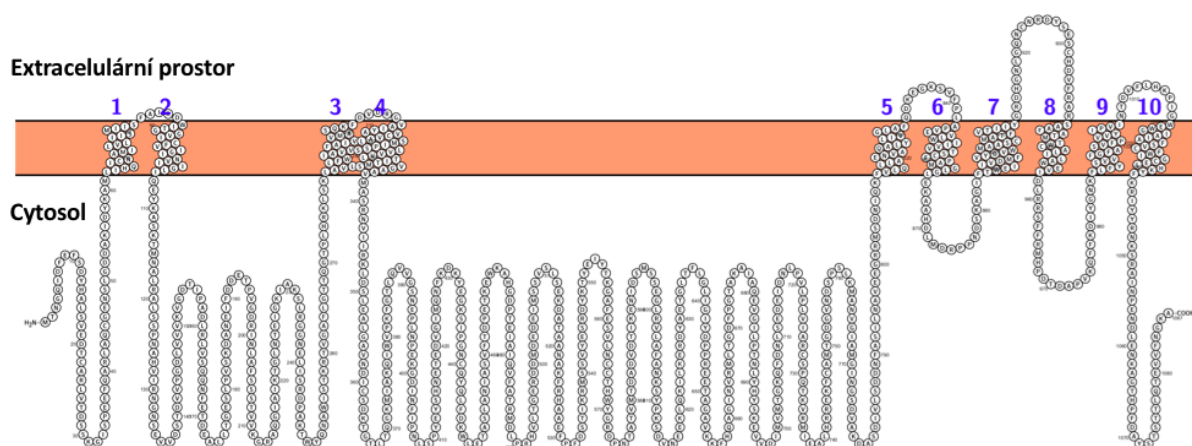
Jak protein ScEna1 o délce 1091 AK, tak protein CgEna1 o délce 1087 AK patří mezi ATPázy P-typu, jejichž topologie byla popsána v kapitole 2.1.3.3. K vytvoření topologických modelů proteinů na základě sekvence aminokyselin byl využit program Protter (Omasits et al., 2014). Jak je vidět na Obr. 27 a Obr. 28, topologické modely obou proteinů si jsou velice podobné. V čem se ale liší, jsou délky transmembránových domén. Za využití databáze proteinových sekvencí Uniprot bylo zjištěno, že zatímco protein ScEna1 má všechny TMD 21 AK dlouhé, tak délky TMD proteinu CgEna1 jsou různé a nejdelší má délku dokonce 31 AK.

Extracelulární prostor



Obr. 27: Topologický model proteinu ScEna1 vytvořený v programu Protter.

Extracelulární prostor

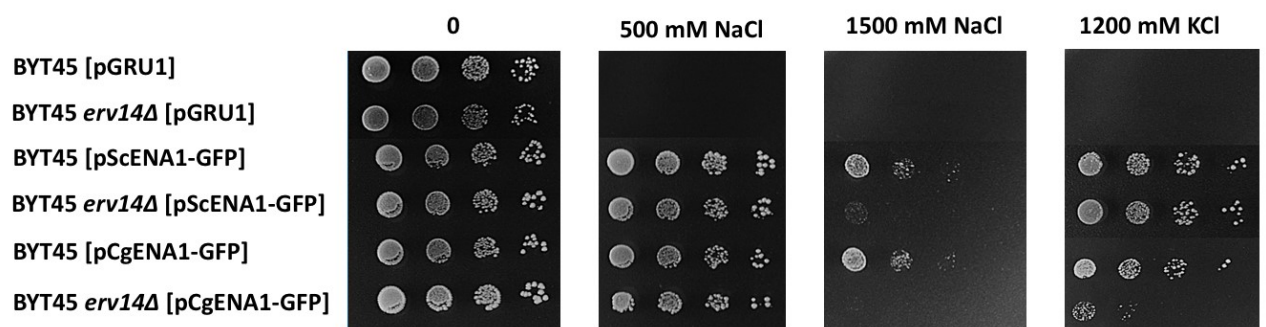


Obr. 28: Topologický model proteinu CgEna1 vytvořený v programu Protter.

## 6.5.2 Ověření funkčnosti proteinů *ScEna1* a *CgEna1* v buňkách **BYT45** a **BYT45 *erv14*Δ**

Nejprve jsme transformovali plazmidy pGRU1 nesoucími geny kódující ATPázy *ScEna1* a *CgEna1* jak buňky **BYT45**, tak buňky **BYT45 *erv14*Δ** a poté jsme ověřili funkci transportérů pomocí kapkového testu.

Pro ověření funkčnosti transportérů v buňkách byl proveden kapkový test, při kterém byly buňky vystaveny různě vysokým koncentracím NaCl (300 mM – 1500 mM) a KCl (600 mM – 1800 mM) v médiu YNB + HLM.

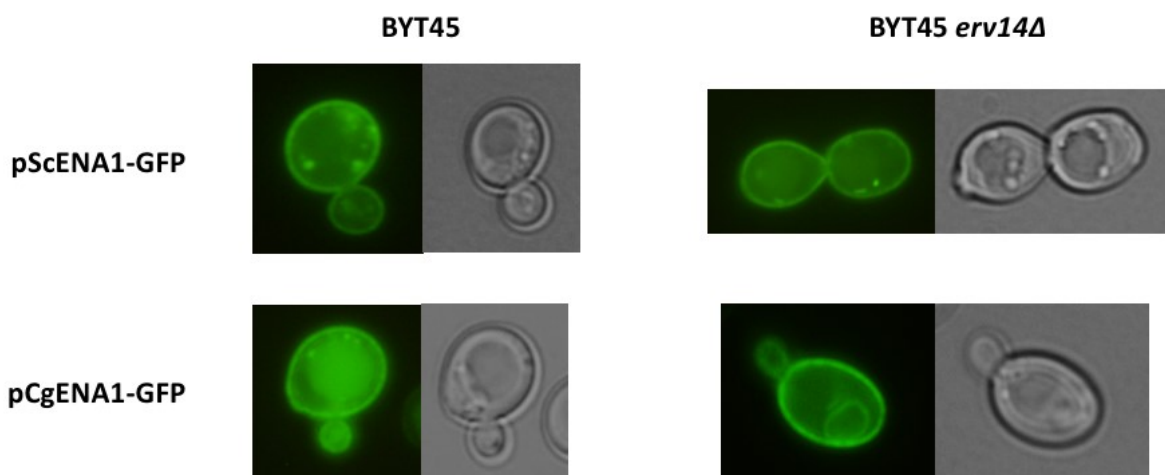


**Obr. 29: Kapkový test ověřující funkčnost ATPáz *ScEna1* a *CgEna1* v buňkách **BYT45** a **BYT45 *erv14*Δ**.** Růst buněk na médiu YNB + HLM v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

Buňky **BYT45** i **BYT45 *erv14*Δ** transformované plazmidy s geny kódujícími transportéry rostly i v přítomnosti mnohonásobně vyšších koncentrací solí, než buňky kontrolní (Obr. 29), čímž se potvrdilo, že jsou transportéry v buňkách funkční. Jak protein *ScEna1*, tak i *CgEna1* udělovaly buňkám schopnost růst v prostředí s vysokými koncentracemi NaCl i KCl, což odpovídá dosud publikovaným výsledkům (Haro et al., 1991; Krauke et al., 2011). Zároveň buňky s plazmidy pScENA1-GFP a pCgENA1-GFP rostly v nepřítomnosti proteinu *Erv14* na médiích s NaCl a v případě buněk transformovaných plazmidem pCgENA1-GFP i na médiích s KCl hůře, než buňky, které *Erv14* měly. To může mít stejně jako v případě testovaných antiporterů z rodiny NHA souvislost jak s nižší tolerancí k solím samotného kmene **BYT45 *erv14*Δ**, tak i s případným zadržováním transportérů uvnitř buňky či případnou kombinací obou příčin.

### 6.5.3 Lokalizace proteinů *ScEna1* a *CgEna1* v buňkách BYT45 a BYT45 *erv14*Δ

Díky značení proteinů pomocí GFP bylo možné jejich lokalizaci v buňkách zjišťovat za využití fluorescenční mikroskopie.



**Obr. 30: Lokalizace ATPázy *ScEna1* a lokalizace ATPázy *CgEna1* v buňkách BYT45 a BYT45 *erv14*Δ.**

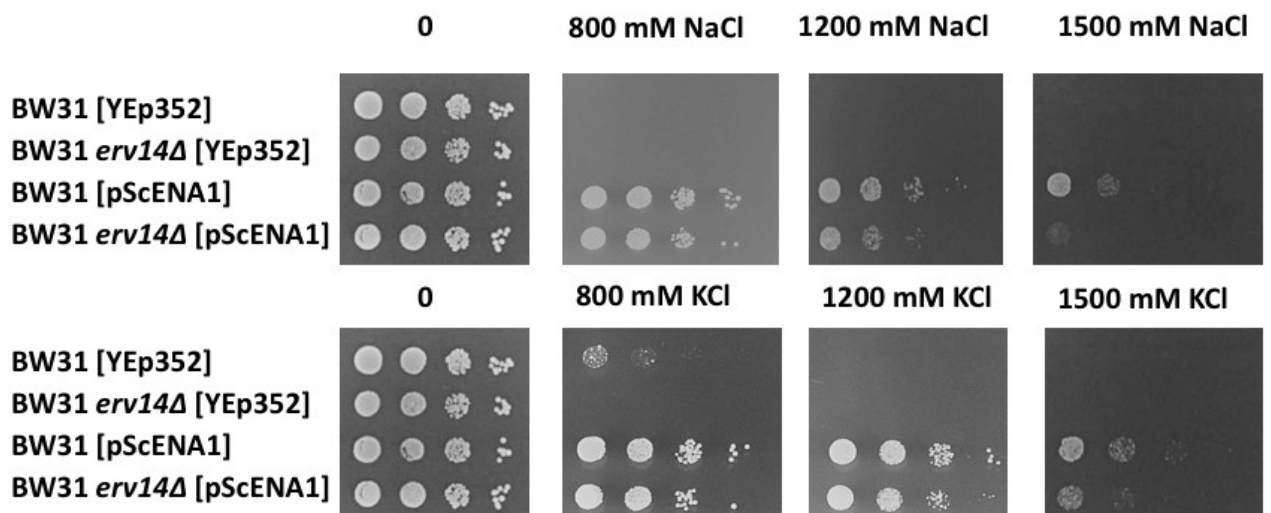
Jak je vidět na Obr. 30, protein *ScEna1* se dostával správně do plazmatické membrány jak v přítomnosti cargo receptoru *Erv14* (BYT45), tak v jeho nepřítomnosti (BYT45 *erv14*Δ) a žádné defekty transportu do membrány v důsledku delece *ERV14* nebyly patrné. Transport ATPázy *CgEna1* do plazmatické membrány byl v buňkách BYT45 efektivní, bez pozorovatelných defektů, ale v buňkách *erv14*Δ bylo možné kromě lokalizace v plazmatické membráně pozorovat i slabý fluorescenční signál v perinukleárním ER. Z těchto výsledků se dá usuzovat, že nepřítomností proteinu *Erv14* je ovlivněn pouze transport heterologně exprimovaného proteinu *CgEna1*.

## 6.6 Studium lokalizace, funkce a aktivity proteinu ScEna1 v kmeni BW31 a BW31 *erv14*Δ

Při dalším studiu vlivu proteinu Erv14 na ATPázu Ena1 v kmenech BW31 a BW31 *erv14*Δ jsme se rozhodli zaměřit se na práci s buňkami produkujícími protein ScEna1. Abychom ověřili a rozšířili výsledky získané v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14*Δ, transformovali jsme kmeny BW31 a BW31 *erv14*Δ plazmidy kódujícími ATPázu Ena1 a sledovali vliv proteinu Erv14 na funkci, lokalizaci a aktivitu tohoto proteinu. Kvasinky byly transformovány jak plazmidem YEp352 nesoucím gen kódující protein ScEna1, se kterými byla testována funkce a aktivita ATPázy Ena1 v přítomnosti a absenci proteinu Erv14, tak i plazmidem pGRU1 nesoucím gen kódující protein ScEna1 značený pomocí GFP, který umožnil sledovat lokalizaci proteinu v buňkách.

### 6.6.1 Ověření funkčnosti ATPázy ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14*Δ

Pro ověření funkčnosti ATPázy ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14*Δ byl proveden kapkový test, při kterém byl testován růst buněk na médiích YNB + AHLW s přidavkem NaCl (500 mM – 1800 mM) či KCl (600 mM – 1800 mM).

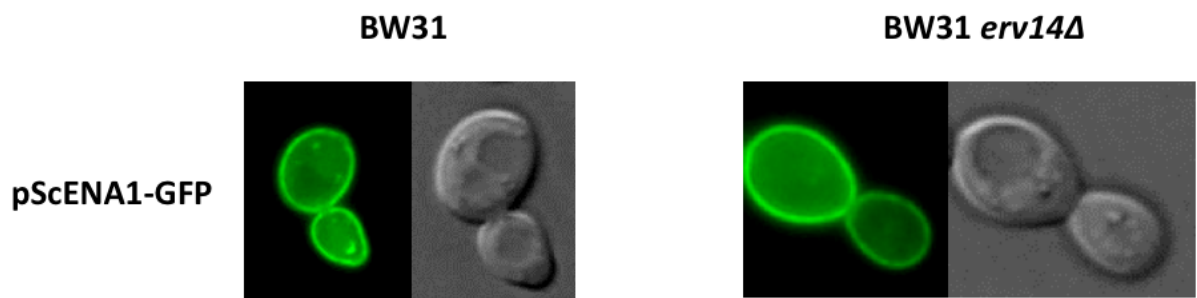


Obr. 31: Kapkový test ověřující funkčnost proteinu ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14*Δ. Růst buněk na médiu YNB + AHLW v přítomnosti a nepřítomnosti solí byl sledován po dobu jednoho týdne.

ATPáza ScEna1 umožňovala buňkám růst na půdách s mnohem vyššími koncentracemi solí, než rostly buňky s prázdným vektorem (Obr. 31), čímž bylo ověřeno, že je v buňkách funkční a transportuje aktivně jak sodné, tak draselné kationty ven z buňky. Lépe rostly za přítomnosti solí buňky kmene BW31 transformované vektorem pScENA1, v porovnání s buňkami kmene BW31 *erv14Δ* obsahujícími stejný vektor, což je fenotyp shodný s tím, který byl pozorován v genetickém pozadí kmenů BYT45 a BYT45 *erv14Δ*.

### 6.6.2 Lokalizace ATPázy ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ*

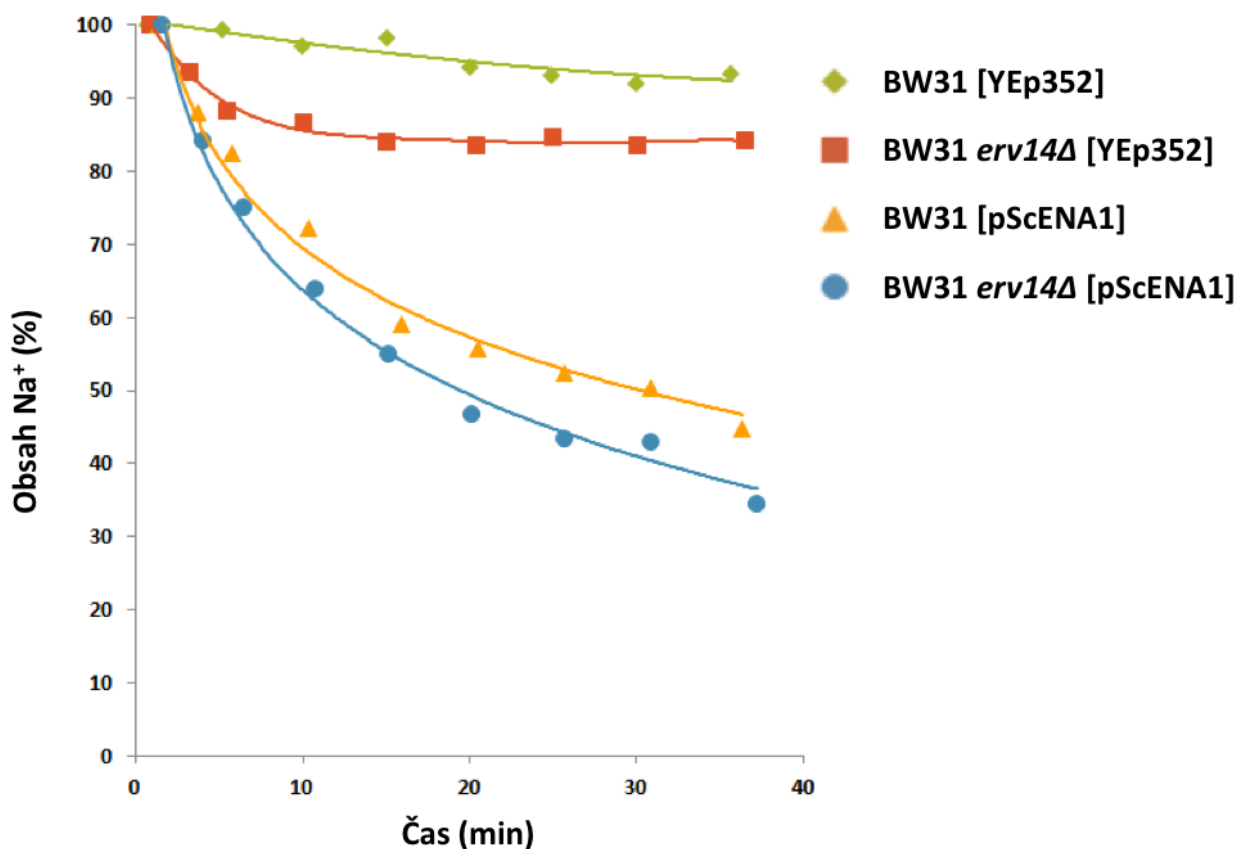
Při ověřování lokalizace ATPázy ScEna1 pomocí fluorescenční mikroskopie v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ* byly také získány stejné výsledky, jako v kmenech BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Obr. 30). Jak v buňkách nesoucích *ERV14*, tak v buňkách *erv14Δ* byl transportér ScEna1 lokalizován v plazmatické membráně a nebylo pozorováno žádné jeho zadržování uvnitř buněk, které by ukazovalo na ovlivnění transportu ScEna1 do membrány v nepřítomnosti cargo receptoru Erv14.



Obr. 32: Lokalizace proteinu ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ*.

### 6.6.3 Měření výstupu sodných kationtů z buněk produkujících protein ScEna1 pomocí AAS

Abychom zjistili, zda zhoršený růst buněk *erv14Δ* s transportérem ScEna1 v přítomnosti solí souvisí s jeho nižší exportní aktivitou, měřili jsme výstup sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ*, transformovaných plazmidy pScENA1, pomocí AAS.



Obr. 33: Export sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* produkujících protein ScEna1. Na grafu je vidět výstup sodných kationtů z buněk BW31 nesoucích prázdný vektor (zeleně) a ATPázu Ena1 (žlutě) a také výstup sodných kationtů z buněk BW31 *erv14Δ* transformovaných prázdným vektorem (červeně) a vektorem kódujícím ATPázu Ena1 (modře).

Jelikož ATPáza Ena1 udává buňkám schopnost tolerovat velmi vysoké koncentrace solí v médiu a její aktivita není závislá na protonovém gradientu (Kap. 2.1.3.3), inkubovali jsme buňky před experimentem 1 hodinu v médiu s NaCl přidaným do koncentrace 600 mM, aby došlo k dostatečné akumulaci sodných kationtů, jejichž výstup jsme následně chtěli měřit.

Ačkoliv se obsah sodných kationtů v buňkách BW31 nesoucích prázdný vektor po celou dobu měření výrazně neměnil, byl pozorován u buněk BW31 *erv14Δ* transformovaných prázdným vektorem na začátku měření lehký pokles v obsahu sodných kationtů. Buňky nesoucí pouze prázdný vektor nemají žádný transportér, kterým by se mohly sodných kationtů specificky zbavovat. Lehký pokles v obsahu sodných kationtů by mohl být dán nespecifickým únikem iontů z buněk v důsledku poškození buněčné stěny či celkově špatným stavem buněk v důsledku delece genu *ERV14* (Kap. 2.4.1). Export sodných kationtů z buněk produkujících ATPázu ScEna1 nebyl v nepřítomnosti proteinu Erv14 zhoršen, nezdá se tedy, že by delece *ERV14* negativně ovlivnila transportní aktivitu proteinu ScEna1. Naopak buňky BW31 *erv14Δ* transformované vektorem pScEna1 vyexportovaly během měření o 10 % více sodných kationtů, než buňky kmene BW31 se shodným vektorem. Zajímavé je, že rozdíl v celkovém vyexportovaném množství sodných kationtů mezi buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ* transformovanými plazmidem pScENA1 byl totožný s rozdílem mezi buňkami kontrolními (32,2 nmol Na<sup>+</sup> na 1 mg buněčné sušiny v případě buněk transformovaných prázdným vektorem oproti 32,9 nmol Na<sup>+</sup> na 1 mg buněčné sušiny v případě buněk transformovaných pScENA1), což podporuje teorii, že by tento rozdíl mohl být způsoben nespecifickým únikem iontů z buněk postrádajících gen *ERV14*.

Tyto výsledky zároveň potvrzují i pozorování pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 32), kde nebyl viditelný rozdíl v lokalizaci ATPázy Ena1 mezi buňkami kmene BW31 a BW31 *erv14Δ*, a tak se zdá, že pro její lokalizaci ani aktivitu není protein Erv14 vyžadován.

## 7 Diskuze

Udržování homeostáze kationtů alkalických kovů je nezbytné pro všechny živé buňky, včetně buněk kvasinek. V modelové kvasince *S. cerevisiae* se na něm podílí řada transportérů kationtů alkalických kovů lokalizovaných v plazmatické membráně nebo v membránách vnitřních organel. Proteiny, jejichž místem působení v buňce je plazmatická membrána, jako je Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1 (Prior et al., 1996; Banuelos et al., 1998) či Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPáza Ena1 (Haro et al., 1991) se dostávají na povrch buňky sekreční dráhou. Během svého vzniku jsou transportovány do endoplazmatického retikula (ER), kde dochází k jejich skládání a úpravám, odkud pokračují dále ve váčcích COPII do Golgiho aparátu (GA) a poté do plazmatické membrány (Feyder et al., 2015). Ne všechny proteiny ale mohou interagovat s proteiny váčků COPII přímo, některé vyžadují tzv. cargo receptor, který daný protein rozpozná a umožní mu interagovat s proteiny COPII (Baines and Zhang, 2007). Jedním z cargo receptorů, který ke svému transportu z ER vyžaduje velké množství proteinů, včetně antiporteru plazmatické membrány Nha1, je protein Erv14 (Powers and Barlowe, 1998, 2002). Pokud buňka postrádá Erv14, nemohou být tyto proteiny efektivně transportovány do míst, kde mají plnit své funkce, což vede k narušení tvorby buněčné stěny (Sacristan et al., 2013), sporulace (Nakanishi et al., 2007), axiálního pučení (Powers and Barlowe, 1998) a udržování homeostáze kationtů alkalických kovů (Rosas-Santiago et al., 2015). Stále zůstává otázkou, jak cargo receptor Erv14 rozpoznává proteiny, kterým umožňuje vstup do váčků COPII, ale jako nejpravděpodobnější možnost se zdá, že význam pro tento proces má jejich struktura (Herzig et al., 2012). Všechny proteiny, jejichž efektivní transport z ER je závislý na přítomnosti Erv14, jsou transmembránové proteiny, jejichž finálním místem působení jsou pozdní části sekreční dráhy, kde je dvojrvtva fosfolipidů širší (Sharpe et al., 2010) a tudíž i proteiny zde lokalizované mají delší transmembránové domény, což by mohl být znak rozpoznávaný proteinem Erv14 (Herzig et al., 2012). Ne všechny proteiny působící v pozdních částech sekreční dráhy ale Erv14 ke svému transportu vyžadují, a tudíž zde musí být ještě nějaký další znak, podle kterého Erv14 své vazebné partnery rozpoznává.

## 7.1 Studium vlivu delece genu *ERV14* na růst kmenů W303-1A a BW31

Veškeré dosud publikované výsledky, které popisovaly vliv delece genu *ERV14* na toleranci buněk vůči solím byly získány v kmeni *S. cerevisiae* BY4741 (Brachmann et al., 1998). Jelikož ale bylo ukázáno, že buňky kmene BY4741 se od druhého často využívaného laboratorního kmene *S. cerevisiae*, W303-1A, liší v některých fyziologických parametrech, jako je tolerance vůči solím či membránový potenciál (Petrezselyova et al., 2010), rozhodli jsme se ověřit, zda budeme pozorovat v kmeni W303-1A (Wallis et al., 1989) stejný vliv delece genu *ERV14* na růst buněk v přítomnosti solí, jako v kmeni BY4741. Gen *ERV14* byl odstraněn i z genomu kmene BW31 (W303-1A *ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1-Δ::LEU2*), který postrádá exportéry kationtů alkalických kovů (Kinclova-Zimmermannova et al., 2005). Gen *ERV14* byl z genomu kmenů deletován pomocí kazety *kanMX* (Josef Škoda, Guldener et al., 1996), kterou bylo nutné nejprve z genomu kmenů W303-1A *erv14Δ::kanMX* a BW31 *erv14Δ::kanM* odstranit. Úspěšné odstranění deleční kazety *kanMX* bylo ověřeno pomocí kapkového testu a colony PCR s využitím čtyř párů primerů.

Po získání kmenů W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ* jsme nejprve ověřili obecný vliv delece genu *ERV14* na růst buněk. Za tímto účelem jsme měřili růstové křivky kmenů W303-1A, W303-1A *erv14Δ*, BW31 a BW31 *erv14Δ* po dobu 30 hodin v tekutém médiu YPD + ade. Z výsledného grafu bylo patrné, že buňky kmene W303-1A *erv14Δ* i BW31 *erv14Δ* vstupují později do exponenciální fáze růstu, než buňky W303-1A a BW31, a zároveň i dorůstají nižší finální optické denzity, než buňky, které *Erv14* mají. Již při objevení proteinu *Erv14* bylo publikováno, že delece genu *ERV14* v buňkách vede k prodloužení lag fáze (Powers and Barlowe, 1998), což se shoduje s výsledky získanými v této práci. Delece genu *ERV14* tedy zhoršuje růst buněk nejen ve stresových podmínkách, ale i v podmínkách, kdy buňky rostou v bohatém médiu. To může být vysvětleno celkově zhoršeným stavem buněk v důsledku delece *ERV14*, která vede k narušení mnoha buněčných funkcí, jak již bylo popsáno výše.

Abychom ověřili, že má delece genu *ERV14* v kmenech W303-1A a BW31 stejný vliv na toleranci buněk vůči solím jako na buňky kmene BY4741 a BYT45 (Rosas-Santiago et al., 2015), kde byl ukázán zhoršený růst kmenů BY4741 *erv14Δ* i BYT45 *erv14Δ* v přítomnosti solí oproti buňkám, které *Erv14* obsahovaly, byl testován růst buněk W303-1A, W303-1A *erv14Δ*, BW31 a BW31 *erv14Δ* pomocí kapkového testu na médiích YNB + AHLW s přidavkem NaCl

v rozmezí koncentrací 100 mM – 1500 mM a KCl v rozmezí koncentrací 100 mM – 1800 mM. Růst kmenů W303-1A *erv14Δ* i BW31 *erv14Δ* byl viditelně zhoršen oproti růstu kmenů W303-1A a BW31, které *ERV14* mají, na médiích obsahujících NaCl i KCl, což je v souladu s dosud publikovanými výsledky pro kmen BY4741 (Rosas-Santiago et al., 2015). Zhoršený růst buněk W303-1A *erv14Δ* oproti buňkám W303-1A je dobře pochopitelný, jelikož tento kmen nese ve svém genomu gen kódující antiporter Nha1, který je nákladem pro *Erv14* (Herzig et al., 2012) a v jeho nepřítomnosti je částečně zadržován uvnitř buněk, což vede k nižší toleranci buněk vůči solím. Pro zhoršený růst buněk BW31 *erv14Δ* oproti buňkám BW31 ale toto vysvětlení neplatí, jelikož buňky kmene BW31 *erv14Δ* postrádají antiporter Nha1. Je však možné, že protein *Erv14* ovlivňuje průchod sekreční dráhou a tedy lokalizaci a funkci i jiného transportéru kationtů alkalických kovů, jak již bylo navrženo dříve při obdobných pokusech s buňkami BYT45 a BYT45 *erv14* (Rosas-Santiago et al., 2015), což by tento fenotyp vysvětlovalo.

Po ověření, že má delece *ERV14* v kmeni W303-1A na toleranci buněk vůči solím stejný efekt, jako v kmeni BY4741, jsme se zaměřili na druhý cíl této práce, kterým bylo studování vlivu C-konce antiporteru Nha1 na jeho lokalizaci, funkci a aktivitu v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu *Erv14*.

## **7.2 Studium vlivu delece genu *ERV14* na lokalizaci a funkci antiporterů NHA z různých druhů kvasinek**

Antiporter Nha1 byl objeven jako jeden z proteinů závislých při svém transportu do plazmatické membrány na přítomnosti cargo receptoru *Erv14* (Herzig et al., 2012). *Erv14* interaguje s transmembránovými doménami antiporteru (Rosas-Santiago et al., 2015) a pokud není v buňce přítomen, je antiporter Nha1 částečně zadržován v ER. Postrádá-li však antiporter Nha1 hydrofilní C-koncovou část, mezi níž a proteinem *Erv14* nebyla interakce prokázána, pak není transport Nha1 do plazmatické membrány na přítomnosti *Erv14* závislý (Rosas-Santiago et al., 2015). C-konec tvoří více než polovinu délky antiporteru Nha1, a tak jsme se rozhodli ověřit, zda požadavek na přítomnost *Erv14* pro průchod Nha1 sekreční dráhou souvisí s délkou C-koncové části antiporteru.

Pro tento cíl jsme zvolili nejprve heterologní expresi antiporterů NHA plazmatické membrány z různých druhů kvasinek v *S. cerevisiae*. Podle topologických modelů mají všechny tyto kvasinkové transportéry podobnou strukturu, přičemž C-konec je část, kterou

se mezi sebou liší nejvýrazněji, a to jak sekvencí, tak i délkou, což bylo pro naše experimenty zásadní (Tab. 4, Pribylova et al., 2006).

K experimentům jsme využili jak buňky kmene BYT45 a BYT45*erv14Δ*, které byly transformovány plazmidy nesoucími geny kódující proteiny NHA z kvasinkových druhů *Z. rouxii* (ZrNha1), *D. hansenii* (DhNha1), *Y. lipolytica* (YNha1 a YNha2), *C. albicans* (CaCnh1), *C. dubliniensis* (CdCnh1), *C. glabrata* (CgCnh1), *C. parapsilosis* (CpCnh1) a *S. cerevisiae* (ScNha1), tak i buňky kmene BW31 a BW31 *erv14Δ*, ve kterých jsme ověřovali výsledky experimentů s heterologně exprimovanými antiportery NHA z vybraných druhů kvasinek získané v buňkách BYT45 a BYT45*erv14Δ*. Nově jsme také v kmenech BW31 a BW31 *erv14Δ* ověřovali funkci a lokalizaci zkrácené verze antiporteru Nha1 *S. cerevisiae* postrádající C-konec (ScNha1-472), jejíž funkce a lokalizace v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14 již byla testována v buňkách BYT45 dříve (Rosas-Santiago et al., 2015). Výsledky získané při níže popsaných experimentech s antiporterem ScNha1 bez C-konce v buňkách kmene BW31 a BW31 *erv14Δ* se shodují s výsledky publikovanými dříve v kmeni BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015).

Růst buněk byl testován pomocí kapkového testu na médiích YNB s přidávkem NaCl a KCl. Všechny buňky produkující transportéry rostly v přítomnosti solí lépe, než buňky s prázdným vektorem, čímž se potvrdilo, že jsou antiportery v buňkách funkční. Bez ohledu na transportér, který kvasinky nesly, rostly vždy v nepřítomnosti proteinu Erv14 za přítomnosti solí hůře, než v jeho přítomnosti. Tento rozdíl byl pozorovatelný i mezi buňkami s prázdným vektorem jak na médiu s NaCl, tak s KCl, což odpovídá dříve publikovaným výsledkům pro kmeny BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015) a našim výsledkům s netransformovanými kmeny BW31 a BW31 *erv14Δ* (Obr. 12) diskutovaným v kap. 7.1. V případě produkce některých transportérů jsme však pozorovali větší rozdíly v růstu za přítomnosti solí mezi buňkami s *ERV14* a *erv14Δ*, než v případě produkce jiných transportérů, což by mohlo souviset s případným zadržováním některých antiporterů uvnitř buněk postrádajících protein Erv14. Díky značení studovaných transportérů pomocí GFP jsme mohli studovat i lokalizaci těchto proteinů v buňkách s *ERV14* a buňkách *erv14Δ*. Zjistili jsme, že lokalizace antiporterů *YNha1*, *YNha2*, *CaCnh1*, *CdCnh1* a *ScNha1* bez C-konce se nezdá být nepřítomností Erv14 nijak ovlivněna, jelikož silný fluorescenční signál těchto proteinů byl pozorován v plazmatické membráně jak v buňkách, které *ERV14* měly, tak i v buňkách, které *ERV14* postrádaly, a lokalizace proteinů v těchto dvou kmenech nebyla nijak odlišná. Zvláštní

případ tvořila lokalizace proteinů *Y/Nha2* a *ScNha1* bez C-konce, jejichž fluorescence byla jak v buňkách s *ERV14*, tak v buňkách *erv14Δ* patrná nejen v plazmatické membráně, ale i v endoplazmatickém retikulu, což si vysvětlujeme možnou nadprodukcí těchto proteinů. Na druhou stranu fluorescenční signál antiporterů *ScNha1*, *CgCnh1* a *CpCnh1* pozorovaný v buňkách *erv14Δ* byl v plazmatické membráně slabší a u transportérů *ScNha1*, *CgCnh1*, *CpCnh1*, *DhNha1* a *ZrNha1* bylo možné vidět jejich částečné zadržování uvnitř buňky, zatímco v buňkách s *ERV14* byly transportéry lokalizovány v plazmatické membráně bez známek vnitrobuněčného zadržování. Získané výsledky tedy naznačují, že by interakce mezi antiportery NHA a proteinem *Erv14* mohla být konzervována mezi různými druhy kvasinek.

Abychom zjistili, jestli má požadavek na přítomnost *Erv14* pro průchod sekreční dráhou souvislost s délkou C-konce studovaných antiporterů, porovnali jsme pomocí programu MegAlign (Lasergene 11 DNASTAR) aminokyselinové sekvence všech testovaných antiporterů a určili délky jejich C-konců podle topologického modelu, navrženého pro antiporter kvasinky *Z. rouxii* *ZrSod2-22* (Kinclova-Zimmermannova et al., 2015) (Tab. 4). Na základě tohoto srovnání jsme mohli konstatovat, že všechny transportéry, které jsou v nepřítomnosti proteinu *Erv14* částečně zadržovány uvnitř buněk, pravděpodobně v ER, mají C-konec delší než 500 AK. Tento výsledek naznačil, že ke svému transportu z ER vyžadují cargo receptor *Erv14* proteiny NHA s dlouhými C-konci.

Zároveň byl na základě podobnosti srovnávaných sekvencí vytvořen fylogenetický strom (Obr. 13) ukazující příbuznost jednotlivých antiporterů z rodiny NHA z různých druhů kvasinek. Je z něj patrné, že závislost transportu proteinů NHA na *Erv14* není dána příbuzností antiporterů, čímž se vyloučila možnost, že se požadavek na *Erv14* vyvinul pouze u konkrétní vývojové větve kvasinek a s délkou C-konce nijak nesouvisí. To můžeme vidět např. v případě antiporterů NHA z blízce příbuzných kvasinkových druhů *C. albicans* (*CaCnh1*), *C. dubliniensis* (*CdCnh1*) a *C. parapsilosis* (*CpCnh1*). Zatímco proteiny *CaCnh1* a *CdCnh1* se zdají být v transportu z ER na přítomnosti proteinu *Erv14* nezávislé, antiporter *CpCnh1*, který jako jediný z nich má C-konec delší než 500 AK, k průchodu sekreční dráhou cargo receptor *Erv14* vyžaduje.

Díky srovnání aminokyselinových sekvencí proteinů jsme také v rámci C-konce téměř všech transportérů našli konzervované domény C1 – C6 (viz. příloha), které zajišťují (doména C1) a regulují (domény C2-C6) aktivitu transportérů NHA (Kamauchi et al., 2002; Mitsui et al. 2004). Tyto domény se nachází u různých transportérů NHA různě daleko od

sebe a hlavní diverzitu C-konce tvoří právě ty oblasti, které od sebe jednotlivé domény oddělují. S výjimkou antiporteru *Y/Nha2*, jehož C-konec je jen 94 AK dlouhý, jsme u všech transportérů našli konzervované domény C1-C6 a nezdá se tedy pravděpodobné, že by některá z těchto konzervovaných domén souvisela s požadavkem antiporterů s dlouhými C-koncovými částmi na přítomnost *Erv14* pro průchod sekreční dráhou.

### **7.3 Studium vlivu delece genu *ERV14* na lokalizaci, funkci a aktivitu zkrácených verzí antiporteru *ScNha1* v buňkách kmene BW31**

Jak výsledky získané při experimentech s heterologně exprimovanými transportéry z rodiny NHA z různých druhů kvasinek, tak výsledky získané při studiu funkce a lokalizace nezkráceného proteinu *ScNha1* a zkrácené verze *ScNha1* postrádající C-koncovou část (*ScNha1-472*) v přítomnosti a nepřítomnosti *Erv14*, naznačily, že je protein *Erv14* vyžadován pro průchod sekreční dráhou pouze antiportery s dlouhým C-koncem. Pro potvrzení této teorie jsme se rozhodli otestovat lokalizaci, funkci a aktivitu proteinu *ScNha1* s různou délkou C-konce v přítomnosti i nepřítomnosti proteinu *Erv14* v buňkách BW31.

Abychom mohli sledovat lokalizaci proteinů v rámci buňky, bylo nutné vytvořit plazmidy pGRU1 nesoucí geny kódující různě dlouhé verze antiporteru *ScNha1* značené pomocí GFP. K vytvoření plazmidů nesoucích sekvence kódující zkrácené verze proteinu *ScNha1* o celkové délce 928 AK, 680 AK a 568 AK, s C-konci o délce 497 AK, 249 AK a 137 AK, jsme využili homologní rekombinaci v kvasince *S. cerevisiae*. Nově vytvořenými plazmidy a také již dříve vytvořenými plazmidy nesoucími geny kódující proteiny *ScNha1* o celé délce (985 AK) a protein *ScNha1* bez C-konce (472 AK), značené GFP, byly transformovány buňky kmene BW31 a BW31 *erv14Δ* a byla zjišťována lokalizace produkovaných proteinů. V případě buněk kmene BW31 byly všechny verze proteinu *ScNha1* lokalizovány správně v plazmatické membráně, ale v buňkách kmene BW31 *erv14Δ* se jejich lokalizace lišila. Protein o celé délce a nejdelší zkrácená verze *ScNha1-928* byly v buňkách BW31 *erv14Δ* výrazně zadržovány uvnitř buněk a nedostávaly se tak efektivně do plazmatické membrány, jako v přítomnosti proteinu *Erv14*. U verzí *ScNha1-680*, *ScNha1-568* a *ScNha1-472* byl v buňkách BW31 *erv14Δ* v plazmatické membráně stejně silný fluorescenční signál, jako u buněk kmene BW31 a jejich lokalizace byla v obou kmenech shodná. U zkrácené verze proteinu *ScNha1* o celkové délce 568 AK bylo patrné, že ačkoliv je signál nezávisle na přítomnosti proteinu *Erv14* detekovatelný pouze v cytoplazmatické membráně, tak je méně silný, než u ostatních verzí.

Naopak fluorescenční signál proteinů ScNha1-680 a ScNha1-472 byl velmi silný v buňkách BW31 i BW31 *erv14Δ* a zároveň bylo možné vidět lokalizaci proteinů uvnitř buňky v perinukleárním ER, což může být dáno vysokou produkcí těchto verzí proteinu ScNha1. Z výsledků získaných pomocí fluorescenční mikroskopie jsme mohli vyhodnotit, že zatímco transport plné verze proteinu s délkou C-konce 557 AK a zkrácené verze proteinu ScNha1-928 s C-koncem o délce 497 AK je ovlivněn proteinem Erv14, tak kratší verze Erv14 k efektivnímu průchodu sekreční dráhou nevyžadují. To se shoduje s výsledky získanými s heterologně exprimovanými proteiny z rodiny NHA z různých druhů kvasinek v kmenech BYT45 i BW31, kde bylo patrné vnitrobuněčné zadržování v nepřítomnosti Erv14 u proteinů s C-koncem delším než 500 AK.

Vzhledem k tomu, že pro studium lokalizace zkrácených verzí ScNha1 byly proteiny značeny pomocí GFP na C-konci, využili jsme pro další experimenty, které zahrnovaly podrobnější testování funkce a aktivity zkrácených verzí transportéru ScNha1 buňky kmene BW31 a BW31 *erv14Δ*, nesoucí plazmidy pNHA1-985, pNHA1-928, pNHA1-680, pNHA1-568 a pNHA1-472 odvozené od vektoru YEp352. Vyloučili jsme tak možnost, že samotné připojení GFP na C-konec jednotlivých verzí ScNha1 ovlivňuje získané výsledky týkající se souvislosti mezi délkou C-koncové části antiporteru a jeho požadavku na přítomnost Erv14 pro průchod sekreční dráhou. Funkci antiporterů ScNha1 o celkové délce 985 AK, 928 AK, 680 AK, 568 AK a 472 AK v buňkách jsme testovali pomocí kapkového testu na médiu YNB+AHLW s přidanými solemi NaCl (200 mM – 800 mM) a KCl (600 mM – 1500 mM). Všechny transportéry byly v buňkách BW31 i BW31 *erv14Δ* funkční a zvyšovaly jejich toleranci vůči solím. Tolerance buněk BW31 vůči solím s odlišnými verzemi transportéru ScNha1 se ale lišila. Buňky BW31 obsahující ScNha1 o celkové délce 928 AK tolerovaly v porovnání s ostatními nejvyšší koncentrace NaCl, což je v souladu s publikovanými výsledky (Kinclova et al., 2001c), které ukázaly, že zkrácení C-konce antiporteru Nha1 zvyšuje toleranci buněk vůči NaCl v porovnání s buňkami nesoucími plnou verzi proteinu. Buňky BW31 nesoucí ostatní zkrácené verze ScNha1 byly naopak méně tolerantní vůči NaCl v porovnání s buňkami s nezkrácenou verzí antiporteru a při růstu na médiu s přidaným KCl nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi buňkami BW31 s různými verzemi antiporteru, což také odpovídá dříve publikovaným výsledkům. Stejně jako při pokusech s heterologně exprimovanými antiportery NHA z různých druhů kvasinek, i zde jsme za přítomnosti solí pozorovali zhoršený růst buněk BW31 *erv14Δ* a to nejen těch, které nesly prázdný vektor, ale i těch produkujících

studované transportéry. Rozdíly v toleranci k solím buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* produkujících shodné transportéry byly různě výrazné. Nejvýraznější rozdíl se zdál být mezi buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ*, které nesly nezkrácenou verzi ScNha1 a verzi zkrácenou o 57 AK na C-konci, ScNha1-928, což odpovídá i výsledkům z fluorescenčního mikroskopu, kde bylo pozorováno jejich zadržování uvnitř buněk *erv14Δ* a slabý signál v plazmatické membráně.

K určení aktivity jednotlivých verzí antiporteru Nha1 v buňkách BW31 a ke zjištění, jak je tato aktivita ovlivněna nepřítomností proteinu Erv14 v buňkách BW31 *erv14Δ*, jsme měřili výstup sodných kationtů z buněk. Buňky BW31 a BW31 *erv14Δ* nesoucí plazmidy YEp352, pNHA1-985, pNHA1-928, pNHA1-680 a pNHA1-568 v exponenciální fázi růstu byly inkubovány 1 hodinu v tekutém médiu YNB + AHLW s přidavkem 100 mM NaCl s upraveným pH na hodnotu 7. Tyto podmínky zajistily, že antiporter Nha1 využívající k exportu sodných a draselných kationtů energii gradientu protonů přes plazmatickou membránu nebyl aktivní, což vedlo k nahromadění sodných kationtů v buňkách, jejichž výstup jsme následně po dobu 40 minut měřili a vyhodnocovali pomocí AAS. Pro buňky s prázdným vektorem byl po celou dobu experimentu naměřen shodný obsah kationtů, což odpovídá tomu, že tyto buňky nemají systém, kterým by se sodných kationtů mohly zbavovat. Nejvyšší celkové množství vyexportovaných sodných kationtů v čase a zároveň i jejich nejrychlejší výstup byl zaznamenán u buněk BW31 nesoucích verzi ScNha1-928, což je v souladu s publikovanými výsledky (Kinclova et al., 2001) a také s výsledky zde provedeného kapkového testu, kde buňky s touto zkrácenou verzí vykazovaly nejvyšší odolnost vůči NaCl v médiu. Rychlost exportu sodných kationtů a i celkové vyexportované množství těchto kationtů z buněk BW31 nesoucích plnou verzi proteinu ScNha1 a zkrácenou verzi ScNha1-680 se shodovaly. Celkové množství sodných kationtů, které vyexportovaly buňky BW31 nesoucí plnou verzi proteinu ScNha1, bylo kolem 60 %, což odpovídá výsledkům publikovaným dříve (Kinclova et al., 2001c). Buňky kmene BW31 nesoucí zkrácenou verzi proteinu ScNha1-568 vyexportovaly během 40 minut měření nejméně, jen kolem 30 %, sodných kationtů, což odpovídá jak jejich špatnému růstu na kapkovém testu, tak i slabšímu fluorescenčnímu signálu pozorovanému díky fluorescenční mikroskopii.

Největší rozdíl v exportu sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* nesoucích shodnou verzi antiporteru ScNha1 byl zaznamenán mezi buňkami nesoucími plnou verzi proteinu a rozdílný export sodných kationtů vykazovaly i buňky BW31 a BW31 *erv14Δ*

nesoucí zkrácenou verzi ScNha1-928, kdy buňky *erv14Δ* vyexportovaly během měření méně sodných kationtů než buňky, které *ERV14* nesly. To odpovídá jak výsledkům kapkových testů, kde byl mezi buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ* nesoucími transportéry o celé délce a transportéry ScNha1-928 pozorovatelný největší rozdíl v růstu za přítomnosti solí, tak i výsledkům z fluorescenčního mikroskopu, kde bylo u buněk s těmito verzemi v nepřítomnosti proteinu Erv14 pozorováno výrazné zadržování těchto proteinů uvnitř buňky a jejich slabší fluorescenční signál v plazmatické membráně, než u buněk BW31, které protein Erv14 měly. Zhoršení exportu sodných kationtů v buňkách BW31 *erv14Δ* oproti buňkám BW31 nesoucím verze ScNha1-680 a ScNha1-568 pozorováno nebylo, což je v souladu s výsledky z fluorescenčního mikroskopu, kde nebyl patrný rozdíl v jejich lokalizaci v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14. Export sodných kationtů z buněk nesoucích ScNha1 o celé délce byl testován již dříve, v buňkách kmene BYT45 a BYT45 *erv14Δ* (Rosas-Santiago et al., 2015), a výsledky zde prezentované se s publikovanými shodují.

Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že protein Erv14 není antiporterem Nha1 vyžadován pro průchod sekreční dráhou nejen v případě, kdy antiporter Nha1 postrádá celý C-konec, ale i v případě, kdy je přítomna až polovina celé délky C-konce. Naopak, aby byl protein Erv14 vyžadován k transportu Nha1 z ER, nemusí mít antiporter celý C-konec a zároveň pro požadavek na Erv14 není potřebná ani inhibiční doména C-konce, C6. V dalších experimentech, navazujících na tuto diplomovou práci, bude zjišťována maximální délka C-konce, při které antiporter Nha1 ještě nevyžaduje k průchodu sekreční dráhou přítomnost proteinu Erv14, případně bude hledána konkrétní sekvence či motiv C-konce, který je pro požadavek na Erv14 důležitý.

Zůstává otázkou, proč je pro průchod sekreční dráhou proteinu Nha1 v přítomnosti jeho C-konce cargo receptor Erv14 zapotřebí, když mezi proteinem Erv14 a C-koncem Nha1 nebyla žádná interakce prokázána. Je možné, že by dlouhý C-konec Nha1 mohl díky své velikosti bránit účinné inkorporaci antiporteru do váčků COPII. Erv14, ačkoliv s C-koncem Nha1 přímo neinteraguje, by mohl mít vliv na jeho prostorové uspořádání díky interakci s transmembránovými doménami Nha1 či ostatními proteiny váčku COPII. To by mohlo usnadnit vstup proteinu Nha1 do váčku COPII, který je bez pomoci proteinu Erv14 narušen. Protein s kratším C-koncem by nemusel být na přítomnosti Erv14 závislý, jelikož nemá tak dlouhý C-konec, který by bránil jeho efektivnímu vstupu do váčku COPII. Tato teorie by vysvětlovala získané výsledky, které ukazují, že by požadavek na protein Erv14 mohl být dán

délkou C-konce, jelikož protein Nha1 s krátkým C-koncem k transportu z ER protein Erv14 nevyžaduje.

Bylo také publikováno (Rosas-Santiago et al., 2015), že zatímco v přítomnosti proteinu Erv14 se nachází antiporter Nha1 v plazmatické membráně jako dimer, v buňkách *erv14Δ* byl v plazmatické membráně protein Nha1 nalezen ve formě monomeru. Rozdíl v množství monomerní a dimerní formy proteinu Nha1 byl v přítomnosti a nepřítomnosti Erv14 pozorován i v ER. Přestože jak v buňkách s *ERV14*, tak v buňkách *erv14Δ* se v ER protein Nha1 vyskytuje jak v monomerní, tak i dimerní formě, v buňkách obsahujících Erv14 převažovaly dimery, zatímco v buňkách *erv14Δ* monomery. Je tedy zřejmé, že pro efektivní proces dimerizace v ER je důležitá přítomnost proteinu Erv14. Protein zkrácený o C-konec byl na rozdíl od proteinu Nha1 s C-koncem o celé délce v buňkách s *ERV14* i *erv14Δ* nalezen v ER i PM ve formě monomeru. Je tedy možné, že C-konec proteinu Nha1, který tato zkrácená verze postrádá, hraje roli v oligomerizaci proteinů (Rosas-Santiago et al., 2015). Protein Erv14 by mohl kromě zprostředkování efektivní dimerizace antiporteru Nha1 hrát roli i v zabudování tohoto dimeru do váčku COPII. Tomu odpovídá pozorování, kdy byl protein Nha1 s dlouhým C-koncem v buňkách *erv14Δ* nalezen v plazmatické membráně ve výrazně menším množství, a to pouze v monomerní formě a také bylo možné pozorovat výrazné zadržování antiporteru v ER. Protein v monomerní formě by se mohl dostávat do váčku COPII snáze díky své menší velikosti. Jelikož v oligomerizaci proteinu Nha1 hraje roli C-konec antiporteru, není zkrácená verze Nha1 bez C-konce schopna efektivní oligomerizace, což také znamená, že by nemusela vyžadovat k zainkorporování do váčků COPII přítomnost proteinu Erv14. Tomu odpovídá i shodná lokalizace proteinu Nha1 bez C-konce v buňkách nesoucích Erv14 a v buňkách *erv14Δ*. Vzhledem k výsledkům zde získaným se zkrácenými verzemi proteinu Nha1, kde se ukázalo, že lokalizace ani aktivita verzí Nha1 s C-koncem o délce 249 AK a 137 AK není nepřítomností proteinu Erv14 ovlivněna, je možné, že motiv potřebný pro dimerizaci antiporteru se nachází v druhé polovině jeho C-konce, a proto tyto zkrácené verze Nha1 k exportu z ER Erv14 nevyžadují. K ověření této teorie bude nutné do budoucna zjistit, zda se zkrácené verze ScNha1-680 a ScNha1-568 nachází v PM ve formě dimeru či nikoliv.

## 7.4 Studium funkce, lokalizace a aktivity proteinu Ena1 v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14

V další části diplomové práce jsme chtěli zjistit, zda je úloha proteinu Erv14 v udržování homeostáze kationtů alkalických kovů obecnější, jestli má přítomnost proteinu Erv14 vliv na funkci, lokalizaci či aktivitu ATPázy Ena1. V dřívější studii (Herzig et al., 2012), která se zabývala identifikací proteinů závislých na konkrétním cargo receptoru, nebyla ATPáza ScEna1 identifikována jako náklad cargo receptoru Erv14. V této studii byl však gen *ENA1* umístěn za vlastním inducibilním promotorem, který zajišťuje zvýšení normálně nízké exprese genu *ENA1* v podmínkách s vysokým pH prostředí či v podmínkách se zvýšenou přítomností kationtů alkalických kovů v prostředí. Abychom ověřili, že průchod sekreční dráhou ATPázy Ena1 opravdu není závislý na přítomnosti proteinu Erv14, byl v této práci gen *ENA1* umístěn na mnohokopiovém vektoru za slabým a konstitutivním promotorem genu *NHA1*.

K pokusům byly nejprve využity buňky kmene BYT45 a BYT45 *erv14Δ* transformované plazmidy pGRU1 nesoucími geny kódujícími ATPázu ScEna1 a její homolog z kvasinky *C. glabrata*, *CgEna1*. Pro ověření růstu buněk BYT45 a BYT45 *erv14Δ* s transportéry ScEna1 a *CgEna1* jsme provedli kapkový test na médiu YNB s přídavkem NaCl v rozmezí koncentrací 300 mM – 1500 mM a KCl v rozmezí koncentrací 600 mM – 1800 mM. Jak ATPáza ScEna1, tak i ATPáza *CgEna1* byly v buňkách BYT45 i BYT45 *erv14Δ* funkční a výrazně zvyšovaly toleranci buněk vůči solím v porovnání s buňkami s prázdným vektorem. V růstu buněk BYT45 a BYT45 *erv14Δ* nesoucích transportér ScEna1 či *CgEna1* byl znatelný rozdíl, kdy buňky postrádající Erv14 netolerovaly tak vysoké koncentrace solí, jako buňky, které Erv14 měly. Při ověřování lokalizace těchto proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie v buňkách BYT45 jsme nepozorovali žádný defekt v transportu do membrány ani u ATPázy ScEna1, ani u ATPázy *CgEna1*. V buňkách BYT45 *erv14Δ* ale byla situace odlišná. Ačkoliv ATPáza ScEna1 byla lokalizována stejně jako v přítomnosti proteinu Erv14, bez známek jakéhokoliv zadržování uvnitř buňky, v plazmatické membráně, ATPáza *CgEna1* byla nepřítomností proteinu Erv14 ovlivněna a v buňkách BYT45 *erv14Δ*, ačkoliv byla také lokalizována v plazmatické membráně, byl patrný i slabý fluorescenční signál v perinukleárním ER.

Jelikož Erv14 rozpoznává proteiny na něm závislé pravděpodobně na základě struktury (Herzig et al., 2012), tak nás zajímalo, zda je nějaký rozdíl ve struktuře proteinu ScEna1 a *CgEna1*, který by vysvětlil, proč by mohla být ATPáza *CgEna1* na přítomnosti Erv14

závislá na rozdíl od ATPázy ScEna1. V programu Protter (Omasits et al., 2014) byly vytvořeny na základě sekvence aminokyselin obou proteinů topologické modely. Výsledné topologické modely obou proteinů si jsou velice podobné, liší se ale délkou transmembránových domén. Zatímco protein ScEna1 má všechny transmembránové domény 21 AK dlouhé, tak délky transmembránových domén proteinu CgEna1 jsou různě dlouhé, přičemž nejdelší je tvořena 31 AK. Je tedy možné, že tento rozdíl ve struktuře proteinů by mohl hrát roli v odlišné lokalizaci heterologně exprimovaného proteinu CgEna1 v buňkách *erv14Δ*.

Při dalším studiu jsme pracovali s kmeny BW31 a BW31 *erv14Δ* a zaměřili jsme se pouze na vliv přítomnosti proteinu Erv14 na funkci a lokalizaci ATPázy ScEna1. Nejprve jsme ověřovali lokalizaci proteinu ScEna1 v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ* pomocí fluorescenční mikroskopie, kde jsme obdrželi shodné výsledky s těmi z kmenů BYT45 a BYT45 *erv14Δ*, kdy ATPáza ScEna1 byla nezávisle na přítomnosti proteinu Erv14 lokalizována v plazmatické membráně. Pro studium růstu a transportní aktivity buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* s ATPázou ScEna1 byly tyto buňky transformovány plazmidem YEp352 nesoucím gen kódující ATPázu ScEna1, který není značen na C-konci pomocí GFP, a tudíž není struktura proteinu nijak pozměněna. Nejprve byl testován růst buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* nesoucích ATPázu ScEna1 pomocí kapkového testu na médiu YNB + AHLW s přidavkem NaCl (500 mM – 1800 mM) nebo KCl (600 mM – 1800 mM). V obou kmenech byl transportér funkční a zvyšoval toleranci buněk vůči solím v porovnání s buňkami, které transportér nenesly. Zároveň bylo možné vidět, že je růst buněk BW31 *erv14Δ* s ATPázou ScEna1 na médiu s přidavkem solí zhoršen, oproti růstu buněk BW31 s plazmidem pScENA1, což odpovídá výsledkům získaným v genetickém pozadí BY4741.

Abychom zjistili, zda je horší růst buněk BW31 *erv14Δ* produkujících ATPázu ScEna1 v přítomnosti solí dán horší tolerancí buněk kmene BW31 *erv14Δ* v důsledku delece genu *ERV14*, či jestli je aktivita ATPázy Ena1 delecí genu *ERV14* ovlivněna i přes to, že jsme nepozorovali žádný rozdíl v lokalizaci tohoto proteinu mezi buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ*, měřili jsme výstup sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14Δ* produkujících ATPázu Ena1 pomocí AAS. Jelikož Ena1 umožňuje buňkám růst při vysokých koncentracích solí v prostředí a její aktivita není závislá na pH, bylo nutné buňky inkubovat v médiu s NaCl v koncentraci 600 mM, aby došlo k akumulaci dostatečného množství sodných kationtů v buňkách, jejichž výstup byl následně po dobu 40 minut měřen a vyhodnocován pomocí AAS. Buňky BW31 nesoucí prázdný vektor nevykazovaly během doby měření žádný export

sodných kationtů, což odpovídá očekávání, jelikož tyto buňky nemají žádný transportní systém, kterým by se mohly sodných kationtů zbavovat. U buněk BW31 *erv14Δ* s prázdným vektorem byl ale pozorován mírný pokles v obsahu sodných kationtů na začátku měření a pak už zůstávala jejich hladina konstantní. Buňky BW31 *erv14Δ* nesoucí ATPázu ScEna1 také v průběhu experimentu vyexportovaly o trochu větší množství sodných kationtů, než buňky se shodným transportérem, které *ERV14* nesly. Zajímavé je, že rozdíl v množství vyexportovaných sodných kationtů mezi buňkami BW31 a BW31 *erv14Δ* s prázdným vektorem a BW31 a BW31 *erv14Δ* s ATPázou ScEna1 byl totožný. Je možné, že by mohlo v tomto případě jít spíše o nespecifický únik iontů způsobený zhoršeným stavem buněk v důsledku delece genu *ERV14*, které mají mimo jiné i poškozenou buněčnou stěnu (Sacristan et al. 2013). Tímto experimentem jsme ukázali, že export sodných kationtů z buněk BW31 *erv14Δ* nesoucích protein ScEna1 není zhoršen oproti exportu z buněk BW31 se shodným transportérem, a tudíž se nezdá, že by přítomnost proteinu Erv14 měla vliv na transportní aktivitu ATPázy Ena1. Pokud vezmeme v úvahu výsledky ze všech experimentů, zdá se pravděpodobné, že průchod sekreční dráhou ATPázy Ena1 není závislý na přítomnosti proteinu Erv14.

## 8 Závěr

Tato diplomová práce měla čtyři hlavní cíle. Prvním z nich bylo studovat vliv delece genu *ERV14* na růst buněk kmene W303-1A a BW31 (W303-1A *ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2*) za přítomnosti solí a ověřit, zda se získané výsledky shodují s výsledky již dříve publikovanými pro buňky kmene BY4741 a BYT45. Odstraněním kazety *kanMX* z genomu buněk W303-1A *erv14Δ::kanMX* a BW31 *erv14Δ::kanMX* byly vytvořeny kmeny W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ*. Pro porovnání růstu buněk s delecí genu *ERV14*, W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ*, s růstem buněk, které *ERV14* v genomu mají, W303-1A a BW31, byly měřeny růstové křivky v tekutém médiu a také byl prováděn kapkový test na médiích obsahujících různé koncentrace solí. Zhoršený růst buněk W303-1A *erv14Δ* a BW31 *erv14Δ* oproti buňkám W303-1A a BW31 byl pozorován jak v tekutém médiu, tak na kapkovém testu v přítomnosti solí, což se shoduje s již dříve publikovanými výsledky pro kmen BY4741.

Dalším cílem bylo studovat vliv C-konce antiporteru ScNha1 na jeho lokalizaci, funkci a aktivitu v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu Erv14. K objasnění vlivu C-konce proteinu Nha1 na požadavek proteinu Erv14 jsme využili dva hlavní přístupy. Prvním z nich byla heterologní exprese antiporterů NHA z různých druhů kvasinek, lišících se délkou C-konce, v kmenech BYT45 a BW31 kvasinky *S. cerevisiae*, kde jsme studovali jejich funkci a lokalizaci v buňkách s *ERV14* a buňkách *erv14Δ* pomocí kapkových testů a fluorescenční mikroskopie. Výsledky experimentů ukázaly, že v požadavku na protein Erv14 pro průchod sekreční dráhou by mohla hrát roli délka C-konce antiporteru. Zatímco antiportery NHA z různých druhů kvasinek s C-koncem kratším než 500 AK se zdály být na přítomnosti Erv14 nezávislé, proteiny s C-koncem delším než 500 AK k bezproblémovému průchodu sekreční dráhou cargo receptor Erv14 vyžadovaly. Druhým přístupem, jak se pokusit objasnit vliv C-konce proteinu Nha1 na požadavek proteinu Erv14 bylo vytvoření plazmidů nesoucích geny kódující různé verze proteinu Nha1, lišící se délkou svého C-konce, a studium jejich funkce, lokalizace a aktivity v buňkách BW31 a BW31 *erv14Δ* pomocí kapkových testů, fluorescenční mikroskopie a měření výstupu sodných kationtů z buněk pomocí AAS. Výsledky získané při těchto pokusech, ve shodě s výsledky pokusů s heterologně exprimovanými antiportery NHA z různých druhů kvasinek potvrdily, že to, zda protein Nha1 ke svému průchodu sekreční dráhou vyžaduje protein Erv14 či nikoliv, souvisí s délkou C-konce antiporteru.

Posledním cílem této práce bylo zjistit, zda je přítomností proteinu Erv14 ovlivněn i jiný exportér kationtů alkalických kovů než jen antiporter Nha1, ATPáza Ena1. V buňkách BYT45 a BYT45 *erv14*Δ, případně BW31 a BW31 *erv14*Δ, byla studována pomocí kapkových testů a fluorescenční mikroskopie funkce a lokalizace ATPázy ScEna1 a jejího homologu z *C. glabrata*, CgEna1. Nepřítomnost Erv14 ovlivnila lokalizaci pouze heterologně exprimovaného proteinu CgEna1, nikoliv ScEna1. Měření výstupu sodných kationtů z buněk BW31 a BW31 *erv14*Δ produkujících protein ScEna1 neukázalo, že by nepřítomnost proteinu Erv14 ovlivnila aktivitu ATPázy. Erv14 tak pravděpodobně nepůsobí jako cargo receptor pro tento transportér.

## 9 Použitá literatura

Alepuz, P.M., Cunningham, K.W., and Estruch, F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* 26, 91-98.

Ali, R., Brett, C.L., Mukherjee, S., and Rao, R. (2004). Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem* 279, 4498-4506.

Arino, J., Ramos, J., and Sychrova, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 95-120.

Baines, A.C., and Zhang, B. (2007). Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends Biochem Sci* 32, 381-388.

Banelos, M.A., Ruiz, M.C., Jimenez, A., Souciet, J.L., Potier, S., and Ramos, J. (2002). Role of the Nha1 antiporter in regulating K<sup>+</sup> influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 9-15.

Banelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., and Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144 (Pt 10), 2749-2758.

Barlowe, C.K., and Miller, E.A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193, 383-410.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.

Benito, B., Garciadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A. (2002). Potassium - or sodium - efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* 148, 933-941.

Bertl, A., Slayman, C.L., and Gradmann, D. (1993). Gating and conductance in an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* 132, 183-199.

- Bi, X., Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23. Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell* 13, 635-645.
- Bihler, H., Slayman, C.L., and Bertl, A. (1998). NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 432, 59-64.
- Bihler, H., Slayman, C.L., and Bertl, A. (2002). Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* 1558, 109-118.
- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I., and Stevens, T.H. (2000). The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11, 4277-4294.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Brett, C.L., Donowitz, M., and Rao, R. (2005) a. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C223-239.
- Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., and Rao, R. (2005) b. The yeast endosomal Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* 16, 1396-1405.
- Cagnac, O., Aranda-Sicilia, M.N., Leterrier, M., Rodriguez-Rosales, M.P., and Venema, K. (2010). Vacuolar cation/H<sup>+</sup> antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285, 33914-33922.
- Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., and Blumwald, E. (2007). Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 24284-24293.
- Dancourt, J., and Barlowe, C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev biochem* 79, 777-802.

- D'Arcangelo, J.G., Crissman, J., Pagant, S., Copic, A., Latham, C.F., Snapp, E.L., and Miller, E.A. (2015). Traffic of p24 proteins and COPII coat composition mutually influence membrane scaffolding. *Curr Biol* 25, 1296-1305.
- D'Arcangelo, J.G., Stahmer, K.R., and Miller, E.A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2464-2472.
- de la Pena, P., Barros, F., Gascon, S., Ramos, S., and Lazo, P.S. (1982). The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. The role of potassium. *Eur J Biochem* 123, 447-453.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., and Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 847-853.
- Durell, S.R., and Guy, H.R. (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophys J* 77, 789-807.
- Dutta, D., and Fliegel, L. (2018). Structure and function of yeast and fungal Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporters. *IUBMB Life* 70, 23-31.
- Fairman, C., Zhou, X., and Kung, C. (1999). Potassium uptake through the TOK1 K<sup>+</sup> channel in the budding yeast. *J Membr Biol* 168, 149-157.
- Felcmanova, K., Neveceralova, P., Sychrova, H., and Zimmermannova, O. (2017). Yeast Kch1 and Kch2 membrane proteins play a pleiotropic role in membrane potential establishment and monovalent cation homeostasis regulation. *FEMS Yeast Res* 17.
- Feyder, S., De Craene, J.O., Bar, S., Bertazzi, D.L., and Friant, S. (2015). Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci* 16, 1509-1525.
- Flis, K., Hinzpeter, A., Edelman, A., and Kurlandzka, A. (2005). The functioning of mammalian CIC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochem J* 390, 655-664.

- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *8*, 2848-2859.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Banuelos, M.A., Haro, R., and Rodriguez-Navarro, A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* *236*, 363-368.
- Geva, Y., Crissman, J., Arakel, E.C., Gomez-Navarro, N., Chuartzman, S.G., Stahmer, K.R., Schwappach, B., Miller, E.A., and Schuldiner, M. (2017). Two novel effectors of trafficking and maturation of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Traffic* *18*, 672-682.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* *274*, 546, 563-547.
- Gomez, M.J., Luyten, K., and Ramos, J. (1996). The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* *135*, 157-160.
- Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., and Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* *20*, 7654-7661.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* *24*, 2519-2524.
- Hanscho, M., Ruckerbauer, D.E., Chauhan, N., Hofbauer, H.F., Krahulec, S., Nidetzky, B., Kohlwein, S.D., Zanghellini, J., and Natter, K. (2012). Nutritional requirements of the BY series of *Saccharomyces cerevisiae* strains for optimum growth. *FEMS Yeast Res* *12*, 796-808.
- Haro, R., Garcjadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* *291*, 189-191.
- Hecht, K.A., O'Donnell, A.F., and Brodsky, J.L. (2014). The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cell Logist* *4*, e28023.

Herzig, Y., Sharpe, H.J., Elbaz, Y., Munro, S., and Schuldiner, M. (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biol* 10, e1001329.

Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., and Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167.

HRÁŠKOVÁ, Michaela. *Úloha proteinu Erv14 v buňkách kvasinky Saccharomyces cerevisiae*. Praha, 2016. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, 2016-06-07

Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S., and Young, P.G. (1992). Gene amplification at a locus encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J* 11, 1631-1640.

Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujike, S., Haga, M., Nakamura, N., Inoue, H., Sakajo, S., Ueda, M., Tanaka, A., and Kanazawa, H. (2002). Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (Nha1p). *J Biochem* 131, 821-831.

Kane, P.M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 177-191.

Ke, R., Ingram, P.J., and Haynes, K. (2013). An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol* 9, e1002879.

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.

Kinclova, O., Potier, S., and Sychrova, H. (2001) a. The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes. *J Biotechnol* 88, 151-158.

Kinclova, O., Potier, S., and Sychrova, H. (2001) b. The *Candida albicans* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter exports potassium and rubidium. *FEBS Lett* 504, 11-15.

- Kinclova, O., Potier, S., and Sychrova, H. (2002). Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H<sup>+</sup> antiporters into two subfamilies. *Microbiology* *148*, 1225-1232.
- Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S., and Sychrova, H. (2001) c. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* *40*, 656-668.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Falson, P., Cmunt, D., and Sychrova, H. (2015). A hydrophobic filter confers the cation selectivity of *Zygosaccharomyces rouxii* plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J Mol Biol* *427*, 1681-1694.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Gaskova, D., and Sychrova, H. (2006). The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> - antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* *6*, 792-800.
- Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2006). Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* *49*, 229-236.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Zavrel, M., and Sychrova, H. (2005). Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *J Biol Chem* *280*, 30638-30647.
- Kjellerup, L., Gordon, S., Cohrt, K.O., Brown, W.D., Fuglsang, A.T., and Winther, A.L. (2017). Identification of antifungal H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors with effect on plasma membrane potential. *Antimicrob Agents Chemother* *61*.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. (1990). *TRK2* is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *125*, 305-312.
- Ko, C.H., and Gaber, R.F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *11*, 4266-4273.
- Kojima, A., Toshima, J.Y., Kanno, C., Kawata, C., and Toshima, J. (2012). Localization and functional requirement of yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1p, in the endocytic and protein recycling pathway. *Biochim Biophys Acta* *1823*, 534-543.

- Krauke, Y., and Sychrova, H. (2008). Functional comparison of plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters from two pathogenic *Candida species*. *BMC Microbiol* 8, 80.
- Krauke, Y., and Sychrova, H. (2011). Cnh1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and Ena1 Na<sup>+</sup>-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 11, 29-41.
- Kuhlbrandt, W., Zeelen, J., and Dietrich, J. (2002). Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Science* 297, 1692-1696.
- Kurihara, T., Hamamoto, S., Gimeno, R.E., Kaiser, C.A., Schekman, R., and Yoshihisa, T. (2000). Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11, 983-998.
- Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C.L., and Rivetta, A. (2004). Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J Membr Biol* 198, 177-192.
- Lamb, T.M., Xu, W., Diamond, A., and Mitchell, A.P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* 276, 1850-1856.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996). A pH-sensitive yeast outward rectifier K<sup>+</sup> channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* 271, 4183-4187.
- Loukin, S.H., and Saimi, Y. (2002). Carboxyl tail prevents yeast K<sup>+</sup> channel closure: proposal of an integrated model of TOK1 gating. *Biophys J* 82, 781-792.
- Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., and Rodriguez-Navarro, A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* 273, 14838-14844.
- Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A.M., Aguilera-Romero, A., Martin, M.E., Okano, T., Silva, D.V., Seeberger, P.H., Riezman, H., Funato, K., Goder, V., et al. (2015). COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Curr Biol* 25, 152-162.

- Maresova, L., and Sychrova, H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* 55, 588-600.
- Maresova, L., and Sychrova, H. (2010). Genetic interactions among the Arl1 GTPase and intracellular Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporters in pH homeostasis and cation detoxification. *FEMS Yeast Res* 10, 802-811.
- Maresova, L., Urbankova, E., Gaskova, D., and Sychrova, H. (2006). Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* 6, 1039-1046.
- Maresova, L., Vydareny, T., and Sychrova, H. (2012). Comparison of the influence of small GTPases Arl1 and Ypt6 on yeast cells' tolerance to various stress factors. *FEMS Yeast Res* 12, 332-340.
- Marquez, J.A., and Serrano, R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* 382, 89-92.
- Martinez-Munoz, G.A., and Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 283, 20309-20319.
- Martinez, P., and Persson, B.L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup> - coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258, 628-638.
- Mason, A.B., Allen, K.E., and Slayman, C.W. (2014). C-terminal truncations of the *Saccharomyces cerevisiae* PMA1 H<sup>+</sup>-ATPase have major impacts on protein conformation, trafficking, quality control, and function. *Eukaryot Cell* 13, 43-52.
- Matsumoto, T.K., Ellsmore, A.J., Cessna, S.G., Low, P.S., Pardo, J.M., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 33075-33080.
- McCusker, J.H., Perlin, D.S., and Haber, J.E. (1987). Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 4082-4088.

- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A., and Pardo, J.M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *269*, 8792-8796.
- Michel, B., Lozano, C., Rodriguez, M., Coria, R., Ramirez, J., and Pena, A. (2006). The yeast potassium transporter TRK2 is able to substitute for TRK1 in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* *23*, 581-589.
- Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S., and Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* *21*, 6105-6113.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* *114*, 497-509.
- Miosga, T., Witzel, A., and Zimmermann, F.K. (1994). Sequence and function analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Yeast* *10*, 965-973.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* *191*, 144-148.
- Mitsui, K., Kamauchi, S., Nakamura, N., Inoue, H., and Kanazawa, H. (2004). A conserved domain in the tail region of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) plays important roles in localization and salinity-resistant cell-growth. *J Biochem* *135*, 139-148.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., and Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1p: implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta* *1720*, 125-136.
- Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* *114*, 483-495.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., and Serrano, R. (1999). A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* *19*, 3328-3337.

Nakanishi, H., Suda, Y., and Neiman, A.M. (2007). Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 120, 908-916.

Nakano, A., and Muramatsu, M. (1989). A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 109, 2677-2691.

Nass, R., Cunningham, K.W., and Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* 272, 26145-26152.

Nass, R., and Rao, R. (1998). Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 273, 21054-21060.

Navarrete, C., Petrezselyova, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahradka, J., Arino, J., Sychrova, H., and Ramos, J. (2010). Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 10, 508-517.

Nowikovsky, K., Froschauer, E.M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G., and Schweyen, R.J. (2004). The *LETM1/YOL027* gene family encodes a factor of the mitochondrial K<sup>+</sup> homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* 279, 30307-30315.

Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J., and Schweyen, R.J. (2007). Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* 14, 1647-1656.

Omasits, U., Ahrens, C.H., Muller, S., and Wollscheid, B. (2014). Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30, 884-886.

Oot, R.A., Couoh-Cardel, S., Sharma, S., Stam, N.J., and Wilkens, S. (2017). Breaking up and making up: The secret life of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Protein Sci* 26, 896-909.

Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., and Miller, E.A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr Biol* 25, 403-412.

Papouskova, K., and Sychrova, H. (2006). *Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters with different functions in cell physiology. *FEBS Lett* 580, 1971-1976.

Papouskova, K., and Sychrova, H. (2007) a. Production of *Yarrowia lipolytica* Nha2 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter improves the salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* 52, 600-602.

Papouskova, K., and Sychrova, H. (2007) b. *Schizosaccharomyces pombe* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters differing in their substrate specificity. *FEMS Yeast Res* 7, 188-195.

Persson, B.L., Berhe, A., Fristedt, U., Martinez, P., Pattison, J., Petersson, J., and Weinander, R. (1998). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1365, 23-30.

Petrezselyova, S., Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2012). Vhc1, a novel transporter belonging to the family of electroneutral cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters, participates in the regulation of cation content and morphology of *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *Biochim Biophys Acta* 1828, 623-631.

Petrezselyova, S., Lopez-Malo, M., Canadell, D., Roque, A., Serra-Cardona, A., Marques, M.C., Vilaprinyo, E., Alves, R., Yenush, L., and Arino, J. (2016). Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Ena1 Expression by Calcineurin/Crz1 under High pH Stress: A Quantitative Study. *PLoS One* 11, e0158424.

Petrezselyova, S., Ramos, J., and Sychrova, H. (2011). Trk2 transporter is a relevant player in K<sup>+</sup> supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* 56, 23-28.

Petrezselyova, S., Zahradka, J., and Sychrova, H. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* 114, 144-150.

Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem* 270, 13036-13041.

- Powers, J., and Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila cornichon* gene product. *J Cell Biol* *142*, 1209-1222.
- Powers, J., and Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII - coated transport vesicles. *Mol Biol Cell* *13*, 880-891.
- Pribylova, L., Papouskova, K., and Sychrova, H. (2008). The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporters (ZrNha1p and ZrSod2-22p) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology. *Fungal Genet Biol* *45*, 1439-1447.
- Pribylova, L., Papouskova, K., Zavrel, M., Souciet, J.L., and Sychrova, H. (2006). Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: sequence and structure comparison. *Folia Microbiol* *51*, 413-424.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., and Sychrova, H. (1996). Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *387*, 89-93.
- Proft, M., and Struhl, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* *118*, 351-361.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R., and Pardo, J.M. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett* *471*, 224-228.
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R., and Peña, A. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Bacteriol* *180*, 5860-5865.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., and Rodriguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* *176*, 249-252.
- Ramos, J., Contreras, P., and Rodríguez-Navarro, A. (1985). A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* *143*, 88-93.
- Rao, R., Drummond-Barbosa, D., and Slayman, C.W. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast *PMA1* gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast* *9*, 1075-1084.

Rivetta, A., Kuroda, T., and Slayman, C. (2011). Anion currents in yeast K<sup>+</sup> transporters (TRK) characterize a structural homologue of ligand-gated ion channels. *Pflugers Arch* 462, 315-330.

Roberg, K.J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., and Kaiser, C.A. (1999). *LST1* is a *SEC24* homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 145, 659-672.

Rodriguez-Navarro, A., and Benito, B. (2010). Sodium or potassium efflux ATPase a fungal, bryophyte, and protozoal ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1798, 1841-1853.

Rodriguez-Navarro, A., Quintero, F.J., and Garcíadeblas, B. (1994). Na<sup>+</sup>-ATPases and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in fungi. *Biochim Biophys Acta* 1187, 203-205.

Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Yanez-Dominguez, C., Vera-Estrella, R., Zimmermannova, O., Sychrova, H., and Pantoja, O. (2017). Plant and yeast cornichon possess a conserved acidic motif required for correct targeting of plasma membrane cargos. *Biochim Biophys Acta* 1864, 1809-1818.

Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrova, H., and Pantoja, O. (2015). Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* 1858, 67-74.

Roth, S., Neuman-Silberberg, F.S., Barcelo, G., and Schupbach, T. (1995). *Cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967-978.

Sacristan, C., Manzano-Lopez, J., Reyes, A., Spang, A., Muniz, M., and Roncero, C. (2013). Oligomerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol Microbiol* 90, 252-266.

Schlessler, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M., and Goffeau, A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263, 19480-19487.

- Serra-Cardona, A., Petrezselyova, S., Canadell, D., Ramos, J., and Arino, J. (2014). Coregulated expression of the Na<sup>+</sup>/phosphate Pho89 transporter and Ena1 Na<sup>+</sup>-ATPase allows their functional coupling under high-pH stress. *Mol Cell Biol* 34, 4420-4435.
- Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 22, 51-63.
- Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* 156, 11-14.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., and Fink, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup> -ATPases. *Nature* 319, 689-693.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J.R., and Arino, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* 46, 1319-1333.
- Seto-Young, D., and Perlin, D.S. (1991). Effect of membrane voltage on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266, 1383-1389.
- Sharpe, H.J., Stevens, T.J., and Munro, S. (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* 142, 158-169.
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., and Schekman, R. (2000). Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 151, 973-984.
- Simon, E., Barcelo, A., and Arino, J. (2003). Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett* 545, 239-245.
- Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., and Arino, J. (2001). A screening for high copy suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 276, 29740-29747.

- Stefan, C.P., and Cunningham, K.W. (2013). Kch1 family proteins mediate essential responses to endoplasmic reticulum stresses in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* 288, 34861-34870.
- Stevens, T.H., and Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 779-808.
- Supply, P., Wach, A., and Goffeau, A. (1993). Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268, 19753-19759.
- Sychrova, H., Ramirez, J., and Pena, A. (1999). Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 171, 167-172.
- Utku, N., Bulwin, G.C., Beinke, S., Heinemann, T., Beato, F., Randall, J., Schnieders, B., Sandhoff, K., Volk, H.D., Milford, E., et al. (1999). The human homolog of *Drosophila cornichon* protein is differentially expressed in alloactivated T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1449, 203-210.
- Velkova, K., and Sychrova, H. (2006). The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* 369, 27-34.
- Vergani, P., Miosga, T., Jarvis, S.M., and Blatt, M.R. (1997). Extracellular K<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup> mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K<sup>+</sup> channel encoded by the yeast gene *TOK1*. *FEBS Lett* 405, 337-344.
- Vinton, P.J., and Weinert, T. (2017). A slowed cell cycle stabilizes the budding yeast genome. *Genetics* 206, 811-828.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., and Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58, 409-419.
- Wells, K.M., and Rao, R. (2001). The yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 is an N-linked glycoprotein. Topological implications. *J Biol Chem* 276, 3401-3407.

Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., and Rudolph, H.K. (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14, 3870-3882.

Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., and Serrano, R. (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* 25, 8683-8692.

Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., and Serrano, R. (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 21, 920-929.

Yoshihisa, T., Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259, 1466-1468.

Zhang, Z., Zheng, Y., Mazon, H., Milgrom, E., Kitagawa, N., Kish-Trier, E., Heck, A.J., Kane, P.M., and Wilkens, S. (2008). Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J Biol Chem* 283, 35983-35995.

Zhou, X.L., Vaillant, B., Loukin, S.H., Kung, C., and Saimi, Y. (1995). *YKC1* encodes the depolarization-activated K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett* 373, 170-176.

Zotova, L., Aleschko, M., Sponder, G., Baumgartner, R., Reipert, S., Prinz, M., Schweyen, R.J., and Nowikovsky, K. (2010). Novel components of an active mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Biol Chem* 285, 14399-14414.



Majority  
 HXLP-EXGFPHWQLXATIWPIVCFIIITSIIVHGSSVAVLTLGKXINRMXITMXFTTTT-----TXG--GXSSWMQRLXK  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
**ScNha1** NVVPSKEESKHQQLIACIWPITCFIVITSIIVHGSSVAVITLGRHLNTITLTKFTTHT-----TNGDNGKSSWMQRLPS 472  
**CaCnh1** HHLP-NEDEFHYQLLATIWPIVCFIVITSIIVHGSSVAVLTLGKRLNRMATMSFTTDQ-----EGN--GSGGWMQRLQK 469  
**CdCnh1** HHLP-SKDFPHYQLLATIWPIVCFIVITSIIVHGSSVAVLTLGKRLNRMATMSFTTDQ-----EG--GGGWMQRLQK 468  
**CgCnh1** NVVPEVEBTEHWQLIATIWPTICFFIITSIIVHGSSVAVITLGRHLNTVTLTKFTTHT-----TNG--NGKSSWMQRLPS 471  
**CpCnh1** HEVP-GKGFPHDQLLVAIWPLVCFIVITSIIVHGSSVAVLTLGKRLNRMATMSFTATNGETSTGGG--GGSNMMQRLQK 474  
**DhNha1** ALLP-ENNFHYQLLACIWPVCFIVITSIIVHGSSVAVLTLGKRLNRMATMSFTTN-----TQD--QGSPWMSRLQK 469  
**YINha1** EDWP-KEGQPNWLAVQTIWVCTFLIISIVVHGSSLEVFFLGKRVSNLSITINSTTTA-----GD--ESHMMISRLPG 467  
**YINha2** HTYD-----EHW-LITVMYPLVYFLILSSVVVHGITLPSVMLGKQLP-TTLSRTMTMTTR----- 444  
**ZrNha1** EILP-EKGSKHQIWIWPIVCFILTSIIVHGSSVAVITLGRHLNTITLTKFTTNT-----TNG--NGKSSWMQRLPA 470

Majority  
 LDKAGRSFSLHRVDTMAP-----E-----VETSGIKVRPAGGAKRR---KKKKR---  
 490 500 510 520 530 540 550 560  
**ScNha1** LDKAGRSFSLHRMDTQMTLSGDEGEAEEGGGRKGLAGGEDDEGLNNDQIGSVATSGIPARPAGGMPRRRKLRSRKEKRLNR 552  
**CaCnh1** LDRATTSFSLHRVDTMAPT-----EKSQ-----PETTGKVRPTGGAKRK---KNH--- 512  
**CdCnh1** LDRATTSFSLHRVDTMAP-----QELQ-----PETSIGIKVCPAGGAKRK---KKHGR--- 512  
**CgCnh1** LDKSGRSFSLHRVDTSATNETIHETEPD-----ELKQNDTMEDYSGVITSGKPVRAAGMRRR---VTRKKKKSRG 540  
**CpCnh1** LDRANTSFSLHRVDTMAPD-----EKEEQ-----PDEQEQTQLPETSIGIKVRPAGGAKRR---KKKRRSQK 532  
**DhNha1** LDKASTFSLHRIDTQAPS-----TEKG-----HKLQQSNTVETSGIKVRPAGGAKRR---KHKKRRDP 525  
**YINha1** IGDNGRTISISRVDTREP-----G-MITFGEKRLAKQRERE---AQTEKHGDE 512  
**YINha2** -----SFSRSRSASRDR-----TPRDPFGHVKID----- 468  
**ZrNha1** LEKSGRSFSLQVRDTEAP-----SFSGQTAVETSGVPTPAGGMKRG---RKNRRNKR 520

Majority  
 R-----XKSLSRN--XX--DDELXX-XGRERPOAEKQLQGGTFA-----XTNE-----X--X  
 570 580 590 600 610 620 630 640  
**ScNha1** RQKLRNKGREIFSSRSKNEMYD--DDELND-LGRERLQKEKEARAATFALSTAVNTQRNEEIGMGDEEEDYTPPEKEYS 629  
**CaCnh1** -----RDD-----RTPEAQILQLGG-----NKTPPE----- 533  
**CdCnh1** -----IKSLSRV--AT-KDDE----KRAPPAAQFLQLGSRTS-----EHETST----- 548  
**CgCnh1** R---KHAERLMRKTTEKLNPMFPGGYDDELND-LGREKQLQLEKEAEAGTFALG-----RKN-----WPNADND 597  
**CpCnh1** P-----GLIQKTLRSV--TS-GDEKTH-QPRHRPHQEVLLQLGGGSQ-----QQQQQNS--PTKSTISTSSEPEVTA 594  
**DhNha1** R-----SRLKKSLSRASADS-EAIDEIVP-SQRHKQAEFLQLGRTPSTA--IRTPSDEES--EPESAVGIDNSKEDFD 592  
**YINha1** ANISSESTAKQRKPRRRMSKDEPVNQPLSLGQGRGHEIDTFVEGDHVIQ-----ENDD--G-----DIVAEYD 574  
**YINha2** ----- 468  
**ZrNha1** R-----KELLHVLVSGNGTNE---EELND-LGRERLQREKEARAATFALSTAANRGTNKDTLEAEGQTGGSDSTEQVA 589

Majority  
 X-KXSSSSXX-----LAXPN-XTSGRSYX-----EKXX-----  
 650 660 670 680 690 700 710 720  
**ScNha1** DNYNTPSFESSERS-----SSLRGRTYVPRNRDYGEE-----TES-----EIESEDEMENESERSMA 682  
**CaCnh1** --PESADT-----LAIEN-KTSGLSAFG-----EKPP----- 558  
**CdCnh1** --KESSDNN-----LAVEN-KTSGLSEYG-----EKQP----- 574  
**CgCnh1** DDADGSP-----HTVIGTSSIGSDQYD-----EE-----KVDSRHSLESTQ----- 633  
**CpCnh1** EVKNSSSSTEGEH-----LLDNEKTSKGSQYG-----QRS----- 625  
**DhNha1** DSPGSSNSIEVVANEDQGRMVFAVPPYDSDHGRVEQD-----EDQDN----- 633  
**YINha1** QEKAGSSSGTDGDD-----QSPHITDRRHSHEFN-----VAAGG----- 608  
**YINha2** -----AISN----- 472  
**ZrNha1** SNEPTKSDIDIMNREET--VHAISGLDELARDREHGEINLIEGGGEEEDLGAISTPRSQTTEDIDEKLSRRESEGTGSR 666

Majority  
 -----XXXEEEPVPTVAYOEGDQLIILEDQXGEIXXXLKLXX-----PX-----  
 730 740 750 760 770 780 790 800  
**ScNha1** SSEERRIRKMKEEEMKPGTAYLDGNRMIIENKQGEIINQVDIED-----RNEARD----- 732  
**CaCnh1** -----TKAEKAPVPTVAYQDGDQVILEDQYGEVMENIKLTK-----PVRAP----- 600  
**CdCnh1** -----TKAEKAPVPTVAYQDGDQVILEDQYGEVMETLKLTRK-----PK--P----- 614  
**CgCnh1** SEKERKLAELEKQEE'PHVAYAEGNKIIFENKQGEIIDEAKLNSP-----SDEEAQ----- 684  
**CpCnh1** -----RPEVPVPTVAYQEGDNIILEDQFGEIMDNLTLGKRGEAVEKRRKSQSSNAPVSSPGVASVAAAAAADDQ 695  
**DhNha1** GKVSFARNAMEGRKSVPTAFQEGEKIILEDQAGEIITETLPLKSLQ-----GQPN----- 684  
**YINha1** -----HHHLHHERVKAVAYKIDDELIVENEDGDLKRYKIRQ----- 645  
**YINha2** -----PTDLRQNIHVVDSESG----- 487  
**ZrNha1** SAESERMRKIRBEEBQAHVAYAEDDQLIVENAEGEVIDEARYNKP-----RKDEEHGL----- 719

