

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie



Mgr. Hana Elicharová

Homeostáze kationtů alkalických kovů patogenních kvasinek rodu *Candida*
Alkali-metal-cation homeostasis in pathogenic *Candida* species

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.
Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Praha, 2016

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

Datum:

Podpis:

Tato práce vznikla v letech 2010-2016 ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i. za podpory:

- MŠMT: LC531 Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek (2004–2011)
- GA ČR: GAP302/12/1151 Vnitrobuněčné pH a homeostáze kationtů alkalických kovů ve virulenci a pathogenicitě kvasinek rodu *Candida* (2013–2015)
- EU FP7: PITN-GA-2013-606786 ImResFun Molecular Mechanisms of Human Fungal Pathogen Host Interaction (2013–2017)
- GA ČR: 16-03398S Transportéry patogenních kvasinek rodu *Candida* jako možný cíl vývoje nových antimykotik (2016–2018)

Výsledky byly publikovány ve čtyřech odborných člancích:

1. Elicharová, H. and H. Sychrová (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Medical Mycology*, 51: 785-794.
2. Elicharová, H. and H. Sychrová (2014). Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*. *Microbiology*, 160: 1705-1713.
3. Hušeková, B., H. Elicharová and H. Sychrová (2016). Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 394-401.
4. Elicharová, H., B. Hušeková and H. Sychrová (2016). Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow039

Poděkování

Bez vedení, podpory a dobré vůle mé školitelky Hany Sychrové by tato práce nikdy nemohla vzniknout a za to jí patří můj dík.

Další dík patří všem mým současným i bývalým kolegům, kteří mi vždy pomáhali, ale především vytvářejí prostředí, kam se ráda vracím.

Chtěla bych též poděkovat Pavlu Srbovi, který mi ukázal (ještě než se stal mým manželem), že se nemám bát zkusit „dělat vědu, když Tě to baví“. Po celou dobu byl se mnou a naučil mě spoustu věcí.

Moji rodiče mě vychovali, podporovali, báli se o mě a já jim dnes rozumím lépe, neboť dnes nám statečně (spolu s rodiči Pavla) pomáhají vychovávat naše dcery Marušku a Bětušku. Za to jim patří můj dík.

Abstrakt

Kvasinky rodu *Candida* jsou oportunní patogeny schopné vyvolat závažné systémové infekce u imunokompromitovaných pacientů. Virulence jednotlivých druhů kandid závisí mimo jiné na jejich odolnosti vůči proměnlivosti vnějšího prostředí. Udržování homeostáze kationtů alkalických kovů, čili na jedné straně schopnost akumulovat dostatečné množství draselných iontů a na straně druhé úspěšně čelit jejich vysoké extracelulární koncentraci, je nezbytné pro růst a virulenci kandid.

V rámci této práce jsme popsali souvislost mezi tolerancí k solím a rezistencí k flukonazolu u šesti druhů kandid a možný mechanismus této interakce. Flukonazol hyperpolarizuje plasmatickou membránu buněk kandid a zvyšuje tak nespecifický vstup kationtů alkalických kovů do buňky, čímž výrazně narůstá citlivost kandid k solím těchto kationtů. Popsaný mechanismus má obecnou platnost, neboť flukonazol zvyšuje senzitivitu kandid i k dalším kladně nabitým látkám, které vstupují do buňky v závislosti na velikosti membránového potenciálu.

Účinek flukonazolu na membránový potenciál a tedy i na vstup kationtů alkalických kovů do buňky obrátil naši pozornost k homeostázi draselných kationtů, jejichž relativně vysoká vnitrobuněčná koncentrace a tedy i jejich dostatečný import do buňky je zásadní pro růst a virulenci kandid. Navíc dosud známé kvasinkové importéry K^+ , které za zásobení buňky K^+ zodpovídají, nemají homolgy v lidském genomu a mohly by tak být slibnými cíli pro nová antimykotika.

Vyhledali jsme proto v genomech devíti druhů rodu *Candida* geny kódující potenciální importéry K^+ a predikovali jejich topologii. Následně jsme pak porovnali růst šesti druhů kandid na limitně nízké koncentraci K^+ . Zaznamenali jsme inhibici růstu všech šesti druhů kandid, jejíž míra se však u jednotlivých druhů liší. Nakonec jsme charakterizovali importéry K^+ , kterými disponuje *C. albicans*, za podmínek heterologní exprese v kmeni *S. cerevisiae* *trk1Δtrk2Δ* postrádajícím vlastní importéry K^+ . Všechny tři importéry K^+ patřící *C. albicans* jsou za těchto podmínek schopny zajistit dostatek K^+ pro růst a dělení buněk *S. cerevisiae* *trk1Δtrk2Δ* a všechny tak mají potenciál podílet se na importu K^+ v *C. albicans*.

Abstract

Several tens of *Candida* species belong to the opportunistic human pathogens capable of inducing life-threatening infections in immunocompromised patients. Virulence of single *Candida* species depends among others on their resistance to the variable external conditions. The maintenance of alkali-metal-cation homeostasis, which means the ability to accumulate sufficient amount of potassium cations and on the other hand to survive under high extracellular concentrations of alkali-metal cations, is essential for growth and virulence of *Candida* cells.

We observed the negative effect of fluconazole (FLC) on salt-tolerance of six *Candida* species and found that it is independent of the species level of FLC-resistance. FLC hyperpolarizes plasma membrane of *Candida* cells and therefore increases non-specific uptake of alkali-metal cations which results in strongly increased salt-sensitivity of *Candida* cells. The FLC-induced hyperpolarization also results in an increased sensitivity of *Candida* cells to the antifungals which are positively charged and are driven into the cells by the membrane potential.

The effect of fluconazole on membrane potential and thus on the uptake of alkali-metal cations into the cell turned our attention to the homeostasis of potassium cations whose high intracellular concentration is crucial for growth and proliferation of all cells (including *Candida* species). Moreover, already characterized yeast K^+ -importers, which are responsible for K^+ -supply, have no homologues in human genome thus they could serve as promising targets for new antifungals.

We identified genes encoding putative K^+ -importers in genomes of nine *Candida* species and predicted their topology. Then we compared the growth of six species on extremely low K^+ -concentrations and observed that the species-specific level of inhibition with the number of genes for putative K^+ -importers does not correlate. Finally, we characterized the K^+ -importers of *C. albicans* by heterologous expression in *S. cerevisiae* *trk1* Δ *trk2* Δ strain lacking its own K^+ -importers. All three *in silico* *C. albicans* K^+ -importers are able to provide *S. cerevisiae* *trk1* Δ *trk2* Δ cells with sufficient amount of K^+ for their growth and proliferation, and therefore all of them probably participate in import of potassium cations in *C. albicans*.

Obsah

1	Úvod a cíle práce	15
2	Literární přehled	17
2.1	Kvasinky	17
2.1.1	<i>Candida albicans</i>	21
2.1.2	<i>Candida dubliniensis</i>	25
2.1.3	<i>Candida tropicalis</i>	25
2.1.4	<i>Candida parapsilosis</i>	25
2.1.5	<i>Candida guilliermondii</i>	26
2.1.6	<i>Candida lusitaniae</i>	27
2.1.7	<i>Candida krusei</i>	27
2.1.8	<i>Candida glabrata</i>	27
2.2	Homeostáze kationtů alkalických kovů	28
2.2.1	Membránový potenciál	31
2.2.2	Import kationů alkalických kovů	34
2.2.3	Export kationů alkalických kovů	38
2.2.4	Intracelulární transport kationů alkalických kovů	42
2.3	Antimykotická léčba	44
2.3.1	Azoly	48
2.3.2	Allylaminy, thiokarbamáty a morfoliny	51
2.3.3	Polyeny	52
2.3.4	Echinokandiny	53
2.3.5	Ostatní antimykotika	54
2.3.6	Rezistence k antimykotikům	55
3	Použité metody	59
4	Výsledky	61
4.1	Publikace č. 1 - Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of <i>Candida</i> cells	63
4.2	Publikace č. 2 - Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of <i>Candida glabrata</i>	77
4.3	Publikace č. 3 - Pathogenic <i>Candida</i> species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations	91

4.4	Publikace č. 4 - Three <i>Candida albicans</i> potassium uptake systems differ in their ability to provide <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>trk1trk2</i> mutants with necessary potassium	103
4.5	Autorský podíl	116
5	Závěry a diskuze	117
6	Zkratky	121
7	Použitá literatura	123

1. Úvod a cíle práce

Každý pátý z asi 1400 dosud popsaných lidských patogenů patří do říše *Fungi*, což ji činí druhou nejpočetnější skupinou po bakteriích. Patří sem i několik desítek druhů kvasinek rodu *Candida*, které jsou oportunní patogeny schopné vyvolat závažné systémové infekce (kandidémie) u silně imunokompromitovaných pacientů, jejichž mortalita dosahuje řádově desítek procent (Pfaller et al., 2014).

Virulence jednotlivých druhů kandid závisí mimo jiné na jejich odolnosti vůči různým druhům stresu. Udržování homeostáze kationtů alkalických kovů, čili schopnost na jedné straně akumulovat dostatečné množství draselných kationtů a na druhé straně úspěšně čelit vysoké extracelulární koncentraci nejen kationtů draselných, ale i sodných a lithných, je důležitá např. pro morfogenezi či adhezenci *C. albicans* (Watanabe et al., 2006).

Dalším neméně důležitým faktorem je rezistence jednotlivých druhů k antimykotikům. V předkládané práci jsme se zaměřili na rezistenci k flukonazolu (FLC), který je díky svým výborným farmakokinetickým vlastnostem stále lékem volby v profylaxi kandidémií imunokompromitovaných pacientů a jehož masivní zavedení do terapie v 80. letech 20. stol. mělo za následek vzestup incidence druhů kandid k flukonazolu rezistentních (Pappas et al., 2009).

Předkládaná práce navazuje na dříve publikované výsledky naší skupiny, které charakterizovaly toleranci některých patogenních druhů kandid k solím alkalických kationtů a popsaly vliv přítomnosti flukonazolu na toleranci FLC-senzitivního i FLC-rezistentního kmene *C. albicans* k NaCl (Krauke and Sychrova, 2008; Kolečka et al., 2009; Krauke and Sychrova, 2010). Proto byly první cíle předkládané práce stanoveny následovně:

- Podrobně charakterizovat toleranci patogenních druhů kandid k solím různých alkalických kovů a k flukonazolu
- Sledovat vliv flukonazolu na toleranci kandid k solím a hodnotit jeho účinky zejména z hlediska rezistence jednotlivých druhů k FLC i k solím
- Objasnit mechanismus jakým flukonazol ovlivňuje toleranci kandid k solím a tím i homeostázi kationtů alkalických kovů

Výsledky první části práce ukázaly, že FLC zasahuje homeostázi kationtů alkalických kovů na úrovni vstupu kationtů do buňky. Zásobit buňku dostatečným množstvím draselných kationtů je jednou z podmínek pro růst kandid a tedy i rozvoj infekce, kdy při výskytu v plasmě či na sliznicích hostitele se kandidy vyrovnávají s nedostatkem K^+ . Proto jsme stanovili další cíle se záměrem charakterizovat

importéry, které u kvasinek zodpovídají za zásobení buňky K^+ . Doposud známé typy kvasinkových importérů K^+ nemají homology v lidském genomu (Benito et al., 2004; Ramos et al., 2011) a mohly by tak sloužit jako cíle nových antimykotik. Cílem druhé části práce bylo:

- V genomech patogenních druhů kandid identifikovat geny pro předpokládané importéry K^+ a pomocí nástrojů bioinformatiky je klasifikovat a odhadnout jejich topologii
- Charakterizovat růst kandid na limitně nízké koncentraci draselných kationtů za různých podmínek
- Vybrané transportéry K^+ charakterizovat pomocí heterologní exprese v kmeni *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ*, který postrádá vlastní draselné importéry

2. Literární přehled

2.1 Kvasinky

Kvasinky je souhrnné označení pro jednobuněčné houbové organismy množící se převážně pučením. Většina druhů patří do subphyla *Saccharomycotina* (phylum *Ascomycota*), včetně kvasinek rodu *Candida*, které stojí ve středu pozornosti předkládané práce.

Kvasinky obývají takřka všechny známé biomy, čemuž odpovídá i jejich velmi široká genetická a tím i metabolická různorodost. Nalezneme mezi nimi několik desítek druhů vykazujících silný Crabtreeho efekt (inhibice respirace v přítomnosti vyšších koncentrací glukózy) a podílejících se na kvasných procesech (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* a další), komenzály žijící v trávicím traktu xylofágních brouků, kteří jsou schopni fermentovat xylózu (*Scheffersomyces*, *Spathaspora*), kryo-, xero-, osmo- a halotolerantní kvasinku *Debaryomyces hansenii* žijící ve vysoce slaných vodách a v neposlední řadě i oportunně patogenní kvasinky rodu *Candida*.

Nejhojněji a nejdéle se různé druhy kvasinek využívají v potravinářském průmyslu při produkci kvašených nápojů, mléčných výrobků, v pekařství, při výrobě dochucovadel (sójová omáčka, miso), během fermentace čajových lístků, kávových zrn, vanilkových i kakaových lusků (Tamang et al., 2016). Mnoho druhů kvasinek našlo uplatnění v biotechnologiích a např. výroba některých tzv. biofarmaceutických léčiv a vakcín (např. hirudin, prekursor inzulinu, hepatitis surface antigen) by bez použití kvasinek nebyla možná (Nielsen et al., 2013).

V základním molekulárně biologickém výzkumu sehrály nezastupitelnou roli dva kvasinkové modelové organismy *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*, jejichž studium vedlo k objasnění mnoha klíčových biologických procesů eukaryotických buněk (např. replikace DNA, buněčný cyklus, rekombinace); (Yanagida, 2002; Karathia et al., 2011).

Na základě analýzy genomů 86 druhů patřících k subphylu *Saccharomycotina* se podařilo určit jejich vzájemné fylogenetické vztahy (Obr. 1); (Hittinger et al., 2015). V současnosti jsou za dvě nejvýznamnější větve považovány WGD a CTG. Ke skupině WGD (Whole Genome Duplication) patří druhy, u jejichž společného předka došlo k duplikaci genomové DNA následované delecí jednotlivých genů či částí chromozomů a translokacemi mezi chromozomy (Wolfé and Shields, 1997). Podle nově popsáného scénáře byla příčinou duplikace genomové DNA mezidruhovú hybridizace následovaná zdvojením genomové DNA, což vedlo ke stabilizaci genomu a udržení fertility nového druhu (Marcet-Houben and Gabaldon, 2015). K větvi

CTG pak patří druhy, které při translaci interpretují kodon CUG místo kanonického leucinu jako serin.

Rod *Candida* zahrnuje přibližně 200 druhů, z nichž se asi 30 počítá mezi lidské patogeny (Miceli et al., 2011). Většina druhů je soustředěna do větve CTG, nicméně zástupce rodu *Candida* nalezneme i ve větvi WGD (*C. glabrata*) a také mimo tyto dvě fylogeneticky významné skupiny (*C. krusei*). Všechny druhy studované v předkládané práci a *S. cerevisiae* jakožto modelový organismus jsou v Obr. 1 zvýrazněny hvězdičkou.

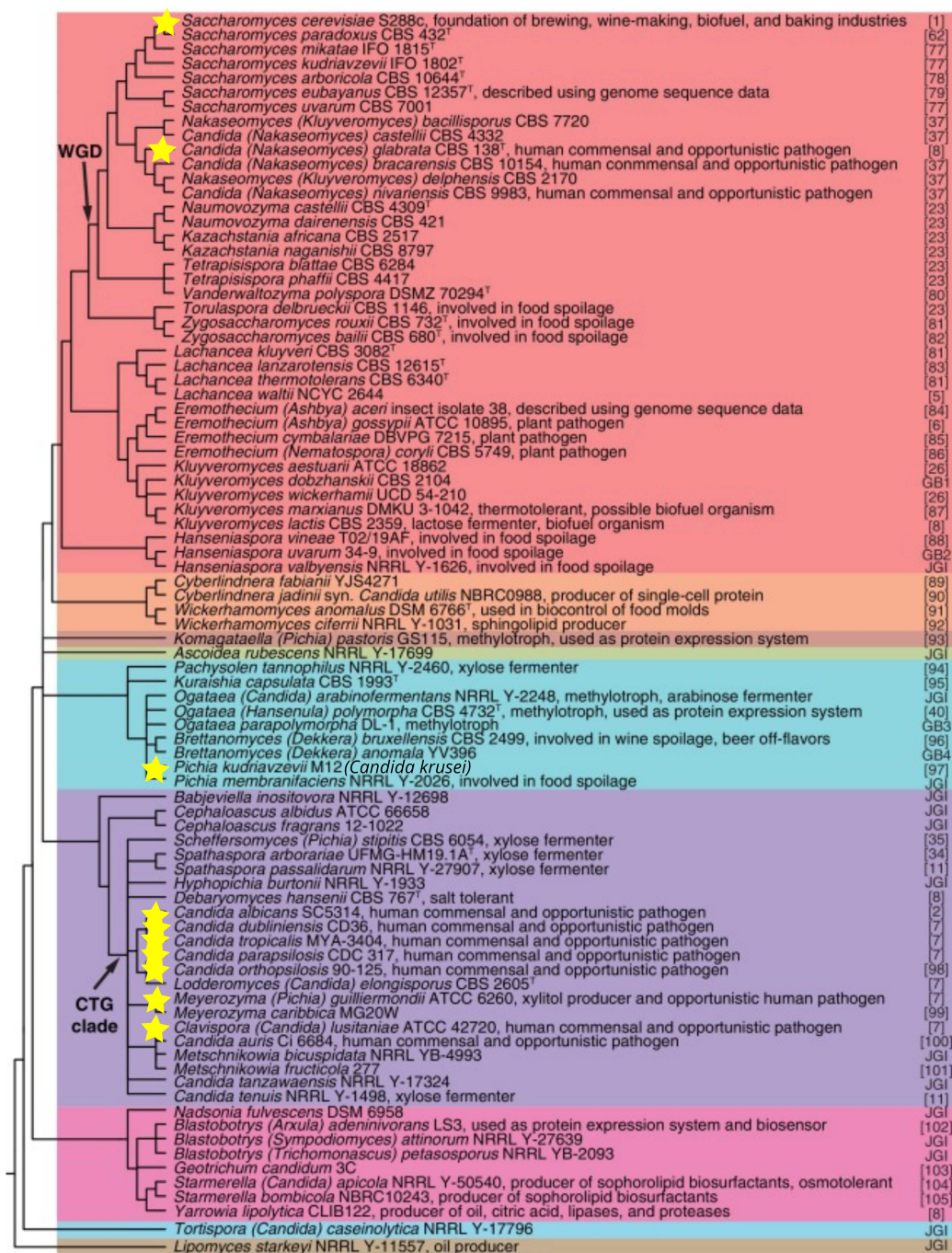
Kvasinky rodu *Candida* jsou běžnou součástí lidské mikroflóry kůže, sliznic dutiny ústní, trávicího a urogenitálního ústrojí. Při oslabení imunity hostitele kandidy často způsobují lokální infekce postihující především sliznice, ale i kůži a nehty. Rizikové faktory povrchových infekcí jsou dětský věk, diabetes mellitus, léčba širokospektrými antibiotiky či dieta vedoucí ke změnám ve střevní mikroflóře (Trofa et al., 2008; Quindos, 2014).

Druhým typem onemocnění vyvolaných kandidami jsou systémové invazivní infekce souhrnně nazývané kandidémie, jež jsou silně vázané na nemocniční prostředí. Jedná se o čtvrtou nejčastější nozokomiální systémovou infekci a současně kandidémie tvoří 85 % všech invazivních mykoinfekcí (Tortorano et al., 2006; Quindos et al., 2008). Incidence kandidémií se v Evropě pohybuje mezi 1,5 – 4,5 %, mortalita mezi 15 – 35 % (Guinea, 2014). Tyto systémové infekce propukají u pacientů se závažně porušenou imunitou nejčastěji v důsledku předchozího léčebného zásahu. Nejvíce ohroženi jsou pacienti podstupující transplantaci či onkologičtí pacienti podstupující agresivnější formy chemoterapie. Další rizikovou skupinu tvoří nezralí novorozenci s nízkou porodní hmotností a pacienti s primární poruchou imunity (např. AIDS); (Ruhnke, 2006).

Pouze pět druhů kandid vyvolává 92 % všech kandidémií, kdy incidence jednotlivých druhů se v různých částech světa liší. Obecně nejčastějším původcem systémových infekcí (40-60 %) zůstává *C. albicans*. V severní Evropě a v USA je druhým nejčastějším druhem *C. glabrata* naproti tomu ve Španělsku a Brazílii *C. parapsilosis* (včetně poddruhů *C. metapsilosis* a *C. orthopsilosis*). Další dva významné druhy dělí se o třetí až pátou pozici v závislosti na regionu jsou *C. krusei* a *C. tropicalis* (Pfaller et al., 2010). Všechny výše zmíněné druhy jsou zahrnuté v předkládané práci. Mezi raritní původce systémových infekcí, které byly rovněž studovány, patří *C. lusitanae*, *C. dubliniensis* a *C. guillierdermondii*.

V ČR je zastoupení jednotlivých druhů podobné. Dominantním druhem je *C. albicans* (50 %), následují *C. parapsilosis* (13,5 %) a *C. glabrata* (12,6 %) s téměř stejnou incidencí a *C. tropicalis* (10, 5 %); (Jurčová, 2015).

Taxonomie kvasinek doznala v posledních letech výrazných změn, zejména pod tlakem nových možností identifikace druhů na základě analýzy DNA. Původní



Obrázek 1: Fylogenetické vztahy mezi 86 druhy kvasinek, které patří do subphyla *Saccharomycotina*. Druhy studované v předkládané práci jsou označeny hvězdičkou; upraveno podle Hittinger et al. (2015)

taxonomická metodika používala různá jména pro sexuální a asexuální formu téhož organismu (např. *Candida famata* – *Debaryomyces hansenii*; *Candida kefyra* – *Kluyveromyces marxianus*). XVIII. Mezinárodní botanický kongres v roce 2011 tuto praxi zrušil a formuloval nová taxonomická pravidla, podle kterých organismy dříve označované dvěma jmény by nově měly mít jméno jen jedno, přičemž při výběru nového jména je přihlíženo zejména k používanosti jednotlivých označení (Brandt and Lockhart, 2012). Tabulka 1 uvádí v současnosti platná označení námi studovaných druhů doplněná o jména synonymní a přehled jmen používaných v této práci. Všechny druhy zahrnuté v předkládané práci nesou rodové jméno *Candida*, jak je doposud obvyklé v literatuře orientované na klinický význam těchto lidských patogenů.

Základní charakteristiky jednotlivých druhů jsou popsány dále a shrnuty v Tabulce 2 na str. 30.

Tabulka 1: Přehled platných jmen a synonym podle (C. P. Kurtzman, 2011)

platné jméno	jméno použité v předkládané práci	synonyma
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida stellatoidea</i> <i>Monilia psilosis</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dublinionesis</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Procandida tropicalis</i> <i>Oidium tropicale</i> <i>Mycotorula tropicalis</i> <i>Monilia tropicalis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Mycotorula parapsilosis</i> <i>Mycocandida parapsilosis</i> <i>Monilia parapsilosis</i>
<i>Candida metapsilosis</i>	<i>Candida metapsilosis</i>	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	-
<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i> <i>Clavispora imtechensis</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Yamadazyma guilliermondii</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Candida acidothermophilum</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Torulopsis glabrata</i> <i>Cryptococcus glabratus</i> <i>Nakaseomyces glabrata</i>

2.1.1 *Candida albicans*

Nejstarší zmínka o *C. albicans* pochází z Hippokratova díla Corpus Hippocraticum (asi 400 př. n. l.), kde jsou popsány příznaky infekce dutiny ústní vyvolané zřejmě tímto druhem (Higgs, 1973). *C. albicans* je běžnou součástí mikrobiomu trávicího traktu, vyskytuje se též na kůži a sliznicích dutiny ústní i urogenitálního ústrojí. Je nejčastějším původcem jak povrchových zánětů, tak systémových sepsí s potenciálem napadnout v podstatě kterýkoliv tělní orgán. Mortalita kandidemií způsobených *C. albicans* u imunokompromitovaných pacientů se pohybuje mezi

46-75 % (Pfaller and Diekema, 2007; Pfaller et al., 2010; Guinea, 2014; Pfaller et al., 2014).

Jednou z nejvýznamnějších charakteristik *C. albicans* je její polymorfismus – doposud bylo popsáno šest různých morfologií, ve kterých se *C. albicans* vyskytuje (Obr. 2). Během rozvoje infekce zaujímá *C. albicans* především podobu kvasinkové buňky a hyf (polyjaderná kontinuální vláknitá forma). Přechod mezi těmito nejlépe prostudovanými stavy ve směru kvasinka – hyfa je indukován v podmínkách, které připomínají vnitřní tělní prostředí (např. $\text{pH} > 7$, $t \approx 37^\circ\text{C}$, vyšší koncentrace CO_2); (Mayer et al., 2013). *C. albicans* ve formě jednotlivých pučících kvasinkových buněk, které se též označují jako bílé (white cells) podle barvy jimi tvořených kolonií, je přítomna ve všech fázích rozvoje infekce. V této formě nejčastěji diseminuje do krevního oběhu a následně napadá vnitřní orgány. Naproti tomu hyfální podoba je jednoznačným indikátorem počínající invaze *C. albicans* do hostitelského organismu (Saville et al., 2003).

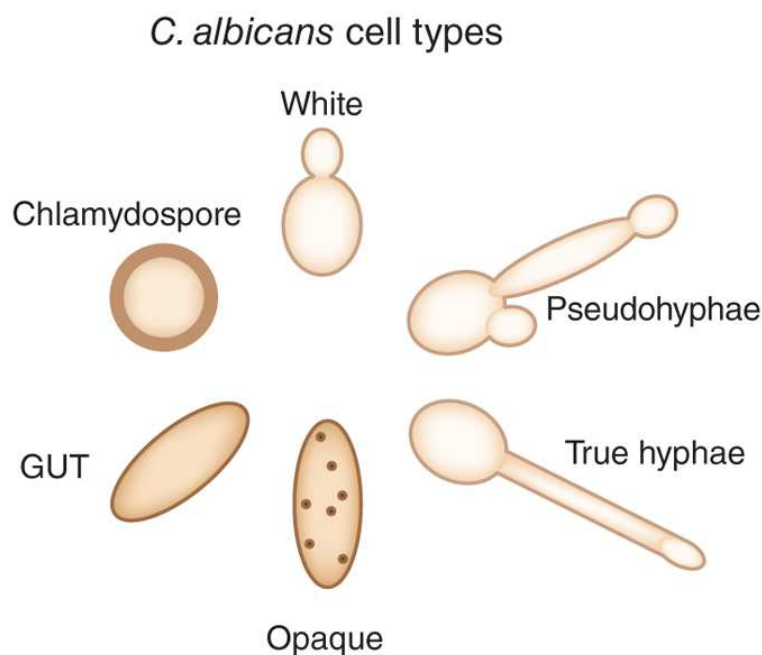
Dalším důležitým faktorem pro virulenci *C. albicans* je schopnost adheze a invaze. Buňky tohoto druhu disponují sadou proteinů (adhezinů), které přímo umožňují vysokou adhezi k buňkám hostitele, k abiotickým povrchům (tělní katétry), k ostatním mikroorganismům i k dalším buňkám *C. albicans*. Nejlépe prostudovaný je soubor osmi povrchových glykoproteinů Als, které jsou esenciální pro adhezi hyf. Dále je známý adhezin Hwp1, který vytváří kovalentní vazby s povrchovými enzymy savčích buněk (Mayer et al., 2013).

Invaze do hostitelských buněk probíhá dvěma způsoby. První je pasivní proces indukované endocytózy, kdy buňky *C. albicans* exprimují na svém povrchu tzv. invaziny, jejichž vazba na příslušné struktury hostitelských buněk vede k jejich endocytóze do buněk hostitele. Druhým způsobem je aktivní penetrace plasmatické membrány hostitelských buněk hyfami, které dokáží působit na povrch buňky hostitele značnou silou. Penetrace je usnadněna sekrecí proteáz Sap narušujících povrch hostitelské buňky.

Polymorfismus a schopnost adherence k rozličným povrchům využívá *C. albicans* k tvorbě biofilmu. Jako první se přichytí na sliznici nebo tělní katétr kvasinkové buňky, které prolifерují a mění se v hyfy. Ty dále expandují za produkce extracelulární matrix, která se hromadí a zvyšuje odolnost *C. albicans* k imunitní obraně hostitele i k antimykotikům (Thompson et al., 2011).

Další morfologickou formou *C. albicans* jsou pseudohyfy, což jsou vlákna složená z pevně spojených avšak striktně oddělených buněk. Tato forma se u *C. albicans* vyskytuje mnohem méně než pravé hyfy a její význam pro virulenci zůstává nejasný (Thompson et al., 2011).

Podobně nejasný je i význam chlamydospor – další morfologické podoby *C. albicans*. Chlamydospory jsou velké kulaté buňky chráněné silnou buněčnou

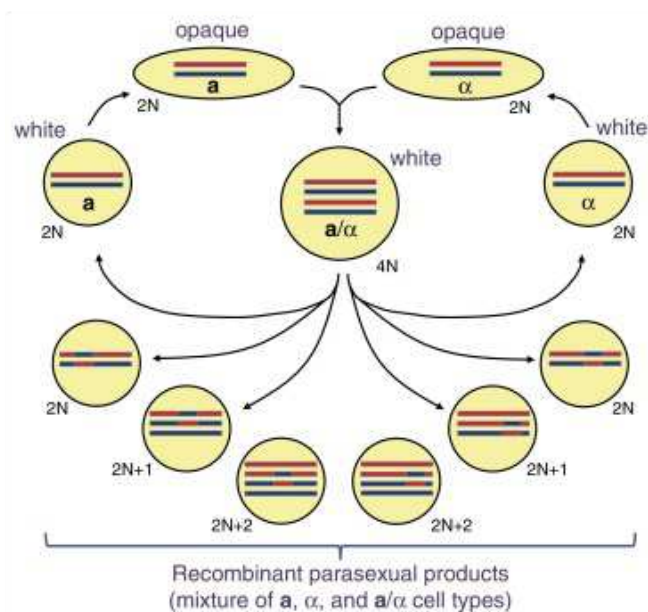


Obrázek 2: Morfologické formy *C. albicans*; převzato z Gow (2013)

stěnou, které se objevují na konci hyf. Jejich tvorbu indukuje kultivace v médiu chudém na živiny, jejich výskyt během invazivní infekce je nízký. Chlamydospory tvoří pouze *C. albicans* a *C. dubliniensis*, u ostatních druhů nebyly pozorovány. Jejich úloha v životním cyklu *C. albicans* dosud nebyla objasněna (Staib and Morschhauser, 2007; Palige et al., 2013).

Nověji popsanou formou *C. albicans* jsou tzv. buňky GUT (Gastrointestinally induced transition). Jedná se o jednotlivé buňky protáhlého tvaru s hladkým povrchem bez znatelného tečkování. V této formě se *C. albicans* vyskytuje ve střevě, kdy se chová jako avirulentní komenzál, čemuž odpovídá i zjištěný útlum exprese genů spojených s virulencí (Pande et al., 2013).

Poslední známá morfoloická forma *C. albicans* se nazývá opalescentní (opaque cells). Tyto buňky se podobají buňkám ve formě GUT, ale na rozdíl od nich jsou opalescentní buňky tečkované. Přechod kvasinková buňka – opalescentní buňka je těsně spjat s parasexuálním cyklem *C. albicans*. Pouze opalescentní buňky exprimují fermomony a k nim příslušné receptory a podstupují páření. Podobně jako u haploidní *S. cerevisiae* i u diploidní *C. albicans* rozeznáváme buňky typu „a“ a „α“, které konjugují. U *C. albicans* dochází po konjugaci ke splynutí jader (2n) obou buněk za vzniku zygoty (4n), ze které vzniká dělením generace tetraploidních buněk. Zpět k počátečnímu diploidnímu stavu se tyto buňky *C. albicans* (4n) nevrací podstoupením meiózy, ale procesem zvaným kordinovaná ztráta chromozomů (Obr.3). Tetraploidní buňky podstupují řadu mitotických dělení, během kterých podobně jako při meióze dochází k rekombinaci,



Obrázek 3: Parasexuální cyklus *C. albicans*; převzato z Bennett (2015)

pro kterou je klíčová typicky „meiotická“ rekombináza Spo11. Výsledkem je nestabilní populace buněk s různorodou ploidií, která se postupně ustálí na výchozím stavu $2n$ (Bennett, 2015).

C. albicans je primárně citlivá ke všem používaným antimykotikům. Sekundární rezistence k polyenům i echinokandinům je velmi vzácná, naopak rozvoj rezistence vůči azolům je častý a vzhledem k vysoké incidenci tohoto druhu a masivnímu používání azolů v terapii i očekávatelný (Arendrup, 2013; Sanguinetti et al., 2015; Goncalves et al., 2016). V rozvoji rezistence *C. albicans* k azolům se uplatňují různé mechanismy popsané v kapitole 2.3.6.

C. albicans patří do větve CTG. První kompletní sekvence genomu *C. albicans* kmene SC5314 byla publikována v roce 2004 (Jones et al., 2004). Velikost tohoto genomu je 14,3 Mb a obsahuje 6107 genů. V pořadí druhým kmenem, jehož genom byl sekvenován, je WO-1, u kterého byl prvně popsán přechod mezi kvasinkovou (white) a opalescentní (opaque) formou. Genom tohoto kmene má velikost 14,4 Mb a obsahuje 6159 genů (Butler et al., 2009). Dnes je nejvýznamnějším zdrojem genomových dat portál Candida Genome Database shromažďující aktuální verze anotovaných sekvencí genomů *C. albicans* a dalších čtyř druhů kandid (Inglis et al., 2012).

2.1.2 *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis byla objevena před 21 lety v Dublinu v izolátech z dutiny ústní HIV-pozitivních pacientů, přičemž následné studie a hlavně sekvenování genomů odhalily těsnou fylogenetickou příbuznost s *C. albicans* (Sullivan et al., 1995). Na rozdíl od *C. albicans* se *C. dubliniensis* vyskytuje v lidské mikroflóře střeva i sliznic jen zřídka a nejčastěji je nalézána právě v dutině ústní HIV-pozitivních pacientů (Sullivan et al., 2005). *C. dubliniensis* je mnohem méně virulentní než *C. albicans*, počet systémových onemocnění způsobených *C. dubliniensis* je velmi nízký (0,1 %); (Sullivan et al., 2004; Papon et al., 2013). Tento druh je primárně citlivý ke všem typům používaných antimykotik, rozvoj sekundární rezistence byl popsán pouze při expozici azolům (Coleman et al., 2010).

C. dubliniensis se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk, opalescentních buněk, které podstupují páření následované parasexuálním cyklem, produkuje pravé hyfy, pseudohyfy i chlamydospory.

Také *C. dubliniensis* patří mezi diploidní druhy ze skupiny CTG. Její genom má velikost 14,6 Mb a obsahuje 5758 genů. Blízkost *C. dubliniensis* a *C. albicans* dokumentuje podobnost jejich genomů, kdy 44 % genů obou druhů dosahuje identity >90 % a přes 96 % genů pak identity >80 % (Butler et al., 2009).

2.1.3 *Candida tropicalis*

C. tropicalis je mezi klinicky významnými druhy nejbližší příbuzná *C. albicans*. Podíl tohoto druhu na incidenci kandidémií se v závislosti na regionu pohybuje mezi 4 až 13 % (Papon et al., 2013; Pfaller et al., 2014). *C. tropicalis* je spojována především s pacienty se silnou neutropenií, kteří strávili dlouhou dobu na jednotkách intenzivní péče a měli zavedený tělní katétr, na kterém je schopna *C. tropicalis* tvořit biofilm (Negri et al., 2012). *C. tropicalis* patří k druhům, které jsou citlivé vůči všem významným druhům antimykotik (Chai et al., 2010; Silva et al., 2012).

C. tropicalis se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk, tvoří pseudohyfy i hyfy. Je to diploidní druh patřící do větve CTG. Velikost genomu *C. tropicalis* je 14,5 Mb a obsahuje 6258 genů (Butler et al., 2009).

2.1.4 *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis byla poprvé popsána v roce 1928 a pojmenována *Monilia parapsilosis* v odkazu na *Monilia psilosis* (dnes *C. albicans*), které se nejvíce podobala (Ashford, 1928). Incidence onemocnění vyvolaných tímto druhem má široké rozpětí (4-20 %) a je silně závislá na regionu. Severní Amerika a Austrálie evidují

několikanásobně vyšší výskyt *C. parapsilosis* než Evropa (Papon et al., 2013; Guinea, 2014; Pfaller et al., 2014). *C. parapsilosis* je častým původcem kandidemií nezralých novorozenců s mortalitou okolo 10 % (Pammi et al., 2013). Vstupní branou infekce je u novorozenců jak sliznice gastrointestinálního traktu, tak kůže u kterých není plně vyvinuta antimikrobní bariérová funkce. Podobně jako ostatní druhy dokáže *C. parapsilosis* využít tělních katétrů pro tvorbu biofilmu. Na rozdíl od ostatních kandid tento druh dokáže kontaminovat různá prostředí a perzistovat v nich velmi dlouho, což je významné hlavně ve spojitosti s nemocničním prostředím. Jako zdroj infekce *C. parapsilosis* byly identifikovány vaky s parenterální výživou, glycerinové čípky, parenterální roztoky glukózy či topické přípravky. Také byly zaznamenány případy přenosu *C. parapsilosis* z rukou zdravotnického personálu na pacienta, a to zejména v souvislosti s infekcemi u nezralých novorozenců (van Asbeck et al., 2009; Trofa et al., 2008).

Rezistence tohoto druhu k azolům i k ostatním druhům antimykotik je vzácná s výjimkou několika izolátů primárně rezistentních k echinokandinům (Arendrup, 2013).

Na základě genotypizace populace *C. parapsilosis* byly objeveny tři rozdílné subpopulace tohoto druhu, které se od sebe oddělily asi před jedním milionem let. První a dominantní, do které spadá 90 % izolátů zůstalo jméno *C. parapsilosis*, druhá byla nazvána *Candida metapsilosis* a třetí *Candida orthopsilosis* (Tavanti et al., 2005). Další zvláštností *C. parapsilosis* je mezi kvasinkami výjimečná lineární forma mitochondriálního genomu, který je asi 30 kb dlouhý (Nosek et al., 1995). Doposud nebyl u tohoto druhu pozorován sexuální cyklus.

C. parapsilosis se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk a pseudohyf. Jedná se o diploidní druh patřící do větve CTG, jehož genom má velikost 13,1 Mb a obsahuje 5733 genů (Butler et al., 2009).

2.1.5 *Candida guilliermondii*

C. guilliermondii je v celosvětovém měřítku původcem asi 1,4 % invazivních kandidemií, avšak v latinské Americe je výskyt více než dvojnásobně vyšší (3,7 %); (Pfaller et al., 2006; Papon et al., 2013; Pfaller et al., 2014). Pacienti postižení systémovou infekcí *C. guilliermondii* trpí nejčastěji hematologickými malignitami a solidními tumory. *C. guilliermondii* je také častým původcem onychomykóz. Klinicky nejvýznamnějším rysem tohoto druhu je jeho přirozeně snížená citlivost k azolům a echinokandinům (Pfaller and Diekema, 2007).

C. guilliermondii se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk a pseudohyf. Jedná se o diploidní druh patřící do větve CTG, jehož genom má velikost 10,6 Mb a obsahuje 5920 genů (Butler et al., 2009).

2.1.6 *Candida lusitaniae*

C. lusitaniae patří k vzácným původcům kandidemií (0,5 % případů); (Papon et al., 2013; Pfaller et al., 2014). Význam tohoto druhu spočívá v jeho schopnosti rozvinout rezistenci k různým antimykotikům během léčby. Nejčastěji byl pozorován rozvoj rezistence k amfotericinu B, dále pak k azolům a z novější doby jsou známy případové studie, kdy během infekce došlo k rozvoji rezistence vůči všem běžně používaným skupinám antimykotik (Favel et al., 2003; Asner et al., 2015; Young et al., 2003).

C. lusitaniae se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk a pseudohyf. Jedná se o haploidní druh patřící do větve CTG, jehož genom je velký 12,1 Mb a obsahuje 5941 genů (Butler et al., 2009).

2.1.7 *Candida krusei*

C. krusei je druh zodpovědný asi za 2,5 % kandidemií (Papon et al., 2013; Pfaller et al., 2014), nejčastěji u leukemických pacientů s výraznou neutropenií. Klinicky nejvýznamnější je přirozená rezistence *C. krusei* k flukonazolu i většině ostatních azolů, která pravděpodobně vyplývá z odlišné struktury cílového enzymu 14 α -demethylázy (Orozco et al., 1998; Pfaller and Diekema, 2007).

C. krusei se často podílí (jako jediný klinicky významný druh) na fermentaci různých potravin v celém světě (např. mléčné produkty, cassava, tapi), přičemž je přímo esenciální pro rozvinutí charakteristické chuti a vůně během fermentace kakaových bobů (Yadav et al., 2012).

C. krusei se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk a pseudohyf. Jedná se o diploidní druh stojící mimo větve CTG i WGD. Velikost genomu *C. krusei* je 11,4 Mb a obsahuje 5093 genů (Xiao et al., 2014).

2.1.8 *Candida glabrata*

C. glabrata byla objevena jako součást lidské střevní mikroflóry roku 1917 (Anderson, 1917) a do 80. let 20. století stála mimo pozornost. Právě v této době byla opakovaně identifikována jako původce systémových infekcí imunokompromitovaných pacientů, v současnosti je zejména v USA a severní Evropě druhým nejčastějším původcem kandidemií (Papon et al., 2013; Guinea, 2014; Pfaller et al., 2014).

C. glabrata je jediným klinicky významným druhem rodu *Candida*, který fylogeneticky patří do větve WGD (viz kap. 1.1. a Obr. 1) a je tedy bližší příbuzný *S. cerevisiae* než *C. albicans*. *C. glabrata* se během infekce vyskytuje výhradně v kvasinkové formě. Z ostatních morfologií byla popsána schopnost tohoto druhu

tvořit pseudohyfy při růstu na pevném médiu chudém na zdroj dusíku, podobně jako je tomu u *S. cerevisiae* (Csank and Haynes, 2000).

C. glabrata podobně jako *C. albicans* vyniká v adherenci k tkáním hostitele i k umělým povrchům (zejména tělním katétrům) a v tvorbě biofilmu. Hlavní adheziny tohoto druhu jsou geny *EPA*, které jsou příbuzné genům *FLO* zajišťujícím flokulaci u *S. cerevisiae*. Genom *C. glabrata* obsahuje v závislosti na kmeni i přes dvacet kopií genů *EPA* (Gabaldon et al., 2013). Dalším faktorem v rozvoji infekce je invazní potenciál. *C. glabrata* aktivně překonává epiteliální bariéru, prostupuje do hlubších tkání a diseminuje do krevního řečiště, a to vše pouze v kvasinkové formě. Zásadní se zdá být schopnost buněk *C. glabrata* procházet hostitelskými tkáněmi (např. vrstvou enterocytů) bez jejich porušení, a tedy bez imunitní reakce hostitele (Perez-Torrado et al., 2012). V neposlední řadě infekční potenciál tohoto druhu umocňuje jeho rezistence k oxidativnímu stresu, která mu umožňuje přežít fagocytózu makrofágy (Kaur et al., 2005).

Nárůst incidence systémových infekcí způsobených druhem *C. glabrata* souvisí se zavedením azolových antimykotik do terapie, vůči kterým je *C. glabrata* často rezistentní, případně se u ní rezistence rychle rozvine, přičemž se uplatňují zejména transportéry exportující azoly z buňky (viz kap. 2.3.6) a (Rodrigues et al., 2014; Kolaczowska and Kolaczowski, 2016).

C. glabrata je haploidní druh, u kterého doposud nebyl zdokumentován sexuální cyklus (Bolotin-Fukuhara and Fairhead, 2014). Velikost genomu tohoto druhu je 12,3 Mb a obsahuje 5283 genů (Dujon et al., 2004).

2.2 Homeostáze kationtů alkalických kovů

Přítomnost kationtů alkalických kovů v cytosolu je esenciální pro celou řadu fyziologických pochodů, avšak jejich nadbytek je pro buňku toxický, přičemž optimální koncentrace jednotlivých kationtů se výrazně liší. Homeostáze kationtů alkalických kovů je těsně spjata s regulací membránového potenciálu a pH, a to i na úrovni jednotlivých buněčných kompartmentů, které si udržují své specifické kationtové složení včetně pH (Obr. 4); (Kane, 2016; Yenush, 2016).

Hlavním intracelulárním kationtem je K^+ , jehož vysokou koncentraci udržují všechny buňky (u kvasinek 200-300 mM). Draselné kationty jsou zcela nezbytné pro kompenzaci negativních nábojů makromolekul (karboxylové skupiny, mono- a diestery kyseliny fosforečné) a pro regulaci vnitrobuněčného pH, objemu buňky a membránového potenciálu, což jsou fyziologické parametry přímo související s elektrochemickými poměry v cytosolu. V neposlední řadě jsou draselné kationty nezbytné pro syntézu proteinů i aktivaci mnoha enzymů (Rodriguez-Navarro,

Tabulka 2: Hlavní charakteristiky jednotlivých druhů kvasinek rodu *Candida*

druh	ploidie	velikost genomu (Mb) a reference	morfologie ¹	sex. cyklus ²	incidence (%) ³	incidence v ČR (%) ⁴	azoly	amfotericin B	rezistence ⁵	echinokandiny
<i>C. albicans</i>	2n	14,4 (Jones et al., 2004)	K, P, H	+	50-60	50	S	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	2n	14,6 (Butler et al., 2009)	K, P, H	+	0,1	*	S	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	2n	14,5 (Butler et al., 2009)	K, P, H	+	4-13	10,5	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	2n	13,1 (Butler et al., 2009)	K, P	-	4-20	13,5	-	-	-	P
<i>C. guilliermondii</i>	n	10,6 (Butler et al., 2009)	K, P	+	0,7	*	P	-	-	P
<i>C. lusitanae</i>	n	12,1 (Butler et al., 2009)	K, P	+	0,5	*	S	P, S	P, S	S
<i>C. krusei</i>	2n	11,4 (Xiao et al., 2014)	K, P	+	2-4	*	P	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	n	12,3 (Dujon et al., 2004)	K, P	-	7-20	12,6	P, S	-	-	-

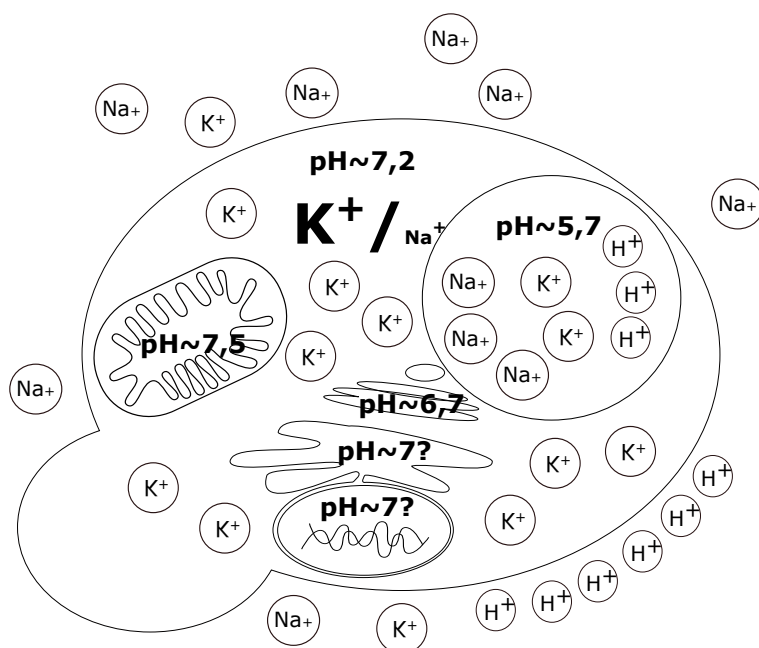
¹ (K) kvasinkové buňky, (P) pseudohyfy, (H) hyfy

² sexuální nebo parasexuální cyklus přítomen (+), doposud nepozorován (-)

³ dle Papon et al. (2013); Pfaller et al. (2014)

⁴ (*) velmi nízká incidence, počet výskytů <10 (Jurčová, 2015)

⁵ (P) primární rezistence, (S) sekundární rezistence, (-) rezistence doposud nepozorována



Obrázek 4: Rozložení kationtů alkalických kovů a pH v *S. cerevisiae*, upraveno podle Kane (2016)

2000).

Kvasinky akceptují velmi široké rozpětí extracelulárních koncentrací kationtů alkalických kovů - modelový druh *Saccharomyces cerevisiae* je schopen růst v přítomnosti KCl v koncentracích 10 μ M – 2,5 M a NaCl < 1,5 M (Arino et al., 2010). V případě nedostatku K^+ se hromadí v cytosolu H^+ , čímž dochází k poklesu pH, snížení membránového potenciálu (a tedy i oslabení sekundárního transportu), zastavení proteosyntézy a dalším, pro buňku škodlivým jevům. Jsou-li v podmínkách nedostatku K^+ přítomny sodné kationty, vstupují do buňky a jsou využity pro udržení elektronové neutrality a regulaci membránového potenciálu přednostně před protony. Zároveň však platí, že v nadbytku jsou Na^+ pro kvasinky toxické, ačkoliv některé druhy tolerantní k solím akceptují i nižší vnitrobuněčný poměr K^+/Na^+ než druhy k solím více citlivé (Rodriguez-Navarro, 2000).

Pro udržení optimálního poměru K^+/Na^+ používají kvasinky tři základní strategie: 1) vysokou účinnost a selektivitu importu K^+ , 2) efektivní export nadbytečných nebo toxických kationtů či 3) jejich sekvestraci do vakuoly. Hlavními nástroji v regulaci homeostáze kationtů alkalických kovů jsou transportéry lokalizované v plasmatické membráně i v membránách jednotlivých buněčných organel. Tyto transportéry využívají pro přesun kationtů různé transportní mechanismy: primárně aktivní ATPázy, sekundárně aktivní antiportní a symportní systémy, pasivní kanály (Arino et al., 2010; Ramos et al., 2011; Yenush, 2016).

Tolerance k solím kationtů alkalických kovů byla doposud studována u čtyř patogenních druhů kvasinek rodu *Candida*. Všechny lze obecně označit za tole-

rantní k solím, ačkoliv maximální tolerované koncentrace se mezi jednotlivými druhy značně liší, přičemž pořadí druhů od nejvíce k nejméně tolerantnímu je: *C. parapsilosis* > *C. albicans* > *C. glabrata* > *C. dubliniensis* (Krauke and Sychrova, 2008, 2010).

Následující kapitoly předkládané práce představují jednotlivé transportní systémy podílející se na homeostázi kationtů alkalických kovů s využitím komplexních znalostí o modelovém organismu *S. cerevisiae*, doplněné současnými poznatky o těchto systémech v kandidátech.

2.2.1 Membránový potenciál

Všechny živé buňky, kvasinky nevyjímaje, jsou ohraňeny plasmatickou membránou, která zabraňuje volné difúzi (nejen) iontů a umožňuje dosáhnout jejich nestejněnoměrného rozložení uvnitř a vně buňky. Tato situace vede k ustavení rozdílných elektrických potenciálů na obou stranách membrány, vzniku elektrochemického gradientu a v důsledku i elektrického napětí.

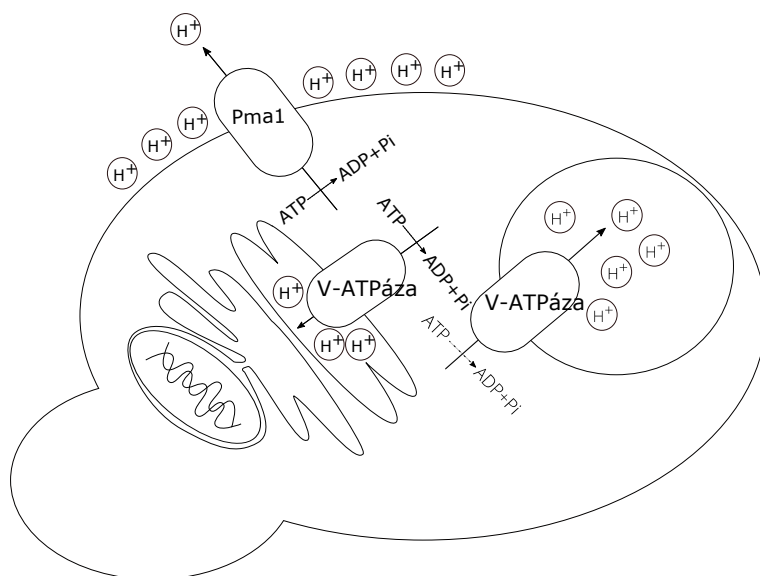
Neustálým exportem H^+ vzniká dovnitř směřovaný gradient pH a je udržován pozitivní náboj vně buňky, zatímco v cytosolu převládá náboj negativní, což je hlavní podmínkou udržení iontové homeostáze a turgoru. Tento gradient je určující pro nespecifický vstup kladně nabitých látek (kationty alkalických kovů nevyjímaje) do buňky a je hlavním faktorem, který v případě externího nadbytku solí určuje rychlost vstupu kationtů alkalických kovů.

V neposlední řadě je neustále obnovovaný gradient H^+ využíván jako zdroj energie pro sekundární transport mnoha substrátů (např. aminokyseliny, fosfáty, sulfáty, vitamíny) přes plasmatickou membránu (Barnett, 2008).

Jak již bylo zmíněno, přísná regulace pH se odehrává i na úrovni jednotlivých organel. Kupříkladu nízké pH udržované ve vakuole je způsobeno aktivním přenosem H^+ z cytosolu a takto generovaný membránový potenciál mezi cytosolem a vakuolou je následně využíván k transportu mnoha substrátů, včetně v cytosolu nadbytečných K^+ nebo toxických Na^+ (Arino et al., 2010).

ATPáza Pma1

H^+ -ATPáza Pma1 je klíčový transportér zajišťující export protonů přes plasmatickou membránu a tím i generování membránového potenciálu (Serrano et al., 1986). Tento protein (918 aa) patří mezi P-ATPázy, čemuž odpovídá i jeho struktura obsahující 10 transmembránových domén (TMD) a dlouhou intracelulární smyčku mezi 4 a 5 TMD zodpovědnou za vazbu a hydrolyzu ATP (Kuhlbrandt et



Obrázek 5: ATPáza plasmatické membrány Pma1 a V-ATPázy lokalizované v membráně vakuoly a Golgiho aparátu v *S. cerevisiae*

al. 2002). Pma1 je nejhojnějším proteinem plasmatické membrány a jeho aktivita spotřebuje přibližně 20 % celkové produkce ATP (Benito et al., 1991).

Genom *S. cerevisiae* obsahuje esenciální gen *ScPMA1* a jeho paralog *ScPMA2* s velmi nízkou úrovní transkripce, který však je schopen (při zvýšené expresi pod kontrolou silného promotoru) částečně nahradit funkci za normálních podmínek dominantně transkribovaného *ScPMA1* (Supply et al., 1993).

Nejlépe je prostudována aktivita a regulace Pma1 v *S. cerevisiae*. Mezi hlavní regulátory aktivity *ScPma1* patří glukóza. Nárůst její koncentrace v médiu vede k aktivaci *ScPma1* a naopak pokles koncentrace glukózy k útlumu tohoto transportéru. Odpověď na přítomnost glukózy je zprostředkována fosforylací C-konce *ScPma1* a je velmi rychlá (Serrano, 1983; Kane, 2016).

V-ATPázy

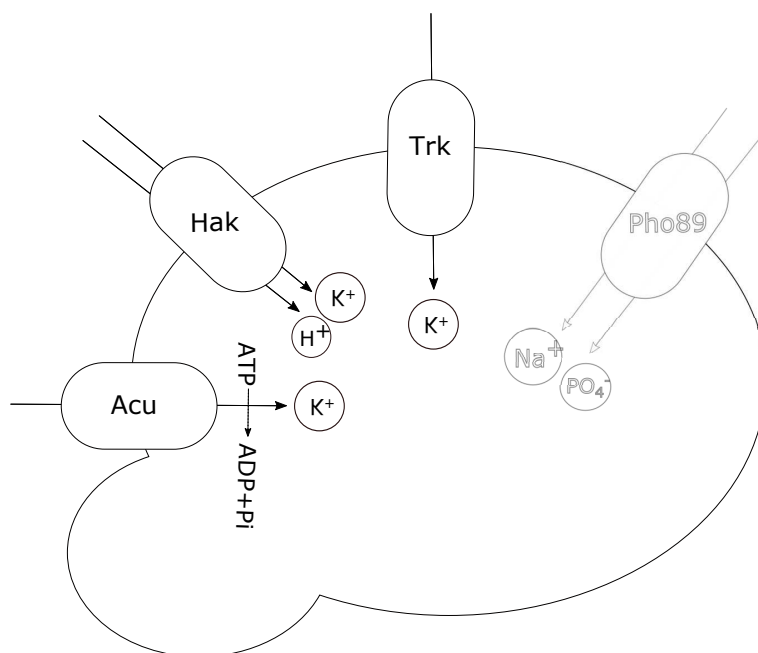
V-ATPázy jsou intracelulární přenašeče protonů lokalizované v membránách vakuoly, Golgiho aparátu a dalších organel (např. pozdního endosomu). Aktivita V-ATPáz acidifikuje lumen uvedených organel (Kane, 2016).

Tyto pumpy patří mezi F-ATPázy, v *S. cerevisiae* se skládají ze 14 podjednotek organizovaných do dvou domén: katalytické V_1 a transmembránové V_o tvořící pár pro průchod protonu membránou. Každá podjednotka je kódovaná jedním genem s výjimkou podjednotky „a“ domény V_o , kterou kódují dva izoformní geny *ScVPH1* a *ScSTV1* řídící lokalizaci celého komplexu. V-ATPázy obsahující část

kódovanou *ScVPH1* jsou určeny pro vakuolární membránu, přítomnost produktu genu *ScSTV1* směřuje celý komplex do membrány Golgiho aparátu a dalších odvozených organel (Forgac, 2007).

Podobně jako u *ScPma1* je i aktivita V-ATPáz ovlivněna přítomností glukózy, jejíž nedostatek vede k rozvolnění vazby mezi doménami V_1 a V_o , a tím i k deaktivaci transportéru (Kane and Smardon, 2003).

Aktivita V-ATPáz a *ScPma1* je vzájemně propojena. Např. absence genu *ScVMA1* kódujícího podjednotku „a“ katalytické domény V_1 znamená ztrátu aktivity V-ATPáz, pokles cytosolického pH a zároveň i snížení aktivity *ScPma1*, v důsledku narušení sekrece *ScPma1* do plasmatické membrány (Martinez-Munoz and Kane, 2008).



Obrázek 6: Znamé importní systémy kationtů alkalických kovů v plasmatické membráně kvasinek

2.2.2 Import kationů alkalických kovů

Uniportní systém Trk

Prvním přenašečem draselných iontů objeveným mimo živočišné buňky se stal Trk1 (TRansporter of K^+) v *S. cerevisiae*, jehož exprese zlepšila růst buněk *S. cerevisiae* citlivých k nízkým koncentracím K^+ (Gaber et al., 1988). Asi jednu polovinu transportéru *ScTrk1* (celková délka 1235 aa) tvoří transmembránová část složená ze čtyř tzv. segmentů MPM. Každý segment se skládá ze dvou strukturálních jednotek prostupujících membránu (M), které jsou spojené krátkou α -šroubovicí P (pore loop) obsahující zcela mezidruhově konzervované glyciny a formující dva póry pro průchod K^+ (Durell and Guy, 1999). Studium struktury transmembránové části kvasinkových přenašečů Trk usnadňuje znalost struktury jejich bakteriálních homologů, které s nimi sdílejí uspořádání do čtyř segmentů MPM (Cao et al., 2011; Vieira-Pires et al., 2013; Levin and Zhou, 2014). Druhou polovinu proteinu tvoří intracelulární smyčka mezi 2. a 3. segmentem MPM a dále ostatní smyčky mezi jednotlivými segmenty MPM, N- a C-koncových částí proteinu.

Primární funkce *ScTrk1* – import K^+ , byla experimentálně prokázána mnoha pracemi, avšak transportní mechanismus stále nebyl zcela objasněn. V současnosti se předpokládá, že *ScTrk1* je uniportní systém využívající pro přenos K^+ jako zdroj energie membránový potenciál. Stále však nebyla potvrzena/vyvrácena možnost, že

v extrémních podmínkách silné depolarizace membrány a v přítomnosti Na^+ může *ScTrk1* využít gradientu Na^+ pro symport Na^+/K^+ , a to díky dvěma vazebným místům pro kationty (Arino et al., 2010).

Afinita k substrátu *ScTrk1* se dramaticky liší v závislosti na dostupnosti živin (dusíku) a K^+ , kdy v případě nedostatku těchto elementů v médiu vykazuje *ScTrk1* mnohonásobně vyšší afinitu ke K^+ než při kultivaci v bohatém médiu. Podobně vzrůstá afinita ke K^+ tohoto transportéru i v přítomnosti sodných kationtů (Arino et al., 2010).

Mimo prokázaný import draselných kationtů, existuje předpoklad, že *ScTrk1* asociuje v plasmatické membráně v tetramer, v jehož středu vzniká kanál pro výstup chloridových aniontů z buněk (Kuroda et al., 2004; Pardo et al., 2015).

Genom *S. cerevisiae* obsahuje navíc gen *ScTRK2* kódující transportér sdílející s *ScTrk1* uspořádání transmembránové části do čtyř segmentů MPM (identita s *ScTrk1* v této části je 70-90 %) i prokázanou aktivitu pro import K^+ (Ko et al., 1990). V případě absence *ScTRK1* je pod kontrolou silného promotoru *ScTRK2* schopen nahradit jeho funkci (Michel et al., 2006). Za normálních podmínek je *ScTRK2* exprimován méně a jeho podíl na importu K^+ je nižší než u *ScTRK1*, avšak nikoliv zanedbatelný a navíc u buněk ve stacionární fázi se zdá, že *ScTrk2* převezme od *ScTrk1* úlohu dominantního importéru K^+ (Petrezselyova et al., 2011; Borovikova et al., 2014).

Ortology přenašeče *ScTrk* jsou široce zastoupené mezi všemi kvasinkovými druhy, přičemž jejich funkce byla ověřena i u dvou druhů kandid. Genom *C. albicans* obsahuje ortology tří typů draselných transportérů (Ramos et al., 2011), přičemž doposud byl experimentálně charakterizován pouze *CaTrk1*. Tento přenašeč se strukturou ani primární funkcí (import K^+) neliší od *ScTrk1*, avšak jeho úloha v přenosu Cl^- se nepotvrdila (Miranda et al., 2009).

V kontrastu k *C. albicans* stojí *C. glabrata*, u které *CgTRK1* zůstává dosud jediným nalezeným genem kódujícím možný importér K^+ . Transportní funkce i důležitost *CgTrk1* pro homeostázi draselných kationtů u tohoto druhu byla experimentálně potvrzena. Delece *CgTRK1* v buňkách *C. glabrata* vyústila v neschopnost růstu v přítomnosti nízkých koncentrací draselných kationtů, v hyperpolarizaci plasmatické membrány i zvýšenou senzitivitu k toxickým kationtům alkalických kovů, pravděpodobně zapříčiněnou absencí jiného importního mechanismu s dostatečnou selektivitou pro K^+ (Llopis-Torregrosa et al., 2016).

Symporní systém Hak

U mnoha kvasinkových druhů byl popsán (vedle systému Trk) druhý transportér přenášející K^+ do buňky pojmenovaný Hak (High Affinity K^+ Transporter),

jehož funkce byla studována u dvou druhů kvasinek: *Debaryomyces occidentalis* (Banuelos et al., 1995, 2000) a *Debaryomyces hansenii* (Prista et al., 2007).

Již z názvu vyplývá hlavní charakteristika tohoto přenašeče - velmi vysoká afinita k draselným kationtům. Za normálních podmínek je dominantním importérem K^+ přenašeč Trk a gen *HAK* není transkribován, přičemž hlavním aktivátorem jeho transkripce je nedostatek draselných kationtů. Transportér Hak využívá pro přenos K^+ symportní mechanismus, kdy spolu s jedním K^+ přenáší do buňky jeden proton. U osmotolerantního druhu *D. hansenii*, který toleruje neobvykle nízký poměr K^+/Na^+ a případný nedostatek K^+ nahrazuje sodnými kationty, byl prokázán symport K^+-Na^+ zprostředkovaný přenašečem *DhHak1* (Prista et al., 2007).

Délka proteinů je u *DoHak1* 1018 aa a *DhHak1* 1050 aa, přičemž doposud nebyla provedena žádná studie jejich struktury, či topologie. Jedinou prací na tomto poli zůstává predikce topologie s experimentálním ověřením lokalizace TMD systému *kup* v bakterii *Escherichia coli* (Sato et al., 2014), který je vzdáleným příbuzným kvasinkovým transportérům typu Hak.

ATPáza Acu

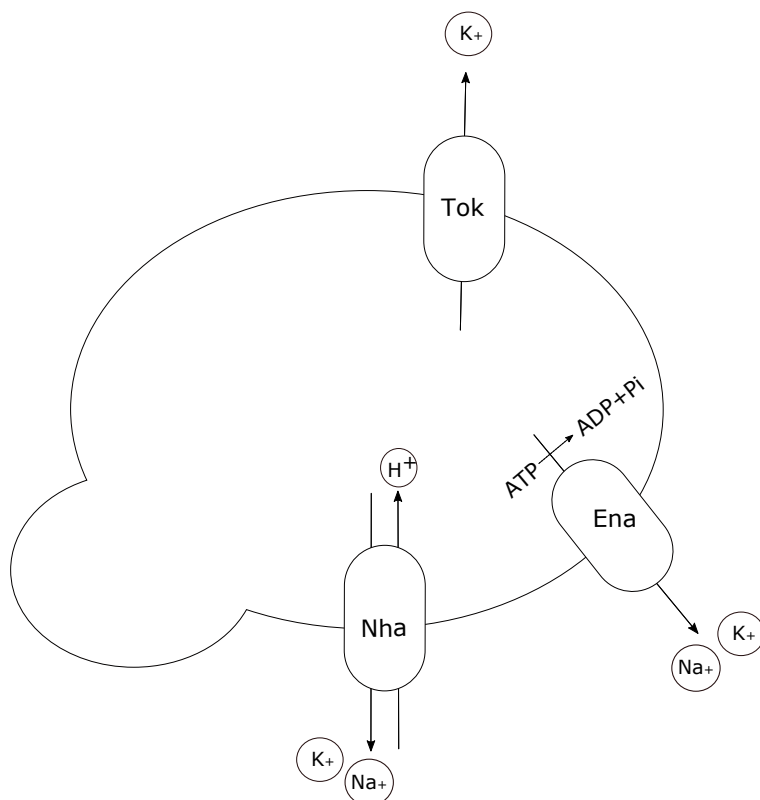
Třetím, nejnověji popsaným typem importéru K^+ vyskytujícím se u kvasinek, je ATPáza Acu. Prvně byla charakterizována u kvasinky *Millerozyma farinosa* (dříve *Pichia sorbitophila*), která disponuje jedním genem *PsACU1* a u sněti *Ustilago mayidis*, v jejímž genomu byly nalezeny dvě kopie genu (*Umacu1* a *Umacu2*) kódující zmíněnou ATPázu. Všechny tři transportéry přenáší s vysokou afinitou K^+ , přičemž *Umacu1* a *Umacu2* transportují v případě nedostatku K^+ i kationty sodné. Geny nebo pseudogeny kódující ATPázy Acu byly identifikovány v genomech několika dalších kvasinkových druhů, včetně *C. albicans* (Benito et al., 2004).

Symportní systém Pho89

V buňkách *S. cerevisiae* byl popsán jediný přenašeč, který transportuje s vysokou selektivitou sodné kationty do buňky, ačkoliv jsou pro buňku toxické. Je jím *ScPho89* – jeden ze symportních systémů, které jsou zodpovědné za import PO_4^{3-} . Zatímco blízký příbuzný *ScPho84* využívá pro transport PO_4^{3-} za nízkého extracelulárního pH koncentračního spádu H^+ , *ScPho89* je aktivní při vysokém vnějším pH a jako zdroj energie mu slouží koncentrační gradient Na^+ (Martinez and Persson, 1998). Tento přenašeč je aktivní pouze za specifických podmínek – při silném hladovění na anorganický fosfát a při již zmíněném vysokém extra-

celulárním pH, kdy je pro buňku výhodné získat anorganický fosfát i za cenu importu toxických Na^+ .

Indukce transkripce *ScPHO89* zvýšením extracelulárního pH je koordinována s indukcí transkripce *ScENA1*. ATPáza *ScEna1* exportuje Na^+ , čímž kompenzuje import toxických Na^+ přenesených aktivitou *ScPho89*. Udržuje tak neustále dovnitř směřující gradient Na^+ , který je potřebný pro energizaci transportu fosfátových aniontů proti jejich koncentračnímu spádu transportérem *ScPho89* (Serra-Cardona et al., 2014).



Obrázek 7: Známé exportní systémy kationtů alkalických kovů v plasmatické membráně kvasinek

2.2.3 Export kationtů alkalických kovů

Antiportní systém Na⁺/H⁺

Systémy přenášející kationty alkalických kovů výměnou za proton (obecně značené Na⁺/H⁺ exchangers) patří k nejrozšířenějším transportérům ve všech organismech. K nejlépe prostudovaným patří *ScNha1* náležící *S. cerevisiae*, přičemž homology genu *NHA1* byly nalezeny ve všech dosud sekvenovaných kvasinkových genomech. Protein *ScNha1* je dlouhý 985 aa, asi polovinu jeho délky tvoří část zodpovědná za transport kationtů složená z 12 hydrofobních transmembránových domén a poměrně krátkých hydrofilních smyček. V této vysoce konzervované části *ScNha1* byly identifikovány aminokyseliny nesoucí negativní náboj (kyselina asparagová), které jsou esenciální pro transport kationtů alkalických kovů (Ohgaki et al., 2005). Druhou polovinu proteinu *ScNha1* tvoří C-konec, který obsahuje šest konzervovaných regionů (Mitsui et al., 2005). První z nich, bezprostředně navazující na poslední transmembránovou doménu, je esenciální pro správnou lokalizaci a funkci *ScNha1* (Kinclova et al., 2001b). Předpokládá se, že C-konec může interagovat s početnými partnery a být tak hlavní regulační částí celého

systému (Arino et al., 2010). N-konec je velmi krátký (13 aa) a nepředpokládá se, že by obsahoval regulační oblast.

ScNha1 je schopen přenášet jak Na^+ a K^+ , tak i Li^+ a Rb^+ (Banuelos et al., 1998; Kinclova et al., 2001a). Společně s ATPázami *Ena* se podílí na detoxifikaci cytosolu od nežádoucích kationtů, a to především při nízkém extracelulárním pH (kdy je mechanismus výměny kationtu alkalického kovu za proton obzvláště výhodný). Gen *ScNHA1* patří mezi tzv. provozní geny. Jeho transkripce je konstitutivní a není indukována změnou extracelulárního pH, osmotickým šokem či přítomností solí. Tento antiportní systém se podílí na neustálé cirkulaci K^+ přes plasmatickou membránu, a tím naplňuje svou hlavní úlohu – neustále udržovat optimální koncentraci K^+ v buňce (Banuelos et al., 1998).

Doposud byly charakterizovány Na^+/H^+ antiportní systémy pěti druhů kvasinek rodu *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *C. glabrata*; Soong et al. (2000); Kinclova et al. (2001b); Kamauchi et al. (2002); Krauke and Sychrova (2011)). Při heterologní expresi příslušných genů v *S. cerevisiae* byla u všech prokázána antiportní aktivita a široká substrátová specifita (Na^+ , K^+ , Li^+ , Rb^+), avšak jednotlivé systémy se lišily svou transportní kapacitou. Rozdíl v aktivitě antiportních systémů jednotlivých druhů kandid byly v souladu s celkovou tolerancí druhů k solím. Druhy s vysokou tolerancí k solím (*C. parapsilosis* a *C. albicans*) disponují antiportními systémy s vysokou aktivitou, naproti tomu antiportní systémy druhů citlivějších na vyšší koncentraci solí (*C. dubliniensis*, *C. glabrata*) jsou aktivní méně (Krauke and Sychrova, 2008, 2010). Detailní studium funkce *CaCnh1* a *CgCnh1* a jejich součinnosti s ATPázami *Ena* ukázalo, že narozdíl od *ScNha1* se tyto dva antiportní systémy podílí na detoxifikaci buněk od nadbytečných Na^+ jen malou měrou a jejich zcela dominantní úloha spočívá v regulaci vnitrobuněčné koncentrace draselných kationtů (Kinclova et al., 2001a; Krauke and Sychrova, 2011).

ATPázy *Ena*

P-ATPázy plasmatické membrány *S. cerevisiae*, které využívají energii získanou hydrolýzou ATP k exportu kationtů alkalických kovů (Na^+ , K^+ , Li^+) proti elektrochemickému gradientu, jsou označovány *Ena* (exitus natru) a jsou hlavními determinantami tolerance *S. cerevisiae* k solím (Benito et al., 2002). Podobně jako u antiportních systémů Na^+/H^+ , geny kódující ATPázy *Ena* byly nalezeny ve všech doposud sekvenovaných genomech kvasinkových organismů.

Počet genů kódující ATPázy *Ena* v *S. cerevisiae* není u všech kmenů stejný. Kopie genů jsou většinou uloženy na chromozomu tandemově. Kmen D273-10B disponuje pěti kopiemi, naproti tomu kmen CEN.PK113-7D má pouze jediný gen

pojmenovaný *ENA6*, což pravděpodobně souvisí s neobvyklou citlivostí tohoto kmenu k Na^+ a Li^+ (Wieland et al., 1995; Daran-Lapujade et al., 2009). Většina ATPáz Ena je složena z 1091 aa a obsahuje 10 transmembránových domén. Za hydrolýzu ATP zodpovídají pro P-ATPázy typické domény lokalizované v cytosolu.

Za optimálních podmínek je množství proteinů Ena v plasmatické membráně velmi nízké a roste teprve v reakci na podnět z vnějšího prostředí. Exprese genů *ScENA* je prokazatelně indukována přítomností solí, osmotickým stresem a vyšším extracelulárním pH, kdy se obtížně uplatňuje antiportní systém *ScNha1*. Hlavní funkce ATPáz Ena je v *S. cerevisiae* detoxifikace cytosolu od nežádoucích kationtů (Ghaemmaghami et al., 2003).

Genom *C. albicans* a *C. dubliniensis* obsahuje geny nazvané *ENA21* a *ENA22*. Bazální úroveň exprese i její indukce v přítomnosti NaCl byla výrazně vyšší u *C. albicans* než u *C. dubliniensis*, což je v souladu s tím, že *C. albicans* toleruje mnohem vyšší koncentrace solí než *C. dubliniensis*. Zároveň se liší i úroveň exprese jednotlivých genů, přičemž gen *ENA21* je u obou druhů exprimován intenzivněji než gen *ENA22* (Enjalbert et al., 2009).

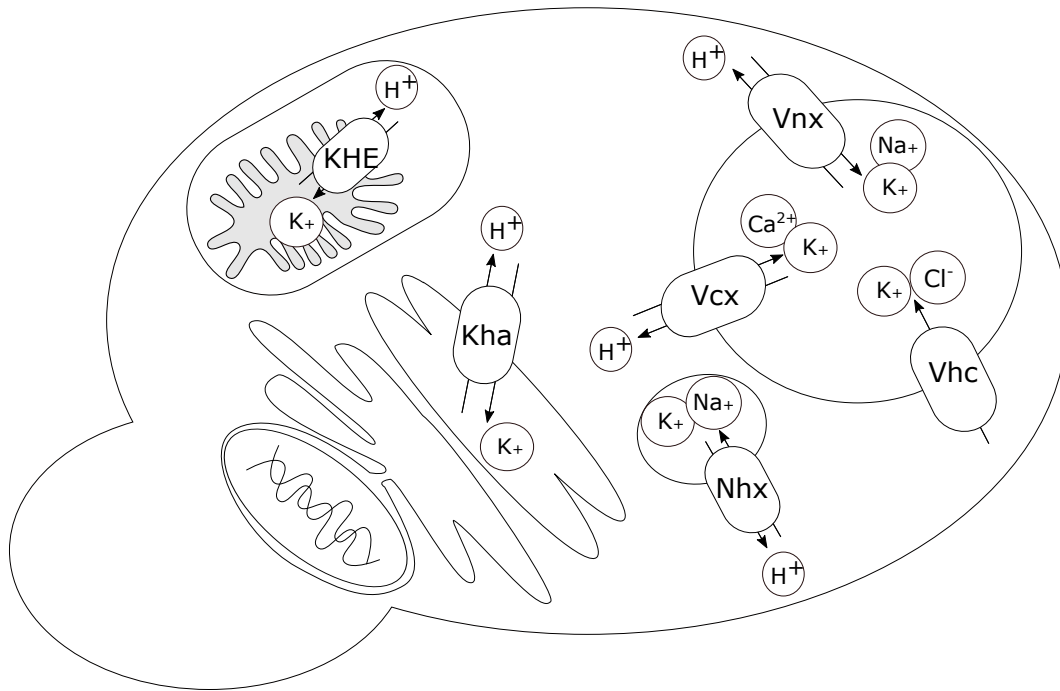
C. glabrata disponuje jediným genem *CgENA1* kódujícím příslušnou ATPázu, jež je zodpovědná za detoxifikaci buněk od Na^+ a Li^+ . Její podíl na exportu K^+ i kapacita transportu toho kationtu jsou nízké (Krauke and Sychrova, 2008).

Kanál Tok

Kanál *ScTok1* slouží pro přenos K^+ z buňky, přičemž je to jediný systém se substrátovou specifitou pouze pro draselné kationty. Za určitých experimentálních podmínek může přes tento kanál K^+ v omezené míře do buněk i vstupovat (Yenush, 2016).

Topologie 691 aa dlouhého proteinu *ScTok1* zahrnuje osm transmembránových domén. Poslední dva páry společně se smyčkami P (charakteristickými pro draselné přenašeče) tvoří dva póry pro průchod K^+ . Na tento segment navazuje C-konec umístěný v cytosolu, který reguluje průchodnost celého kanálu (Loukin and Saimi, 2002; Martinac et al., 2008).

Úloha *ScTok1* spočívá v rychlé a jemné regulaci membránového potenciálu. K otevření *ScTok1* vede především depolarizace buněčné membrány, která je rychle kompenzována únikem draselných kationtů přes tento kanál. Podíl *ScTok1* na regulaci membránového potenciálu dokazuje i depolarizace membrány mutantního kmenu *S. cerevisiae tok1Δ* a naopak hyperpolarizace plasmatických membrán buněk *S. cerevisiae*, ve kterých je exprese genu *ScTOK1* uměle zvýšena (Maresova et al., 2006). Taktéž v *C. albicans* byl nalezen gen kódující kanál *CaTok1*, jehož funkce byla ověřena a jež se velmi podobá funkci *ScTok1* (Baev et al., 2003).



Obrázek 8: Známé intracelulární transportéry kationtů alkalických kovů v kvasinkách; lokalizace transportérů: Kha - Golgiho aparát; Nhx - pozdní endosom, KHE - vnitřní membrána mitochondrie; Vnx, Vcx a Vhc - vakuola

2.2.4 Intracelulární transport kationtů alkalických kovů

Obsah sodných a draselných kationtů je uvnitř buňky *S. cerevisiae* přísně regulován, přičemž jejich koncentrace v cytosolu a v jednotlivých organelách se výrazně liší (Herrera et al., 2013). Transport kationtů alkalických kovů mezi buněčnými kompartmenty umožňuje regulovat koncentraci K^+ , a tím i pH a objem jednotlivých organel. Dominantní úlohu ve vnitrobuněčném přesunu kationtů alkalických kovů hrají antiportní systémy, které využívají pro energizaci transportu membránový potenciál generovaný příslušnými V-ATPázami. Příspěvek dalších transportérů s odlišným transportním mechanismem je spíše okrajový.

Systém kompartmentů zahrnující pozdní endosomy, recyklující endosomy a trans cisterny Golgiho aparátu disponuje specifickým antiportním systémem *ScNhx1* transportujícím Na^+ a K^+ z cytosolu do endosomu (Nass et al., 1997; Brett et al., 2005). Shromážděné kationty se pak dostávají s ostatním obsahem endosomu do vakuoly. Přenos kationtů alkalických kovů pomocí *ScNhx1* do endosomu a následně do vakuoly hraje důležitou roli v případě potřeby buňky odstranit K^+ nebo toxické Na^+ z cytosolu. Membrána Golgiho aparátu obsahuje další antiportní systém *ScKha1*, který zodpovídá za akumulaci K^+ v této organelle (Maresova and Sychrova, 2005).

Vakuolární membrána buněk *S. cerevisiae* podle současného poznání obsa-

huje tři transportéry přenášející kationty alkalických kovů. Na přenosu K^+ se nejvýznamněji podílí antiportní systém K^+/H^+ *ScVnx1* (Cagnac et al., 2007). Dalším antiportním systémem je *ScVcx1*, jehož hlavní funkcí je transport vápenatých kationtů do vakuoly, avšak může přenášet i kationty draselné (Cagnac et al., 2010). Posledním vakuolárním přenašečem draselných kationtů je kotransportér *ScVhc1*, který společně s jedním K^+ přenáší do vakuoly jeden chloridový aniont (Petrezse-lyova et al., 2013).

V mitochondriích je pohyb iontů těsně spjat s dýchacím řetězcem, který generuje negativní membránový potenciál uvnitř mitochondrie. Výměna draselných kationtů (tažených přes vnitřní membránu mitochondrie do matrix) za protony (potassium-proton exchange - KHE) je jedním ze základních prvků chemiosmotické teorie dýchacího řetězce (Mitchell, 1961). Ačkoliv výše popsaná výměna K^+ za protony byla mnohokrát experimentálně prokázána, dodnes nebyly identifikovány všechny proteiny, které se na transportu K^+ podílejí (Yenush, 2016).

2.3 Antimykotická léčba

Látky s fungicidním nebo fungistatickým účinkem nesoucí souhrnné označení antimykotika jsou nenahraditelné prostředky v terapii infekcí vyvolaných houbovými a tedy i kvasinkovými patogeny. Buňky kvasinkového patogena i hostitele jsou eukaryontní, takže jejich metabolické i fyziologické pochody a buněčné struktury jsou si velmi podobné, což znesnadňuje vývoj látek s dostatečně silným a zároveň selektivním účinkem (a nízkou toxicitou pro hostitele).

Tento fakt se odráží i na relativně malém počtu v současnosti používaných typů antimykotik lišících se mechanismem účinku (šest skupin) ve srovnání s antibakteriálními antibiotiky, jichž je k dispozici asi 2,5krát více (Sanglard et al., 2009; Coates et al., 2011).

Antimykotika se používají v terapii (a profylaxi) zevních i systémových infekcí, kdy dnes používané látky disponují širokým spektrem účinku zahrnující jak všechny významné houbové patogeny (např. *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton spp.*, *Microsporium spp.*) tak i kvasinky rodu *Candida*, jejichž incidence je mezi všemi houbovými patogeny nejvyšší (Pfaller and Diekema, 2007; Havlickova et al., 2008; Vallabhaneni et al., 2016).

Léčivé přípravky obsahující antimykotika lze rozdělit podle způsobu podání na kožní a vaginální přípravky a přípravky pro perorální či intravenózní aplikaci. Dle povinného hlášení distributorů pro Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) byla celková cena spotřebovaných antimykotik v ČR v roce 2015 734 mil. Kč, z toho 361 mil. Kč tvoří náklady na antimykotika k vnitřnímu užití. Obecně nejužívanějším antimykotikem byl v ČR v roce 2015 klotrimazol, jehož spotřeba 1 774 000 balení o řád převyšuje všechny ostatní (Tab. 3).

Velká většina současných antimykotik cílí na povrchové struktury patogenů. Důležitou součástí plasmatické membrány kvasinkových, rostlinných i živočišných buněk jsou steroly, které určují její fluiditu a jsou důležité pro ukotvení a správnou funkci mnoha membránových proteinů. Zatímco dominantním sterolem plasmatické membrány živočišných buněk je cholesterol, u buněk kvasinek je jím ergosterol.

Enzymy syntetické dráhy ergosterolu jsou cílem celé řady antimykotik: azolů, allylaminů, thiokarbamatů (v ČR se v současnosti nepoužívají) a morfolinů. Syntéza ergosterolu se skládá z více než 20 reakcí a primární surovinou je acetyl-CoA. Obrázek 9 představuje zjednodušené schéma syntézy včetně genů, které kódují příslušné enzymy, z nichž některé slouží jako cílová místa antimykotik.

Taktéž ergosterol sám je napadán antimykotiky ze skupiny polyenů, které se k němu pevně váží a vzniklé agregáty pak silně poškozují funkce plasmatické membrány.

Druhou povrchovou strukturou kvasinkových buněk, kterou živočišné buňky

zcela postrádají a na kterou jsou zacílena nejnovější antimykotika (echinokandiny), je buněčná stěna.

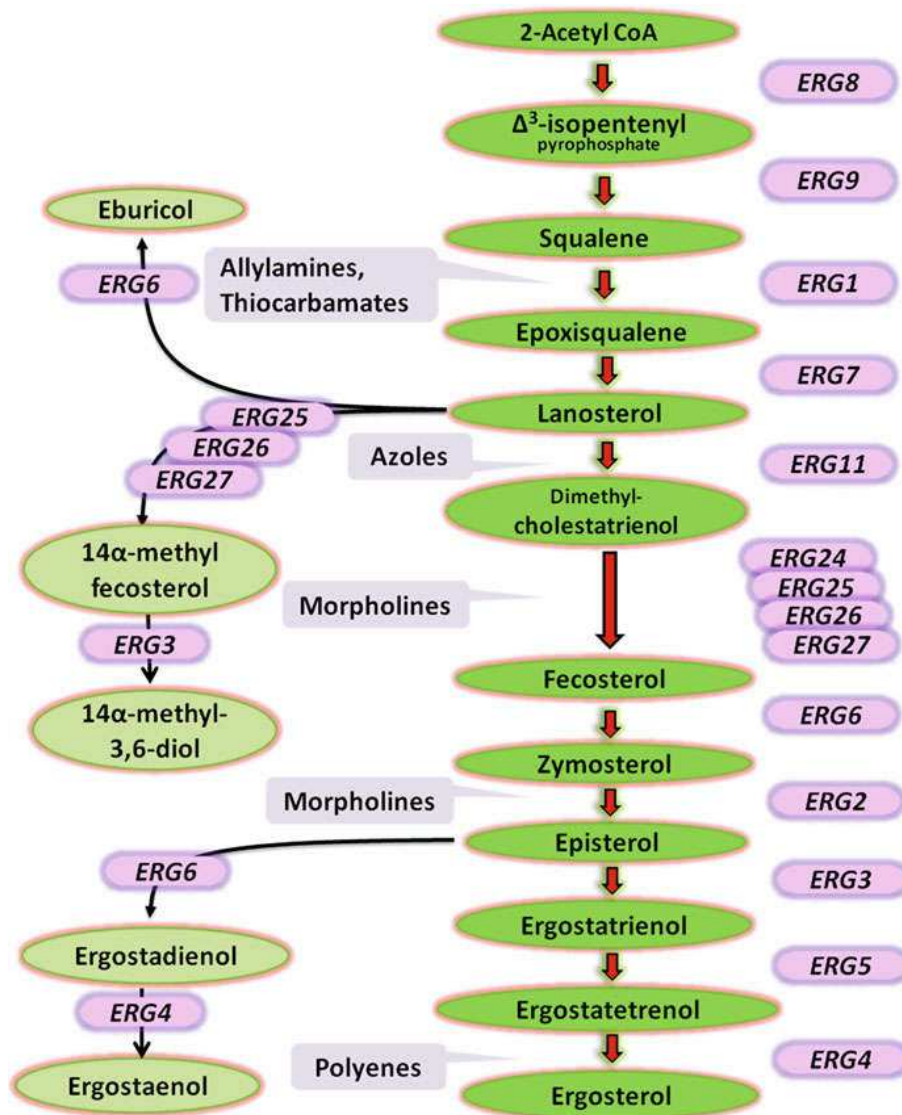
Další antimykotika, která se nadále v ČR uplatňují v terapii povrchových infekcí, jsou kyselina undecylenová a ciklopirox, u nichž přesný mechanismus účinku dosud nebyl objasněn. Antimykotika, která cílí na vnitřní struktury buňky (flucytosin, griseofulvin), jsou často zatížena toxicitou, nebo rychlým rozvojem rezistence a v ČR se v současnosti nepoužívají.

Tabulka 3: Antimykotika, jejich mechanismy účinku a spotřeba v ČR v roce 2015

čllová struktura	mechanismus účinku	skupina	látka	způsob podání ¹	počet balení (tisíce)	počet DDD	Cena ² (milióny Kč)		
inhibice syntézy ergosterolu, vazba na ergosterol	inhibice Erg11	imidazoly	klotrimazol	K, V	1774	-	138		
			ekonazol	K, V	229	-	24		
			ketokonazol	K	82	-	17		
				bifonazol	K	189	-	23	
				fluconazol	P, I	198	721	73	
				itrakonazol	P	39	320	15	
				vorikonazol	P, I	20	41	97	
				posakonazol	P	3	16	48	
				terbinafin	K, P	122	-	14	
				naftifin	K	748	-	70	
inhibice syntézy β -1,3-glukanu	inhibice Erg2 a Erg24	morfoliny	amorfolin	K	30	-	14		
			natamycin	K, V	35	-	3		
		vazba na ergosterol	polyeny	nystatin	K, V	477	-	38	
				amfotericin B	I	1,1	31	24	
		inhibice syntézy β -1,3-glukanu	inhibice Flks1	kaspofungin	I	3,8	3,8	33	
				mikafungin	I	7,3	7,3	51	
				anidulafungin	I	2,8	2,8	20	
		-	-	ostatní	kys. undecylenová	K	49	-	2
					cikloproprax	K	293	-	30

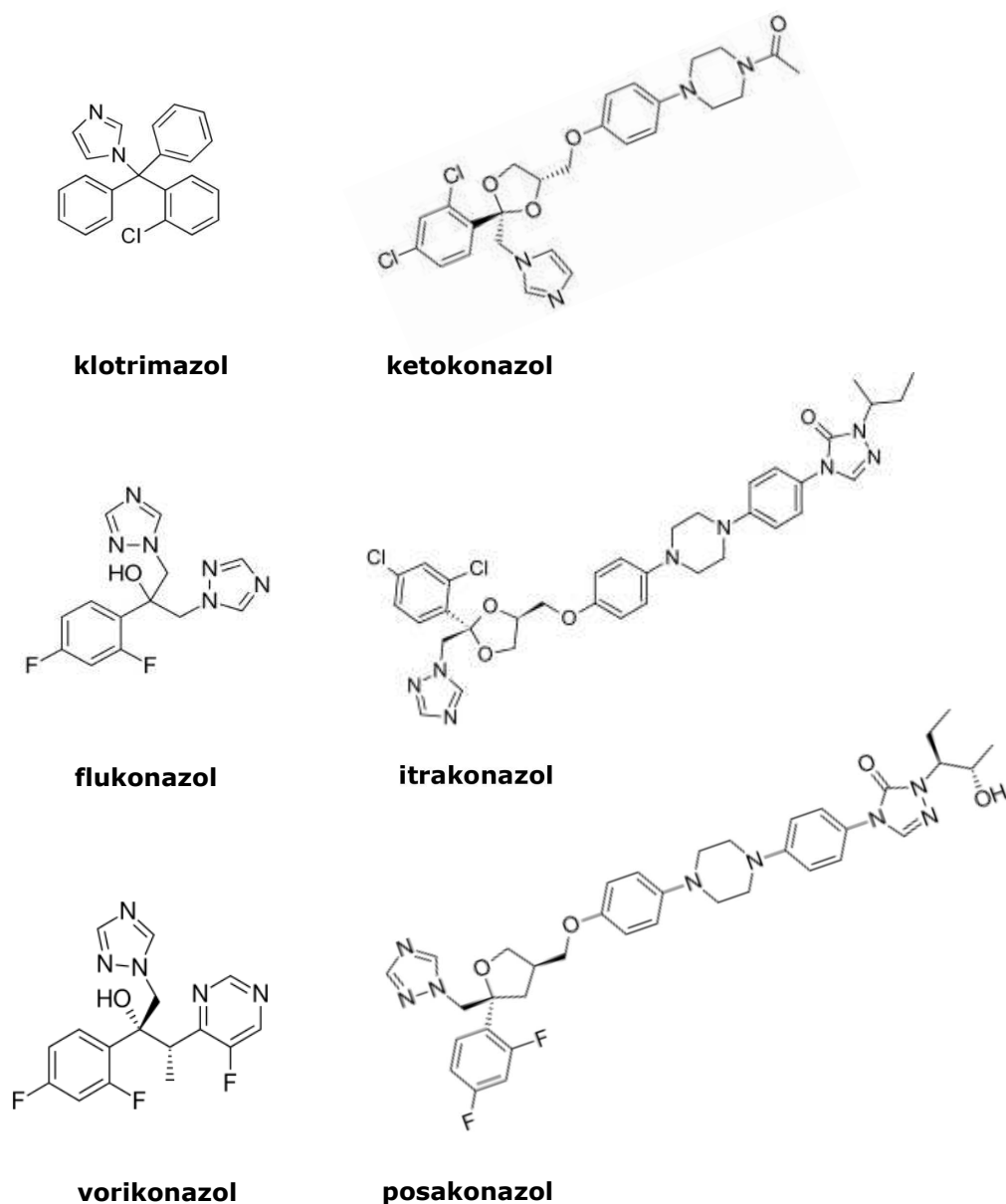
¹ (K) kožní podání, (V) vaginální podání, (P) perorální podání, (I) intravenózní podání

² Údaje o spotřebě (počet balení, počet DDD a celkové ceny) antimykotik v ČR v roce 2015 byly zpracovány na základě čtvrtletních hlášení o dodávkách léčiv od distributorů pro SÚKL (<http://www.sukl.cz/rok-2015>); DDD (definovaná denní dávka) představuje předpokládanou průměrnou udržovací dávku léčiva na jeden den, podávanou k léčbě v hlavní indikaci pro dospělého člověka; u přípravků pro kožní podání není DDD stanovena



Obrázek 9: Zjednodušené schéma syntézy ergosterolu v modelovém organismu *S. cerevisiae* a antimykotika, která tuto dráhu blokuji; převzato z Prasad et al. (2016)

2.3.1 Azoly



Obrázek 10: Struktura vybraných azolových antimykotik; upraveno podle Prasad et al. (2016)

Azoly jsou syntetická antimykotika obsahující ve své struktuře imidazolový nebo triazolový kruh. První léčivo z této skupiny chlormidazol bylo do praxe uvedeno roku 1958 pro léčbu povrchových mykóz. V průběhu následujících téměř šedesáti let se staly azoly nejpočetnější skupinou antimykotik vůbec. Azoly patří mezi širokospektrá antimykotika účinná proti většině významných houbových patogenů (např. *Candida* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*). Struktura nejvíce používaných zástupců této skupiny je znázorněna na obrázku 10.

Mechanismus fungistatického účinku azolů spočívá v blokádě syntézy ergoste-

rolu (Obr. 9). Azoly inhibují enzym 14 α -demethylázu (kódovanou genem *ERG11*), jež patří mezi cytochromy P450 (CYP), ve kterých je atom železa v aktivním centru zablokovan vazbou na dusík z imidazolového (triazolového) kruhu (Odds et al., 2003). Azoly též váží CYP 22 δ -desaturázu produkt genu *ERG5* katalyzující předposlední reakci syntetické dráhy ergosterolu (Obr. 9); (Kelly et al., 1997a). Různé izoformy CYP se vyskytují v buňkách všech známých organismů a v lidském těle zodpovídají za metabolismus xenobiotik a tedy i většiny léčivých látek. Afinita azolů k CYP ze syntetické dráhy ergosterolu kvasinek je ovlivněna strukturou postranního řetězce a pro jednotlivé látky z této skupiny je různá. Jednotlivé azoly se tedy liší jak spektrem účinku, tak i selektivitou. Inhibice lidských CYP má za následek zpomalení metabolismu současně podávaných léčiv a vede k jejich nežádoucí kumulaci v organismu (Lincová, 2007).

Pro fungistatický účinek azolů je významná především inhibice 14 α -demethylázy vedoucí k hromadění jejího substrátu lanosterolu a dalších methylovaných sterolů z něj odvozených a k nedostatku ergosterolu. Tato změna složení plasmatické membrány mění její fluiditu a negativně ovlivňuje funkci řady membránových proteinů, např. enzymů syntetizujících stavební prvky buněčné stěny (Daum et al., 1998).

Vývojově nejstarší skupinu dnes používaných azolů tvoří imidazoly z konce 60. let 20. stol. Tato léčiva jsou kvůli své nízké selektivitě (a vysoké afinitě k lidským CYP a tím i toxicitě) určena pro kožní a vaginální použití. Do této skupiny patří i klotrimazol, který je dnes nejužívanějším antimykotikem v ČR (Tab. 3).

V 80. letech 20. stol byl do praxe uveden první imidazol pro vnitřní užití (ketokonazol), což znamenalo významné zlepšení terapie kandidemií, neboť nabízel alternativu k amfotericinu B, který je zatížen kumulativní nefrotoxicitou (Lincová, 2007).

Mladší skupinu azolů tvoří triazoly, mezi které se počítají dnes nejužívanější systémová antimykotika flukonazol a itrakonazol, která přinesla oproti ketokonazolu širší spektrum účinku a nižší toxicitu. Od nich jsou pak odvozena nejmladší léčiva vorikonazol a posakonazol s výrazně vyšší účinností vůči kvasinkovým patogenům, která jsou dnes vyhrazena pro léčbu závažných systémových mykóz (Fera et al., 2009; Peyton et al., 2015).

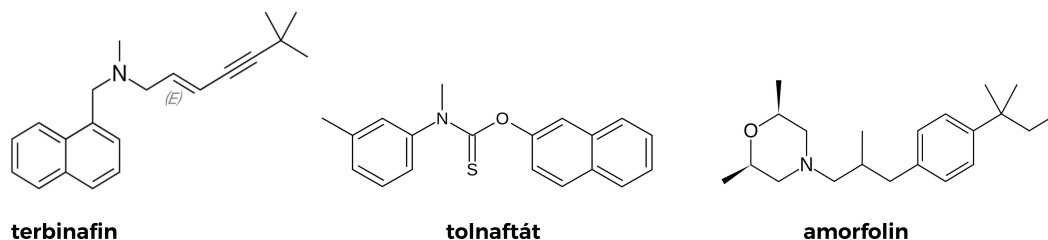
Především vůči vnitřně podávaným azolům vzniká poměrně rychle rezistence, a to nejčastěji u kandid. Masivní nasazení ketokonazolu a flukonazolu vedlo ke zvýšení incidence druhů primárně k azolům rezistentních (*C. krusei*), což je zapříčiněno odlišným složením jejich plasmatické membrány, i nárůstu výskytu kmenů všech patogenních druhů kandid s rozvinutou sekundární rezistencí (Pfaller and Diekema, 2007; Pfaller et al., 2014). Při rozvoji rezistence vůči azolům se

uplatňují různé mechanismy popsané v kapitole 2.3.6.

Flukonazol

Flukonazol (FLC) má mezi azoly výjimečnou pozici, a proto je i rezistence kandid k této látce předmětem studia předkládané práce. Flukonazol patří mezi triazoly a společně s itrakonazolem se od začátku uplatnil při léčbě systémových mykóz (Odds et al., 2003). Flukonazol vyniká svými farmakokinetickými parametry, na rozdíl od ostatních azolů je hydrofilní, dobře se vstřebává z trávicího traktu, přičemž absorpce nezávisí na potravě a pH žaludku. K dalším výjimečným vlastnostem této látky patří jeho nízká vazba na bílkoviny v krevní plasmě, relativně dlouhý biologický poločas (20-30 h) a vysoký terapeutický index (vysoká selektivita, nízká toxicita) (Lincová, 2007). Kvůli uvedeným vlastnostem je flukonazol stále nejpoužívanějším perorálním antimykotikem současnosti, ačkoliv je zatížen rozvojem rezistence (Marr and Boeckh, 2000; Pappas et al., 2009). V profylaxi systémových mykóz u imunokompromitovaných pacientů, kdy je potřeba udržovat dlouhodobě stabilní koncentraci antimykotika při perorálním způsobu užití, je dodnes flukonazol nenahraditelný. V ČR byla za rok 2015 spotřeba FLC 721 000 DDD, což je nejvíce mezi systémovými antimykotiky (Tab. 3).

2.3.2 Allylaminy, thiokarbamáty a morfoliny



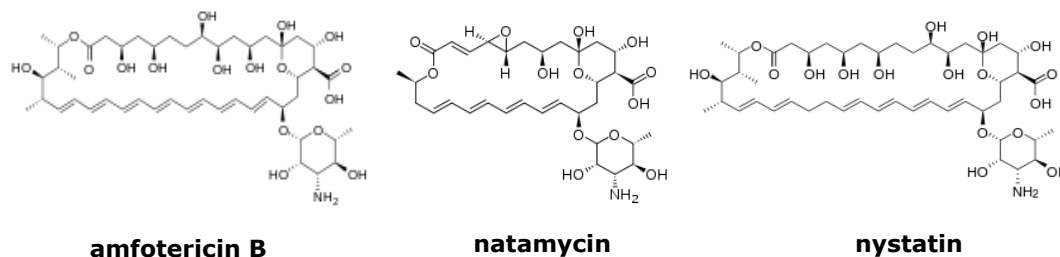
Obrázek 11: Struktura vybraných antimykotik ze skupiny allylaminů, thiokarbamatů a morfolinů; upraveno podle Prasad et al. (2016)

Tři skupiny antimykotik z názvu této kapitoly podobně jako azoly blokují syntézu ergosterolu. Allylaminy a thiokarbamáty jsou nekompetitivní inhibitory skvalenepoxidázy (produkt genu *ERG1*; Obr. 9), jejichž aktivita vede k intracelulárnímu hromadění skvalenu (fungicidní účinek) a depleci ergosterolu v plasmatické membráně (fungistatický účinek). Klinicky se dnes uplatňují zástupci allylaminů (terbinafin a naftifin; Obr. 11), které jsou používány k léčbě dermatofytóz různého původu. Terbinafin lze aplikovat perorálně v případě závažných dermatofytóz, kdy se uplatňuje jeho vysoká lipofilita a keratofilita a tím i výborná penetrace do jinak obtížně dosažitelných tkání (nehty, stratum corneum); (Lincová, 2007).

Thiokarbamáty (tolnaftát, tolcyklát; Obr. 11) jsou v současnosti překonány azoly jak z hlediska účinnosti, tak toxicity (Lincová, 2007). Rezistence k allylaminům a thiokarbamatům vzniká nejčastěji mutací či zvýšenou transkripcí genu *ERG1* kódujícího cílový enzym (Prasad et al., 2016).

Morfoliny blokují syntézu ergosterolu hned na dvou místech jeho syntetické dráhy: inhibicí proteinů Erg24 a Erg2 (Obr. 9), což vede k hromadění toxických sterolů. V humánní medicíně se používá jediný zástupce této skupiny – amorfolin určený k zevnímu použití (Obr. 11).

2.3.3 Polyeny



Obrázek 12: Struktura vybraných polyenových antimykotik; upraveno podle Prasad et al. (2016)

První polyenové antimykotikum amfotericin B byl izolován roku 1955 z bakterie *Streptomyces nodosus* pocházející z delty řeky Orinoko (Oura et al., 1955). Bakterie stejného rodu slouží v biotechnologické výrobě těchto antimykotik dodnes.

Struktura polyenů obsahuje rozsáhlý cyklus z části tvořený řetězcem konjugovaných dvojných vazeb, podle kterého je celá skupina pojmenovaná. Jsou to většinou barevné, silně hydrofobní a tedy ve vodě nerozpustné látky, které navíc ve vodném prostředí spontánně agregují (Lemke et al., 2005).

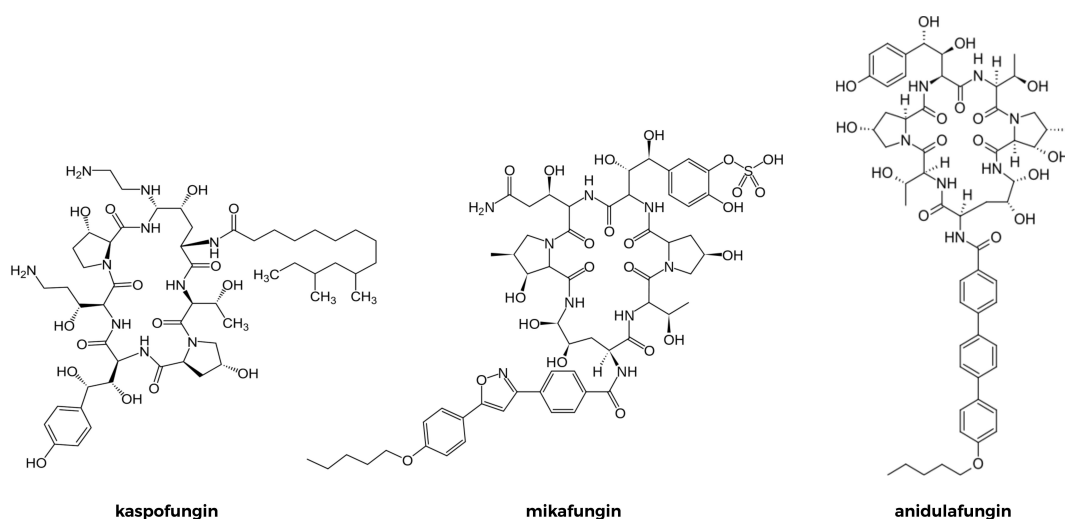
Mechanismus fungicidního účinku polyenů spočívá v jejich schopnosti vázat se na ergosterol v plasmatické membráně. V místě vzniku agregátů ergosterol-polyen je plasmatická membrána poškozena natolik, že přestává plnit svou bariérovou funkci (Odds et al., 2003).

Polyeny jsou širokospektrá antimykotika zasahující všechny klinicky významné houbové patogeny i protozoární parazity, jejichž plasmatická membrána obsahuje ergosterol (např. *Leishmania sp.*); (Lemke et al., 2005).

Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je amfotericin B (Obr.12), který je indikován k léčbě systémových infekcí. Výskyt primární rezistence i rozvoj sekundární rezistence k amfotericinu B je vzácný, nicméně byl několikrát pozorovaný zejména u *C. lusitaniae* (Favel et al., 2003; Arendrup, 2013; Asner et al., 2015). Hlavním limitem použití tohoto léčiva je jeho nefrotoxicita, která je závislá na celkové dávce, neboť je způsobena vazbou amfotericinu B na cholesterol plasmatické membrány nefronů, v nichž se amfotericin B kumuluje (Zager, 2000).

Snížit akumulaci amfotericinu B v nefronech lze pomocí hydrofobního nosiče, který zlepší distribuci účinné látky. Jako nosič pro amfotericin B jsou využívány látky tělu vlastní (lipidy, deoxycholová kyselina) nebo látky syntetické (často polymerní povahy), které s amfotericinem B tvoří koloidní roztoky, suspenze, emulze či micely (Lemke et al., 2005; Azanza et al., 2015). V ČR se dále používají pro léčbu povrchových a vaginálních mykóz polyenová antimykotika natamycin a nystatin (Tab. 3, Obr.12).

2.3.4 Echinokandiny



Obrázek 13: Struktura vybraných antimykotik ze skupiny echinokandinů; upraveno podle Prasad et al. (2016)

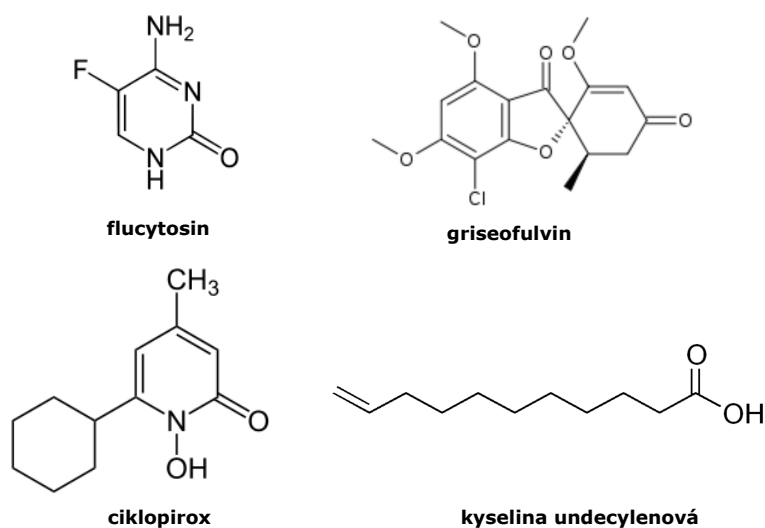
Echinokandiny tvoří nejmladší skupinu v současnosti používaných antimykotik. V terapii našly uplatnění tři látky z této skupiny – kaspofungin, mikafungin a anidulafungin (Obr. 13). Jedná se o semisyntetické cyklické hexapeptidy s hydrofobním postranním řetězcem, který se pravděpodobně váže na fosfolipidy plasmatické membrány patogenů (Denning, 2003).

Mechanismus účinku echinokandinů spočívá v blokádě syntézy základního stavebního prvku buněčné stěny houbových organismů β -1,3-glukanu, a to nekompetitivní inhibicí β -1,3-glukansyntetázy kódované genem *FKS1* (Perlin, 2011).

Echinokandiny mají široké spektrum účinku, zahrnující i patogenní druhy kandid. Všechny tři v terapii používané látky vynikají nízkou toxicitou, díky absenci β -1,3-syntetázy v savčích buňkách. Jsou vyhrazeny pro terapii závažných orgánových mykóz především při intoleranci amfotericinu B či rezistenci původce infekce k triazolům. Jejich hlavní nevýhodou je náročnost jejich administrace, kdy jsou všechny echinokandiny dostupné pouze jako lyofilizáty pro přípravu intravenózních roztoků (s nízkou stabilitou), a finanční náročnost (Denning, 2003; Perlin, 2011). Za rok 2015 bylo v ČR podáno 14 169 DDD echinokandinů v ceně 104,8 mil. Kč – pro srovnání za stejné období bylo podáno 31 057 DDD amfotericinu B s náklady 24,2 mil. Kč (Tab. 3).

Rezistence k echinokandinům je zatím hlášena spíše výjimečně a její příčinou je pravděpodobně mutace genu *FKS1*, který kóduje cílový enzym (Sanglard et al., 2009).

2.3.5 Ostatní antimykotika



Obrázek 14: Struktura vybraných antimykotik; upraveno podle (Wishart et al., 2006)

Flucytosin

Flucytosin (5-fluorocytosin; Obr. 14) je antimykotikum neobvyklé svým zacílením, jež není zaměřeno na povrchové struktury, ale na replikaci DNA a proteosyntézu. Tento pyrimidinový analog je aktivně transportován do buňky, kde následně podstupuje reakci katalyzovanou cytosindeaminázou (kódovanou genem *FCY1*), která se v savčích buňkách nevyskytuje, na vlastní účinnou látku 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU působí jako antimetabolit, kdy jeho inkorporace do DNA a RNA vede k zastavení replikace i proteosyntézy (Odds et al., 2003; Vermes et al., 2000).

Flucytosin je zatížen četnými nežádoucími účinky a velmi rychlým nástupem rezistence, která se rozvíjí především u kandid. Hlavní dva mechanismy vedoucí k rezistenci jsou snížení importu flucytosinu do buňky v důsledku mutací v genech kódujících příslušné transportéry a limitace enzymatické přeměny flucytosinu na účinný 5-FU (Sanglard and Odds, 2002).

Přesto, díky vynikajícím farmakokinetickým parametrům (dobrá dostupnost v likvoru), je toto léčivo indikováno v kombinaci s amfotericinem B nebo triazoly v terapii kryptokokových meningitid (Lincová, 2007). Vzhledem k prakticky nulové incidenci kryptokokových infekcí v ČR zde není flucytosin v současnosti používán.

Griseofulvin

Griseofulvin (Obr. 14) byl prvně izolován roku 1939 z kultury *Penicillium patulum* a po uvedení do praxe v 50. letech 20. stol. se stal prvním antimykotikem pro vnitřní užití určeným k terapii kožních mykóz. Mechanismus účinku je pravděpodobně založen na vazbě griseofulvinu na tubulin, následným zablokováním funkce mikrotubulů a tím i mitózy (Develoux, 2001; Odds et al., 2003). Podobně jako flucytosin tedy nemíří na povrchové struktury, ale do nitra buňky.

Hlavním faktorem limitujícím použití této látky je nízká selektivita griseofulvinu, spojená s častým výskytem nežádoucích účinků zejména hepatotoxicitou (Develoux, 2001). Dnes patří griseofulvin k obsolentním léčivům a v ČR se nepoužívá.

Ciklopirox a kyselina undecylenová

Ciklopirox a kyselina undecylenová (Obr. 14) jsou syntetická léčiva dosud v ČR používaná k léčbě nezávažných kožních mykóz. Mechanismus účinku obou látek nebyl doposud zcela objasněn. Ciklopirox zasahuje mnoho základních buněčných procesů (replikace DNA, agregace dělicího vřeténka) a ovlivňuje transkripci mnoha genů souvisejících s virulencí a rezistencí u *C. albicans* (Leem et al., 2003; Niewerth et al., 2003).

Nenasycená mastná kyselina undecylenová působí ve vysokých koncentracích fungistaticky zejména proti dermatofytům (*Trichophyton spp.*). U *C. albicans* kyselina undecylenová inhibuje zatím neznámým způsobem morfogenezi a růst biofilmu (McLain et al., 2000; Goncalves et al., 2012).

2.3.6 Rezistence k antimykotikům

Výskyt patogenů rezistentních čili odolných vůči látkám proti nim zacíleným, a tedy patogenů disponujících selekční výhodou, je komplikací každé doposud známé terapie využívající antimykotika (i antibakteriální antibiotika). Patogeny přirozeně odolné vůči konkrétní látce označujeme jako primárně rezistentní. Klinicky významným příkladem je primární rezistence *C. krusei* k azolům, která vyplývá z odlišné struktury cílového enzymu 14 α -demethylázy a která pravděpodobně vedla ke zvýšení incidence kandidemií způsobených tímto druhem (Orozco et al., 1998).

Mnohem častěji se patogeny stávají odolnými až po kontaktu s daným antimykotikem. K rozvoji této tzv. sekundární rezistence dochází nejčastěji změnou cílové struktury (enzymu), zvýšením exprese genu kódujícího cílový enzym, zmnožením části nebo celého chromozomu nesoucího geny pro cílové enzymy, alterací metabolické dráhy zablokované antimykotikem, snížením importu anitmykotika, či jeho

efektivním exportem.

Změna cílové struktury

Tento způsob rozvoje rezistence je velmi rozšířený a za jeho vznikem stojí pravděpodobně spontánní mutace genu kódujícího příslušný enzym, které vedou ke strukturním změnám v místě vazby antimykotika.

Touto cestou často získávají rezistenci kandidy vůči azolům, kdy azoly selhávají v inhibici 14 α -demethylázy (mutace v genu *ERG11*), i vůči flucytosinu, kdy dochází ke snížení deaminace této látky cytosindeaminázou (mutace genu *FCY1*). Mutace genu *FKS1* kódujícího β -1,3-glukansyntetázu je pak příčinou (zatím ojedinělého) rozvoje rezistence kandid vůči echinokandinům (Sanglard et al., 2009; Perlin, 2011; Marichal et al., 1999).

Zvýšení exprese genu *ERG11*

Úroveň exprese genu *ERG11* je faktorem, který je spojován s pozitivní selekcí primárně rezistentních druhů a kmenů, i s rozvojem sekundární rezistence k azolům u kandid. K navýšení exprese genu *ERG11* a tím i k posílení rezistence dochází dvěma odlišnými mechanismy. První z nich spočívá v navýšení počtu kopií genu *ERG11* cestou remodelace genomu (viz další odstavec), který byl prvně pozorován u druhu *C. glabrata*, jež primární i sekundární rezistencí k azolům vyniká (Marichal et al., 1997).

Druhý způsob zvýšení exprese genu *ERG11* souvisí s regulací transkripce celé biosyntetické dráhy ergosterolu. V promotorech některých genů biosyntetické dráhy ergosterolu (včetně genů *ERG11* a *ERG2*; Obr. 9) se nachází tzv. box SRE (Sterol Response Element), na který se váže hlavní regulátor této dráhy - transkripční faktor Upc2, a tím indukuje expresi příslušných genů a posiluje syntézu ergosterolu (MacPherson et al., 2005). Geny kódující tento faktor byly nalezeny v genomech všech klinicky významných druhů kandid i v *S. cerevisiae* (Noel, 2012). Exprese samotného genu *UPC2* narůstá v přítomnosti azolů, což může být přímá reakce na (buňkou detekované) antimykotikum, nebo odpověď na pokles obsahu ergosterolu v plasmatické membráně. U některých kmenů *C. albicans* byly v genu *UPC2* objeveny mutace měnící aktivitu tohoto transkripčního faktoru, které vedou ke zvýšené expresi genů syntetické dráhy ergosterolu, a tím i k primární rezistenci těchto kmenů *C. albicans* k azolům (Silver et al., 2004).

Plasticita genomu

Kvasinkové organismy se vyznačují značnou plasticitou genomu, která jim umožňuje adaptovat se na změny vnějšího prostředí. Nejčastěji dochází k multiplikaci chromozomů (nebo jejich částí), které nesou geny potřebné pro adaptaci na nové podmínky. Aneuploidie se rozvíjí rychle v prostředí se selekčním tlakem, kdy dochází k nerovnoměrnému rozdělení chromozomů během mitózy a k proliferaci té části dceřinných buněk, které aneuploidní genom poskytuje selekční výhodu (Berman, 2016). U kandid je tento mechanismus spojený s rezistencí k antimykotikům. Nejlépe je tento jev prostudovaný u druhu *C. albicans*, hojně je pozorován u druhu *C. glabrata* i dalších (Noel, 2012). Např. původně diploidní genom kmenů *C. albicans* rezistentních k flukonazolu často obsahuje tři chromozomy č. 5, které mimo jiné nesou gen *ERG11* a gen *TAC1* (regulátor transkripce transportérů ABC, viz dále). Tato aneuploidie tedy posiluje rezistenci k flukonazolu hned dvěma nezávislými způsoby (Selmecki et al., 2006). Aneuploidní genomy jsou nestabilní a po vymizení selekčního tlaku se brzy vrací k původní ploidii, přičemž u některých kmenů *C. albicans* vede absence antimykotika k redukci rezistence (Berman, 2016).

Alterace metabolické dráhy

V případě rezistence k antimykotikům, se také tento mechanismus uplatňuje zejména v rozvoji rezistence vůči azolům. Pokud dojde k inhibici 14α -demethylázy, hromadí se v buňce toxický lanosterol a další methylované steroly. Pokud současně dojde vlivem mutace k zablokování genu *ERG3* kódujícího 5δ -desaturázu, konečným produktem takto modifikované syntetické dráhy je 14α -methylfekosterol, jehož přítomnost v plasmatické membráně nepůsobí toxicky a do jisté míry nahrazuje chybějící ergosterol (Kelly et al., 1997b). Uvedený mechanismus byl objeven např. v kmeni *C. dubliniensis* rezistentnímu vůči itrakonazolu (Pinjon et al., 2003).

Další modifikace syntetické dráhy ergosterolu zahrnující mutace v genech *ERG5* a *ERG6* vede nejen k nahrazení ergosterolu v plasmatické membráně jinými steroly a tím i k vyšší rezistenci vůči azolům, ale též vůči amfotericinu B, který se k alternativním sterolům váže mnohem slaběji než k ergosterolu. Takto vzniklá křížová rezistence byla popsána např. u *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. lusitaniae* (Young et al., 2003; Vandeputte et al., 2007; Martel et al., 2010).

Snížení importu antimykotika

U lipofilních antimykotik (většina azolů) se předpokládá, že vstupují do buňky mechanismem prosté difúze přes plasmatickou membránu. Několik studií uvádí, že změna fluidity plasmatické membrány (zejména její snížení) vede ke zvýšení rezistence kandid k azolům (Prasad et al., 2016).

Snížení importu antimykotika hraje též roli v rozvoji rezistence k flucytosinu, kde však dochází k mutacím v genech kódujících proteiny, které flucytosin do buňky přenášejí (Sanglard and Odds, 2002).

Export antimykotik

Efektivní export brání kumulaci antimykotika v buňce je jedním z nejrozšířenějších způsobů obrany proti antimykotikům. Kandidy disponují velkým počtem genů kódujících transportéry zodpovědné za export cizorodých látek a tedy i antimykotik. Zdaleka ne všechny geny jsou v současnosti charakterizovány. Tyto transportéry se vyznačují širokou substrátovou specifitou a dvěma odlišnými transportními mechanismy a mohou tak buňku chránit před různými typy antimykotik.

První skupinu tvoří transportéry typu ABC. Jedná se o ATPázy pojmenované podle konzervované domény katalyzující hydrolyzu ATP (ATP Binding Cassette). V genomu *C. albicans* bylo identifikováno 28, v *S. cerevisiae* 22 a v genomu *C. glabrata* 18 genů patřících do této skupiny. Ne všechny tyto proteiny exportují xenobiotika (Gaur et al., 2005; Gbelska et al., 2006). Rozvoj rezistence zejména k azolům související s transportéry ABC byl prokázán u druhů *C. albicans* (charakterizováno sedm různých transportérů ABC), *C. glabrata* (*CgCdr1*, *CgCdr2* a *CgSnq2*) a *C. krusei* (*CkAbc1*); (Prasad et al., 2016).

Druhý typ transportérů podílejících se na exportu antimykotik jsou proteiny z velmi početné skupiny MFS (Major Facilitator Superfamily). Transportéry MFS energizují export substrátu výměnou za proton (tedy antiportním mechanismem), takže fungují hlavně za podmínek, kdy existuje gradient protonů přes plasmatickou membránu, a tedy spíše v kyselém vnějším prostředí.

Kandidy disponují mnoha desítkami genů kódujících předpokládané antiportní systémy (Gaur et al., 2008), které se podílejí na exportu mnoha různých substrátů včetně xenobiotik. Mezi nejlépe prostudované zástupce této skupiny patří *CaMdr1* a jeho homology u druhů *C. dubliniensis* (*CdMdr1*) a *C. glabrata* (*CgMdr1*). U posledních dvou jmenovaných druhů jsou tyto transportéry zodpovědné za rezistenci k flukonazolu (Moran et al., 1998; Sanglard et al., 1999).

3. Použité metody

Mikrobiologické metody

- Kultivace a uchovávání kvasinek a bakterií
- Stanovení rychlosti růstu a charakterizace růstových fenotypů při různých druzích stresu
 - kapkový test, gradientový kapkový test
 - sledování růstu v tekutém médiu
- Stanovení počtu buněk a sušiny biomasy
- Mikroskopie kvasinek

Biochemické metody

- Stanovení obsahu Na^+ a měření exportu Na^+ v buňkách kvasinek pomocí atomové absorpční spektrofotometrie (Kinclova et al., 2001b)
- Měření relativního membránového potenciálu (Denksteinova et al., 1997)

Bioinformatické metody

- Sběr dat z databází, analýza, manipulace s daty pomocí skriptů vytvořených v jazyku Perl a nástrojů sbírky BioPerl
- Porovnávání sekvencí DNA a proteinů
 - ClustalX (Larkin et al., 2007)
 - Muscle (Edgar, 2004)
- Hledání ortologů kvasinkových importérů K^+
 - Blast NCBI (Johnson et al., 2008)
 - *Candida* Genome Database (Inglis et al., 2012)
 - *Saccharomyces* Genome Database (Cherry et al., 2012)
 - GenBank (Benson et al., 2005)
- Analýza syntenie

- Yeast Gene Order Browser (Byrne and Wolfe, 2005)
- *Candida* Gene Order Browser (Maguire et al., 2013)
- Vyhledávání konzervovaných úseků a konzervovaných funkčních domén
 - Protein Families Database (Finn et al., 2016)
 - CATH Database (Sillitoe et al., 2015)
- Predikce topologie
 - TMHMM 2.0. (Krogh et al., 2001)
 - KD plot (Kyte and Doolittle, 1982)
- Predikce sekundární struktury
 - Soubor algoritmů JPred4 (Drozdetskiy et al., 2015)
- Predikce strukturovanosti proteinu
 - DisEMBL (Linding et al., 2003a)
 - Globplot (Linding et al., 2003b)

4. Výsledky

Výsledky této disertační práce jsou shrnuty celkem ve čtyřech publikovaných článcích, které na sebe volně navazují a dohromady tak vytvářejí ucelený soubor nových poznatků týkajících se homeostáze kationtů alkalických kovů patogenních druhů kvasinek rodu *Candida* z hlediska jejího významu pro rezistenci k flukonazolu a hledání cílů pro nová antimykotika.

1. Elicharová, H. and H. Sychrová (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Medical Mycology*, 51: 785-794.
2. Elicharová, H. and H. Sychrová (2014). Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*. *Microbiology*, 160: 1705-1713.
3. Hušeková, B., H. Elicharová and H. Sychrová (2016). Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 394-401.
4. Elicharová, H., B. Hušeková and H. Sychrová (2016). Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow039

4.1 Publikace č. 1 - Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells

Jednotlivé druhy kvasinek rodu *Candida*, které jsou nejčastějšími původci systémových mykóz, se liší virulencí či rezistencí k různým typům antimykotik, avšak všechny se musí neustále vyrovnávat s měnícím se prostředím i různými stresovými faktory.

Zaměřili jsme se na schopnost pěti druhů patogenních kandid udržovat homeostázi kationtů alkalických kovů v přítomnosti flukonazolu (FLC), neboť již dříve byla popsána schopnost tohoto antimykotika zvýšit intracelulární obsah Na^+ u dvou kmenů *C. albicans* (senzitivního a tolerantního k FLC) (Kolecka et al., 2009). Dříve publikované práce zahrnující i tři námi studované druhy (*C. albicans*, *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*) ukazují, že kandidy se v toleranci k solím alkalických kovů (NaCl, KCl, LiCl) výrazně liší (Krauke and Sychrova, 2008, 2010). My jsme pokračovali charakterizací tolerance k solím u druhů *C. krusei* a *C. tropicalis*. Oba druhy jsou spíše osmosenzitivní, avšak překvapivě dramaticky se liší jejich citlivost k LiCl. *C. krusei* je k této toxické soli citlivější než obecně nejvíce osmosenzitivní *C. dubliniensis* a naproti tomu *C. tropicalis* toleruje podobně vysoké koncentrace jako nejvíce osmotolerantní *C. parapsilosis*. Námi pozorovaná tolerance k solím u ostatních druhů, včetně obecně osmotolerantní *C. albicans* je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Krauke and Sychrova, 2008, 2010).

Následně jsme našli subinhibiční koncentrace solí (NaCl, KCl) a flukonazolu a provedli sadu růstových experimentů v přítomnosti kombinací subinhibičních koncentrací FLC a solí. Přítomnost subinhibiční koncentrace FLC v kombinaci se subinhibiční koncentrací soli (NaCl nebo KCl) způsobila výrazné zpomalení růstu všech druhů kandid tedy FLC-senzitivních (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) i FLC-rezistentních (*C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*), přičemž výraznější efekt vykazuje ve srovnání s KCl obecně více toxický NaCl. Buňky všech druhů kandid pěstovaných s FLC po přidavku NaCl do média akumulují více Na^+ než buňky pěstované bez FLC a právě zvýšení vnitrobuněčné koncentrace Na^+ (případně K^+) je nejspíše příčinou inhibice růstu kandid v přítomnosti kombinace FLC+NaCl (KCl).

Pozorovaná akumulace kationtů alkalických kovů mohla být způsobena buď nadměrným vstupem kationtů do buňky, nebo jejich nedostatečným exportem. Vzhledem k (námi zjištěné) neporušené schopnosti všech testovaných kandid exportovat Na^+ , jsme se zaměřili na vstup kationtů do buňky, který závisí na membránovém potenciálu.

Pro měření relativního membránového potenciálu pro různé druhy kandid byla

optimalizována a prvně úspěšně použita metoda využívající fluorescenční sondu diS-C₃(3) (Denksteinova et al., 1997). Inkubace buněk všech testovaných druhů kandid v přítomnosti subinhibiční koncentrace FLC vedla k nárůstu membránového potenciálu, což znamená i zvýšení nespécifického vstupu kladně nabitých látek (a tedy i Na⁺ nebo K⁺) do buňky. Hyperpolarizační efekt FLC byl ověřen použitím hygromycinu B, který také nese kladný náboj a ke kterému byly všechny druhy kandid citlivější výrazně více, pokud byla v médiu přítomna i subinhibiční koncentrace FLC. Z výše uvedeného vyplývá potenciál flukonazolu (již v malých koncentracích) zesilovat antimykotický účinek pravděpodobně všech látek, jejichž vstup do buňky závisí na velikosti membránového potenciálu.

Eličarová, H. and H. Sychrová (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Medical Mycology*, 51: 785-794.

Original Articles

Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells

HANA ELICHAROVA & HANA SYCHROVA

Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Five pathogenic *Candida* species were compared in terms of their osmotolerance, tolerance to toxic sodium and lithium cations, and resistance to fluconazole. The species not only differed, in general, in their tolerance to high osmotic pressure (*C. albicans* and *C. parapsilosis* being the most osmotolerant) but exhibited distinct sensitivities to toxic sodium and lithium cations, with *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* being very tolerant but *C. krusei* and *C. dubliniensis* sensitive to LiCl. The treatment of both fluconazole-susceptible (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) and fluconazole-resistant (*C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. tropicalis*) growing cells with subinhibitory concentrations of fluconazole resulted in substantially elevated intracellular Na⁺ levels. Using a diS-C₃(3) assay, for the first time, to monitor the relative membrane potential ($\Delta\Psi$) of *Candida* cells, we show that the fluconazole treatment of growing cells of all five species results in a substantial hyperpolarization of their plasma membranes, which is responsible for an increased non-specific transport of toxic alkali metal cations and other cationic drugs (e.g., hygromycin B). Thus, the combination of relatively low doses of fluconazole and drugs, whose import into the tested *Candida* strains is driven by the cell membrane potential, might be especially potent in terms of its ability to inhibit the growth of or even kill various *Candida* species.

Keywords fluconazole resistance, sodium tolerance, membrane potential, combinatorial stress, *Candida*

Introduction

Yeasts belonging to the genus *Candida* are associated with infections of immunocompromised patients and cause life-threatening invasions of the bloodstream and organs [1,2]. The virulence of various *Candida* species depends on their ability to survive under a broad range of stress conditions caused by nutrition availability in host tissues, immune cells or antimycotics. Osmotic stress, among others, is an obstacle to overcome, as it may play an important role in the progress of the infection [3] and the cell salt tolerance is a key physiological parameter. *Candida* species are, in

general, osmotolerant yeasts [4], and similarly to many other yeast species, including the model *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* cells maintain a low intracellular concentration of toxic sodium or lithium cations (in the μM range) but a relatively high concentration (200–300 mM) of potassium cations, which plays an important role in many biological processes such as the regulation of cell volume, pH and membrane potential [5]. To maintain an optimally high intracellular ratio between potassium and sodium, yeast cells use a broad range of various transport mechanisms and substrate specificities to mediate the uptake and efflux of alkali metal cations. For an efficient efflux of toxic sodium and lithium cations or surplus potassium, yeasts employ two active transporters, a Na⁺(K⁺)/H⁺ antiporter and a Na⁺(K⁺)-ATPase [5,6].

Candida species differ in their salt tolerance. A direct comparison of four *Candida* species [4] showed that *C. albicans* is relatively osmotolerant, but *C. parapsilosis*

Received 23 August 2012; Received in final revised form 7 December 2012; Accepted 19 February 2013

Correspondence: Hana Sychrova, Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic. Tel: +420 24106 2667; Fax: +420 24106 2488; E-mail: sychrova@biomed.cas.cz

can grow in the presence of even higher concentrations of external salts and tolerates the lowest intracellular K^+/Na^+ ratio. *Candida dubliniensis* is in contrast relatively osmosensitive. These findings correlate with the characterization of $Na^+(K^+)/H^+$ antiporters of the three *Candida* species upon expression in *S. cerevisiae*. The $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter of the most halotolerant *C. parapsilosis* had a much higher transport activity than the antiporter of the most osmosensitive *C. dubliniensis* [7]. Besides the low activity of its $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter, *C. dubliniensis*'s Na^+ -ATPase is also much less expressed and active than its homologue in the closely related but much more osmotolerant *C. albicans* [8]. As some of the yeast alkali-metal-cation transporters do not exist in mammalian cells (e.g., Trk potassium-uptake systems or Ena Na^+ -ATPases), they may serve as possible antifungal drug targets.

An important factor in the development of candidemia is the species-specific susceptibility to antifungal agents. The introduction of treatment with azoles in the 1980s resulted on the one hand in a decrease in infections caused by relatively fluconazole-susceptible *C. albicans* strains, and on the other hand in a rapid increase of non-*C. albicans* infections caused by species resistant to azoles. Azoles block the synthesis of ergosterol via the inhibition of 4α -demethylase, which in turn results in a change in the composition of the plasma membrane (higher lanosterol content) and cell wall (changed chitin/glucans ratio) in *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* [9]. Fluconazole (FLC) is one of the most frequently used azoles in both the therapy and prophylaxis of candidemia thanks to its suitable and reliable pharmacokinetic parameters [10–12] and many studies were devoted to characterizing its activity in detail [13]. Using the model yeast *S. cerevisiae*, FLC was shown to modulate plasma-membrane parameters such as rigidity, heterogeneity, and water penetration [14] that influence numerous cell activities. For example, ergosterol depletion leads to the inactivation of vacuolar ATPase accompanied by an impaired vacuolar acidification that causes alterations in the secretome and wall proteome of *C. albicans* cells [15]. The presence of FLC also affects the tolerance of *C. albicans* to salts. Subinhibitory concentrations of FLC increased the intracellular content of toxic sodium cations in both FLC-susceptible and FLC-resistant *C. albicans* strains [16].

In this study, we aimed to answer the question of whether the observed combination effect of subinhibitory concentrations of FLC and NaCl is species-specific and what mechanism is responsible for the increased sodium content in *Candida* cells in the presence of FLC. We focused on five clinically important species differing in many biological aspects and used the most frequently isolated species *C. albicans*, its closest relative *C. dubliniensis*, the naturally FLC-resistant *C. krusei*, the halotolerant

C. parapsilosis and the species associated with neutropenia and malignancy, *C. tropicalis* [4,17–21]. First, we characterized the salt tolerance of *C. krusei* and *C. tropicalis* and compared it with the other three species. We then studied the combinatory effect of FLC and salts on the five species and measured the cation content in cells. In order to estimate the relative membrane potential of cells in various growth conditions, we optimized a fluorescence diS-C₃(3) assay for *Candida* species. We show for the first time that FLC-treatment results in a plasma-membrane hyperpolarization and that the combination effect of low FLC and salt concentrations is caused by an increased uptake of alkali metal cations that is driven by the higher plasma-membrane potential.

Materials and methods

Strains, media and growth conditions

The commonly used laboratory strains *C. albicans* SC5314, *C. dubliniensis* CD36, *C. krusei* ATCC6258, *C. parapsilosis* CBS604 and *C. tropicalis* ATCC750 were employed. Cells were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, and 2% glucose) supplemented as indicated at 30°C. Agar (2%) was added to allow for solidification of the plates. Salts or sorbitol were added before autoclaving, drugs (fluconazole; Ardez Pharma, Kosor, Czech Republic; 2 mg/ml aqueous stock solution and hygromycin B (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA); 50 mg/ml aqueous stock solution) were sterilized by filtration and added to the media after autoclaving.

The phenotypes of the species in the presence of salts, FLC and hygromycin B were studied both on solid and in liquid media. Classical drop tests were performed to compare the growth capacity of *Candida* species. Yeast cells (grown overnight on a fresh YPD plate without supplements) were resuspended in sterile water to the same initial OD₆₀₀ (approx. 1). Ten-fold serial dilutions were prepared and 3 μ l aliquots spotted on a series of plates containing the indicated concentrations of supplements. Plates were incubated at 30°C for 3 or 7 d, and digital greyscale images of growing colonies were taken using a Nikon Coolpix 7000 camera. Each drop test was repeated at least three times and representative results are shown. To compare the growth in liquid media, an Elx808 BioTek 96-well plate reader was used [22]. Cells growing overnight in YPD were diluted to OD₆₀₀ = 0.002 in YPD with supplements at the indicated concentrations. Aliquots (100 μ l) were distributed into the plate wells and their growth at 30°C was monitored over 48 h. Gen5 software (BioTek, Prague, Czech Republic) was used to determine the V_{max} value for each growth curve by performing linear regression, calculating the slope for each curve and reporting the steepest slope as the

V_{\max} (mOD₆₀₀/min). Growth rate was determined in quadruplicate in three separate experiments. The plotted values of V_{\max} are the mean \pm standard error of three separate experiments.

Sodium content assay

To estimate the intracellular sodium content, cells growing overnight in YPD were diluted in 20 ml of fresh YPD with or without fluconazole to OD₆₀₀ = 0.15 and incubated at 30°C to OD₆₀₀ = 0.6. As yeast cells grown under standard conditions maintain a very low intracellular concentration of toxic Na⁺ (on the order of μ M), the cells need to be pre-loaded with NaCl before [Na⁺]_{in} measurement. For the sodium preloading, fresh YPD supplemented with NaCl (and fluconazole when indicated) was added to the cell culture and cultivation followed at 30°C for 60 or 120 min. The cell culture was then harvested, washed with H₂O, and the pellets resuspended in a buffer containing 20 mM MES (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid), 0.1 mM MgCl₂ and adjusted with Ca(OH)₂ to pH 5.5. Three aliquots of cells were withdrawn immediately, filtered, acid extracted, and the concentration of Na⁺ in the extracts was estimated by atomic absorption spectroscopy [23]. The plotted values are the mean \pm standard error (SE) of three separate experiments.

Relative membrane potential assay

The fluorescence assay for monitoring relative membrane-potential changes was adapted from [24–26] as follows: cells grown overnight in YPD were diluted in 20 ml of fresh YPD with or without fluconazole to OD₆₀₀ = 0.15 and incubated at 30°C to OD₆₀₀ = 0.6. Cells were harvested, washed twice with a MES-TEA buffer (10 mM MES adjusted with triethanolamine to pH 6.0), and resuspended in the same buffer to OD₆₀₀ = 0.2. A diS-C₃(3) (3,3-dipropylthiacyanocarbonyl iodide) fluorescence probe (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 0.1 mM stock solution in ethanol) was added to 3 ml of cell suspension to a final probe concentration of 0.2 μ M. When indicated, fluconazole was added to the cell suspension in MES-TEA buffer immediately after the fluorescence probe just before the fluorescence measurement. CCCP (carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazone, Sigma-Aldrich; 50 mM stock solution in dimethyl sulfoxide) or amiodarone (Sigma-Aldrich; 20 mM stock solution in dimethyl sulfoxide) were added to the measured samples to the final indicated concentration when the fluorescence signal reached its equilibrium. Fluorescence emission spectra were measured with an ISS PC1 spectrofluorometer. The excitation wavelength was 531 nm, and emission intensities were measured at 560 and 580 nm. The staining curves (i.e., the dependence of the emission intensity ratio I_{580}/I_{560} on the

duration of staining t) were fitted as described in [27], and the value of the intensity ratio at equilibrium was estimated. The shown values are the mean \pm SE of three separate experiments.

Results

First, we compared the salt tolerance of *C. krusei* and *C. tropicalis* to the salt tolerance of the other three species whose salt tolerance we had compared previously [4], i.e., with highly salt-tolerant *C. parapsilosis*, salt-tolerant *C. albicans* and relatively salt-sensitive *C. dubliniensis*. The growth of each of the five species was tested on a series of plates containing a broad range of salt concentrations (0.5–2.5 M NaCl, 0.25–1 M LiCl and 0.5–2.7 M KCl). The three salts were chosen as a non-toxic solute that mainly increased the osmotic pressure (KCl), a moderately toxic solute that increased the osmotic pressure (NaCl) and a highly toxic solute (LiCl) whose toxicity prevents its use at concentrations causing a high osmotic stress. Figure 1A shows the growth of the five species at salt concentrations where crucial differences among the species were observed. *Candida krusei* is more osmotolerant than *C. dubliniensis*, but it is extremely sensitive to the presence of toxic lithium cations. On the other hand, *C. tropicalis* appears to be a rather osmosensitive species but tolerates toxic lithium cations, as well as *C. parapsilosis*. Similarly, we also compared the ability of the five species to grow in the presence of FLC ranging from 0.5–200 μ g/ml. Figure 1B demonstrates that FLC was very toxic for *C. albicans* cells, less toxic for *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* and not toxic for *C. krusei*. *Candida krusei* growth was inhibited by FLC concentrations higher than 100 μ g/ml, i.e., the concentration at which the other four species did not grow at all (data not shown). The use of a series of plates with increasing concentrations of salts and fluconazole helped us to choose the subinhibitory concentrations of salts and FLC that did not significantly affect growth. The subinhibitory concentrations of FLC used were 0.5 (for *C. albicans* and *C. parapsilosis*) or 10 μ g/ml (for the other three species). Figure 5B shows that the growth at these FLC concentrations was not significantly inhibited.

Fluconazole affects salt tolerance

When we tested the growth of *Candida* cells in the presence of FLC together with a salt (both at subinhibitory concentrations), we observed a combinatorial inhibitory effect for all five species. The tests of FLC and salt combinations were performed first on plates and then confirmed in liquid media. Figures 2A and 2B show in detail the results obtained for the FLC-resistant and simultaneously relatively salt-sensitive species *C. dubliniensis*. *Candida*

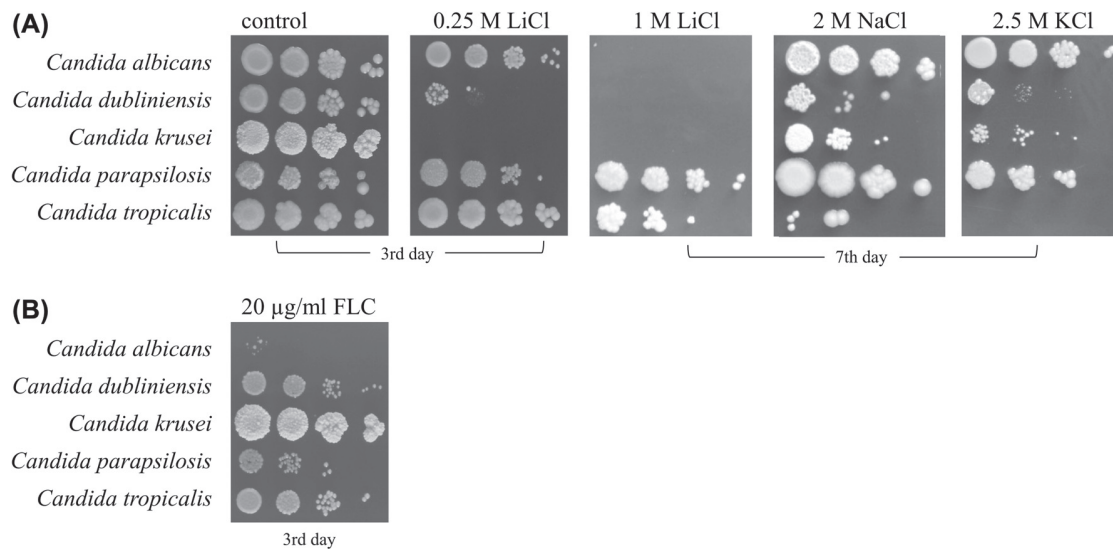


Fig. 1 Tolerance of *Candida* species to salts and fluconazole (FLC). Ten-fold serial dilutions of overnight-grown cells were prepared and 3 µl aliquots spotted on a series of YPD plates containing the indicated concentrations of salts (A) or FLC (B).

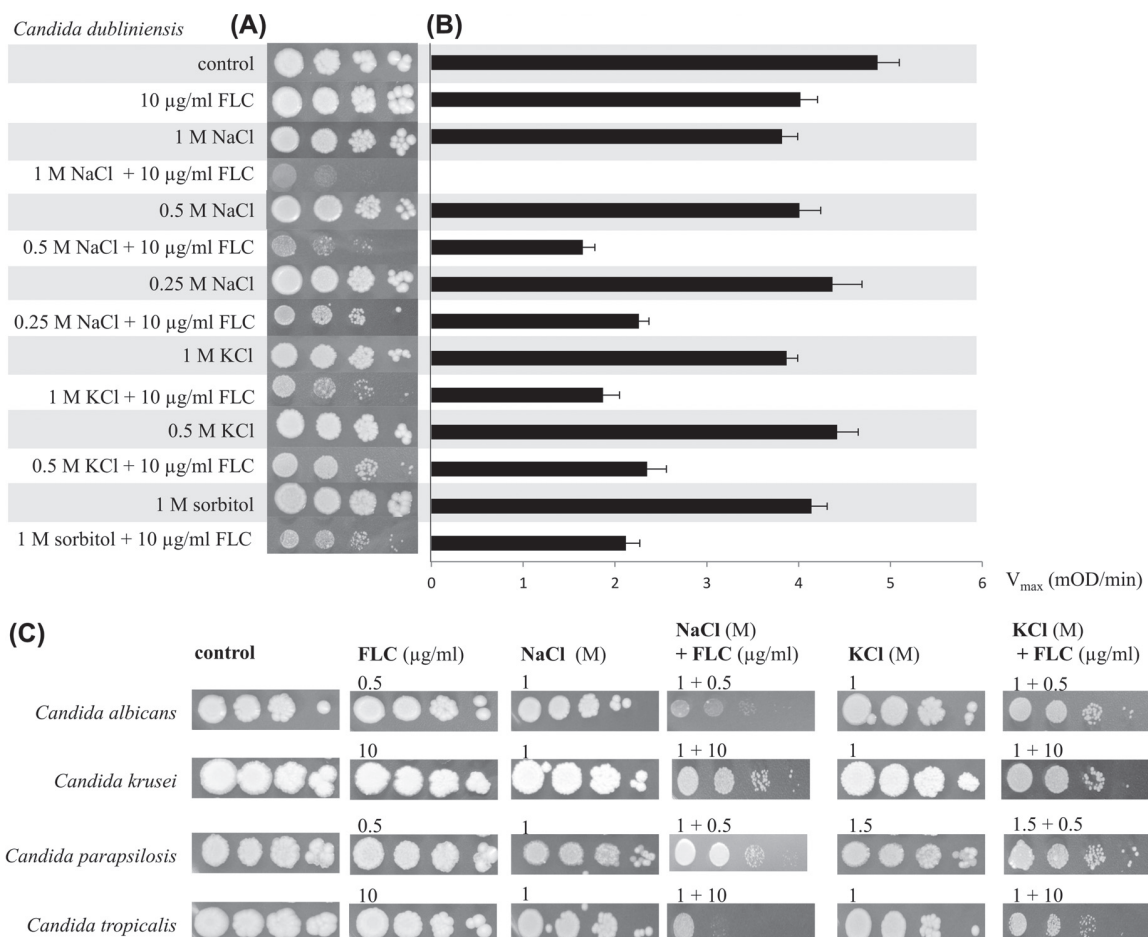


Fig. 2 Growth of *Candida* species in presence of subinhibitory concentrations of salts, fluconazole (FLC) and their combination. Ten-fold serial dilutions of overnight-grown cells of *Candida* species were prepared and 3 µl aliquots spotted on a series of plates supplemented as indicated (A and C). (B) Growth of *C. dubliniensis* cells in liquid YPD supplemented as indicated. The growth rate V_{max} values are the mean \pm standard error of three separate experiments.

dubliniensis grew well in the presence of 10 µg/ml FLC or moderate concentrations of salts (e.g., 1 M NaCl or 1 M KCl) but when the two compounds were mixed, its growth was severely inhibited. The level of inhibition was higher when NaCl was used, probably due to the toxicity of sodium cations. Nevertheless, a combinatorial effect observed for non-toxic KCl and FLC suggested that the presence of fluconazole affected the general osmotolerance of *C. dubliniensis* cells. To confirm this, we tested the combination of FLC and a non-ionic solute (1 M sorbitol). As with the salts, cells were able to grow well in the presence of 1 M sorbitol, but as soon as FLC was added together with sorbitol, the growth of cells was significantly inhibited (Fig. 2A and 2B). This result confirmed that the presence of fluconazole influenced the general osmotolerance of *C. dubliniensis* cells.

Similar tests with appropriate specific subinhibitory concentrations of salts and FLC were performed for the other four species and the obtained results are summarized

Table 1 Subinhibitory concentrations of fluconazole (FLC) and the lowest concentrations of salts that when combined caused a significant inhibition of growth of species.

Species	FLC (µg/ml)	NaCl (M)	KCl (M)
<i>Candida albicans</i>	0.5	0.5	1
<i>Candida dubliniensis</i>	10	0.25	0.5
<i>Candida krusei</i>	10	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0.5	1	1
<i>Candida tropicalis</i>	10	0.5	1

in Figure 2C. For all four species, the combination of subinhibitory concentrations of FLC and salt inhibited their growth, and this inhibition was, as with *C. dubliniensis*, more pronounced with NaCl than with KCl. Table 1 summarizes the used subinhibitory FLC concentration and the lowest concentrations of salts at which the combinatorial effect of both compounds was clearly visible for each species. In summary, we found for both FLC-tolerant/sensitive and/or salt-tolerant/sensitive species a combination

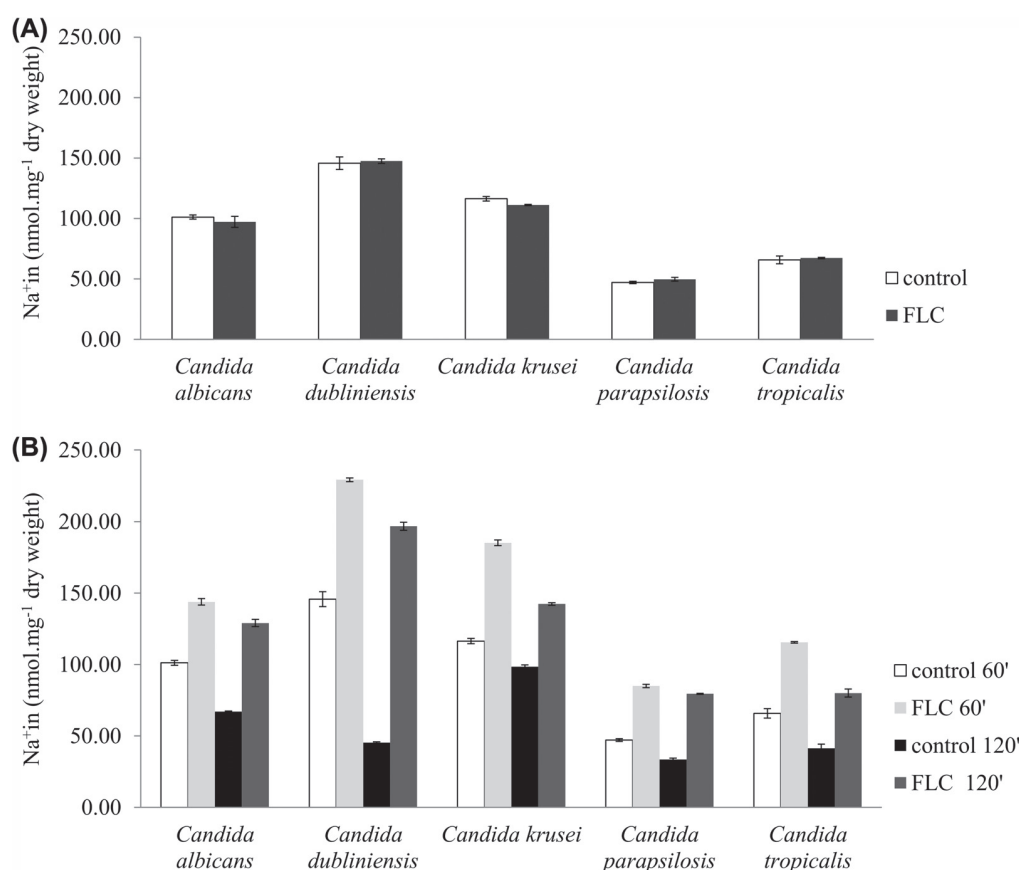


Fig. 3 Influence of fluconazole (FLC) on intracellular sodium content in *Candida* cells. (A) Overnight-grown cells were preloaded with NaCl (0.5 M NaCl in YPD for *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*; 0.25 M for *C. dubliniensis*) and subinhibitory concentrations of FLC for 60 min, then the intracellular sodium content was estimated. (B) Overnight-grown cells were cultivated in fresh YPD medium with or without subinhibitory concentrations of FLC for two cell cycles. The cells were then incubated in YPD supplemented with NaCl (0.5 M for *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*; 0.25 M for *C. dubliniensis*) and the intracellular sodium content was estimated after 60 and 120 min. The plotted values are the mean \pm standard error of three separate experiments.

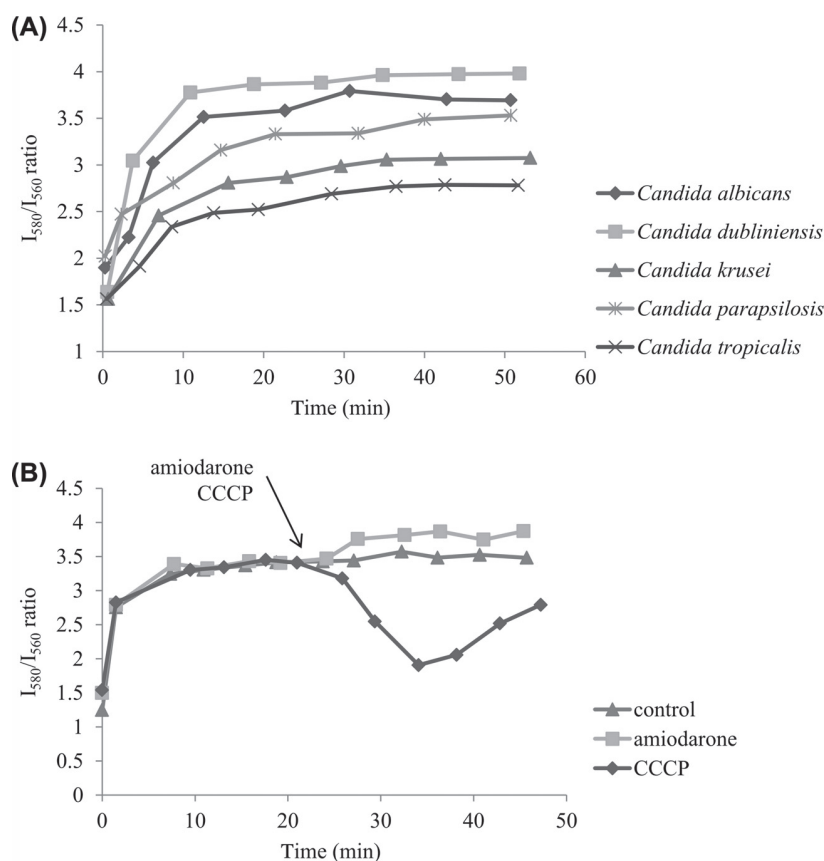


Fig. 4 Measurement of relative membrane potential of *Candida* species. Overnight-grown cells were cultivated in fresh YPD medium for two cell cycles (approx. 240 min), washed twice and resuspended in a MES-TEA buffer to $OD_{600} = 0.2$. The diS-C₃(3) probe was added to the cell suspension to a final concentration of 0.2 μ M. (A) I_{580}/I_{560} fluorescence emission ratio of diS-C₃(3) was measured in *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* for 55 min. (B) I_{580}/I_{560} fluorescence emission ratio of diS-C₃(3) was measured in *C. albicans* cells. 5 μ M amiodarone or 10 μ M CCCP was added after 25 min.

of subinhibitory concentrations that significantly affected their growth.

Fluconazole treatment increases intracellular sodium content

Our previous results suggested that FLC increases the content of toxic sodium cations in *C. albicans* cells [16]. To determine whether the presence of FLC increases the sodium content in all five species, we first measured the intracellular sodium content in *Candida* cells preloaded with NaCl and simultaneously treated with FLC (at the concentrations given in Table 1) for 60 min (Fig. 3A). All species were incubated with 0.5 M NaCl except *C. dubliniensis*, which was preloaded with 0.25 M NaCl. Figure 3A shows that the internal sodium content in *Candida* species differed and reflected their salt tolerance. Salt-sensitive *C. dubliniensis* cells had the highest intracellular Na⁺ concentration, although they were preloaded with a lower amount of NaCl (Fig. 3A). Surprisingly, we did not observe the presence of FLC during cell preloading

to have any effect. In all five species, the intracellular content of sodium was the same whether fluconazole was added or not. The results obtained suggested that FLC had no immediate effect on sodium content and that it needed to be present during cell growth to influence cation homeostasis.

To verify the effect of FLC treatment during cell growth and division, a second series of sodium content measurements was performed with cells that were grown in the presence of subinhibitory concentrations of FLC for two cell cycles prior to Na⁺ preloading. Preloading (with the same NaCl concentrations as mentioned above) took 60 or 120 min. The FLC-treatment resulted in a subsequent increase in the intracellular sodium content in the cells of all five species (Fig. 3B). After 60 min of preloading with NaCl, FLC-treated cells contained about 40% (*C. albicans*) to 80% (*C. parapsilosis*) more sodium than control cells grown without FLC. In the growth tests, (Fig. 2) all *Candida* species tolerated 1 M NaCl however, the FLC-treatment resulted in a sharp increase in $[Na^+]_{in}$ though the

cells were preloaded with much lower concentrations of NaCl (0.5 M for *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and 0.25 M for *C. dubliniensis*) and for a relatively short time (60–120 min). These results suggested that the changes in the plasma-membrane composition resulting from FLC treatment either altered the rate of uptake or efflux of sodium cations across the plasma membrane. As both FLC-treated and control cells contained more sodium after 60 min of preloading than after 120 min (Fig. 3B), we concluded that the induction/activation of sodium exporting systems (mainly Ena ATPases) is functional in both types of cells. No specific transporters for the uptake of toxic sodium cations have been identified in yeast cells. The only reported exception is the phosphate- Na^+ cotransporter Pho89 in *S. cerevisiae* [28] which is only active in cells starved of phosphate and incubated in an alkaline external pH. Under conditions of NaCl stress, sodium transport into the cells is non-specific. It follows the sodium concentration gradient and is driven by the plasma-membrane potential [5]. Thus, the observed increased sodium content could result from a plasma-membrane hyperpolarization caused by a change in the membrane composition resulting from growth in the presence of FLC. To verify this hypothesis, we first optimized the technique used for estimating the relative plasma-membrane potential ($\Delta\Psi$) in *S. cerevisiae* cells for the five *Candida* species, confirmed its applicability in a series of experiments with hyperpolarizing and depolarizing compounds, and finally estimated the relative membrane potential in FLC-treated cells.

Measurement of relative membrane potential

The relative plasma-membrane potential and its changes in the five *Candida* species was measured using a diS-C₃(3) assay. This assay is based on the potential-dependent distribution of a diS-C₃(3) fluorescence probe across the cell membrane and it was successfully used to monitor the changes in the plasma-membrane potential in *S. cerevisiae* [24,25]. The wavelength of maximum emission changes, when the probe is bound to intracellular components, and the position of the emission spectrum thus reflects the actual intracellular probe concentration. To confirm that the diS-C₃(3) assay is a suitable technique for monitoring membrane potential changes in *Candida* cells, we first measured the diS-C₃(3) probe staining curves in YPD grown cells (Fig. 4A) and then monitored the influence of a depolarizing (CCCp) and a hyperpolarizing (amiodarone) drug on the relative $\Delta\Psi$ of all five *Candida* species. The protonophore CCCp causes either a small reduction or an almost total loss of membrane potential depending on the dose, and amiodarone was shown to both increase and decrease the $\Delta\Psi$ of *S. cerevisiae* depending on dose [29]

and to have a synergistic inhibitory effect with FLC on *C. albicans* cells [30]. Reproducible staining curves were obtained for all five species; however, there were differences among them suggesting that the *Candida* species significantly differ either in their plasma-membrane composition or in their $\Delta\Psi$ or both (Fig. 4A). The relative plasma membrane potential is usually represented as the emission intensity I_{580}/I_{560} ratio at the staining equilibrium [25]. This ratio differed from 2.78 ± 0.16 for *C. tropicalis* to 3.97 ± 0.18 for *C. dubliniensis* and was much higher for all five *Candida* species than the ratio measured for similarly grown and treated *S. cerevisiae* (approx. 1.8). Nevertheless, the addition of either hyperpolarizing amiodarone or depolarizing CCCp resulted in a corresponding increase or decrease in the staining curve (shown for *C. albicans* in Fig. 4B) and confirmed the reliability of this technique for estimating the relative membrane potential of *Candida* cells.

Fluconazole treatment increases relative membrane potential

To determine if FLC influences the $\Delta\Psi$ of *Candida* cells, we compared the relative membrane potential in three samples of cells for each species. Overnight-grown cells were divided into three aliquots and incubated in fresh YPD in the absence (aliquots 1 and 2) or presence (aliquot 3) of appropriate subinhibitory FLC concentrations (Table 1) for two cell cycles (approx. 240 min). The cells were then transferred to the MES-TEA buffer, the probe was added and fluorescence measured. The first aliquot served as a control, the second aliquot was used to monitor the immediate effect of FLC, which was added to cells together with the diS-C₃(3) probe just before the fluorescence measurement, and the third aliquot of cells served to monitor the changes in $\Delta\Psi$ resulting from the presence of fluconazole during cell growth. We observed no changes in the $\Delta\Psi$ of any *Candida* species when FLC was added together with the fluorescence probe (Fig. 5A) and this result confirmed our conclusion that FLC had no immediate effect on the sodium content in *Candida* cells (Fig. 3A). On the other hand, the cells of all five species that grew for two cell cycles in the presence of subinhibitory concentrations of FLC exhibited a significant increase in I_{580}/I_{560} ratio that implied a hyperpolarization of their plasma membranes (Fig. 5A). The relative hyperpolarization was species-specific; nevertheless, the treatment of growing cells with subinhibitory concentrations of FLC increased their relative $\Delta\Psi$ in all *Candida* species. To confirm that FLC treatment hyperpolarizes the plasma membrane, we performed a series of drop tests on YPD plates with a toxic cationic compound (hygromycin B). Hygromycin B enters into the yeast cells in proportion to their plasma-membrane

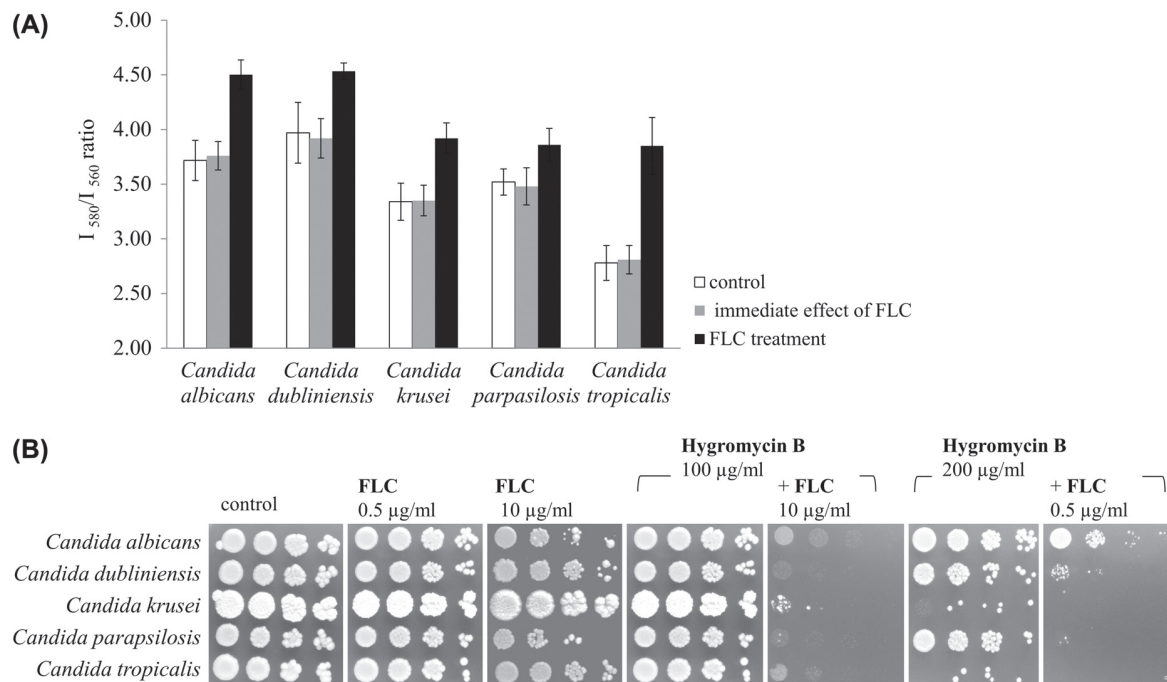


Fig. 5 Effect of fluconazole (FLC) on relative membrane potential and hygromycin B sensitivity. (A) Overnight-grown cells were cultivated in fresh YPD medium for 240 min with or without subinhibitory concentrations of FLC. Cells were washed twice and resuspended in a MES-TEA buffer to $OD_{600} = 0.2$. The diS-C₃(3) probe (0.2 µM final concentration) was added and the emission ratio estimated. Control, cells incubated without FLC (□); (■), cell suspension to which FLC was added together with the fluorescent probe; (■), cells grown in the presence of FLC for two cell cycles. The columns represent the values of the I_{580}/I_{560} fluorescence emission ratio at equilibrium. The plotted values are the mean \pm standard error of three separate experiments. (B) Ten-fold serial dilutions of overnight-grown cells were prepared and 3 µl aliquots spotted on a series of YPD plates containing the indicated amounts of FLC and hygromycin B.

potential, i.e., hyperpolarized cells are more sensitive to this drug [31–33]. *Candida* species tolerated quite high concentrations of hygromycin B (Fig. 5B), however, some of them (*C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. parapsilosis*) were more resistant than the others (*C. krusei* and *C. tropicalis*). Thus, we used two subinhibitory concentrations of hygromycin B (100 µg/ml for *C. krusei* and *C. tropicalis*, and 200 µg/ml for *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. parapsilosis*), which did not cause a significant inhibition of growth (Fig. 5B). When FLC and hygromycin B were combined, the growth of all five *Candida* species was strongly inhibited (Fig. 5B). The subinhibitory concentrations of FLC increased the sensitivity of all five *Candida* species to the hygromycin B whose toxicity depends on the level of cell membrane potential.

Discussion

The virulence of *Candida* species depends on many environmental conditions, including extracellular pH and the concentration of alkali metal cations. For example, intracellular potassium concentration was shown to be involved in the yeast-to-hyphae morphological switch of *C. albicans* [34], and high extracellular concentra-

tions of alkali metal cations were shown to affect *C. albicans* virulence traits such as germ tube formation, adhesion, and hydrophobicity [35]. Our long-term aim is to understand the regulation of the maintenance of alkali-metal-cation homeostasis in pathogenic yeast species and to contribute towards identifying new targets for antifungal therapy.

Testing the tolerance of five *Candida* species to alkali-metal-cation salts revealed significant differences among these species despite the fact that they possess homologous genes encoding alkali-metal-cation transporters in their genomes. Though all five species could be classified as relatively osmotolerant (compared to the model yeasts *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*), they exhibited different levels of tolerance to different salts. Whereas *C. krusei* was rather osmotolerant but highly sensitive to relatively low concentrations of toxic lithium cations, *C. tropicalis* was the most osmosensitive among the five tested species but it tolerated, similarly to *C. parapsilosis*, very high concentrations of LiCl (Fig. 1A). One of the reasons for the observed variations in salt tolerance might be the difference in the level of expression and/or activity of cation exporting systems, Ena ATPases and Cnh1 cation/proton antiporters in these species [7,8].

As with salt tolerance, we observed significant differences in species sensitivity to fluconazole, with *C. krusei* being by far the most FLC-resistant (Fig. 1B).

Our results showed that though the various *Candida* species had different levels of salt and fluconazole tolerance, all of them were sensitive to the combination of species-specific subinhibitory concentrations of these compounds (Fig. 2) and in all of them, fluconazole treatment resulted in an increase in the intracellular content of toxic sodium cations (Fig. 3B). Thus, the previously observed phenomenon of a combinatorial inhibitory effect of FLC and salts in *C. albicans* [16] seems to be rather general in all *Candida* species. Nevertheless, the level of inhibition was species-specific, as the most resistant to the combinatorial effect of salt and FLC was the most halotolerant (and relatively FLC-susceptible) *C. parapsilosis* and the most FLC-resistant *C. krusei* (Figs. 1 and 2). As the combination of subinhibitory concentrations affected the growth of both FLC/salt sensitive and FLC/salt tolerant species, we suggest that the observed synergistic interaction was a result of a general change in cytosolic cation homeostasis and most probably also in the osmotic balance.

Having established the requisite experimental platform for the estimation of membrane potential changes, we were able to show that the observed higher content of sodium in FLC-treated cells most likely resulted from a higher non-specific uptake of sodium driven by the increased membrane potential (negative inside). We did not observe an immediate effect of FLC addition when measuring the intracellular sodium content, nor when estimating the relative membrane potential (Figs. 3A and 5A). The cell had to grow and divide in the presence of FLC before the changes in cation content and membrane potential could be observed. These results suggested that it was the different composition of the plasma membrane in FLC-treated cells [9] that led to the hyperpolarization of the plasma membrane, and that this hyperpolarization was the basis of the increased cell sensitivity to toxic cationic compounds, e.g., hygromycin B (Fig. 5B). This conclusion of ours is supported by two earlier observations. First, some azoles (miconazole, ketoconazole) influence K^+ homeostasis immediately after their addition to cells, but the short-term presence of FLC does not affect the potassium content in *S. cerevisiae* [36]. Second, a synergistic effect of amiodarone and azoles in *C. albicans* has been described [30] and we showed that both of these compounds had a hyperpolarizing effect on the plasma membrane, amiodarone an immediate one (Fig. 4B) and FLC during cell growth and division (Fig. 5A).

In summary, we show for the first time that FLC treatment results in a hyperpolarization of the plasma membranes of five strains of both FLC-susceptible and

FLC-tolerant *Candida* species and that the synergistic effect of subinhibitory concentrations of FLC and many other cationic drugs is most probably caused by an increased uptake of these compounds driven by the higher plasma-membrane potential.

Acknowledgments

We thank Vladimir Buchta for *C. krusei* and *C. tropicalis* strains. We also thank Olga Zimmermannova for critical reading of the manuscript. The technical assistance of Pavla Herynkova is gratefully acknowledged.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

This work was supported by the following grants: GA CR P302/12/1151, AV0Z 50110509 and RVO:6798582.

References

- Odds FC. *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol* 1987; **15**: 1–5.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133–163.
- Steinberg BE, Huynh KK, Brodovitch A, et al. A cation counterflux supports lysosomal acidification. *J Cell Biol* 2010; **189**: 1171–1186.
- Krauke Y, Sychrova H. Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Curr Microbiol* 2010; **61**: 335–339.
- Arino J, Ramos J, Sychrova H. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; **74**: 95–120.
- Ramos J, Arino J, Sychrova H. Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 2011; **317**: 1–8.
- Krauke Y, Sychrova H. Functional comparison of plasma-membrane Na^+/H^+ antiporters from two pathogenic *Candida* species. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 80.
- Enjalbert B, Moran GP, Vaughan C, et al. Genome-wide gene expression profiling and a forward genetic screen show that differential expression of the sodium ion transporter *Ena21* contributes to the differential tolerance of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to osmotic stress. *Mol Microbiol* 2009; **72**: 216–228.
- Pfaller M, Riley J. Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; **11**: 152–156.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503–535.
- Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, et al. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* 2011; **54**: 279–310.
- Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J Infect Dis* 2000; **181**: 309–316.
- Charlier C, Hart E, Lefort A, et al. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 384–410.

- 14 Abe F, Usui K, Hiraki T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 2009; **48**: 8494–8504.
- 15 Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL, *et al.* Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukar Cell* 2011; **10**: 1071–1081.
- 16 Kolecka A, Krauke Y, Bujdakova H, Sychrova H. Subinhibitory concentrations of fluconazole increase the intracellular sodium content in both fluconazole-resistant and -sensitive *Candida albicans* strains. *Can J Microbiol* 2009; **55**: 605–610.
- 17 Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: why is *C. albicans* more pathogenic? *Int J Microbiol* 2012; **2012**: 205921.
- 18 Oxman DA, Chow JK, Frenzl G, *et al.* Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern? *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1460–1465.
- 19 Silva S, Negri M, Henriques M, *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; **36**: 288–305.
- 20 Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 329–334.
- 21 Colombo AL, Guimaraes T, Silva LR, *et al.* Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Ctrl Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 570–576.
- 22 Maresova L, Sychrova H. Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *BioTechniques* 2007; **43**: 667–672.
- 23 Kinclova O, Ramos J, Potier S, Sychrova H. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Molec Microbiol* 2001; **40**: 656–668.
- 24 Denksteinova B, Gaskova D, Herman P, *et al.* Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C-3(3) fluorescence. *Folia Microbiol* 1997; **42**: 221–224.
- 25 Maresova L, Urbankova E, Gaskova D, Sychrova H. Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* 2006; **6**: 1039–1046.
- 26 Pena A, Sanchez NS, Calahorra M. Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *J Bioenerg Biomembr* 2010; **42**: 419–432.
- 27 Malac J, Urbankova E, Sigler K, Gaskova D. Activity of yeast multi-drug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C-3(3) fluorescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 2536–2543.
- 28 Martinez P, Persson BL. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 1998; **258**: 628–638.
- 29 Maresova L, Muend S, Zhang YQ, Sychrova H, Rao R. Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. *J Biol Chem* 2009; **284**: 2795–2802.
- 30 Gamarra S, Rocha EM, Zhang YQ, *et al.* Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemoth* 2010; **54**: 1753–1761.
- 31 McCusker JH, Perlin DS, Haber JE. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 4082–4088.
- 32 Perlin DS, Brown CL, Haber JE. Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1988; **263**: 18118–18122.
- 33 Barreto L, Canadell D, Petrezelyova S, *et al.* A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2011; **10**: 1241–1250.
- 34 Watanabe H, Azuma M, Igarashi K, Ooshima H. Relationship between cell morphology and intracellular potassium concentration in *Candida albicans*. *J Antibiot* 2006; **59**: 281–287.
- 35 Hermann P, Forgacs K, Gal E, *et al.* Effects of alkali metal ions on some virulence traits of *Candida albicans*. *Folia Microbiol* 2003; **48**: 173–176.
- 36 Calahorra M, Lozano C, Sanchez NS, Pena A. Ketoconazole and miconazole alter potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1808**: 433–445.

This paper was first published online on Early Online on 29 March 2013.

4.2 Publikace č. 2 - Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*

Klinický význam druhu *C. glabrata* spočívá v celosvětově stoupající incidenci kandidemií způsobených tímto druhem, u kterého navíc dochází k častému rozvoji rezistence vůči antimykotikům. Proto byla studována tolerance tohoto druhu k solím a souvislost s rezistencí k flukonazolu stejně jako u druhů zahrnutých v Publikaci č. 1. *C. glabrata* je však relativně tolerantní k solím a velmi rezistentní k flukonazolu, čili i subinhibiční koncentrace jmenovaných látek jsou pro ni vyšší než pro druhy studované v Publikaci č. 1. Tyto vlastnosti společně s konstrukcí nového dvojitého mutanta postrádajícího geny pro dva nejvýznamnější kvasinkové exportéry kationtů alkalických kovů ATPázu *CgEna1* a antiportní systém *CgCnh1*, jejichž funkce byla studována dříve s využitím jednoduchých mutantů (Krauke and Sychrova, 2011), byly důvodem studovat tento druh odděleně od ostatních.

Absence antiportního systému *CgCnh1* snižuje toleranci buněk *C. glabrata* ke KCl, zatímco absence samotné ATPázy *CgEna1* nikoliv, i když nejcitlivější ke KCl byl dvojitý mutant postrádající oba přenašeče. Z uvedeného vyplývá, že na exportu K^+ v *C. glabrata* se podílí oba jmenované systémy, přičemž dominantní je antiportní systém *CgCnh1*.

Podobně tolerance *C. glabrata* k NaCl je nejvíce snížena u dvojitého mutanta (tedy i na exportu Na^+ se podílejí oba transportéry), avšak hlavním exportérem Na^+ je ATPáza *CgEna1*, jejíž absence zčásti snižuje toleranci k NaCl na rozdíl od absence *CgCnh1*, jež toleranci k NaCl neovlivňuje.

Měření membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy diS-C₃(3) (Denksteinova et al., 1997) ukázalo, že absence obou exportérů kationtů alkalických kovů vede k hyperpolarizaci plasmatické membrány a tím i ke zvýšenému vstupu kationtů do buňky, což (společně se ztrátou schopnosti efektivně exportovat Na^+ nebo K^+ z buňky) prohlubuje citlivost buněk *C. glabrata* k solím.

Dále jsme sledovali vliv subinhibiční koncentrace FLC na homeostázi kationtů alkalických kovů a zejména na membránový potenciál. Přítomnost subinhibiční koncentrace FLC způsobuje zvýšenou citlivost tohoto druhu k NaCl i ke KCl, přičemž absence transportérů kationtů alkalických kovů tento efekt prohloubila.

Zvýšená citlivost buněk *C. glabrata* k solím v přítomnosti FLC je pravděpodobně způsobená změnou složení lipidové složky plasmatické membrány, jež vede (obdobně jako u ostatních druhů kandid, viz Publikace č. 1) k její hyperpolarizaci.

Zajímavý je výrazně vyšší membránový potenciál v přítomnosti FLC u obou kmenů postrádajících gen *CgENA1* (jednoduchého i dvojitého mutantu) ve srovnání s divokým typem a kmenem postrádajícím gen *CgCNH1*. Např. v buňce *S. cerevisiae* nebyla hyperpolarizace membrány v závislosti na aktivitě samotné ATPázy *ScEna1* pozorována (Arino et al., 2010; Zahradka and Sychrova, 2012).

Zvýšení membránového potenciálu v přítomnosti FLC vede ke zvýšení citlivosti buněk *C. glabrata* nejen ke kationtům alkalických kovů, ale též k dalším antimykoticky aktivním látkám nesoucím kladný náboj (hygromycin B, tetramethylammonium, spermin), které vstupují do buňky v závislosti na membránovém potenciálu. Oba kmeny postrádající gen *CgENA1*, u nichž byla flukonazolem indukovaná hyperpolarizace obzvláště výrazná, byly ke všem jmenovaným látkám v přítomnosti FLC citlivější než divoký kmen či mutant postrádající pouze antiportní systém *CgCnh1*.

Flukonazol již v malých koncentracích zesiluje antimykotický účinek látek vstupujících do buňky v závislosti na síle membránového potenciálu a efektivně tak eliminuje růst druhu *C. glabrata*, který je obecně tolerantní k osmotickému stresu i k antimykotikům. Tohoto efektu by mohlo být využito při vývoji nových antimykotik.

Eličarová, H. and H. Sychrová (2014). Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*. *Microbiology*, 160: 1705-1713.

Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*

Hana Elicharova and Hana Sychrova

Correspondence

Hana Sychrova
hana.sychrova@fgu.cas.cz

Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

Candida glabrata is a salt-tolerant and fluconazole (FLC)-resistant yeast species. Here, we analyse the contribution of plasma-membrane alkali-metal-cation exporters, a cation/proton antiporter and a cation ATPase to cation homeostasis and the maintenance of membrane potential ($\Delta\Psi$). Using a series of single and double mutants lacking *CNH1* and/or *ENA1* genes we show that the inability to export potassium and toxic alkali-metal cations leads to a slight hyperpolarization of the plasma membrane of *C. glabrata* cells; this hyperpolarization drives more cations into the cells and affects cation homeostasis. Surprisingly, a much higher hyperpolarization of *C. glabrata* plasma membrane was produced by incubating cells with subinhibitory concentrations of FLC. FLC treatment resulted in a substantially increased sensitivity of cells to various cationic drugs and toxic cations that are driven into the cell by negative-inside plasma-membrane potential. The effect of the combination of FLC plus cationic drug treatment was enhanced by the malfunction of alkali-metal-cation transporters that contribute to the regulation of membrane potential and cation homeostasis. In summary, we show that the combination of subinhibitory concentrations of FLC and cationic drugs strongly affects the growth of *C. glabrata* cells.

Received 2 March 2014

Accepted 5 June 2014

INTRODUCTION

Candida glabrata is an opportunistic human pathogen more phylogenetically related, despite its name, to *Saccharomyces cerevisiae* than to the group of other *Candida* species (Dujon *et al.*, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2006). The prevalence of *C. glabrata* (now the second most common causative agent of fungal infection) began to increase after the introduction of candidaemia treatment and prophylaxis with fluconazole (FLC), because of the frequent resistance of *C. glabrata* to this azole antifungal (Pappas *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2012; Ruhnke *et al.*, 2011). The virulence of *C. glabrata* depends on its ability to maintain crucial metabolic homeostasis under a broad range of stresses. Intracellular cation homeostasis, which provides the cytosol with the high amount of potassium required for many physiological functions such as pH, cell volume and membrane potential ($\Delta\Psi$) regulation, and also maintains a low intracellular level of toxic sodium, is an important yeast cell fitness parameter (Ariño *et al.*, 2010).

Abbreviations: CCCP, carbonylcyanide *p*-chlorophenylhydrazone; diS-C₃(3), 3,3-dipropylthiacarbocyanine iodide; FLC, fluconazole; V_{max} , maximal growth rate; $[Na^+]_{in}$, intracellular Na⁺ concentration.

One supplementary figure is available with the online version of this paper.

Yeast cells possess a series of transporters with varying transport mechanisms that provide cells with the required amount of potassium or eliminate the surplus of alkali metal cations from the cytoplasm, either by exporting them from the cell or by sequestering them in organelles (Ariño *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011). We previously characterized two main exporters of alkali metal cations of *C. glabrata*, Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter and Ena1 ATPase, using heterologous expression in *S. cerevisiae* and deletion of the corresponding genes in *C. glabrata* (Krauke & Sychrova, 2011). The two systems have a different function in *C. glabrata* cells; cation/H⁺ antiporter Cnh1 is mainly involved in the regulation of potassium content, it exports surplus K⁺ from cells, and it is expressed constitutively. In contrast, Ena1 ATPase exports toxic Na⁺ and Li⁺ from the cell, and its expression is upregulated upon osmotic stress. However, Ena1 is probably not an exclusive system for Na⁺ export in *C. glabrata* cells, as deletion of the corresponding gene led to only a 30% decrease in sodium efflux (Krauke & Sychrova, 2010a, 2011).

The specific uptake of potassium, as well as the export of alkali metal cations, depends on the plasma-membrane potential, which is mainly composed of the inward gradient of protons (Ramos *et al.*, 2011; Saier *et al.*, 2009). The proton gradient is built by the plasma H⁺-ATPase, which is encoded by the essential *PMA1* gene in *S. cerevisiae* and

whose orthologue *CgPMA1* was identified in *C. glabrata* (Bairwa & Kaur, 2011; Goffa *et al.*, 2011). The proton motive force across the plasma membrane serves as an essential source of energy for many different processes such as nutrient uptake, drug efflux and pH maintenance, and its disruption resulting in cell death is the main antifungal mechanism of certain antimycotics (Maresova *et al.*, 2009). The widely used antifungal triazole FLC changes the plasma-membrane and cell-wall integrity via the inhibition of one of the enzymes (sterol 14 α -demethylase) in the ergosterol synthesis pathway. Thus the growth of cells in the presence of FLC results in a changed plasma-membrane lipid composition accompanied by a substantial hyperpolarization, causing an increased influx of alkali metal cations and cationic drugs into yeast cells (Elicharova & Sychrova, 2013). Some other azoles (miconazole and ketoconazole) were shown to hyperpolarize *S. cerevisiae* plasma membranes immediately after their addition (Calahorra *et al.*, 2011). The ion-channel blocker amiodarone is known to extensively hyperpolarize *S. cerevisiae* cells (Maresova *et al.*, 2009) and was shown to have a synergistic effect with FLC in terms of killing *Candida albicans* cells (Gupta *et al.*, 2003).

In this study, we aimed to explore in more detail the role of alkali-metal-cation export systems in the maintenance of membrane potential and cation homeostasis in *C. glabrata* cells, using a newly constructed double mutant lacking both main alkali-metal-cation exporters (*Cnh1* and *Ena1*) and also *C. glabrata*-optimized monitoring of relative plasma-membrane potential as a key factor of the non-specific uptake of cations. A detailed phenotypic characterization of the double mutant, single mutants and WT strain showed a previously unknown contribution of these transporters to alkali-metal-cation homeostasis in *C. glabrata* cells, and helped to elucidate the effect of FLC treatment on relative membrane potential and alkali-metal-cation homeostasis in this pathogenic yeast species.

METHODS

Strains and cultivation. The strains used in this study are listed in Table 1. Yeast cells were maintained and propagated in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 30 °C.

***C. glabrata ena1 Δ cnh1 Δ* strain construction.** The *C. glabrata ena1 Δ cnh1 Δ* strain was constructed using the *SAT1* flipper cassette

(Reuss *et al.*, 2004). The *CgCNH1* and *CgENA1* deletion cassettes with corresponding diagnostic oligonucleotides as described previously (Krauke & Sychrova, 2011) were used to delete the *CgCNH1* gene in an *ena1 Δ* strain and the *CgENA1* in a *cnh1 Δ* strain. The deletion cassettes were cut out of the plasmids using unique restriction sites and used to transform the *C. glabrata* single mutants by electroporation. Clones were selected by growth on YPD supplemented with 200 μ g nourseothricin ml⁻¹ (Werner Bio-agents). The integration of the cassettes and their location was verified by diagnostic PCR as described previously (Krauke & Sychrova, 2011). Five independent transformants with correctly integrated cassettes were tested for phenotype (KCl and NaCl tolerance). Four strains had the same and expected phenotype, i.e. high sensitivity to both KCl and NaCl. The integrated cassettes were eliminated from the locus by growth in YPM (1% yeast extract, 2% peptone, 2% maltose) and subsequent screening for nourseothricin-sensitive clones on YPD plates with 25 μ g nourseothricin ml⁻¹. The successful removal of the integrated cassette was verified by diagnostic PCR.

Growth assay. Growth phenotypes of the strains in the presence of salts, FLC or cationic drugs were tested both on solid and in liquid media. Classical drop tests were performed to compare the growth capacity of *C. glabrata* strains. Cells were grown in YPD medium, supplemented as indicated at 30 °C. Agar (2%) was added to solidify the plates. Salts were added before autoclaving; drugs [FLC (Ardez), hygromycin B (MP Biomedicals), tetramethylammonium (Sigma), spermine (Sigma)] were sterilized by filtration and added to the media after autoclaving. Yeast cells (grown overnight on a fresh YPD plate without supplements) were resuspended in sterile water to the same initial OD₅₉₅ 1 (Amersham Ultraspec 10, 1 cm cuvette, samples diluted tenfold before measurement). Tenfold serial dilutions were prepared and 3 μ l aliquots spotted on a series of plates containing the indicated concentrations of supplements. Plates were incubated at 30 °C for 3 or 7 days, and digital greyscale images of growing colonies were taken using a Nikon Coolpix7000 camera. Each drop test was repeated at least three times and representative results are shown.

To compare the growth in liquid media an Elx808 BioTek 96-well plate reader was used (Maresová & Sychrová, 2007). Cells growing overnight in liquid YPD were diluted to OD₅₉₅ 0.002 in YPD with supplements at the indicated concentrations. Aliquots (100 μ l) were distributed into the plate wells and the optical density in each well was measured at 595 nm at 1 h intervals with intensive shaking of the microplate. Data are shown as the mean of four growth curves (error bars are not shown, but the SE did not exceed 15%) or as the maximal growth rate V_{max} . The V_{max} value for each growth curve was determined by performing a linear regression, calculating the slope for each curve and reporting the steepest slope as the V_{max} (mOD₅₉₅ min⁻¹) using the software Gen5. The plotted values of V_{max} are the mean \pm SE of three separate experiments.

Sodium content and efflux assay. To estimate the intracellular sodium content or measure sodium efflux, cells growing overnight in

Table 1. *C. glabrata* strains used in the present study

Strain	Genotype	Reference or source
ATCC2001	WT	ATCC
<i>cnh1Δ</i>	ATTC2001 <i>cnh1Δ::FRT</i>	Krauke & Sychrova (2011)
<i>ena1Δ</i>	ATTC2001 <i>ena1Δ::FRT</i>	Krauke & Sychrova (2011)
<i>ena1Δcnh1Δ</i>	ATTC2001 <i>ena1Δ::FRT cnh1Δ::FRT</i>	This study
<i>cnh1Δena1Δ</i>	ATTC2001 <i>cnh1Δ::FRT ena1Δ::FRT</i>	This study

ATCC, American Type Culture Collection.

liquid YPD were diluted in 20 ml fresh YPD with or without FLC to OD₅₉₅ 0.15 and incubated at 30 °C for two cell cycles. As yeast cells grown under standard conditions maintain a very low intracellular concentration of toxic Na⁺ (in the order of μM), the cells were preloaded with NaCl before intracellular Na⁺ concentration – [Na⁺]_{in} – measurement. For the sodium preloading, fresh YPD supplemented with 1 M NaCl (0.25 M final concentration) and FLC (when indicated) was added and cultivation continued at 30 °C for 60 min. The cell culture was then harvested and washed with H₂O. To estimate the intracellular sodium content, the pellets were resuspended in incubation buffer [20 mM MES, 0.1 mM MgCl₂, adjusted with Ca(OH)₂ to pH 5.5] and three aliquots of cells were withdrawn immediately. Aliquots were filtered, acid extracted and the concentration of Na⁺ in the extracts was estimated by atomic absorption spectroscopy (Kinclová *et al.*, 2001). To measure sodium efflux, washed pellets were resuspended in the same incubation buffer supplemented with 2 % glucose and 50 mM KCl to prevent the reuptake of lost Na⁺, and samples were withdrawn at distinct time points for 60 min. The data are plotted as the mean ± SE of three separate experiments.

Relative membrane potential assay. The fluorescence assay for monitoring relative membrane-potential changes was adapted from Denksteinova *et al.* (1997), Maresova *et al.* (2006) and Peña *et al.* (2010) as follows: cells grown overnight in YPD were diluted in 20 ml fresh YPD with or without FLC to OD₅₉₅ 0.15 and incubated at 30 °C for two cell cycles. Cells were harvested, washed twice with a MES/TEA buffer (10 mM MES adjusted with triethanolamine to pH 6.0) and resuspended in the same buffer to OD₅₉₅ 0.2. A diS-C₃(3) (3,3-dipropylthiobarbiturate iodide) fluorescence probe (Sigma; 0.1 mM stock solution in ethanol) was added to 3 ml cell suspension to a final probe concentration of 0.2 μM. When indicated, FLC or amiodarone (Sigma; 20 mM stock solution in DMSO) was added to the cell suspension in MES/TEA buffer immediately after the fluorescence probe, just before fluorescence measurement. CCCP (carbonylcyanide *p*-chlorophenylhydrazone; Sigma; 50 mM stock solution in DMSO) was added to the measured samples to the final indicated concentration when the fluorescence signal reached its equilibrium. Fluorescence emission spectra were measured with an ISS PCI spectrofluorometer. The excitation wavelength was 531 nm, and emission intensities were measured at 560 and 580 nm. The data are given as either staining curves (i.e. the dependence of the emission intensity ratio I₅₈₀/I₅₆₀ on the duration of staining *t*) or the value of the intensity ratio at equilibrium, which was estimated as described in Maláč *et al.* (2005). The values shown are the mean ± SE of three separate experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of *C. glabrata* *ena1Δcnh1Δ* strain

Firstly, we characterized the salt tolerance of the newly constructed *C. glabrata* double mutant strain *ena1Δcnh1Δ* lacking both the Ena1 ATPase and Cnh1 antiporter. We compared its salt tolerance to the salt tolerance of the WT and single mutant strains (*ena1Δ*, *cnh1Δ*). The growth of the four strains was tested on a series of plates containing a broad range of salt concentrations (0.5–2.7 M KCl, 0.005–0.5 M LiCl and 0.25–1 M NaCl). The three salts were chosen as a non-toxic solute that mainly increased the osmotic pressure (KCl), a moderately toxic solute that increased the osmotic pressure (NaCl) and a highly toxic solute (LiCl) whose toxicity prevents its use at concentrations causing a high osmotic stress.

The *C. glabrata* WT was able to grow on a high concentration of KCl (2.7 M). The findings that deletion of the *CNH1* gene decreased KCl tolerance but deletion of the *ENA1* gene did not (Fig. 1a) were in accordance with our previous results (Krauke & Sychrova, 2010b, 2011). A new finding was a significantly decreased KCl tolerance of the double mutant *ena1Δcnh1Δ* strain, which did not grow on 1 M KCl (Fig. 1a). This decreased KCl tolerance of the double mutant demonstrated the participation of the Ena1 ATPase in the efflux of surplus K⁺ in *C. glabrata* cells.

Secondly, we tested the sensitivity of all four strains to LiCl. Consistent with our earlier results (Krauke & Sychrova, 2011), the WT and *cnh1Δ* strain tolerated LiCl much better than the *ena1Δ* strain (Fig. 1a). When we compared the growth of LiCl-tolerant strains on a borderline high concentration of LiCl (0.5 M), we observed that the *cnh1Δ* strain grew slightly better than the WT. The double mutant, similarly to the *ena1Δ* strain, did not grow on 0.25 M LiCl (Fig. 1a). A series of drop tests (5–100 mM LiCl) gave a maximal tolerated LiCl concentration of 15 mM for both strains lacking the *ENA1* gene (not shown). Growth experiments in liquid medium verified the drop test's results that the lethal LiCl concentration for *ena1Δ* and *ena1Δcnh1Δ* strains is 15 mM, and showed slightly better growth of the double mutant strain in the presence of 2.5, 5 and 10 mM LiCl (Fig. 1b). The moderate Li⁺-protective effect of *CNH1* deletion (observed when the WT was compared with *cnh1Δ* or *ena1Δ* with *ena1Δcnh1Δ* strains) is probably caused by a decreased loss of K⁺ from cells lacking the Cnh1 exporter, which leads to a lower negative charge inside the cell, and consequently to a decreased non-specific uptake of Li⁺.

Finally, we focused on NaCl tolerance. Fig. 1(a) shows the growth of all four strains on YPD plates supplemented with NaCl, where differences among the strains were observed. The WT and *cnh1Δ* strains tolerated NaCl much better than the other two strains that lacked the *ENA1* gene. In contrast to when testing LiCl tolerance, we did not observe any difference in the growth of the WT and *cnh1Δ* cells on plates with high NaCl concentrations (1–1.4 M; not shown). We hypothesize that the protective effect of a decreased loss of K⁺ from cells (due to the lack of Cnh1 antiporter) on toxic alkali-metal-cation tolerance was sufficient to reduce the influx of Li⁺ (0.5 M), but it was not able to affect Na⁺ influx to the same degree because of the higher external NaCl concentration (1–1.4 M).

The double mutant grew more poorly than the single *ena1Δ* mutant on 0.5 M NaCl and only a few NaCl-resistant colonies appeared on 0.75 M NaCl (Fig. 1a). Also the growth rate of the *ena1Δ* strain in liquid YPD medium supplemented with 0.5 and 0.75 M NaCl was higher than the growth rate of the double mutant (Fig. 1c). These results suggested that although sodium cations are mainly exported by the Ena1 ATPase, they are also exported by Cnh1 in *C. glabrata* cells.

To characterize NaCl tolerance and the role of both cation-efflux systems in more detail, we measured the [Na⁺]_{in} of

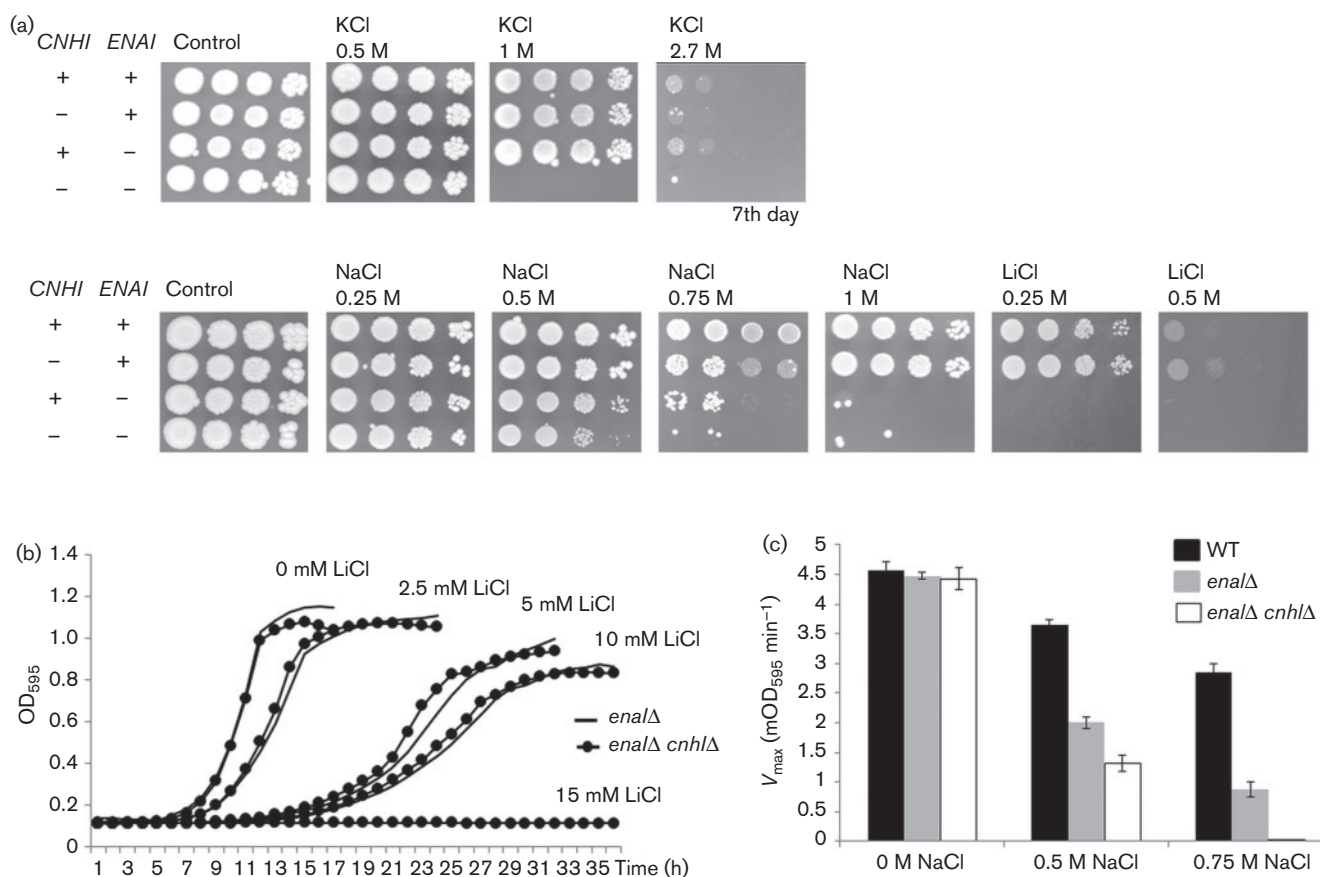


Fig. 1. Tolerance of *C. glabrata* WT and mutant strains lacking the *CNH1* and/or *ENA1* gene to NaCl, KCl and LiCl. (a) Tenfold serial dilutions of overnight-grown cells were prepared and 3 μ l aliquots spotted on a series of YPD plates containing the indicated concentrations of salts. The pictures were taken on the third day of incubation unless otherwise indicated. (b, c) Growth of *C. glabrata ena1Δ* and *ena1Δcnh1Δ* strains in liquid medium supplemented with the indicated concentrations of LiCl (b) (mean of four growth curves, SE did not exceed 15%) and NaCl (c) (plotted growth rate V_{max} values are mean \pm SE of three separate experiments). Similar results were obtained for four independently obtained *ena1Δ cnh1Δ* strains.

all four strains using atomic absorption spectroscopy. Cells were incubated in YPD medium containing 0.25 M NaCl (this concentration was well tolerated by all strains; Fig. 1a) and the intracellular sodium content was estimated after 60 and 120 min. The accumulation of Na⁺ in the WT and *cnh1Δ* strain did not differ significantly, and their sodium content decreased over 120 min of incubation with NaCl (Fig. 2a). This decrease in [Na⁺]_{in} did not appear in either of the strains lacking the Ena1 ATPase (*ena1Δ* and *ena1Δcnh1Δ*), suggesting that the Ena1 ATPase is responsible for the maintenance of low intracellular sodium concentration under our experimental conditions. The role of Ena1 was also visible from a comparison of the intracellular amounts of Na⁺, where the strains without the *ENA1* gene accumulated much more sodium than the WT and *cnh1Δ* strains within 1 h of incubation with NaCl [approx. 140 vs 60 nmol (mg dry weight)⁻¹; Fig. 2a]. The small difference in sodium content in cells lacking either only the *ENA1* gene or both the *ENA1* and *CNH1* genes

(Fig. 2a) again showed that the Cnh1 antiporter weakly contributes to sodium efflux.

Further, the sodium efflux was measured to verify whether the observed increased Na⁺ accumulation in *ena1Δcnh1Δ* cells is due to a diminished ability to export sodium cations. The cells of all four strains were preloaded in medium with 0.25 M NaCl for 60 min, washed and resuspended in incubation buffer containing 2% glucose and 50 mM KCl to prevent the reuptake of lost Na⁺. The samples were withdrawn immediately after resuspending in incubation buffer (time 0) and after 30 and 60 min. Fig. 2(b) demonstrates the differing Na⁺ efflux capacity of the *C. glabrata* strains. The WT and *cnh1Δ* strains pumped out approximately 90% of their accumulated Na⁺ within 30 min and contained almost no Na⁺ after 60 min, while the *ena1Δ* strain lost only 34% of its Na⁺ within the first 30 min and still contained 36% of its Na⁺ after 60 min of incubation in a sodium-free buffer. The double mutant had

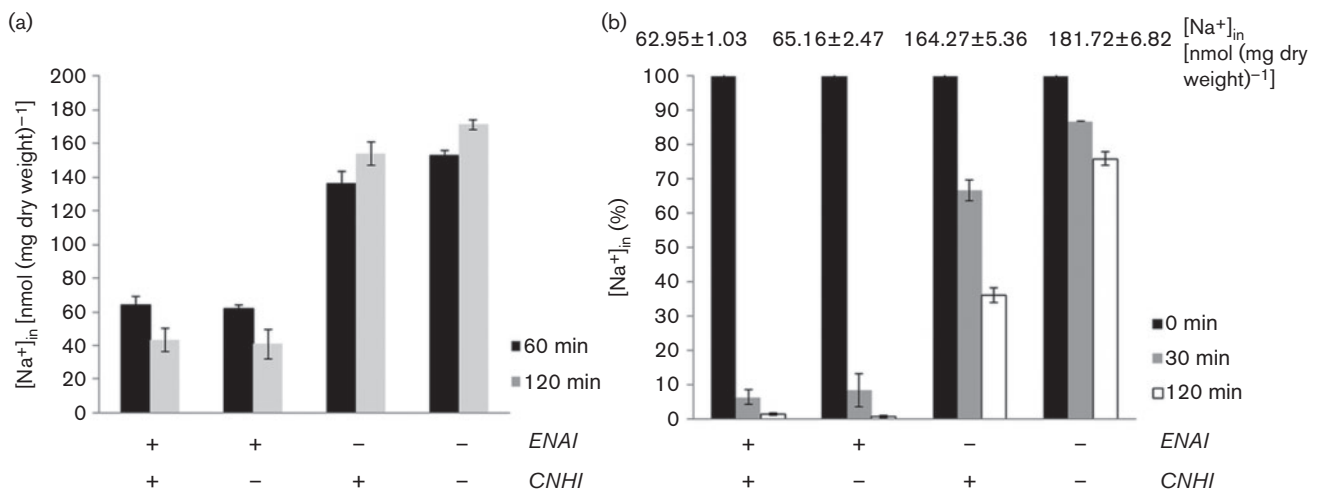


Fig. 2. Intracellular sodium content and efflux of *C. glabrata* WT and mutant strains lacking the *CNH1* and/or *ENA1* gene. (a) Overnight-grown cells were preloaded with 0.25 M NaCl for 60 min and their $[Na^+]_{in}$ was estimated. Data are shown as the mean \pm SE of three separate experiments. (b) Efflux of Na^+ from cells grown and preloaded as in (a) was followed for 60 min. Columns represent the amount of sodium lost from cells within the indicated time. Data are shown as the mean \pm SE of three separate experiments and the mean initial $[Na^+]_{in}$ corresponding to 100% are listed above.

the lowest Na^+ efflux capacity of all four strains (Fig. 2b), confirming the involvement of *Cnh1* in sodium export.

In summary, the construction of the double mutant and its detailed characterization gave us some new results. It showed unambiguously and for what is believed to be the first time that the *Cnh1* antiporter contributes to the elimination of toxic sodium in *C. glabrata* cells; although this contribution is quite small compared to the situation in *S. cerevisiae*, where both the antiporter and the ATPase contribute almost equally to cation homeostasis (Ariño *et al.*, 2010).

Estimation of relative membrane potential

The relative plasma-membrane potential and its changes in all four *C. glabrata* strains was monitored using a diS-C₃(3) assay. This assay is based on the potential-dependent distribution of the diS-C₃(3) fluorescence probe across the cell membrane, and the emission intensity I_{580}/I_{560} ratio reflects the relative membrane potential. This technique has been used to monitor the plasma-membrane potential changes in *S. cerevisiae* (Denksteinova *et al.*, 1997; Maresova *et al.*, 2006) and other yeast species (Elicharova & Sychrova, 2013; Střibný *et al.*, 2012). To confirm that diS-C₃(3) assay is a suitable technique for monitoring membrane-potential changes in *C. glabrata* cells, we first measured the diS-C₃(3) probe staining curves of *C. glabrata* WT cells growing in YPD and then monitored the effect of the addition of drugs known to cause a depolarization (CCCp) or a hyperpolarization (amiodarone) of yeast plasma membranes (Maresova *et al.*, 2009). The I_{580}/I_{560} ratio of *C. glabrata* cells stabilized at 1.57 ± 0.18 after 15 min of staining (Fig. 3a). The addition of 10 μ M CCCp to *C. glabrata* WT cells at equilibrium

resulted in a drop of $\Delta\Psi$, whereas 5 μ M amiodarone added together with the probe caused a rapid hyperpolarization of *C. glabrata* cells (Fig. 3a). These observations confirmed the reliability of the diS-C₃(3) assay for estimating the relative $\Delta\Psi$ and its changes in *C. glabrata* cells.

Further, we compared the I_{580}/I_{560} ratios for all four *C. glabrata* strains to estimate whether the deletion of *CNH1* and/or *ENA1* genes influences the plasma-membrane potential. Fig. 3(b) shows the I_{580}/I_{560} ratio at the staining equilibrium (mean of 10 experiments) for cells growing exponentially in YPD. We did not observe any distinctive differences in $\Delta\Psi$ between the strains, though the double *ena1 Δ cnh1 Δ* mutant ($I_{580}/I_{560} = 1.98 \pm 0.16$ approx.) was significantly ($P = 0.036$) hyperpolarized compared to the WT ($I_{580}/I_{560} = 1.57 \pm 0.18$ approx.), which could be the result of diminished K^+ fluxes across the plasma membrane in this strain, if the regulation of membrane potential and potassium fluxes is interconnected in *C. glabrata* cells as it is in *S. cerevisiae* organelles (Ariño *et al.*, 2010). In order to elucidate whether this effect on membrane potential might result in a changed tolerance/sensitivity of *C. glabrata* cells to alkali-metal cations and cationic drugs, we combined the use of mutant cells lacking the exporters of alkali metal cations, FLC treatment and tests of cation/drug tolerance.

Effect of FLC on relative membrane potential

Treatment with subinhibitory concentrations of FLC was shown to hyperpolarize the plasma membrane of various non-*glabrata* *Candida* species, e.g. *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* (Elicharova & Sychrova, 2013), and consequently to result in a higher amount of alkali metal cations in cells. *C. glabrata* cells are known to be FLC-resistant. Thus,

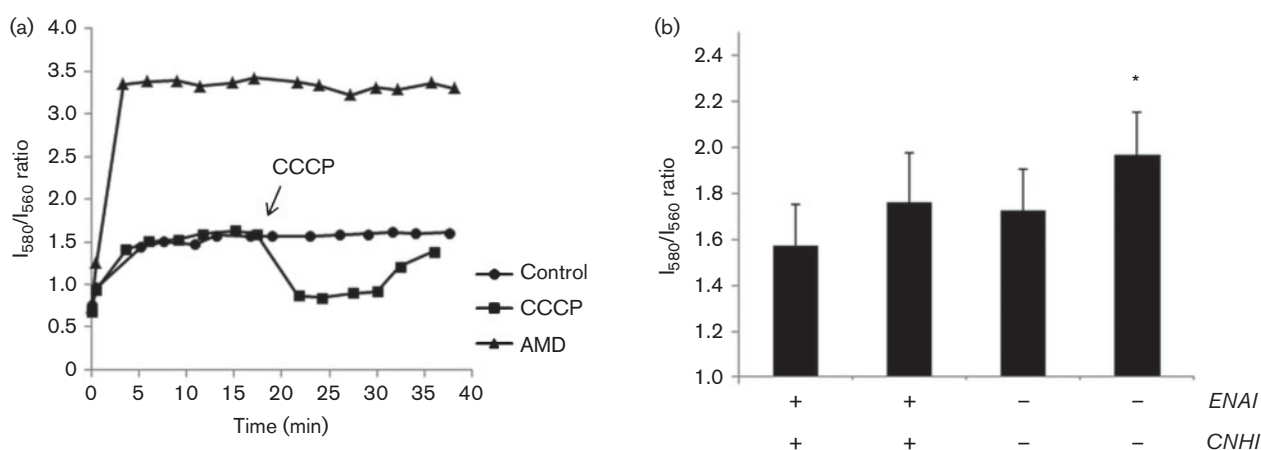


Fig. 3. Measurement of relative membrane potential of *C. glabrata* cells. Overnight-grown cells were cultivated in fresh YPD medium for two cell cycles, washed twice and resuspended in MES/TEA buffer to OD_{600} 0.2. The diS-C₃(3) probe was added to the cell suspension to a final concentration of 0.2 μ M. (a) The I_{580}/I_{560} fluorescence emission ratio of diS-C₃(3) was measured in *C. glabrata* WT cells (a representative experiment is shown). Amiodarone (AMD) (5 μ M) was added together with a diS-C₃(3) probe to the cell suspension. CCCP (10 μ M) was added after 15 min staining. (b) The I_{580}/I_{560} fluorescence emission ratio of diS-C₃(3) was measured in *C. glabrata* WT, $cnh1\Delta$, $ena1\Delta$ and $ena1\Delta cnh1\Delta$ cells for 40 min. The columns represent the values of the I_{580}/I_{560} fluorescence emission ratio at equilibrium. The plotted values are the mean \pm SE of ten separate experiments. The significance of the $\Delta\Psi$ changes relative to the WT cells are given according to *t*-test analysis (asterisk indicates $P < 0.05$), and similar results were obtained for four independently obtained $ena1\Delta cnh1\Delta$ strains.

we first estimated a subinhibitory concentration of FLC that did not affect the growth of the WT and the mutant strains. According to a drop test on YPD supplemented with FLC (10–200 μ g ml^{-1} ; Fig. S1, available in the online Supplementary Material) we selected 20 μ g FLC ml^{-1} as the subinhibitory concentration for all four strains. To compare changes in the relative $\Delta\Psi$ of *C. glabrata* strains caused by FLC treatment, we divided overnight-grown cells into three aliquots and incubated them in fresh YPD (OD_{600} 0.15) in the absence (aliquots 1 and 2) or presence (aliquot 3) of 20 μ g FLC ml^{-1} for 4 h (to reach OD_{600} 0.6). The cells were then transferred to the MES/TEA buffer, the diS-C₃(3) probe was added and fluorescence measured. The first aliquot served as a control, the second aliquot was used to monitor the immediate effect of FLC (20 μ g ml^{-1}), which was added together with the probe, and the third aliquot of cells served to monitor the changes in $\Delta\Psi$ resulting from the presence of FLC during cell growth. FLC had no immediate effect on the $\Delta\Psi$ of any *C. glabrata* strain; however, the cells of all four strains treated for two cell cycles with a subinhibitory concentration of FLC were significantly hyperpolarized. Fig. 4(a) shows that the treatment with FLC more strongly increased the I_{580}/I_{560} ratio of both strains lacking the *ENA1* gene ($ena1\Delta$, $I_{580}/I_{560} = 3.69 \pm 0.13$; $ena1\Delta cnh1\Delta$, $I_{580}/I_{560} = 3.47 \pm 0.15$) than the I_{580}/I_{560} ratio of the WT (2.51 ± 0.03) and $cnh1\Delta$ strains (2.80 ± 0.08). To verify that the FLC treatment really did hyperpolarize *C. glabrata* cells, especially both strains lacking the *ENA1* gene, we performed a series of drop tests on YPD with three cationic toxic compounds (tetramethylammonium, hygromycin B and spermine) that differ in their mode of action. These drugs

enter yeast cells according to their plasma-membrane potential, i.e. more hyperpolarized cells are more sensitive to these drugs (Barreto *et al.*, 2011; McCusker *et al.*, 1987; Perlin *et al.*, 1988). Fig. 4(b) shows the growth of *C. glabrata* cells on YPD plates containing subinhibitory concentrations of FLC (20 μ g ml^{-1}) or low concentrations of cationic drug (0.5 M tetramethylammonium, 200 μ g hygromycin B ml^{-1} , 5 mM spermine) or combinations of them. Combining a very low concentration of any of the three drugs with the subinhibitory concentration of FLC inhibited significantly the growth of all four *C. glabrata* strains. Moreover, hygromycin B + FLC and spermine + FLC affected both strains lacking the *ENA1* gene more than the WT and $cnh1\Delta$ strains (Fig. 4b). These observations together with the $\Delta\Psi$ measurements confirmed that the subinhibitory concentration of FLC hyperpolarized *C. glabrata* cells and showed for what is believed to be the first time that the Ena1 ATPase is involved in the maintenance of the plasma-membrane potential of *C. glabrata* cells, and that its malfunction contributes to membrane hyperpolarization upon FLC treatment. The connection between the activity/expression of Ena1 ATPase and the level of plasma-membrane potential had already been observed in a genome-wide screen for cationic-drug tolerance in *S. cerevisiae* cells (Barreto *et al.*, 2011).

Effect of FLC treatment on alkali-metal-cation tolerance and content

We showed that the lack of Cnh1 antiporter, Ena1-ATPase or both of these exporters resulted in an impaired export of

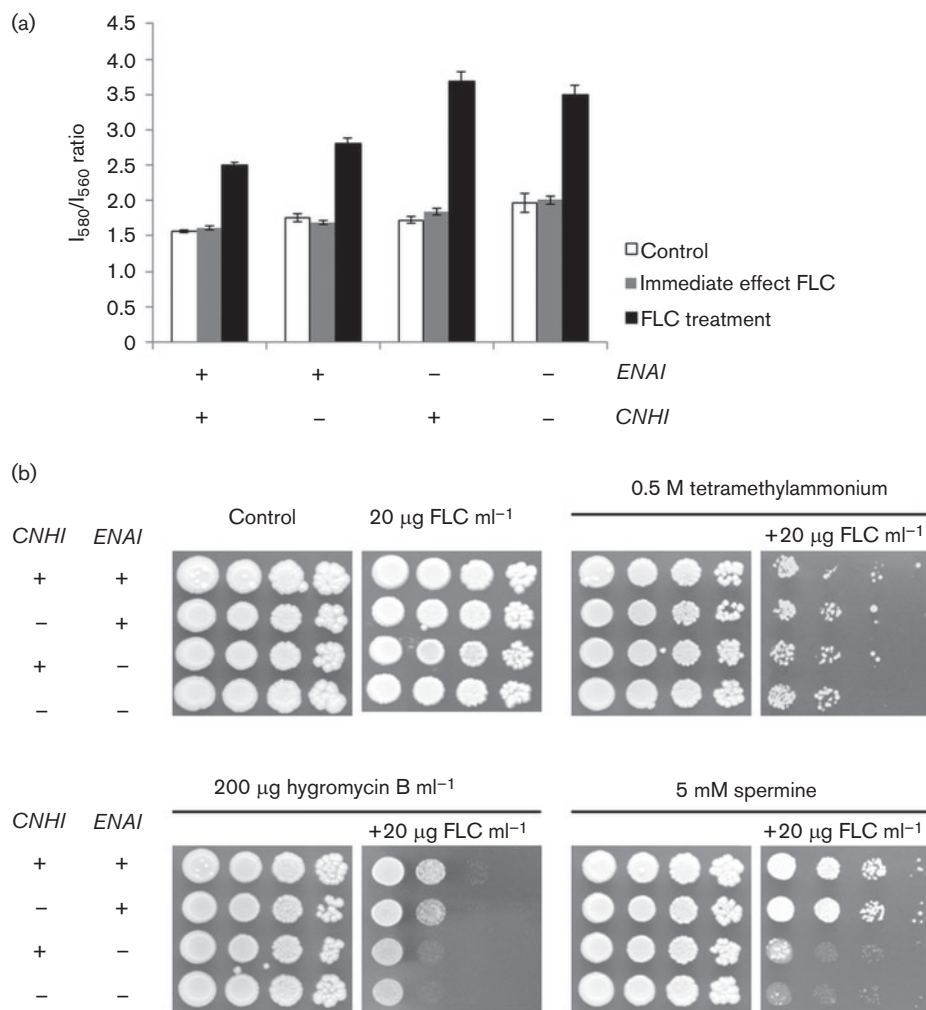


Fig. 4. Influence of FLC on cell relative membrane potential and sensitivity to cationic drugs. (a) Overnight-grown cells were divided into three aliquots, incubated in fresh YPD in the absence (aliquots 1 and 2) or presence (aliquot 3) of 20 µg FLC ml⁻¹ for two cell cycles, washed twice and resuspended in MES/TEA buffer to OD₆₀₀ 0.2. diS-C₃(3) was added to the cell suspension to a final concentration of 0.2 µM and the I₅₈₀/I₅₆₀ fluorescence emission ratio of diS-C₃(3) was estimated. Control, cells incubated without FLC (aliquot 1); immediate effect FLC, cell suspension to which FLC was added together with the fluorescent probe (aliquot 2); FLC treatment, cells grown in presence of FLC for two cell cycles (aliquot 3). The columns represent the values of the I₅₈₀/I₅₆₀ fluorescence emission ratio at equilibrium. The plotted values are the mean ± SE of three separate experiments. (b) Tenfold serial dilutions of overnight-grown WT and mutant strains were prepared and 3 µl aliquots spotted on a series of YPD plates containing the indicated amounts of FLC, tetramethylammonium, hygromycin B and spermine.

surplus alkali-metal cations (Fig. 2b). Further, we observed a hyperpolarizing effect of a subinhibitory concentration of FLC on *C. glabrata* cells, which led to an increased sensitivity to cationic drugs, probably resulting from their higher uptake (Fig. 4). It follows that *C. glabrata* cells, especially mutant strains, treated with FLC should be hypersensitive to alkali-metal cations. To verify this assumption, we performed a series of drop tests on YPD with subinhibitory concentrations of FLC, NaCl, KCl and combinations of them, and measured the [Na⁺]_{in} of FLC-treated cells. Fig. 5(a) shows the effect of 20 µg FLC ml⁻¹ on *C. glabrata* tolerance to NaCl and KCl. *C. glabrata* WT cells tolerate a

relatively high concentration of KCl or NaCl (Krauke & Sychrova, 2010b), but in the presence of 20 µg FLC ml⁻¹ did not grow on 1 M KCl or 1 M NaCl. The same concentration of FLC together with half that concentration of KCl (0.5 M) only slightly inhibited the growth of the WT and *ena1Δ* strains, while this combination strongly impaired the growth of *cnh1Δ* and even more *ena1Δcnh1Δ* cells. As *C. glabrata* cells normally contain approximately 300 mM K⁺ (Krauke & Sychrova, 2011), the 500 mM external concentration of KCl is not a severe osmotic stress for these cells; the observed growth inhibition in the presence of a subinhibitory concentration of FLC and 0.5 M KCl results from an

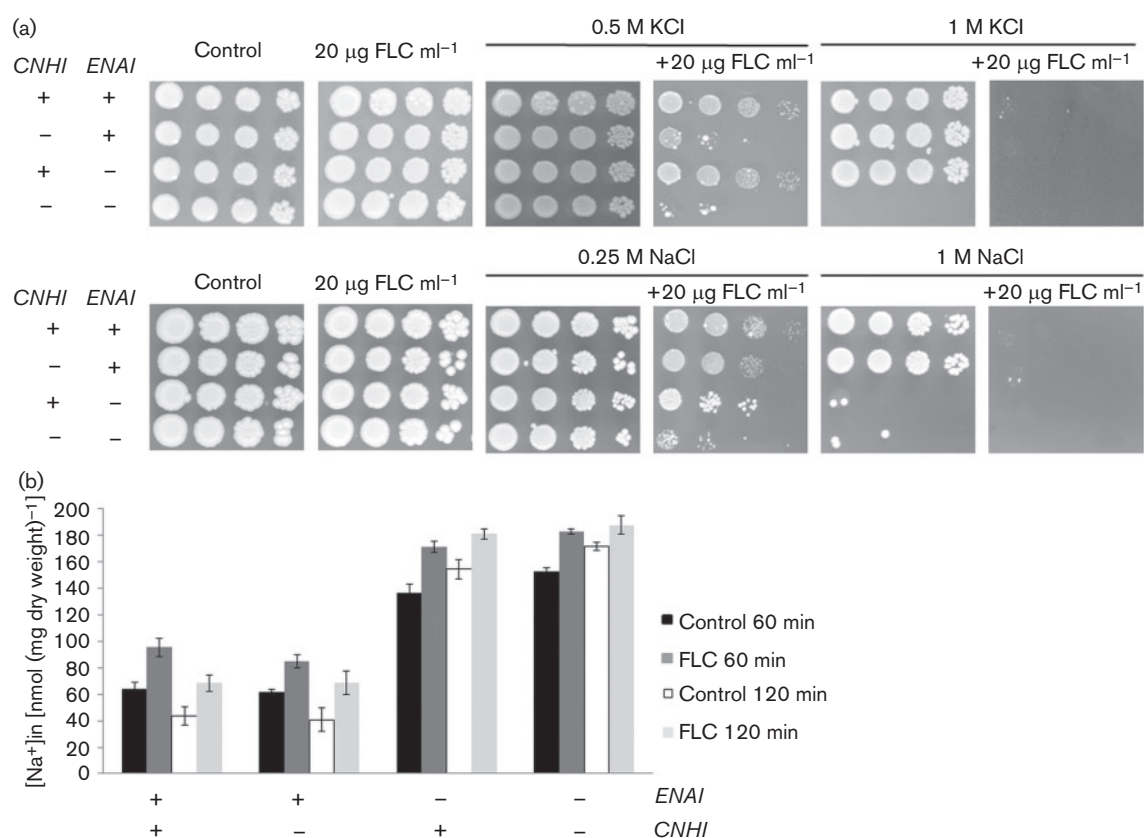


Fig. 5. Influence of FLC on cell tolerance to KCl and NaCl. (a) Tenfold serial dilutions of overnight-grown WT and mutant strains were prepared and 3 µl aliquots spotted on a series of YPD plates containing the indicated amounts of FLC, KCl and NaCl. The experiment testing the combination of NaCl and FLC was performed in parallel with the test of NaCl tolerance shown in Fig. 1. Thus, the pictures of the control plate and plates with 0.25 and 1.0 M NaCl are the same as in Fig. 1. (b) Overnight-grown cells were cultivated in fresh YPD medium, with or without (control) FLC, for two cell cycles. The cells were then incubated with 0.25 M NaCl and the intracellular sodium was estimated after 60 and 120 min. The plotted values are the mean ± SE of three separate experiments.

increased uptake of K⁺ (due to an FLC-induced plasma-membrane hyperpolarization) and a partly impaired activity of Cnh1. The very high sensitivity of *cnh1Δ* cells to the combination of FLC and low K⁺ confirms that the full activity of Cnh1 is indispensable for *C. glabrata* cells to survive FLC treatment in the presence of a slightly elevated concentration of KCl (Fig. 5a). Similarly, the double mutant (lacking both sodium exporters Ena1 and Cnh1) was the most sensitive to the combination of FLC+0.25 M NaCl, though this NaCl concentration alone only had a marginal effect on cell growth (Fig. 5a).

Finally, we estimated the sodium content in cells treated with FLC (20 µg ml⁻¹) for two cell cycles and then preloaded with 0.25 M NaCl for 60 or 120 min. Similar to the measurement of ΔΨ, control experiments verified that FLC did not change [Na⁺]_{in} immediately upon addition to the cells (not shown), but it was FLC treatment during the growth of the culture that significantly increased the sodium content in all four *C. glabrata* strains (Fig. 5b). The

strains lacking the Ena1 ATPase accumulated more Na⁺ than the WT and *cnh1Δ* strains. The high Na⁺ content of FLC-treated cells of the *ena1Δ* and *ena1Δcnh1Δ* strains corresponded very well to their high sensitivity to the combination of FLC+NaCl (Fig. 5).

Conclusions

In summary, our results showed that although *C. glabrata* cells are FLC resistant in general, the growth of cells in the presence of subinhibitory concentrations of FLC hyperpolarizes the cell plasma membrane, thus rendering the cells more sensitive to cationic drugs and affecting their ability to maintain cation homeostasis. The combination of a relatively low concentration of FLC together with low concentrations of cationic drugs might serve as a potent treatment of *C. glabrata* infections, and the effect of this treatment might be enhanced when a specific inhibitor of the yeast Ena1 ATPase is identified.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pavla Herynkova for technical support. This work was supported by GA ČR (project 302/12/1151) and BIOCEV (Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University) from the European Regional Development Fund (project CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

REFERENCES

- Ariño, J., Ramos, J. & Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 95–120.
- Bairwa, G. & Kaur, R. (2011). A novel role for a glycosylphosphatidylinositol-anchored aspartyl protease, CgYps1, in the regulation of pH homeostasis in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **79**, 900–913.
- Barreto, L., Canadell, D., Petrezsélyová, S., Navarrete, C., Maresová, L., Pérez-Valle, J., Herrera, R., Olier, I., Giraldo, J. & other authors (2011). A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **10**, 1241–1250.
- Calahorra, M., Lozano, C., Sánchez, N. S. & Peña, A. (2011). Ketoconazole and miconazole alter potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 433–445.
- Denksteinova, B., Gaskova, D., Herman, P., Vecer, J., Malínský, J., Plásek, J. & Sigler, K. (1997). Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C3(3) fluorescence. *Folia Microbiol (Praha)* **42**, 221–224.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C. & other authors (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35–44.
- Elicharova, H. & Sychrová, H. (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Med Mycol* **51**, 785–794.
- Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E. & Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* **6**, 99.
- Goffa, E., Bialkova, A., Batova, M., Dzugasova, V. & Subik, J. (2011). A yeast cell-based system for screening *Candida glabrata* multidrug resistance reversal agents and selection of loss-of-function *pdr1* mutants. *FEMS Yeast Res* **11**, 155–159.
- Gupta, S. S., Ton, V. K., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K. & Rao, R. (2003). Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 28831–28839.
- Kinclová, O., Ramos, J., Potier, S. & Sychrová, H. (2001). Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**, 656–668.
- Krauke, Y. & Sychrová, H. (2010a). Chimeras between *C. glabrata* Cnh1 and *S. cerevisiae* Nha1 Na⁺/H⁺-antiporters are functional proteins increasing the salt tolerance of yeast cells. *Folia Microbiol (Praha)* **55**, 435–441.
- Krauke, Y. & Sychrová, H. (2010b). Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Curr Microbiol* **61**, 335–339.
- Krauke, Y. & Sychrová, H. (2011). Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter and Ena1 Na⁺-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* **11**, 29–41.
- Malác, J., Urbánková, E., Sigler, K. & Gásková, D. (2005). Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: diS-C3(3) fluorescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2536–2543.
- Maresová, L. & Sychrová, H. (2007). Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* **43**, 667–672.
- Maresová, L., Urbánková, E., Gásková, D. & Sychrová, 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.
- Maresová, L., Muend, S., Zhang, Y. Q., Sychrová, H. & Rao, R. (2009). Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. *J Biol Chem* **284**, 2795–2802.
- McCusker, J. H., Perlin, D. S. & Haber, J. E. (1987). Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 4082–4088.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K., Jr, Calandra, T. F., Edwards, J. E., Jr, Filler, S. G., Fisher, J. F., Kullberg, B. J. & other authors (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 503–535.
- Peña, A., Sánchez, N. S. & Calahorra, M. (2010). Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *J Bioenerg Biomembr* **42**, 419–432.
- Perlin, D. S., Brown, C. L. & Haber, J. E. (1988). Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**, 18118–18122.
- Pfaller, M., Neofytos, D., Diekema, D., Azie, N., Meier-Kriesche, H. U., Quan, S. P. & Horn, D. (2012). Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**, 323–331.
- Ramos, J., Ariño, J. & Sychrová, H. (2011). Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* **317**, 1–8.
- Reuss, O., Vik, Å., Kolter, R. & Morschhäuser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**, 119–127.
- Ruhnke, M., Rickerts, V., Cornely, O. A., Buchheidt, D., Glöckner, A., Heinz, W., Höhl, R., Horré, R., Karthaus, M. & other authors (2011). Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* **54**, 279–310.
- Saier, M. H., Jr, Yen, M. R., Noto, K., Tamang, D. G. & Elkan, C. (2009). The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res* **37** (Database issue), D274–D278.
- Štříbný, J., Kinclová-Zimmermannová, O. & Sychrová, H. (2012). Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **58**, 255–264.

Edited by: J. Morschhäuser

4.3 Publikace č. 3 - Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations

V prvních dvou publikacích jsme prokázali vliv flukonazolu na membránový potenciál buněk všech šesti studovaných druhů kvasinek rodu *Candida* a tím i na porušení regulace vstupu kationtů do buňky, přičemž schopnost akumulace dostatečného množství a efektivní regulace obsahu draselných kationtů je zcela klíčová pro fungování všech buněk.

V současnosti jsou známé tři typy kvasinkových importérů K^+ lišící se transportním mechanismem, které jsou klíčové pro zajištění dostatečné vnitrobuněčné koncentrace draselných kationtů. Jako první krok jsme v genomech devíti patogenních druhů kandid vyhledali ortology všech typů draselných importérů. Mezidruhové zastoupení jednotlivých typů transportérů i počet genů pro draselné transportéry se liší. Nejrozšířenější jsou geny kódující uniportní systém Trk, které jsme našli ve všech devíti genomech. *C. glabrata* a *C. krusei* dalšími typy importérů nedisponují. Genomy druhů patřících do skupiny CTG obsahují dále geny pro symportní systém Hak. V genomech dvou kmenů *C. albicans* jsme našli pseudogen patřící ATPáze Acu, který je složený vždy ze dvou otevřených čtecích rámců.

Porovnáním růstu vybraných druhů kandid na limitně nízké koncentraci draselných kationtů ($15 \mu\text{M}$) jsme testovali, jestli rozdílné zastoupení genů pro importéry K^+ má vliv na jejich schopnost akumulovat draselné kationty. Nejvíce tolerantní k relativnímu nedostatku K^+ jsou druhy *C. albicans* a *C. krusei*, naopak nejhůře tyto podmínky snáší druh *C. glabrata*. Jak *C. krusei* tak i *C. glabrata* disponují pouze přenašečem Trk. Přímá souvislost mezi tolerancí k nízkým koncentracím K^+ a počtem genů pro draselné transportéry se tedy nepotvrdila.

Růst jednotlivých druhů kandid na limitně nízké koncentraci draselných kationtů je částečně ovlivněn i vnějším pH, kdy při pH 3,5 je zpomalen růst *C. tropicalis* a při pH 8 je zcela zastaven růst *C. glabrata*. Také morfologie jednotlivých druhů je ovlivněna koncentrací draselných kationtů v médiu – obecně je v podmínkách nedostatku K^+ redukována produkce hyf a pseudohyf a tento efekt je nejvýraznější u druhů *C. krusei* a *C. tropicalis*.

Popsané výsledky ukazují schopnost kandid akumulovat dostatečné množství draselných kationtů pro růst i při velmi nízké koncentraci K^+ v médiu, za což zodpovídají importéry draselných kationtů. Vzhledem k absenci homologů všech doposud známých typů kvasinkových importérů K^+ v lidském genomu (Benito

et al., 2004; Ramos et al., 2011), by se tyto proteiny mohly stát slibnými cíli pro nová antimykotika.

Hušeková, B., H. Elicharová and H. Sychrová (2016). Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 394-401.

Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations

B. Hušeková, H. Elicharová, and H. Sychrová

Abstract: A high intracellular concentration of potassium (200–300 mmol/L) is essential for many yeast cell functions, such as the regulation of cell volume and pH, maintenance of membrane potential, and enzyme activation. Thus, cells use high-affinity specific transporters and expend a lot of energy to acquire the necessary amount of potassium from their environment. In *Candida* genomes, genes encoding 3 types of putative potassium uptake systems were identified: Trk uniporters, Hak symporters, and Acu ATPases. Tests of the tolerance and sensitivity of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis* to various concentrations of potassium showed significant differences among the species, and these differences were partly dependent on external pH. The species most tolerant to potassium-limiting conditions were *C. albicans* and *C. krusei*, while *C. parapsilosis* tolerated the highest KCl concentrations. Also, the morphology of cells changed with the amount of potassium available, with *C. krusei* and *C. tropicalis* being the most influenced. Taken together, our results confirm potassium uptake and accumulation as important factors for *Candida* cell growth and suggest that the sole (and thus probably indispensable) Trk1 potassium uptake system in *C. krusei* and *C. glabrata* may serve as a target for the development of new antifungal drugs.

Key words: *Candida*, potassium homeostasis, morphology.

Résumé : Une concentration intracellulaire élevée de potassium (200–300 mmol/L) est essentielle à plusieurs fonctions cellulaires des levures, comme la régulation du volume et du pH cellulaire, le maintien du potentiel membranaire et l'activité enzymatique. Ainsi, les cellules font usage de transporteurs à affinité élevée et dépensent beaucoup d'énergie pour acquérir la quantité nécessaire de potassium de leur environnement. Dans les génomes de *Candida*, on a repéré des gènes codant 3 types de systèmes putatifs d'assimilation du potassium : les uniporteurs Trk, les symporteurs Hak et les ATPases Acu. Des tests analysant la tolérance et la sensibilité de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* à diverses concentrations de potassium ont révélé des différences significatives d'une espèce à l'autre, et ces différences dépendaient en partie du pH externe. Les espèces les plus tolérantes à des conditions limitées en potassium étaient *C. albicans* et *C. krusei*, tandis que *C. parapsilosis* a toléré les concentrations les plus élevées de KCl. En outre, la morphologie des cellules a varié selon la quantité de potassium accessible; *C. krusei* et *C. tropicalis* en ont été les plus affectés. Dans l'ensemble, nos résultats ont confirmé que l'assimilation et l'accumulation du potassium étaient d'importants facteurs pour la croissance des cellules de *Candida*, et portent à croire que le système d'assimilation du potassium Trk1, unique et probablement indispensable chez *C. krusei* et *C. glabrata*, pourrait représenter une cible pour la conception de nouveaux médicaments antifongiques. [Traduit par la Rédaction].

Mots-clés : *Candida*, homéostasie du potassium, morphologie.

Introduction

There are 4–5 million diverse species of fungi in nature, and yeasts form a substantial group of them. While most yeasts are nonpathogenic, there are a number of yeasts that are pathogenic to humans, animals, and plants. Human fungal pathogens are mostly opportunistic, implying that the success level of their infections depends upon the immune defense system of the host (Heitman 2011; Prasad and Singh 2013). Owing to ad-

vancements in preventive treatments such as immune suppression during organ transplantations and to life-threatening diseases like AIDS, these opportunistic yeasts are finding suitable hosts to thrive in (Tuite and Lacey 2013). The *Candida* genus is composed of over 150 heterogeneous species, but only a minority are associated with human candidiasis (Papon et al. 2013), since roughly 65% of *Candida* species are unable to grow at a temperature of 37 °C, enabling them to prosper as

Received 20 November 2015. Revision received 6 January 2016. Accepted 8 January 2016.

B. Hušeková, H. Elicharová, and H. Sychrová. Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, The Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.

Corresponding author: Hana Sychrová (email: sychrova@biomed.cas.cz).

pathogens or commensals of humans (Rodrigues et al. 2014). The pathogenicity of *Candida* species is attributed to certain virulence factors, such as the ability to evade host defenses, adhesion and biofilm formation (on host tissues and on medical devices), and the production of tissue-damaging hydrolytic enzymes, such as proteases, phospholipases, and haemolysins (Silva et al. 2012). *Candida albicans* contributes to 50%–60% of human yeast infections, followed by non-*C. albicans* species, which mostly include *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* (Heitman 2011). Taken together, these 5 species accounted for 90%–95% of candidemia cases (Pfaller et al. 2005, 2011).

Due to their eukaryotic nature, yeasts are especially difficult to treat, resulting in mortalities in the range of 40%–90% (Lagrou et al. 2007). Though there has been an expansion in the number of antifungal drugs in recent years, the treatment of fungal diseases remains unsatisfactory, mainly due to a dramatic increase in the appearance of strains resistant to treatment with classical antifungal drugs, such as polyenes, azole derivatives, and echinocandins. The increasing incidence of systemic yeast infections and rapid development of drug resistance have highlighted the need for new antifungal agents with new structures of their active compounds and with fewer side effects.

Phenotypic evaluations of *Candida* wild-type and mutant strains with defective sensing capacities clearly indicate that physiological fitness plays a central role in virulence and (or) pathogenicity. This fitness includes an efficient regulation of intracellular K⁺ and pH homeostases, which are crucial physiological factors and influence many processes (e.g., the cell cycle, organelle biogenesis and cell volume, maintenance of membrane potential, cell response to osmotic and pH stresses (Ariño et al. 2010)). Yeast cells, including *Candida* species, usually need to accumulate high concentrations of potassium (200–300 mmol/L) to ensure the proper growth and division of cells (Ariño et al. 2010; Krauke and Sychrova 2010; Krauke and Sychrova 2011; Petrezsélyová et al. 2011). Thus, it is evident that pathogenic *Candida* species must compete with their host cells for the necessary potassium, which is usually present in a few millimoles per litre in extracellular host fluids, and to do this they need efficient potassium uptake systems. So far, only 1 potassium uptake system has been partly characterized in *C. albicans* (Baev et al. 2004).

For our study, we chose 6 species whose genomes have been sequenced (Table 1). Besides the 5 most prevalent species (Papon et al. 2013) mentioned above, we also chose *Candida dubliniensis*, which differs in many physiological parameters from its close relative *C. albicans* and is relatively low in virulence and causes frequent oral-cavity infections of AIDS patients (Sullivan et al. 1995). The other 5 species differ in their niche within the human body and their virulence. *Candida tropicalis* is

Table 1. *Candida* wild-type strains used in this study.

Strain	Reference	Genome project
<i>C. albicans</i> SC5314	Jones et al. 2004	Lowe and Eddy 1997
<i>C. dubliniensis</i> CD36	Bennett et al. 1998	Jackson et al. 2009
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	ATCC collection	Dujon et al. 2004
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	ATCC collection	Chan et al. 2012
<i>C. parapsilosis</i> CP69	Vinterova et al. 2013	Guida et al. 2011
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	ATCC collection	Butler et al. 2009

commonly associated with patients with neutropenia and malignancy (Nucci and Colombo 2007), whereas *C. parapsilosis* appears to be a significant problem in neonates and patients receiving parenteral nutrition (Trofa et al. 2008). The 2 last species, *C. glabrata* and *C. krusei* (also known as a pathogenic form of *Pichia kudriavzevii* or *Issatchenkia orientalis* (Kurtzman et al. 2010) do not belong to the CUG clade, in contrast to the other 4 species. These 2 species are associated with elderly patients, neutropenic neonates, and patients treated with corticoids (Quindós 2014), and both of them are less susceptible to all clinically used azoles than is *C. albicans*. *Candida krusei* even possesses intrinsic resistance to fluconazole (Arendrup 2013).

The aim of this work was to (i) search the genome sequences of various *Candida* species to find the number and nature of their putative potassium uptake systems, (ii) verify whether the number of genes encoding specific potassium transporters is reflected in the ability of *Candida* species to grow under potassium-limiting concentrations, and (iii) estimate whether the limited potassium influences the morphology of *Candida* cells.

Materials and methods

Strains and growth media

The *Candida* strains used are listed in Table 1. Strains were maintained on plates with YPD medium (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% glucose; 2% agar). To monitor their growth and morphology, either the classic YNB was used (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose; 2% agar for solid media) or potassium-free YNB-F (0.175% YNB-F without amino acids, ammonium sulfate, and potassium (Formedium UK), adjusted to pH 5.8 and supplemented with 0.4% ammonium sulfate, 2% glucose, various concentrations of KCl, and 2% agar for solid media). In some experiments, ammonium sulfate was replaced with other sources of nitrogen, namely proline or casamino acids.

To estimate the potassium requirements of *Candida* species at various external pH, YNB-F plates were buffered as described earlier by Kinclová et al. (2001) with one exception, 20 mmol/L bicine was used for pH 8.0 plates.

Table 2. Putative K⁺ importing transporters.

Clade	Ploidy	Species	Transporter length (amino acids)			
			Trk	Hak	Acu	Kch
CUG	2n	<i>C. albicans</i>	1056	808	355*, 654*	659
CUG	2n	<i>C. dubliniensis</i>	1064	808	282*	659
CUG	2n	<i>C. parapsilosis</i>	1041	794	—	609
CUG	2n	<i>C. tropicalis</i>	1097	815	—	634
WGD	n	<i>C. glabrata</i>	1352	—	—	524, 323
—	2n	<i>C. krusei</i>	1173	—	—	553
WGD	n	<i>S. cerevisiae</i>	1235, 889	—	—	497, 352

*pseudogene.

Drop tests

Growth phenotypes of strains in the presence of various potassium concentrations were tested on solid media by a classical drop test. Cells growing on solid media were resuspended in sterile water to the same initial OD₆₀₀ (approx. 1). Tenfold serial dilutions were prepared, and 3 µL aliquots were spotted on a series of plates containing the indicated concentrations of potassium. Plates were incubated at 30 °C, and digital greyscale images of growing colonies were taken using a Nikon Coolpix4500 digital camera at the indicated times. Representative results of at least 3 independent experiments are shown.

Morphology changes

Cells grown on solid YNB-F media with either 15 µmol/L or 200 mmol/L KCl at 30 °C for 24 h or 7 days were harvested, washed with water, and resuspended in water. Cells grown in liquid YNB-F media (with either 15 µmol/L or 200 mmol/L KCl at 30 °C for 24 h) were viewed directly in the growth medium. Cells were viewed with an Olympus AX70 microscope with Nomarski optics. The micrographs were recorded with a DP70 digital camera using the program DP controller. For each species and each set of conditions, the morphology of at least 100 cells was estimated and expressed as %. The experiment was repeated twice, representative results are shown.

Bioinformatics

The DNA and protein sequences were obtained from the *Candida* genome database (Inglis et al. 2012), *Saccharomyces* genome database (Cherry et al. 2012), and NCBI GenBank (Benson et al. 2005). Orthologs of putative potassium transporters were determined using the *Candida* gene order browser (Maguire et al. 2013), yeast gene order browser (Byrne and Wolfe 2005), and NCBI Blast algorithm (Johnson et al. 2008).

Results and discussion**In silico search for potassium transporters in *Candida* species**

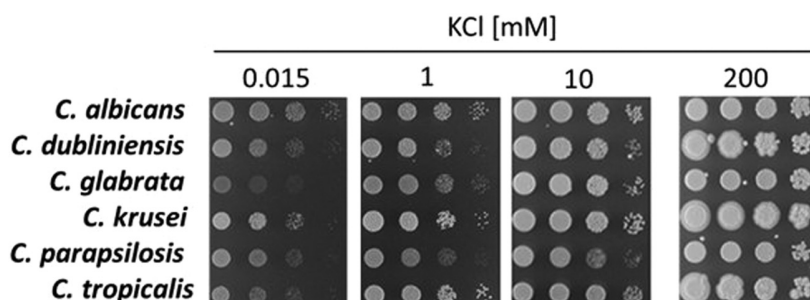
So far, 3 types of efficient potassium-specific uptake systems, differing in their transport mechanism and primary protein structure, have been identified in yeast species. These are the frequently found Trk potassium uniporters and Hak potassium-proton symporters, and a rare Acu ATPase. The Trk and Hak transporters have been characterized in a number of conventional and nonconventional yeast species, mainly via heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking their own Trk1 and Trk2 potassium transporters (Petrezsélyová et al. 2011). The Acu1 ATPase has been characterized only in *Pichia sorbitophila* yeast and plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis* (Benito et al. 2004). Besides these 3 high-affinity uptake systems, some channels (Kch family) involved in calcium signalling have been suggested to also act as nonspecific low-affinity potassium transporting systems in *S. cerevisiae* and *C. albicans* (Stefan and Cunningham 2013; Stefan et al. 2013).

Our search in the genome databases and comparison of retrieved sequences originating in various *Candida* species revealed a significant difference in the number and type of putative potassium transporters (Table 2 and supplementary Table S1¹). The most ubiquitous are the Trk transporters. Genes encoding their putative homologues were found in all searched genomes. However, they exist in only 1 copy in all searched *Candida* species, which is different from the model yeast *S. cerevisiae*, which possesses 2 copies of these uniporters whose activity is thought to be driven by plasma-membrane potential (for reviews, cf. Ariño et al. 2014, 2010).

The Hak1 transporter, which uses the inward gradient of protons (created in yeast cells by the Pma1 plasma-membrane H⁺-ATPase) to accumulate potassium cations against their concentration gradient probably exists in all *Candida* species from the CUG clade but not in *C. glabrata* or *C. krusei* (Table 2 and supplementary Table S1¹). Finally, a complete gene encoding an Acu ATPase was not found in any of the searched species. In *C. albicans* and *C. dubliniensis* genomes, open reading frames (ORFs) encoding parts of the ACU gene were found (Table 2 and supplementary Table S1¹). In *C. albicans* SC5314, 2 neighbor ORFs with an intergenic region (213 nt long) exist (supplementary Table S1¹), and if the stop codon of the first one is changed to an amino-acid codon, 1 ORF encoding a complete Acu1 ATPase (1075 aa long) can be found. A point mutation changing this stop codon into a codon for lysine was reported to be sufficient to obtain a functional potassium transporter upon expression in *S. cerevisiae*, but unfortunately no results were shown (Benito et al. 2004). As this situation (the

¹Supplementary data are available with the article through the journal Web site at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/cjm-2015-0766>.

Fig. 1. Growth of *Candida* species cells on YNB-F medium supplemented with KCl as indicated. Pictures were taken after 24 h (for 0.015, 1, 10 mmol/L KCl) or 72 h (200 mmol/L KCl).



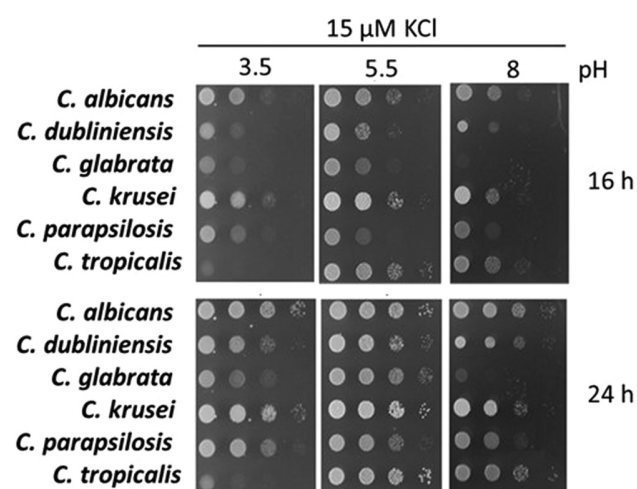
same frame shift due to a point mutation) is not conserved in *C. albicans* WO-1 and *C. dubliniensis* (supplementary Table S1¹), where the damage to the original *ACU1* ORF seems to be more extensive, it would be interesting to clone and sequence the corresponding DNA regions to search for a complete gene in various *C. albicans* strains and clinical isolates.

As for the Kch channels, corresponding ORFs were found in the genomes of all species. Two members of the Kch family were found only in *C. glabrata*, a close relative of *S. cerevisiae* that also has 2 *KCH* genes whose products are supposed to participate in the maintenance of membrane potential (Stefan and Cunningham 2013).

Growth of *Candida* species at low potassium concentrations

To estimate whether the number of putative potassium-specific transporters encoded in the genome is reflected in the cells' ability to grow on media with limited potassium, we compared the growth of *Candida* species in a special YNB-F medium (cf. Materials and methods) with a very low amount (ca. 15 $\mu\text{mol/L}$) of potassium and ammonium sulfate as a source of nitrogen. Classic YNB contains approx. 15–20 mmol/L KCl. As shown in Fig. 1, our hypothesis was only partly confirmed. *Candida glabrata*, which probably has only 1 *Trk1*, grew poorly if the K^+ concentration was lower than 1 mmol/L, and *C. albicans*, with at least 2 types of transporters, grew very well even on only 15 $\mu\text{mol/L}$ KCl. On the other hand, *C. parapsilosis* with 2 different transporters grew much worse than *C. krusei*, with only one (Fig. 1). All species grew well if the KCl concentration was higher than 1 mmol/L, though the growth of *C. parapsilosis* was slightly slower than the growth of the others even in the presence of 10 mmol/L KCl. If the plates were supplemented with 200 mmol/L KCl, all *Candida* species grew very well (Fig. 1). Results similar to those shown in Fig. 1 were obtained if the YNB-F was supplemented with the same amounts of potassium but various sources of nitrogen (proline or casamino acids, not shown). The growth of *S. cerevisiae* cells at potassium-limiting concentrations was shown to depend on the presence of sodium cations (Camacho et al. 1981). As our media contain millimolar concentrations of sodium cations, we cannot ex-

Fig. 2. Growth of *Candida* species cells on YNB-F medium buffered as indicated and containing 15 $\mu\text{mol/L}$ KCl.

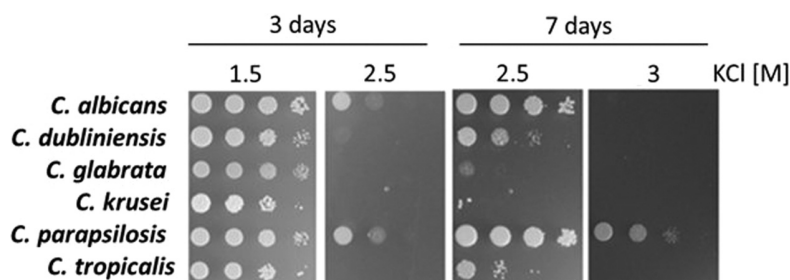


clude that the observed differences might be partly due to the presence of sodium. However, the *Candida* species tolerate relatively high concentrations of sodium and are able to maintain an appropriate intracellular K^+/Na^+ ratio even if the sodium concentration in the medium is several hundred times higher than that of potassium (Krauke and Sychrova 2010).

Further, we tested the growth at limiting potassium concentrations and different pHs of the medium (Fig. 2). We thought that Hak transporters would be more active at lower pH, as they transport potassium in symport with protons. Surprisingly, our results showed that all *Candida* species acquired the necessary potassium most easily when grown at pH 5.5, and that *C. tropicalis* had problems acquiring potassium at pH 3.5 (Fig. 2), and started to grow at this pH if the KCl concentration was higher than 1 mmol/L (not shown). *Candida glabrata* did not grow at pH 8 (Fig. 2), and the addition of more KCl did not improve its growth at this pH (not shown).

In all tests with a low concentration of potassium, *C. krusei* grew very well (Figs. 1 and 2) despite having probably only 1 potassium uptake system (Table 2). Thus, it would be interesting to clone its *TRK1* gene and compare the properties of the protein product with those of

Fig. 3. Growth of *Candida* species cells on YNB medium supplemented with KCl as indicated.



C. glabrata Trk1 expressed under the same conditions (e.g., in *S. cerevisiae* *trk1trk2* mutants, Petrežsélyová et al. 2011; Zimmermannova et al. 2015) and elucidate whether *C. krusei* Trk1 is more active or has a higher affinity for potassium than *C. glabrata* Trk1, and also estimate the amount of Trk protein in the cells of the 2 species. Also, a detailed characterization of the Trk and Hak transporters from *C. parapsilosis* and a comparison with the same transporters from *C. albicans* might explain why this species is so sensitive to low concentrations of potassium.

Growth of *Candida* species on high potassium concentrations

We also tested the growth of *Candida* species in the presence of very high potassium concentrations (Fig. 3). Previously, we found that among the 4 *Candida* species studied, *C. parapsilosis* was the most tolerant to high potassium concentrations added into the rich YPD medium (Krauke and Sychrova 2008). Here, when we tested the 6 species and YNB medium, *C. parapsilosis* was again the most tolerant to high concentrations of KCl (Fig. 3). On the other hand, surprisingly, *C. dubliniensis* tolerated higher concentrations of KCl when grown on YNB than YPD (Fig. 3 and Krauke and Sychrova 2008). *Candida krusei*, which is very tolerant to low potassium concentrations, was extremely sensitive to high potassium concentrations (Figs. 1 and 3). This raises the question of whether it has an extremely efficient potassium uptake system that is not completely downregulated at high external potassium levels and brings in too much of this cation. Again, only the cloning of the *C. krusei* *TRK1* gene and its expression in *S. cerevisiae* mutants lacking their own potassium uptake and efflux systems can answer this question.

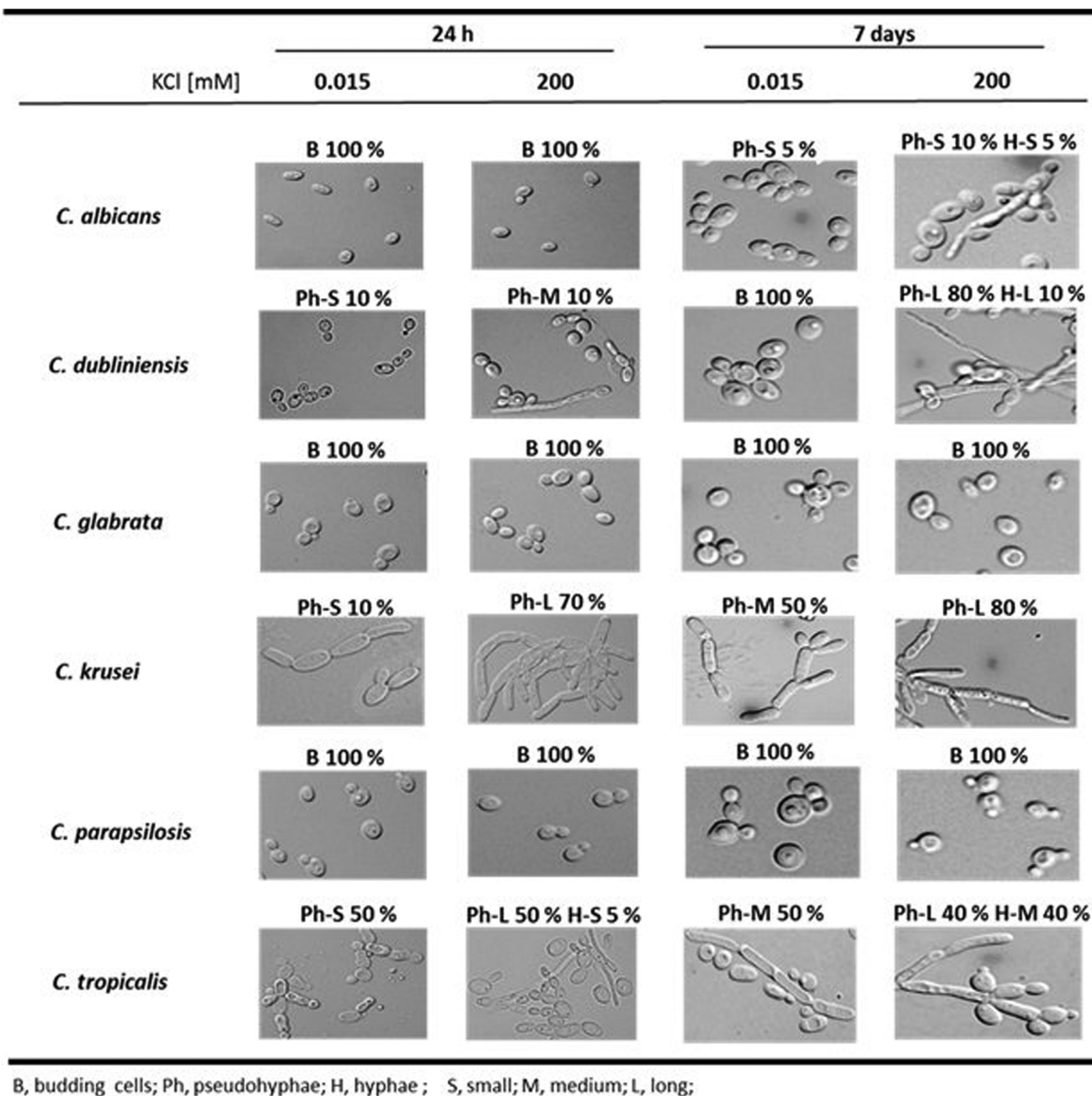
Candida morphology at low potassium concentrations

Many yeast species are able to change their cell morphology in response to changes in external conditions. In *Candida* species, this ability is believed to coevolve together with virulence (Thompson et al. 2011). *Candida* species exist either in the budding form or they form pseudohyphae or even hyphae, and the morphology of cells switches according to the available nutrients, external temperature, or other external changes. A relation-

ship between the formation of *C. albicans* hyphae and the intracellular concentration of potassium has also been suggested (Watanabe et al. 2006). To elucidate whether *Candida* morphology also depends on the availability of potassium (as a crucial cation involved in the regulation of many cell physiology parameters), we tested the morphology of cells grown either under potassium-limiting (YNB-F + 15 $\mu\text{mol/L}$ KCl) or abundant (YNB-F + 200 mmol/L KCl) conditions. Cells were grown on solid medium and their morphology was observed after 24 h and 7 days, and the results obtained are summarized in Fig. 4. It is worth noting that similar results were obtained when cells were grown in liquid YNB-F + 15 $\mu\text{mol/L}$ KCl and YNB-F + 200 mmol/L KCl for 24 h (not shown). *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* only formed budding yeast cells at the early stage of growth (24 h) under both tested conditions. This is surprising, especially for *C. parapsilosis*, since the 15 $\mu\text{mol/L}$ concentration of potassium limits its growth (Fig. 1). Even more surprising was the observation that *C. krusei* formed much more and longer pseudohyphae at 200 mmol/L KCl than at 15 $\mu\text{mol/L}$, both at the beginning of growth (10% vs. 70% after 24 h) and also after 7 days (Fig. 4). Three species (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*) formed more hyphae and (or) pseudohyphae after 7 days on the plate with 200 mmol/L KCl than on the medium with 15 $\mu\text{mol/L}$ KCl. This is probably due to a faster consumption of nutrients (and growth) in the medium with abundant potassium, where the cells reach the starvation phase earlier. Taken together, our results showed that the concentration of potassium in the environment significantly influences the morphology of at least *C. krusei* and *C. tropicalis*, which both form more and longer pseudohyphae and hyphae in media with optimal (200 mmol/L) potassium concentration than under potassium-limiting conditions, even in the first phase of growth. Simultaneously, the growth of one of them (*C. krusei*) is not limited by low potassium, whereas the other one (*C. tropicalis*) grows rather slowly upon potassium limitation.

Though the extracellular pH and concentration of alkali metal cations are listed among the environmental conditions influencing the virulence of *Candida* species in all reviews and text books, the mechanisms of the

Fig. 4. Morphology of cells grown on YNB-F medium supplemented with KCl as indicated for 24 h and 7 days. For each strain and set of conditions, the morphology of approx. 100 cells was observed and the percentage of budding cells, pseudohyphae and hyphae and their lengths (small, medium, long) counted.



maintenance of pH and potassium intracellular homeostases have been mainly studied in *S. cerevisiae*. Since *Candida* cells need to transport potassium very efficiently (due to the low extracellular potassium concentrations in host organisms and the competition for it with host cells), we believe that a detailed characterization of the potassium-specific uptake systems of *Candida* species will (i) elucidate their contribution to the regulation and (or) maintenance of basic physiological parameters, e.g., potassium and pH_{in} homeostases, plasma-

membrane potential, and cell volume; and (ii) show that the malfunction and (or) inhibition of their activity has a detrimental effect on cell viability similarly as was proven in *S. cerevisiae*, (Ariño et al. 2014, 2010); and (iii) indicate the Trk and Hak transporters to be promising targets for the development of new antifungal drugs, mainly due to the fact that these 2 yeast potassium transporters differ from human potassium uptake systems both in their protein structure and mechanism of transport.

Acknowledgements

Olga Zimmermannova is acknowledged for the critical reading of the manuscript. This work was funded by the Czech National Science Foundation (GA CR 302/12/1151) and the institutional support RVO: 67985823. This work was also supported by BIOCEV (Biotechnology and Biomedicine Centre of Academy of Sciences and Charles University) (grant CZ.1.05/1.1.00.02.0109), a project from European Regional Development Fund.

References

- Arendrup, M.C. 2013. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med. J.* **60**(11): B4698. PMID:24192246.
- Ariño, J., Ramos, J., and Sychrová, H. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**(1): 95–120. doi:10.1128/MMBR.00042-09. PMID:20197501.
- Ariño, J., Aydar, E., Drulhe, S., Ganser, D., Jorriin, J., Kahm, M., et al. 2014. Systems biology of monovalent cation homeostasis in yeast: the translucent contribution. *Adv. Microb. Physiol.* **64**: 1–63. doi:10.1016/B978-0-12-800143-1.00001-4. PMID:24797924.
- Baev, D., Rivetta, A., Vylkova, S., Sun, J.N., Zeng, G.F., Slayman, C.L., and Edgerton, M. 2004. The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *J. Biol. Chem.* **279**(53): 55060–55072. doi:10.1074/jbc.M411031200. PMID:15485849.
- Benito, B., Garciadeblás, B., Schreier, P., and Rodríguez-Navarro, A. 2004. Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot. Cell.* **3**(2): 359–368. doi:10.1128/EC.3.2.359-368.2004. PMID:15075266.
- Bennett, D.E., McCreary, C.E., and Coleman, D.C. 1998. Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiology*, **144** (Pt 1): 55–72.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Wheeler, D.L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **33**(Database issue): D34–D38.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., et al. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, **459**(7247): 657–662.
- Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. 2005. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res.* **15**(10): 1456–1461. doi:10.1101/gr.3672305. PMID:16169922.
- Camacho, M., Ramos, J., and Rodríguez-Navarro, A. 1981. Potassium requirements of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **6**(5): 295–299. doi:10.1007/BF01566880.
- Chan, G.F., Gan, H.M., Ling, H.L., and Rashid, N.A.A. 2012. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryot. Cell.* **11**(10): 1300–1301. doi:10.1128/EC.00229-12. PMID:23027839.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., et al. 2012. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **40**(Database issue): D700–D705.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., et al. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature*, **430**(6995): 35–44.
- Guida, A., Lindstadt, C., Maguire, S.L., Ding, C., Higgins, D.G., Corton, N.J., et al. 2011. Using RNA-seq to determine the transcriptional landscape and the hypoxic response of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *BMC Genomics*, **12**(628).
- Heitman, J. 2011. Microbial pathogens in the fungal kingdom. *Fungal Biol. Rev.* **25**(1): 48–60. doi:10.1016/j.fbr.2011.01.003. PMID:21528015.
- Inglis, D.O., Arnaud, M.B., Binkley, J., Shah, P., Skrzypek, M.S., Wymore, F., et al. 2012. The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res.* **40**(Database issue): D667–D674.
- Jackson, A.P., Gamble, J.A., Yeomans, T., Moran, G.P., Saunders, D., Harris, D., et al. 2009. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* **19**(12): 2231–2244. doi:10.1101/gr.097501.109. PMID:19745113.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezukh, Y., McGinnis, S., and Madden, T.L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **36**(Web Server issue): W5–W9.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., et al. 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(19): 7329–7334. doi:10.1073/pnas.0401648101. PMID:15123810.
- Kinclová, O., Ramos, J., Potier, S., and Sychrová, H. 2001. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* **40**(3): 656–668. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02412.x. PMID:11359571.
- Krauke, Y., and Sychrová, H. 2008. Functional comparison of plasma-membrane Na⁺/H⁺ antiporters from two pathogenic *Candida* species. *BMC Microbiol.* **8**: 80. doi:10.1186/1471-2180-8-80. PMID:18492255.
- Krauke, Y., and Sychrová, H. 2010. Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Curr. Microbiol.* **61**(4): 335–339. doi:10.1007/s00284-010-9616-3. PMID:20300937.
- Krauke, Y., and Sychrová, H. 2011. Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter and Ena1 Na⁺-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* **11**(1): 29–41. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00686.x. PMID:20942808.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., and Boekhout, T. 2010. The yeasts, a taxonomic study. 5th ed. Elsevier.
- Lagrou, K., Verhaegen, J., Peetermans, W.E., De, Rijdt, T., Maertens, J., and Van Wijngaerden, E. 2007. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**(8): 541–547. doi:10.1007/s10096-007-0339-8. PMID:17569999.
- Lowe, T.M., and Eddy, S.R. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**(5): 955–964. doi:10.1093/nar/25.5.0955. PMID:9023104.
- Maguire, S.L., OhEigeartaigh, S.S., Byrne, K.P., Schroder, M.S., O'Gaora, P., Wolfe, K.H., and Butler, G. 2013. Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Mol. Biol. Evol.* **30**(6): 1281–1291. doi:10.1093/molbev/mst042. PMID:23486613.
- Nucci, M., and Colombo, A.L. 2007. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**(1): 77–82. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.009. PMID:17368800.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., and Bennett, R.J. 2013. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.* **9**(9): 3550–3550.
- Petreželyová, S., Ramos, J., and Sychrová, H. 2011. Trk2 transporter is a relevant player in K⁺ supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **56**(1): 23–28. doi:10.1007/s12223-011-0009-1.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Rinaldi, M.G., Barnes, R., Hu, B., Veselov, A.V., et al. 2005. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole.

- zole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* **43**(12): 5848–5859. doi:10.1128/JCM.43.12.5848-5859.2005. PMID:16333066.
- Pfaller, M.A., Moet, G.J., Messer, S.A., Jones, R.N., and Castanheira, M. 2011. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008–2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(2): 561–566. doi:10.1128/AAC.01079-10. PMID:21115790.
- Prasad, R., and Singh, A. 2013. Lipids of *Candida albicans* and their role in multidrug resistance. *Curr. Genet.* **59**(4): 243–250. doi:10.1007/s00294-013-0402-1. PMID:23974286.
- Quindós, G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev. Iberoam. Micol.* **31**(1): 42–48. doi:10.1016/j.riam.2013.10.001. PMID:24270071.
- Rodrigues, C.F., Silva, S., and Henriques, M. 2014. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**(5): 673–688. doi:10.1007/s10096-013-2009-3. PMID:24249283.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., and Azeredo, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**(2): 288–305. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x. PMID:21569057.
- 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**(48): 34861–34870. doi:10.1074/jbc.M113.508705. PMID:24142703.
- Stefan, C.P., Zhang, N.N., Sokabe, T., Rivetta, A., Slayman, C.L., Montell, C., and Cunningham, K.W. 2013. Activation of an essential calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by Kch1 and Kch2, putative low-affinity potassium transporters. *Eukaryot. Cell*, **12**: 204–214. doi:10.1128/EC.00299-12. PMID:23204190.
- Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E., and Coleman, D.C. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol. J.* **141** (Pt 7): 1507–1521.
- Thompson, D.S., Carlisle, P.L., and Kadosh, D. 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell*, **10**(9): 1173–1182. doi:10.1128/EC.05085-11. PMID:21764907.
- Trofa, D., Gácsér, A., and Nosanchuk, J.D. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**(4): 606–625. doi:10.1128/CMR.00013-08. PMID:18854483.
- Tuite, N.L., and Lacey, K. 2013. Overview of invasive fungal infections. *Methods Mol. Biol.* **968**: 1–23. doi:10.1007/978-1-62703-257-5_1. PMID:23296882.
- Vinterova, Z., Bauerova, V., Dostal, J., Sychrova, H., Hruskova-Heidingsfeldova, O., and Pichova, I. 2013. *Saccharomyces cerevisiae* can secrete Sapp1p proteinase of *Candida parapsilosis* but cannot use it for efficient nitrogen acquisition. *J. Microbiol.* **51**(3): 336–344. doi:10.1007/s12275-013-2422-4. PMID:23812814.
- Watanabe, H., Azuma, M., Igarashi, K., and Ooshima, H. 2006. Relationship between cell morphology and intracellular potassium concentration in *Candida albicans*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **59**(5): 281–287. doi:10.1038/ja.2006.39.
- Zimmermannova, O., Salazar, A., Sychrova, H., and Ramos, J. 2015. The *Zygosaccharomyces rouxii* Trk1 is an efficient potassium transporter providing yeast cells with high lithium tolerance. *FEMS Yeast Res.* **15**(4): fov029. doi:10.1093/femsyr/fov029. PMID:26019147.

4.4 Publikace č. 4 - *Three Candida albicans potassium uptake systems differ in their ability to provide Saccharomyces cerevisiae trk1trk2 mutants with necessary potassium*

Výsledky Publikace č. 3 odhalily nestejněměrné zastoupení genů pro importéry draselných kationtů mezi jednotlivými druhy kandid, kdy pouze v genomu *C. albicans* jsme našli (pseudo)geny pro všechny typy kvasinkových importérů K^+ .

Námi provedené predikce topologie, sekundární struktury a strukturovanosti importérů K^+ *C. albicans* pomohly odhadnout jejich stavbu. Uniportní systém *CaTrk1* je jediný z trojice, u nějž je známá struktura transmembránové části jeho bakteriálního homologu (Cao et al., 2011), která je velmi konzervovaná i mezi kvasinkami, kandidy nevyjímaje. Nejvariabilnější částí přenašeče Trk tvoří intracelulární hydrofilní smyčka L23, která zabírá téměř polovinu délky celého transportéru a v naprosté většině je nestrukturovaná, což je u smyček membránových proteinů velmi neobvyklé. Výjimku tvoří krátký sekvenčně i strukturně konzervovaný motiv lokalizovaný v první třetině této smyčky.

Symportní systém *CaHak1* se sestává dle naší predikce z 12 TMD, v nichž se nachází několik vysoce konzervovaných nabitých aminokyselin. Poslední z přenašečů K^+ v *C. albicans* je ATPáza *CaAcu1*. U dvou laboratorních kmenů (SC5314 a WO-1) je gen *CaACU1* rozdělen mutacemi, jež zavádí do sekvence na různých místech STOP-kodon. Analýza lokusu *CaACU1* v genomech 32 kmenů *C. albicans* ukázala, že zhruba u dvou třetin z nich tato mutace chybí a gen *CaACU1* je v těchto kmenech nepřerušeno.

V genu *CaACU1* z kmene SC5314 jsme *in vitro* výměnou jednoho nukleotidu odstranili STOP-kodon, který jej dělil na dva otevřené čtecí rámce. Takto upravený gen *CaACU1* a dále *CaHAK1* a *CaTRK1* z kmene *C. albicans* SC5314 jsme exprimovali v mutantním kmeni *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ*, který postrádá vlastní draselné importéry. Také jsme pomocí značení GFP určili lokalizaci jednotlivých transportérů. Všechny tři studované systémy zlepšily růst kmenu *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ* na médiu s velmi nízkou koncentrací K^+ a byly schopné zajistit dostatek K^+ pro růst a dělení buněk, ačkoliv pouze transportér *CaTrk1* byl hojně zastoupen v plasmatické membráně. Velmi malé zastoupení *CaHak1* a *CaAcu1* v plasmatické membráně naznačuje jejich velkou transportní kapacitu.

Tato práce by měla být odrazovým můstkem pro studium draselných importérů

C. albicans z pohledu jejich souhry, vlivu na virulenci a potenciálu stát se cíli pro nová antimykotika.

Eličarová, H., B. Hušková and H. Sychrová (2016). Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow039



RESEARCH ARTICLE

Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae* *trk1trk2* mutants with necessary potassium

Hana Elicharová[†], Barbora Hušeková[†] and Hana Sychrová*

Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, The Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

*Corresponding author: Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, CAS, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic.

Tel: +420-241062556; Fax: +420-241062488; E-mail: sychrova@biomed.cas.cz[†]The two authors contributed equally to the work.**One sentence summary:** Pathogenic *Candida albicans* may use up to three transporters with differing transport mechanisms to acquire the necessary potassium in the host.

Editor: Ian Dawes

ABSTRACT

Yeasts usually have one or two high-affinity potassium transporters. Two complete and one interrupted gene encoding three types of putative potassium uptake system exist in *Candida albicans* SC5314. As high intracellular potassium is essential for many yeast cell functions, the existence of three transporters with differing transport mechanisms (Trk uniporter, Hak cation-proton symporter, Acu ATPase) may help pathogenic *C. albicans* cells to acquire the necessary potassium in various organs and tissues of the host. When expressed in *Saccharomyces cerevisiae* lacking their own potassium uptake systems, all three putative transporters were able to provide cells with the ability to grow with low amounts of potassium over a broad range of external pH. Only CaTrk1 was properly recognized and secreted to the plasma membrane. Nevertheless, even the small number of CaHak1 and mainly CaAcu1 molecules which reached the plasma membrane resulted in an improved growth of cells in low potassium concentrations, suggesting a high affinity and capacity of the transporters. A single-point mutation restored the complete CaACU1 gene, and the resulting protein not only provided cells with the necessary potassium but also improved their tolerance to toxic lithium. In contrast to its known homologues, CaAcu1 did not seem to transport sodium.

Keywords: *Candida*; potassium uptake; Hak1 transporter; Trk1 transporter; Acu1 ATPase; cation homeostasis

INTRODUCTION

Potassium is one of the elements accumulated in yeast cells to high levels. Its high intracellular concentration is required for many physiological functions, such as the regulation of cell volume and cytosolic pH, the maintenance of stable potential across the plasma membrane, compensation of negative charges in many macromolecules, protein synthesis and enzyme activation (Arino, Ramos and Sychrova 2010; Cyert and

Philpott 2013). Cells usually need to use high-affinity specific transporters and expend a lot of energy to acquire the necessary amount of potassium from their environment. Yeast species, including *Candida albicans*, intracellularly accumulate 200–300 mM potassium to ensure the proper growth and division of cells (Arino, Ramos and Sychrova 2010; Krauke and Sychrova 2010, 2011; Petrezselyova, Ramos and Sychrova 2011). Intracellular potassium homeostasis is maintained by the activity of a number of potassium influx, efflux and organelle transporters. For

Received: 27 January 2016; Accepted: 14 April 2016

© FEMS 2016. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

its sequestration to organelles, mainly transporters with an antiport mechanism of activity (exchanging potassium for protons) serve in yeast cells (Arino, Ramos and Sychrova 2010; Ramos, Arino and Sychrova 2011; Gelis et al. 2015), whereas the active efflux of surplus potassium cations across the yeast plasma membrane is usually mediated by antiporters and cation ATPases (reviewed in Arino, Ramos and Sychrova 2010; Ramos, Arino and Sychrova 2011). As for active potassium influx resulting in an accumulation high enough to create the internal turgor necessary for cell expansion and division (Rodríguez-Navarro 2000), three different types of plasma-membrane transporters mediating potassium uptake have been described in yeast: ubiquitously present Trk uniporters, Hak potassium-proton symporters and rarely occurring Acu ATPases (reviewed in Arino, Ramos and Sychrova 2010; Ramos, Arino and Sychrova 2011). These transporters share the same basic function but are very different from the mechanistic, structural and phylogenetic points of view. Nevertheless, they are thought to be distant members of families of potassium-transporting proteins that have been mainly characterized in detail in various bacteria (Diskowski et al. 2015).

Our previous search in the databases of sequenced *Candida* genomes revealed that species from the CTG clade may have both the Trk and Hak type of potassium transporters, whereas non-CTG *Candida* species, such as *C. glabrata* or *C. krusei*, probably have only Trk transporters (Hušeková, Elicharová and Sychrová 2016). The existence of a sole potassium uptake system in *C. glabrata* has been recently confirmed experimentally by the construction of mutants lacking the *CgTRK1* gene and characterization of their phenotypes (Llopis-Torregrosa, Hušeková and Sychrová 2016). *Candida albicans* seems to be unique among the *Candida* species as its genome might also contain a gene encoding the Acu1 P-type ATPase. To date, Acu1 ATPases have been characterized in only two species. They import sodium and potassium cations into *Ustilago maydis* and *Pichia sorbitophila* cells (Benito et al. 2004). In the first *C. albicans*-sequenced genome of the SC5314 strain (Jones et al. 2004), the putative ACU1 gene is interrupted by a point mutation changing its codon 356 into a STOP codon. The possibility of restoring the complete gene encoding a functional Acu1 ATPase by correcting this mutation in the cloned DNA fragment was mentioned, but the results were never shown (Benito et al. 2004).

Candida albicans is a diploid species, a harmless commensal for healthy individuals and a serious pathogen for immunocompromised patients. It accounts for a large number of fungal infections not only for local mucosities but also for life-threatening organ and bloodstream candidemias. It is also believed to be responsible for most device-associated fungal infections (Motaung et al. 2015). *Candida albicans* grows as a unicellular budding yeast, but under a broad range of conditions it can switch its morphology and form a mycelium of pseudohyphae and hyphae (Kurtzman, Fell and Boekhout 2010). To divide as a yeast or to produce long and rapidly growing hyphae, *C. albicans* cells must compete with their host cells for the necessary potassium, which is usually present at a few mmol/l in the host extracellular fluids, and to do this they need efficient potassium uptake systems. For example, intracellular potassium concentration was shown to be involved in the yeast-to-hyphae morphological switch of *C. albicans* (Watanabe et al. 2006), and high concentrations of alkali metal cations were shown to affect *C. albicans* virulence traits such as germ tube formation, adhesion and hydrophobicity (Hermann et al. 2003).

Whereas the alkali-metal-cation efflux systems of *C. albicans* and its close relative *C. dubliniensis*, Ena ATPases and Cnh1 antiporters have been characterized in detail

(Kinclova-Zimmermannova and Sychrova 2007; Krauke and Sychrova 2008; Enjalbert et al. 2009), much less is known about the three *C. albicans* putative potassium uptake systems. So far only CaTrk1 has been characterized, mainly using the electrophysiological approach (Baev et al. 2004; Miranda et al. 2009). CaTrk1 molecules, similarly to those of ScTrk1, act as high-affinity potassium uniporters driven by the inside-negative membrane potential, and are believed to form tetramers in the cell plasma membranes, which are able to facilitate the efflux of chloride (Pardo et al. 2015).

In this study, we cloned the sequences encoding all three putative transporters into a series of plasmids suitable for expression in *S. cerevisiae* mutants lacking their own potassium uptake systems ScTrk1 and ScTrk2 (BYT 12; Navarette et al. 2010; Petrezselyova, Ramos and Sychrova 2011). The absence of Trk transporters in *S. cerevisiae* results in the inability to grow at low external potassium concentrations, high sensitivity to other cations and cationic drugs and to significant changes in many physiological parameters (Bertl et al. 2003; Navarette et al. 2010; Arino et al. 2014). In this way, we produced a series of strains expressing only one of the three putative *C. albicans* potassium uptake systems and we were able to directly compare the phenotypes of their activity in *S. cerevisiae* cells.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media and growth conditions

The *C. albicans* SC5314 strain (Jones et al. 2004) was used to amplify fragments of genomic DNA. *Saccharomyces cerevisiae* BYT12, lacking its own potassium uptake systems (*trk1Δ trk2Δ*; Navarette et al. 2010; Petrezselyova, Ramos and Sychrova 2011), was used to express cloned *C. albicans* DNA fragments, and its parental strain BY4741 (EUROSCARF) was used as a potassium-uptake capable control. To examine the ability of CaAcu1 to transport sodium, *S. cerevisiae* BYT45 (*nha1Δ ena1-5Δ*; Navarette et al. 2010) strain was used.

Non-transformed strains were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose; 2% agar for solid media). To select the transformants, cells were grown in classic YNB (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose; 2% agar for solid media) with the necessary auxotrophic supplements and without uracil. To monitor their growth in the presence of different concentrations of potassium and other alkali-metal cations, potassium-free YNB-F was used (0.175% YNB-F without amino acids, ammonium sulphate and potassium (Formedium UK), adjusted to pH 5.8 and supplemented with 0.4% ammonium sulphate, 2% glucose, indicated concentrations of KCl and other salts). To estimate the potassium requirements of transformants at various external pH levels, YNB-F plates were buffered as described earlier (Kinclova et al. 2001).

Growth phenotypes of strains were tested on solid media by a classical drop test. Fresh cells were resuspended in sterile water to the same initial OD₆₀₀ (~1). Tenfold serial dilutions were prepared, and 3 μl aliquots spotted on a series of plates. Plates were incubated at 30 °C, and digital greyscale images of growing colonies were taken using a Nikon Coolpix4500 digital camera at the indicated times. Representative results of at least three independent experiments are shown.

Escherichia coli XL1 Blue was used as the host strain for plasmid amplification. The *E. coli* transformants were grown in standard Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (100 μg ml⁻¹).

Table 1. Plasmids used in this study.

Plasmid	Features	Reference
YEpl352	Multicopy, URA3	Hill et al. (1986)
pGRU1	Multicopy, URA3, GFP	Kinclova et al. (2001)
pNHA1-985	YEpl352, NHA1	Kinclova et al. (2001)
pNHA1-985-GFP	pGRU1, NHA1-GFP	Kinclova et al. (2001)
YEpl352-ZrTRK1	YEpl352, prom NHA1, ZrTRK1	Stribny, Kinclova-Zimmermannova and Sychrova (2012)
YEpl352-OsHKT1;3	YEpl352, prom NHA1, OsHKT1;3	Rosas-Santiago et al. (2015)
pCaTRK1	YEpl352, prom NHA1, CaTRK1	This work
pCaHAK1	YEpl352, prom NHA1, CaHAK1	This work
pCaACU1	YEpl352, prom NHA1, CaACU1	This work
pCaACU1-a	YEpl352, prom NHA1, CaACU1-a	This work
pCaACU1-b	YEpl352, prom NHA1, CaACU1-b	This work
pCaTRK1-GFP	pGRU1, prom NHA1, CaTRK1-GFP	This work
pCaHAK1-GFP	pGRU1, prom NHA1, CaHAK1-GFP	This work
pCaACU1-GFP	pGRU1, prom NHA1, CaACU1-GFP	This work
pCaACU1-a-GFP	pGRU1, prom NHA1, CaACU1-a-GFP	This work
pCaACU1-b-GFP	pGRU1, prom NHA1, CaACU1-b-GFP	This work

Plasmid construction

The plasmids used are listed in Table 1. All new plasmids were generated by homologous recombination in *S. cerevisiae*. Successful cloning was verified by diagnostic PCR and sequencing. Primers used for DNA-fragment amplification and diagnostic PCR are listed in Supplementary Table 1, Supporting Information. For the expression of *C. albicans* genes in *S. cerevisiae*, the amplified ORFs were cloned into multicopy plasmids behind the NHA1 promoter (replacing the NHA1 ORF in pNHA1-985 and pNHA1-985GFP, respectively; Kinclova et al. 2001). The complete ACU1 ORF (cf. Fig. 1C and Supplementary Fig. 1, Supporting Information) was constructed by amplifying the DNA fragment with a primer consisting of the last 40 nucleotides of the ACU1-a, a TTG codon (instead of TAG in the genome sequence) and the first 20 nucleotides after the ACU1-a STOP codon (oligonucleotide ACU + ACU-F, Supplementary Table 1, Supporting Information) and oligonucleotides YEplN-CaACU1b-R or pGRU1N-CaACU1b-R. The resulting DNA fragments were cloned by homologous recombination into pCaACU1-a and pCaACU1-a-GFP.

Fluorescence microscopy

Cells from the exponential phase of growth in YNB were observed under an Olympus AX70 microscope with Nomarski contrast, or the fluorescence signal of BYT12 cells producing *C. albicans* transporters tagged C-terminally with GFP was observed using a U-MWB cube with a 450–480 nm excitation filter and 515 nm barrier filter.

Bioinformatics

The DNA and protein sequences were obtained from the *Candida* genome database (Inglis et al. 2012), NCBI genome database and Yeast gene order browser (Byrne and Wolfe 2005). Orthologues of putative potassium transporters and their synteny were determined using the *Candida* gene order browser (Maguire et al. 2013), Yeast gene order browser (Byrne and Wolfe 2005) and NCBI Blast algorithm (Johnson et al. 2008). The protein topology was predicted by Kyte-Doolittle plot (Kyte and Doolittle 1982) and

the THMHMM 2.0. algorithm (Krogh et al. 2001). The secondary structure was calculated with JPred4 (Drozdetskiy et al. 2015) and the protein disorder with DisEMBL (Linding et al. 2003a) and GlobPlot2 (Linding et al. 2003b).

RESULTS AND DISCUSSION

In silico analysis of putative potassium transporters in *C. albicans*

As was mentioned above, three types of efficient potassium-specific uptake systems, differing in their transport mechanism and primary protein structure, have been identified in yeast species so far. But in most pathogenic *Candida* species and their close relative *Debaryomyces hansenii*, only two ORFs encoding Trk1 and Hak1 transporters, respectively, seem to be conserved (Prista et al. 2007; Martinez, Sychrova and Ramos 2011; Hušeková, Elicharová and Sychrová 2016). The genome of *C. albicans* is the only one in which the putative coding sequence for all three systems has been identified (Hušeková, Elicharová and Sychrová 2016). Trk1 (encoded in SC5315 by orf19.600) is believed to be a high-affinity potassium uniporter, and its activity as a potassium uptake system in *C. albicans* has been shown (Baev et al. 2004; Miranda et al. 2009). The structure of yeast Trk proteins has been predicted (Durell and Guy 1999; Durell et al. 1999), and the obtained model corresponds well with the revealed structure of bacterial Trk-type transporters (Cao et al. 2011; Vieira-Pires, Szollosi and Morais-Cabral 2013; Levin and Zhou 2014). Yeast Trk systems are thought to be composed of four membrane-pore-membrane segments, each including two transmembrane domains spanning the membrane and pore loop with the filter sequence. The predicted structure of the identified *C. albicans* putative Trk1 protein corresponds very well with the model (Fig. 1A). CaTrk1 is shorter than that of *S. cerevisiae* (1056 versus 1235 amino acids, respectively), and the two proteins share about 40% identity at the protein sequence level. Our detailed analysis revealed that two intracellular loops are significantly shorter in CaTrk1 than in ScTrk1. The loop L23 between transmembrane segments (TMS) 2 and 3 is 499 amino acids long in CaTrk1 and 647 amino acids long in ScTrk1, which is in both cases about half of the whole protein length. The L67 loop between

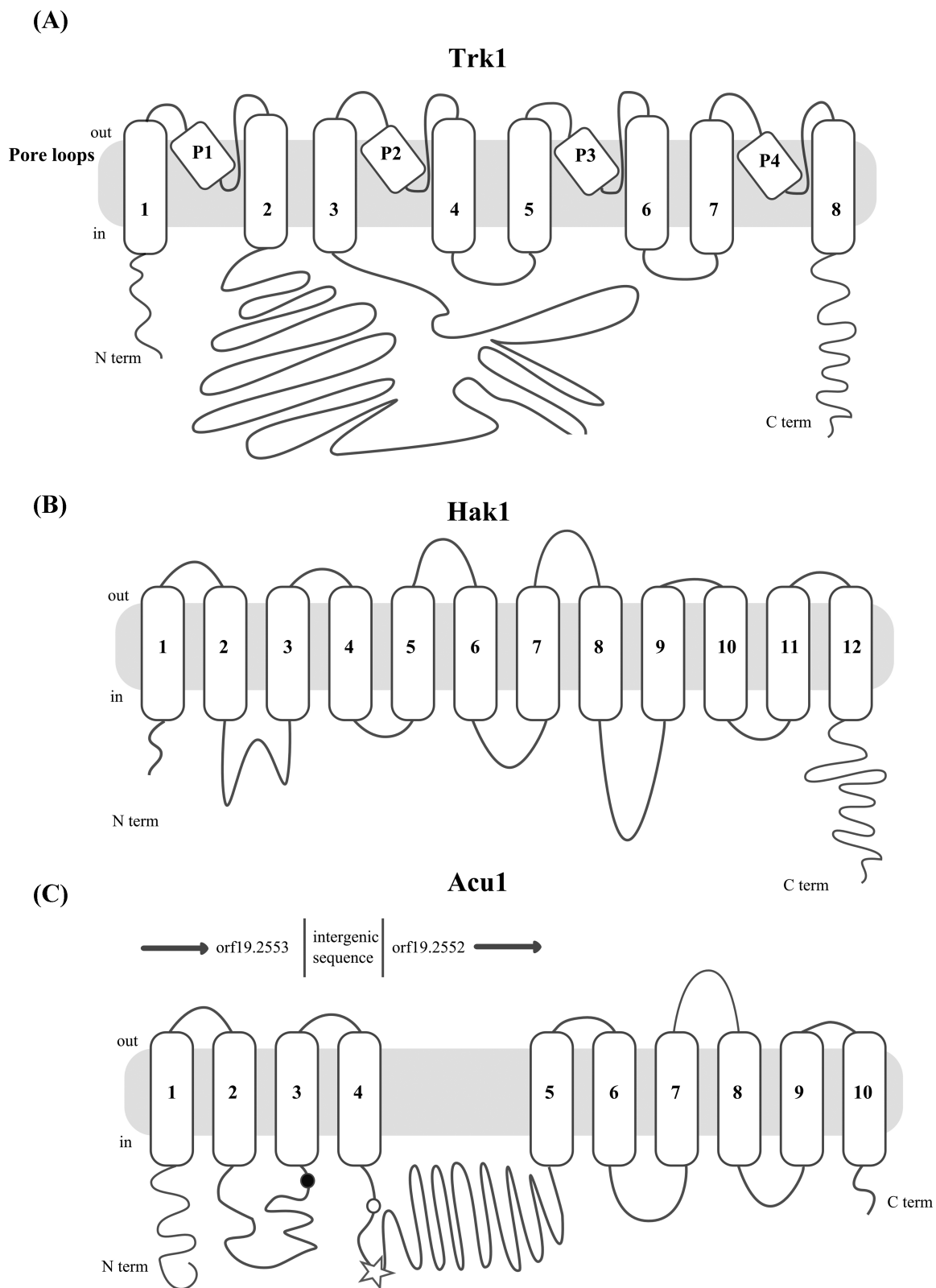


Figure 1. Predicted membrane topology of *C. albicans* potassium uptake systems. The transmembrane topology was predicted using a KD plot, the TMHMM 2.0 algorithm and previously published data. (A) Trk1; transmembrane spanning segments are numbered, the intramembrane pore loops containing the filter sequence are marked P1-4. (B) Hak1, transmembrane spanning segments are numbered. (C) Acu1; transmembrane spanning segments are numbered, the STOP codon of the Acu1-a (orf 19.2553) is indicated with a black circle, the START codon of the Acu1-b (orf 19.2552) with an open circle and the ATP-binding site with a star.

TMS6 and TMS7 is very short in CaTrk1 (37 amino acids), whereas in ScTrk1 it has 83 residues. The existence of a very long intracellular loop between TMS 2 and 3 in yeast Trk transporters seems to be conserved. According to our analysis of sequences of eight Trk1 candidates from various *Candida* species and strains, it exists in all of them, being the shortest in *C. lusitaniae* putative Trk1 (417 amino acids) and the longest in *C. glabrata* Trk1 (737 amino acids). Surprisingly, our prediction of disorder level suggested that the majority of L23 is disordered (prediction by DisEMBL and GlobPlot). Only one short helix appears in all analysed Trk1 sequences between positions 100 and 200 of these loops (predicted by JPred4). This region contains the highly conserved motif D-M-[YF]-[RK]-S-I-x-M-L-Q. The existence of such highly disordered large internal loops in membrane transporters is quite unusual and its role in yeast Trk1 proteins is unknown.

As for Hak1 potassium uptake systems, they are believed to operate with the cation-proton symport mechanism (Rodríguez-Navarro 2000; Ramos, Arino and Sychrova 2011) but very little is known about their protein structure. The only topology prediction, together with a partial experimental validation of the model, exists for a bacterial Hak1 homologue (Kup) from *E. coli* (Sato et al. 2014). *Candida albicans* putative Hak1 is 808 amino acids long (orf19.6249), as in other *Candida* species from the CTG clade (Hušeková, Elicharová and Sychrová 2016). According to our prediction of *Candida* Hak1 topology, which is based on a KD plot and TMHMM 2.0 and whose results are in agreement with the *E. coli* Kup model (Sato et al. 2014), CaHak1 is a typical plasma-membrane transporter with 12 TMS, relatively short loops and short N- and C- termini oriented to the cytosol (Fig. 1B). The Hak1 transporters in *Candida* species share on average about 60% identity (not shown).

There seems to be no complete gene encoding Acu1 ATPase in the genome of *C. albicans* SC5314. It is split into two neighbouring ORFs (orf19.2553 and orf19.2552) with an intergenic region (213 nt long). If the stop codon of the first one is changed to an amino-acid codon, one ORF encoding a complete Acu1 ATPase (1075 amino acids long) can be found. In fact, a point mutation replacing TAG (STOP) with an amino-acid-encoding codon, which corresponds to residue 357 in the complete Acu1 protein (Fig. 1C), is enough to restore the complete ORF. The *C. albicans* Acu1 ATPase probably consists of 10 TMS, a long loop between TMS 4 and 5 with the ATP-binding site, and it shares more than 35% identity with the *U. maydis* and *P. sorbitophila* Acu1 proteins. When we checked the same ORF in another *C. albicans* strain whose genome has been sequenced and annotated (WO-1; Slutsky et al. 1987; Butler et al. 2009), we found that the locus is more damaged than in SC5314 (Supplementary Fig. 1, Supporting Information). Moreover, only a small part of an ACU1-like ORF (encoding a 282 amino-acid-long protein, i.e. about 26% of the complete Acu1) was found in the genome of *C. albicans*' close relative *C. dubliniensis*. A detailed search of contigs of sequenced (but not annotated) genomes of other 32 *C. albicans* strains in the NCBI genome database revealed that ACU1 exists in all the sequenced genomes, it is interrupted in about one-third of these genomes, and ~20 strains probably contain an unbroken allele.

Surprisingly, no significant remnants of the ACU1 gene were found in the genomes of other *Candida* species, although the surrounding synteny of this part of the chromosome seems to be conserved among the species. According to our results, MET6 and URA5 are neighbours in seven pathogenic *Candida* species from the CTG clade, but fragments or complete genes of ACU1 can only be found between these two genes in the two *C. albicans* strains and in *C. dubliniensis*.

Cloning of the three *C. albicans* genes and their expression in *S. cerevisiae*

To confirm the predicted potassium uptake function of the three putative transporters, we cloned them into two *S. cerevisiae* multicopy vectors behind the *NHA1* promoter, and tagged their 3' termini with the GFP sequence in one of the two plasmid series (Table 1). The weak and constitutive promoter of *NHA1* which encodes a potassium and sodium efflux system (Nha1 antiporter) has been already repeatedly successfully used by us for the expression of heterologous transporters in *S. cerevisiae* (e.g. TRK1 genes from *Zygosaccharomyces rouxii* or *C. glabrata*; Stribny, Kinclova-Zimmermannova and Sychrova 2012; Zimmermannová et al. 2015; Llopis-Torregrosa, Hušeková and Sychrová 2016). For the complete ACU1 ORF, we introduced a point mutation changing the STOP codon into a Leu codon (as mentioned above and in Materials and Methods). We also cloned the two DNA fragments encoding the two neighbour ORFs in the ACU1 locus (orf19.2553 and orf19.2552) and named them ACU1-a and ACU1-b (cf. Supplementary Fig. 1, Supporting Information and Table 1). For the expression, the *S. cerevisiae* BYT12 strain was used, which lacks its own Trk1 and Trk2 potassium uptake systems. Besides the plasmids with *C. albicans* genes, we transformed this strain with empty YEp352 or pGRU1 plasmids and with the plasmid harbouring the *Z. rouxii* TRK1 gene cloned into the same plasmid and behind the same promoter (cf. Table 1). In all experiments, transformants of BYT12 with empty vectors served as negative controls, and transformants with YEp352-ZrTRK1 as positive controls. The BY4741 strain (TRK1 TRK2; parental strain for BYT12) harbouring the empty vectors was used as a second positive control.

Complementation of *S. cerevisiae* trk1trk2 phenotype in limiting potassium concentrations

Saccharomyces cerevisiae cells can grow at micromolar potassium concentrations (Fig. 2A; 15 μ M KCl; BY4741[YEp352]) because their efficient high-affinity potassium-specific Trk1 and Trk2 are able to accumulate 200–300 mM potassium inside the cells, which establishes the necessary turgor for the expansion of the cell wall, cell growth and division (Navarette et al. 2010). On the other hand, as a consequence of the lack of TRK1 and TRK2 genes, the growth of *S. cerevisiae* BYT12 cells is inhibited if the external concentration of potassium is below 100 mM (Fig. 2A; BYT12[YEp352]).

The heterologous expression of any membrane protein which is able to transport potassium cations results in the improved growth of BYT12 cells (or similar *S. cerevisiae* mutants in other genetic backgrounds, e.g. W12 derived from W303) at potassium concentrations below 100 mM (Navarette et al. 2010; Petrežselyova, Zahradka and Sychrova 2010; Petrežselyova, Ramos and Sychrova 2011). As shown in Fig. 2A, the expression of all three putative *C. albicans* transporters improved the ability of BYT12 cells to grow at low potassium, although to different levels. Cells with CaTrk1 grew very well at low potassium concentrations, maybe even slightly better than the control BY4741 cells (Fig. 2A; 15 μ M KCl). This very slight difference may be caused by the fact that CaTRK1 was expressed from a multicopy plasmid, whereas *S. cerevisiae* TRK1 and TRK2 genes are known to be expressed constitutively and at relatively low levels (Arino, Ramos and Sychrova 2010). Thus probably BYT12[pCaTRK1] cells contain more copies of a potassium transporter than cells with their own Trk proteins. Also the presence of the complete Acu1

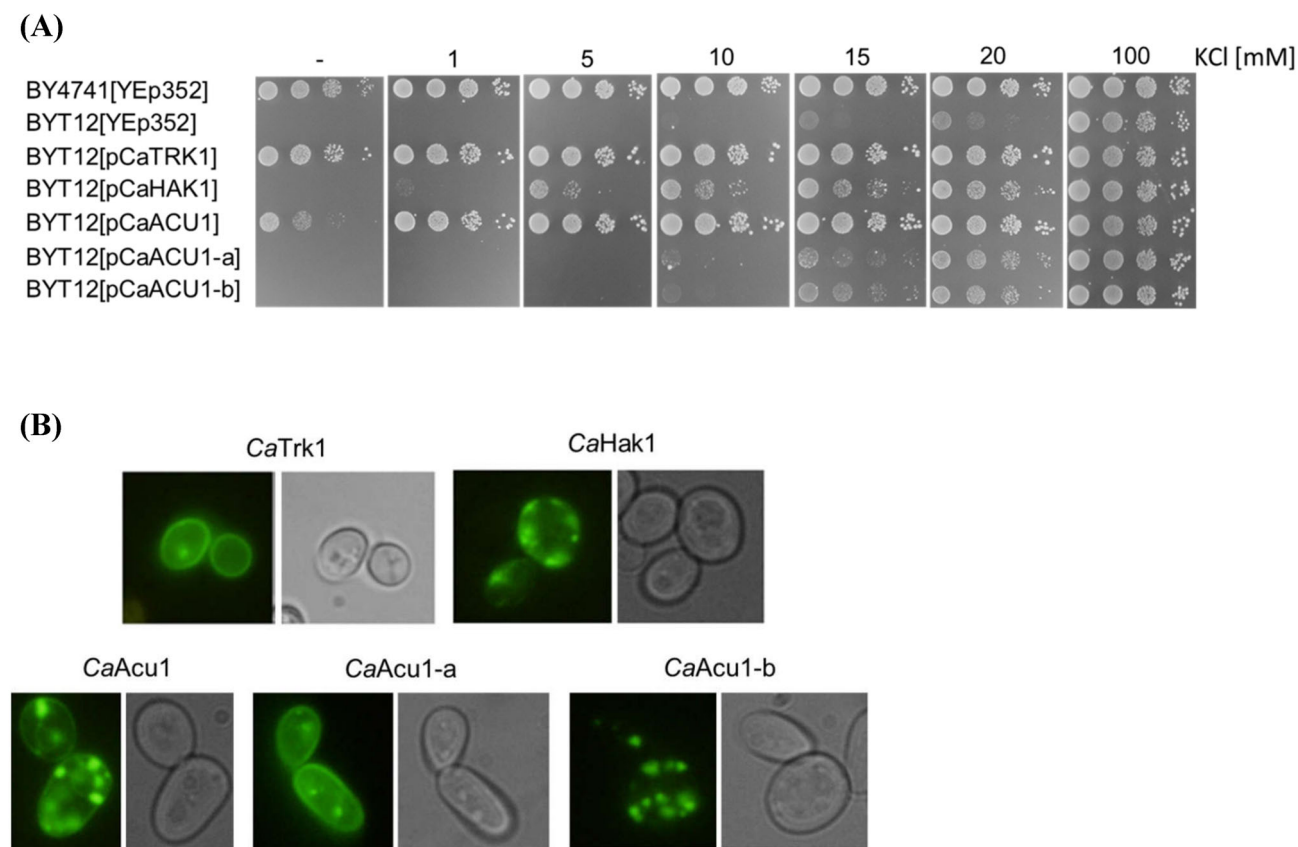


Figure 2. All three *C. albicans* putative transporters improve the growth of *S. cerevisiae* BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) cells at low potassium concentrations. (A) The growth of *S. cerevisiae* BYT12 transformed with plasmids as indicated on a series of YNB-F plates supplemented with KCl as indicated (-, no extra KCl added, 15 μ M concentration of K^+ in the medium). BY4741 transformed with an empty vector served as a positive control, BYT12 transformed with the empty vector as a negative control, respectively. The pictures were taken on the third day of incubation at 30°C. The experiment was repeated three times and a representative result is shown. (B) Localization of *C. albicans* proteins C-terminally tagged with GFP in exponentially growing *S. cerevisiae* BYT12 cells.

ATPase enabled the cells to grow on 15 μ M KCl, although the growth was slower than with cells expressing CaTrk1 or with the positive control BY4741. On the other hand, the presence of CaHak1 improved the ability of BYT12 cells to grow at low potassium to a lesser extent. Cells expressing this symporter started to grow if the potassium concentration was at least 5 mM (Fig. 2A). GFP-tagging of the C-termini of *C. albicans* transporters (a series of plasmids with the GFP sequence; Table 1) did not change the ability of the three transporters to complement the phenotype of BYT12 cells at low potassium concentrations (not shown), but enabled the visualization of proteins under a fluorescence microscope (Fig. 1B). Surprisingly, only CaTrk1 molecules seemed to be localized predominantly to the plasma membrane of *S. cerevisiae* cells. The majority of CaHak1 and CaAcu1 proteins were stacked in granule-like compartments inside the cells, and only a small portion of the proteins reached the plasma membrane (Fig. 2B). This could result from improper folding of the synthesized protein and consequently in stacking of the protein along the secretory pathway. There could be two reasons for it: either protein misfolding as a consequence of the presence of CTG codons in the *C. albicans* ORFs, or the absence of specific chaperons required for the correct folding and delivery of the proteins to the plasma membrane.

Our analysis of the three *C. albicans* sequences revealed that all three ORFs contain several CTG codons (six in CaTRK1, five in CaHAK1 and two in CaACU1; Supplementary Table 2, Supporting Information). Nevertheless, the presence of these codons does

not affect CaTrk1, as it is localized to the plasma membrane and is as active as *S. cerevisiae* own Trk proteins (Fig. 2). The two CTG codons in CaAcu1 are localized to the N-terminus and in the long ATP-binding loop (but outside the ATP-binding domain), respectively, thus it is also improbable that they affect the localization or activity of CaAcu1 (Figs 1 and 2). We cannot exclude the possibility that the presence of five CTG codons in CaHAK1 affects the proper folding and thus the localization of the protein. On the other hand, our results showed that none of the CTG codons in the three transporters encode a seryl residue which would be crucial and indispensable for their activity as all three proteins are active in *S. cerevisiae*.

The inability of the majority of CaHak1 and CaAcu1 molecules to reach the plasma membrane of *S. cerevisiae* cells might instead be due to the absence of specific chaperons that would help the proper folding in the membrane of endoplasmic reticulum. These specific chaperons are very important for transporters with multiple transmembrane segments, as was shown e.g. for the Shr3 chaperon and amino-acid permeases in both *S. cerevisiae* and *C. albicans* (Ljungdahl et al. 1992; Martinez and Ljungdahl 2004), and we hypothesize that the absence of genes encoding Hak- and Acu-type transporters in the genome of *S. cerevisiae* is accompanied by the absence of corresponding specific chaperons for these transporters as well.

The results obtained for the complete Acu1 protein were surprising, as they show that even a small number of protein molecules in the plasma membrane (Fig. 2B) results in a very

good complementation of the BYT12 phenotype (Fig. 2A; 15 μ M KCl) and suggest that Acu1 ATPase might have a very high affinity for potassium.

Very interesting and surprising results were obtained when the two short fragments of the Acu1 ATPase were expressed in *S. cerevisiae*. We thought that these constructs would serve as negative controls for the expression of the complete Acu1, but as is evident in Fig. 2A, BYT12 cells expressing either Acu1-a or Acu1-b grew slightly better in the presence of 15 and 20 mM KCl than cells with the empty vector. This result suggested that they both somehow (probably as low-affinity transporters) contribute to the potassium influx under our experimental conditions. GFP-tagging of Acu1-a, the short N-terminal fragment of Acu1 (first 355 amino acids, 2 TMS and without ATP-binding site; Fig. 1C), revealed that it is localized predominantly to the plasma membrane of BYT12 cells (Fig. 2B). This corresponds to the well-known fact that the majority of yeast plasma-membrane transporters harbour the signal sequences for targeting to the plasma membrane in the first transmembrane segments. On the other hand, the 654 amino-acid-long Acu1-b (Fig. 1C) is localized predominantly inside the cells, though some molecules probably reach the plasma membrane, as is evident from the improved growth of BYT12 cells with CaAcu1-b at 15 and 20 mM KCl (Fig. 2A). The difference in the localization of the complete CaAcu1 and the CaAcu1-a protein (Fig. 2B) again suggests that the proper folding of the complete CaAcu1 at the level of the endoplasmic reticulum is affected, and it supports our hypothesis mentioned above on the absence of specific chaperons required for the folding and biogenesis of long membrane proteins.

Candida albicans potassium transporters support the growth of *S. cerevisiae* BYT12 cells at a broad range of external pH levels

The inability to grow at low external pH is one of the major phenotypes resulting from the deletion of TRK1 and TRK2 in *S. cerevisiae* cells (Navarette et al. 2010). When the ability of *C. albicans* transporters to provide enough potassium at various external pH (from 3.5 to 7.0) was tested, it revealed that all three transporters were active at these pH levels (Fig. 3). This was partly surprising for CaHak1 at pH 7, as it should use the inward gradient of protons created by the plasma-membrane H⁺-ATPase to import potassium against its concentration gradient in symport with protons. On the other hand, we know from our previous experiments with yeast cation/proton antiporters that these proteins are also partly functional when the external pH is kept close to neutral levels (Papoušková and Sychrova 2006; Krauke and Sychrova 2011). The observed activity of proton symporters or antiporters at external pH close to neutral levels most likely results from the use of protons continuously pumped out by the Pma1 ATPases. There are two things worth noting. First, the presence of CaAcu1-a and CaAcu1-b did not result in the growth of BYT12 cells at pH 3.5. They only supported growth at higher external pH, mainly CaAcu1-a at pH 7.0 (Fig. 3). And second, the higher external pH positively influenced the growth of BYT12 cells transformed with an empty vector. This shows the existence of an additional system transporting potassium which only operates at a higher external pH. This system is probably NSC1, a non-specific cationic channel whose presence and potassium-uptake activity at high external pH was shown by an electrophysiological approach (Bihler, Slayman and Bertl 1998; Bertl et al. 2003), but whose encoding sequence in the *S. cerevisiae* genome has not been identified yet.

Candida albicans Acu1 does not transport sodium when expressed in *S. cerevisiae* cells

The Acu1 ATPases in *U. maydis* and *P. sorbitophila* import both potassium and sodium cations into the cells (Benito et al. 2004). On the other hand, our results suggest that CaAcu1 does not import sodium cations into *S. cerevisiae* cells. As shown in Fig. 4, the presence of CaAcu1 clearly improved the growth of BYT12 cells even in the presence of a mixture of KCl and an eight times higher concentration of NaCl (50 and 400 mM concentration, respectively). If CaAcu1 transported both cations, then the competition between the necessary potassium cations and toxic sodium cations would result in the inhibited growth of BYT12 cells expressing this ATPase. Further, we tested the ability of CaAcu1 to transport sodium cations upon its expression in *S. cerevisiae* BYT45 (*nha1 Δ ena1-5 Δ*) cells which are very sensitive to sodium influx (Navarette et al. 2010). As negative and positive controls, respectively, the empty YEp352 vector and YEp352-OsHKT1;3 (encoding rice Hkt1;3 sodium uptake system; Rosas-Santiago et al. 2015) were used. Figure 4B shows that the toxicity of imported sodium cations was visible only in cells expressing the plant OsHKT1;3 transporter. Cells expressing CaAcu1 grew similarly in the presence and absence of NaCl. This result confirmed that sodium is not a substrate of CaAcu1.

CaAcu1 prevents better the *S. cerevisiae* cells from lithium toxicity than CaTrk1

Some very efficient and high-affinity potassium uptake systems are able to increase the tolerance of yeast cells to toxic cations of lithium. Lithium is thought to enter yeast cells following its concentration gradient via non-specific transport systems in a membrane-potential-dependent manner (Arino, Ramos and Sychrova 2010). If a highly efficient potassium-specific uptake system operates in the presence of increased concentrations of lithium, then even relatively low external concentrations of potassium and its uptake via these efficient systems are enough to diminish the influx of lithium and thus increase the tolerance of cells to the toxic cations. An example of such an ability was recently shown for the efficient Trk1 system from the osmotolerant yeast *Z. rouxii*. Expression of this system in BYT12 rendered the cells tolerant to extremely high concentrations of lithium, and it even improved the lithium tolerance of *S. cerevisiae* wild types (Zimmermannová et al. 2015). To verify whether the three different *C. albicans* potassium transporters are able to increase the tolerance of *S. cerevisiae* BYT12 cells to lithium, we tested the growth of the corresponding transformants on classic YNB medium (containing ~15 mM potassium) to which we added various concentrations of LiCl and in some cases also 150 mM KCl. In this experiment, as a positive control, we used BYT12 cells expressing ZrTrk1 under the same conditions as *C. albicans* transporters, i.e. from the YEp352 plasmid and the NHA1 promoter (Zimmermannová et al. 2015). As shown in Fig. 5, it was CaAcu1 that improved the tolerance of BYT12 cells to lithium significantly more than CaTrk1. CaTrk1 only improved the tolerance to lithium if extra KCl was added together with LiCl (Fig. 5; cf. 800 mM LiCl versus 800 mM LiCl + 150 mM KCl), and CaHak1 had no effect on lithium tolerance (Fig. 5). This result again suggested that CaAcu1 is a highly efficient high-affinity potassium uptake system.

As was mentioned above, the three putative potassium uptake systems that are encoded in *C. albicans* genome differ in their protein structure and transport mechanism. It is worth noting that all three *C. albicans* potassium transporters also

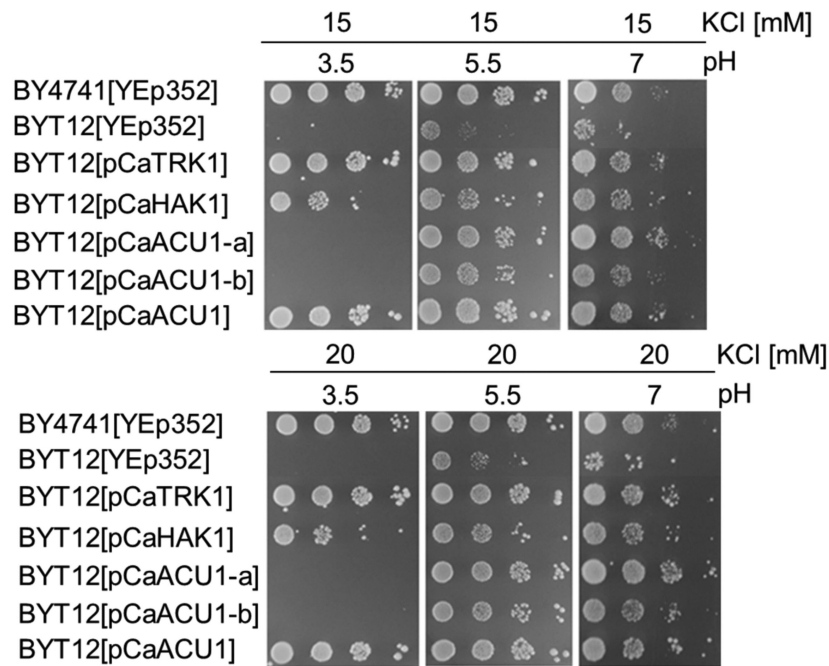


Figure 3. *Candida albicans* potassium uptake systems are in *S. cerevisiae* cells functional over a broad range of external pH. Growth comparison of BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) and BY4741 (positive control) cells transformed as indicated on YNB-F plates supplemented with KCl as indicated and buffered to indicated pH values. The pictures were taken on the third day of incubation at 30°C. The experiment was repeated three times and a representative result is shown.

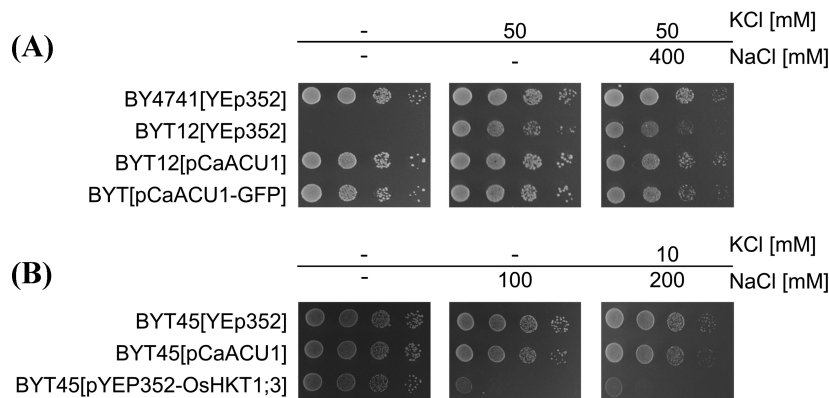


Figure 4. *Candida albicans* Acu1 does not affect the tolerance of *S. cerevisiae* cells to sodium cations. (A) Growth comparison of BYT12 (*trk1Δ trk2Δ*) and BY4741 (positive control) cells transformed as indicated on YNB-F plates supplemented with KCl and/or NaCl as indicated. (B) Growth comparison of BYT45 (*nha1Δ ena1-5Δ*) transformed as indicated on YNB-F plates supplemented with KCl and/or NaCl as indicated. The pictures were taken on the second day of incubation at 30°C. The experiment was repeated three times and a representative result is shown.

differ from mammalian potassium uptake systems. The co-existence of transporters with differing mechanisms, a uniport driven by the membrane potential (Trk1) and a symport of cations with protons (Hak1), may not only be advantageous for acquiring the necessary potassium under various growth conditions inside the host, but also for the efficient regulation of *C. albicans* membrane potential and its intracellular pH, which is tightly connected to the activity of yeast potassium importers and exporters (Kinclova-Zimmermannova, Gaskova and Sychrova 2006; Navarette et al. 2010; Kahm et al. 2012; Arino et al. 2014; Kahm and Kschischo 2016). In the future, it would be interesting to estimate and compare the levels of expression of *CaTRK1* and *CaHAK1* and their changes under various growth conditions and also in various morphology states. A prerequisite for the rapid growth of *C. albicans* hyphae and pseudohyphae is the establishment of high turgor enabling the expansion of the cell wall and plasma membrane. This turgor is achieved mainly

by the intracellular accumulation of high potassium concentrations in yeast cells (Rodríguez-Navarro 2000).

We showed in this study that the difference in the protein structure of the three *C. albicans* transporters affects their biogenesis and whole-cell level of activity in *S. cerevisiae*. Nevertheless, our results proved that all three are able to provide *S. cerevisiae* with the necessary levels of potassium to support cell growth and division.

A surprising phenotype was observed with the reconstituted full version of Acu1 ATPase. In contrast to the other two known Acu1 ATPases (Benito et al. 2004), it probably does not transport sodium (Fig. 4). The fact that just the few molecules which reached the plasma membrane (Fig. 2B) were sufficient to support the growth of BYT12 cells to almost the wild-type level (Fig. 2A) and to significantly increase cell tolerance to lithium (Fig. 5), together with the fact that we have found only damaged ACU1 ORFs in the genomes of the mostly studied *C. albicans* and

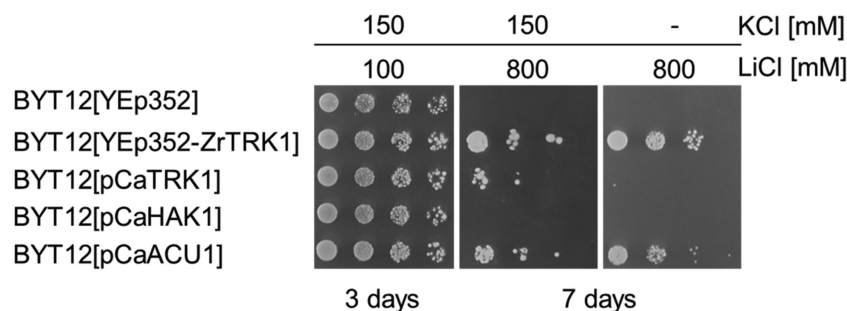


Figure 5. *Candida albicans* Trk1 and Acu1 improve the tolerance of *S. cerevisiae* cells to toxic lithium cations. Growth comparison of BYT12 (*trk1*Δ *trk2*Δ) cells transformed as indicated on YNB media supplemented with KCl and/or LiCl as indicated. The pictures were taken on the third or seventh day of incubation at 30°C. The experiment was repeated three times and a representative result is shown.

C. dubliniensis strains, raises the question of whether the complete *ACU1* might influence the fitness or the virulence of the strain. Unfortunately, no information about the strain nature, virulence level and their original niche is available for *C. albicans* strains with apparently unbroken *ACU1* which we identified in the contigs at NCBI database. The ability to use ATP directly for the accumulation of potassium might be an advantage when the proton gradient across the plasma membrane and/or the membrane potential are not high enough to provide necessary potassium, but on the other hand, having an extremely efficient ATPase for potassium uptake may become counter productive if it brings too much potassium and the cell has to spend extra energy to get rid of surplus potassium and maintain the appropriate level of membrane potential and pH homeostasis. Only the reconstitution of the complete *ACU1* ORF in *C. albicans* SC5314 followed by a detailed characterization of the resulting phenotypes may help to answer the question of whether a functional *Acu1* ATPase might be an advantage for the survival of *C. albicans* cells within the host, or whether it is a disadvantage reflected in the damaged loci found in the SC5314 and WO-1 *C. albicans* and *C. dubliniensis* strains.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at FEMSYR online.

ACKNOWLEDGEMENTS

Olga Zimmermannova and Vicent Llopis-Torregrosa are acknowledged for the critical reading of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Czech National Science Foundation [GA CR 302/12/1151 and 16-03398S] and the European Commission Framework 7 Programme [MC-ITN-2013-606786 ImResFun].

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Arino J, Aydar E, Drulhe S et al. Systems biology of monovalent cation homeostasis in yeast: the translucent contribution. *Adv Microb Physiol* 2014;**64**:1–63.
- Arino J, Ramos J, Sychrova H. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol R* 2010;**74**:95–120.
- Baev D, Rivetta A, Vylkova S et al. The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *J Biol Chem* 2004;**279**:55060–72.
- Benito B, Garcia-deblas B, Schreier P et al. Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot Cell* 2004;**3**:359–68.
- Bertl A, Ramos J, Ludwig J et al. Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* 2003;**47**:767–80.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1998;**432**:59–64.
- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 2009;**459**:657–62.
- Byrne KP, Wolfe KH. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* 2005;**15**:1456–61.
- Cao Y, Jin X, Huang H et al. Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature* 2011;**471**:336–40.
- Cyert MS, Philpott CC. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2013;**193**:677–713.
- Diskowski M, Mikusevic V, Stock C et al. Functional diversity of the superfamily of K⁺ transporters to meet various requirements. *Biol Chem* 2015;**396**:1003–14.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J et al. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**:W389–4.
- Durell SR, Guy HR. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys J* 1999;**77**:789–807.
- Durell SR, Hao Y, Nakamura T et al. Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. *Biophys J* 1999;**77**:775–88.
- Enjalbert B, Moran GP, Vaughan C et al. Genome-wide gene expression profiling and a forward genetic screen show that differential expression of the sodium ion transporter *Ena21* contributes to the differential tolerance of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to osmotic stress. *Mol Microbiol* 2009;**72**:216–28.
- Gelis S, Gonzalez-Fernandez R, Herrera R et al. A physiological, biochemical and proteomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *trk1,2* transport mutants grown under limiting potassium conditions. *Microbiology* 2015;**161**:1260–70.
- Hermann P, Forgacs K, Gal E et al. Effects of alkali metal ions on some virulence traits of *Candida albicans*. *Folia Microbiol* 2003;**48**:173–6.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ et al. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 1986;**2**:163–7.

- Hušeková B, Elicharová H, Sychrová H. Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Can J Microbiol* 2016;**62**, DOI: 10.1139/cjm-2015-0766.
- Inglis DO, Arnaud MB, Binkley J et al. The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multi-species search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:D667–74.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y et al. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:W5–9.
- Jones T, Federspiel NA, Chibana H et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *P Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:7329–34.
- Kahm M, Kschischo M. Mathematical modelling of cation transport and regulation in yeast. *Adv Exp Med Biol* 2016;**892**: 291–305.
- Kahm M, Navarrete C, Llopis-Torregrosa V et al. Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis revealed by mathematical modeling. *PLoS Comput Biol* 2012;**8**:e1002548.
- Kinclova O, Ramos J, Potier S et al. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* 2001;**40**:656–68.
- Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, Sychrova H. Na⁺,K⁺/H⁺-antiporter Nha1 influences plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2006;**6**:792–800.
- Kinclova-Zimmermannova O, Sychrova H. Plasma-membrane Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter regulates potassium homeostasis in *Candida albicans*. *Microbiology* 2007;**153**:2603–12.
- Krauke Y, Sychrova H. Functional comparison of plasma-membrane Na⁺/H⁺ antiporters from two pathogenic *Candida* species. *BMC Microbiol* 2008;**8**:80.
- Krauke Y, Sychrova H. Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Curr Microbiol* 2010;**61**:335–9.
- Krauke Y, Sychrova H. Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter and Ena1 Na⁺-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2011;**11**:29–41.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;**305**:567–80.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 5th edn. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier, 2010.
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;**157**:105–32.
- Levin EJ, Zhou M. Recent progress on the structure and function of the TrkH/KtrB ion channel. *Curr Opin Struct Biol* 2014;**27**: 95–101.
- Linding R, Jensen LJ, Diella F et al. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 2003a;**11**: 1453–9.
- Linding R, Russell RB, Neduva V et al. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* 2003b;**31**:3701–8.
- Ljungdahl PO, Gimeno CJ, Styles CA et al. SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* 1992;**71**:463–78.
- Llopis-Torregrosa V, Hušeková B, Sychrová H. Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. *PLoS One* 2016;**11**:e0153374.
- Maguire SL, OhEigeartaigh SS, Byrne KP et al. Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Mol Biol Evol* 2013;**30**:1281–91.
- Martinez JL, Sychrova H, Ramos J. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hanseii*. *Fungal Genet Biol* 2011;**48**:177–84.
- Martinez P, Ljungdahl PO. An ER packaging chaperone determines the amino acid uptake capacity and virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 2004;**51**:371–84.
- Miranda M, Bashi E, Vylkova S et al. Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2009;**9**: 278–92.
- Motaung TE, Albertyn J, Pohl CH et al. *Candida albicans* mutant construction and characterization of selected virulence determinants. *J Microbiol Meth* 2015;**115**:153–65.
- Navarette C, Petrezselyova S, Barretto L et al. Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance both in potassium sufficient and limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 2010;**10**:508–17.
- Papouskova M, Sychrova H. *Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H⁺ antiporters with different functions in cell physiology. *FEBS Lett* 2006;**580**:1971–6.
- Pardo JP, Gonzalez-Andrade M, Allen K et al. A structural model for facultative anion channels in an oligomeric membrane protein: the yeast TRK (K⁺) system. *Pflug Arch* 2015;**467**: 2447–60.
- Petrezselyova S, Ramos J, Sychrova H. Trk2 transporter is a relevant player in K⁺ supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* 2011;**56**: 23–8.
- Petrezselyova S, Zahradka J, Sychrova H. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* 2010;**114**:144–50.
- Prista C, Gonzalez-Hernandez JC, Ramos J et al. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hanseii*. *Microbiology* 2007;**153**:3034–43.
- Ramos J, Arino J, Sychrova H. Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 2011;**317**:1–8.
- Rodriguez-Navarro A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1469**:1–30.
- Rosas-Santiago P, Lagunas-Gómez D, Barkla BJ et al. Identification of rice Cornichon as a possible cargo receptor for the sodium transporter OshKT1;3. *J Exp Bot* 2015;**66**:2733–48.
- Sato Y, Nanatani K, Hamamoto S et al. Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K⁺ transport of a Kup/HAK/KT-type *Escherichia coli* potassium transporter. *J Biochem* 2014;**155**: 315–23.
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J et al. “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1987;**169**:189–97.
- Stribny J, Kinclova-Zimmermannova O, Sychrova H. Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant nonconventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2012;**58**:255–64.
- Vieira-Pires RS, Szollosi A, Morais-Cabral JH. The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* 2013;**496**:323–8.
- Watanabe H, Azuma M, Igarashi K et al. Relationship between cell morphology and intracellular potassium concentration in *Candida albicans*. *J Antibiot* 2006;**59**:281–7.
- Zimmermannová O, Salzar A, Sychrova H et al. The *Zygosaccharomyces rouxii* Trk1 is an efficient potassium transporter providing yeast cells with high lithium tolerance. *FEMS Yeast Res* 2015;**15**, DOI: 10.1093/femsyr/fov029.

4.5 Autorský podíl

1. Elicharová, H. and H. Sychrová (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Medical Mycology*, 51: 785-794.

Podíl autorky disertační práce na této publikaci: **70 %**

Autorka se podílela na této publikaci vypracováním veškerých experimentů, zpracováním výsledků a přispěla k tvorbě textu.

2. Elicharová, H. and H. Sychrová (2014). Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*. *Microbiology*, 160: 1705-1713.

Podíl autorky disertační práce na této publikaci: **70 %**

Autorka se podílela na této publikaci vypracováním veškerých experimentů, zpracováním výsledků a přispěla k tvorbě textu.

3. Hušeková, B., H. Elicharová and H. Sychrová (2016). Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 394-401.

Podíl autorky disertační práce na této publikaci: **30 %**

Autorka se podílela na této publikaci vypracováním analýzy vedoucí k nalezení ortologů importérů K^+ v genomech devíti druhů *Candida* a přispěla k tvorbě textu.

4. Elicharová, H., B. Hušeková and H. Sychrová (2016). Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow039

Podíl autorky disertační práce na této publikaci: **40 %**

Autorka se podílela na této publikaci vypracováním predikcí topologie, strukturovanosti a sekundární struktury proteinů, identifikací konzervovaných a funkčních regionů, analýzou lokusu *CaACU1* a přispěla k tvorbě textu.

RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

5. Závěry a diskuze

Výsledky předkládané práce představené v předchozích kapitolách nově odhalují souvislost mezi homeostází kationtů alkalických kovů a rezistencí patogenních druhů kvasinek rodu *Candida* k flukonazolu a popisují možný mechanismus této interakce. Dále rozšiřují poznatky o toleranci kandid k solím a o úloze, kterou v toleranci k solím zastávají exportéry kationtů alkalických kovů u druhu *C. glabrata*. V neposlední řadě nově popisují růst kandid na limitně nízké koncentraci draselných kationtů a charakterizují transportéry, které zodpovídají za import K^+ . Závěry, které zcela naplňují cíle disertační práce, je možné shrnout do dvou částí, z nichž první přinesla sedm významných výsledků:

- Charakterizovali jsme toleranci k solím u šesti druhů kandid, zcela nově pro druhy *C. krusei* a *C. tropicalis*, kdy tyto dva druhy vykazují překvapivou citlivost (*C. krusei*) či naopak rezistenci (*C. tropicalis*) k toxickým Li^+ . Námi pozorovaná tolerance ostatních druhů kandid k solím i jejich rezistence k flukonazolu (FLC) pak byla v souladu s dříve publikovanými pracemi. V předkládané práci byla tolerance k solím pro těchto šest druhů kandid prvně porovnána za stejných experimentálních podmínek.
- Popsali jsme účinky společného působení solí a flukonazolu na růst patogenních kvasinek, kdy kombinace FLC + sůl (obě látky v subinhibičních koncentracích) silně tlumí růst všech testovaných druhů kandid. Síla tohoto účinku se u jednotlivých druhů liší. Inkubace v přítomnosti subinhibiční koncentrací FLC a NaCl zvyšuje vnitrobuněčný obsah Na^+ u všech studovaných druhů.
- K měření relativního membránového potenciálu buněk kandid jsme optimalizovali metodu vyvinutou pro *S. cerevisiae* používající fluorescenční sondu diS-C₃(3) a prvně ji úspěšně použili pro stanovení a porovnání relativního membránového potenciálu různých druhů kandid.
- Odhalili jsme mechanismus, jakým FLC pravděpodobně snižuje toleranci kandid k solím. Prokázali jsme, že inkubace s FLC vede ke zvýšení membránového potenciálu u všech studovaných druhů kandid, a tím i ke zvýšenému vstupu kationtů alkalických kovů do buňky.
- Ověřili jsme a rozšířili znalosti o funkci dvou hlavních exportérů kationtů alkalických kovů u druhu *C. glabrata*. Charakterizace nově zkonstruovaného dvojitého mutantu postrádajícího gen *CgCNH1* a *CgENA1* ukázala, že

antiportní systém *CgCnh1* hraje dominantní úlohu v homeostázi K^+ , avšak zároveň se podílí na exportu toxických Na^+ a že ATPáza *CgEna1* zodpovídá za detoxifikaci buňky od toxických Na^+ i nadbytečných K^+ .

- Delece genu *CgENA1* vedla ke zvýšení membránového potenciálu buněk *C. glabrata* a tím i k prohloubení citlivosti k solím, kdy se k neschopnosti exportovat nadbytečné kationty přidává zvýšený vstup kationtů v důsledku hyperpolarizace plasmatické membrány.
- Stejně jako ostatní druhy kandid je i *C. glabrata* v přítomnosti subinhibiční koncentrace FLC hyperpolarizována, což zvyšuje její citlivost ke kationtům alkalických kovů i dalším kladně nabitým látkám s antimykotickým účinkem.

Hlavním výsledkem této části předkládané práce je zjištění, že flukonazol způsobuje zvýšení membránového potenciálu kandid bez ohledu na jejich rezistenci k této látce, což má za následek zvýšení nespecifického vstupu látek nesoucí kladný náboj do buňky. Flukonazol má tedy potenciál synergně působit s potenciálními antimykotiky kationtové povahy.

Zjištění, že flukonazol ovlivňuje membránový potenciál a tedy vstup kationtů do buněk kandid, nás vedlo ke studiu transportérů, které za specifický import hlavního kationtu alkalických kovů - K^+ zodpovídají. Hlavní výsledky této části práce jsou:

- V genomech devíti patogenních druhů kandid jsme na základě sekvenční podobnosti identifikovali 17 předpokládaných importérů K^+ a zjistili, že počet genů pro importéry K^+ se u jednotlivých druhů kandid liší.
- Předpověděli jsme topologii jednotlivých typů transportérů s využitím dostupných znalostí o topologii či struktuře jejich bakteriálních homologů a rozkryli stavbu pseudogenu *ACU1* u *C. albicans*.
- Porovnali jsme růst jednotlivých druhů kandid na limitně nízké koncentraci K^+ . Nedostatek K^+ nejlépe tolerují *C. albicans* a *C. krusei* a nejhůře *C. glabrata*.
- Zjistili jsme, že limitní koncentrace K^+ vedou ke změnám v morfogenezi, kdy tyto podmínky inhibují produkci hyf a pseudohyf, a to zejména u druhů *C. krusei* a *C. tropicalis*.
- Pomocí heterologní exprese v kmeni *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ*, který postrádá vlastní draselné importéry, jsme prokázali, že produkty všech tří genů kódujících možné importéry K^+ z *C. albicans*, jsou schopny zajistit dostatek

K^+ pro růst buněk *S. cerevisiae*. Míra zastoupení jednotlivých transportérů v plasmatické membráně se výrazně liší.

Výsledky předkládané disertační práce slouží jako východisko pro další výzkum zaměřený na kvasinkové transportéry importující draselné kationty s důrazem na systém Trk. Prvně bychom chtěli pokračovat v charakterizaci růstu jednotlivých druhů patogenních i nekonvenčních druhů kvasinek na limitně nízké koncentraci K^+ a porovnat transportéry Trk patřící různým druhům kvasinek v podmínkách heterologní exprese v kmeni *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ*. Dále bychom chtěli s využitím veřejně dostupných genomových projektů porovnat sekvence genů kódujících transportéry K^+ u různých kmenů jednotlivých druhů kandid lišících se např. původem či rezistencí k antimykotikům, a tím popsat stabilitu/flexibilitu cílových genů. Konečně identifikace funkčních částí systému Trk za využití náhodné mutagenese, dostupné krystalové struktury bakteriálního homologu Trk a bioinformatické studie zmíněné výše, by měla pomoci lépe porozumět transportnímu mechanismu a regulaci tohoto klíčového transportéru.

6. Zkratky

5-FU	5-fluorouracil
aa	aminokyselina (amino acid)
ATP	adenosintrifosfát
CYP	cytochrom P450
DDD	definovaná denní dávka
diS-C ₃ (3)	3,3'-dipropylthiokarbocyanin jodid
FLC	flukonazol
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GUT	Gastrointestinally induced transition
Mb	1 000 000 párů bází (Megabase pairs)
MPM	Membrane-Pore-Membrane
SÚKL	Státní úřad pro kontrolu léčiv
TMD	transmembránová doména
WGD	Whole Genome Duplication

7. Použitá literatura

- Anderson, H. W. (1917). Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *The Journal of Infectious Disease*, 21:341–354.
- Arendrup, M. C. (2013). *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Danish Medical Journal*, 60:B4698.
- Arino, J., Ramos, J., and Sychrova, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74:95–120.
- Ashford, B. K. (1928). Certain conditions of the gastro-intestinal tract in Porto Rico and their relation to tropical sprue. *American Journal of Tropical Medicine*, 8:507–538.
- Asner, S. A., Giulieri, S., Diezi, M., Marchetti, O., and Sanglard, D. (2015). Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:7715–7722.
- Azanza, J. R., Sadada, B., and Reis, J. (2015). Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence. *Revista Espanola de Quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 28:275–281.
- Baev, D., Rivetta, A., Li, X. S., Vylkova, S., Bashi, E., Slayman, C. L., and Edgerton, M. (2003). Killing of *Candida albicans* by human salivary histatin 5 is modulated, but not determined, by the potassium channel TOK1. *Infection and Immunity*, 71:3251–3260.
- Banuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J., and Rodriguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *The EMBO Journal*, 14:3021–3027.
- Banuelos, M. A., Madrid, R., and Rodriguez-Navarro, A. (2000). Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Molecular Microbiology*, 37:671–679.
- Banuelos, 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*, 144:2749–2758.

- Barnett, J. A. (2008). A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. *Yeast*, 25:689–731.
- 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.
- Benito, B., Garciadeblas, B., Schreier, P., and Rodriguez-Navarro, A. (2004). Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryotic Cell*, 3:359–368.
- Benito, B., Moreno, E., and Lagunas, R. (1991). Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1063:265–268.
- Bennett, R. J. (2015). The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 28:10–17.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Wheeler, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33:34–38.
- Berman, J. (2016). Ploidy plasticity: a rapid and reversible strategy for adaptation to stress. *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow020.
- Bolotin-Fukuhara, M. and Fairhead, C. (2014). *Candida glabrata*: a deadly companion? *Yeast*, 31:279–288.
- Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A., and Sychrova, H. (2014). Potassium uptake system Trk2 is crucial for yeast cell viability during anhydrobiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 350:28–33.
- Brandt, M. E. and Lockhart, S. R. (2012). Recent taxonomic developments with and other opportunistic yeasts. *Current Fungal Infection Reports*, 6:170–177.
- Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S., and Rao, R. (2005). The yeast endosomal Na⁺K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular Biology of The Cell*, 16:1396–13405.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., and et al. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459:657–662.

- Byrne, K. P. and Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research*, 15:1456–1461.
- C. P. Kurtzman, Jack W. Fell, T. B., editor (2011). *The Yeasts a Taxonomic Study*. Elsevier, London, 5 edition.
- Cagnac, O., Aranda-Sicilia, M. N., Leterrier, M., Rodriguez-Rosales, M. P., and Venema, K. (2010). Vacuolar cation/H⁺ antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 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⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:24284–24293.
- Cao, Y., Jin, X., Huang, H., Derebe, M. G., Levin, E. J., Kabaleeswaran, V., Pan, Y., Punta, M., Love, J., and et al. (2011). Crystal structure of a potassium ion transporter TrkH. *Nature*, 471:336–340.
- Chai, L. Y., Denning, D. W., and Warn, P. (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 36:282–298.
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., and et al. (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40:700–705.
- Coates, A. R., Halls, G., and Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 163:184–194.
- Coleman, D. C., Moran, G. P., McManus, B. A., and Sullivan, D. J. (2010). Mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Future Microbiology*, 5:935–949.
- Csank, C. and Haynes, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters*, 189:115–120.
- Daran-Lapujade, P., Daran, J. M., Luttkik, M. A., Almering, M. J., Pronk, J. T., and Kotter, P. (2009). An atypical *PMR2* locus is responsible for hypersensitivity to sodium and lithium cations in the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. *FEMS Yeast Research*, 9:789–792.

- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14:1471–1510.
- Denksteinova, B., Gaskova, D., Herman, P., Vecer, J., Malinsky, J., Plasek, J., and Sigler, K. (1997). Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C₃(3) fluorescence. *Folia Microbiologica*, 42:221–224.
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362:1142–1151.
- Develoux, M. (2001). Griseofulvin. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 128:1317–1325.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., and Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43:389–394.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neueglise, C., and et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430:35–44.
- 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⁺ channel. *Biophysical Journal*, 77:789–807.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32:1792–1797.
- Enjalbert, B., Moran, G. P., Vaughan, C., Yeomans, T., Maccallum, D. M., Quinn, J., Coleman, D. C., Brown, A. J., and Sullivan, D. J. (2009). Genome-wide gene expression profiling and a forward genetic screen show that differential expression of the sodium ion transporter Ena21 contributes to the differential tolerance of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to osmotic stress. *Molecular Microbiology*, 72:216–228.
- Favel, A., Michel-Nguyen, A., Peyron, F., Martin, C., Thomachot, L., Datry, A., Bouchara, J. P., Challier, S., Noel, T., Chastin, C., and Regli, P. (2003). Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47:331–339.
- Fera, M. T., La Camera, E., and De Sarro, A. (2009). New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7:981–998.

- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., and et al. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44:279–285.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8:917–929.
- Gabaldon, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., Arnaise, S., Boisnard, S., Aguilera, G., and et al. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*, 14:623.
- 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*. *Molecular and Cellular Biology*, 8:2848–2859.
- Gaur, M., Choudhury, D., and Prasad, R. (2005). Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast *Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 9:3–15.
- Gaur, M., Puri, N., Manoharlal, R., Rai, V., Mukhopadhyay, G., Choudhury, D., and Prasad, R. (2008). MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*, 9:579.
- Gbelska, Y., Krijger, J. J., and Breunig, K. D. (2006). Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. *FEMS Yeast Research*, 6:345–355.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425:737–741.
- Goncalves, L. M., Del Bel Cury, A. A., Sartoratto, A., Garcia Rehder, V. L., and Silva, W. J. (2012). Effects of undecylenic acid released from denture liner on *Candida* biofilms. *Journal of Dental Research*, 91:985–989.
- Goncalves, S. S., Souza, A. C., Chowdhary, A., Meis, J. F., and Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*, doi: 10.1111/myc.12469.
- Gow, N. A. R. (2013). A developmental program for *Candida* commensalism. *Nature Genetics*, 45:967–968.

- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:5–10.
- Havlickova, B., Czaika, V. A., and Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51:2–15.
- Herrera, R., Alvarez, M. C., Gelis, S., and Ramos, J. (2013). Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and vacuolar mutants. *The Biochemical Journal*, 454:525–532.
- Higgs, J. (1973). Muco-cutaneous candidiasis: historical aspects. *Transactions of the St. John's Hospital Dermatological Society*, 59:175–194.
- Hittinger, C. T., Rokas, A., Bai, F. Y., Boekhout, T., Goncalves, P., Jeffries, T. W., Kominek, J., Lachance, M. A., Libkind, D., Rosa, C. A., Sampaio, J. P., and Kurtzman, C. P. (2015). Genomics and the making of yeast biodiversity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35:100–109.
- Inglis, D. O., Arnaud, M. B., Binkley, J., Shah, P., Skrzypek, M. S., Wymore, F., Binkley, G., Miyasato, S. R., Simison, M., and Sherlock, G. (2012). The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Research*, 40:667–674.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36:5–9.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., and et al. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:7329–7334.
- Jurčová, F. (2015). *Epidemiologie kandidémií ve FN Brno, laboratorní identifikace kvasinek*. bakalářská práce, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita.
- 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⁺/H⁺ antiporters (Nha1p). *Journal of Biochemistry*, 131:821–831.
- Kane, P. M. (2016). Proton transport and pH control in fungi. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 892:33–68.

- Kane, P. M. and Smardon, A. M. (2003). Assembly and regulation of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35:313–321.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One*, 6:16015.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., and Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, 8:378–384.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Baldwin, B. C., Corran, A. J., and Kelly, D. E. (1997a). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:9986–9988.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., and Einsele, H. (1997b). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Letters*, 400:80–82.
- Kinclova, O., Potier, S., and Sychrova, H. (2001a). The *Candida albicans* Na⁺/H⁺ antiporter exports potassium and rubidium. *FEBS Letters*, 504:11–15.
- Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S., and Sychrova, H. (2001b). Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Molecular Microbiology*, 40:656–668.
- Ko, C. H., Buckley, A. M., and Gaber, R. F. (1990). TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 125:305–312.
- Kolaczowska, A. and Kolaczowski, M. (2016). Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71:1438–1450.
- Kolecka, A., Krauke, Y., Bujdakova, H., and Sychrova, H. (2009). Subinhibitory concentrations of fluconazole increase the intracellular sodium content in both fluconazole-resistant and -sensitive *Candida albicans* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 55:605–610.
- Krauke, Y. and Sychrova, H. (2008). Functional comparison of plasma-membrane Na⁺/H⁺ antiporters from two pathogenic *Candida* species. *BMC Microbiology*, 8:80.

- Krauke, Y. and Sychrova, H. (2010). Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Current Microbiology*, 61:335–339.
- Krauke, Y. and Sychrova, H. (2011). Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter and Ena1 Na⁺-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 11:29–41.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305:567–580.
- Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C. L., and Rivetta, A. (2004). Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *The Journal of Membrane Biology*, 198:177–192.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157:105–132.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., and et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947–2948.
- Leem, S. H., Park, J. E., Kim, I. S., Chae, J. Y., Sugino, A., and Sunwoo, Y. (2003). The possible mechanism of action of ciclopirox olamine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*, 15:55–61.
- Lemke, A., Kiderlen, A. F., and Kayser, O. (2005). Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68:151–162.
- Levin, E. J. and Zhou, M. (2014). Recent progress on the structure and function of the TrkH/KtrB ion channel. *Current Opinion in Structural Biology*, 27:95–101.
- Lincová, D. (2007). *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, Praha, 2 edition.
- Linding, R., Jensen, L. J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T. J., and Russell, R. B. (2003a). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*, 11:1453–1459.
- Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V., and Gibson, T. J. (2003b). GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Research*, 31:3701–3708.
- Llopis-Torregrosa, V., Husekova, B., and Sychrova, H. (2016). Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. *PloS One*, 11:0153374.

- Loukin, S. H. and Saimi, Y. (2002). Carboxyl tail prevents yeast K⁺ channel closure: proposal of an integrated model of TOK1 gating. *Biophysical Journal*, 82:781–792.
- MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De Deken, X., Raymond, M., and Turcotte, B. (2005). *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:1745–1752.
- Maguire, S. L., OhEigeartaigh, S. S., Byrne, K. P., Schroder, M. S., O’Gaora, P., Wolfe, K. H., and Butler, G. (2013). Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Molecular Biology and Evolution*, 30:1281–1291.
- Marcet-Houben, M. and Gabaldon, T. (2015). Beyond the Whole-Genome Duplication: phylogenetic Evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker’s yeast lineage. *PLoS Biology*, 13:1002220.
- Maresova, L. and Sychrova, H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Molecular Microbiology*, 55:588–600.
- 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 Research*, 6:1039–1046.
- Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W., Borgers, M., Ramaekers, F., Odds, F., and Bossche, H. (1999). Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*, 145:2701–2713.
- Marichal, P., Vanden Bossche, H., Odds, F., Nobels, G., Warnock, D., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S., and Mose-Larsen, P. (1997). Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41:2229–2237.
- Marr, K. A. and Boeckh, M. (2000). Prophylaxis against fungal infections and cytomegalovirus disease after bone marrow transplantation - The Wilkin/Feinberg article reviewed. *Oncology-New York*, 14:1712.
- Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G., Kelly, D. E., and Kelly, S. L. (2010). A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14alpha-demethylase) and *ERG5*

- (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:3578–3583.
- Martinac, B., Saimi, Y., and Kung, C. (2008). Ion channels in microbes. *Physiological Reviews*, 88:1449–1490.
- Martinez, P. and Persson, B. L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 258:628–638.
- Martinez-Munoz, G. A. and Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:20309–20319.
- Mayer, F. L., Wilson, D., and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4:119–128.
- McLain, N., Ascanio, R., Baker, C., Strohaber, R. A., and Dolan, J. W. (2000). Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:2873–2875.
- Miceli, M. H., Diaz, J. A., and Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet. Infectious Diseases*, 11:142–151.
- 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.
- Miranda, M., Bashi, E., Vylkova, S., Edgerton, M., Slayman, C., and Rivetta, A. (2009). Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 9:278–292.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144–148.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., and Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: implications for its antiporter activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1720:125–136.
- Moran, G. P., Sanglard, D., Donnelly, S. M., Shanley, D. B., Sullivan, D. J., and Coleman, D. C. (1998). Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:1819–1830.

- Nass, R., Cunningham, K. W., and Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H^+ -ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:26145–26152.
- Negri, M., Silva, S., Henriques, M., and Oliveira, R. (2012). Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology*, 31:1399–1412.
- Nielsen, J., Larsson, C., van Maris, A., and Pronk, J. (2013). Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 24:398–404.
- Niewerth, M., Kunze, D., Seibold, M., Schaller, M., Korting, H. C., and Hube, B. (2003). Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:1805–1817.
- Noel, T. (2012). The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. *Journal de Mycologie Medicale*, 22:173–178.
- Nosek, J., Dinouel, N., Kovac, L., and Fukuhara, H. (1995). Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Molecular & General Genetics: MGG*, 247:61–72.
- Odds, F. C., Brown, A. J., and Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11:272–279.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., and Kanazawa, H. (2005). Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na^+/H^+ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712:185–196.
- Orozco, A. S., Higginbotham, L. M., Hitchcock, C. A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., and Filler, S. G. (1998). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:2645–2649.
- Oura, M., Sternberg, T. H., and Wright, E. T. (1955). A new antifungal antibiotic, amphotericin B. *Antibiotics Annual*, 3:566–573.
- Palige, K., Linde, J., Martin, R., Battcher, B., Citiulo, F., Sullivan, D. J., Weber, J., Staib, C., Rupp, S., and et al. (2013). Global transcriptome sequencing

- identifies chlamyospore specific markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *PLoS One*, 8:61940.
- Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., and Bliss, J. M. (2013). *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32:206–216.
- Pande, K., Chen, C., and Noble, S. M. (2013). Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nature Genetics*, 45:1088–1091.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., and Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens*, 9:1003550.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K., Calandra, T. F., Edwards, J. E., Filler, S. G., Fisher, J. F., Kullberg, B. J., and et al., O.-Z. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48:503–535.
- Pardo, J. P., Gonzalez-Andrade, M., Allen, K., Kuroda, T., Slayman, C. L., and Rivetta, A. (2015). A structural model for facultative anion channels in an oligomeric membrane protein: the yeast TRK (K⁺) system. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 467:2447–2460.
- Perez-Torrado, R., Llopis, S., Jespersen, L., Fernandez-Espinar, T., and Querol, A. (2012). Clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates cannot cross the epithelial barrier *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*, 157:59–64.
- Perlin, D. S. (2011). Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiology*, 6:441–457.
- Petrezselyova, S., Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2013). Vhc1, a novel transporter belonging to the family of electroneutral cation-Cl⁻ co-transporters, participates in the regulation of cation content and morphology of *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828:623–631.
- Petrezselyova, S., Ramos, J., and Sychrova, H. (2011). Trk2 transporter is a relevant player in K⁺ supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 56:23–28.

- Peyton, L. R., Gallagher, S., and Hashemzadeh, M. (2015). Triazole antifungals: a review. *Drugs of Today*, 51:705–718.
- Pfaller, M. A., Andes, D. R., Diekema, D. J., Horn, D. L., Reboli, A. C., Rotstein, C., Franks, B., and Azie, N. E. (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PloS One*, 9:101510.
- Pfaller, M. A. and Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20:133–163.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W., and Ling, T. A. (2010). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:1366–1377.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Mendez, M., Kibbler, C., Erzsebet, P., Chang, S. C., Gibbs, D. L., and Newell, V. A. (2006). *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:3551–3556.
- Pinjon, E., Moran, G. P., Jackson, C. J., Kelly, S. L., Sanglard, D., Coleman, D. C., and Sullivan, D. J. (2003). Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:2424–2437.
- Prasad, R., Shah, A. H., and Rawal, M. K. (2016). Antifungals: mechanism of action and drug resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 892:327–349.
- Prista, C., Gonzalez-Hernandez, J. C., Ramos, J., and Loureiro-Dias, M. C. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 153:3034–3043.
- Quindos, G. (2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. a changing face. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 31:42–48.
- Quindos, G., Sanchez-Vargas, L. O., Villar-Vidal, M., Eraso, E., Alkorta, M., and Hernandez-Almaraz, J. L. (2008). Activities of fluconazole and voriconazole

- against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31:266–271.
- Ramos, J., Arino, J., and Sychrova, H. (2011). Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiology Letters*, 317:1–8.
- Rodrigues, C. F., Silva, S., and Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology*, 33:673–688.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469:1–30.
- Ruhnke, M. (2006). Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Current Drug Targets*, 7:495–504.
- Sanglard, D., Coste, A., and Ferrari, S. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research*, 9:1029–1050.
- Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P. A., and Bille, J. (1999). The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:2753–2765.
- Sanglard, D. and Odds, F. C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2:73–85.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., and Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58:2–13.
- Sato, Y., Nanatani, K., Hamamoto, S., Shimizu, M., Takahashi, M., Tabuchi-Kobayashi, M., Mizutani, A., Schroeder, J. I., Souma, S., and Uozumi, N. (2014). Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K⁺ transport of a Kup/HAK/KT-type *Escherichia coli* potassium transporter. *Journal of Biochemistry*, 155:315–323.
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J. L. (2003). Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast

- and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic Cell*, 2:1053–1060.
- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2006). Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*, 313:367–370.
- Serra-Cardona, A., Petrezselyova, S., Canadell, D., Ramos, J., and Arino, J. (2014). Coregulated expression of the Na⁺/phosphate Pho89 transporter and Ena1 Na⁺-ATPase allows their functional coupling under high-pH stress. *Molecular and Cellular Biology*, 34:4420–4435.
- Serrano, R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters*, 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⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*, 319:689–693.
- Sillitoe, I., Lewis, T. E., Cuff, A., Das, S., Ashford, P., Dawson, N. L., Furnham, N., Laskowski, R. A., Lee, D., and et al., L. (2015). CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 43:376–381.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., and Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36:288–305.
- Silver, P. M., Oliver, B. G., and White, T. C. (2004). Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryotic Cell*, 3:1391–1397.
- Soong, T. W., Yong, T. F., Ramanan, N., and Wang, Y. (2000). The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na⁺ and H⁺ transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiology*, 146:1035–1044.
- Staib, P. and Morschhauser, J. (2007). Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50:1–12.
- Sullivan, D. J., Moran, G. P., and Coleman, D. C. (2005). *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiology Letters*, 253:9–17.

- Sullivan, D. J., Moran, G. P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C., and Coleman, D. C. (2004). Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 4:369–376.
- Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. E., and Coleman, D. C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141:1507–1521.
- Supply, P., Wach, A., and Goffeau, A. (1993). Enzymatic properties of the *PMA2* plasma membrane-bound H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:19753–19759.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H. (2016). Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7:377.
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., and Odds, F. C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:284–292.
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., and Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic Cell*, 10:1173–1182.
- Tortorano, A. M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., and Grillot, R. (2006). Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27:359–366.
- Trofa, D., Gacser, A., and Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21:606–625.
- Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T., and Chiller, T. (2016). The global burden of fungal diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30:1–11.
- van Asbeck, E. C., Clemons, K. V., and Stevens, D. A. (2009). *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, 35:283–309.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Berges, T., Hennequin, C., Chabasse, D., and Bouchara, J. P. (2007). Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:982–990.

- Vermes, A., Guchelaar, H. J., and Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46:171–179.
- Vieira-Pires, R. S., Szollosi, A., and Morais-Cabral, J. H. (2013). The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature*, 496:323–328.
- Watanabe, H., Azuma, M., Igarashi, K., and Ooshima, H. (2006). Relationship between cell morphology and intracellular potassium concentration in *Candida albicans*. *The Journal of Antibiotics*, 59:281–287.
- 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⁺ pump in the yeast plasma membrane. *The EMBO Journal*, 14:3870–3882.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., and Woolsey, J. (2006). Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*, 34:668–672.
- Wolfe, K. H. and Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387:708–713.
- Xiao, H., Shao, Z., Jiang, Y., Dole, S., and Zhao, H. (2014). Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production. *Microbial Cell Factories*, 13:121.
- Yadav, J. S., Bezawada, J., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2012). *Candida krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. *Canadian Journal of Microbiology*, 58:937–952.
- Yanagida, M. (2002). The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biology*, 3:1–4.
- Yenush, L. (2016). Potassium and sodium transport in yeast. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 892:187–228.
- Young, L. Y., Hull, C. M., and Heitman, J. (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin b in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:2717–2724.
- Zager, R. A. (2000). Polyene antibiotics: relative degrees of *in vitro* cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of The National Kidney Foundation*, 36:238–249.

Zahradka, J. and Sychrova, H. (2012). Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Research*, 12:439–446.