

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie



Mgr. Hana Elicharová

Homeostáze kationtů alkalických kovů patogenních kvasinek rodu *Candida*

Autoreferát disertační práce

Školitelka: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Praha, 2016

**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)

**Interní obhajoba ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i.
proběhla 6. 10. 2016**

Obsah

1	Abstrakt	3
2	Úvod a cíle práce	4
3	Použité metody	6
4	Výsledky	7
4.1	Publikace č. 1 - Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of <i>Candida</i> cells	7
4.2	Publikace č. 2 - Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of <i>Candida glabrata</i>	8
4.3	Publikace č. 3 - Pathogenic <i>Candida</i> species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations	10
4.4	Publikace č. 4 - Three <i>Candida albicans</i> potassium uptake systems differ in their ability to provide <i>Saccharomyces cerevisiae trk1trk2</i> mutants with necessary potassium	11
5	Závěr	13
6	Použitá literatura	16
7	Curriculum vitae	18
8	Seznam publikací, prezentací výsledků a absolvovaných kurzů	19

1. Abstrakt

Kvasinky rodu *Candida* jsou oportunní patogeny schopné vyvolat závažné systémové infekce u imunokompromitovaných pacientů. Virulence jednotlivých druhů kandidid 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 kandidid.

V rámci této práce jsme popsali souvislost mezi tolerancí k solím a rezistencí k flukonazolu u šesti druhů kandidid a možný mechanismus této interakce. Flukonazol hyperpolarizuje plasmatickou membránu buněk kandidid a zvyšuje tak nespecifický vstup kationtů alkalických kovů do buňky, čímž výrazně narůstá citlivost kandidid k solím těchto kationtů. Popsaný mechanismus má obecnou platnost, neboť flukonazol zvyšuje senzitivitu kandidid 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 kandidid. 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 kandidid na limitně nízké koncentraci K^+ . Zaznamenali jsme inhibici růstu všech šesti druhů kandidid, 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*.

2. 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

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
- Měření relativního membránového potenciálu

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, Muscle)
- Hledání ortologů kvasinkových importérů K^+ (Blast NCBI, *Candida* Genome Database, *Saccharomyces* Genome Database, GenBank)
- Analýza syntenie (Yeast Gene Order Browser, *Candida* Gene Order Browser)
- Vyhledávání konzervovaných úseků a konzervovaných funkčních domén (Protein Families Database, CATH Database)
- Predikce topologie (TMHMM 2.0., KD plot)
- Predikce sekundární struktury pomocí souboru algoritmů JPred4
- Predikce strukturovanosti proteinu (DisEMBL, Globplot)

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.

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

Eličarová, H. and H. Sychrová (2013), *Medical Mycology*, 51: 785-794.

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 citlivostí 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). Inkubace buněk všech testovaných druhů kandid v přítomnosti subinhibiční koncentrace FLC vedla k nárůstu membránového potenciálu, což znamená i zvýšení nespecifického 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.

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

Elicharová, H. and H. Sychrová (2014), *Microbiology*, 160: 1705-1713.

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 zřetelně snižuje toleranci k NaCl na rozdíl od absence *CgCnh1*, jež toleranci k NaCl neovlivňuje.

Měření membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy diS-C₃(3) 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 mutanta) 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.

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

Hušeková, B., H. Elicharová and H. Sychrová (2016), *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 394-401.

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 (Ramos et al., 2011). 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.

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

Elicharová, H., B. Hušeková and H. Sychrová (2016), *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow039

Výsledky Publikace č. 3 odhalily nestejně 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 něž 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.

5. Závěr

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 mutanta 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 nescifického 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. Použitá literatura

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

7. Curriculum vitae

Hana Elicharová

★ 4. 9. 1984

Oddělení membránového transportu

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

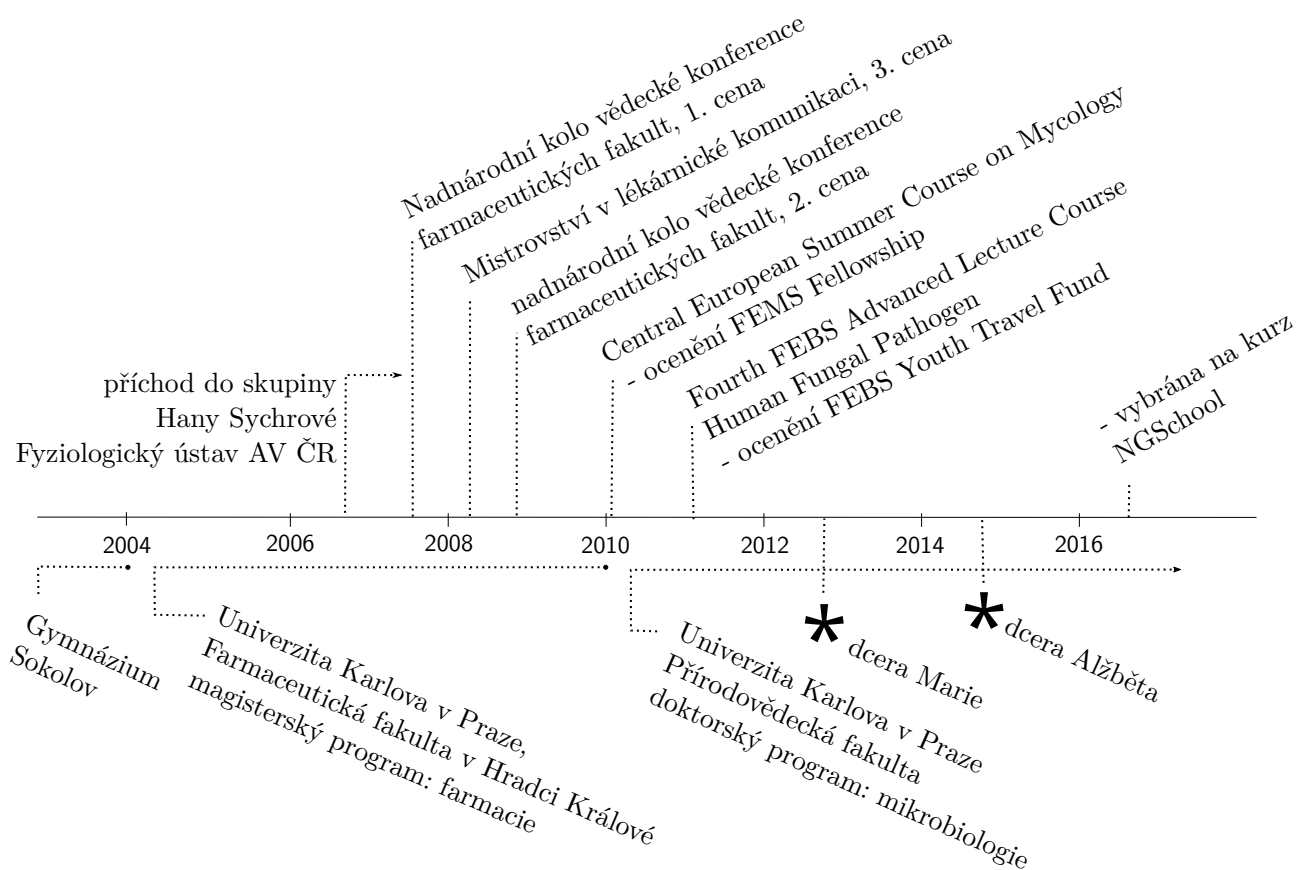
Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

elicharova@biomed.cas.cz

+420 241 062 120

+420 724 677 392



8. Seznam publikací, prezentací výsledků a absolvovaných kurzů

Publikace

1. **Eličarová, H.** and H. Sychrová (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Medical Mycology*, 51: 785-794.
2. **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.
3. Hušeková, B., **H. Eličarová** 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. **Eličarová, 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

Prezentace výsledků

prezentující autor označen *

1. PhD Student Workshop, March 15. -17. 2011, Třešť, CR
H. Eličarová* and H. Sychrová
ústní prezentace: Alkali-metal-cation homeostasis and resistance to azoles in *Candida* yeast species
2. 39th Annual Conference on Yeasts, 3.-6. 5. 2011, Smolenice, Slovakia
H. Eličarová* and H. Sychrová
poster: Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance and resistance toazole antimycotics
3. Fourth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, 7.-13. 5. 2011, La Colle, France
H. Eličarová* and H. Sychrová

- poster: Relation between alkali-metal-cation homeostasis and resistance to azoles in *Candida* species
4. Czech-Spanish Workshop Yeast Physiology, 19.-20. 9. 2011 Prague, CR
H. Elicharová* and H. Sychrová
ústní prezentace: Relation between alkali-metal-cation homeostasis and resistance to azoles in *Candida* species
 5. FinSysB Conference, 10.-14.10 2012, Acquafredda di Maratea, Italy
H. Elicharová* and H. Sychrová
poster: Alkali-metal-cation homeostasis of *Candida* species is affected by subinhibitory concentrations of azoles
 6. 11th ASM conference on *Candida* and Candidiasis, 28.3.-2.4. 2012, San Francisco, USA
H. Elicharová* and H. Sychrová
postery: a) Fluconazole treatment hyperpolarizes plasma membrane of *Candida* species b) Role of alkali-metal-cation exporters in salt and fluconazole tolerance of *Candida glabrata* cells
 7. SMYTE 13, 31st Small Meeting on Yeast Transport and Energetics 24.- 28. 9. 2013, Antalya, Turkey
H. Elicharová and H. Sychrová*
ústní prezentace: Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* species
 8. ISSY Cell Surface & Organelles in Yeasts, 18.- 22. 6. 2013, Stará Lesná, Slovakia
B. Hušková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport Systems for Uptake of K⁺ in *Candida* Species
 9. 4th CESC 2014 Central European Summer Course on Mycology, 4.-11. 7. 2014, Szeged, Hungary
B. Hušková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport systems for potassium uptake in *Candida* species
 10. XIV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků 2014, 13. - 16. 5 2014, Milovy, CR

H. Elicharová* and H. Sychrová

ústní prezentace: K⁺ importující transportéry kvasinek rodu *Candida*

11. 41st Annual Conference on Yeasts, 20.-23. 5. 2014, Smolenice, Slovakia
B. Hušeková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport systems for potassium uptake in *Candida albicans*
12. Sixth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, 16.-22. 5. 2015, La Colle, France
B. Hušeková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport system for potassium uptake in *Candida albicans*
13. SMYTE 15, 33rd Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, 21.-24. 6 2015, Lisbon, Portugal
B. Hušeková, **H. Elicharová**, V. Llopis-Torregrosa and H. Sychrová* ústní prezentace: Potassium transporters in *Candida* species
14. Next Generation Sequencing School, 14.-21. 8. 2016, Dolný Smokovec, Slovakia
H. Elicharová*, B. Hušeková and H. Sychrová
ústní prezentace: *Candida albicans* uptake systems as novel targets for antifungal drug discovery
15. 3rd Prague Summer School Advances in Drug Discovery, 5.-8. 9. 2016, Prague, CR 2016
H. Elicharová*, B. Hušeková and H. Sychrová
poster: *Candida albicans* uptake systems as novel targets for antifungal drug discovery

Absolvované kurzy

1. Central European Summer Course on Mycology, Szeged HU, 2010
2. Advances in Molecular Biology and Genetics, Prague CR, 2011
3. Computational Genomics, Prague CR, 2011
4. Fourth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, La Colle FR, 2011

5. Modern Problems of NMR Spectroscopy, Pec p. Sněžkou CR, 2011
6. Advances in Microbiology, Prague CR, 2014
7. Next Generation Sequencing School, Dolný Smokovec SVK, 2016
8. 3rd Prague Summer School Advances in Drug Discovery, Prague CR, 2016

Charles University in Prague

Faculty of Science

Ph.D. study program: Microbiology



Mgr. Hana Elicharová

Alkali-metal-cation homeostasis in pathogenic *Candida* species

Summary of the Ph.D. thesis

Supervisor: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Institute of Physiology CAS

Prague, 2016

The thesis is based on research results obtained at the Department of Membrane Transport, Institute of Physiology CAS in 2010–2016.

Work on this thesis and publications were supported by:

- MŠMT: LC531 Centre on molecular biology and physiology of yeast communities. (2004–2011)
- GA ČR: GAP302/12/1151 Intracellular pH and alkali-metal-cation homeostasis in *Candida* virulence and pathogenicity (2013–2015)
- EU FP7: PITN-GA-2013-606786 ImResFun Molecular Mechanisms of Human Fungal Pathogen Host Interaction (2013–2017)
- GA ČR: 16-03398S Transporters in pathogenic *Candida* yeast species as potential target of new antifungals. (2016–2018)

**Internal defense of this thesis took place
at the Institute of Physiology CAS on October 06, 2016.**

Contents

1	Abstract	3
2	Introduction and aims of the thesis	4
3	Methods	6
4	Results	7
4.1	Publication No 1 - Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of <i>Candida</i> cells	7
4.2	Publication No 2 - Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of <i>Candida glabrata</i>	8
4.3	Publication No 3 - Pathogenic <i>Candida</i> species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations	10
4.4	Publication No 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	11
5	Conclusions	13
6	References	16
7	Curriculum Vitae	18
8	Publications, presentations and attended courses	19

1. 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 trk1Δtrk2Δ* strain lacking its own K⁺-importers. All three *in silico* *C. albicans* K⁺-importers are able to provide *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ* 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*.

2. Introduction and aims of the thesis

About twenty percent of 1,400 previously described human pathogens belong to the kingdom *Fungi*, making it the second largest group after the bacteria. It also includes several dozen *Candida* species, which are opportunistic pathogens capable of causing severe systemic infections (candidemia) in strongly immunocompromised patients, with the mortality reaching tens of percent (Pfaller et al., 2014).

Virulence of single *Candida* species depends among others on their resistance to various stresses. Maintenance of alkali-metal-cation homeostasis, which means on one hand the accumulation of a sufficient amount of potassium cations and on the other dealing with high extracellular concentration of all alkali-metal cations, is important e.g. for morphogenesis or adherence of *C. albicans* cells (Watanabe et al., 2006).

Another equally important factor is the resistance of various *Candida* species to antifungals. In this thesis, we focused on resistance to fluconazole (FLC), which is due to its excellent pharmacokinetic parameters the drug of choice in the therapy and prophylaxis of candidaemia and its massive introduction in eighties of 20th century resulting in increasing incidence of FLC-resistant *Candida* species. (Pappas et al., 2009).

This thesis builds on previously published results of our group, which characterized salt-tolerance of several pathogenic *Candida* species and described the effect of fluconazole on tolerance to NaCl in both, FLC-sensitive and FLC-resistant *C. albicans* strains (Krauke and Sychrova, 2008; Kolecka et al., 2009; Krauke and Sychrova, 2010). Therefore, the first aims of this thesis were determined as follows:

- Characterization of tolerance to salts of various alkali-metal cations and of resistance to fluconazole of pathogenic *Candida* species
- Observation of FLC effect on salt-tolerance of *Candida* species and evaluation of results in term of the FLC resistance and salt tolerance of various species
- Elucidation of interaction mechanisms between FLC and salt tolerance thus between FLC and alkali-metal-cation homeostasis

The first results showed that FLC affects alkali-metal-cation homeostasis at the level of cations uptake into the cell. The sufficient K⁺-supply of *Candida* cells belongs to the important factors for growth and thus infection development where

Candida cells have to cope with relative K⁺-insufficiency in plasma or on mucoses of the host.

Therefore, we set following aims to characterize importers that are responsible for the K⁺-supply of *Candida* cells. Previously described types of yeast K⁺-importers have no homologues in the human genome (Benito et al., 2004; Ramos et al., 2011) and thus they may serve as targets for new antifungals. The aims of the second part of the thesis are:

- Identification of genes for putative K⁺-importers in sequenced *Candida* genomes and their classification and topology prediction employing bioinformatic tools
- Growth characterization of various *Candida* species on limiting K⁺-concentration upon various conditions
- Characterization of selected K⁺-importers upon heterologous expression in the *S. cerevisiae* strain lacking its own K⁺-importers

3. Methods

Microbiological methods

- Cell cultivation and storage of yeasts and bacteria
- Estimation of growth rate and characterization of growth phenotypes upon various stress conditions
- Estimation of the number and dry weight of yeast cells
- Microscopy

Biochemical methods

- Estimation of intracellular Na⁺-content and measurement of Na⁺-export in yeast cells by atomic absorption spectrophotometry
- Measurement of relative membrane potential

Bioinformatic methods

- Data collection and analysis using scripts in Perl and BioPerl
- Alignment of DNA- and protein- sequences (ClustalX, Muscle)
- Identification of K⁺-importers in yeast genomes (Blast NCBI, *Candida* Genome Database, *Saccharomyces* Genome Database, GenBank)
- Synteny analysis (Yeast Gene Order Browser, *Candida* Gene Order Browser)
- Identification of conserved regions and domains (Protein Families Database, CATH Database)
- Topology prediction (TMHMM 2.0., KD plot)
- Prediction of protein secondary structure by JPred4 algorithm collection
- Disorder prediction (DisEMBL, Globplot)

4. Results

Obtained results of this thesis are summarized in four publications, which together create a comprehensive set of new insights in the alkali-metal-cation homeostasis of pathogenic *Candida* species in terms of its importance for their FLC-resistance and identification of potential targets for new antifungals.

4.1. Publication No 1 - Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells

Elicharová, H. and H. Sychrová (2013), *Medical Mycology*, 51: 785-794.

Various *Candida* species, which are the most common causing agents of systemic mycoses, differ in the virulence and resistance to various types of antifungals, but all of them have to constantly cope with the changing environment and different stress factors.

We focused on the ability of five pathogenic *Candida* species to maintain alkali-metal-cation homeostasis in the presence of FLC, which was shown to affect 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 (Kolecka et al., 2009). Further, *Candida* species differ in their salt tolerance (Krauke and Sychrova, 2008, 2010).

We newly described salt-tolerance of two clinically important species *C. krusei* and *C. tropicalis*. Both species are rather osmosensitive but surprisingly dramatically differ in their sensitivity to LiCl. *C. krusei* is more sensitive to this toxic salt than the most osmosensitive *C. dubliniensis*, whereas *C. tropicalis* that tolerates similarly high LiCl level as the most osmotolerant *C. parapsilosis*. Our results on salt-tolerance of other *Candida* species, including generally osmotolerant *C. albicans*, are consistent with previously published results (Krauke and Sychrova, 2008, 2010).

Consequently, we estimated subinhibitory concentrations of salts (NaCl, KCl) and FLC and performed set of growth experiments in the presence of combination of these concentrations of salts and FLC. Presence of subinhibitory concentration of FLC in combination with subinhibitory concentration of salt (NaCl or KCl) inhibits strongly growth of all tested *Candida* species i.e. the growth of both, FLC-sensitive (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) and FLC-resistant (*C. dubliniensis*,

C. krusei, *C. tropicalis*) species. The growth of all species is inhibited more in the presence of NaCl in combination with FLC than in FLC+KCl due to the Na⁺ toxicity. Cells of all tested species incubated with FLC accumulate higher amount of Na⁺ than the control cells incubated without FLC and this increased intracellular Na⁺-content results in growth inhibition of *Candida* cells.

The observed higher accumulation of alkali-metal cations may be caused either by an increased cations uptake into the cell, or by their impaired export. As we observed unchanged export capacity for Na⁺ in all tested *Candida* species, we focused on the cation uptake which depends on the plasma membrane potential.

We optimized and firstly used diS-C₃(3) assay to measure relative membrane potential in cells of various *Candida* species. Presence of subinhibitory concentration of FLC during incubation results in plasma-membrane hyperpolarization of all tested species and thereby in an increase of non-specific uptake of positively charged compounds including Na⁺ or K⁺. The effect of FLC on membrane potential was verified by a Hygromycin B sensitivity test as this cationic drug also enters the cells proportionally to the membrane potential. The sensitivity of all tested *Candida* species to Hygromycin B is significantly enhanced in the presence of subinhibitory FLC concentration.

Altogether, own results show the potential of FLC to increase the membrane-potential dependent influx of various compounds and thus enhance their antimycotic effect.

4.2. Publication No 2 - Fluconazole affects the alkali-metal-cation homeostasis and susceptibility to cationic toxic compounds of *Candida glabrata*

Elicharová, H. and H. Sychrová (2014), *Microbiology*, 160: 1705-1713.

Candida glabrata is more phylogenetically related, despite its name, to *Saccharomyces cerevisiae* than to the group of other *Candida* species. The prevalence of *C. glabrata* (now the second most common causative agent of systemic fungal infections) 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.

We studied the relationship between salt-tolerance and FLC-resistance in

C. glabrata cells similarly to other *Candida* species which were involved in Publication No 1. *C. glabrata* is relatively salt-tolerant and very FLC-resistant. We newly constructed a double mutant lacking both main alkali-metal-cation exporters (*CgEna1* ATPase and *CgCnh1* antiporter), which were partially characterized using single mutant strains (Krauke and Sychrova, 2011).

The deletion of only the *CNH1* gene decreases KCl tolerance but deletion of only the *ENA1* gene does not. The KCl tolerance is mostly impaired in double mutant *ena1Δcnh1Δ* strain. These results demonstrate the participation of the Ena1 ATPase in the efflux of surplus K⁺ in *C. glabrata* cells.

Then we focused on tolerance to NaCl. The wild-type and *cnh1Δ* strains tolerate NaCl much better than the other two strains that lack the *ENA1* gene, and the double mutant grows more poorly on NaCl than the single *ena1Δ* mutant. These findings suggest that although sodium cations are mainly exported by the Ena1 ATPase, they are also exported by the Cnh1 antiporter in *C. glabrata* cells.

Measurement of the membrane potential using fluorescent diS-C₃(3) probe showed that the absence of Ena1 ATPase leads to plasma-membrane hyperpolarization and thus to an increased uptake of cations into the cell, which together with the absence of Ena1 exporting function enhances the salt sensitivity of *C. glabrata* cells.

Further, we observed the effect of subinhibitory FLC concentrations on alkali-metal-cation homeostasis and mainly on membrane potential. The presence of FLC results in an increased sensitivity of *C. glabrata* cells to NaCl and KCl while this effect is enhanced by the absence alkali-metal cation exporters.

Decreased salt tolerance of *C. glabrata* cells in the presence of FLC is probably caused by a changed lipid composition of plasma membrane resulting in its hyperpolarization (by the similar way as in other *Candida* species, see Publication No 1). Interestingly, the hyperpolarization induced by FLC is stronger in strains lacking the Ena1 ATPase. This result seems to be *C. glabrata* specific as it was not observed in *S. cerevisiae* cells (Arino et al., 2010; Zahradka and Sychrova, 2012).

To verify that the FLC treatment really hyperpolarizes *C. glabrata* cells, especially both strains lacking the *ENA1* gene, we tested tolerance of this species to three cationic toxic compounds (tetramethylammonium, Hygromycin B and spermine), which enter yeast cells according to their plasma-membrane potential. Combining a very low concentration of any of the three drugs with the subinhibitory

concentration of FLC inhibits significantly the growth of all four *C. glabrata* strains. Moreover, Hygromycin B+FLC and spermine+FLC affect both strains lacking the *ENA1* gene more than the wild-type and *cnh1Δ* strains.

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.

4.3. Publication No 3 - Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations

Hušeková, B., H. Elicharová and H. Sychrová (2016), *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 394-401.

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.

So far, three types of efficient potassium-specific uptake systems, differing in their transport mechanism, have been identified in yeast species (Ramos et al., 2011). We determined orthologues of putative K⁺-importers in genomes of nine pathogenic *Candida* species. The number and type of putative potassium transporters significantly differ among them. The most ubiquitous are the Trk transporters. Genes encoding their putative homologues were found in all searched genomes and surprisingly, genomes of *C. glabrata* and *C. krusei* do not contain genes for other putative K⁺-importers. Genomes of species belonging to the CTG clade contain also a gene for the K⁺-H⁺ Hak symporter. Only *C. albicans* possesses (pseudo)gene for the Acu ATPase.

We compared growth of six *Candida* species on very low K⁺-concentration (15 μM) to observe if the different distribution of genes for K⁺-importers relates to their capacity of K⁺-accumulation. The most tolerant to the K⁺ limitation are *C. albicans* and *C. krusei*, on the other hand the most sensitive is *C. glabrata*.

Both, *C. glabrata* and *C. krusei* only possess genes for Trk system thus the direct relationship between tolerance to low K⁺-concentration and number of genes for K⁺-importers does not exist.

Growth of *Candida* species on low K⁺-concentration is partially affected by external pH. The growth of *C. parapsilosis* is inhibited at pH 3.5, whereas *C. glabrata* cells do not grow in the presence of low K⁺-concentration at alkaline pH. Also, the morphology of cells changes 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 potassium uptake systems may serve as a target for the development of new antifungal drugs.

4.4. Publication No 4 - Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium

Elicharová, H., B. Hušeková and H. Sychrová (2016), *FEMS Yeast Research*, doi: 10.1093/femsyr/fow039

Publication no. 3 shows the unequal representation of genes for K⁺-importers among *Candida* species, where only the genome of *C. albicans* possesses genes for all known types of yeast K⁺-importers.

We analyzed the topology, secondary structure and disorder level of putative *C. albicans* K⁺-importers. *CaTrk1* uniporter is the only one with predicted structure of its transmembrane part thanks to the structure determination of its bacterial homologue (Cao et al., 2011).

The most variable part of Trk importer consists of an large intracellular hydrophilic loop which builds almost a half of the whole protein and it is disordered with the exception of one short conserved motif. In general, such long loops lacking secondary structure are very rare in membrane proteins.

According to our prediction, the second K⁺-importer of *C. albicans* - *CaHak1* symporter consists of 12 transmembrane domains containing some highly conserved charged amino acids. Finally, *CaAcu1* ATPase is the third K⁺-importer of *C. albicans*. We found pseudogenes in two laboratory strains (SC5314 and WO-1). The original genes are divided in two open reading frames by a mutation

introducing the STOP-codon. The following analysis on *CaACU1* locus in genomes of 32 *C. albicans* strains showed that this interrupted version of the *CaACU1* gene is only present in one third of the strains. The other strains possess unbroken variant of the this gene.

We replaced the STOP-codon from the *CaACU1* pseudogene of the SC5314 strain by a Leu codon and expressed this complete *CaACU1*, and also *CaTRK1* and *CaHAK1* genes in the *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ* strain lacking its own K⁺-importers. We also enabled the localization of these importers by GFP-tagging. All three studied K⁺-importers improve the growth of *S. cerevisiae trk1Δtrk2Δ* strain on medium with low K⁺-concentration, thus all of them are able to supply sufficient amount of K⁺ for cell growth and proliferation.

These results should serve as the starting point for further study of K⁺-importers in terms of their cooperation, role in virulence and potential to serve as targets for new antifungals.

5. Conclusions

Results of this study presented in previous chapters reveal a new relationship between alkali-metal-cation homeostasis and fluconazole resistance in pathogenic *Candida* species and describe the possible mechanism of this interaction. Furthermore, we extended the characterization of salt tolerance of *Candida* species and role of alkali-metal-cation exporters in this parameter in *C. glabrata*. Finally, we newly described growth of *Candida* species on limiting K^+ -concentration and characterized transporters which are responsible for K^+ -accumulation in *C. albicans*. Obtained results show that the aims of this theses were achieved, and the main conclusions may be divide into two inter-connected parts. The first part involves:

- For first time, the salt tolerance and resistance to fluconazole of 6 *Candida* species were compared upon the same experimental conditions. For *C. krusei* and *C. tropicalis* it was the first characterization of their salt tolerance and it showed the surprising sensitivity of *C. krusei*, and resistance of *C. tropicalis* to toxic Li^+ .
- The growth of all tested *Candida* species is significantly inhibited in the presence of combination of FLC + salt (both in subinhibitory concentrations), independently of their FLC-resistance, while the level of inhibition is species specific.
- The various *Candida* species differ in their relative membrane potential, which was estimated for first time using the optimized diS-C₃(3) assay.
- Incubation with the subinhibitory concentrations of FLC results in a plasma-membrane hyperpolarization and thus in an increased uptake of alkali-metal cations and cationic drugs in cells of all studied *Candida* species.
- Characterization of a double mutant lacking both, *CgCNH1* and *CgENA1* genes showed that the *CgCnh1* antiporter plays dominant role in maintenance of K^+ -homeostasis and it also partly participates in export of toxic Na^+ , whereas the *CgEna1* ATPase is mainly responsible for detoxification of toxic Na^+ and surplus K^+ .
- Deletion of the *CgENA1* gene resulted in a plasma-membrane hyperpolarization of *C. glabrata* cells thus in a further decrease of their salt tolerance. This decrease in salt tolerance is caused by an additive effect of a lack of the

CgEna1 exporter in combination with an increased uptake of alkali-metal cations due to the plasma-membrane hyperpolarization.

The general conclusion of the first part of the thesis is, that fluconazole increases membrane potential of *Candida* species, independently of their FLC-resistance, this way it increases non-specific uptake of positively charged compounds into the cell, and thereby FLC enhances the effect of cationic antifungals.

In relation to the first part of the thesis, we further turned our attention to the importers responsible for the specific uptake of the main intracellular cation K^+ . Main conclusions of the second part are:

- The number and type of putative potassium transporters significantly differ among *Candida* species. 17 orthologues of three types of K^+ -importers were identified in genomes of nine *Candida* species.
- According to our predictions, the topology and structure of single types of K^+ -importers significantly differ. For the *Acu1* ATPase, the analysis revealed the existence of various pseudogenes or complete genes in genomes of 32 studied *C. albicans* strains.
- *Candida* species differ in the growth in conditions with extremely low K^+ -concentrations. *C. albicans* and *C. krusei* are the most tolerant to these conditions, whereas *C. glabrata* is the most sensitive.
- The morphology of *Candida* cells changes with the amount of potassium available. The production of pseudohyphae and hyphae is reduced in K^+ -limiting conditions.
- The products of all three genes encoding putative K^+ -importers in *C. albicans* provide sufficient amount of K^+ for growth and proliferation of an *S. cerevisiae* strain lacking its own K^+ -importers. This confirms that the three identified genes encode potassium uptake systems.

Obtained results serve as a starting point for further research focused on yeast K^+ -importers with the emphasis on Trk systems. First, we plan to extend growth characterization of various pathogenic and non-conventional yeast species on limiting K^+ -concentration and also to compare the activity of various Trk importers upon heterologous expression in *S. cerevisiae*. Then we plan to analyze genomes

of *Candida* species using the public Next-generation-sequencing data (approx. 400 whole-genome-sequence projects available) to chart the K⁺-uptake systems on the genetic level. Exploration of ploidy, homo-/heterozygosity and occurrence of sequential variances in various *Candida* strains differing in their origin, virulence or antifungal resistance should uncover the evolutionary conservation or flexibility of K⁺-uptake systems (especially in strains with acquired antifungal resistance). Finally, we would like to identify functional elements of the Trk system employing random mutagenesis in combination with results from bioinformatic analysis mentioned above. Altogether, these steps should improve the understanding of role of K⁺-uptake systems in K⁺-accumulation and homeostasis which are crucial not only for fitness and thus virulence of *Candida* cells, but belong to the key physiological parameters in all organisms.

6. References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

7. Curriculum Vitae

Hana Elicharová

★ 4. 9. 1984

Department of Membrane Transport

Institute of Physiology CAS

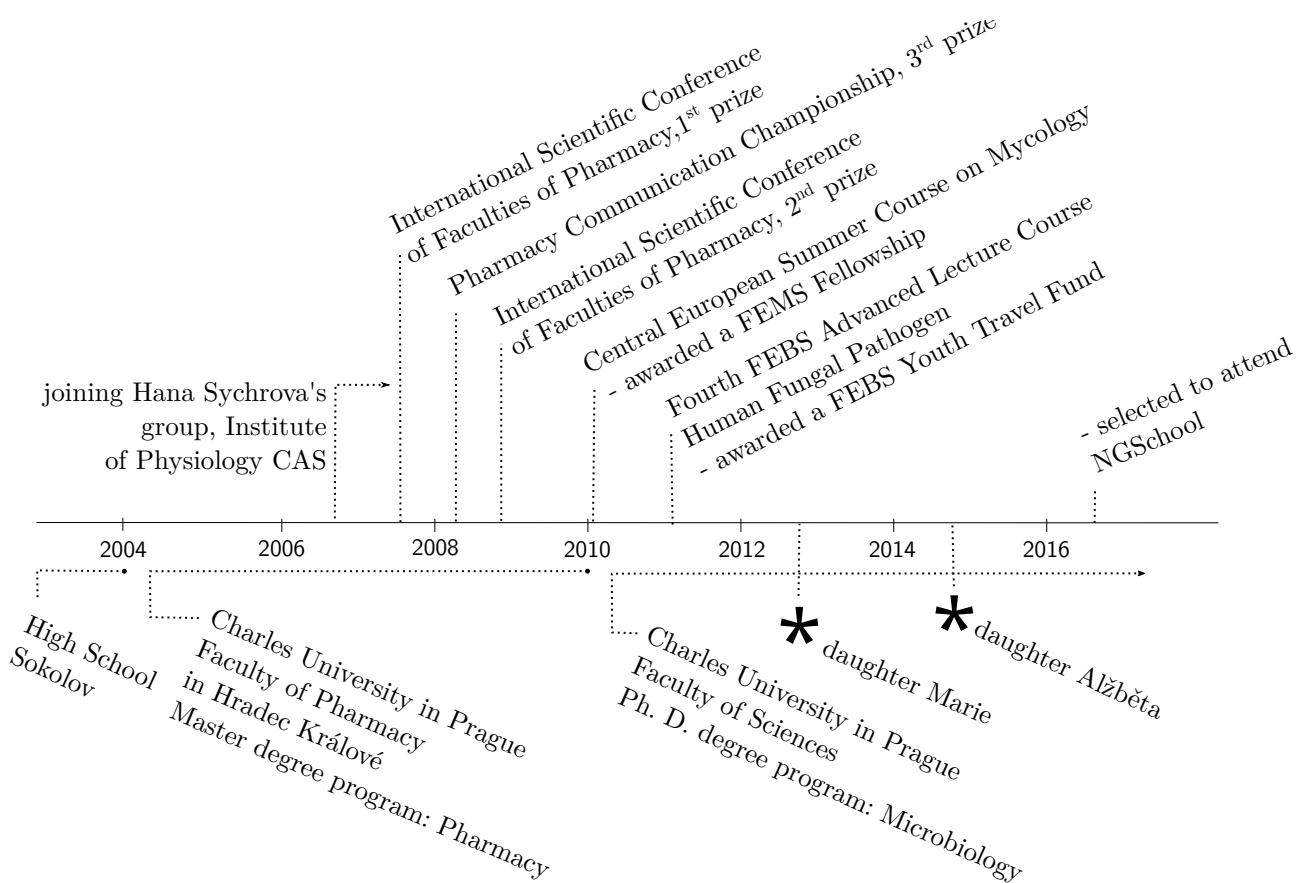
Vídeňská 1083

142 20 Prague 4

elicharova@biomed.cas.cz

+420 241 062 120

+420 724 677 392



8. Publications, presentations and attended courses

Publications

1. **Eličarová, H.** and H. Sychrová (2013). Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Medical Mycology*, 51: 785-794.
2. **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.
3. Hušeková, B., **H. Eličarová** 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. **Eličarová, 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

Result presentations

* presenting author

1. PhD Student Workshop, March 15. -17. 2011, Třešť, CR
H. Eličarová* and H. Sychrová
oral presentation: Alkali-metal-cation homeostasis and resistance to azoles in *Candida* yeast species
2. 39th Annual Conference on Yeasts, 3.-6. 5. 2011, Smolenice, Slovakia
H. Eličarová* and H. Sychrová
poster: Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance and resistance to azole antimycotics
3. Fourth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, 7.-13. 5. 2011, La Colle, France
H. Eličarová* and H. Sychrová
poster: Relation between alkali-metal-cation homeostasis and resistance to azoles in *Candida* species

4. Czech-Spanish Workshop Yeast Physiology, 19.-20. 9. 2011 Prague, CR
H. Elicharová* and H. Sychrová
oral presentation: Relation between alkali-metal-cation homeostasis and resistance to azoles in *Candida* species
5. FinSysB Conference, 10.-14.10 2012, Acquafredda di Maratea, Italy
H. Elicharová* and H. Sychrová
poster: Alkali-metal-cation homeostasis of *Candida* species is affected by subinhibitory concentrations of azoles
6. 11th ASM conference on *Candida* and Candidiasis, 28.3.-2.4. 2012, San Francisco, USA
H. Elicharová* and H. Sychrová
posters: a) Fluconazole treatment hyperpolarizes plasma membrane of *Candida* species b) Role of alkali-metal-cation exporters in salt and fluconazole tolerance of *Candida glabrata* cells
7. SMYTE 13, 31st Small Meeting on Yeast Transport and Energetics 24.- 28. 9. 2013, Antalya, Turkey
H. Elicharová and H. Sychrová*
oral presentation: Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* species
8. ISSY Cell Surface & Organelles in Yeasts, 18.- 22. 6. 2013, Stará Lesná, Slovakia
B. Hušková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport Systems for Uptake of K⁺ in *Candida* Species
9. 4th CESC 2014 Central European Summer Course on Mycology, 4.-11. 7. 2014, Szeged, Hungary
B. Hušková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport systems for potassium uptake in *Candida* species
10. XIV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků 2014, 13. - 16. 5 2014, Milovy, CR
H. Elicharová* and H. Sychrová
oral presentation: K⁺ importující transportéry kvasinek rodu *Candida*

11. 41st Annual Conference on Yeasts, 20.-23. 5. 2014, Smolenice, Slovakia
B. Hušeková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport systems for potassium uptake in *Candida albicans*
12. Sixth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, 16.-22. 5. 2015, La Colle, France
B. Hušeková*, **H. Elicharová** and H. Sychrová
poster: Transport system for potassium uptake in *Candida albicans*
13. SMYTE 15, 33rd Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, 21.-24. 6 2015, Lisbon, Portugal
B. Hušeková, **H. Elicharová**, V. Llopis-Torregrosa and H. Sychrová*
oral presentation: Potassium transporters in *Candida* species
14. Next Generation Sequencing School, 14.-21. 8. 2016, Dolný Smokovec, Slovakia
H. Elicharová*, B. Hušeková and H. Sychrová
oral presentation: *Candida albicans* uptake systems as novel targets for antifungal drug discovery
15. 3rd Prague Summer School Advances in Drug Discovery, 5.-8. 9. 2016, Prague, CR 2016
H. Elicharová*, B. Hušeková and H. Sychrová
poster: *Candida albicans* uptake systems as novel targets for antifungal drug discovery

Attended courses

1. Central European Summer Course on Mycology, Szeged, Hungary, 2010
2. Advances in Molecular Biology and Genetics, Prague, CR, 2011
3. Computational Genomics, Prague, CR, 2011
4. Fourth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, La Colle France, 2011
5. Modern Problems of NMR Spectroscopy, Pec p. Sněžkou, CR, 2011

6. Advances in Microbiology, Prague, CR, 2014
7. Next Generation Sequencing School, Dolný Smokovec, Slovakia, 2016
8. 3rd Prague Summer School Advances in Drug Discovery, Prague, CR, 2016