Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Speciální chemicko-biologické obory

Študijný obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Michaela Farbulová

Kvasinky ako nástroj pre štúdium homeostázy katiónov v eukaryotických bunkách

Yeasts as a tool for study of cation homeostasis in eukaryotic cells

Bakalárska práca

Školiteľka: Ing. Olga Zimmermannová, Ph.D.

Praha, 2023

Poďakovanie:

V prvom rade by som rada poďakovala svojej školiteľke Ing. Olze Zimmermannové, Ph.D. za jej cenné rady, čas a ochotu, ktoré mi počas vypracovávania mojej záverečnej práce venovala. Ďalej patrí moja vďaka aj rodine a priateľom, ktorí mi boli po celý čas štúdia oporou.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 3.5.2023 Podpis:

Abstrakt

Jednou z kľúčových schopností buniek je udržiavanie rovnováhy vo vnútornom prostredí pri zmenách vo vonkajšom prostredí. Medzi katióny, ktoré majú nenahraditeľnú úlohu v živých organizmoch, patria K^+, Na^+ a H^+. Pri kvasinkách bola identifikovaná väčšina proteínov, ktoré sú zodpovedné za transport monovalentných katiónov cez bunkové membrány, čo z nich robí ideálny modelový organizmus na štúdium fyziologických procesov v eukaryotických bunkách vrátane princípov zachovania homeostázy monovalentných katiónov. Pomocou jednobunkového organizmu, ako sú kvasinky, sme takisto schopní charakterizovať proteíny z fylogeneticky nižších organizmov aj človeka a odhaľovať tak poruchy funkcie transportných systémov súvisiacich s patologickými ochoreniami.

Cieľom tejto bakalárskej práce je poukázať na dôležitosť kvasiniek vo výskume štruktúry a funkcie transportérov katiónov z eukaryotických buniek a zároveň zhrnúť poznatky o ochoreniach spojených s narušením funkcie jednotlivých transportérov katiónov.

Kľúčové slová: kvasinka, eukaryotická bunka, homeostáza katiónov, transport K^+, transport Na^+, vnútrobunkové pH, štruktúra membránových proteínov, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

One of the key abilities of cells is to maintain a balance in the internal environment when the external surroundings change. Among the cations that have an irreplaceable role in living organisms are K^+, Na^+ and H^+. In yeasts, most proteins transporting monovalent cations across cell membranes have been identified, making them an ideal model organism for studying cellular physiological processes in eukaryotic cells, including the principles of maintaining monovalent cation homeostasis. Using a unicellular organism such as yeast, we can also characterise proteins from phylogenetically higher organisms and humans, thus revealing disorders of transport systems related to pathological diseases.

This bachelor thesis aims to point out the importance of yeasts in the research of the structure and function of cation transporters from eukaryotic cells and, at the same time, summarise knowledge about diseases associated with the disruption of the functions of individual cation transporters.

Keywords: yeast, eukaryotic cell, cation homeostasis, K^+ transport, Na^+ transport, intracellular pH, structure of membrane proteins, *Saccharomyces cerevisiae*

OBSAH

1. Úvod ... 1

2. Kvasinky ako modelový organizmus ... 2

2.1. Štruktúra eukaryotickej bunky ... 2

2.2. Nobelove ceny udelené za štúdium kvasiniek ... 4

3. Zachovanie homeostázy monovalentných katiónov na molekulárnej úrovni ... 5

3.1 Katióny K^+, Na^+, H^+ – funkcie v bunke a obsah v prostredí ... 5

3.2 Membránové transportné systémy ... 7

3.2.1 Primárne aktívny transport ... 8

3.2.2 Sekundárne aktívny transport ... 9

4. Štruktúry a funkcie transportérov monovalentných katiónov u nižších eukaryot ... 10

4.1 Pma1 ... 10

4.2 Import K^+ ... 10

4.3 Export K^+ a ďalších monovalentných katiónov ... 12

4.4 Vnútrobunkové transportné systémy monovalentných katiónov ... 13

5. Štruktúry a funkcie transportérov monovalentných katiónov u vyšších eukaryot ... 15

5.1 Na^+/K^+- ATPáza ... 15

5.2 Symportéry monovalentných katiónov ... 16

5.3 Antiportéry monovalentných katiónov ... 17

5.3.1 SLC9A ... 18

5.3.2 SLC9B ... 20

5.3.3 SLC9C ... 21

6. Molekulárne podstaty ochorení súvisiacich s poruchami homeostáze ... 22

6.1 Patológie spojené s SLC9A ... 22

6.1.1 NHE1 ... 22

6.1.2 NHE2 – NHE5 ... 23

6.1.3 NHE6 – NHE9 ... 24

6.2 Patológie spojené s SLC9B ... 25

6.3 Patológie spojené s SLC9C ... 26

6.4 Ďalšie patológie spojené s transportom iónov ... 26

7. Záver ... 28

8 Zoznam použitej literatúry ... 29

1. Úvod

Kvasinky radíme medzi jednobunkové nižšie eukaryotické organizmy. V súčasnosti sú kvasinky využívané v biotechnológii, v potravinárskom priemysle na výrobu alkoholických nápojov a pečiva alebo vo farmaceutickom priemysle na produkciu liečiv. Kľúčovú rolu majú aj pri skúmaní molekulárnych procesov prebiehajúcich v eukaryotických bunkách, pretože štruktúra buniek kvasiniek je veľmi podobná štruktúre buniek vyšších organizmov vrátane človeka *(Alberts 2015)* (Obr. 1).

Všetky živé organizmy potrebujú na svoj správny rast a delenie vyvážené koncentrácie minerálnych látok. Na udržiavanie stálej homeostázy v organizme si preto vytvorili mechanizmy, ktorými regulujú transport iónov do bunky a z bunky. Medzi najdôležitejšie monovalentné katióny patria K^+, Na^+ a H^+. Ich koncentrácia musí byť prísne regulovaná. K^+ a H^+ sa podieľajú na udržiavaní objemu bunky, pH, elektrochemického gradientu cez membrány a zúčastňujú sa na dôležitých bunkových procesoch, ako sú syntéza a aktivácia enzýmov. Na^+ sa podieľa na správnom fungovaní nervovej a svalovej sústavy, udržiavaní stáleho krvného tlaku, ale intracelulárne je udržiavaný v nízkych koncentráciách, pretože zvýšené koncentrácie Na^+ sú pre bunku toxické. Spočiatku sa zdalo, že použitie jednobunkového organizmu, ako sú napríklad kvasinky, nemôže mať pri štúdiu komplexných systémov vyšších eukaryotov vrátane človeka veľký význam. Dnes však vieme, že mnohé kvasinkové gény kódujúce proteíny môžu byť nahradené ich ľudskými ekvivalentmi, čo otvára možnosti výskumu aktivity ľudských proteínov v ovládanom zjednodušenom systéme „Humanized yeast“. Tento systém umožňuje nové objavy a skúmanie funkcií ľudských génov spojených s patológiami *(Kachroo et al. 2022)*. Vďaka podobnosti buniek kvasiniek s bunkami vyšších eukaryotov môžeme kvasinky využiť na skúmanie nielen bežných procesov v bunke, ako napríklad bunkového cyklu, metabolizmu, štruktúry a biogenézy proteínov alebo reakčnej odpovede voči stresu *(Smith a Snyder 2006)*, ale aj na objasnenie podstaty ľudských ochorení.

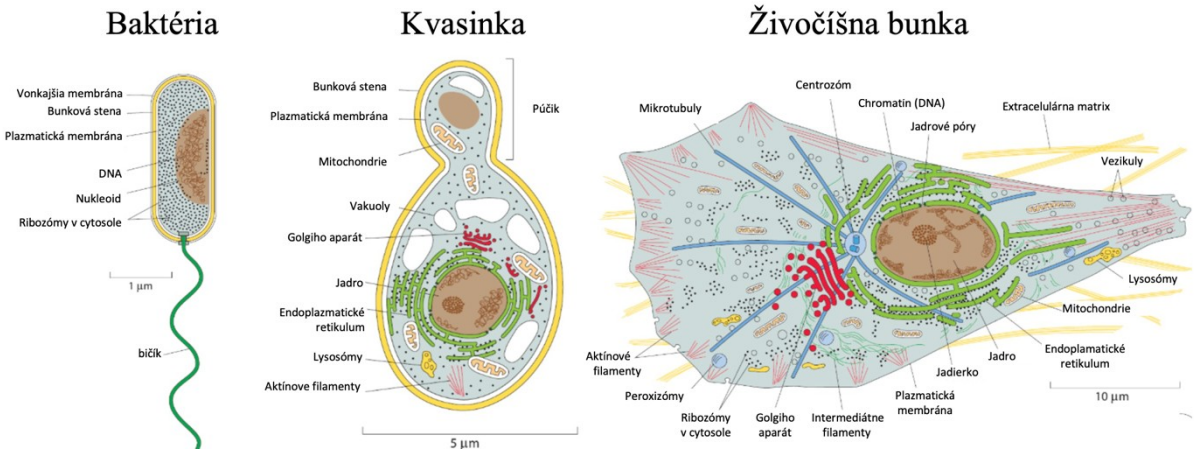
Táto práca je zameraná na dôležitosť kvasiniek, najmä *Saccharomyces cerevisiae*, ako modelového organizmu pri štúdiu (i) princípov zachovania homeostázy katiónov K^+, Na^+ a H^+ v eukaryotických bunkách (ii) štruktúry a funkcie najvýznamnejších transportérov katiónov v S. *cerevisiae* a v živočíšnych bunkách a (iii) zhrňuje najnovšie poznatky o patológiách súvisiacich s narušením homeostázy monovalentných katiónov a s nefunkčnosťou najmä antiportérov Na^+/H^+.

2. Kvasinky ako modelový organizmus

Medzi najvýznamnejšie kvasinky patrí *Saccharomyces cerevisiae*. Genóm *S. cerevisiae* bol v roku 1996 kompletne sekvenovaný ako prvý genóm eukaryotického organizmu. Sekvencia genómu *S. cerevisiae* obsahuje viac ako 6000 génov so sekvenciou takmer 13000 kilobáz, ktoré sú organizované v 16 chromozómoch *(Goffeau et al. 1996)*. Medzi ďalšie dôvody, prečo sú kvasinky vhodným modelovým organizmom, je ich krátky generačný čas, relatívne ľahká manipulácia, kultivácia a dostupnosť dobre vyvinutých metód molekulárnej biológie a genetiky *(Smith a Snyder 2006)*. Identifikáciou ľudských ortológov kvasinkových proteínov vrátane proteínov súvisiacich s ľudskými patológiami sa kvasinky využívajú ako zjednodušený model na výskum ľudských ochorení *(Thines et al. 2019; Velázquez et al. 2022; Stribny et al. 2020)*.

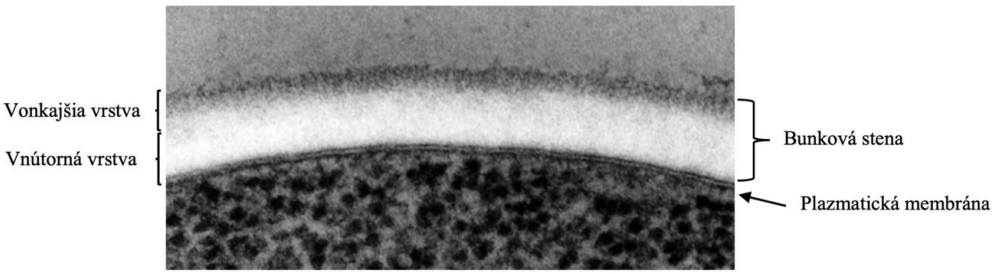
2.1. Štruktúra eukaryotickej bunky

Dôležitú úlohu v štruktúre eukaryotickej bunky hrajú biologické membrány, ktoré rozdeľujú bunku do jednotlivých kompartmentov (Obr. 1). Takmer všetky metabolické procesy prebiehajú v cytoplazme, v ktorej sú aj lokalizované jednotlivé kompartmenty, ktoré sa od seba líšia štruktúrou a funkciou *(Alberts 2015)*.



Obr. 1: Schematické porovnanie bakteriálnej, kvasinkovej a živočíšnej bunky
(prevzaté a upravené z *Alberts 2015)*

Na povrchu buniek kvasiniek sa nachádza bunková stena, ktorá je zložená prevažne z glukánov a mannanov, ktoré sa podieľajú na udržiavaní bunkovej integrity počas rastu a množenia. Hrúbka bunkovej steny je zhruba 120 nm a zaberá zhruba 17% celého objemu bunky *(Yamaguchi et al. 2011)* (Obr. 2).



Obr. 2: Fotografia z elektrónového mikroskopu povrchu bunky *S. cerevisiae*
(prevzaté a upravené z *Yamaguchi et al. 2011*)

Plazmatická membrána je selektívne permeabilná a tvorí rozhranie medzi extracelulárnym a intracelulárnym prostredím. Dochádza tu k selekcii látok (vrátane katiónov H^+, Na^+, K^+), ktoré vstupujú do bunky alebo naopak, ktoré bunku opúšťajú. Jednotlivé typy transportérov monovalentných katiónov, nachádzajúcich sa v plazmatickej membráne, sú opísané v nasledujúcich kapitolách. Ich činnosťou dochádza k udržovaniu rozdielnej koncentrácie iónov na oboch stranách membrány a vzniku membránového potenciálu.

Pri eukaryotických organizmoch je genetická informácia bunky uložená v jadre, ktoré je od cytoplazmy oddelené dvoma membránami. Jadrová membrána obsahuje póry, vďaka ktorým jadro môže komunikovať s cytoplazmou a ostatnými kompartmentmi. Vonkajšia membrána jadra je prepojená s ďalším membránovým útvarom, tzv. drsným endoplazmatickým retikulom, na ktorého povrchu sa nachádzajú ribozómy, ktoré majú proteosyntetickú aktivitu. Endoplazmatické retikulum bez naviazaných ribozómov je tzv. hladké ER, kde dochádza k syntéze lipidov. Endomembránový systém – Golgiho aparát (GA) sa podieľa na ďalšej úprave proteínov a transporte molekúl, ktoré vznikli v ER. GA je tvorený cisternami *(Suda a Nakano 2012)*.Všetky tieto procesy sú poháňané energiou v podobe ATP, ktorá je syntetizovaná na vnútornej strane membrány mitochondrií v elektrónovom transportnom reťazci. Hlavným zásobným a degradačným orgánom je vakuola, kde dochádza k akumulácii metabolitov *(Janderová a Bendová 1999).*

2.2. Nobelove ceny udelené za štúdium kvasiniek

To, aké dôležité sú kvasinky vo vede, dokazuje aj 5 Nobelových cien. Všetky tieto ceny majú spoločné to, že autori pri svojom výskume využili kvasinky ako modelový organizmus (Tab. 1).

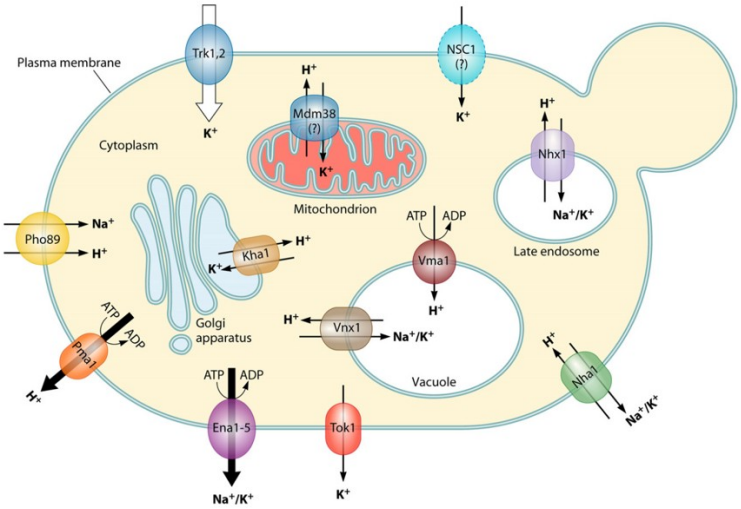
Rok	Autor	Oblasť	Modelový organizmus	Objav
2001	Leland Hartwell Paul Nurse Tim Hunt	Fyziológia a medicína	*S. cerevisiae* *Schizosaccharomyces pombe* *Arbacia punctulata*	Hartwell – *cdc* (cell division cycle) gény Nurse, Hunt – cyklin – dependentná proteín kináza cdc2
2006	Roger Kornberg	Chémia	*S. cerevisiae*	Molekulárne princípy eukaryotickej transkripcie – *GAL* gén
2009	Elizabeth Blackburn Carol W. Greider Jack W. Szostak	Fyziológia a medicína	*Tetrahymena / S. cerevisiae*	Teloméry a enzým telomeráza
2013	James E. Rothman Randy W. Schekman Thomas C. Südhof	Fyziológia a medicína	*S. cerevisiae*	Schekman – *SEC* (secretory) gény Rothman – SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteíny Südhof – vezikulárny transport
2016	Yoshinori Ohsumi	Fyziológia a medicína	*S. cerevisiae*	Kľúčové gény, ktoré sa zúčastňujú autofágie

Tab. 1: Prehľad dosiaľ udelených Nobelových cien, keď boli pri výskume využité kvasinky ako modelové organizmy

3. Zachovanie homeostázy monovalentných katiónov na molekulárnej úrovni

Monovalentné katióny hrajú v správnom fungovaní bunky nenahraditeľnú rolu. V prirodzenom prostredí je pre bunku esenciálne udržiavanie stálej koncentrácie jednotlivých iónov. Základné princípy zachovania homeostázy katiónov na úrovni buniek priniesli poznatky získané v bunkách *S. cerevisiae (Yenush 2016)*. Aj rad transportných systémov pre katióny z nižších aj vyšších eukaryotov bol charakterizovaná pomocou kvasiniek *(Rosas-Santiago et al. 2015; Dibalova-Culakova et al. 2018; Becares et al. 2021)*.

Bunky *S. cerevisiae* obsahujú v plazmatickej membráne najmenej osem rôznych transportných mechanizmov na udržanie koncentrácie intracelulárnych katiónov *(Ariño et al. 2019)* (Obr. 3). K^+ sa hromadí vnútri bunky vo vysokých koncentráciách 200 – 300 mM a naopak – Na^+ je pre bunku vo vysokých koncentráciách toxický, a tak sa vyskytuje v bunkách v nízkych koncentráciách okolo 30 mM *(Bañuelos et al. 2002)*. Za fyziologických podmienok sa intracelulárne pH v cytozole pohybuje okolo 7,2 *(Orij et al. 2009; Zimmermannová et al. 2019)*.



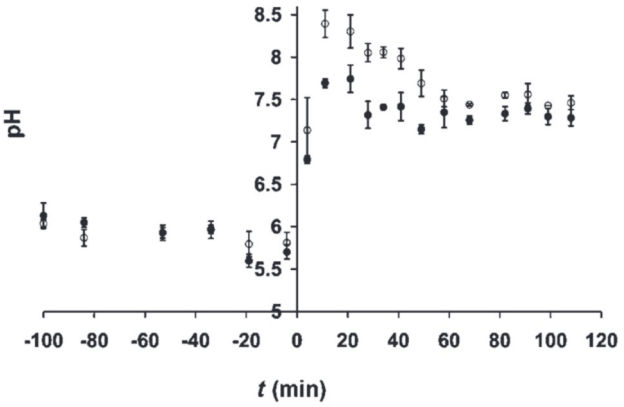
Obr. 3: Transportéry katiónov alkalických kovov v plazmatickej membráne a v membránach vnútorných organel kvasinky *S. cerevisiae* (prevzaté z *Ariño et al. 2010*)

3.1 Katióny K^+, Na^+, H^+ – funkcie v bunke a obsah v prostredí

Draslík je kľúčovým monovalentným katiónom v mnohých aspektoch. Podieľa sa napríklad na osmoregulácii, kompenzácii negatívnych nábojov makromolekúl či syntéze a aktivácii enzýmov. V prirodzenom prostredí musí väčšina buniek akumulovať intracelulárne draselné ióny proti koncentračnému gradientu. Kvasinky akceptujú široké rozpätie koncentrácií monovalentných katiónov – *S. cerevisiae* sú schopné rásť v prítomnosti extracelulárneho K^+ v koncentrácii 10 μM až 2.5 M a Na^+ < 1.5 M *(Ariño et al. 2010)*. Vysoký obsah draslíka je v bunke udržiavaný aktivitou vstupných transportných systémov K^+, ale predpokladá sa, že v rámci rovnováhy sú mierne aktívne aj výstupné transportné systémy a dochádza tak k obojsmernej cirkulácii K^+ cez plazmatickú membránu *(Ariño et*

al. 2010). Ak dôjde k narušeniu vstupu K^+ do bunky, dochádza k zvýšeniu potenciálu membrány a jej hyperpolarizácii *(Navarrete et al. 2010)*.

Pri *S. cerevisiae* je cytozolické pH určené činnosťou protónovej pumpy v plazmatickej membráne, ktorá pumpuje protóny von z bunky proti elektrochemickému gradientu (Obr. 3, Pma1). Orij spolu so svojím tímom v roku 2009 vydal publikáciu, v ktorej popisuje spojitosť medzi intracelulárnym pH a rastom bunky. Za prítomnosti glukózy ako zdroja energie v prostredí je cytozolické pH neutrálne 7,2 a je považované za optimálne na rast bunky. Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú pH, sú zaradené slabé organické kyseliny, živiny ako glycerol, etanol a nízka extracelulárna koncentrácia glukózy. Orij počas výskumu dokázal, že v prípade nedostatku živín sa pH pohybuje okolo 6,0 ± 0,2, a už o 30 min od pridania glukózy do média došlo k stabilizácii pH na hodnotu 7,3 (Obr. 4) *(Orij et al. 2009)*.



Obr. 4: Graf znázorňujúci zmenu intracelulárneho (•) a mitochondriálneho (o) pH po pridaní glukózy do média v čase 0 minút (prevzaté z *Orij et al. 2009)*

Nedávne štúdie ukazujú, že homeostáza protónov úzko súvisí s transportom a homeostázou katiónov draselných *(Zimmermannova et al. 2021)* a vápenatých *(Ma et al. 2021)*. Na rozdiel od draslíka je vápnik v bunkách udržiavaný v nízkych koncentráciách. V kvasinkových bunkách má Pma1 dôležitú úlohu v udržiavaní homeostázy cytozolu a jej aktivita priamo ovplyvňuje membránový potenciál. Najnovšie výsledky dokazujú, že aktivácia Pma1 je nezávislá od prítoku Ca^{2+}, ale hyperpolarizácia membrány generovaná Pma1 priamo riadi influx Ca^{2+} *(Ma et al. 2021)*.

Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát sú hlavnými komponentmi sekrečnej dráhy. Pre bunku je dôležité správne rozdelenie novo syntetizovaných glykoproteínov a lipidov, preto si bunky vytvorili sofistikovaný spôsob, ako efektívne rozdeľovať biosyntetické produkty. Princípom tejto stratégie je kontrola interakcie cargo proteínov a receptorov moduláciou stavu protonácie *(Paroutis et al. 2004)*. Proces acidifikácie a postupné znižovanie pH v sekrečnej dráhe sú spojené s postupným znižovaním hustoty H^+ púmp paralelne so znižovaním permeability protónov *(Wu et al. 2001)*. Zatiaľ čo pH endoplazmatického retikula je skoro neutrálne (pH 7,2), cis-Golgiho aparát je výrazne kyslejší než endoplazmatické retikulum a dochádza k acidifikácii jednotlivých cisterien až na hodnotu pH 6,0

v trans-Golgiho aparáte. Hodnota pH sekrečných váčikov je výraznejšia, a to až 5,2 *(Casey et al. 2010)*.

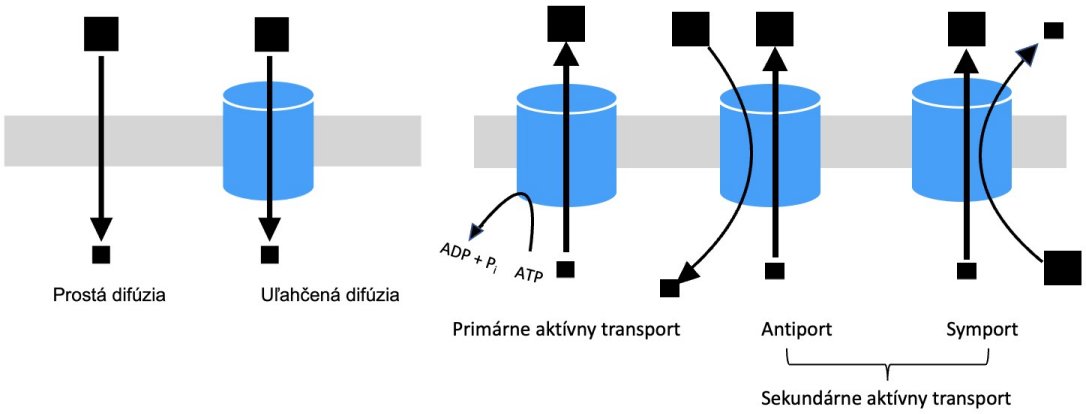
Mitochondriálny matrix má za optimálnych podmienok rastu hodnotu pH 7,9 ± 0,2 (Obr. 4). Táto hodnota je oproti ostatným kompartmentom výrazne alkalická. Je to spôsobené transportom protónov v rámci elektrotransportného reťazca, ktorého výsledkom je tvorba gradientu, ktorý sa následne využíva na výrobu ATP *(Llopis et al. 1998; Casey et al. 2010)*.

Peroxizómy sú vysoko konzervované organely v eukaryotických bunkách. Majú úlohu predovšetkým pri α-, β-oxidácii mastných kyselín a metabolizmu H_2O_2. V roku 2004 bola použitá kvasinka *S. cerevisiae* na meranie hodnoty pH peroxizómov *in vivo*, pričom bola nameraná alkalická hodnota pH 8,2 ± 0,2 *(van Roermund et al. 2004)*.

Vakuoly a lysosómy sú organely vyskytujúce sa v bunkách kvasiniek, rastlín aj živočíchov. Majú zásobnú funkciu a podieľajú sa na udržovaní objemu bunky a intracelulárneho pH. Kvasinkové vakuoly majú preukázateľne kyslé pH ~ 5,5, tak isto lysozómy 5,0 ± 0,5. Zdá sa však, že je pH vakuol je viac závislé od extracelulárnych podmienok *(Martínez-Muñoz a Kane 2008)*.

3.2 Membránové transportné systémy

Transport je sprostredkovaný špecifickými proteínmi, ktoré sú inkorporované do biologických membrán a umožňujú tak obojsmernú výmenu látok. Prenos cez bunkové membrány podľa energetickej náročnosti je rozdelený na pasívny transport (difúzia) a aktívny transport (Obr. 5). Pasívny transport prebieha bez spotreby energie, dochádza k prenosu molekuly z miesta s vyššou koncentráciou na miesto s nižšou koncentráciou. Prostá difúzia prebieha bez prítomnosti prenášača, molekuly voľne prechádzajú membránou. Druhým typom pasívnej difúzie je uľahčená difúzia, keď sú látky do bunky transportované cez špecializované kanály, napríklad aquaporíny na prenos molekúl vody *(Pettersson et al. 2006)*. Aktívnym transportom je substrát transportovaný cez membránu proti koncentračnému gradientu a je spojený so spotrebou energie. Rozlišujeme primárne aktívny transport a sekundárne aktívny transport (Obr. 5).



Obr. 5: Rozdelenie membránového transportu z hľadiska energetickej náročnosti, veľkosť čiernych štvorcov označuje množstvo substrátu *(autor: Michaela Farbulová)*

Monovalentné katióny sú prenášané cez membrány pomocou kanálov a prenášačov. Kanály sú hydrofilné póry, ktoré umožňujú pasívny transport látok cez membránu bunky na základe ich veľkosti a náboja v smere koncentračného gradientu. Sú vysoko špecifické pre substrát, ktorý prenášajú. Jednou z dôležitých vlastností kanálov je, že nie vždy umožnia iónom voľne prechádzať membránou. Keď sú dostatočné stimulované, dochádza k ich otvoreniu, aby umožnili transport substrátu *(Kulbacka et al. 2017)*. Príkladom kanála, ktorý je regulovaný zmenou membránového potenciálu, je draselný kanál $K_V1.2$, ktorý sa podieľa na udržiavaní membránového potenciálu a regulácie nervových vzruchov *(Zhang et al. 2016)*. Druhým typom kanálov sú chemicky riadené kanály, keď musí dôjsť k naviazaniu ligandu, aby došlo k otvoreniu kanála (kanály Na^+/K^+, ktoré sú otvárané naviazaním acetylcholínu *(Ribeiro Junior et al. 2017))*. Tretím typom sú kanály, ktoré sa otvárajú vplyvom mechanického podnetu (TRAAK – K^+ kanál v centrálnej nervovej sústave *(Brohawn et al. 2019)*.

3.2.1 Primárne aktívny transport

Pri primárnom transporte dochádza k prechodu substrátu membránou proti koncentračnému gradientu za spotreby energie. Proces sa začína naviazaním substrátu na jednej strane membrány, čo vedie ku konformačnej zmene transportného proteínu, ktorý následne uvoľní substrát na druhej strane membrány *(Klaassen a Aleksunes 2010)*. Podľa typu zdroja energie môžeme primárny transport rozdeliť do troch skupín: transportéry využívajúce energiu z hydrolytických reakcií, energiu z oxidačných reakcií na vnútornej strane mitochondriálnej membrány *(Sun et al. 2013)* a energiu z absorpcie svetelného žiarenia *(Cartron et al. 2014)*.

ATPázy sú transportéry, ktoré využívajú na transport energiu pochádzajúcu z defosforylácie ATP. Na základe lokalizácie ich rozdeľujeme na ATPázy typu F-, V-, P-. Na vnútornej membráne mitochondrií a chloroplastov sú lokalizované ATPázy typu F (F_1F_O-ATPázy). V tomto prípade ide skôr o ATP syntázu, pretože využíva elektrochemický gradient H^+ na tvorbu ATP z ADP *(Klusch et al. 2017)*. ATPázy typu P sa vyskytujú v plazmatickej membráne baktérií, húb, živočíchov a rastlín. Transport substrátu je sprevádzaný zmenou konformácie proteínu, ktorá je vyvolaná fosforyláciou a následnou defosforyláciou ATPázy *(Dyla et al. 2020)*. Evolučne príbuzné F-ATPázam sú V-ATPázy. Pri *S. cerevisiae* sú V-ATPázy lokalizované v membráne vakuol, Golgiho aparáte a ďalších endozómoch. Ich hlavnou funkciou je generovanie potenciálu cez membránu. V *S. cerevisiae* bolo preukázané, že V-ATPáza spolupracuje s P-ATPázou Pma1 v plazmatickej membráne a spoločne sa podieľajú na regulácii intracelulárneho pH *(Martínez-Muñoz a Kane 2008)*. U živočíchov sa V-ATPázy vyskytujú takisto v plazmatickej membráne metastázujúcich rakovinových buniek. V dôsledku zvyšovania invazivity nádorových buniek dochádza k zvýšeniu ich metabolickej aktivity a okysľovaniu cytozolického pH. Aby sa minimalizovalo potenciálne toxické zníženie pH, dochádza k zvýšenej aktivite V-ATPáz. Mnohé výskumy preukázali, že aktivita V-ATPáz bola omnoho vyššia vo vysoko metastázujúcich bunkách v porovnaní s bunkami s nízkou metastazickou aktivitou. V-

ATPázy sú preto potenciálnym cieľom v liečbe nádorových ochorení *(Sennoune et al. 2004; Hinton et al. 2009)*.

3.2.2 Sekundárne aktívny transport

V prípade, že je na transport látok využitá energia z primárneho transportu, hovoríme o sekundárnom transporte. Dochádza k transportu minimálne dvoch rôznych substrátov, pričom koncentračný gradient jedného slúži ako hnacia sila transportu druhého substrátu proti koncentračnému spádu (Obr. 5). V *S. cerevisiae* je najčastejšie využívaný protónový gradient generovaný Pma1 H^+-ATPázou *(Serrano et al. 1986)*. Ak sú oba substráty transportované rovnakým smerom, hovoríme o symporte (kotransporte). Symportom s Na^+ sú v *S. cerevisiae* transportované ióny, napríklad PO_4^{3-} cez transportér Pho89 *(Zvyagilskaya et al. 2008)* (Obr. 3). Ak sú substráty prenášané opačným smerom, hovoríme o antiporte. Jedným z príkladov antiportu v *S. cerevisiae* je Nha1 (Na^+, K^+/H^+), ktorý využíva protónový gradient na aktívne vylučovanie katiónov alkalických kovov *(Bañuelos et al. 1998)* (Obr. 3).

4. Štruktúry a funkcie transportérov monovalentných katiónov u nižších eukaryot

Najviac preštudovaným modelom v súvislosti s transportom v nižších eukaryotických organizmoch je kvasinka *S. cerevisiae*. V plazmatickej membráne sa nachádzajú 2 uniportné systémy na príjem draslíka do bunky (Trk1, Trk2), na transport K^+ von z bunky slúžia 3 exportné systémy (draselný kanál Tok1, Na^+, K^+-ATPázy Ena, Na^+, K^+/H^+ antiportér Nha1) (Obr. 3).

Medzi najmenej preskúmané transportéry patrí Nsc1 kanál (Non-specific cation channel), ktorý môžeme považovať za nízko afinitný transportný systém K^+. Nsc1 je regulovaný koncentráciou extracelulárnych bivalentných katiónov *(Bihler et al. 2002)*. Pho89 je jediným transportérom, ktorý dokáže symportom s PO_4^{3-} prenášať Na^+. Tento transportér je aktívny len za vysokého pH (optimum pH ~ 9,5) *(Zvyagilskaya et al. 2008)*. Zaujímavosťou je, že gény *PHO89* a *ENA1* sú regulované rovnakými signálnymi dráhami v reakcii na vysoké pH, keď je potrebný systém na efflux Na^+ pôsobiaci proti aktivite Pho89 *(Serra-Cardona et al. 2014)*.

Transportéry monovalentných katiónov boli takisto identifikované v membránach organel. Najvýznamnejšími sú v Golgiho aparáte K^+/H^+ antiportér Kha1 *(Maresova a Sychrova 2004)*, v endozómoch Na^+, K^+/H^+ antiportér Nhx1 *(Nass et al. 1997)* a vo vakuole Na^+, K^+/H^+ antiportér Vnx1*(Cagnac et al. 2007)* a K^+-Cl^- kotransportér Vhc1 *(Petrezselyova et al. 2013b)*.

4.1 Pma1

Proteín Pma1 (H^+-ATPáza) radíme pri *S. cerevisiae* medzi esenciálne transportéry. Jeho primárnou funkciou je efflux protónov cez plazmatickú membránu proti koncentračnému gradientu, pričom dochádza k hydrolýze ATP *(Møller et al. 1996)*. Proteín Pma1 je zložený z 3 cytozolických domén, ktoré sú do lipidovej dvojvrstvy zakotvené pomocou 10 transmembránových helixov *(Zhao et al. 2021)*. Najdôležitejším regulačným faktorom Pma1 je metabolizmus glukózy. Pri *S. cerevisiae* je karboxylová terminálna doména (C-terminálny koniec) autoinhibičného charakteru. Zvýšením koncentrácie glukózy dochádza k fosforylácii C-terminálnej domény, pričom dôjde k zmene jej konformácie a uvoľneniu protónov von z bunky *(Eraso et al. 2006)*. Ako už bolo uvedené, Pma1 je pre bunky kvasiniek esenciálna, ale jej prítomnosť v živočíšnych bunkách nebola dokázaná. Táto skutočnosť umožňuje uvažovať o Pma1, ako o možnom cieli antimykotických liečiv *(Kjellerup et al. 2017; Bublitz et al. 2018)*.

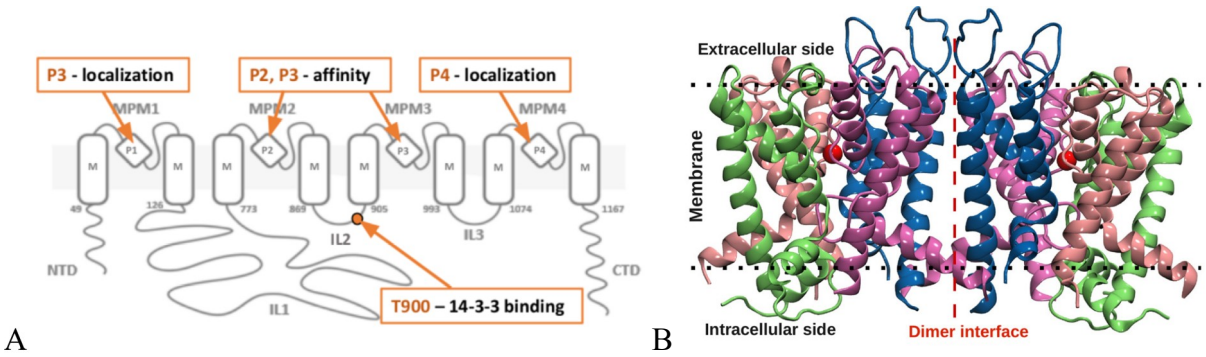
4.2 Import K^+

Draslík je do buniek importovaný pomocou špecifických transportérov Trk (Transport of K^+), ktoré sú lokalizované v plazmatickej membráne. Trk proteíny neboli charakterizované len v kvasinkách *S. cerevisiae,* ale aj v iných kvasinkách, ako napríklad *S. pombe (Soldatenkov et al. 1995)*. Spolu s Trk transportérmi boli v bunkách nekonvenčných kvasiniek charakterizované ďalšie typy transportérov draslíka, K^+-H^+ symportér Hak1 (High affinity K^+ transporter) a ATPáza Acu

(Alkali cation uptake). Gény *HAK1* a *ACU1* boli identifikované ako druhovo špecifické, žiaden z génov kódujúcich tieto transportéry sa nenachádza v genóme *S. cerevisiae*. Transportér Hak1 bol identifikovaný pri kvasinkách, ktoré žijú v prostredí s nižšou koncentráciou K^+, ako napríklad *Debaryomyces occidentalis (Bañuelos et al. 1995)*. V prípade transportného systému Acu, ktorý umožňuje vysoko afinitný transport K^+, ide o ATPázu, ktorá dodnes bola identifikovaná len pri niekoľkých druhoch, medzi najvýznamnejšie patria kvasinky *Candida albicans (Elicharová et al. 2016)* alebo *Pichia sorbitophila (Benito et al. 2004)*.

V *S. cerevisiae* je import draslíka sprostredkovaný dvoma transportérmi Trk1 a Trk2. Trk1 je považovaný za hlavný importér K^+. Gaber et al. v roku 1988 charakterizoval kvasinkový gén *TRK1* kódujúci integrálny membránový proteín dlhý 1235 aminokyselín (AA) usporiadaných v 12 transmembránových segmentoch. Vo svojom výskume odhalil, že gén *TRK1* je pre bunku neesenciálny. Jeho deléciou v bunke dôjde k zníženiu schopnosti buniek rásť v prostredí s nízkym obsahom draslíka *(Gaber et al. 1988)*. Nedávno bolo zistené, že sa afinita Trk1 postupne mení v závislosti od koncentrácií K^+ vo vonkajšom aj vnútornom prostredí a membránovom potenciáli *(Masaryk a Sychrová 2022)*.

Aj napriek tomu, že Gaber predikoval štruktúru Trk kanála, jeho štruktúra bola bližšie charakterizovaná pomocou prokaryotického kanála pre K^+ KscA izolovaného z *Streptomyces lividans,* ktorý patrí do rodiny Trk/Krt/HKT transportérov. Ide o 4 opakujúce sa podjednotky M-P-M (Membrane-Pore-Membrane). Ako M označujeme hydrofóbne α-helixy, ktoré prechádzajú membránou. P sú α-helixy, ktoré sa nachádzajú v extracelulárnej časti plazmatickej membrány, ale neprechádzajú ňou. Ich konce vystupujú do extracelulárneho prostredia. P obsahujú sekvenčnú oblasť, ktorá v mieste póru vytvára podobne ako pri K^+ kanáli KscA selektívny filter. Táto oblasť je dôležitá hlavne preto, že obsahuje v sekvencii konzervovaný glycín, ktorá podobne ako pri prokaryotoch selektívne viaže draslík *(Zayats et al. 2015)* (Obr. 6).



Obr. 6: (A) Topologický model proteínu Trk1. Vyznačené sú jednotlivé štruktúrne elementy a ich objasnené funkcie. NTD = N-terminálna doména, CTD = C-terminálna doména, IL = intracelulárna slučka, M, P – viz. text (upravené z *Masaryk et al. 2023)* (B) Model membránové časti proteínu Trk1. Jednotlivé opakujúce sa domény sú farebne odlíšené. Červené body značia ióny K^+ v selektívnom filtri (prevzaté z *Zayats et al. 2015)*.

Gén *TRK2* kóduje proteín s dĺžkou 889 AA, ktorý je z 55 % identický s proteínom Trk1, pričom k rozdielu v ich štruktúre dochádza najmä v hydrofilných transmembránových segmentoch. Medzi segmentmi M3 a M4 dochádza ku skráteniu hydrofilnej slučky, ktorá má pri Trk1 dĺžku 650 AA a pri Trk2 je polovičná (334 AA) *(Ko a Gaber 1991)*. Ako sa ukázalo, kvasinky obsahujúce deléciu v géne pre Trk1 mali zníženú schopnosť rásť v médiu s nízkou koncentráciou K^+ (< 10 mM), pričom delécia v géne pre Trk2 nevykazuje fenotypovú odlišnosť od kvasiniek, ktoré *TRK2* gén obsahovali *(Bertl et al. 2003; Navarrete et al. 2010)*. Musí sa však dodať, že kvasinky obsahujúce dvojitú deléciu *trk1*Δ *trk2*Δ stále vykazovali čiastočný transport draslíka, čo sa dá vysvetliť činnosťou nízko afinitného transportéra Nsc1 *(Bihler et al. 2002; Navarrete et al. 2010)*. Ďalšie štúdie ukazujú, že zatiaľ čo expresia Trk1 je signifikantná v exponenciálnej fáze rastu bunky, Trk2 je hlavným transportným systémom v stacionárnej fáze a za podmienok dehydratačného stresu – anhydrobióza *(Borovikova et al. 2014)*. Okrem toho bolo v súvislosti s GICD (Glucose-induce cell death) preukázané, že Trk2 je zásadný pre prežitie bunky. Presná funkcia Trk2 v GICD nie je známa, ale výsledky ukazujú, že bunky bez Trk2 indikovali vyššiu aktivitu Pma1 *(Dušková et al. 2021)*.

Trk1 a Trk2 sú hlavné importné systémy K^+, ale ich funkcia bola dokázaná aj v súvislosti s homeostázou Ca^{2+} v *S. cerevisiae*. Trk1 je pre rast bunky dôležitý v prípade, že sa bunka nachádza v prostredí s vysokým obsahom Ca^{2+}. V prípade neprítomnosti Trk2 sa hladina intracelulárneho Ca^{2+} zdvojnásobila *(Zimmermannova et al. 2021)*.

Stabilita Trk1 a Trk2 je regulovaná mnohými kinázami a fosfatázami. Kinázami, ktoré sa podieľajú na stabilite Trk1 v plazmatickej membráne, sú Hal4 a Hal5. Neovplyvňujú aktivitu transportéra, ale ak sa bunka nachádza v prostredí s nízkym obsahom draslíka, chránia transportéry pred degradáciou a zakotvujú ich v plazmatickej membráne *(Mulet et al. 1999; Pérez-Valle et al. 2007)*. S kinázami Hal4/Hal5 úzko súvisí fosfatáza kalcineurín, ktorá reguluje vysoko afinitný transport K^+ cez Trk1. Kalcineurín zvyšuje expresiu Hal5, čím nepriamo pozitívne reguluje transport K^+ *(Casado et al. 2010)*.

4.3 Export K^+ a ďalších monovalentných katiónov

V *S. cerevisiae* existujú minimálne 3 transportéry zapojené do exportu K^+, pričom export závisí od podmienok, v ktorých sa bunka nachádza.

Tok1 (Transport outward K^+) je jediným kanálom špecifickým pre K^+ v plazmatickej membráne *S. cerevisiae*. *TOK1* kóduje proteín dlhý 691 AA, ktorý predikuje 8 transmembránových domén, z čoho 4 sú transmembránové helixy a 4 sa zúčastňujú na formovaní 2 P (Pore-forming domain) domén s 2 MPM sekvenciami *(Ketchum et al. 1995)*. Jeho funkciou je transport K^+ von z bunky tak, že pri otvorení kanála dôjde k depolarizácii plazmatickej membrány. Deléciou génu *TOK1* dochádza k silnej depolarizácii plazmatickej membrány a naopak – pri zvýšenej expresii tohto génu dochádza k hyperpolarizácii. Z toho vyplýva, že kanál Tok1 má dôležitú úlohu v regulácii membránového potenciálu *(Zahumenský et al. 2017)*.

Nha1 je Na^+, K^+/H^+ antiportér z rodiny proteínov CPA1 *(Masrati et al. 2018)*. Tento typ transportéra je prítomný takmer vo všetkých organizmoch, od baktérií až po človeka. Jeho primárnou funkciou je zbavovanie sa nadbytočných solí (Na^+, K^+ a H^+) z bunky *(Bañuelos et al. 1998)*. Pri *S. cerevisiae* je proteín kódovaný génom *NHA1*, jeho dĺžka je 985 AA usporiadaných do 13 transmembránových domén, krátkej hydrofilnej N- a dlhej cytoplazmatickej C-terminálnej domény (podľa databázy modelov proteínov Alpha fold (*Varadi et al. 2022)*). Hydrofilný C-koniec Nha1 tvorí 554 AA a zaberá tak 56 % celého proteínu *(Kinclová et al. 2001)*. Transportná aktivita je negatívne regulovaná cez C-terminálnu doménu pomocou interakcie s 14-3-3 proteínmi *(Smidova et al. 2019)*. Interakcia je sprostredkovaná fosforylovaným Ser481 na alanín polypeptidu Nha1, na ktorý sa 14-3-3 proteíny naviažu. Ak dôjde k mutácii Ser481, dochádza k zvýšenému exportu katiónov cez Nha1, čo má za následok zvýšenú citlivosť buniek voči nízkym koncentráciám K^+ *(Smidova et al. 2019)*. Na regulácii Nha1 sa podieľa aj fosfatáza Ppz1. Jej nadmerná expresia v bunkách aktivuje Nha1, čo vedie k značnému poklesu cytozolického pH a koncentrácie K^+ a tým aj k zastaveniu rastu *(Albacar et al. 2021)*.

Tretím exportérom monovalentných katiónov je Na^+, K^+-ATPáza Ena, ktorá je kódovaná repetitívnymi génmi *ENA*. Gén *ENA1* kóduje proteín s dĺžkou 1091 AA s predpokladanou topológiou 10 transmembránových domén *(Haro et al. 1991; Ariño et al. 2010)*. Na rozdiel od Nha1 exprimovaného v *S. cerevisiae* konštitutívne je expresia Ena1 za optimálnych podmienok veľmi nízka, naopak – k zvýšeniu expresie génu *ENA1* dochádza, ak bunka prechádza osmotickým stresom alebo signifikantnou zmenou pH *(Ruiz a Ariño 2007)*. Expresia *ENA* je na transkripčnej úrovni regulovaná rôznymi signálnymi dráhami. Za jednu z hlavných môžeme považovať kalcineurínovú kaskádu. Za nepriaznivých podmienok dochádza k defosforylácii transkripčného faktora Crz1 (Calcineurin-Responsive Zinc Finger 1) kalcineurínom, čo má za následok jeho vstup do jadra a expresiu *ENA1,* ktoré vo svojom promótore obsahujú 2 oblasti na naviazanie Crz1 *(Thewes 2014; Petrezsélyová et al. 2016)*. Ďalším známym transkripčným faktorom regulujúcim expresiu *ENA1* je Rim101, ktorý potlačením expresie proteínu Nrg1 zvýši transkripciu *ENA* v prípade, že je pH cytozolu alkalizované *(Lamb a Mitchell 2003)*.

4.4 Vnútrobunkové transportné systémy monovalentných katiónov

Transportéry katiónov sa taktiež nachádzajú v membránach vnútrobunkových organel, kde sa podieľajú na regulácií homeostáze vo vakuole, GA, endozómoch a v mitochondriách (Obr. 3). Väčšina z nich sú antiporty, ktoré podobne ako transportéry v plazmatickej membráne, na transport využívajú protónový gradient, ktorý je ale v membránach organel generovaný V-ATPázou Vma1. Tá je zložená z 13 proteínov usporiadaných do 2 domén V_0 (transmembránová), V_1 (periférna). Periférna doména je zodpovedná za hydrolýzu ATP, úlohou transmembránovej domény je translokácia protónov do lumen organel *(Stevens a Forgac 1997)*. V membráne vakuoly *S. cerevisiae* sa ďalej nachádza aj Na^+/H^+ antiportér Vnx1, ktorý sa podobne ako ostatné y podieľa na udržovaní homeostázy a intracelulárneho

pH *(Cagnac et al. 2007)*. Draslík do vakuoly transportuje K^+-Cl^- kotransportér Vhc1 *(Petrezselyova et al. 2013b)*.

Pôvodne sa predpokladalo, že sa v membráne vakuol *S. cerevisiae* nachádza ďalší prenášač Nhx1 *(Nass et al. 1997)*, ale ako bolo neskôr preukázané, jeho primárnou funkciou je udržovanie stabilného vnútorného pH v PVC (pre-vacuolar compartments) *(Brett et al. 2005b)*. Podobnú funkciu ako Nhx1 v endozómoch zastáva v membráne Golgiho aparátu antiportér Kha1. Okrem regulácie pH môžeme predpokladať, že Nhx1a Kha1 sú spolu s malými GTPázami dôležité pri regulácii transportu váčikov medzi Golgiho aparátom a PVC, čo zohráva významnú úlohu v tolerancii buniek voči mnohým stresovým faktorom *(Maresova a Sychrova 2004; Marešová a Sychrová 2010)*.

Transport K^+ cez vnútornú mitochondriálnu membránu je pravdepodobne sprostredkovaný Mdm38. Mitochondrie, ktoré boli izolované z *mdm38* mutantov, vykazujú nižší membránový potenciál, zvýšený objem a vyššiu koncentráciu K^+ v matrixe *(Nowikovsky et al. 2007)*. Homológom k Mdm38 v ľudských bunkách je Letm1, ktorý je spájaný s ochorením Wolf-Hirschhornov syndróm *(Lupo et al. 2011)*.

5. Štruktúry a funkcie transportérov monovalentných katiónov u vyšších eukaryot

Membrána predstavuje jednu z najdôležitejších štruktúr všetkých živých organizmov, keďže tvorí hranicu medzi bunkou a vonkajším prostredím, ale aj samotnými bunkami medzi sebou. Na rozdiel od jednobunkových nižších eukaryotov musia vyššie eukaryoty udržiavať fyziologické prostredie nielen na úrovni bunky, ale aj na úrovni celého organizmu. Z tohto dôvodu je ich počet výrazne vyšší ako pri nižších eukaryotoch. Napríklad v každej živočíšnej bunke sa na regulácii pH podieľa viac než 60 génov kódujúcich transportné proteíny v plazmatickej membráne *(Doyen et al. 2022)*. Štruktúra, substrátová špecifita, transportná aktivita a funkcie mnohých z nich boli študované pomocou heterológnej expresie v bunkách kvasiniek *(Kolacna et al. 2005; Schushan et al. 2010; Velázquez et al. 2022)*. V nasledujúcich kapitolách sú opísané najvýznamnejšie transportné systémy monovalentných katiónov prítomných v membránach vyšších eukaryotických organizmov.

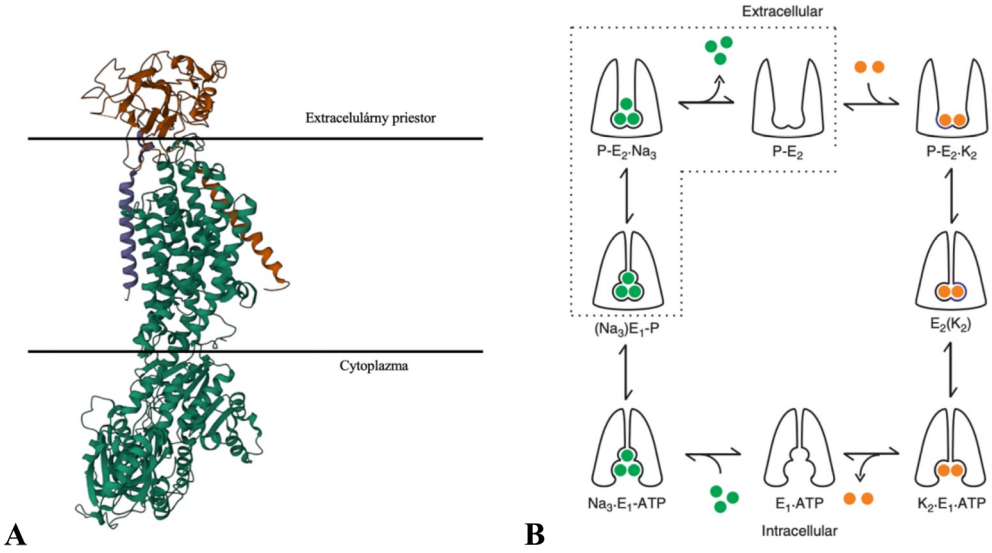
5.1 Na^+/K^+- ATPáza

Sodno-draselná pumpa je esenciálna pre všetky živočíšne bunky. Je jedným z najväčších proteínových komplexov zo skupiny P-ATPáz. Ako jej názov napovedá, jej funkciou je transport 3 Na^+ von z bunky a naopak – import 2 K^+ do bunky a generuje tak elektrochemický gradient katiónov Na^+ cez plazmatickú membránu, ktorý slúži ako hnacia sila pre ďalšie transportné systémy *(Skou a Esmann 1992)*. Je zložená z α-, β- a γ- podjednotky (Obr. 7A).

Katalytická α-podjednotka vykonáva samotný transport katiónov cez plazmatickú membránu. Je rozdelená na transmembránovú a cytoplazmatickú časť. Katalytická α-podjednotka obsahuje 10 transmembránových helixov vytvárajúcich 3 domény – A (Actuator), P (Phosphorylation) a N (Nukleotid-binding). Transport je spojený so zmenou konformácie proteínu. Proteín v E1 konformácii s naviazaným ATP má vysokú afinitu k 3 Na^+. Hydrolýza naviazaného ATP iniciuje zmenu konformácie na E2, čo má za následok uvoľnenie 3 Na^+ do extracelulárneho priestoru. E2 konformácia má vysokú afinitu k 2 K^+ a fosfátu. Uvoľnenie fosfátu z E2 konformácie umožňuje naviazanie ATP, pričom dôjde k uvoľneniu 2 K^+ do cytoplazmy, vráteniu pumpy do E1 konformácie a začína sa nový cyklus *(Gadsby et al. 2012)* (Obr. 7B*)*. V živočíšnych bunkách sa vyskytuje v 4 izoformách, ktoré sa líšia α-podjednotkami, pričom α1 je prítomná vo všetkých bunkách, α2 je exprimovaná v svalovom tkanive *(Shelly et al. 2004)*, kde sa podieľa na kontrakcii svalu a v srdci *(Yuen et al. 2017),* ale bola nájdená aj v astrocytoch *(Mann et al. 2022)*, Izoforma α3 sa nachádza predovšetkým v mozgu, konkrétne v neurónoch *(Bøttger et al. 2011)*, α4 je špecifická pre spermie, kde bolo preukázané, že má vplyv na ich pohyblivosť *(Numata et al. 2022)*.

β-podjednotka má dôležitú úlohu pri transporte z ER a správnom zakotvení α-podjednotky do plazmatickej membrány, čím ju chráni pred degradáciou *(Rajasekaran et al. 2004)*. Ďalej bolo preukázané, že ovplyvňuje afinitu Na^+ a K^+ k ich väzbovým miestam *(Crambert et al. 2000)*. γ-

podjednotka, inak označovaná aj FXYD (Phenyl-X-Thyrosin-Aspartat) proteín, je špecifická pre niektoré tkanivá, ako sú napríklad obličky, srdce alebo svaly *(Therien et al. 2001)*.



Obr.7: (A) Štruktúra Na^+/K^+-ATPázy v živočíšnej bunke. Zelenou je vyznačená α- podjednotka, oranžovou je vyznačená β-podjednotka a fialovou γ-podjednotka (prevzaté z *PDB kód 3A3Y*) (B) Zjednodušený cyklus Na^+/K^+-ATPázy. Zelenými guličkami sú znázornené ióny Na^+, oranžové predstavujú ióny K^+ (prevzaté z *Gadsby et al. 2012)*

Princípy regulácie Na^+/K^+-ATPázy prostredníctvom interakcie s ďalšími proteínmi boli študované aj pomocou heterológnej expresie ich podjednotiek v kvasinkách a dvojhybridovom systéme. Boli identifikované 2 interakčné partneri – Ral-GTPázy *(Bhullar et al. 2007)* a TD1 (Transdermal protein 1) *(Wang et al. 2015)*, pričom oba sa viažu na β1-podjednotku Na^+/K^+-ATPázy a ovplyvňujú tak jej aktivitu.

5.2 Symportéry monovalentných katiónov

Prvým typom zo skupiny kotransportérov monovalentných katiónov je Na^+-K^+-Cl^- (NKCC). Transport je elektroneutrálny, 2 Cl^- sú cez membránu translokované spolu s 1 Na^+ a 1 K^+ *(Gamba 2005)*. V organizme sa vyskytuje v dvoch izoformách. NKCC1 je 1991 AA dlhý proteín zložený do 12 transmembránových domén *(Chew et al. 2019)*. Je lokalizovaný na bazolaterálnej strane epiteliálnych buniek. Napriek tomu, že je NKCC prítomný vo všetkých bunkách, nie je jeho prítomnosť esenciálna pre život bunky. Bolo preukázané, že jeho neprítomnosť môže viesť napríklad ku strate sluchu *(Delpire et al. 1999)* alebo neplodnosti *(Pace et al. 2000)*. Okrem iného NKCC1 plní funkciu ako hlavný Cl^- importér v neurónoch, kde sa podieľa na udržiavaní Cl^- elektrochemického gradientu v nedostatočne vyvinutých neurónoch a periférnych senzorických neurónoch *(Payne et al. 2003; Yamada et al. 2004)*. NKCC2 izoforma je 1100 AA dlhá a nachádza sa na apikálnej strane epiteliálnych buniek. Je charakteristická pre vzostupné rameno Henleo kľučky, kde sa podieľa na resorpcii soli *(Castrop a Schießl 2014)*. Substrátová špecifita a funkcia NKCC2 bola študovaná

pomocou heterológnej expresie v kvasinke *S. cerevisiae*. Ľudský NKCC2 bol schopný nahradiť funkciu vakuolárneho symportéra K^+-Cl^- Vhc1, čo je analóg NKCC2 v kvasinkových bunkách v regulácii homeostázy K^+ a Na^+ *(Petrezselyova et al. 2013a)*.

Na^+-Cl^- kotransportér (NCC) je hlavným komponentom dráhy resorpcie v distálnom stočenom kanáliku obličiek. Je zložený z 1023 AA, ktoré spoločne vytvárajú 12 transmembránových domén *(Gamba et al. 1993)*. Hlavnú úlohu plní v regulácii krvného tlaku *(Cruz et al. 2001),* ale zúčastňuje sa aj na resopcii Na^+ *(Sandberg et al. 2006)*. NCC je aktivovaný renin-angiotensinom a naopak – negatívne regulovaný je potravou s vysokým obsahom K^+ *(Hoorn et al. 2020)*.

K^+-Cl^- (KCC) je elektroneutrálny symportér, ktorý prenáša 1 K^+ a 1 Cl^- cez plazmatickú membránu po smere gradientu von z bunky. Prítomnosť KCC bola preukázaná v rôznych tkanivách, ako napríklad astrocyty *(Ringel a Plesnila 2008)*, srdce *(Antrobus et al. 2012)* alebo v rakovinových bunkách *(Hsu et al. 2007)*. V organizme je prítomný v 4 izoformách: KCC1 je prvou objavenou izoformou s dĺžkou 1085 AA, ktorá je prítomná takmer vo všetkých bunkách *(Gillen et al. 1996)*. KCC2 je prítomná v centrálnej nervovej sústave, kde sa podieľa na exporte chloritových aniónov von z bunky *(Silayeva et al. 2015)*. Spolupracuje s NKCC transportným systémom, ktorý transportuje Cl^- do bunky a spoločne sa takto podieľajú na regulácii hladiny Cl^- v neurónoch *(Zhang et al. 2021)*. KCC3 je najviac exprimovaný v bunkách obličiek, kde má hlavnú funkciu v regulovaní bunkového objemu pri transepiteliálnom transporte solí *(Mercado et al. 2005)*. Izoforma KCC4 je prítomná napríklad v kostnej dreni, srdci, pľúcach, pankrease alebo mozgu, kde sa podobne ako KCC3 podieľa na regulácii bunkového objemu *(Mount et al. 1999)*.

Posledným kotrasportérom z tejto skupiny je Na^+-I^- transportér (NIS). U ľudí dosahuje tento proteín dĺžku 643 AA *(Smanik et al. 1996; 1997)*. Stoichiometria Na^+-I^- transportu 2:1 dokáže transportovať aj iné anióny, ako napríklad NO^{3-}, BF^{4-} alebo SCN^- *(Eskandari et al. 1997)*. Vyskytuje sa v štítnej žľaze a ďalších extra-tyreiodálnych tkanivách, kde sa podieľa na transporte jódu, a tak zaujíma kľúčovú úlohu pri syntéze hormónov štítnej žľazy. Tie sú dôležité pri vývoji centrálnej nervovej sústavy v ranom štádiu vývoja *(Portulano et al. 2014)*.

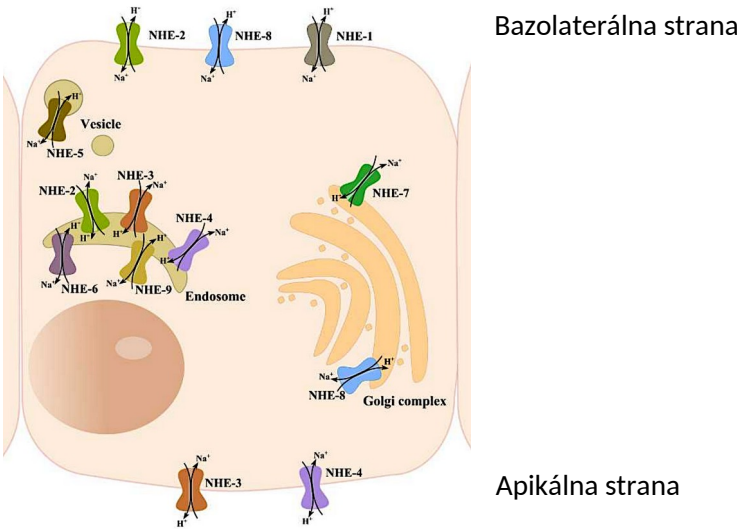
5.3 Antiportéry monovalentných katiónov

Na^+/H^+ antiportéry zdieľajú rovnakú transmembránovú topológiu nazývanú NhaA fold. Prvýkrát bol opísaný na základe kryštalickej štruktúry prokaryotického antiportéra NhaA prítomného v plazmatickej membráne *Escherichia coli.* Bakteriálny antiportér NhaA transportuje $2H^+$ a Na^+ a na základe tohto transportu reguluje bunkové pH a koncentráciu Na^+ v bunke *(Dwivedi et al. 2016)*. Na základe experimentov s NhaA v *E. coli* bolo možné charakterizovať štruktúru tohto foldu v aktívnej forme *(Winkelmann et al. 2022)*. Skladá sa z 12 transmembránových helixov a jedinečnosťou tohto komplexu je postavenie helixu IV a XI. Tieto dva helixy sú v štruktúre lokalizované oproti sebe a v membráne dochádza k ich kríženiu vďaka rozvoľneniu oboch α-helixov a vytvára sa tak miesto na naviazanie transportovaného katiónu *(Winkelmann et al. 2022)*.

Eukaryotické antiportéry Na^+/H^+ (NHE) sú kódované génmi rodiny *SLC9*. Rozdeľujeme ich do 3 skupín: SLC9A (NHE1-9), SLC9B (NHA1, NHA2), SLC9C (SLC9C1, SLC9C2). Tieto transportné proteíny sú prítomné v organizmoch všetkých vyšších eukaryotov v plazmatickej membráne, ale aj v membránach vnútorných organel *(Donowitz et al. 2013)*. Smer transportu katiónov je daný nastavením ich gradientu cez membránu. Antiportéry tohto typu pri kvasinkách a rastlinách, ktoré exportujú intracelulárny Na^+ výmenou za extracelulárny H^+, zatiaľ čo antiportéry vyšších eukaryotov exportujú intracelulárny H^+ za súčasného importu Na^+. Ale ľudské Na^+/H^+ antiportéry exprimované v bunkách kvasiniek transportujú v opačnom smere ako v živočíšnych bunkách v dôsledku nastavenia gradientu H^+ cez plazmatickú membránu *(Flegelova a Sychrova 2005; Flegelova et al. 2006)*. Táto skupina transportérov je podrobnejšie opísaná v nasledujúcich kapitolách spolu s poruchami ich funkcie a vplyvom na ľudský organizmus.

5.3.1 SLC9A

Prvou a najpočetnejšou skupinou SLC9 transportérov sú SLC9A Na^+/H^+ antiportéry. Ľudský genóm kóduje 9 izoforiem tohto génu. NHE1 je lokalizovaný v plazmatickej membráne. Izoformy NHE2 – NHE4 sú primárne lokalizované v plazmatickej membráne, ale môžeme ich nájsť aj v membráne recyklujúcich endozómov. NHE5 je tkanivovo špecifický pre bunky neurónov v mozgu. NHE6 – NHE9 sú intracelulárne antiportéry vyskytujúce sa na membránach bunkových organel *(Martins et al. 2014)* (Obr. 8).



Obr. 8: Schematické zobrazenie lokalizácie NHE izoforiem v epiteliálnej bunke (prevzaté z *Martins et al. 2014)*

NHE1 bol v roku 1989 prvým identifikovaným proteínom zo skupiny NHE *(Sardet et al. 1989)*. Heterológnou expresiou NHE1 v kvasinkách bolo umožnené bližšie charakterizovať jeho štruktúru a funkcie *(Flegelova et al. 2006; Moncoq et al. 2008)*. Je zložený z 815 AA rozdelených do dvoch domén. Prvou je katalytická transmembránová doména a druhou je regulačná C-terminálna doména, ktorá je kompletne intracelulárna *(Lee et al. 2013)*. Je exprimovaný takmer vo všetkých bunkových

typoch na bazolaterálnej membráne, kde sa podieľa na udržiavaní vnútrobunkového pH, bunkového objemu, je regulátorom bunkového cyklu *(Putney a Barber 2003),* proliferácie a na rezistencii bunky voči apoptóze *(Wu et al. 2004)*.

NHE2 je epiteliálnym Na^+/H^+ antiportérom, ktorý je 815 AA dlhý. V tele sa vyskytuje predovšetkým na bazolaterálnej strane žalúdka, v tenkom čreve a hrubom čreve, kde sa zúčastňuje na resorpcii Na^+ či na oprave poškodeného epitelu *(Xue et al. 2011)*. V menšej miere je zastúpený v svalstve, mozgu, maternici, pľúcach či srdci *(Orlowski a Grinstein 2004)*. Pomocou heterológnej expresie živočíšneho NHE2 v kvasinkovom modeli bolo prvýkrát preukázané, že transportuje aj katióny K^+ *(Flegelova a Sychrova 2005)*.

NHE3 tvorí 843 AA *(Brant et al. 1995)*. Od ostatných sa odlišuje recykláciou medzi apikálnou stranou epiteliálnych buniek a endozomálnymi kompartmentmi a plní tak funkciu v oboch týchto systémoch *(D'Souza et al. 1998)*. U ľudí sa v gastrointestinálnom trakte podieľa na absorpcii Na^+ *(Zachos et al. 2009)*. To, že má túto funkciu, podporuje aj výskum vedený na myšiach, keď mali myši s deletovaným *NHE3* génom problém so zadržiavaním vody v organizme *(Zachos et al. 2009)*. NHE3 bol študovaný v kvasinkách, kde ho exprimovali v kmeni citlivom na katiónové soli. Výsledkom bolo zvýšenie tolerancie buniek voči sodíku aj draslíku, čo odhalilo, že dokáže transportovať katióny Na^+ aj K^+ *(Flegelova et al. 2006)*.

SLC9A4 kóduje proteín NHE4 dlhý 798 AA, ktorý bol prvýkrát klonovaný zo žalúdka myši *(Orlowski et al. 1992)*. NHE4 vykazuje najvyššiu expresiu v parietálnych bunkách žalúdka, pankreatických bunkách a obličkách *(Bookstein et al. 1994)*.

NHE5 je posledným NHE exprimovaným v plazmatickej membráne. Je 896 AA dlhý *(Klanke et al. 1995)* a zdieľa 50 % homológiu s NHE3 *(Attaphitaya et al. 1999)*. Primárne sa nachádza v centrálnej nervovej sústave, konkrétne v neurónoch, kde sa podieľa na regulácii ich pH *(Diering et al. 2009)*.

NHE6 je ďalším zástupcom NHE antiportérov v membránach vnútorných organel. Dĺžka proteínu je 669 AA s predikovanou štruktúrou 13 transmembránových helixov (databáza Alpha fold) (*Varadi et al. 2022))*. Transkript bol nájdený v tkanivách s vysokým obsahom mitochondrií v bunkách ako svaly, srdce alebo mozog *(Numata et al. 1998)*.

NHE7 bol prvýkrát klonovaný v roku 2001. Proteín je dlhý 725 AA, pričom vykazuje 70 % homológiu s NHE6, ale len 25 % homológiu s ostatnými NHE. Je prítomný takmer vo všetkých sekrečných tkanivách, ako je napríklad žalúdok, pankreas, slinné žľazy, mliečne žľazy alebo prostata *(Numata a Orlowski 2001)*. Hlavnú funkciu plní v trans-GA, kde sa podieľa na udržiavaní pH okysľovaním lumenu *(Galenkamp et al. 2020)*.

SLC9A8 kóduje ľudský NHE8 proteín. Obsahuje 576 AA, pričom zdieľa len z 24 % homológiu s ostatnými NHE. V bunke je prítomný všade, najmä v Golgiho aparáte *(Nakamura et al. 2005)*, v sliznici čreva v ranej fáze vývoja *(Becker et al. 2007)* a podieľa sa na produkcii testosterónu *(Xu et al. 2015)*.

Posledným je NHE9 transportér zložený z 645 AA usporiadaných v 13 transmembránových doménach *(Winkelmann et al. 2020)*. V organizme je prítomný najmä v mozgu, kde je spájaný s ochorením ADHD *(de Silva 2003; Kondapalli et al. 2013)*, či v neskorých recyklujúcich endozómoch *(Nakamura et al. 2005)*.

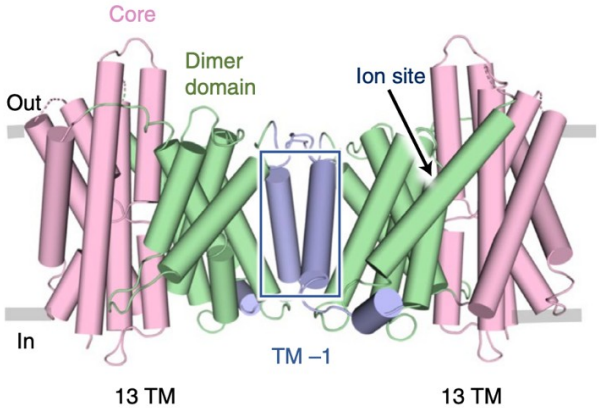
5.3.2 SLC9B

Pri živočíšnych bunkách došlo k nedávnemu objavu ďalšej skupiny antiportérov SLC9. V porovnaní s izoformami NHE 1 – 9 vykazujú SLC9B vyššiu homológiu s prokaryotickými NhaA *E. coli,* podľa čoho boli aj pomenované izoformy NHA1 a NHA2.

NHA1 je vysoko konzervovaný proteín dlhý 515 AA, ktorého gény sú prítomné vo všetkých vyšších eukaryotoch *(Brett et al. 2005a)*. V roku 2006 bol tento gén prvýkrát klonovaný pomocou metódy PCR a zároveň sa odhalilo, že je lokalizovaný predovšetkým v spermiách *(Ye et al. 2006)*.

Druhým je NHA2. Identifikovaný bol v roku 2008 v osteoklastoch a mitochondriách *(Battaglino et al. 2008; Fuster et al. 2008)*. Trojrozmerná štruktúra NHA2 proteínu z bizóna (ale skráteného o hydrofilný N-koniec) bola nedávno rozlúštená pomocou kryoelektrónovej mikroskopie a expresie v kvasinke *S. cerevisiae* ako prvého eukaryotického antiportéra pri Na^+/H^+ *(Matsuoka et al. 2022)*. Tvorí ho 14 transmembránových domén, v membráne sa nachádza ako homodimér, pričom každá monomérna jednotka sa skladá z transportnej a dimerizačnej podjednotky (Obr. 9).

Výsledky publikované koncom minulého roka priniesli mnoho nových poznatkov o ľudskom ortológu NHA2. Bola optimalizovaná jeho expresia v *S. cerevisiae* a bolo identifikovaných niekoľko aminokyselinových zvyškov, ktoré sa podieľajú na stabilizácii, substrátovej špecifite a transportnej aktivite NHA2. Bolo zistené, že vysoko konzervovaný prolín 246, ktorý je lokalizovaný v jadre proteínu, sa podieľa na selekcii iónov. Zámena tohto prolínu za inú aminokyselinu viedla ku zmene substrátovej špecifity a zároveň modifikovaný NHA2 vykazoval vyššiu rezistenciu voči phoretínu (špecifický NHA2 inhibítor *(Kondapalli et al. 2012)*). Ďalším zaujímavým zistením je, že podobne ako pri transmembránovom proteíne 165 v Golgiho aparáte (viz. kap. 6.4) je N-terminálny segment NHA2 autoinhibičného charakteru. Zmena negatívne nabitých aminokyselinových zvyškov v tomto segmente viedla k zníženej schopnosti proteínu transportovať substráty, naopak – pri skrátení N-konca o viac než polovicu došlo k zdvojnásobeniu transportnej aktivity *(Velázquez et al. 2022)*.



Obr. 9: Štruktúra NHA2ΔN. Ružovo je zafarbená transportná podjednotka, zelená je dimerizačná podjednotka, fialovou je vyznačený prvý transmembránový helix (prevzaté z *Matsuoka et al. 2022)*

5.3.3 SLC9C

Antiportéry rodiny SLC9C sú primárne exprimované v spermiách. Kódujú 1120 AA s predikovanou topológiou 14 trasmembránových segmentov *(Wang et al. 2003)*. Vyskytujú sa v dvoch izoformách: SLC9C1, SLC9C2. Aktivita niektorých z nich je regulovaná membránovým potenciálom. Pri myšiach je SLC9C1 aktivovaný hyperpolarizáciou plazmatickej membrány a závisí od pH, podobne ako pri ježovke purpurovej *(Windler et al. 2018; Hernández-Garduño et al. 2022)*. Na druhej strane u ľudí nebola pozorovaná aktivácia SLC9C1 hyperpolarizáciou plazmatickej membrány, čo naznačuje, že regulačné mechanizmy SLC9C sú medzidruhovo odlišné. Na pochopenie funkcie a mechanizmu účinku sú potrebné ďalšie štúdie, najmä expresie NHE v heterológnych systémoch *(Hernández-Garduño et al. 2022)*.

Ku SLC9C2 existuje málo funkčných dát, existuje však predpoklad, že sa nachádzajú vo vaječníkoch, koži, spojivovom tkanive *(Donowitz et al. 2013)*. Aktivita tohto antiportéra v hlavičke spermií bola dokázaná len nedávno. Bližšie je jeho charakteristika opísaná v kap. 6.3 *(Gardner a James 2023)*.

6. Molekulárne podstaty ochorení súvisiacich s poruchami homeostáze

Homeostáza je dynamický proces, ktorým si organizmy udržiavajú vnútornú stabilitu a prispôsobujú sa vonkajším podmienkam. Poruchy homeostázy vedú k mnohým ochoreniam. Kvasinka *S. cerevisiae* sa vďaka svojim vlastnostiam stala dôležitým modelovým organizmom na štúdium procesov spojených s poruchami homeostázy. Poznatky získané v kvasinkách často dopomohli k objasneniu ekvivalentných mechanizmov prebiehajúcich u ľudí. V nasledujúcich podkapitolách sú charakterizované ochorenia súvisiace s narušením funkcie jednotlivých transportérov katiónov.

6.1 Patológie spojené s SLC9A

V predošlej kapitole boli popísané štruktúry jednotlivých izoforiem NHE 1 – 9, pričom každá izoforma je špecifická pre určitý typ tkaniva, kde plní najrôznejšie funkcie. Všetky majú spoločné, že sa podieľajú na odstraňovaní H^+, ktorý vzniká metabolickými procesmi v bunke.

6.1.1 NHE1

NHE1 je za zníženého intracelulárneho pH aktivovaná nadbytočnými protónmi, aby došlo k vyrovnaniu koncentrácií a vyrovnaniu pH. Dysregulácia NHE1 je charakteristickým znakom buniek, ktoré podliehajú metastázovaniu. Protóny vylučované NHE1 do extracelulárneho prostredia spôsobujú jeho okysľovanie, čo má za následok aktiváciu proteáz. Proteázy sekretované nádorovými bunkami sú následne zodpovedné za remodeláciu extracelulárneho matrixu, čo je jedným z kritických znakov metastázovania buniek *(Stock et al. 2008)*.

Existuje určitá súvislosť medzi NHE1 a rakovinou prsníka. Výskum z roku 2014 preukázal súvislosť NHE1 s invazivitou a schopnosťou migrácie nádorových buniek rakoviny prsníka. Porovnaním vysoko invazívnych buniek MDA-MB-231 s rovnakými bunkami, ktorým chýbal gén pre NHE1, sa ukázalo, že v bunkách bez NHE1 sa výrazne znížila ich migračná a invazívna schopnosť. Tento fakt podporil myšlienku využitia inhibítorov NHE1 na potenciálne zvýšenie úspešnosti chemoterapeutickej liečby *(Amith et al. 2014)*.

Genetické ochorenie, ktoré je spájané s týmto antiportérom je Lichtenstein-Knorr syndróm. Je to autozomálne recesívne ochorenie, ktoré je charakteristické zámenou glycínu na pozícii 305 za arginín, čo má za následok stratu aktivity NHE1 *(Guissart et al. 2015)*. Najčastejšie postihuje mozoček, spinocerebelárnu dráhu miechy a čiastočne zmyslové nervy. Fenotypovým prejavom je strata sluchu, ktorá je spôsobená zmenou pH endolymfatického vaku vo vnútornom uchu. Medzi ďalšie fenotypové prejavy patria vývojové chyby či záchvaty *(Fliegel 2021)*.

Hyperaktivita NHE1 je často spájaná so srdcovými ochoreniami, ako je napríklad ischémia, reperfúzne poškodenie alebo zlyhanie srdca. Počas ischémie dochádza k anaeróbnej glykolýze a nadprodukcii protónov. To má za následok aktiváciu NHE1 a akumuláciu veľkého množstva Na^+ vnútri bunky. Tento signál v podobe zvýšenia koncentrácie Na^+ vnútri bunky aktivuje Na^+/Ca^{2+}, Na^+ je

pumpovaný smerom von z bunky a Ca^{2+} je importovaný do bunky. V konečnom dôsledku dochádza k akumulácii Ca^{2+}, ktorý slúži ako signálna molekula pre ďalšie dráhy vedúce k bunkovej smrti. Práve inhibícia NHE1 sa považuje za cieľ terapeutických liečiv na liečbu kardiovaskulárnych ochorení *(Fliegel 2009)*.

Tento rok bola vydaná publikácia, kde je opísaná molekulárna podstata hypoxie v súvislosti s NHE1. Pri hypoxii vyvolanej vysokou nadmorskou výškou alebo chronickým ochorením pľúc dochádza ku zmene štruktúry pľúcnej vaskulárnej steny, primárne k migrácii PASMC (Pulmonary arterial smooth muscle cells). Už z predošlých štúdií je známe, že zníženie alebo strata funkcie NHE1 vedie k spomaleniu migrácie a proliferácie PASMC *(Walker et al. 2016)*. Vo fibroblastoch pri myšiach bol identifikovaný adaptérový proteín ezrín, ktorý umožňuje väzbu NHE1 a aktínových vlákien. Za hypoxických podmienok dochádza k interakcii NHE1 a SMA (smooth muscle specific α-actin) prostredníctvom ezrínu, čo má za následok migráciu a proliferáciu PASMC *(Lade et al. 2023)*.

6.1.2 NHE2 – NHE5

Jedným z najmenej preskúmaných antiportérov je NHE2, a preto ani patologický dosah na organizmus nie je úplne známy. Na odhalenie fyziologickej funkcie boli ako modelový organizmus použité myši, ktoré mali mutáciu génu NHE2. Výsledky indikovali, že delécia génu znížila životaschopnosť a sekrečnú schopnosť parietálnych buniek *(Schultheis et al. 1998)*. Transportér NHE2 je dôležitým komponentom aj pri oprave poškodených epitelov. TFF2 (Trefoil factor 2) je peptid, ktorý je sekretovaný do lúmenu žalúdka a čriev, pričom hlavnou funkciou je ochrana epitelov a podpora migrácie buniek v prípade ich poškodenia. Aktívny TFF2 stimuluje NHE2 a umožňuje tak opravu epitelov *(Xue et al. 2011)*.

CSD (Congenital sodium diarrhea) alebo aj sodíková hnačka je vzácny patologický stav, ktorý je spôsobený mutáciou génu *SLC9A3 (Janecke et al. 2015)* alebo *GUCY2C (Fiskerstrand et al. 2012)*. Prejavom ochorenia je vodnatá hnačka, ktorá je charakteristická vysokým obsahom Na^{+} v stolici. Medzi negatívne regulátory NHE3 patrí dopamín, ktorý prostredníctvom signálnej dráhy PKA (Protein kinase A) redukuje prítomnosť NHE3 na bunkovom povrchu *(Hu et al. 2017)*. Zaujímavosťou je, že ochorenie môže byť pozorované v plode v poslednom trimestri tehotenstva. Medzi fenotypové prejavy patrí zvýšené množstvo plodovej vody, črevné dilatácie alebo infekcia plodu *(Dimitrov et al. 2019)*. Prítomnosť NHE3 bola zistená aj v semenníkoch myší. Existuje teória, že sa pravdepodobne zúčastňuje na formovaní akrozómu počas spermatogenézy. Myši, ktorých gén SLC9A3 bol zmutovaný, vykazovali nižšiu produkciu spermií a defekty pri formovaní akrozómu. Molekulárna podstata je však stále neznáma a je predmetom ďalších výskumov *(Wang et al. 2017)*.

NHE4 je prítomný v bazolaterálnej membráne parietálnych buniek, kde sa spolu s antiportérom $Cl^{-}/HCO3^{-}$ podieľa na regulácii sekrécie žalúdočných kyselín. Ich funkcia nie je zatiaľ objasnená. Patológiou spojenou s týmto antiportérom je hypochlórhydria, keď pri absencii génu NHE4 myši vykazovali znížené množstvo žalúdočných kyselín, redukovaný počet parietálnych buniek

a naopak – zvýšené množstvo buniek sliznice. Tento patologický stav bol identifikovaný pri myšiach a nie je potvrdený súvis hypochlórhydrie u ľudí s defektom NHE4 *(Gawenis et al. 2005)*. NHE4 bol lokalizovaný vo vzostupnom ramene Henleo kľučky, kde plní úlohu pri vylučovaní amoniaku *(Bourgeois et al. 2010)*.

Štruktúrne najpríbuznejšou izoformou NHE3 je NHE5. Zdieľajú až 50 % aminokyselinovej sekvencie, majú podobné regulačné mechanizmy a subcelulárnu lokalizáciu. Obe sa nachádzajú v endozómoch aj v plazmatickej membráne, pričom medzi nimi cirkulujú *(Szászi et al. 2002)*. NHE5 je primárne lokalizovaný v neurónoch v mozgu. Ukázalo sa, že NHE5 negatívne reguluje rast dendritických tŕňov po acidifikácii synaptickej štrbiny *(Diering et al. 2011)*. V neposlednom rade plní určitú úlohu aj v ochrane neurónov pred acidózou počas metabolického stresu *(Jinadasa et al. 2014),* alebo pri invazivite a proliferácii nádorových buniek *(Kurata et al. 2019)*.

6.1.3 NHE6 – NHE9

NHE6 je endozomálny transportér, ktorý je v posledných desaťročiach spájaný s mnohými patológiami neurodegeneratívneho charakteru. Ortológom k NHE6 v kvasinkových bunkách je Nhx1, ktorý plní úlohu vo fúzii multivezikulárnych teliesok s lysozómom. Stratou *NHX1* nedochádza k správnemu fúzovaniu multivezikulárnych teliesok s membránou lysozómu *(Karim a Brett 2018)*. Vzhľadom na to, že NHE6 a NHE9 dokážu nahradiť funkciu Nhx1 v kvasinkovej bunke, môžeme predpokladať, že funkcie endozomálnych NHE sú naprieč eukaryotickými organizmami vysoko konzervované *(Bowers et al. 2000; Karim a Brett 2018)*.

Mutácie v ľudských ortológoch kvasinkového Nhx1, NHE6 a NHE9 sú spájané s neurodegeneratívnymi ochoreniami. Prvým ochorením je Christiansonov syndróm, čo je X-viazané neurodegeneratívne ochorenie, ktoré súvisí s mutáciou v NHE6 *(Pescosolido et al. 2014)*. Strata NHE6 bola skúmaná pri myšiach. Mutácia spôsobuje hyperacidifikáciu endozómov spôsobenú únikom protónov z endozómov, čo vedie k defektom pri dozrievaní *(Ouyang et al. 2013)* a fúzovaní endozómov *(Pescosolido et al. 2021)*. Medzi ďalšie ochorenia súvisiace s dysreguláciou NHE6 patrí Alzheimerova choroba *(Prasad a Rao 2015)* alebo poruchy autistického spektra *(Schwede et al. 2014)*.

Len nedávno sa preukázalo, že genetické mutácie v *SLC9A7* spôsobujú nesyndromickú formu mentálneho postihnutia. Najväčší vplyv má táto mutácia na trans-GA, kde to vedie k zníženej acidifikácii a narušeniu post-translačnej úpravy NHE7, ktorá je esenciálna pre jej správne fungovanie *(Khayat et al. 2019)*. Funckia NHE7 je spájaná s nádorovými ochoreniami. Zvýšená expresia NHE7 v nádorových bunkách rakoviny prsníka preukázateľne zvýšila invazivitu a adhéziu buniek medzi sebou *(Numata 2011)*. V najnovšom článku súvisiacom s rakovinou pankresu bola vyslovená myšlienka, že Golgiho aparát pôsobí ako „rezervoár protónov“ v nádorových bunkách. Galenkamp dokázal, že potlačenie aktivity NHE7 má za následok acidifikáciu cytozolu a spomalenie rastu tumoru *(Galenkamp et al. 2020)*.

NHE8 plní v organizme najrôznejšie funkcie takmer vo všetkých tkanivách. Vyskytuje sa v celom gastrointestinálnom trakte, pričom najvyššia exprimácia bola detekovaná v tenkom a hrubom čreve, kde má hlavnú úlohu v absorpcii sodíka *(Xu et al. 2008)*. Expresia NHE8 sa dokonca preukázateľne mení s vekom a zároveň je závislá od pohlavia *(Xu et al. 2011)*. Úloha NHE8 v samčom rozmnožovacom trakte je veľmi podobná ako pri oboch SLC9C. Myši s chýbajúcim génom *SLC9A8* produkovali spermie, ktorým kompletne chýbal akrozóm a vykazovali nižšiu pohyblivosť. Navyše mitochondrie, ktoré tvoria začiatok bičíka, boli lokalizované v hlave a ich hlavička bola zaoblená. Všetky tieto abnormality viedli k neplodnosti, u ľudí je nazývaná aj globozoospermia *(Oberheide et al. 2017)*.

NHE9 je spojený hlavne s patológiami autistického spektra *(Kondapalli et al. 2013)*, roztrúsenou sklerózou *(Liu et al. 2017)* či hyperaktivitou spojenou s poruchou pozornosti *(de Silva 2003)*. S NHE9 interaguje viac než 100 známych proteínov. Ich charakterizáciou sa preukázal podiel NHE9 na oxidačnom strese a mitochondriálnej dysfunkcii, čo sú faktory podmieňujúce už zmienené ochorenia *(Zhang-James et al. 2019)*. Zapojený je aj v imunitnom systéme, konkrétne pri maturácii fagozómov. Fagozómy počas maturácie získavajú proteíny prostredníctvom fúzie s endozómami, kde NHE9 reguluje transport protónov, a tak priamo ovplyvňuje ich pH vnútri bunky. Nedávne štúdie na makrofágoch ukázali vysokú expresiu NHE9, ktorá sa signifikantne znížila, ak boli makrofágy vystavené bakteriálnej infekcii *(Shamroukh et al. 2022)*.

6.2 Patológie spojené s SLC9B

V bičíku spermií myší bol identifikovaný NHA1, kde má spolu s NHA2 význam pre pohyblivosť spermií. Spermie s deletovaným NHA1 vykazovali nižšiu pohyblivosť, ale k úplnej neplodnosti nedošlo. Naopak, deletovanie oboch NHA1 aj NHA2 viedlo k úplnej neplodnosti jedinca (*Chen et al. 2016)*. Zaujímavá je nedávna štúdia, ktorá preukázala, že metylácia NHA1 môže predikovať intoleranciu plodu voči pôrodu, čo je stav vyžadujúci cisársky rez *(Knight et al. 2018)*.

Kvasinky *S. cerevisiae* boli využité aj v súvislosti s objasnením funkcie ľudského NHA2. Jeho prítomnosť bola preukázaná v mnohých tkanivách, ale napriek tomu jeho fyziologická funkcia je stále málo známa. Jeho funkcia závisí od lokalizácie v organizme. Najdôležitejšiu úlohu má v distálnych nefrónoch, kde plní duálnu funkciu v resorpcie a sekrécie solí a podieľa sa na udržovaní stáleho arteriálneho tlaku. Vysoká spätná absorpcia sodíka v nefrónoch je jedným z najväčších rizikových faktorov hypertenzie *(Kondapalli et al. 2012; 2017)*. NHA2 sa nachádza aj v β-bunkách pankreasu, kde plní úlohu ako regulátor sekrécie inzulínu. V prípade mutácie v NHA2 mutované kmene myší vykazovali zníženú sekréciu inzulínu pri glukózovej záťaži *(Deisl et al. 2013)*. Na základe tohto zistenia bol nedávno identifikovaný jednonukleotidový polymorfizmus v géne *NHA2*, bol identifikovaný ako nový lokus spájaný s diabetom typu 2 u ľudí *(Liu et al. 2018)*. Efekty mutácií ovplyvňujúcich aktivitu NHA2 a s tým aj spojené patológie možno študovať aj pomocou funkčnej expresie NHA2 v kvasinkách *(Velázquez et al. 2022)*.

6.3 Patológie spojené s SLC9C

Transportéry skupiny SLC9C patria medzi málo preskúmané antiportéry a ich fyziologická funkcia je v posledných rokoch čoraz viac odhaľovaná. Fyziologickú úlohu plnia hlavne v regulácii pH spermií a ich schopnosti oplodniť vajíčko *(Wang et al. 2003)*.

Predpokladom je, že rovnako ako ostatné SLC9 antiportéry sa podieľajú na stabilizácii pH spermií a ich aktivácii v neskoršej fáze oplodnenia. Ak dôjde k mutácii tohto génu, dôjde k spomaleniu alebo strateniu pohyblivosti spermií – asthenozoospermia, čo je najrozšírenejšou príčinou mužskej neplodnosti *(Cavarocchi et al. 2021)*.

Pri myšiach a u ľudí bola preukázaná expresia izoformy SLC9C1 v bičíku spolu s ďalšími NHE *(Zhang et al. 2017),* mimoriadnym zistením však bolo, že SLC9C2 je jediným známym NHE lokalizovaným v hlavičke spermií, konkrétne v akrozomálnej membráne spermií. Jeho úloha v hlavičke spermií zatiaľ ostáva neznáma, môžeme však predpokladať, že sa zúčastňuje na regulácii pH pri zmene membránového potenciálu v dôsledku maturačných zmien/kapacitácie *(Gardner a James 2023)*.

Aj keď SLC9C2 je charakteristickým transportérom v spermiách, expresia SLC9C2 spolu s NHE1 bola preukázaná aj v srdci myší a ľudí. Pérez-Carrillo spolu so svojím tímom porovnali RNA-seq data vzorky zdravého srdcového tkaniva so vzorkami srdcového tkaniva po prekonaní zástavy srdca. Hlavným zámerom bolo charakterizovať efekt SGLT2i (sodium/glucose cotransporter 2 inhibitors) na expresiu mRNA SLC9C2. Využili empagliflozín, ktorý sa bežne využíva pri liečbe pacientov po zástave srdca. Preukázali, že SLC9C2 má význam pri srdcovej dysfunkcii a jeho hladina bola znížená po liečbe empagliflozínom. Na základe týchto poznatkov môžeme uvažovať o SLC9C2 ako o cieli pre SGLT2i pri liečbe srdcových dysfunkcií *(Pérez-Carrillo et al. 2022)*.

6.4 Ďalšie patológie spojené s transportom iónov

Poslednú časť tejto práce sme venovali trom príkladom využitia kvasiniek ako modelového organizmu pri výskume transportérov bivalentných katiónov a aniónov.

Prvým príkladom je draselný importér Kir2.1, ktorý hrá dôležitú úlohu v udržiavaní membránového potenciálu *(Hibino et al. 2010)*. Má tetramérnu štruktúru, každá podjednotka je zložená z transmembránovej domény, ktorú tvoria dva α-helixy, a z cytoplazmatickej domény s N- a C-koncom. Alfa-helixy sú od seba oddelené selektívnym filtrom pre katióny K^+ *(Fernandes et al. 2022)*. Poruchy jeho funkcie sú najčastejšie spájané s dedičným ochorením Andersenov-Tawilov syndróm, ktorého hlavnou príčinou je mutácia v géne pre Kir2.1, *KCNJ2 (Gélinas et al. 2017)*. Pomocou heterológnej expresie v kvasinkách *S. cerevisiae* boli charakterizované transportné vlastnosti myšieho ortológu Kir2.1. V kmeni, v ktorom chýbali draselné transportéry Trk1, Trk2 a Tok1 (Obr. 3), bola expresia myšieho ortológu schopná obnoviť rast buniek v prostredí s nedostatkom draslíka a bolo potvrdené, že katióny Cs^+, Ag^+ a Ba^{2+} inhibujú jeho transportnú aktivitu *(Kolacna et al. 2005; Hasenbrink et al. 2005)*. Kvasinky využili aj na identifikáciu faktorov, ktoré regulujú transport tohto

draselného kanála. Skúmaním schopnosti rastu kvasinkových buniek s exprimovaným živočíšnym Kir2.1 boli objavené špecifické α-arestíny, ktoré sa podieľajú na prenose Kir2.1 do plazmatickej membrány a zvyšujú jeho transportnú aktivitu *(Hager et al. 2018)*.

Za zmienku určite stojí aktuálny výskum kAE1 (kidney anion exchanger 1), ktorý sa nachádza v bazolaterálnej membráne α-ICs (α-intercalated cells) v obličkách zložených zo 14 transmembránových domén. Poruchy v kAE1 vedú k patologickému stavu známemu ako distálna renálna tubulárna acidóza (dRTA) *(Arakawa et al. 2015)*. Sarder et al. úspešne plne exprimovali ľudský proteín kAE1 v kvasinke *S. cerevisiae*. Vďaka pokročilým metódam molekulárnej biológie a mikroskopie následne dokázali určiť lokalizáciu tohto exprimovaného proteínu v plazmatickej membráne kvasiniek, ako aj jeho biologickú aktivitu. Bojovali však s akumuláciou kAE1 v membránach ER, preto bolo v plazmatickej membráne lokalizované menšie množstvo tohto proteínu *(Sarder et al. 2020)*. Napriek tomu poznatky získané týmto výskumom boli následne využité na lepšie pochopenie molekulárnej podstaty degradácie nesprávne zbalených proteínov v eukaryotických bunkách. Výsledky priniesli aj sľubnú stratégiu pre funkčnú expresiu živočíšnych membránových proteínov v kvasinkách, čo môže byť využité pri štúdiu aj ďalších patológií u človeka *(Li et al. 2021)*.

Nedávno charakterizovaným membránovým proteínom je TMEM165 (Transmembrane protein 165) lokalizovaný v membráne Golgiho aparátu. Proteín je vysoko konzervovaný od baktérií, kvasiniek až po ľudí. Primárnou funkciou tohto transportéra je udržovanie homeostázy Ca^{2+} a Mn^{2+}. Patológiou spájanou s mutáciou v géne pre TMEM165 je CDG (Congenital disorders of glycosylation). CDG je vzácne dedičné metabolické ochorenie, ktoré je charakteristické defektmi v génoch zapojených do glykozylácie *(Foulquier et al. 2012)*. Kvasinky obsahujú transportér pre Ca^{2+} Gdt1 (Gcr1 dependent translation factor 1), ktorý je ortológom ľudského TMEM165. Na porovnanie funkcie týchto dvoch ortológov využili ako modelový organizmus kvasinky *S. cerevisiae*, ktoré mali deletovaný gén *GDT1* a vykazovali nižšiu odolnosť voči vyšším koncentráciám Ca^{2+} a Mn^{2+} *(Demaegd et al. 2013)*. Nedávno vyšla publikácia, v ktorej sú využité mutované kmene *S. cerevisiae,* v ktorých chýba gén *GDT1* na charakterizáciu ľudského proteínu TMEM165. Kvasinky s exprimovaným TMEM165 boli vystavované rôznym koncentráciám Ca^{2+} a Mn^{2+}, pričom bola sledovaná transportná aktivita proteínu a vplyv mutácií na jeho transportnú aktivitu. Vo výsledku bolo preukázané, že sa TMEM165 podieľa na regulácii Ca^{2+} a Mn^{2+} a fenotyp takisto potvrdil, že N-terminálna doména prítomná v TMEM165 má autoinhibičný charakter *(Stribny et al. 2020)*.

7. Záver

V posledných desaťročiach mnohé štúdie preukázali dôležitosť kvasiniek ako zjednodušeného modelu na skúmanie kľúčových bunkových procesov prebiehajúcich v ľudských bunkách, napríklad biosyntéza, transport alebo degradácia proteínov. Udržiavanie stálej koncentrácie katiónov v bunke je jedným z hlavných aspektov ich správneho fungovania. Najlepšie preskúmaným modelovým eukaryotickým organizmom je kvasinka *S. cerevisiae*. Je schopná prežiť a adaptovať sa na prostredie širokého rozsahu pH a koncentrácií katiónov, zatiaľ čo vnútri bunky sú koncentrácie katiónov a pH prísne regulované. V súčasnosti máme k dispozícii rad čiastkových poznatkov o jednotlivých transportéroch, ktoré sa podieľajú na regulácii homeostázy monovalentných katiónov pri nižších aj vyšších eukaryotov, ale informácie o ich 3D štruktúre – vzhľadom na problematickú izoláciu a purifikáciu týchto membránových proteínov – sú značne obmedzené. Aj kompletná fyziologická funkcia, regulácia a vzájomná interakcia sú stále nedostatočne objasnené. Napriek tomu výskum membránového transportu neustále napreduje a je určite zaujímavou oblasťou vedeckého bádania.

Z môjho pohľadu využitie kvasiniek ako modelového organizmu má mnoho výhod, ale stretáva sa s radom obmedzení. Vďaka kvasinkám možno charakterizovať základné princípy udržovania homeostázy katiónov v bunkách z nižších alebo vyšších eukaryotických organizmov. Ďalej sa využívajú na určenie mnohých štruktúr a charakterizáciu štruktúrnych prvkov v transportéroch katiónov, ktoré sú dôležité pre ich aktivitu. V posledných rokoch sa čoraz viac využívajú aj na cryo-EM, pomocou ktorého dokážeme rozlúštiť 3D štruktúry aj membránových proteínov.

Ako z práce vyplýva, rad závažných ochorení vzniká v dôsledku nerovnováhy v homeostáze K^+, Na^+ a pH v dôsledku narušenej funkcie jednotlivých transportérov katiónov. Heterológnou expresiou ľudských génov v kvasinkách možno charakterizovať štruktúru a funkciu týchto proteínov, ako aj vplyv na organizmus v prípade ich dysfunkcie či absencie. Expresia proteínov však nie je vždy jednoduchá a veľakrát dochádza ku komplikáciám. V prípade úspešnej expresie ľudského transportéra v kvasinkách možno tento modelový systém využiť na objasnenie podstaty ochorení spojených s daným transportérom vrátane rýchleho testovania vplyvu mutácií (SNPs – single nucleotide polymorphisms) na funkciu transportérov alebo na selekciu inhibítorov ovplyvňujúcich jeho aktivitu.

Nevýhodou kvasiniek je, že sú zjednodušeným modelom na výskum, neobsahujú zložitejšie regulačné mechanizmy, ktoré sú prítomné v živočíšnych bunkách, preto je potrebné získané poznatky ďalej prehĺbiť priamo v bunkách vyšších eukaryotov.

Hlavným cieľom mojej práce bolo preukázať dôležitosť kvasiniek ako modelového organizmu v štúdiu eukaryotických buniek a zhrnúť najnovšie poznatky o patológiách spojených s poruchami homeostázy monovalentných katiónov. Informácie a vedomosti získané písaním tejto bakalárskej práce sú nepochybne prínosné a využiteľné aj v mojom ďalšom (magisterskom) štúdiu.

8 Zoznam použitej literatúry

ALBACAR, Marcel, Lenka SACKA, Carlos CALAFÍ, Diego VELÁZQUEZ, Antonio CASAMAYOR, Joaquín ARIÑO a Olga ZIMMERMANNOVÁ, 2021. The toxic effects of Ppz1 overexpression involve Nha1-mediated deregulation of K^+ and H^+ homeostasis. *Journal of Fungi*. **7**(12), 1010.

ALBERTS, Bruce, 2015. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group.

AMITH, Schammim Ray, Jodi Marie WILKINSON, Shairaz BAKSH a Larry FLIEGEL, 2014. The Na^+/H^+ exchanger (NHE1) as a novel co-adjuvant target in paclitaxel therapy of triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget*. **6**(2), 1262–1275.

ANTROBUS, Shane P., Christian LYTLE a John A. PAYNE, 2012. K^+-Cl^- cotransporter-2 KCC2 in chicken cardiomyocytes. *American journal of physiology-cell physiology*. **303**(11), C1180–C1191.

ARAKAWA, Takatoshi, Takami KOBAYASHI-YURUGI, Yilmaz ALGUEL, Hiroko IWANARI, Hinako HATAE, Momi IWATA, Yoshito ABE, Tomoya HINO, Chiyo IKEDA-SUNO, Hiroyuki KUMA, Dongchon KANG, Takeshi MURATA, Takao HAMAKUBO, Alexander D. CAMERON, Takuya KOBAYASHI, Naotaka HAMASAKI a So IWATA, 2015. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science*. **350**(6261), 680–684.

ARIÑO, Joaquín, José RAMOS a Hana SYCHROVÁ, 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **74**(1), 95–120.

ARIÑO, Joaquín, José RAMOS a Hana SYCHROVÁ, 2019. Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*. **36**(4), 177–193.

ATTAPHITAYA, Surat, Keerang PARK a James E. MELVIN, 1999. Molecular cloning and functional expression of a rat Na^+/H^+ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(7), 4383–4388.

BAÑUELOS, María A., Ronald D. KLEIN, Susan J. ALEXANDER-BOWMAN a Alonso RODRÍGUEZ-NAVARRO, 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**(13), 3021–3027.

BAÑUELOS, María A., José RAMOS, Fernando CALERO, Valerie BRAUN a Serge POTIER, 2002. Cation/H^+ antiporters mediate potassium and sodium fluxes in *Pichia sorbitophila*. Cloning of the *PsNHA1* and *PsNHA2* genes and expression in *Saccharomyces cerevisiae*: K^+ and Na^+ transport genes of *Pichia sorbitophila*. *Yeast*. **19**(15), 1365–1372.

BAÑUELOS, María A., Hana SYCHROVÁ, Claudine BLEYKASTEN-GROSSHANS, Jean-Luc SOUCIET a Serge POTIER, 1998. The Nhal antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*. **144**(10), 2749–2758.

BATTAGLINO, Ricardo A., Lan PHAM, Leslie R. MORSE, Martha VOKES, Anupriya SHARMA, Paul R. ODGREN, Meiheng YANG, Hajime SASAKI a Philip STASHENKO, 2008. NHA-oc/NHA2: A mitochondrial cation–proton antiporter selectively expressed in osteoclasts. *Bone*. **42**(1), 180–192.

BECARES, Eva Ramos, Per Amstrup PEDERSEN, Pontus GOURDON a Kamil GOTFRYD, 2021. Overproduction of human zip (SLC39) zinc transporters in *Saccharomyces cerevisiae* for biophysical characterization. *Cells*. **10**(2), 213.

BECKER, Amy M., Jianning ZHANG, Sunita GOYAL, Vangipuram DWARAKANATH, Peter S. ARONSON, Orson W. MOE a Michel BAUM, 2007. Ontogeny of NHE8 in the rat proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **293**(1), F255–F261.

BENITO, Begoña, Blanca GARCIADEBLÁS, Peter SCHREIER a Alonso RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2004. Novel P-Type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryotic Cell*. **3**(2), 359–368.

BERTL, Adam, José RAMOS, Jost LUDWIG, Hella LICHTENBERG-FRATÉ, John REID, Hermann BIHLER, Fernando CALERO, Paula MARTÍNEZ a Per O. LJUNGDAHL, 2003. Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1, trk2* and *tok1* null mutations. *Molecular Microbiology*. **47**(3), 767–780.

BHULLAR, Rajinder P., Richard R. CLOUGH, Juddy KANUNGO, Sherif M. ELSARAJ a Ognjen GRUJIC, 2007. Ral-GTPase interacts with the β1 subunit of Na^+/K^+-ATPase and is activated upon inhibition of the Na^+/K^+. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **85**(3–4), 444–454.

BIHLER, Hermann, Clifford L. SLAYMAN a Adam BERTL, 2002. Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1558**(2), 109–118.

BOOKSTEIN, Crescence, Mark W. MUSCH, Alex DEPAOLI, Yue XIE, Mitchel VILLEREAL, Mrinalini C.

RAO a Eugene B. CHANG, 1994. A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(47), 29704–29709.

BOROVIKOVÁ, Diana, Pavla HERYNKOVÁ, Alexander RAPOPORT a Hana SYCHROVÁ, 2014. Potassium uptake system Trk2 is crucial for yeast cell viability during anhydrobiosis. *FEMS Microbiology Letters*. **350**(1), 28–33.

BØTTGER, Pernille, Zuzanna TRACZ, Anders HEUCK, Poul NISSEN, Marina ROMERO-RAMOS a Karin LYKKE-HARTMANN, 2011. Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*. **519**(2), 376–404.

BOURGEOIS, Soline, Leonie Van MEER, Bharath WOOTLA, May BLOCH-FAURE, Régine CHAMBREY, Gary E. SHULL, Lara R. GAWENIS a Pascal HOUILLIER, 2010. NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*. **120**(6), 1895–1904.

BOWERS, Katherine, Boaz P. LEVI, Falguny I. PATEL a Tom H. STEVENS, 2000. The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. **11**(12), 4277–4294.

BRANT, Steven R., Chris YUN, Mark DONOWITZ a Chung-Ming TSE, 1995. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na^+/H^+ exchanger isoform, NHE3. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **269**(1), C198–C206.

BRETT, Christopher L., Mark DONOWITZ a Rajini RAO, 2005a. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **288**(2), C223–C239.

BRETT, Christopher L., Deepali N. TUKAYE, Sanchita MUKHERJEE a Rajini RAO, 2005b. The yeast endosomal $Na^+(K^+)/H^+$ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular Biology of the Cell*. **16**(3), 1396–1405.

BROHAWN, Stephen G, Weiwei WANG, Annie HANDLER, Ernest B. CAMPBELL, Jürgen R. SCHWARZ a Roderick MACKINNON, 2019. The mechanosensitive ion channel TRAAK is localized to the mammalian node of Ranvier. *eLife*. **8**, e50403.

BUBLITZ, Maike, Lasse KJELLERUP, Karen O'Hanlon COHRT, Sandra GORDON, Anne L. MORTENSEN, Johannes D. CLAUSEN, Thomas D. PALLIN, John B. HANSEN, Anja T. FUGLSANG, William DALBY-BROWN a Anne-Marie L. WINTHER, 2018. Tetrahydrocarbazoles are a novel class of potent P-type ATPase inhibitors with antifungal activity. *PLOS ONE*. **13**(1), e0188620.

CAGNAC, Olivier, Marina LETERRIER, Mark YEAGER a Eduardo BLUMWALD, 2007. Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H^+ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. **282**(33), 24284–24293.

CARTRON, Michaël L., John D. OLSEN, Melih SENER, Philip J. JACKSON, Amanda A. BRINDLEY, Pu QIAN, Mark J. DICKMAN, Graham J. LEGGETT, Klaus SCHULTEN a C. NEIL HUNTER, 2014. Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1837**(10), 1769–1780.

CASADO, Carlos, Lynne YENUSH, Carmen MELERO, María DEL CARMEN RUIZ, Raquel SERRANO, Jorge PÉREZ-VALLE, Joaquín ARIÑO a José RAMOS, 2010. Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Letters*. **584**(11), 2415–2420.

CASEY, Joseph R., Sergio GRINSTEIN a John ORLOWSKI, 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **11**(1), 50–61.

CASTROP, Hayo a Ina Maria SCHIESSL, 2014. Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **307**(9), F991–F1002.

CAVAROCCHI, Emma, Marjorie WHITFIELD, Ahmed CHARGUI, Laurence STOUVENEL, Patrick LORÈS, Charles COUTTON, Christophe ARNOULT, Pietro SANTULLI, Catherine PATRAT, Nicolas THIERRY MIEG, Pierre F. RAY, Emmanuel DULIOUST a Aminata TOURÉ, 2021. The sodium/proton exchanger SLC9C1 (sNHE) is essential for human sperm motility and fertility. *Clinical Genetics*. **99**(5), 684–693.

CRAMBERT, Gilles, Udo HASLER, Ahmed T. BEGGAH, Chuliang YU, Nikolai N. MODYANOV, Jean-Daniel HORISBERGER, Lionel LELIÈVRE a Käthi GEERING, 2000. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase Isozymes. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(3), 1976–1986.

CRUZ, Dinna N., David B. SIMON, Carol NELSON-WILLIAMS, Anita FARHI, Karin FINBERG, Laura BURLESON, John R. GILL a Richard P. LIFTON, 2001. Mutations in the Na-Cl cotransporter reduce blood pressure in humans. *Hypertension*. **37**(6), 1458–1464.

DEISL, Christine, Alexandre SIMONIN, Manuel ANDEREGG, Giuseppe ALBANO, Gergely KOVACS, Daniel ACKERMANN, Holger MOCH, Wanda DOLCI, Bernard THORENS, Matthias A. HEDIGER a Daniel G. FUSTER, 2013. Sodium/hydrogen exchanger NHA2 is critical for insulin secretion in β-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**(24), 10004–10009.

DELPIRE, Eric, Jianming LU, Roger ENGLAND, Christopher DULL a Tina THORNE, 1999. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nature Genetics*. **22**(2), 192–195.

DEMAEGD, Didier, François FOULQUIER, Anne-Sophie COLINET, Louis GREMILLON, Dominique LEGRAND, Pascal MARIOT, Edgar PEITER, Emile VAN SCHAFTINGEN, Gert MATTHIJS a Pierre MORSOMME, 2013. Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110**(17), 6859–6864.

DE SILVA, M G, 2003. Disruption of a novel member of a sodium/hydrogen exchanger family and DOCK3 is associated with an attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype. *Journal of Medical Genetics*. **40**(10), 733–740.

DIBALOVA-CULAKOVA, Hana, Javier ALONSO-DEL-REAL, Amparo QUEROL a Hana SYCHROVÁ, 2018. Expression of heterologous transporters in *Saccharomyces kudriavzevii*: A strategy for improving yeast salt tolerance and fermentation performance. *International Journal of Food Microbiology*. **268**, 27–34.

DIERING, Graham H., John CHURCH a Masayuki NUMATA, 2009. Secretory carrier membrane protein 2 regulates cell-surface targeting of brain-enriched Na^+/H^+ exchanger NHE5. *Journal of Biological Chemistry*. **284**(20), 13892–13903.

DIERING, Graham H., Fergil MILLS, Shernaz X. BAMJI a Masayuki NUMATA, 2011. Regulation of dendritic spine growth through activity-dependent recruitment of the brain-enriched Na^+/H^+ exchanger NHE5. *Molecular Biology of the Cell*. **22**(13), 2246–2257.

DIMITROV, Georges, Sarah BAMBERGER, Chloe NAVARD, Sophie DREUX, Catherine BADENS, Patrice BOURGEOIS, Christophe BUFFAT, Jean-Pierre HUGOT a Alexandre FABRE, 2019. Congenital sodium diarrhea by mutation of the SLC9A3 gene. *European Journal of Medical Genetics*. **62**(10), 103712.

DONOWITZ, Mark, Chung-Ming TSE a Daniel FUSTER, 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na^+/H^+ exchangers. *Molecular Aspects of Medicine*. **34**(2–3), 236–251.

DOYEN, Denis, Mallorie POËT, Gisèle JARRETOU, Didier F. PISANI, Michel TAUC, Marc COUGNON, Mederic ARGENTINA, Yann BOURET a Laurent COUNILLON, 2022. Intracellular pH control by membrane transport in mammalian cells. Insights into the selective advantages of functional redundancy. *Frontiers in Molecular Biosciences*. **9**, 825028.

D'SOUZA, Sudhir, Ana GARCIA-CABADO, Frank YU, Ken TETER, Gergely LUKACS, Karl SKORECKI, Hsiao-Ping MOORE, John ORLOWSKI a Sergio GRINSTEIN, 1998. The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na^+/H^+ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(4), 2035–2043.

DUŠKOVÁ, Michala, Denis CMUNT, Klára PAPOUŠKOVÁ, Jakub MASARYK a Hana SYCHROVÁ, 2021. Minority potassium-uptake system Trk2 has a crucial role in yeast survival of glucose-induced cell death. *Microbiology*. **167**(6)

DWIVEDI, Manish, Shahar SUKENIK, Assaf FRIEDLER a Etana PADAN, 2016. The Ec-NhaA antiporter switches from antagonistic to synergistic antiport upon a single point mutation. *Scientific Reports*. **6**(1), 23339.

DYLA, Mateusz, Magnus KJÆRGAARD, Hanne POULSEN a Poul NISSEN, 2020. Structure and mechanism of P-Type ATPase ion pumps. *Annual Review of Biochemistry*. **89**(1), 583–603.

ELICHAROVÁ, Hana, Barbora HUŠEKOVÁ a Hana SYCHROVÁ, 2016. Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Research*. **16**(4), fow039.

ERASO, Pilar, María J. MAZÓN a Francisco PORTILLO, 2006. Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H^+-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1758**(2), 164–170.

ESKANDARI, Sepehr, Donald D.F. LOO, Ge DAI, Orlie LEVY, Ernest M. WRIGHT a Nancy CARRASCO, 1997. Thyroid Na^+/I^- symporter. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(43), 27230–27238.

FERNANDES, Carlos A. H., Dania ZUNIGA, Charline FAGNEN, Valérie KUGLER, Rosa SCALA, Gérard PÉHAU-ARNAUDET, Renaud WAGNER, David PERAHIA, Saïd BENDAHHOU a Catherine VÉNIEN-BRYAN, 2022. Cryo–electron microscopy unveils unique structural features of the human Kir2.1 channel. *Science Advances*. **8**(38), eabq8489.

FISKERSTRAND, Torunn, Najla ARSHAD, Bjørn I. HAUKANES, Rune R. TRONSTAD, Khanh D. c. PHAM, Stefan JOHANSSON, Bjarte HÅVIK, Siv L. TØNDER, Shawn E. LEVY, Damien BRACKMAN, Helge BOMAN, Kabir H. BISWAS, Jaran APOLD, Nils HOVDENAK, Sandhya S. VISWESWARIAH a Per M. KNAPPSKOG, 2012. Familial diarrhea syndrome caused by an activating *GUCY2C* mutation. *New England Journal of Medicine*. **366**(17), 1586–1595.

FLEGELOVÁ, Hana, Rosine HAGUENAUER-TSAPIS a Hana SYCHROVÁ, 2006. Heterologous expression of mammalian Na/H antiporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*

General Subjects. **1760**(3), 504–516.
FLEGELOVÁ, Hana a Hana SYCHROVÁ, 2005. Mammalian NHE2 Na^+/H^+ exchanger mediates efflux of potassium upon heterologous expression in yeast. *FEBS Letters*. **579**(21), 4733–4738.
FLIEGEL, Larry, 2009. Regulation of the Na^+/H^+ exchanger in the healthy and diseased myocardium. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. **13**(1), 55–68.
FLIEGEL, Larry, 2021. Role of genetic mutations of the Na^+/H^+ exchanger isoform 1, in human disease and protein targeting and activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **476**(2), 1221–1232.
FOULQUIER, François, Mustapha AMYERE, Jaak JAEKEN, Renate ZEEVAERT, Els SCHOLLEN, Valérie RACE, Riet BAMMENS, Willy MORELLE, Claire ROSNOBLET, Dominique LEGRAND, Didier DEMAEGD, Neil BUIST, David CHEILLAN, Nathalie GUFFON, Pierre MORSOMME, Willem ANNAERT, Hudson H. FREEZE, Emile VAN SCHAFTINGEN, Miikka VIKKULA a Gert MATTHIJS, 2012. TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *The American Journal of Human Genetics*. **91**(1), 15–26.
FUSTER, Daniel G., Jianning ZHANG, Mingjun SHI, I. Alexandru BOBULESCU, Stefan ANDERSSON a Orson W. MOE, 2008. Characterization of the sodium/hydrogen exchanger NHA2. *Journal of the American Society of Nephrology*. **19**(8), 1547–1556.
GABER, Richard F., Cora A. STYLES a Gerald R. FINK, 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **8**(7), 2848–2859.
GADSBY, David C., Francisco BEZANILLA, Robert F. RAKOWSKI, Paul DE WEER a Miguel HOLMGREN, 2012. The dynamic relationships between the three events that release individual Na^+ ions from the Na^+/K^+-ATPase. *Nature Communications*. **3**(1), 669.
GALENKAMP, Koen M.O., Paulina SOSICKA, Michael JUNG, M. Victoria RECOUVREUX, Yijuan ZHANG, Matthew R. MOLDENHAUER, Giovanni BRANDI, Hudson H. FREEZE a Cosimo COMMISSO, 2020. Golgi acidification by NHE7 regulates cytosolic pH homeostasis in pancreatic cancer cells. *Cancer Discovery*. **10**(6), 822–835.
GAMBA, G, S N SALTZBERG, M LOMBARDI, A MIYANOSHITA, J LYTTON, M A HEDIGER, B M BRENNER a S C HEBERT, 1993. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **90**(7), 2749–2753.
GAMBA, Gerardo, 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiological Reviews*. **85**(2), 423–493.
GARDNER, Cameron C. a Paul F. JAMES, 2023. The SLC9C2 gene product (Na^+/H^+ exchanger isoform 11; NHE11) is a testis-specific protein localized to the head of mature mammalian sperm. *International Journal of Molecular Sciences*. **24**(6), 5329.
GAWENIS, Lara R., Jeannette M. GREEB, Vikram PRASAD, Christina GRISHAM, L. Philip SANFORD, Thomas DOETSCHMAN, Anastasia ANDRINGA, Marian L. MILLER a Gary E. SHULL, 2005. Impaired gastric acid secretion in mice with a targeted disruption of the NHE4 Na^+/H^+ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(13), 12781–12789.
GÉLINAS, Roselle, Nabil EL KHOURY, Marie-A. CHAIX, Claudine BEAUCHAMP, Azadeh ALIKASHANI, Nathalie ETHIER, Gabrielle BOUCHER, Louis VILLENEUVE, Laura ROBB, Frédéric LATOUR, Blandine MONDESERT, Lena RIVARD, Philippe GOYETTE, Mario TALAJIC, Céline FISET a John David RIOUX, 2017. Characterization of a human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocyte model for the study of variant pathogenicity: Validation of a *KCNJ2* mutation. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. **10**(5), e001755.
GILLEN, Christopher M., Susan BRILL, John A. PAYNE a Bliss FORBUSH, 1996. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. *Journal of Biological Chemistry*. **271**(27), 16237–16244.
GOFFEAU, André, Bart G. BARRELL, Howard BUSSEY, Ronald W. DAVIS, Bernard DUJON, Horst FELDMANN, Francis GALIBERT, Jörg D. HOHEISEL, Claude JACQ, Mark JOHNSTON, Edward J. LOUIS, Hans W. MEWES, Yumiko MURAKAMI, Peter PHILIPPSEN, Hervé TETTELIN a Sstephen G. OLIVER, 1996. Life with 6000 Genes. *Science*. **274**(5287), 546–567.
GUISSART, Claire, Xiuju LI, Bruno LEHEUP, Nathalie DROUOT, Bettina MONTAUT-VERIENT, Emmanuel RAFFO, Philippe JONVEAUX, Anne F. ROUX, Mireille CLAUSTRES, Larry FLIEGEL a Michel KOENIG, 2015. Mutation of *SLC9A1*, encoding the major Na^+/H^+ exchanger, causes ataxia-deafness Lichtenstein-Knorr syndrome. *Human Molecular Genetics*. **24**(2), 463–470.
HAGER, Natalie A., Collin J. KRASOWSKI, Timothy D. MACKIE, Alexander R. KOLB, Patrick G. NEEDHAM, Andrew A. AUGUSTINE, Alison DEMPSEY, Christopher SZENT-GYORGYI, Marcel P. BRUCHEZ, Daniel J. BAIN, Adam V. KWIATKOWSKI, Allyson F. O'DONNELL a Jeffrey L. BRODSKY, 2018. Select α-arrestins control cell-surface abundance of the mammalian Kir2.1 potassium

channel in a yeast model. *Journal of Biological Chemistry*. **293**(28), 11006–11021.
HARO, Rosario, Blanca GARCIADEBLAS a Alonso RODRIGUEZ-NAVARRO, 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Letters*. **291**(2), 189–191.
HASENBRINK, Guido, Sarah SCHWARZER, Lucie KOLÁČNÁ, Jost LUDWIG, Hana SYCHROVÁ a Hella LICHTENBERG-FRATÉ, 2005. Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. *FEBS Letters*. **579**(7), 1723–1731.
HERNÁNDEZ-GARDUÑO, Sandra, Julio C. CHÁVEZ, Arturo MATAMOROS-VOLANTE, Yoloxochitl SÁNCHEZ-GUEVARA, Paulina TORRES, Claudia L. TREVIÑO a Takuya NISHIGAKI, 2022. Hyperpolarization induces cytosolic alkalization of mouse sperm flagellum probably through sperm Na^+/H^+ exchanger. *Reproduction*. **164**(4), 125–134.
HIBINO, Hiroshi, Atsushi INANOBE, Kazuharu FURUTANI, Shingo MURAKAMI, Ian FINDLAY a Yoshihisa KURACHI, 2010. Inwardly rectifying potassium channels: Their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews*. **90**(1), 291–366.
HINTON, Ayana, Souad R. SENNOUNE, Sarah BOND, Min FANG, Moshe REUVENI, G. Gary SAHAGIAN, Daniel JAY, Raul MARTINEZ-ZAGUILAN a Michael FORGAC, 2009. Function of a subunit isoforms of the V-ATPase in pH homeostasis and in vitro invasion of MDA-MB231 human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(24), 16400–16408.
HOORN, Ewout J., Martin GRITTER, Catherina A. CUEVAS a Robert A. FENTON, 2020. Regulation of the renal NaCl cotransporter and its role in potassium homeostasis. *Physiological Reviews*. **100**(1), 321–356.
HSU, Yueh-Mei, Cheng-Yang CHOU, Helen H.W. CHEN, Wen-Ying LEE, Yih-Fung CHEN, Pin-Wen LIN, Seth L. ALPER, J. Clive ELLORY a Meng-Ru SHEN, 2007. IGF-1 upregulates electroneutral K-Cl cotransporter KCC3 and KCC4 which are differentially required for breast cancer cell proliferation and invasiveness. *Journal of Cellular Physiology*. **210**(3), 626–636.
HU, Ming Chang, I. Alexandru BOBULESCU, Henry QUIÑONES, Serge M. GISLER a Orson W. MOE, 2017. Dopamine reduces cell surface Na^+/H^+ exchanger-3 protein by decreasing NHE3 exocytosis and cell membrane recycling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **313**(4), F1018–F1025.
CHEN, Su-Ren, Min CHEN, Shou-Long DENG, Xiao-Xia HAO, Xiu-Xia WANG a Yixun LIU, 2016. Sodium–hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death & Disease*. **7**(3), e2152–e2152.
CHEW, Thomas A., Benjamin J. ORLANDO, Jinru ZHANG, Naomi R. LATORRACA, Amy WANG, Scott A. HOLLINGSWORTH, Dong-Hua CHEN, Ron O. DROR, Maofu LIAO a Liang FENG, 2019. Structure and mechanism of the cation–chloride cotransporter NKCC1. *Nature*. **572**(7770), 488–492.
JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVÁ, 1999. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-990-1.
JANECKE, Andreas R., Peter HEINZ-ERIAN, Jianyi YIN, Britt-Sabina PETERSEN, Andre FRANKE, Silvia LECHNER, Irene FUCHS, Serge MELANCON, Holm H. UHLIG, Simon TRAVIS, Evelyne MARINIER, Vojislav PERISIC, Nina RISTIC, Patrick GERNER, Ian W. BOOTH, Satu WEDENOJA, Nadja BAUMGARTNER, Julia VODOPIUTZ, Marie-Christine FRECHETTE-DUVAL, Jan DE LAFOLLIE, Rabindranath PERSAD, Neil WARNER, C. Ming TSE, Karan SUD, Nicholas C. ZACHOS, Rafiquel SARKER, Xinjun ZHU, Aleixo M. MUISE, Klaus-Peter ZIMMER, Heiko WITT, Heinz ZOLLER, Mark DONOWITZ a Thomas MÜLLER, 2015. Reduced sodium/proton exchanger NHE3 activity causes congenital sodium diarrhea. *Human Molecular Genetics*. **24**(23), 6614–6623.
JINADASA, Tushare, Elöd Z. SZABÓ, Masayuki NUMATA a John ORLOWSKI, 2014. Activation of AMP-activated protein kinase regulates hippocampal neuronal pH by recruiting Na^+/H^+ exchanger NHE5 to the cell surface. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(30), 20879–20897.
KACHROO, Aashiq H., Michelle VANDELOO, Brittany M. GRECO a Mudabir ABDULLAH, 2022. Humanized yeast to model human biology, disease and evolution. *Disease Models & Mechanisms*. **15**(6), dmm049309.
KARIM, Mahmoud A. a Christopher L. BRETT, 2018. The $Na^+(K^+)/H^+$ exchanger Nhx1 controls multivesicular body–vacuolar lysosome fusion. *Molecular Biology of the Cell*. **29**(3), 317–325.
KETCHUM, Karen A., William J. JOINER, Andrew J. SELLERS, Leonard K. KACZMAREK a Steve A. N. GOLDSTEIN, 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*. **376**(6542), 690–695.
KHAYAT, Wujood, Anna HACKETT, Marie SHAW, Alina ILIE, Tracy DUDDING-BYTH, Vera M. KALSCHEUER, Louise CHRISTIE, Mark A. CORBETT, Jane JUUSOLA, Kathryn L. FRIEND, Brian M. KIRMSE, Jozef GECZ, Michael FIELD a John ORLOWSKI, 2019. A recurrent missense variant in *SLC9A7* causes nonsyndromic X-linked intellectual disability with alteration of Golgi acidification and aberrant glycosylation. *Human Molecular Genetics*. **28**(4), 598–614.
KINCLOVÁ, Olga, José RAMOS, Serge POTIER a Hana SYCHROVÁ, 2001. Functional study of the

Saccharomyces cerevisiae Nha1p C-terminus: Alkali metal cation efflux mediated by the *S. cerevisiae* Nha1 Na^+/H^+ antiporter. *Molecular Microbiology*. **40**(3), 656–668.
KJELLERUP, Lasse, Sandra GORDON, Karen O'Hanlon COHRT, William D. BROWN, Anja T. FUGLSANG a Anne-Marie L. WINTHER, 2017. Identification of antifungal H^+-ATPase inhibitors with effect on plasma membrane potential. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **61**(7), e00032-17.
KLAASSEN, Curtis D. a Lauren M. ALEKSUNES, 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological Reviews*. **62**(1), 1–96.
KLANKE, Charles A., Yan Ru SU, David F. CALLEN, Zhuo WANG, Pierre MENETON, Nancy BAIRD, Ramani A. KANDASAMY, John ORLOWSKI, Brith E. OTTERUD, Mark LEPPERT, Gary E. SHULL a Anil G. MENON, 1995. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na^+/H^+ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics*. **25**(3), 615–622.
KLUSCH, Niklas, Bonnie J. MURPHY, Deryck J. MILLS, Özkan YILDIZ a Werner KÜHLBRANDT, 2017. Structural basis of proton translocation and force generation in mitochondrial ATP synthase. *eLife*. **6**, e33274.
KNIGHT, Anna K., Karen N. CONNEELY, Varun KILARU, Dawayland COBB, Jennifer L. PAYNE, Samantha MEILMAN, Elizabeth J. CORWIN, Zachary A. KAMINSKY, Anne L. DUNLOP a Alicia K. SMITH, 2018. *SLC9B1* methylation predicts fetal intolerance of labor. *Epigenetics*. **13**(1), 33–39.
KO, Christopher a Richard F. GABER, 1991. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K^+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **11**(8), 4266–4273.
KOLÁČNÁ, Lucie, Olga ZIMMERMANNOVÁ, Guido HASENBRINK, Sarah SCHWARZER, Jost LUDWIG, Hella LICHTENBERG-FRATÉ a Hana SYCHROVA, 2005. New phenotypes of functional expression of the mKir2.1 channel in potassium efflux-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast*. **22**(16), 1315–1323.
KONDAPALLI, Kalyan C., Anniesha HACK, Maya SCHUSHAN, Meytal LANDAU, Nir BEN-TAL a Rajini RAO, 2013. Functional evaluation of autism-associated mutations in NHE9. *Nature Communications*. **4**(1), 2510.
KONDAPALLI, Kalyan C., Laura M. KALLAY, Melanie MUSZELIK a Rajini RAO, 2012. Unconventional chemiosmotic coupling of NHA2, a mammalian Na^+/H^+ antiporter, to a plasma membrane H^+ gradient. *Journal of Biological Chemistry*. **287**(43), 36239–36250.
KONDAPALLI, Kalyan C., R. TODD ALEXANDER, Jennifer L. PLUZNICK a Rajini RAO, 2017. NHA2 is expressed in distal nephron and regulated by dietary sodium. *Journal of Physiology and Biochemistry*. **73**(2), 199–205.
KULBACKA, Julita, Anna CHOROMAŃSKA, Joanna ROSSOWSKA, Joanna WEŻGOWIEC, Jolanta SACZKO a Marie-Pierre ROLS, 2017. Cell membrane transport mechanisms: Ion channels and electrical properties of cell membranes. *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy*.
KURATA, Toru, Vinotheni RAJENDRAN, Steven FAN, Tetsuo OHTA, Masayuki NUMATA a Sachio FUSHIDA, 2019. NHE5 regulates growth factor signaling, integrin trafficking, and degradation in glioma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*. **36**(6), 527–538.
LADE, Julie M., Manuella R. ANDRADE, Clark UNDEM, Jasmine WALKER, Haiyang JIANG, Xin YUN a Larissa A. SHIMODA, 2023. Hypoxia enhances interactions between Na^+/H^+ exchanger isoform 1 and actin filaments via ezrin in pulmonary vascular smooth muscle. *Frontiers in Physiology*. **14**, 1108304.
LAMB, Teresa M. a Aaron P. MITCHELL, 2003. The transcription factor Rim101p foverns ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **23**(2), 677–686.
LEE, Brian L., Brian D. SYKES a Larry FLIEGEL, 2013. Structural and functional insights into the cardiac Na^+/H^+ exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **61**, 60–67.
LI, Xiaobing, Emmanuelle CORDAT, Manfred J. SCHMITT a Björn BECKER, 2021. Boosting endoplasmic reticulum folding capacity reduces unfolded protein response activation and intracellular accumulation of human kidney anion exchanger 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **38**(9), 521–534.
LIU, Guiyou, Fang ZHANG, Yang HU, Yongshuai JIANG, Zhongying GONG, Shoufeng LIU, Xiuju CHEN, Qinghua JIANG a Junwei HAO, 2017. Genetic variants and multiple sclerosis risk gene *SLC9A9* expression in distinct human brain regions. *Molecular Neurobiology*. **54**(9), 6820–6826.
LIU, Hui-Min, Jing-Yang HE, Qiang ZHANG, Wan-Qiang LV, Xin XIA, Chang-Qing SUN, Wei-Dong ZHANG a Hong-Wen DENG, 2018. Improved detection of genetic loci in estimated glomerular filtration rate and type 2 diabetes using a pleiotropic cFDR method. *Molecular Genetics and Genomics*. **293**(1), 225–235.
LLOPIS, Juan, J. Michael MCCAFFERY, Atsushi MIYAWAKI, Marilyn G. FARQUHAR a Roger Y. TSIEN, 1998. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**(12), 6803–6808.

LUPO, Domenico, Christine VOLLMER, Markus DECKERS, David U. MICK, Ivo TEWS, Irmgard SINNING a Peter REHLING, 2011. Mdm38 is a 14-3-3-Like receptor and associates with the protein synthesis machinery at the inner mitochondrial membrane. *Traffic*. **12**(10), 1457–1466.

MA, Tien-Yang, Marie-Anne DEPREZ, Geert CALLEWAERT a Joris WINDERICKX, 2021. Coordinated glucose-induced Ca^{2+} and pH responses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium*. **100**, 102479.

MANN, Carolyn N., Shamulailatpam S. DEVI, Corey T. KERSTING, Amber V. BLEEM, Celeste M. KARCH, David M. HOLTZMAN a Gilbert GALLARDO, 2022. Astrocytic α2-Na^+/K^+-ATPase inhibition suppresses astrocyte reactivity and reduces neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *Science Translational Medicine*. **14**(632), eabm4107.

MAREŠOVÁ, Lýdie a Hana SYCHROVÁ, 2004. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants: *S. cerevisiae* Khalp is an intracellular Na^+/H^+ antiporter. *Molecular Microbiology*. **55**(2), 588–600.

MAREŠOVÁ, Lydie a Hana SYCHROVÁ, 2010. Genetic interactions among the Arl1 GTPase and intracellular Na^+/H^+ antiporters in pH homeostasis and cation detoxification: Arl1p interactions with organellar ion transporters in yeast. *FEMS Yeast Research*. **10**(7), 802–811.

MARTÍNEZ-MUÑOZ, Gloria A. a Patricia KANE, 2008. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(29), 20309–20319.

MARTINS, Ana D., Raquel L. BERNARDINO, Aline NEUHAUS-OLIVEIRA, Mário SOUSA, Rosália SÁ, Marco G. ALVES a Pedro F. OLIVEIRA, 2014. Physiology of Na^+/H^+ exchangers in the male reproductive tract: Relevance for male fertility. *Biology of Reproduction*. **91**(1).

MASARYK, Jakub, Deepika KALE, Pavel POHL, Francisco J. RUIZ-CASTILLA, Olga ZIMMERMANNOVÁ, Veronika OBŠILOVÁ, José RAMOS a Hana SYCHROVÁ, 2023. The second intracellular loop of the yeast Trk1 potassium transporter is involved in regulation of activity, and interaction with 14-3-3 proteins. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. **21**, 2705–2716.

MASARYK, Jakub a Hana SYCHROVÁ, 2022. Yeast Trk1 potassium transporter gradually changes its affinity in response to both external and internal signals. *Journal of Fungi*. **8**(5), 432.

MASRATI, Gal, Manish DWIVEDI, Abraham RIMON, Yael GLUCK-MARGOLIN, Amit KESSEL, Haim ASHKENAZY, Itay MAYROSE, Etana PADAN a Nir BEN-TAL, 2018. Broad phylogenetic analysis of cation/proton antiporters reveals transport determinants. *Nature Communications*. **9**(1), 4205.

MATSUOKA, Rei, Roman FUDIM, Sukkyeong JUNG, Chenou ZHANG, Andre BAZZONE, Yurie CHATZIKYRIAKIDOU, Carol V. ROBINSON, Norimichi NOMURA, So IWATA, Michael LANDREH, Laura ORELLANA, Oliver BECKSTEIN a David DREW, 2022. Structure, mechanism and lipid-mediated remodeling of the mammalian Na^+/H^+ exchanger NHA2. *Nature Structural & Molecular Biology*. **29**(2), 108–120.

MERCADO, Adriana, Norma VÁZQUEZ, Luyan SONG, Rosa CORTÉS, Alissa H. ENCK, Rick WELCH, Eric DELPIRE, Gerardo GAMBA a David B. MOUNT, 2005. NH_2-terminal heterogeneity in the KCC3 K^+-Cl^- cotransporter. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **289**(6), F1246–F1261.

MØLLER, Jesper V., Birte JUUL a Marc LE MAIRE, 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. **1286**(1), 1–51.

MONCOQ, Karine, Grant KEMP, Xiuju LI, Larry FLIEGEL a Howard S. YOUNG, 2008. Dimeric structure of human Na^+/H^+ exchanger isoform 1 overproduced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(7), 4145–4154.

MOUNT, David B., Adriana MERCADO, Luyan SONG, Jason XU, Alfred L. GEORGE, Eric DELPIRE a Gerardo GAMBA, 1999. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(23), 16355–16362.

MULET, Jose M., Martin P. LEUBE, Stephen J. KRON, Gabino RIOS, Gerald R. FINK a Ramon SERRANO, 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Molecular and Cellular Biology*. **19**(5), 3328–3337.

NAKAMURA, Norihiro, Shingo TANAKA, Yoshinori TEKO, Keiji MITSUI a Hiroshi KANAZAWA, 2005. Four Na^+/H^+ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(2), 1561–1572.

NASS, Richard, Kyle W. CUNNINGHAM a Rajini RAO, 1997. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H^+-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(42), 26145–26152.

NAVARRETE, Clara, Silvia PETREZSÉLYOVÁ, Lina BARRETO, José L. MARTÍNEZ, Jaromír ZAHRÁDKA, Joaquín ARIÑO, Hana SYCHROVÁ a José RAMOS, 2010. Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-

limiting conditions: Potassium transport and yeast physiology. *FEMS Yeast Research*.
NOWIKOVSKY, Karin, Siegfried REIPERT, Rodney J. DEVENISH a Rudolf J. SCHWEYEN, 2007. Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K^+/H^+ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death & Differentiation*. **14**(9), 1647–1656.
NUMATA, Masayuki, 2011. Organellar (Na^+, K^+)/H^+ exchanger NHE7 regulates cell adhesion, invasion and anchorage-independent growth of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports*.
NUMATA, Masayuki a John ORLOWSKI, 2001. Molecular cloning and characterization of a novel (Na^+, K^+)/H^+ exchanger localized to the trans-Golgi network. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(20), 17387–17394.
NUMATA, Masayuki, Kevin PETRECCA, Norma LAKE a John ORLOWSKI, 1998. Identification of a mitochondrial Na^+/H^+ Exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(12), 6951–6959.
NUMATA, September, Jeffrey P. MCDERMOTT a Gustavo BLANCO, 2022. Genetic ablation of Na, K-ATPase α4 results in sperm energetic defects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **10**, 911056.
OBERHEIDE, Karina, Dmytro PUCHKOV a Thomas J. JENTSCH, 2017. Loss of the Na^+/H^+ exchanger NHE8 causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *Journal of Biological Chemistry*. **292**(26), 10845–10854.
ORIJ, Rick, Jarne POSTMUS, Alex TER BEEK, Stanley BRUL a Gertien J. SMITS, 2009. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology*. **155**(1), 268–278.
ORLOWSKI, John, Ramani A. KANDASAMY a Gary E. SHULL, 1992. Molecular cloning of putative members of the Na^+/H^+ exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na^+/H^+ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **267**(13), 9331–9339.
ORLOWSKI, John a Sergio GRINSTEIN, 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. **447**(5), 549–565.
OUYANG, Qing, Sofia B. LIZARRAGA, Michael SCHMIDT, Unikora YANG, Jingyi GONG, Debra ELLISOR, Julie A. KAUER a Eric M. MORROW, 2013. Christianson syndrome protein NHE6 modulates TrkB endosomal signaling required for neuronal circuit development. *Neuron*. **80**(1), 97–112.
PACE, Amy J., Eddie LEE, Krairek ATHIRAKUL, Thomas M. COFFMAN, Deborah A. O'BRIEN a Beverly H. KOLLER, 2000. Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na^+-K^+-$2Cl^-$ cotransporter. *Journal of Clinical Investigation*. **105**(4), 441–450.
PAROUTIS, Paul, Nicolas TOURET a Sergio GRINSTEIN, 2004. The pH of the secretory pathway: Measurement, determinants, and regulation. *Physiology*. **19**(4), 207–215.
PAYNE, John A., Claudio RIVERA, Juha VOIPIO a Kai KAILA, 2003. Cation–chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences*. **26**(4), 199–206.
PÉREZ-CARRILLO, Lorena, Alana ARAGÓN-HERRERA, Isaac GIMÉNEZ-ESCAMILLA, Marta DELGADO-ARIJA, María GARCÍA-MANZANARES, Laura ANIDO-VARELA, Francisca LAGO, Luis MARTÍNEZ-DOLZ, Manuel PORTOLÉS, Estefanía TARAZÓN a Esther ROSELLÓ-LLETÍ, 2022. Cardiac sodium/hydrogen exchanger (NHE11) as a novel potential target for SGLT2i in heart failure: A Preliminary Study. *Pharmaceutics*. **14**(10), 1996.
PÉREZ-VALLE, Jorge, Huw JENKINS, Stephanie MERCHAN, Vera MONTIEL, José RAMOS, Sukesh SHARMA, Ramón SERRANO a Lynne YENUSH, 2007. Key role for intracellular K^+ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Molecular and Cellular Biology*. **27**(16), 5725–5736.
PESCOSOLIDO, Matthew F., Qing OUYANG, Judy S. LIU a Eric M. MORROW, 2021. Loss of Christianson syndrome Na^+/H^+ exchanger 6 (NHE6) causes abnormal endosome maturation and trafficking underlying lysosome dysfunction in neurons. *The Journal of Neuroscience*. **41**(44), 9235–9256.
PESCOSOLIDO, Matthew F., David M. STEIN, Michael SCHMIDT, Christelle M. EL ACHKAR, Mark SABBAGH, Jeffrey M. ROGG, Umadevi TANTRAVAHI, Rebecca L. MCLEAN, Judy S. LIU, Annapurna PODURI a Eric M. MORROW, 2014. Genetic and phenotypic diversity of *NHE6* mutations in Christianson syndrome: Diversity in CS. *Annals of Neurology*. **76**(4), 581–593.
PETREZSÉLYOVÁ, Silvia, Angel DOMINGUEZ, Pavla HERYNKOVÁ, Juan F. MACIAS a Hana SYCHROVÁ, 2013a. Human NKCC2 cation-Cl^- co-transporter complements lack of Vhc1 transporter in yeast vacuolar membranes: Expression of human NKCC2 in yeast. *Yeast*. **30**(10), 395–402
PETREZSÉLYOVÁ, Silvia, Olga KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ a Hana SYCHROVÁ, 2013b. Vhc1, a novel transporter belonging to the family of electroneutral cation–Cl^- cotransporters, participates in the regulation of cation content and morphology of *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1828**(2), 623–631.
PETREZSÉLYOVÁ, Silvia, María LÓPEZ-MALO, David CANADELL, Alicia ROQUE, Albert SERRA-CARDONA, M. Carmen MARQUÉS, Ester VILAPRINYÓ, Rui ALVES, Lynne YENUSH a Joaquín

ARIÑO, 2016. Regulation of the Na^+/K^+-ATPase Ena1 expression by calcineurin/Crz1 under high pH stress: A Quantitative study. *PLOS ONE*. **11**(6), e0158424.
PETTERSSON, Nina, Johan HAGSTRÖM, Roslyn M. BILL a Stefan HOHMANN, 2006. Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **50**(4), 247–255.
PORTULANO, Carla, Monika PARODER-BELENITSKY a Nancy CARRASCO, 2014. The Na^+/I^- symporter (NIS): Mechanism and medical impact. *Endocrine Reviews*. **35**(1), 106–149.
PRASAD, Hari a Rajini RAO, 2015. The Na^+/H^+ exchanger NHE6 modulates endosomal pH to control processing of amyloid precursor protein in a cell culture model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. **290**(9), 5311–5327.
PUTNEY, Luanna K. a Diane L. BARBER, 2003. Na-H Exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(45), 44645–44649.
RAJASEKARAN, Sigrid A., Jegan GOPAL, Dianna WILLIS, Cromwell ESPINEDA, Jeffery L. TWISS a Ayyappan K. RAJASEKARAN, 2004. Na, K-ATPase β_1-Subunit increases the translation efficiency of the α_1-subunit in MSV-MDCK cells. *Molecular Biology of the Cell* . **15**(7), 3224–3232.
RCSB PDB: https://www.rcsb.org/structure/3a3y
RIBEIRO JUNIOR, Rogério F., Jonaina FIORIM, Vinicius B. MARQUES, Karoline DE SOUSA RONCONI, Tatiani BOTELHO, Marcella D. GRANDO, Lusiane M. BENDHACK, Dalton V. VASSALLO a Ivanita STEFANON, 2017. Vascular activation of K^+ channels and Na^+-K^+ ATPase activity of estrogen-deficient female rats. *Vascular Pharmacology*. **99**, 23–33.
RINGEL, Florian a Nikolaus PLESNILA, 2008. Expression and functional role of potassium-chloride cotransporters (KCC) in astrocytes and C6 glioma cells. *Neuroscience Letters*. **442**(3), 219–223.
ROSAS-SANTIAGO, Paul, Daniel LAGUNAS-GÓMEZ, Bronwyn J. BARKLA, Rosario VERA-ESTRELLA, Sylvie LALONDE, Alexander JONES, Wolf B. FROMMER, Olga ZIMMERMANNOVÁ, Hana SYCHROVÁ a Omar PANTOJA, 2015. Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *Journal of Experimental Botany*. **66**(9), 2733–2748.
RUIZ, Amparo a Joaquín ARIÑO, 2007. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae ENA* sodium ATPase system. *Eukaryotic Cell*. **6**(12), 2175–2183.
SANDBERG, Monica B., Arvid B. MAUNSBACH a Alicia A. MCDONOUGH, 2006. Redistribution of distal tubule Na^+-Cl^- cotransporter (NCC) in response to a high-salt diet. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **291**(2), F503–F508.
SARDER, Hasib A. M., Xiaobing LI, Charlotta FUNAYA, Emmanuelle CORDAT, Manfred J. SCHMITT a Björn BECKER, 2020. *Saccharomyces cerevisiae*: First steps to a suitable model system to study the function and intracellular transport of human kidney anion exchanger 1. *mSphere*. **5**(1), e00802-19.
SARDET, Claude, Arlette FRANCHI a Jacques POUYSSÉGUR, 1989. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable antiporter. *Cell*. **56**(2), 271–280.
SENNOUNE, Souad R., Karina BAKUNTS, Gloria M. MARTÍNEZ, Jenny L. CHUA-TUAN, Yamina KEBIR, Mohamed N. ATTAYA a Raul MARTÍNEZ-ZAGUILÁN, 2004. Vacuolar H^+-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: Distribution and functional activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **286**(6), C1443–C1452.
SERRA-CARDONA, Albert, Silvia PETREZSÉLYOVÁ, David CANADELL, José RAMOS a Joaquín ARIÑO, 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**(24), 4420–4435.
SERRANO, Ramón, Morten C. KIELLAND-BRANDT a Gerald R. FINK, 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na^+ + K^+), K^+- and Ca^{2+}-ATPases. *Nature*. **319**(6055), 689–693.
SHAMROUKH, Habiba S., Nabrah LONE, Muaaz AKHTAR, Alhareth ALTAYIB, Shelby SUTLIFF, Zahraa KASSEM, Suvranta K. TRIPATHY a Kalyan C. KONDAPALLI, 2022. The sodium proton exchanger NHE9 regulates phagosome maturation and bactericidal activity in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. **298**(8), 102150.
SHELLY, Daniel A., Suiwen HE, Amy MOSELEY, Craig WEBER, Michelle STEGEMEYER, Ronald M. LYNCH, Jerry LINGREL a Richard J. PAUL, 2004. Na^+ pump α_2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-targeted neonatal mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **286**(4), C813–C820.
SCHULTHEIS, Patrick J., Lane L. CLARKE, Pierre MENETON, Matthew HARLINE, Gregory P. BOIVIN, Grant STEMMERMANN, John J. DUFFY, Thomas DOETSCHMAN, Marian L. MILLER a Gary E. SHULL, 1998. Targeted disruption of the murine Na^+/H^+ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *Journal of Clinical Investigation*. **101**(6), 1243–1253.
SCHUSHAN, Maya, Minghui XIANG, Pavel BOGOMIAKOV, Etana PADAN, Rajini RAO a Nir BEN-TAL, 2010. Model-guided mutagenesis drives functional studies of human NHA2, implicated in hypertension.

Journal of Molecular Biology. **396**(5), 1181–1196.
SCHWEDE, Matthew, Krassimira GARBETT, Károly MIRNICS, Daniel H. GESCHWIND a Eric M. MORROW, 2014. Genes for endosomal NHE6 and NHE9 are misregulated in autism brains. *Molecular Psychiatry*. **19**(3), 277–279.
SILAYEVA, Liliya, Tarek Z. DEEB, Rochelle M. HINES, Matt R. KELLEY, Michaelanne B. MUNOZ, Henry H. C. LEE, Nicholas J. BRANDON, John DUNLOP, Jaime MAGUIRE, Paul A. DAVIES a Stephen J. MOSS, 2015. KCC2 activity is critical in limiting the onset and severity of status epilepticus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **112**(11), 3523–3528.
SKOU, Jens Christian a Mikael ESMANN, 1992. The Na, K-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **24**(3), 249–261.
SMANIK, Patricia A., Qingrong LIU, Tara L. FURMINGER, Kwon-yul RYU, Shunhua XING, Ernest L. MAZZAFERRI a Sissy M. JHIANG, 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **226**(2), 339–345.
SMANIK, Patricia A., Kwon-Yul RYU, Karl S. THEIL, Ernest L. MAZZAFERRI a Sissy M. JHIANG, 1997. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology*. **138**(8), 3555–3558.
SMIDOVA, Aneta, Katerina STANKOVA, Olivia PETRVALSKA, Josef LAZAR, Hana SYCHROVA, Tomas OBSIL, Olga ZIMMERMANNOVA a Veronika OBSILOVA, 2019. The activity of *Saccharomyces cerevisiae* Na^+, K^+/H^+ antiporter Nha1 is negatively regulated by 14-3-3 protein binding at serine 481. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1866**(12), 118534.
SMITH, Michael G. a Michael SNYDER, 2006. Yeast as a model for human disease. *Current Protocols in Human Genetics*. **48**(1)
SOLDATENKOV, Viatcheslav A., Juan A. VELASCO, Matias A. AVILA, Anatoly DRITSCHILO a Vicente NOTARIO, 1995. Isolation and characterization of *SpTRK*, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K^+ transporter protein. *Gene*. **161**(1), 97–101.
STEVENS, Tom H. a Michael FORGAC, 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **13**(1), 779–808.
STOCK, Christian, Rosa A. CARDONE, Giovanni BUSCO, Hermann KRÄHLING, Albrecht SCHWAB a Stephan J. RESHKIN, 2008. Protons extruded by NHE: Digestive or glue? *European Journal of Cell Biology*. **87**(8–9), 591–599.
STRIBNY, Jiri, Louise THINES, Antoine DESCHAMPS, Philippe GOFFIN a Pierre MORSOMME, 2020. The human Golgi protein TMEM165 transports calcium and manganese in yeast and bacterial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **295**(12), 3865–3874.
SUDA, Yasuyuki a Akihiko NAKANO, 2012. The Yeast Golgi Apparatus: The yeast Golgi apparatus. *Traffic*. **13**(4), 505–510.
SUN, Fei, Qiangjun ZHOU, Xiaoyun PANG, Yingzhi XU a Zihe RAO, 2013. Revealing various coupling of electron transfer and proton pumping in mitochondrial respiratory chain. *Current Opinion in Structural Biology*. **23**(4), 526–538.
SZÁSZI, Katalin, Anders PAULSEN, Elöd Z. SZABÓ, Masayuki NUMATA, Sergio GRINSTEIN a John ORLOWSKI, 2002. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na^+/H^+ exchanger NHE5 isoform. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(45), 42623–42632.
THERIEN, Alex G., Helen X. PU, Steven J. D. KARLISH a Rhoda BLOSTEIN, 2001. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **33**(5), 407–414.
THEWES, S., 2014. Calcineurin-Crz1 Signaling in lower eukaryotes. *Eukaryotic Cell*. **13**(6), 694–705.
THINES, DESCHAMPS, STRIBNY, a MORSOMME, 2019. Yeast as a tool for deeper Understanding of human manganese-related diseases. *Genes*. **10**(7), 545.
THORNTON, Gemma, Caroline R. M. WILKINSON, W. Mark TOONE a Nic JONES, 2005. A novel pathway determining multidrug sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*: Hal4 and multidrug sensitivity in *S. pombe*. *Genes to Cells*. **10**(10), 941–951.
VAN ROERMUND, Carlo W. T., Mark DE JONG, Lodewijk IJLST, Jan VAN MARLE, Tobias B. DANSEN, Ronald J. A. WANDERS a Hans R. WATERHAM, 2004. The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *Journal of Cell Science*. **117**(18), 4231–4237.
VARADI, Mihaly, Stephen ANYANGO, Mandar DESHPANDE, Sreenath NAIR, Cindy NATASSIA, Galabina YORDANOVA, David YUAN, Oana STROE, Gemma WOOD, Agata LAYDON, Augustin ŽÍDEK, Tim GREEN, Kathryn TUNYASUVUNAKOOL, Stig PETERSEN, John JUMPER, Ellen CLANCY, Richard GREEN, Ankur VORA, Mira LUTFI, Michael FIGURNOV, Andrew COWIE, Nicole HOBBS, Pushmeet KOHLI, Gerard KLEYWEGT, Ewan BIRNEY, Demis HASSABIS a Sameer VELANKAR, 2022. AlphaFold protein structure database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*. **50**(D1), D439–D444.

VELÁZQUEZ, Diego, Vojtěch PRŮŠA, Gal MASRATI, Elon YARIV, Hana SYCHROVA, Nir BEN-TAL a Olga ZIMMERMANNOVA, 2022. Allosteric links between the hydrophilic N-terminus and transmembrane core of human Na^+/H^+ antiporter NHA2. *Protein Science*. **31**(12).

WALKER, Jasmine, Clark UNDEM, Xin YUN, Julie LADE, Haiyang JIANG a Larissa A. SHIMODA, 2016. Role of Rho kinase and Na^+/H^+ exchange in hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration. *Physiological Reports*. **4**(6), e12702.

WANG, Changli, Renquan RUAN, Li ZHANG, Yunjiao ZHANG, Wei ZHOU, Jun LIN, Weiping DING a Longping WEN, 2015. Role of the Na^+/K^+-ATPase beta-subunit in peptide-mediated transdermal drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*. **12**(4), 1259–1267.

WANG, Dan, Shelby M. KING, Timothy A. QUILL, Lynda K. DOOLITTLE a David L. GARBERS, 2003. A new sperm-specific Na^+/H^+ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*. **5**(12), 1117–1122.

WANG, Ya-Yun, Han-Sun CHIANG, Chiao-Yin CHENG, Yi-No WU, Yung-Chih LIN, Hsuan-Che LIU, Wei-Kung TSAI, Yen-Lin CHEN a Ying-Hung LIN, 2017. SLC9A3 protein is critical for acrosomal formation in postmeiotic male germ cells. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**(1), 103.

WINDLER, F., W. BÖNIGK, H. G. KÖRSCHEN, E. GRAHN, T. STRÜNKER, R. SEIFERT a U. B. KAUPP, 2018. The solute carrier SLC9C1 is a Na^+/H^+-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nature Communications*. **9**(1), 2809.

WINKELMANN, Iven, Rei MATSUOKA, Pascal F MEIER, Denis SHUTIN, Chenou ZHANG, Laura ORELLANA, Ricky SEXTON, Michael LANDREH, Carol V. ROBINSON, Oliver BECKSTEIN a David DREW, 2020. Structure and elevator mechanism of the mammalian sodium/proton exchanger NHE9. *The EMBO Journal*. **39**(24), 4541–4559.

WINKELMANN, Iven, Povilas UZDAVINYS, Ian M. KENNEY, Joseph BROCK, Pascal F. MEIER, Lina-Marie WAGNER, Florian GABRIEL, Sukkyeong JUNG, Rei MATSUOKA, Christoph VON BALLMOOS, Oliver BECKSTEIN a David DREW, 2022. Crystal structure of the Na^+/H^+ antiporter NhaA at active pH reveals the mechanistic basis for pH sensing. *Nature Communications*. **13**(1), 6383.

WU, Karen L., Shenaz KHAN, Sujata LAKHE-REDDY, George JARAD, Amitava MUKHERJEE, Carlos A. OBEJERO-PAZ, Martha KONIECZKOWSKI, John R. SEDOR a Jeffrey R. SCHELLING, 2004. The NHE1 Na^+/H^+ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. *Journal of Biological Chemistry*. **279**(25), 26280–26286.

WU, Minnie M., Michael GRABE, Stephen ADAMS, Roger Y. TSIEN, Hsiao-Ping H. MOORE a Terry E. MACHEN, 2001. Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(35), 33027–33035.

XU, Hua, Huacong CHEN, Jiali DONG, Ronald LYNCH a Fayez K. GHISHAN, 2008. Gastrointestinal distribution and kinetic characterization of the sodium-hydrogen exchanger isoform 8 (NHE8). *Cellular Physiology and Biochemistry*. **21**(1–3), 109–116.

XU, Hua, Huacong CHEN, Jing LI, Yang ZHAO a Fayez K. GHISHAN, 2015. Disruption of NHE8 expression impairs Leydig cell function in the testes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **308**(4), C330–C338.

XU, Hua, Jing LI, Rongji CHEN, Bo ZHANG, Chunhui WANG, Nolan KING, Huacong CHEN a Fayez K. GHISHAN, 2011. NHE2X3 DKO mice exhibit gender-specific NHE8 compensation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **300**(4), G647–G653.

XUE, Lin, Eitaro AIHARA, Timothy C. WANG a Marshall H. MONTROSE, 2011. Trefoil Factor 2 requires Na/H exchanger 2 activity to enhance mouse gastric epithelial repair. *Journal of Biological Chemistry*. **286**(44), 38375–38382.

YAMADA, Junko, Akihito OKABE, Hiroki TOYODA, Werner KILB, Heiko J. LUHMANN a Atsuo FUKUDA, 2004. Cl^- uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1: NKCC-1 mediated Cl^- uptake promoting depolarizing GABA actions. *The Journal of Physiology*. **557**(3), 829–841.

YAMAGUCHI, Masashi, Yuichi NAMIKI, Hitoshi OKADA, Yuko MORI, Hiromitsu FURUKAWA, Jinfang WANG, Misako OHKUSU a Susumu KAWAMOTO, 2011. Structome of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin-sectioning electron microscopy. *Microscopy*. **60**(5), 321–335.

YE, Guangming, Cong CHEN, Dingding HAN, Xiabin XIONG, Yahui KONG, Bo WAN a Long YU, 2006. Cloning of a novel human *NHEDC1* (Na^+/H^+ exchanger like domain containing 1) gene expressed specifically in testis. *Molecular Biology Reports*. **33**(3), 175–180.

YENUSH, Lynne, 2016. Potassium and sodium transport in yeast. *Advances in experimental medicine and biology*. **892**, 187–228.

YUEN, Garrick K., Samuel GALICE a Donald M. BERS, 2017. Subcellular localization of Na/K-ATPase isoforms in ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **108**, 158–169.

ZAHUMENSKÝ, Jakub, Iva JANČÍKOVÁ, Andrea DRIETOMSKÁ, Andrea ŠVENKRTOVÁ, Otakar HLAVÁČEK, Tomáš HENDRYCH, Jaromír PLÁŠEK, Karel SIGLER a Dana GÁŠKOVÁ, 2017. Yeast Tok1p channel is a major contributor to membrane potential maintenance under chemical stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1859**(10), 1974–1985.

ZACHOS, Nicholas C., Olga KOVBASNJUK a Mark DONOWITZ, 2009. Regulation of intestinal electroneutral sodium absorption and the brush border Na^+/H^+ exchanger by intracellular calcium. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1165**(1), 240–248.

ZAYATS, Vasilina, Thomas STOCKNER, Saurabh Kumar PANDEY, Katharina WÖRZ, Rüdiger ETTRICH a Jost LUDWIG, 2015. A refined atomic scale model of the *Saccharomyces cerevisiae* K^+-translocation protein Trk1p combined with experimental evidence confirms the role of selectivity filter glycines and other key residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1848**(5), 1183–1195.

ZHANG, Gaofeng, Mathew EDMUNDSON, Vsevolod TELEZHKIN, Yu GU, Xiaoqing WEI, Paul J. KEMP a Bing SONG, 2016. The role of Kv1.2 channel in electrotaxis cell migration. *Journal of Cellular Physiology*. **231**(6), 1375–1384.

ZHANG, Sensen, Jun ZHOU, Yuebin ZHANG, Tianya LIU, Perrine FRIEDEL, Wei ZHUO, Suma SOMASEKHARAN, Kasturi ROY, Laixing ZHANG, Yang LIU, Xianbin MENG, Haiteng DENG, Wenwen ZENG, Guohui LI, Biff FORBUSH a Maojun YANG, 2021. The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. *Communications Biology*. **4**(1), 226.

ZHANG, Zhe, Yuzhuo YANG, Han WU, Hongliang ZHANG, Haitao ZHANG, Jiaming MAO, Defeng LIU, Lianming ZHAO, Haocheng LIN, Wenhao TANG, Kai HONG a Hui JIANG, 2017. Sodium-hydrogen-exchanger expression in human sperm and its relationship with semen parameters. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. **34**(6), 795–801.

ZHANG-JAMES, Yanli, Marc VAUDEL, Olav MJAAVATTEN, Frode S. BERVEN, Jan HAAVIK a Stephen V. FARAONE, 2019. Effect of disease-associated *SLC9A9* mutations on protein–protein interaction networks: implications for molecular mechanisms for ADHD and autism. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*. **11**(1), 91–105.

ZHAO, Peng, Chaoran ZHAO, Dandan CHEN, Caihong YUN, Huilin LI a Lin BAI, 2021. Structure and activation mechanism of the hexameric plasma membrane H^+-ATPase. *Nature Communications*. **12**(1), 6439.

ZIMMERMANNOVÁ, Olga, Kristina FELCMANOVÁ, Paul ROSAS-SANTIAGO, Klára PAPOUŠKOVÁ, Omar PANTOJA a Hana SYCHROVÁ, 2019. Erv14 cargo receptor participates in regulation of plasma-membrane potential, intracellular pH and potassium homeostasis via its interaction with K^+-specific transporters Trk1 and Tok1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1866**(9), 1376–1388.

ZIMMERMANNOVA, Olga, Kristina FELCMANOVA, Lenka SACKA, Anne-Sophie COLINET, Pierre MORSOMME a Hana SYCHROVA, 2021. K^+-specific importers Trk1 and Trk2 play different roles in Ca^{2+} homeostasis and signalling in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Research*. **21**(3), foab015.

ZVYAGILSKAYA, Renata A., Fredrik LUNDH, Dieter SAMYN, Johanna PATTISON-GRANBERG, Jean-Marie MOUILLON, Yulia POPOVA, Johan M. THEVELEIN a Bengt L. PERSSON, 2008. Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. **8**(5), 685–696.