

Universita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Ing. Mgr. Jaromír Zahrádka

Fyziologické úlohy Na^+/H^+ antiporterů v kvasinkách

Physiological role of Na^+/H^+ antiporters in yeast cells

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha 2013

Prohlášení:

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

V Praze 5. 6. 2013

.....

Abstrakt

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří k důležitým modelům při studiu homeostase iontů alkalických kovů. Stejně jako v jiných buňkách je pro *S. cerevisiae* nezbytné udržení určité koncentrace K^+ uvnitř buněk, na druhou stranu Na^+ a další ionty alkalických kovů jsou pro buňky toxické. K^+ je akumulován pomocí uniporterů Trk1 a Trk2, zatímco export toxických iontů alkalických kovů, a také nadbytečného K^+ , je zajištěn ATPasami Ena, $Na^+(K^+)/H^+$ antiporterem Nha1 a K^+ selektivním kanálem Tok1. Ačkoli jsou jednotlivé transportery poměrně dobře prozkoumány, není dosud mnoho známo o celkové regulaci homeostase iontů alkalických kovů ani o vzájemné interakci a regulaci mezi jednotlivými transportery. V rámci této práce byl studován antiporter Nha1 a jeho fyziologické úlohy v kontextu ostatních transporterů iontů alkalických kovů. Ukázalo se, že nejen Nha1p, ale také další exportery, ATPasy Ena a kanál Tok1, jsou, přes jejich výraznou odlišnost v mechanismu transportu i způsobu regulace, regulovány společně změnou aktivity importerů K^+ a to prostřednictvím membránového potenciálu. Vzájemná regulace a funkční propojení importerů a exporterů K^+ , ale také další výsledky poprvé ukázaly, jak velice důležitá je neustálá cirkulace K^+ , tedy současný vstup a výstup K^+ , pro udržování homeostase iontů alkalických kovů. Ačkoli bylo prokázáno, že homeostáze iontů alkalických kovů a související fyziologické parametry (např. membránový potenciál, velikost buněk či tolerance k solím) mohou být výrazně ovlivněny volbou konkrétního kmene *S. cerevisiae*, byla potvrzena nezastupitelná úloha Nha1p pro přežití buněk v přirozeném prostředí, kde může koncentrace solí výrazně kolísat. V této práci byly znalosti o regulaci Nha1p ještě dále rozšířeny o dva nově nalezené pozitivní regulátory aktivity Nha1p a to 1) proteiny 14-3-3 fyzicky interagující s Nha1p na více místech a 2) kinasu Cka1, která byla dosud známa pouze jako regulátor exprese *ENA1*. Znalosti získané studiem Nha1p byly využity ke studiu lidského Na^+/H^+ antiporteru NHAoc/NHA2 v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících vlastní transportery a byly identifikovány aminokyselinové zbytky, jejichž mutací dochází k disfunkci transporteru vedoucí často k závažné chorobě tvorby kostí, osteopetrose. Práce tedy přispěla mnoha novými poznatky k lepšímu pochopení úlohy Nha1p a dalších transporterů v udržování homeostase iontů alkalických kovů a během práce došlo také k přínosu v oblasti metodiky (především měření vnitrobuněčného pH), který v budoucnu umožní další posun v řešené problematice.

Abstract

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* belongs to important models for alkali-metal-cation homeostasis research. As other cells, certain intracellular content of K^+ is necessary for *S. cerevisiae*, but Na^+ or other alkali metal cations (Li^+ , Rb^+) are toxic for yeast cells. Uniporters Trk1 and Trk2 are responsible for K^+ accumulation, while efflux of Na^+ , Li^+ , Rb^+ and K^+ is ensured by Ena ATPases, $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter Nha1 and K^+ specific channel Tok1. Several regulators of K^+ (Na^+) transporters are already known, but reciprocal regulation between transporters and overall picture of the maintenance of alkali-metal-cation homeostasis is still unclear. In this work, K^+ circulation (simultaneous uptake and export of K^+) was shown to be important in alkali-metal-cation homeostasis maintenance. K^+ circulation is maintained using reciprocal regulation and interactions between K^+ exporters and importers. Though obtained results showed that the alkali-metal-cation homeostasis and associated physiological parameters (e.g. membrane potential, cell size, salt sensitivity) are strain specific, Nha1p was verified to be important for cell survival in ever-changing natural environment. Furthermore, two novel positive regulators of Nha1p activity were found, 14-3-3 proteins and Cka1 kinase. 14-3-3 proteins interact physically with multiple parts of Nha1p. Cka1 kinase was previously known as *ENA1* expression regulator, moreover, regulation of Nha1p activity by Cka1p was observed in this work. Using knowledge and skills obtained during this work, *S. cerevisiae* strain lacking its own alkali-metal-cation exporters was used for characterization of human Nha1p homologue, Na^+/H^+ antiporter NHAoc/NHA2. Residues, whose mutation could be one of crucial points in the development of serious bone disease (osteopetrosis) in human, were identified in the NHAoc/NHA2 sequence. Altogether, results obtained in this work helped for better understanding the role of Nha1p and other transporters in maintenance of alkali-metal-cation homeostasis and its regulation, furthermore, an important progress has been made in methodology (especially in intracellular pH measurement) which will help in future studies.

Tato disertační práce vznikla v letech 2008 - 2013 v rámci projektů:

GA AV ČR IAA500110801 (2008-2012) Úloha přenašečů Na^+/H^+ v buněčné fyziologii - souhra transportérů v optimalizaci vnitrobuněčné homeostáze K^+ a pH

GA ČR 204/08/0354 (2008-2010) Homeostáze kationů alkalických kovů v biologii *Saccharomyces cerevisiae*

MŠMT LC531 (2005-2011) Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek

MŠMT COST OC10012 (2010-2012) Transport kationtů a protonů přes buněčné membrány - molekulární struktura a mechanismus aktivity Na^+/H^+ antiporterů nižších eukaryot

MŠMT specifický vysokoškolský výzkum, projekt 33779266 (2010-2012)

TA 01011467 (2011-2012) SW analýza změn v mikroskopických obrazech buněčných struktur s využitím fluorescenčních indikátorů

výzkumný záměr AV0Z50110509 (2005-2011) Výzkum molekulárních a buněčných základů fyziologických a patofyziologických procesů s cílem objasnit mechanismy vzniku závažných onemocnění člověka

a s využitím zdrojů na dlouhodobý koncepční Rozvoj Výzkumné Organizace, RVO:67985823

Výsledky byly dosud publikovány v odborných člancích:

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

Navarrete, C., Petrezselyová, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahrádka, J., Arino, J., Sychrová, H., Ramos, J.: Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **10**, 508-517 (2010).

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

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 849-858 (2012).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis. *rukopis* (2013).

Huang, X., Morse, L.R., Xu, Y., Zahrádka, J., Sychrová, H., Stashenko, P., Fan, F., Battaglino, R.A.: Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1241-1247 (2010).

Práce vznikla na Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i.

Rád bych zde poděkoval RNDr. Haně Sychrové, DrSc. za trpělivé vedení a čas, který mi věnovala, studijní materiály i znalosti, které jsem jejím prostřednictvím načerpal. Dále bych chtěl poděkovat dalším členům Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. za všestrannou pomoc a vytvoření příjemného a přátelského prostředí, a také mé ženě a dalším členům rodiny za všestrannou pomoc a podporu.

OBSAH

1 Úvod	8
2 Literární přehled	9
2.1 Transport iontů alkalických kovů	9
2.1.1 Transportery zajišťující import K^+ do buněk	11
2.1.1.1 Nespecifický a nízkoafinitní import K^+	13
2.1.2 Transportery zajišťující import Na^+ do buněk	14
2.1.3 Exportní systémy pro ionty alkalických kovů	14
2.1.3.1 K^+ kanál Tok1	15
2.1.3.2 Na^+ -ATPasy Ena	15
2.1.3.3 Na^+/H^+ antiporter Nha1	16
2.1.4 Vnitrobuněčné transportery Na^+ a K^+	17
2.1.5 Úloha H^+ -ATPas pro udržení homeostase K^+ a Na^+	19
2.1.6 Studium antiporterů z jiných organismů v <i>S. cerevisiae</i>	20
2.2 Regulace homeostase iontů alkalických kovů	22
2.2.1 Regulace importu K^+	23
2.2.2 Regulace exportu iontů alkalických kovů	25
2.2.2.1 Regulace ATPasy Ena1	26
2.2.2.2 Regulace antiporteru Nha1	30
2.2.3 Další proteiny podílející se na homeostasi iontů alkalických kovů, proteiny 14-3-3	32
3 Cíle práce	33
4 Výsledky	34
4.1 Publikace č. 1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance	37
4.2 Publikace č. 2 – Lack of main K^+ uptake systems in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions	38
4.3 Publikace č. 3 – Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium limiting conditions	40
4.4 Publikace č. 4 – Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter	41
4.5 Rukopis č. 5 – Pleiotropic role of <i>CKA1</i> in salt tolerance and cation homeostasis	42
4.6 Publikace č. 6 – Mutational analysis of <i>NHAoc/NHA2</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
4.7 Další nepublikované výsledky, metodika měření vnitrobuněčného pH	45
5 Souhrnná diskuse	48
6 Závěr	51
7 Seznam zkratk	53
8 Přehled použité literatury	54

1 Úvod

Kvasinky patří mezi nejdéle studované organismy. Jedním z důvodů je to, že jsou lidmi využívány již tisíce let např. při výrobě chleba a fermentovaných nápojů. Nejnámějším zástupcem jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou v současné době jedním z nejdůležitějších modelových organismů eukaryotních buněk pro základní i aplikovaný výzkum a hojně se využívají také v biotechnologické a potravinářské praxi. Z pohledu základního výzkumu byl význam *S. cerevisiae* jako modelového organismu v posledních dekadách velmi posílen tím, že byl genom této kvasinky kompletně sekvenován jako první genom eukaryotního organismu [1]. K popularitě tohoto modelu dále přispívá fakt, že se jedná o jednoduchý, snadno a rychle rostoucí mikroorganismus, pro který bylo postupně vytvořeno mnoho nástrojů molekulární biologie a genetiky umožňující vnášení mutací, delece, nebo vkládání genů nejen vlastních, ale i genů z jiných organismů [2, 3]. Díky relativně jednoduchému genomu, vysoké sekvenční homologii a funkční podobnosti s proteiny vyšších organismů je *S. cerevisiae* dobrým nástrojem využívaným při rozsáhlých studiích proteinů z jiných eukaryotních organismů [3]. Kromě biomedicínských studií se na základě společenské poptávky po nových technologiích do popředí stále častěji dostává také výzkum možností využití těchto buněk např. při produkci biopaliv, organických plastů, vitamínů, nebo rekombinantních proteinů a peptidů.

Udržování homeostase iontů alkalických kovů je důležitým předpokladem přežití organismů v přirozeném prostředí. Stejně jako pro jiné organismy, také pro *S. cerevisiae* platí, že K^+ je důležitým vnitrobuněčným kationtem, který je uvnitř buněk udržován v poměrně vysoké koncentraci a podílí se např. na udržování osmolarity, iontové síly a pH cytoplasmy nebo na udržování membránového potenciálu. Na rozdíl od K^+ působí Na^+ uvnitř buněk toxicky i ve velmi nízkých koncentracích a buňky využívají několik mechanismů, aby vstupu Na^+ zabránily [4-6].

Modelový organismus *S. cerevisiae* je s úspěchem používán také při výzkumu homeostase iontů alkalických kovů [6, 7]. Ačkoli je udržování homeostase K^+ a Na^+ důležité pro přežívání buněk v přirozeném prostředí, nejsou geny kódující transportery těchto iontů v *S. cerevisiae* esenciální. Při optimálním přísunu K^+ v růstovém médiu (cca 200 mM K^+ ; [6]) a absenci toxických iontů alkalických kovů nejsou růstové schopnosti buněk ovlivněny ani v případě současné delece genů všech známých transporterů K^+ a Na^+ (delece *trk1 trk2 tok1 nha1 ena1*; viz dále) v plasmatické membráně (PM). Tento fakt a jednoduchost genetických manipulací dělá z *S. cerevisiae* velice účinný a velmi citlivý nástroj pro studium transporterů iontů alkalických kovů, ať už pocházejících z této kvasinky nebo z jiných organismů.

2 Literární přehled

2.1 Transport iontů alkalických kovů

Prvky označované jako alkalické kovy nalezneme v 1. skupině periodické tabulky a jedná se o lithium (Li), sodík (Na), draslík (K), rubidium (Rb), cesium (Cs) a francium (Fr). Jelikož jde o velmi reaktivní kovy, vyskytují se v přírodě prakticky pouze ve sloučeninách nebo po disociaci solí ve formě jednomocných kationtů. Ve větším množství nalézáme pouze dva z nich, ionty Na^+ a K^+ , které zauímají 5. a 6. místo ve výskytu prvků na zemi (Na^+ tvoří 2,89 % a K^+ 2,80 % kontinentální zemské kůry; [8]). Ostatní zástupci alkalických kovů se v přírodě vyskytují v mnohem menším množství (Rb 112 ppm¹, Cs 4,8 ppm, Li 20 ppm), v případě radioaktivního Fr je zastoupení mizivé (cca 10^{-18} ppm; [8]). Kromě vysoké reaktivity elementárních prvků je alkalickým kovům společná nízká elektronegativita (0,86 -1,00) a související tvorba solí, které se ve vodě zpravidla dobře rozpouštějí. Z hlediska transportu přes buněčné membrány je důležitějším fyzikálním ukazatelem iontový poloměr, který je považován za faktor zásadně ovlivňující selektivitu iontových transporterů a kanálů [4, 9]. V případě iontů alkalických kovů byly jednotlivé iontové poloměry stanoveny jako: Li^+ 0,76 Å, Na^+ 1,02 Å, K^+ 1,38 Å, Rb^+ 1,52 Å, Cs^+ 1,67 Å a Fr^+ 1,8 Å [10]. Relativní podobnost v iontovém poloměru a zároveň nízké zastoupení prvku v přírodě (vysoký poměr signálu a šumu a vysoká citlivost experimentů) patří k důvodům, proč je Li^+ využíván jako analog při studiu transportu Na^+ a Rb^+ při studiu transportu K^+ [4, 7, 9]. Vzhledem k velmi nízkému zastoupení a také malému významu Fr^+ a Cs^+ ve výzkumu transportních mechanismů iontů alkalických kovů v buňkách se tato práce dále věnuje pouze Li^+ , Na^+ , K^+ a Rb^+ .

Přítomnost iontů alkalických kovů vně i uvnitř buněk zásadně ovlivňuje buněčnou fyziologii, a proto je udržování vnitrobuněčné homeostase iontů alkalických kovů nezbytným předpokladem přežívání buněk v přirozeném prostředí. Kvasinka *S. cerevisiae* se s úspěchem používá jako modelový organismus pro studium homeostase iontů alkalických kovů po mnoho desetiletí [4-6], výsledky těchto studií pomáhají k pochopení, jak je rovnováha iontů v buňkách udržována a k čemu slouží. Výsledky pocházející z tzv. základního výzkumu homeostase iontů alkalických kovů v *S. cerevisiae* lze často přímo využít např. v biotechnologiích, nebo zobecnit a využít pro pochopení fungování jiných buněk a buněčných systémů vyšších organismů. Získané poznatky pak mohou být využity pro

¹ 1 ppm (particles per milion) odpovídá 0,0001 %

pochopení jednotlivých aspektů tak složitých dějů, jako je např. funkce ledvin, nervové nebo svalové soustavy, kde hrají ionty K^+ a Na^+ důležitou roli [11].

Homeostase iontů alkalických kovů u buněk *S. cerevisiae* se příliš neliší od jiných eukaryotních buněk. Pro přežití buněk je nutné, aby byl K^+ udržován v buňkách v relativně vysoké koncentraci [7]. Při růstu v laboratorních podmínkách ve standardním médiu a bez přidavku dalších solí byla tato koncentrace stanovena v rozmezí 200-300 mM [6] v závislosti na kmenu a použitém médiu. Ionty K^+ tvoří hlavní vnitrobuněčný kationt zajišťující elektroneutralitu buňky, zatímco mezi intracelulární anionty patří hlavně fosfáty, polyfosfáty a také karboxylové skupiny. Relativně vysoký obsah K^+ uvnitř buněk je udržován aktivitou vstupních transporterů K^+ , ale předpokládá se, že v rámci dynamické rovnováhy jsou mírně aktivní také výstupní transportery a dochází tak k obousměrnému transportu, cirkulaci K^+ [6]. Narušením vstupu K^+ do buněk dochází k hyperpolarisaci PM [12] a stejný efekt má také nadexprese exporterů K^+ (prokázáno u antiporteru Nha1 a predikováno pro ATPasu Ena1; [13, 14]) vedoucí k urychlení výstupu K^+ z buněk, zatímco po odstranění exporterů K^+ (zpomalení výstupu K^+) je PM depolarisována [15]. Kromě rolí, jako je např. zajištění elektroneutrality systému, udržování membránového potenciálu ($\Delta\Psi$) a vytvoření vhodného prostředí pro správnou funkci enzymů, jsou ionty K^+ důležité pro regulaci vnitrobuněčného turgoru, vnitrobuněčného pH a objemu buňky [5, 6, 15].

Za snížené dostupnosti K^+ dochází v buňkách k částečnému nahrazení tohoto iontu protony, okyselení cytoplasmy a k narušení osmotické rovnováhy uvnitř buňky. Tyto změny dále způsobují inhibici syntézy proteinů a ovlivňují aktivitu enzymů. Za specifických podmínek, při hladovění na K^+ mohou tento iont nahradit také ionty Na^+ [5]. Běžně ani při stonásobně vyšší koncentraci Na^+ než K^+ v médiu nenalzáme zvýšené množství Na^+ uvnitř buněk, k tomu dochází až při překročení extracelulárního poměru koncentrací Na^+/K^+ cca 700:1 [16], kdy část Na^+ vstupuje do buněk a zůstává uvnitř, zatímco adekvátní množství K^+ je z buňky vyloučeno z důvodu zachování elektroneutrality [17]. Poměr vstupujících iontů Na^+/K^+ je výrazně ovlivněn vnějším pH [4].

Zatímco přítomnost K^+ je pro přežití buněk nezbytná, jiné ionty alkalických kovů, Na^+ , Li^+ a Rb^+ jsou pro buňky toxické. Ionty Na^+ obecně patří mezi hojně zastoupené v prostředí (viz výše), ale v cytoplasmě buněk působí toxicky i v mírně zvýšeném množství. Toxicita Na^+ je tvořena více faktory. Stejně jako u jiných iontů dochází při zvýšené koncentraci Na^+ v prostředí k hyperosmotickému stresu [19] a inhibici aktivity enzymů vlivem změny iontové síly cytoplasmy (již při vnějších koncentracích anorganických solí okolo 0,4 M; [18]). Kromě výše zmíněného, působí Na^+ také mnohem specifičtěji na úrovni proteinů. Toxické účinky Na^+ uvnitř buňky *S. cerevisiae* nejsou na molekulární úrovni dostatečně prozkoumány, ale je známo již mnoho specifických cílů účinku Na^+ v buňce, díky kterým

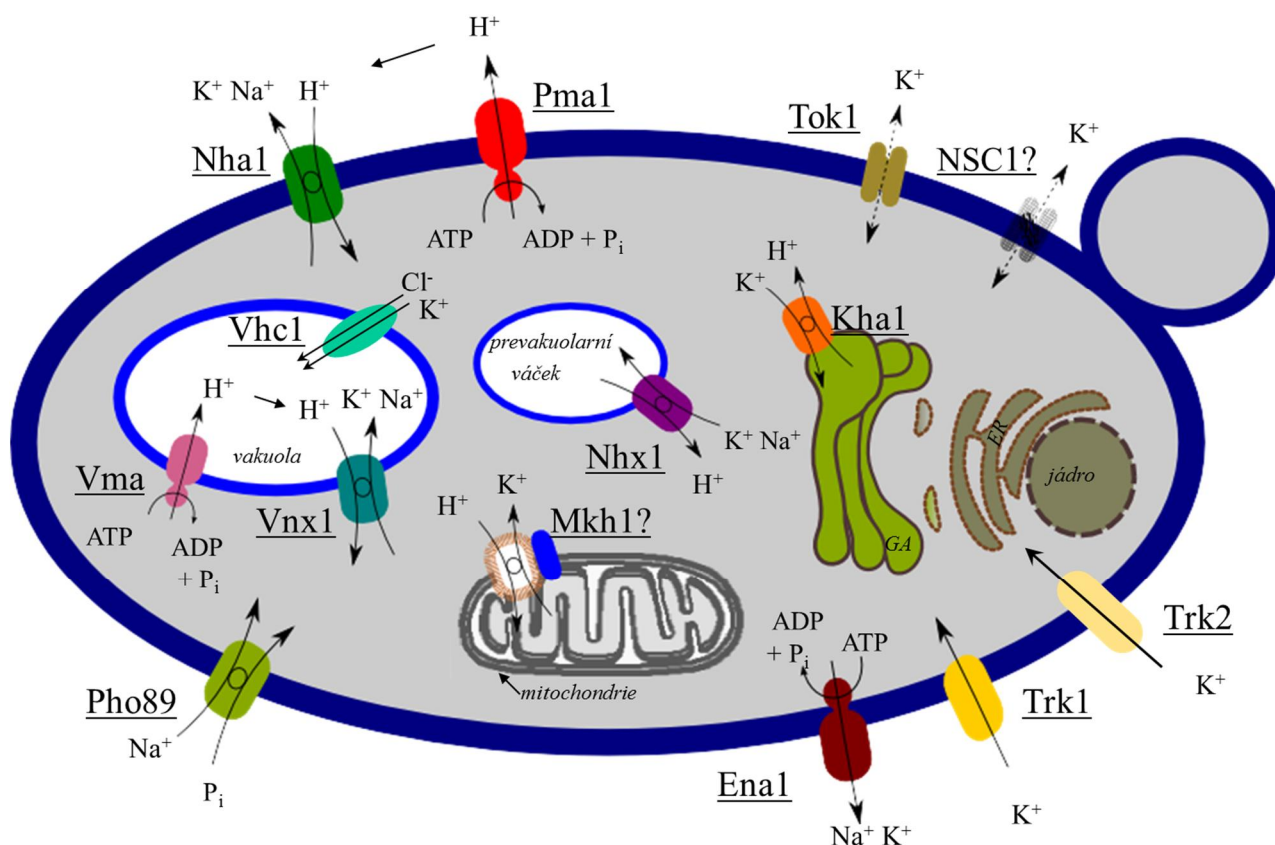
působí Na^+ toxicky i v mnohem nižších koncentracích (cca 0,1 M [20]). Mezi konkrétní příklady účinku iontů Na^+ patří jejich působení na vazebná místa K^+ , Mg^{2+} či Ca^{2+} některých enzymů, např. Hal2p (viz dále). Ionty Na^+ vytěsňují ostatní kationty z jejich vazebných pozic a tak inhibují aktivitu enzymů, které tyto kationty potřebují [18, 21]. Fosfatasa Hal2, jenž katalyzuje přeměnu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátu (PAP) na adenosinmonofosfát, patří mezi známé molekulární cíle toxického působení Na^+ v *S. cerevisiae*. Zvýšená koncentrace Na^+ nebo Li^+ vede k vytěsňování jednoho ze dvou iontů Mg^{2+} v aktivním centru enzymu a inhibici aktivity enzymu. Následné hromadění PAP v buňce může být příčinou inhibice sulfotransferas a enzymů upravujících RNA [18, 22].

Ionty Li^+ a Rb^+ se v přirozeném prostředí téměř nevyskytují, ale s úspěchem se díky podobným vlastnostem používají k výzkumu transportních systémů Na^+ a K^+ [4, 9]. Pro studium transporterů specifických pro K^+ se často využívá vlastnostmi velmi podobný, ale mnohem toxičtější Rb^+ , který je zpravidla přenášen stejnými transportery jako K^+ a díky zanedbatelné přirozené koncentraci jsou měření s Rb^+ velmi přesná a vhodná např. při studiu regulace importerů K^+ [5, 23-25]. Z podobných důvodů je používán Li^+ pro studium transportu Na^+ . Li^+ je mnohem toxičtější než Na^+ a díky tomu je možné při studiu transportu a působení Na^+ rozlišit, jaký podíl na toxicitě má osmotický tlak způsobený zvýšenou koncentrací solí a jaký podíl připadá specifickému působení iontu samotného [18]. Mechanismus toxicity Li^+ bývá v *S. cerevisiae* studován také jako model působení Li^+ v lidských buňkách, jelikož je tento iont farmakologicky využíván např. k léčbě deprese nebo bipolární poruchy [26, 27]. Mezi sledované cíle toxicity Li^+ patří např. fosfoglukomutasa z metabolismů cukrů [26] nebo glutamátové receptory NMDA (N-metyl-D-aspartát) lokalizované v neuronech [28].

Při studiu homeostase iontů alkalických kovů jsou často využívány (např. [25, 29]) toxické organické kationty, jako je hygromycin B, spermin a tetrametylamonné kationty. Zvýšená senzitivita současně ke všem těmto kladně nabitým látkám (každá z látek působí na jiný molekulární cíl) je často spojena s hyperpolarisací PM, která může upozorňovat např. na poruchu importu K^+ , nebo jiný defekt v homeostasi iontů alkalických kovů [12, 30].

2.1.1 Transportery zajišťující import K^+ do buněk

Udržovat vnitrobuněčnou koncentraci K^+ v přípustných mezích je pro buňku životně důležité. Kvasinkové buňky jsou schopny růst ve velmi širokém spektru vnějších koncentrací K^+ (cca 2 μM – 2 M), ale pro růst a dělení buněk je nutné, aby vždy převažoval vstup K^+ nad výstupem a K^+ byl kontinuálně přijímán a předáván dceřiným buňkám [31, 32]. Proto buňky využívají dva režimy importu K^+ do buněk [5]. Nízkoafinitní režim (K_T v řádu mM) je důležitý pro růst buněk v prostředí s dostatkem K^+ , zatímco vysokoafinitní režim (K_T v řádu μM) umožňuje růst za velmi nízkých koncentrací K^+ v prostředí nebo např. za zvýšené extracelulární koncentrace Na^+ [5].



Obr. 2.1.1 Transportery iontů alkalických kovů

zdroj: převzato a upraveno [33]

Akumulace K^+ uvnitř buněk je zajištěna aktivními transportery kódovanými geny *TRK1* [34] a *TRK2* [35], jejichž aktivita je řízena membránovým potenciálem [36] udržovaným pomocí ATPasy *Pma1* ([37]; obr. 2.1.1, str. 12). Ačkoli jsou tyto transportery považovány za uniportery a výsledky mnoha experimentů toto potvrzují, lze předpokládat, že mechanismus uniportu nemůže plně dostačovat k tak vysokému stupni akumulace K^+ jaký byl dříve pozorován [4, 6, 34] v prostředí s nízkým extracelulárním K^+ . Přes intenzivní výzkum probíhající po několik dekad není mechanismus akumulace K^+ prostřednictvím *Trk1p* a *Trk2p* plně objasněn [6, 38].

Dominantní úlohu pro vstup K^+ do buněk hraje *Trk1p* (obr. 2.1.1, str. 12), jenž tvoří 1235 aminokyselinových (AA) zbytků. Topologie proteinu byla predikována na základě zastoupení hydrofobních AA v sekvenci a bylo identifikováno 12 transmembránových segmentů (TMS), tedy předpokládaných úseků prostupujících z jedné strany PM na druhou [34]. Mezi fyziologické úlohy tohoto transporteru patří udržování homeostase K^+ a pH [12, 39], turgoru [40] a $\Delta\Psi$ [12, 41]. Kromě transportu K^+ byla před několika lety objevena schopnost *Trk1p* exportovat Cl^- [42]. Předpokládá se, že chloridový kanál je tvořen symetrickou agregací 4 monomerů *Trk1p* v PM, nicméně kinetické parametry přenosu Cl^- tímto kanálem dosud nebyly stanoveny. Ačkoli se této roli *Trk1p* věnovala pouze jedna práce [42],

bylo ukázáno, že výstup Cl^- prostřednictvím Trk1p by mohl být důležitým faktorem regulujícím import K^+ a udržování $\Delta\Psi$.

Trk2p je homolog Trk1p s vysokým stupněm identity (55%). Jedná se o 889 AA dlouhý protein pravděpodobně obsahující 12 TMS [43]. Za běžných podmínek i během hladovění buněk na K^+ se předpokládá, že téměř všechny K^+ je transportován prostřednictvím Trk1p [6, 30, 38], proto se nejdříve předpokládalo, že Trk2p je odpovědný za nízkoafinitní import K^+ [35]. Brzy se však ukázalo, že tomu tak není a že Trk2p je transporterem s afinitou střední až vysokou a s velmi nízkou V_{\max} [32], jeho úloha je proto minoritní díky velmi nízkému přirozenému množství proteinu v buňkách [44].

Ačkoli není ani jeden z importerů K^+ esenciální pro život buňky, mutanty postrádající gen *TRK1* nejsou schopné růstu v prostředí s nízkou koncentrací K^+ (cca 0.1 - 1 mM v závislosti na kmeni a médiu; [30, 34, 38]), import K^+ a Rb^+ [30, 34] je u nich omezen, vykazují zvýšený $\Delta\Psi$ [12, 30] a zvýšenou citlivost k Li^+ , Na^+ a jiným toxickým (např. organickým) kationtům [30, 38]. Delece *trk1* dále zamezuje přechodnému zmenšení buněk, jenž bylo pozorováno u kmenů exprimujících *TRK1* ihned po přenosu do média s nízkou koncentrací K^+ [38].

Samotná delece *trk2* nemá téměř žádný pozorovatelný fenotyp [32, 38], ale situace je odlišná při deleci obou transporterů, *trk1 trk2*. Do nedávna byla publikována pouze jediná práce prokazující fyziologickou úlohu Trk2p v homeostasi iontů alkalických kovů a to při nedostatku K^+ v médiu a za nízkého pH, ale pouze při současné deleci genu *SIN3*, jehož produkt je součástí komplexu Sin3p-Rpd3p odpovědného za deacetylaci histonů [44]. Za této situace je *TRK2* mnohem více exprimován a Trk2p je pak schopen zastoupit roli chybějícího Trk1p. V nedávno publikované práci [38] byl detailně popsán fenotyp delece *trk2* na pozadí kmenu postrádajícího gen *TRK1*. Kmen s delecí *trk1 trk2* vykazuje mnohem vyšší citlivost k nízkým koncentracím K^+ (s limitem růstu cca 10 mM) než kmen postrádající pouze *TRK1* a také další fenotypy delece *trk1* jsou následnou delecí *trk2* akcentovány (nárůst ^a a citlivost k organickým kationtům). Experimentální zvýšení exprese *TRK2* kompenzuje fenotyp delece *trk1*, což potvrzuje hypotézu velmi podobné fyziologické úlohy, ale rozdílného množství proteinů Trk1 a Trk2 v buňkách [38].

2.1.1.1 Nespecifický a nízkoafinitní import K^+

Vztah mezi existencí dvou režimů importu K^+ , nízkoafinitním a vysokoafinitním, a importery samotnými byl po dlouhou dobu kontroverzní. V současné době se odborníci shodují, že převážná většina K^+ vstupuje do buněk pomocí Trk1p a to jak v režimu nízkoafinitním za dostatku K^+ v okolí, tak v režimu vysokoafinitním v médiu s nízkou koncentrací K^+ (nebo s vyšší koncentrací Na^+). Trk2p přitom hraje minoritní roli díky nízké expresi za běžných podmínek, přestože je schopen importovat

K^+ se střední až vysokou afinitu [6]. Nízkoafinitní transport K^+ (označován jako zbytkový, nebo ektopický) byl pozorován v případě dvojité delece *trk1 trk2* (K_T v řádu mM) [44]. Za tento druh transportu je odpovědný nespecifický transport K^+ pomocí jiných transporterů, jako je např. NCS1 (obr. 2.1.1, str. 12), nespecifický kationtový kanál jednomocných a dvoumocných kationtů, jehož gen dosud nebyl nalezen a jehož existence byla prokázána pouze pomocí elektrofyziologických experimentů zaměřených na toky iontů přes membránu [30, 45, 46]. Import K^+ může za specifických podmínek probíhat také prostřednictvím transporterů cukrů kódovaných geny *HXT* a *GAL2* [47].

2.1.2 Transportery zajišťující import Na^+ do buněk

Na rozdíl od K^+ je přítomnost Na^+ v buňkách *S. cerevisiae* nežádoucí, proto neexistují specifické transportní systémy pro vstup Na^+ do buněk (kromě Pho89p se specifickou funkcí, viz dále). Zvýšené koncentrace Na^+ v okolí buněk ovlivňují kinetiku transportu K^+ formou kompetitivní inhibice [9], ale za běžných podmínek je díky vysokoafinitnímu importu K^+ pomocí Trk1p a Trk2p potlačen nespecifický import Na^+ . U kmenů postrádajícím oba importery K^+ (delece *trk1 trk2*) je akumulace K^+ narušena a zvyšuje se import Na^+ [16], což potvrzuje nespecifickou povahu ektopického transportu iontů alkalických kovů [45].

Jediným transporterem, který je schopen specificky přenášet Na^+ do buněk (obr. 2.1.1, str. 12), je transporter kódovaný genem *PHO89* [48], symporter anorganických fosforečných aniontů (P_i) a Na^+ . Aktivita tohoto transporteru je důležitá v prostředí s nedostatkem P_i (K_T pro P_i je 0,5 μ M), za vysokého pH (pH optimum 9,5) a v přítomnosti Na^+ v okolí buňky. Aktivace importu P_i je maximální při 25 mM Na^+ v prostředí [49], tedy koncentraci, která pro buňky není ani zdaleka toxická. Potřebný P_i není za těchto podmínek možné získávat z prostředí běžnou cestou, pomocí vysokoafinitního P_i - H^+ symporteru kódovaného genem *PHO84*, který je aktivní pouze za nízkého externího pH [50]. Transporter Pho89 je silně regulován několika faktory na úrovni exprese, je silně specifický pro Na^+ a je-li přítomen v PM za nízkého pH, není aktivní. Z uvedených důvodů je jeho aktivita za běžných růstových podmínek zastoupena aktivitou Pho84p [50]. V *S. cerevisiae* je Pho89p jediný známý sekundární transporter využívající gradient Na^+ místo H^+ , buňkami je však využíván jen za mimořádných podmínek (nedostatek P_i a vysoké vnější pH).

2.1.3 Exportní systémy pro ionty alkalických kovů

Transportery zajišťující export iontů alkalických kovů z buňky mají několik úloh, z nichž nejdůležitější je vypuzování toxických kationtů (Na^+ , Li^+ , Rb^+) a přebytečných iontů K^+ z buněk. Přítomnost exporterů umožňuje také již zmíněnou kontinuální cirkulaci K^+ , která je považována za důležitý faktor regulace ovlivňující řadu fyziologických ukazatelů. Důležitost těchto exporterů v *S. cerevisiae*

potvrzuje to, že se zde vyskytují tři systémy s rozdílným mechanismem transportu a regulace. Jedná se o kanál Tok1, ATPasy kódované geny *ENA* a antiporter Nha1 (obr. 2.1.1, str. 12).

2.1.3.1 K⁺ kanál Tok1

Gen *TOK1* kóduje jediný K⁺ specifický kanál v PM *S. cerevisiae* umožňující výstup K⁺ z buněk [51, 52]. Tok1p je tvořen 691 AA s predikovanou topologií obsahující 8 TMS [6, 52] a dvě tzv. P domény, které jsou běžné také u K⁺ kanálů z jiných organismů. Na základě elektrofyziologických experimentů bylo zjištěno, že úkolem Tok1p je napěťově řízený export K⁺ tak, že k otevření kanálu dochází při depolarisaci PM [30, 53]. Vnitrobuněčný K⁺ uvolněný do okolí buňky má pravděpodobně zajistit regeneraci ^a [54]. Tomu nasvědčuje fakt, že aktivita Tok1p může být modulována také externí koncentrací K⁺ [55]. Zajímavé je, že za určitých podmínek je zřejmě možný také transport K⁺ do buňky přes Tok1p [56]. Jedná se pouze o případ, kdy jsou odstraněny importery Trk1p a Trk2p, v prostředí je K⁺ přítomen ve větším množství (80 mM) a při zvýšené expresi Tok1p. Import K⁺ přes Tok1p může za těchto okolností přispět k lepšímu růstu buněk [56].

Delece *tok1* vede k poklesu ^a, zatímco zvýšená exprese způsobí hyperpolarisaci PM [15]. Mimo účinku na ^a a přímo měřené toky iontů přes kanál pomocí elektrofyziologických metod [53, 54] nebyly pro samotnou deleci *tok1* objeveny změny v akumulaci nebo exportu K⁺ a jediným nalezeným fenotypem byla zvýšená tolerance k Cs⁺ [30].

2.1.3.2 Na⁺-ATPasy Ena

Za aktivní export iontů alkalických kovů jsou z velké části odpovědné ATPasy typu P kódované tandemovou repeticí genů *ENA* [57]. Počet genů *ENA* je pro různé kmeny *S. cerevisiae* různý (1-5 kopií; [6, 58, 59]), příkladem může být porovnání dvou běžně užívaných laboratorních kmenů W303 a BY4741, které byly použity také v této práci. Zatímco první kmen W303 [60] obsahuje čtyři geny *ENA* (*ENA1* až *ENA4*), v případě kmenu BY4741 jsou přítomny pouze tři (*ENA1*, *ENA2* a *ENA5*; [6, 58, 61]). Sekvenčně si jsou jednotlivé repetice velmi podobné a za běžných podmínek se v buňce vyskytuje jen malé množství těchto proteinů (cca 600 molekul na buňku; [62]). Dominantní roli u zmíněných kmenů *S. cerevisiae* hraje *ENA1*, jelikož jeho exprese může být v případě potřeby silně indukována (např. v přítomnosti Na⁺, viz dále). Předpokládá se, že role ostatních proteinů Ena je stejná jako v případě Ena1p, ale jejich význam je minoritní. Lokalizace v PM byla zatím prokázána pouze pro Ena1p a Ena2p, jejichž sekvence jsou až na 13 AA shodné. Zajímavé je, že takto malý rozdíl způsobí to, že Ena1p je více specifický pro Na⁺, zatímco Ena2p pro Li⁺ [58].

Ena1p, nejdůležitější a nejstudovanější z těchto ATPas, tvoří 1091 AA uspořádaných pravděpodobně do 10 TMS [6, 57]. Ačkoli byl tento protein nejdříve označován jako Ca²⁺ specifická ATPasa, brzy se

ukázalo, že energie uvolněná hydrolýzou ATP je využita pro export iontů Na^+ , Li^+ a K^+ [17, 57, 63]. ATPasa Ena1 je považována za transporter determinující citlivost buněk k vnějším vysokým koncentracím Na^+ a Li^+ a její role je klíčová v prostředí s vysokým pH, kde je omezena funkce antiporteru Nha1 (viz kapitola 2.1.3.3). Ve výzkumných studiích je zpravidla z genomu odstraňován celý segment repetice genů *ENA*, což vede k silné citlivosti vůči Na^+ a Li^+ [6, 57, 58] a k růstovému defektu v prostředí s vysokým pH [57, 64].

2.1.3.3 Na^+/H^+ antiporter Nha1

Dalším ze systémů zajišťujících export iontů alkalických kovů z buněk je Na^+/H^+ antiporter kódovaný genem *NHA1* [65]. Nha1 je protein dlouhý 985 AA uspořádaných pravděpodobně do 12 TMS [66, 67], který se v PM vyskytuje ve formě funkčního dimeru [68]. Dimerizace probíhá pravděpodobně již v endoplasmatickém retikulu a vede ke konformační změně ve struktuře monomerů, která je nutná pro správnou funkci antiporteru Nha1 [68]. Vznik dimeru umožňuje správný průchod proteinu sekreční dráhou až do PM a v případě, že je dimerizace narušena (např. mutací D145N), tak se protein do PM nedostane [68]. Na základě sekvence byla predikována topologie Nha1p tak, že po krátkém hydrofilním N-konci (13 AA) následuje hydrofobní transmembránová část (AA zbytky 14 – 439 tvořící již zmíněných 12 TMS a spojujících hydrofilních smyček) a hydrofilní C-koncová část (zbylých 546 AA; [66]).

Porovnáme-li sekvenci Nha1p z *S. cerevisiae* s homology z jiných organismů (viz kapitola 2.1.6, str. 20), je první polovina proteinu (hlavně transmembránová část) vysoce konzervována nejen mezi homology Nha1p z jiných druhů kvasinek (např. Sod2p z *Schizosaccharomyces pombe*) ale také s bakteriálními (např. NhaA z *Escherichia coli*), rostlinnými (např. *SOS1* z *Arabidopsis thaliana*) a živočišnými (např. lidskými NHE1-9, nebo NHA2) homology patřícími společně s Nha1p do „superrodiny“ CPA (cation proton antiporter) [66, 69-73]. Vysoký stupeň identity vykazují nejen jednotlivé predikované TMS, ale také některé smyčky, jež je spojují. Díky cílené i náhodné mutagenesi Nha1p v *S. cerevisiae* i homologů jiných kvasinek bylo identifikováno mnoho AA zbytků v transmembránové části důležitých pro transport iontů alkalických kovů a protonů [66, 74-78]. Jedním z dlouhodobých cílů při výzkumu Nha1p je vznik modelu na základě získaných dat a také dříve publikované struktury bakteriálního homologu NhaA (jediná struktura proteinu ze „superrodiny“ CPA v dostatečném rozlišení získaná na základě rentgenové difrakce; [79]). Jde hlavně o vytvoření modelu struktury (konzervované) hydrofobní transmembránové části Nha1p, jež by pomohla osvětlit detaily mechanismu transportu, aktivity a substrátové specifity Nha1p a dalších homologních antiporterů.

Oproti transmembránové části je C-konec Nha1p (55% celého proteinu) konzervovaný pouze částečně, a to jen v rámci kvasinkových homologů. V C-koncích těchto antiporterů bylo nalezeno

6 konzervovaných sekvencí (C1-C6; [66, 80]). Role těchto sekvencí je různá. Zatímco některé části (C2-C3) transport iontů aktivují, jiné (C4-C6) ho inhibují [80]. Z celého C-konce je pro transport nezbytná pouze doména C1 (AA zbytky 434-449), která pravděpodobně přímo navazuje na transmembránovou část, obsahuje sekvenci umožňující průchod Nha1p sekreční dráhou a další AA regulující transportní aktivitu antiporteru [80, 81]. Odstranění zbylé části C-konce (od AA zbytku 473) nemá vliv na lokalizaci

a neovlivňuje transport K^+ , zatímco transport Na^+ a Li^+ je snížen [82]. Je-li exprimována samotná C-koncová část Nha1p (AA zbytky 473-985), je vzniklý protein směřován do buněčného jádra, jelikož obsahuje motiv jaderné lokalizační sekvence, to indikuje dosud neprozkoumané regulační úlohy této části proteinu [83].

Z hlediska homeostase iontů alkalických kovů je nejdůležitější funkcí antiporteru Nha1p export K^+ a Na^+ [63, 84], jenž je poháněn gradientem H^+ vytvořeným přes PM pomocí H^+ -ATPasy Pma1 (viz kapitola 2.1.5). Na izolovaných váčcích PM bylo prokázáno, že v případě Nha1p se jedná o elektrogenní transport, kdy je jeden Na^+ exportován při současném importu dvou protonů [85]. Na rozdíl od ATPas Ena (viz kapitola 2.1.3.2) je Nha1p aktivní při nižším vnějším pH, kde zajišťuje udržení homeostase K^+ a export toxických iontů. Dále se podílí na regulaci vnitrobuněčného pH, $\Delta\Psi$ a účastní se také regulace buněčného objemu [7, 13, 15, 63, 67]. V případě náhlého nárůstu vnitrobuněčného pH mohou být pomocí antiporteru Nha1p importovány potřebné protony umožňující dočasné přežití buněk, energii tomuto transportu dodává gradient K^+ orientovaný směrem ven z buňky [82].

Na základě dřívějších prací je zřejmé, že transport iontů alkalických kovů je zprostředkován transmembránovou částí Nha1p a role hydrofilního C-konce je spíše regulační [82, 83]. Kromě změny v transportní aktivitě Na^+ a Li^+ zhoršuje absence C-konce přežívání a růst buněk vystavených hyperosmotickému šoku [82, 83, 86], protože nemůže dojít k inaktivaci Nha1p zabraňující úniku K^+ a vody typickém při osmotickém stresu. Běžně je Nha1p při osmotickém šoku inaktivován pomocí fosforylace AA zbytků T765 a T876 v C-konci kinasou Hog1 (viz kapitola 2.2.2; [86]). Mimo tuto regulační úlohu Nha1p byla pozorována i funkce nesouvisející s homeostasí iontů alkalických kovů, jedná se schopnost ovlivnění buněčného cyklu. Zvýšená exprese Nha1p umožní buňkám překonat blok mezi fázemi G_1 a S, jež byl způsoben současnou delecí *sit4* a *hal3* [77, 87].

2.1.4 Vnitrobuněčné transportery Na^+ a K^+

Celková koncentrace iontů alkalických kovů v buňce je určována činností výše popsaných transporterů v PM, ale zdaleka není distribuce iontů uvnitř buněk rovnoměrná. Mezi důležité fyziologické parametry patří iontová síla, pH a koncentrace K^+ v cytosolu, ale také v jednotlivých

organelách, kde tyto parametry zásadně ovlivňují funkčnost organel. Vnitrobuněčné transportery, které nejčastěji fungují jako antiportery, obecně pomáhají zajistit správné rozložení K^+ v buňkách a sekvestraci Na^+ (také Li^+ a Rb^+), dále se účastní regulace objemu a pH organel [6]. Přísná regulace pH uvnitř váčků zapojených do endocytické nebo sekreční dráhy je důležitá pro správné směřování váčků [6, 88-90], které může být narušeno např. pouze malou změnou pH ve váčcích. V regulaci směřování váčků proto mají nezastupitelnou úlohu právě antiportery kationtů alkalických kovů a protonů. Při studiu vnitrobuněčných přenašečů je často nejdříve nutné odstranit výše zmíněné transportery umístěné v PM, aby bylo např. možné sledovat případné fenotypy delece genů pro transportery v organelách [89-91], které nemusí být běžně pozorovatelní díky funkci transporterů PM.

Dosud bylo identifikováno celkem pět systémů (obr. 2.1.1, str. 12), jež se podílejí na transportu iontů alkalických kovů mezi jednotlivými kompartmenty v buňkách *S. cerevisiae*. Tři z těchto transporterů, Nhx1 [92], Kha1 [93] a Vnx1 [94], patří mezi antiportery a transport zprostředkovaný těmito přenašeči je řízen protonovým gradientem vytvořeným H^+ -ATPasou Vma (viz kapitola 2.1.5, str. 19). První dva antiportery (Nhx1p a Kha1p) jsou navíc sekvenčně velmi podobné antiporteru Nha1. Dalšími účastníky regulace vnitrobuněčného homeostase iontů alkalických kovů v organelách jsou proteiny Mkh1 [95], Mrs7, nebo Yld183 [96] a nově objevený K^+ -Cl⁻ kotransporter Vhc1 [91].

Nejlépe charakterizovaným intracelulárním transporterem je $Na^+(K^+)/H^+$ -antiporter Nhx1 [92] lokalizovaný v prevakuolárních váčcích odpovídajících pozdnímu endosomu v živočišných buňkách. Mezi úlohy tohoto proteinu patří sekvestrace iontů alkalických kovů (K^+ , Na^+ , Li^+ ; [97]) do prevakuolárních váčků a do vakuoly [90, 98], regulace vnitrobuněčného pH a vesikulárního transportu. Aktivita Nhx1p dále ovlivňuje také sensitivitu k jiným chemickým látkám (např. k organickým kationtům) a změnám teploty [88-90]. Nhx1p se podílí rovněž na časné fázi adaptace buněk vystavených osmotickému stresu (viz kapitola 2.2, str. 22; [99]).

Podobnou úlohu jako Nhx1p hraje i antiporter Kha1, který byl lokalizován v membráně Golgiho aparátu [93, 100]. Jeho úloha v homeostasi iontů alkalických kovů (K^+ , Na^+ a Li^+), regulaci pH a také vesikulárního transportu byla prokázána teprve nedávno [89, 93, 100]. Shodně s Nhx1p byla dále pozorována jistá úloha Kha1p v toleranci k dalším chemickým látkám a teplotním změnám. Ukazuje se, že antiportery Nhx1 a Kha1 jsou společně s malými GTPasami (Ypt6 a Arl1) důležité pro udržení a regulaci obousměrného vesikulárního transportu mezi Golgiho aparátem a prevakuolárními váčky, tento transport samotný může determinovat toleranci nejen k vysokým koncentracím solí, ale k řadě dalších stresů [89, 90]. Nově byla identifikována úloha vesikulárního transportu (a řady proteinů důležitých pro vesikulární transport včetně Nhx1p, Ypt6p a Arl1p) také v regulaci vstupu K^+ do buněk [25].

Za transporter zajišťující sekvestraci K^+ a Na^+ do vakuol byl po dlouho dobu považován prevakuolární Nhx1, dokud nebyl nalezen $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter Vnx1, jež je svou sekvencí mnohem podobnější Ca^{2+}/H^+ antiporterům než typickým zástupcům Na^+/H^+ antiporterů. Přesto je specifický pro Na^+ a K^+ a netransportuje Ca^{2+} [94]. Vnx1p využívá stejně jako Nhx1p a Kha1p protonový gradient vytvořený ATPasou Vma (kapitola 2.1.5, str. 19). Kromě transportu iontů, patří k jeho úlohám také regulace vnitrobuněčného pH a po jeho delecii (*vnx1*) byla ve vakuolách pozorována ještě zbytková (nespecifická) Na^+ transportní aktivita, za kterou je zřejmě odpovědný Ca^{2+}/H^+ antiporter Vcx1 [101], který je ale označován jako Ca^{2+} specifický. Nedávno byl objeven další vakuolární transporter schopný ovlivňovat homeostasi iontů alkalických kovů. Jedná se o dosud jediný známý kotransporter K^+ a Cl^- (homolog k těmto transporterům známým v jiných organismech) v *S. cerevisiae*, který dostal název Vhc1 [91]. Bylo prokázáno, že se Vhc1p skutečně účastní sekvestrace K^+ do vakuol. Aktivita Vhc1p ovlivňuje celkovou homeostasi K^+ a morfologii vakuol během časně fáze adaptace buněk na osmotický stres.

Existence systému zajišťujícího výměnu iontů K^+ a protonů přes mitochondriální membránu byla predikována již před více než 50 lety [102] a později byla také prokázána při měření toků iontů na izolovaných mitochondriích mnoha organismů [6]. Má se za to, že na rozdíl od vnější mitochondriální membrány je průchod malých nabitých molekul a iontů přes vnitřní membránu striktně řízen. Přesto dochází k neselektivnímu nízkoafinitnímu importu K^+ do mitochondrií přes jiné přenašeče, který je umocněn vnitřním záporným $\Delta\Psi$. Tento přísun K^+ (zvyšování osmotického tlaku) je pro mitochondrie nežádoucí a může vést k nasávání vody, bobtnání a až prasknutí mitochondrie. Tomu se mitochondrie brání K^+/H^+ antiportním transportem, kterého se účastní proteiny Mkh1 [95], Mrs7 a Yld183 [96]. Tyto proteiny samotné pravděpodobně netvoří antiporter, ale jsou jeho důležitými a navzájem nezávislými regulátory, mezi kterými nedochází k přímému kontaktu [96]. Antiporter odpovědný za aktivní export K^+ z mitochondrií je tedy stále neznámý a je označován zkratkou KHE (K^+/H^+ exchanger), protože se pravděpodobně jedná o komplex mnoha proteinů [95, 96].

2.1.5 Úloha H^+ -ATPas pro udržení homeostase K^+ a Na^+

H^+ -ATPasy jsou odpovědné za vytváření protonového gradientu přes PM i membrány organel, regulaci pH uvnitř i vně buněk a organel. Vzniklý gradient je využíván sekundárními aktivními transportery k přenosu důležitých živin, metabolitů a dalších látek ve směru (symport), nebo proti směru (antiport) gradientu protonů (kromě iontů alkalických kovů se jedná např. o transport aminokyselin, vitamínů, stopových prvků, glycerolu nebo P_i [50, 103, 104]). Gradient protonů, rozdíl v koncentracích uvnitř a vně buněk, je tak jednou z důležitých součástí buněčné fyziologie umožňující

přežívání buněk. V *S. cerevisiae* jsou činnosti H^+ -ATPas řízeny všechny známé antiporterem, tedy Nha1p a dále intracelulárních Nhx1p, Kha1p a Vnx1p.

Esenciální gen *PMA1* [36] kóduje H^+ -ATPasu typu P tvořenou jedním proteinem lokalizovanou v PM. Mezi její úlohy patří export H^+ z buněk, tím reguluje vnitrobuněčné pH, okyseluje médium okolo buněk, tvoří protonový gradient a vytváří $\Delta\Psi$ [37]. Pma1p je nejvíce zastoupeným proteinem v PM, je velice stabilní a spotřebovává až 20 % buňkou vyprodukovaného ATP [6, 105]. Díky svému vysokému zastoupení v PM je Pma1p využívána při studiích zaměřených na průchod nově vzniklých membránových proteinů sekreční drahou [105]. Kromě *PMA1* byl v genomu *S. cerevisiae* nalezen gen *PMA2* kódující také H^+ -ATPasu sekvenčně velmi podobnou Pma1p. V porovnání s *PMA1* je exprese *PMA2* za standardních podmínek velice nízká, což snižuje význam *PMA2* pro tvorbu protonového gradientu přes PM [106].

Na rozdíl od Pma1p je vakuolární H^+ -ATPasa Vma (H^+ -ATPasu typu V) tvořena třinácti proteiny uspořádanými do dvou domén [107], transmembránové V_0 a periferní V_1 . Sekvenčně i strukturně je ATPasa Vma velice podobná mitochondriálním ATP syntasám typu F [108]. Vma zajišťuje okyselování vnitřního prostoru vakuol, všech váčků a organel včetně endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, podílí se na regulaci transportu sekrečních váčků a je odpovědná za tvorbu protonového gradientu na vnitrobuněčných membránách [109-111]. Tento gradient pak umožňuje fungování výše pospaných vnitrobuněčných antiporterů Nhx1, Kha1 a Vnx1.

2.1.6 Studium antiporterů z jiných organismů v *S. cerevisiae*

Antiporterem sekvenčně homologní k Nha1p z *S. cerevisiae* patří do již zmíněné „superrodiny“ CPA [69]. Jedná se o jak prokaryontní, tak eukaryotní transportery umístěné v PM, nebo v membránách organel. Společným znakem členů rodiny CPA je to, že se predikovaná transmembránová část přenašeče vždy skládá z 10-12 hydrofobních α -helixů vykazujících silnou sekvenční podobnost. Jednotlivé proteiny se mohou lišit v řadě parametrů: substrátovou specifitou, délkou hydrofilních konců, regulací, nebo tím, jestli jsou elektrogenní či elektroneutrální [69, 71, 84]. Studium těchto antiporterů je také v jiných organismech stále velice aktuální a atraktivní. Jedná se např. o studie zaměřené na osmotoleranci nekonvenčních kvasinek potenciálně využitelných pro biotechnologické aplikace [84, 112], studium chování patogenních kvasinek rodu *Candida* [113, 114], výzkum rostlinných antiporterů ovlivňujících osmotoleranci rostlin [115, 116], ale také antiporterů savčích a lidských, které hrají důležité role např. v diferenciaci buněk, ve funkci ledvin, ale také v regulaci buněk nádorových [73, 117, 118, 70, 119, 120]. Mezi nejstudovanější patří savčí/ lidské antiporterem NHE, které se v organismu účastní regulace celé řady důležitých procesů, jako je např. angiogeneze, migrace buněk, růst a proliferace, apoptosa, syntesa DNA nebo glykolysa [121]. Zkoumají se také

antiportery specifické pro jednotlivé tkáně. Jedním z takových je lidský Na^+/H^+ antiporter NHAoc/NHA2. Tento antiporter je exprimován ve vysokém množství pouze v osteoklastech, kde zajišťuje správnou diferenciaci buněk [118]. Porucha v jeho funkci může mít vážné následky ve formě závažných onemocnění tvorby kostní tkáně (*osteopetrosa*) a vede až ke smrti jedince.

Při výzkumu Na^+/H^+ antiporterů jiných organismů (ale také např. iontových kanálů [122]) bývá s úspěchem využíván modelový organismus *S. cerevisiae* [7, 84, 112, 114, 115, 119]. Výhodou využití heterologní exprese v kvasinkách je mimo jiné jasně definované a dobře popsané genetické pozadí, ale také jednoduchost a finanční i časová nenáročnost (např. v porovnání se savčími buněčnými kulturami) vnášení genů, mutací a jiných genových manipulací [123]. Při výzkumu aktivity a vlastností transporterů iontů alkalických kovů heterologní expresí lze navíc využít upravených kmenů *S. cerevisiae*, které postrádají geny svých vlastních transporterů [6, 7]. Tak je možné studovat izolovaně také transportery, jejichž aktivita je v původním organismu velmi nízká nebo překrytá existencí řady dalších transporterů pro tytéž substráty.

2.2 Regulace homeostase iontů alkalických kovů

V předchozí části (kapitola 2.1, str. 9) byly pospány jednotlivé přenašeče zajišťující přenos iontů alkalických kovů. V přirozeném prostředí jsou buňky vystaveny často velmi proměnlivým podmínkám a udržení homeostase iontů alkalických kovů v buňkách je důležitým předpokladem pro přežití, růst a dělení buněk. Aktivita jednotlivých transporterů je proto silně regulována, a to na úrovni regulace exprese genů nebo na úrovni post-translačních modifikací. Dále lze aktivitu transporterů ovlivnit také např. složením membrány nebo změnou vnějšího pH [6, 124-127]. Dalším kritériem dělení regulátorů homeostase iontů alkalických kovů je také, jestli se jedná obecně o regulaci časné, nebo adaptivní odpovědi např. na osmotický stres. Zatímco časná odpověď zahrnuje rychlý souběh dějů, který se odehraje ihned po působení stresu a umožňuje buňkám krátkodobé přežití ve změněných podmínkách (selektivní změny v expresi genu nejsou zpravidla patrné), adaptivní odpověď zajišťuje dlouhodobější adaptaci zahrnující změnu v úrovni exprese genů [6, 64, 128]. Hyperosmotický stres obecně způsobený zvýšenou koncentrací osmolytu (např. NaCl) v prostředí vede ke ztrátě vody společně s K^+ a dochází ke zmenšování buněk [19]. Časná buněčná odpověď na tento stres se skládá mimo jiné z post-translační regulace proteinů, konkrétně zastavení výstupu K^+ (fosforylací Nha1p) a zastavení výstupu glycerolu (důležitého buněčného osmolytu; [19]). Adaptivní fáze odpovědi obsahuje změny v expresi genů, např. indukci exprese *ENA1* a genů pro tvorbu glycerolu [19].

Regulace na úrovni exprese genů je jedním z nejznámějších a nejdéle studovaných regulačních dějů [125, 126] a díky pokročilým metodám se v současné době v kvasinkách dostávají do popředí studie na úrovni celého genomu [62] zachycující celkový obraz regulace exprese genů v organismu za daných podmínek. Ukazuje se, že kromě přítomnosti transkripčních faktorů, aktivátorů a represorů, se na této regulaci výrazně podílí také řada dalších faktorů, jako je např. struktura chromatinu nebo tvorba smyček umožňujících klastrování (a společnou regulaci) „spřízněných“ genů [126, 129]. Exprese proteinu může být ovlivněna také při přepisu genetické informace do molekuly mRNA, jejíž stabilita (rychlost degradace) zásadně ovlivňuje množství vzniklého proteinu. Degradace mRNA obecně probíhá buď specificky pro určitou mRNA, nebo nespecificky a existuje několik možných cest degradace, jako např. deadenylace 3' konce mRNA a rozštěpení za pomoci exosomu, degradace pomocí endonukleas, nebo odštěpení čepičky z 5' koncové části mRNA [124].

Oba výše uvedené děje (regulace exprese genů a stabilita mRNA) jsou zastoupeny také při reakci buněk na osmotický stres [127]. V tomto případě dochází po účinku osmotického stresu obecně k destabilizaci mRNA a utlumení exprese, ale množství mRNA pro proteiny nutné k adaptaci buněk na osmotický stres je zvýšeno vlivem jak růstu exprese příslušných genů, tak specifickým zvýšením stability těchto mRNA. Společným výsledkem je zvýšení množství proteinů nutných pro adaptaci na

osmotický stres [127], jako hlavní regulační článek v tomto ději byla identifikována stresem aktivovaná kinasa Hog1 ([130]; viz dále).

Na rozdíl od většiny organismů a také jiných druhů kvasinek [131], nebyla u *S. cerevisiae* nalezena dráha RNA interference [132] zajišťující post-transkripční umlčování genů pomocí siRNA (silencing). Tento stupeň regulace exprese genů v *S. cerevisiae* zcela chybí.

Post-translační modifikace obecně umožňují řízení funkce, lokalizace nebo degradace již syntetizovaných proteinů. V homeostasi iontů alkalických kovů je nejdůležitější modifikací fosforylace [133]. Fosforylovány mohou být nejen samotné transportery iontů alkalických kovů, ale také transkripční faktory ovlivňující míru exprese některých z nich (viz dále).

Kromě výše zmíněných možností existují ještě další cesty, kterými lze ovlivnit činnost transporterů iontů alkalických kovů. Jednou z nich je změna $\Delta\Psi$, jež může vést např. k otevření napětově řízených kanálů Tok1 [30, 53] nebo ke změnám v nespecifickém importu kationtů (včetně kationtů alkalických kovů). Umístění transporterů v tzv. raftech patří mezi další možnosti regulace aktivity [134] a uplatňuje se pravděpodobně také v transporterů K^+ a Na^+ . Jak bylo dříve ukázáno, patří transportery Nha1 [135] a Trk1 [25, 136] mezi proteiny, jež se v raftech vyskytují, a lze předpokládat, že jejich aktivita bude do značné míry regulována správným složením raftů stejně, jako tomu je u Pma1p. Je-li porušena tvorba a sekrece nasycených sfingolipidů do PM (a tím i do raftů), může dojít k destabilizaci a nesprávnému průchodu Pma1p sekreční drahou. Protein je následně transportován do vakuol [105] a nemůže plnit svou úlohu v PM.

2.2.1 Regulace importu K^+

Jak bylo uvedeno výše, vstup K^+ do buněk zajišťují transportery Trk1 a Trk2, které jsou schopné pracovat jak ve vysokoafinitním (za nedostatku K^+ nebo v přítomnosti Na^+), tak v nízkoafinitním (při dostatku K^+ v okolí) režimu [137]. Exprese obou importerů není podle všeho ovlivňována odchylkami v homeostasi iontů alkalických kovů [6], ačkoli některé případy byly pozorovány. Exprese *TRK1* a *TRK2* U *TRK1* dochází k inhibici exprese během stacionární fáze růstu [138] a jako inhibitor exprese *TRK2* byl nalezen komplex proteinů Rpd3 a Sin3, který byl dříve identifikován jako komplex odpovědný za deacetylaci histonů. [44, 139].

Přestože je regulace Trk1p a Trk2p na post-translační úrovni již dlouho studována, není dosud mechanismus regulace plně objasněn. Již dříve byla identifikována a následně potvrzena aktivace Trk1p pomocí glukosy a dalších fermentovatelných zdrojů uhlíku [6, 24]. Pro dosažení plné aktivity transporterů zajišťujících vstup K^+ do buněk je důležitá i kinasa Snf1, jež se také účastní metabolismu

cukrů [140]. Její účinek na transportery Trk1 a Trk2 je spíše nepřímý, zřejmě prostřednictvím transkripčního faktoru Sip4 [140].

Mezi identifikované aktivátory transporterů Trk1 a Trk2 patří kinasy kódované geny *HAL4* a *HAL5*, jejichž substrát zatím není znám. Tyto kinasy stabilizují transportery v membráně (kromě Trk1p a Trk2p také např. přenašeče živin Hxt1 a Fur4) v prostředí nízké koncentrace K^+ a zabraňují endocytose přenašečů a jejich degradaci ve vakuole [141, 142]. Ukazuje se, že účinek kinasy Hal5 na Trk1p je závislý na aktivitě Ca^{2+} aktivované fosfatasy kalcineurinu [143]. Kalcineurin byl již dříve identifikován jako nezbytná součást procesu přechodu od nízkoafinitního k vysokoafinitnímu režimu importu K^+ , který je aktivován zvýšenou koncentrací Na^+ v prostředí a slouží k zvýšení selektivity importu ve prospěch K^+ [137]. Nově byla důležitost kalcineurinu pro vysokoafinitní import K^+ prokázána také bez přítomnosti Na^+ [143]. Kalcineurin také pravděpodobně tvoří spojovací prvek mezi Trk1p a proteinem Ypi1, jeho nedávno objeveným regulátorem. Ypi1 je regulační podjednotkou proteinfosfatasy Glc7, jež reguluje další buněčné děje, jako je mitosa, metabolismus glykogenu, nebo sporulace [144].

Nepřímý účinek na aktivitu Trk1p má také Hal3p regulující nejen vstup K^+ do buněk, ale také výstup Na^+ a Li^+ z buněk [145]. Hal3p byl identifikován jako negativní regulátor fosfatasy Ppz1, která je sama negativním regulátorem vstupních (Trk1p) i výstupních (Ena1p) transporterů iontů alkalických kovů (viz dále), účinek Hal3p je tedy na aktivitu transporteru Trk1p pozitivní. Fosfatasa Ppz1 se společně Trk1p vyskytuje v membránových raftech, kde dochází k jejich fyzické interakci a ačkoli nebyla defosforylace Trk1p pomocí Ppz1p přímo prokázána, byla v kmenech postrádajících *PPZ1* stanovena nižší úroveň fosforylace Trk1p než je běžné [136]. Účinek Hal3p na Ppz1p je závislý na vnitrobuněčném pH, proto je systém regulace Hal3-Ppz1 považován za vnitrobuněčný senzor pH, který kromě vnitrobuněčného pH ovlivňuje i koncentraci K^+ [6, 136].

Kinasa Sky1 se také účastní homeostase iontů alkalických kovů jako negativní regulátor a při její absenci dochází ke zvýšení tolerance buněk k organickým i anorganickým kationtům včetně Na^+ a Li^+ [146]. Ačkoli některé práce potvrzují možnost ovlivňování homeostase kinasou Sky1 prostřednictvím transporterů Nha1, Kha1, a Tok1 [147], jiné práce ukazují, že je pravděpodobnější regulace prostřednictvím přímého nebo nepřímého ovlivňování aktivity Trk1p [6, 146].

Již dříve bylo nalezeno několik proteinů známých svou úlohou v regulaci vesikulárního transportu, které inhibují import K^+ do buněk (např. [148]), ale nejnovější práce naznačuje, že spíše než jednotlivé proteiny ovlivňuje vstup K^+ do buněk (měřeno vstupem Rb^+) správná funkce vesikulárního transportu jako taková [25]. Lze předpokládat, že vesikulární transport ovlivňuje biogenesi a degradaci

membránových proteinů, ale přesný mechanismus, jakým je import K^+ ovlivňován, znám není. Podle všeho se jedná o obecnější způsob regulace, protože aktivita Trk1p může být ovlivněna velkým množstvím proteinů důležitých pro vesikulární transport (včetně Nhx1p; viz kapitola 2.1.4, str. 17), ale také kinasami fosforylujícími inositol a fosfatidylinositol (geny *KCS1*, *ARG82* a *FAB1*). Zapojení fosfatidylinositolových drah do regulace Trk1p bylo předpovězeno již před mnoha lety [24], ale možnost ovlivnění homeostase iontů alkalických kovů prostřednictvím změn ve složení raftů ještě čeká na prozkoumání.

V neposlední řadě byla identifikována možnost regulace vstupu K^+ pomocí antiporteru Nha1 [149]. Absence *NHA1* vedla podle této publikace [149] ke snížení afinity Trk1p ke K^+ . Touto prací bylo dokázáno, že existuje funkční spojení mezi importery a exportery iontů alkalických kovů.

2.2.2 Regulace exportu iontů alkalických kovů

Systém exporterů iontů alkalických kovů je regulován mnoha cestami [6]. Nalézáme tu jak regulaci post-translační (Nha1p, Tok1p), tak regulaci na úrovni exprese (*ENA1*). Zatímco první cesta upravuje kinetické parametry transporterů (hlavně Nha1) a patří proto do časné odpovědi na stres způsobený Na^+ a Li^+ , druhý typ regulace, regulace exprese, určuje množství transporteru v PM a kvůli časové prodlevě nutné k syntéze nových proteinů patří do odpovědí zpožděných, tzv. adaptivních.

Přes značnou rozdílnost hlavních exporterů iontů alkalických kovů (Ena1p a Nha1p) v sekvenci, mechanismu transportu (antiporter vs. ATPasa) i filosofii regulace (časná vs. adaptivní) nalézáme několik sdílených komponent v jejich regulaci. Podstatným prvkem řízení obou systémů (ale také kanálu Tok1) je dráha kiny Hog1 [6, 86, 150]. Už při lehce zvýšeném množství Na^+ v okolí buňky (0,2-0,4 M) dochází k nastartování kinasové signální kaskády (označována jako dráha HOG; „High Osmolarity Glycerol“) vedoucí k fosforylaci Hog1p [150, 151]. Fosforylovaná kinasa Hog1 na jedné straně vstupuje do jádra a aktivuje expresi *ENA1* [151, 152] a dalších genů, na straně druhé sama fosforyluje transportery Nha1 a Tok1 v PM [86]. Hog1p se účastní odpovědi na osmotický stres, regulace metabolismu glycerolu a kromě zvýšené koncentrace Na^+ může být aktivován řadou dalších stresů, jako například teplotním šokem, hypoxií, nebo kyselinou octovou [128].

Mezi kiny regulující homeostasi iontů alkalických kovů patří rovněž kaseinkinasa 2 (CK2). Jedním ze substrátů CK2 je polyfunkční transkripční faktor Nrg1p (viz také kapitola 2.2.2.1, str. 26), který mimo jiné inhibuje expresi genu *ENA1* [153, 154]. CK2 se skládá ze čtyř podjednotek, dvou katalytických (kinasových), kódovaných *CKA1* a *CKA2*, a dvou regulačních, kódovaných *CKB1* a *CKB2* [155], tvořících společně funkční heterotetramer. Na rozdíl od regulačních podjednotek se mohou Cka1p a Cka2p v tetrameru vzájemně zastoupit, nicméně delece genů pro obě kiny je letální. Delece každé

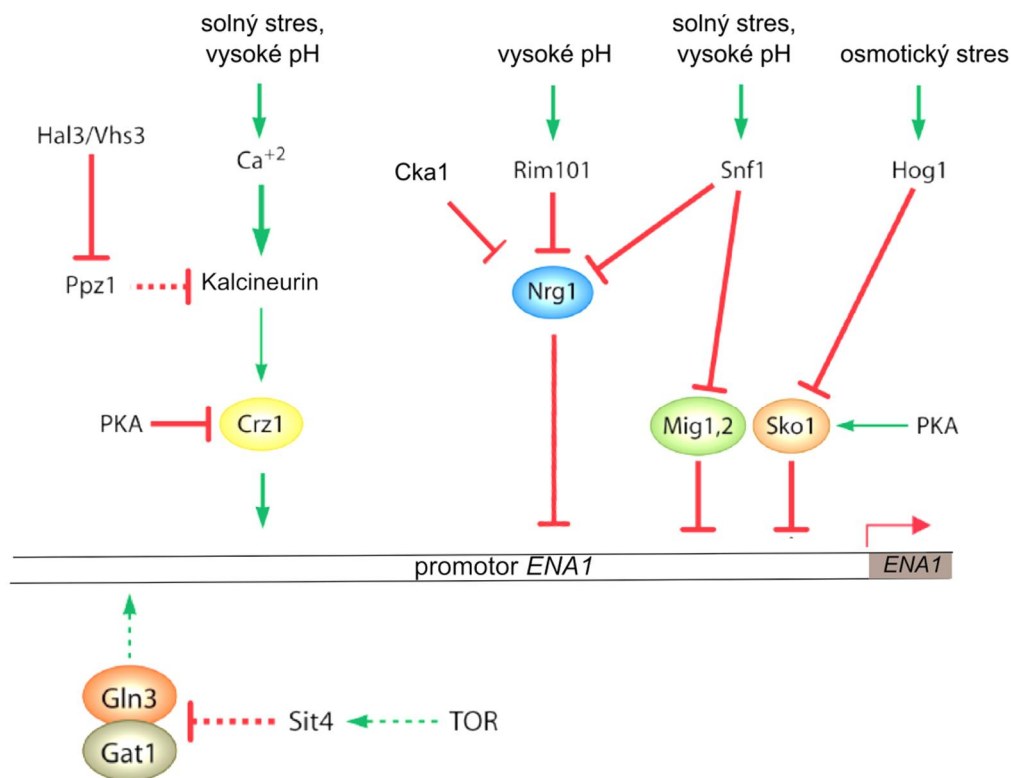
z podjednotek (regulační, nebo katalytické) vede k nárůstu citlivosti buněk k NaCl, v případě delece regulačních podjednotek (*ckb1*, nebo *ckb2*) je tato citlivost mnohem vyšší [153]. Má se za to, že absence jedné z regulačních podjednotek znemožňuje tvorbu tetrameru a kinasové podjednotky jsou pak mnohem méně aktivní, zatímco při delecí pouze jedné z kinasových podjednotek je její pozice v tetrameru a aktivita částečně zastoupena druhou podjednotkou. Ačkoli Cka1p a Cka2p vykazují vysokou sekvenční podobnost, bylo zjištěno, že kinasová aktivita Cka1p je *in vitro* mnohem citlivější k zvýšeným koncentracím NaCl, heparinu a sperminu než aktivita Cka2p [156]. Dále bylo zjištěno, že pouze Cka1p je schopna fosforylovat transkripční faktor Nrg1 a tím omezit jeho působení na represí *ENA1* [153, 154]. Ve výsledku tedy působí zvýšená aktivita Cka1p aktivačně a delece *cka1* inhibičně na expresi *ENA1* (viz dále; [153]). Specifická pro Cka1p (nikoli Cka2p) je také fosforylace Yfc1p, vakuolárního transporteru umožňujícího eliminaci toxických látek (iontů Cd^{2+} a dalších těžkých kovů), která může být ovlivněna přítomností NaCl v médiu [157]. Kromě výše uvedených funkcí se CK2 a její podjednotky účastní regulace řady dalších důležitých fyziologických dějů, jako je např. flokulace, proliferace, odpověď buňky na poškození DNA, nebo regulace exprese RNA polymerasy I a III [153, 155, 156].

Na rozdíl od dalších exporterů (Nha1p a Ena1p), není v případě kanálu Tok1 mnoho známo o mechanismu regulace jak na úrovni exprese, tak post-translační regulace aktivity. Jak již bylo uvedeno, je transport kanálem Tok1 řízen napěťově (tedy $\Delta\Psi$) tak, že k otevření kanálu dochází při depolarisaci membrány [30]. Jediným dosud známým regulačním prvkem je fosforylace Tok1p kinasou Hog1, která byla prokázána, ale dosud nebyl prokázán žádný vliv této modifikace na aktivitu kanálu [86]. Obecně je Tok1p považován za transporter potřebný pro udržení dlouhodobé homeostase a podle dostupných dat je exprese *TOK1* konstitutivní [158]. Na základě nedávno publikovaného modelu homeostase iontů alkalických kovů [14] bylo predikováno, že dříve prokázaná fosforylace Tok1p pomocí Hog1p vede pravděpodobně k poklesu aktivity Tok1p.

2.2.2.1 Regulace ATPasy Ena1

ATPasa Ena1 je kódována prvním z řady genů *ENA* umístěných v tandemové repetici. Jak již bylo uvedeno, z genů *ENA* je *ENA1* nejlépe prozkoumaný a je považován za nejdůležitější prvek determinující toleranci buněk k vysokým koncentracím solí alkalických kovů. Na rozdíl od ostatních genů v klastru, ale také na rozdíl od genů ostatních transporterů iontů alkalických kovů, je gen *ENA1* silně regulován na úrovni exprese. Ke značnému nárůstu exprese *ENA1* dochází při zvýšených koncentracích Na^+ , K^+ nebo Li^+ v médiu, při osmotickém stresu a při vyšším extracelulárním pH [57, 58, 152, 159]. Ačkoli se *de facto* jedná pouze o několik málo stimulů aktivujících expresi genu, vstupuje do regulace exprese *ENA1* několik fyziologicky velmi důležitých signálních drah, jejichž

působení se integruje do signálu regulace promotoru *ENA1* (obr. 2.2.2.1, str. 27; [6, 152]). Možnost regulace *Ena1p* na post-transkripční úrovni byla předpokládána dosud pouze v jediné práci [58], podle které se na regulaci podílí jeden z regulátorů mající zároveň svou úlohu v regulaci exprese *ENA1*, konkrétně se jedná o kalcineurin (viz výše).



Obr. 22.2.2.1 Regulace exprese *ENA1*

Obrázek zachycuje známé regulátory exprese *ENA1* a ukazuje, jestli se jedná o inhibici (červená čára s tupým koncem) nebo aktivaci (zelená šipka). Interakce, které nejsou plně prokázány, jsou vyznačeny nespojitou čarou.

zdroj: převzato a upraveno podle [6]

První z důležitých faktorů regulujících expresi *ENA1* je již zmíněná signální dráha kinasy Hog1 (obr. 2.2.2.1, str. 27). Už při mírně zvýšených koncentracích Na^+ v prostředí (0,2-0,4 M; [151]) je Hog1p aktivována fosforylací a následně se podílí nejen na časné fázi odpovědi na tento stres (fosforylace *Nha1p*, viz dále), ale i na odpovědi adaptivní tak, že aktivovaná kinasa Hog1 fosforyluje transkripční faktory aktivující expresi *ENA1* [152]. Aktivace Hog1p a přenos signálu signální kaskádou vede ve finále k fosforylaci transkripčního faktoru Sko1 [160], který v nefosforylované formě tvoří společně s dalšími faktory komplex inhibující expresi *ENA1* tak, že se tento komplex represorů váže na specifické místo v promotoru *ENA1* označované jako CRE (cyclic-AMP response element; [161]). Tvorba komplexu represorů obsahujících Sko1p je po aktivaci signální kaskády HOG (po fosforylaci Sko1p) inhibována a exprese *ENA1* je tím posílena. Zajímavé je, že Sko1p může být fosforylován také pomocí proteinkinasy A (PKA), jejíž aktivita závisí na přítomnosti cyklického adenosinmonofosfátu

(cAMP), známého druhého posla mezibuněčné signalizace [160]. Na rozdíl od dráhy HOG vede fosforylace Sko1p pomocí PKA ke zvýšené inhibici exprese *ENA1*. Kromě fosforylace Sko1p („de-represe“ *ENA1*) vstupuje aktivovaný Hog1p do regulace exprese *ENA1* ještě v dalším bodě, a to aktivací tvorby komplexu Rpd3-Sin3, jenž vede k deacetylaci histonů, nasednutí RNA polymerasy II a aktivaci exprese *ENA1* [162]. Dráha HOG je důležitá v prostředí se zvýšenou koncentrací Na^+ , zatímco v přítomnosti Li^+ (50 – 100 mM) se Hog1p účastní aktivace exprese *ENA1* jen z menší části [163]. Nárůst exprese *ENA1* za vysokého pH je řízen spíše bez účasti Hog1p, účastní se další dráhy, které jsou popsány dále [6].

Druhou důležitou dráhou, jež se regulace exprese *ENA1* účastní, je signální dráha fosfatasy kalcineurinu (obr. 2.2.2.1, str. 27). V *S. cerevisiae* je kalcineurin tvořen dimerem obsahujícím kromě jedné fosfatasové (redundantně kódované geny *CNA1* a *CNA2*) jednou regulační (*CNB1*) podjednotku, jejíž delece (*cnb1*) vede ke zvýšené citlivosti k Na^+ , Li^+ a zásaditému vnějšímu pH [137]. Kalcineurin je aktivován přítomností volného Ca^{2+} v cytoplasmě, k nárůstu vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} dochází vlivem solného stresu [164, 165], a následně dochází k aktivaci řady genů způsobené hlavně defosforylací transkripčního faktoru Crz1 (obr. 2.2.2.1, str. 27) a jeho vstupem do jádra [6]. Dvě vazebná místa pro Crz1p zajišťující aktivaci exprese se nacházejí také v promotoru *ENA1* [166]. Do regulačního účinku kalcineurinu vstupuje několik dalších faktorů. Prostřednictvím kalcineurinu působí na homeostasi iontů alkalických kovů již zmíněný Ypi1p (viz kapitola 2.2.1, str. 23), zvýšená exprese *YPI1* vede k aktivaci kalcineurinové dráhy a ke zvýšení tolerance buněk k Li^+ , zatímco jeho delece (*ypi1*) toleranci k Li^+ snižuje [144]. Prostřednictvím kalcineurinu působí také inhibitory exprese *ENA1*, jako např. PKA [152], která je schopna fosforylovat Crz1p a tím inhibovat signál kalcineurinu a snížit expresi *ENA1* (obr. 2.2.2.1, str. 27; [6]). Negativní účinek jako PKA má také výše zmíněná fosfatasa Ppz1p (viz kapitola 2.2.1, str. 23), která se podílí na regulaci importu K^+ (Trk1p) a která je společně s Hal3p označována jako vnitrobuněčný senzor pH [6, 136]. Mechanismus účinku fosfatasy Ppz1 není plně objasněn, ale pravděpodobně se účastní deaktivace dráhy kalcineurinu, protože u mutantů postrádajících Ppz1 je tato dráha konstitutivně aktivována [167]. Represivní působení Ppz1p na expresi *ENA1* může být inhibováno Hal3p [6, 168], stejně jako v případě Trk1p (viz kapitola 2.2.1, str. 23) je tedy Hal3p také pro *ENA1* pozitivním regulátorem, bez kterého není možné dosáhnout plné indukce *ENA1*. Jak se ukazuje, je kalcineurinová dráha důležitým spojovacím prvkem mezi homeostasí iontů alkalických kovů a mnoha dalšími důležitými buněčnými pochody jako je např. regulace buněčného cyklu, nebo tvorba acetylkoenzymu A. Celkově se kalcineurin podílí na asi 40 % transkripční odpovědi *ENA1* za vysokého pH [6].

Podobně jako u kalcineurinu a Crz1p dochází k integraci signálů více signálních drah u transkripčního faktoru Nrg1 (obr. 2.2.2.1, str. 27). V rámci promotoru *ENA1* byla predikována 2 - 3 vazebná místa pro aktivovaný Nrg1p, který vazbou na promotor způsobuje inhibici exprese [6, 154, 169]. S ohledem na homeostasi iontů alkalických kovů jsou dosud známy tři faktory omezení represivního působení Nrg1p (jde tedy o aktivátory exprese *ENA1*), a to transkripční represor Rim101 a kinasy CK2 a Snf1. CK2 byla podrobněji popsána v předchozí kapitole (kapitola 2.2.2, str. 25). Pouze jedna z podjednotek CK2, Cka1 je schopna fosforylovat Nrg1p a tím jeho represivní působení na promotor *ENA1* omezit [153]. Druhou regulační drahou zasahující do exprese *ENA1* prostřednictvím represoru Nrg1 je dráha pojmenovaná podle transkripčního faktoru Rim101 ovlivňujícího hlavně meiosis a sporulaci [6, 170]. Na rozdíl od Cka1p, Rim101p inhibuje expresi *NRG1* (a tím se podílí na regulaci exprese *ENA1*; obr. 2.2.2.1, str. 27) za vysokého vnějšího pH, zatímco při vysokých koncentracích $\text{Na}^+(\text{Li}^+)$ není tato dráha příliš aktivní [6, 170]. Delece *rim101* způsobuje citlivost buněk jak k vysokému pH, tak k vysokým koncentracím Na^+ [169, 170]. Rim101p byl nedávno identifikován také jako důležitý faktor ovlivňující přežívání buněk ve slabých kyselinách [171], proto je zřejmé, že úloha Rim101p může být především udržování vhodného vnitrobuněčného pH a adaptace na změny v pH prostředí.

Prostřednictvím Nrg1p působí také další regulátor exprese *ENA1*, kinasa Snf1 (obr. 2.2.2.1, str. 27). Při změně zdroje uhlíku z glukosy na galaktosu, nebo rafinosu dochází k mnoha změnám v metabolismu *S. cerevisiae*. Mimo jiné byla na jmenovaných zdrojích uhlíku pozorována zvýšená exprese *ENA1* [172], kterou způsobuje kinasa Snf1 aktivovaná při nedostatku glukosy. Kromě glukosy, může být Snf1p aktivována také pomocí zásaditého pH, a tím se tato kinasa výrazně podílí na indukci exprese *ENA1* v bazickém prostředí [64, 172] nezávisle na dráze HOG a kalcineurinu. Dosud byly identifikovány dva transkripční faktory zajišťující přenos signálu po aktivaci Snf1p na promotor *ENA1*, a to Mig1p (alternativně Mig2p) a již zmíněný Nrg1p [6]. Nedostatkem glukosy aktivovaný Snf1p vstupuje do jádra a zabraňuje Mig1p ve tvorbě komplexu s dalšími transkripčními faktory a nedochází tak k inhibici exprese *ENA1*, zatímco v případě aktivace Snf1p v prostředí se zvýšenou koncentrací solí alkalických kovů je exprese *ENA1* ovlivňována spíše přes dráhu Nrg1p (Snf1p nevstupuje do jádra) [64, 172]. V bazickém prostředí je pomocí aktivovaného Snf1p exprese *ENA1* indukována oběma cestami, tj. deaktivací represoru Nrg1p i Mig1p (obr. 2.2.2.1, str. 27; [64]).

Regulace exprese *ENA1* probíhá ještě pomocí dráhy TOR pojmenované podle kinasy Tor1 [173], jejíž aktivita je inhibována v přítomnosti imunopresiva rapamycinu (TOR je zkratkou „Target Of Rapamycine“) a v prostředí s nedostatkem nebo metabolicky špatně dostupným zdrojem dusíku. Dráha TOR je považována za hlavní regulační mechanismus zajišťující regulaci růstu v závislosti na dostupnosti živin [174]. Přejídná indukce *ENA1* byla pozorována po inhibici dráhy TOR působením

rapamycinu na buňky [173]. Indukce je podmíněna přítomností transkripčních faktorů Gat1 a Gln3, jenž se váží na specifické sekvence GATA v promotoru (v promotoru *ENA1* jich je 6) a aktivují expresi [173, 175]. Mezičlánkem je pravděpodobně ještě fosfatasa Sit4 (viz kapitola 2.2.2.2, str. 30) odpovědná za přenos signálu tak, že aktivovaný Tor1p aktivuje Sit4p, který následně inhibuje působení Gln3p a Gat1p [6, 172, 176]. Ve výsledku je tedy Tor1p negativním regulátorem exprese *ENA1* (obr. 2.2.2.1, str. 27).

Kromě zmíněných regulátorů jsou s regulací exprese *ENA1* spojeny také produkty genů *HAL1* a *REF2* a některé další faktory se na této regulaci mohou podílet nepřímou formou [6]. Řada z těchto regulací byla v rámci výzkumných prací zatím spíše pouze naznačena a jejich úloha v celém obrazu regulace exprese *ENA1* čeká na objasnění.

V nedávno zveřejněné práci bylo na základě počítačové simulace predikováno, že růst exprese *ENA1* může být důležitým krokem pro obnovení $\Delta\Psi$ po přenesení buněk do prostředí s vysokou koncentrací K^+ , nebo při vysokém pH [14]. Obnovení $\Delta\Psi$ pokleslého díky popsanému stresu může pomáhat k přežívání buněk. Zajímavé je, že podle této predikce by měl být vliv změn exprese *ENA1* na $\Delta\Psi$ poměrně velký, ale zatím nebyl prokázán experimentálně, ačkoli transportery Ena byly v minulosti tématem mnoha studií [6].

2.2.2.2 Regulace antiporteru Nha1

Na rozdíl od *ENA1* byla u *NHA1* pozorována stabilní exprese, která se neměnila vlivem vnější koncentrace Na^+ nebo pH [63] a dosud nebyly nalezeny ani jiné podmínky, které by vedly k signifikantním změnám v jeho expresi. Antiporter Nha1 je tak považován za protein důležitý pro permanentní udržování homeostase iontů alkalických kovů, který je v buňkách stále přítomen v téměř konstantním množství, a jehož regulace je řízena na úrovni post-translační. Ačkoli je Nha1p intenzivně studován již mnoho let, je jedinou prokázanou modifikací fosforylace dvou Thr zbytků (T765 a T876) aktivovanou kinasou Hog1 [86]. Tato fosforylace je důležitou součástí včasné odpovědi buněk na hyperosmotický šok (vyvolaný NaCl), jež pomáhá k přežívání buněk do té doby, než se nastartují další adaptivní mechanismy (např. indukce exprese *ENA1*). Později bylo zjištěno, že osmotický šok způsobený sorbitolem vede po aktivaci Hog1p ke snížení exportu K^+ přes Nha1p [83]. Omezení výstupu K^+ vede v prostředí s vysokou osmolaritou ke snížení úniku vody a v prostředí s Na^+ nedochází k tak snadné výměně vnitrobuněčných iontů K^+ za toxické Na^+ .

Výstup K^+ může být při solném stresu také aktivován zvýšenou expresí již zmíněné fosfatasy Sit4 indukovanou zvýšenou koncentrací Na^+ , K^+ a Li^+ [176]. Dále bylo zjištěno, že výstup K^+ může být prostřednictvím Sit4p (a pouze za přítomnosti Nha1p) pozitivně regulován produktem genu *SAP185*

(při zvýšené expresi *SAP185* je výstup K^+ aktivován) a negativně regulován produktem genu *SAP155* (jehož zvýšená exprese vede k inhibici exportu K^+) [177]. Fosfatasa Sit4 tedy pravděpodobně hraje roli nejen při regulaci *ENA1* (viz předchozí kapitola), ale také při regulaci *Nha1p*. Jako důkaz o vzájemné interakci mezi proteiny Sit4 a *Nha1* se uvádí již zmíněný fakt, že blok mezi fázemi G_1 a S způsobený současnou delecí *sit4* a *hal3* může být překonán zvýšenou expresí *NHA1* [77, 87].

Kromě výše uvedených interakcí bylo na základě více studií identifikováno ještě několik dalších proteinů, které s *Nha1p* přímo interagují, jako je *Cos3p*, který svou přítomností zvyšuje toleranci buněk k solím [178], nebo např. proteiny *Ppz1*, *Hsp30* a další [179], úloha interakcí však ještě nebyla prostudována. Jak bylo uvedeno, jedinou dosud známou post-translační modifikací je fosforylace pomocí *Hog1p*, ačkoli metodou hmotnostní spektroskopie bylo v minulosti identifikováno ještě alespoň 12 dalších AA zbytků fosforylovaných za různých podmínek dosud neznámými kinasami (přehled viz publikace č. 4, str. 41). Dále byla v rámci této práce predikována ještě celá řada dalších potencionálních míst fosforylace, která jsou sekvenčně i na základě předpokládané topologie pro fosforylaci vhodná.

2.2.3 Další proteiny podílející se na homeostasi iontů alkalických kovů, proteiny 14-3-3

Mezi potenciální regulátory homeostase iontů alkalických kovů byly identifikovány také proteiny 14-3-3 tvořící rodinu vysoce konzervovaných, malých, kyselých proteinů, které se vyskytují ve formě funkčního dimeru ve všech dosud zkoumaných eukaryotních buňkách z pravidla ve více isoformách. Jedná se o rozpustné proteiny, které interagují s velkým množstvím (stovkami) partnerů a účastní se tak řady důležitých procesů. Ačkoli dosud nebyla role těchto proteinů plně objasněna, dosavadní studie ukazují, že vytvoření vazby mezi proteinem z rodiny 14-3-3 a jeho interakčním partnerem hraje důležitou roli např. při aktivaci, nebo inaktivaci některých enzymů, ovlivňuje subcelulární lokalizaci některých transkripčních faktorů, může stimulovat interakci jiných proteinů, nebo může působit jako chránící skupina specifického aktivního místa některých enzymů [180-183]. Ačkoli se nejedná o kinasy, ani o fosfatasy, hraje fosforylace interakčního partnera důležitou úlohu v tom, jestli k vazbě s proteinem z rodiny 14-3-3 dojde či nikoli.

V *S. cerevisiae* existují dvě isoformy proteinů 14-3-3 kódované geny *BMH1* a *BMH2*. Dominantní úlohu hraje protein Bmh1 (267 AA) s 80% zastoupením, zatímco Bmh2p (273 AA) tvoří v buňkách pouze zbylých 20 % [184]. O důležitosti těchto proteinů svědčí to, že vykazují tzv. syntetickou letalitu, tedy delece obou genů zároveň nebo nefunkčnost obou proteinů vede ke smrti buňky ve většině studovaných kmenů *S. cerevisiae*. Na základě proteomické analýzy bylo identifikováno v *S. cerevisiae* asi 270 interakčních partnerů a dalšími pracemi byla potvrzena regulační úloha proteinů Bmh1 a Bmh2 v řadě signálních drah [185].

Z experimentálně potvrzených interakčních partnerů Bmh1p a Bmh2p uveďme např. Snf1p, Hal4p, nebo Ppz1p, tedy proteiny účastnící se regulace homeostase iontů alkalických kovů, $\Delta\Psi$ a vnitrobuněčného pH (viz kapitola 2.2, str. 22). Účel těchto interakcí je zatím neznámý. Možnost zapojení proteinů 14-3-3 do regulace homeostase iontů alkalických kovů také naznačuje zvýšená citlivost kmene postrádajícího gen *BMH1* k Na^+ a k některým organickým kationtům (např. hygromycin B; [29, 186]), ale také silná indukce exprese *BMH1* při zvýšených koncentracích NaCl [159]. Je třeba dodat, že u jiných organismů bylo již dříve provedeno několik studií ukazujících funkční propojení mezi transportery iontů alkalických kovů a proteiny 14-3-3, které byly identifikovány např. jako regulátory savčích Na^+/H^+ antiporterů [187] a rostlinného K^+ kanálu Tpk1 [188].

3 Cíle práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce byla charakterisace fyziologických úloh Na^+/H^+ antiporterů v kvasinkách. Práce vznikla v prostředí intenzivní mezinárodní spolupráce při výzkumu homeostase iontů alkalických kovů v kvasinkách v rámci projektu ERA SysMo Translucent I a II.

Pro zjištění fyziologických úloh Na^+/H^+ antiporterů v buňkách kvasinek bylo třeba připravit celou sérii mutantních kmenů postrádajících v různých kombinacích geny kódující jednotlivé transportery iontů alkalických kovů, charakterisovat základní vlastnosti a fyziologické parametry těchto kmenů, a nakonec tyto kmeny cíleně využít pro studium úloh Na^+/H^+ antiporterů plasmatické membrány

K hlavním cílům této disertační práce patří:

- 1) Zjistit, zda existují rozdíly v obsahu iontů alkalických kovů mezi různými kmeny *S. cerevisiae* a od nich odvozenými mutanty.
- 2) Objasnit vzájemné interakce mezi vstupními a výstupními transportery iontů alkalických kovů a zjistit, jakým způsobem je zajištěno přežívání buněk v prostředí s extrémně nízkými nebo vysokými koncentracemi K^+ .
- 3) Najít dosud neznámé regulátory exporterů iontů alkalických kovů a studovat, jakým způsobem regulace probíhá.
- 4) Využít získané znalosti při studiu heterologně exprimovaných transporterů iontů alkalických kovů z vyšších eukaryot a při vývoji nových metod.

4 Výsledky

Výsledky této disertační práce jsou shrnuty celkem v pěti publikovaných pracích (kapitola 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 a 4.6), v jednom rukopise (kapitola 4.5) a v jedné další kapitole obsahující stručný popis výsledků projektu aplikovaného výzkumu, o jejichž publikaci se zatím neuvažuje (kapitola 4.7). Materiály a metody použité v rámci disertační práce jsou uvedeny přímo v jednotlivých publikacích.

První publikace „***Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance**“ (kapitola 4.1, str. 37) se zabývá studiem dvou (ve výzkumu) nejvíce používaných laboratorních kmenů *S. cerevisiae*, BY4741 a W303. Bylo pozorováno, jak se v těchto kmenech vzájemně liší jednotlivé parametry homeostasy iontů alkalických kovů a ukázalo se, že vykazují značné odchylky v toleranci k jednotlivým iontům alkalických kovů a organickým kationtům (např. spermin) nebo v relativním membránovém potenciálu. Dále byly nalezeny rozdíly ve velikosti buněk a stanovené suché váze. Výsledky této práce ukázaly, že i rozdíly v rámci dvou kmenů *S. cerevisiae* mohou v některých parametrech značně ovlivnit regulaci homeostasy iontů alkalických kovů. Výsledky z této práce (např. nově stanovené hodnoty suché váhy nebo velikosti buněk) byly dále využity při přípravě a vyhodnocování experimentů, jejichž výsledky byly publikovány v dalších studiích (např. kapitola 4.2 a 4.3).

V rámci druhé publikace „**Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions**“ (kapitola 4.2, str. 38) byla detailně studována role transporterů Trk1 a Trk2 ve fyziologii buňky v prostředí s dostatkem i s nedostatkem K^+ a bylo zjištěno, že přes velkou řadu sledovaných parametrů se v prostředí s dostatečným množstvím K^+ delece obou vstupních systémů (*trk1 trk2*) projeví hlavně ve sníženém intracelulárním pH a růstu $\Delta\Psi$, zatímco za nedostatku K^+ bylo pozorováno smršťování buněk, objevil se růst rozdílu v $\Delta\Psi$, pokles intracelulárního pH a změny v citlivosti k organickým kationtům. V této publikaci byla poprvé detailně popsána časová závislost pozorovaných dějů a změny kinetických parametrů importu K^+ po přenesení buněk do média bez draslíku. Poprvé zde byla také objevena inhibice exportu K^+ po přenesení buněk do média bez K^+ (hladovění buněk na K^+). Inhibice exportu K^+ ukazovala na to, že absence vstupních transporterů inhibuje exportery, toto funkční propojení dosud nebylo popsáno a jev byl proto zkoumán detailněji v rámci třetí publikace „**Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium limiting conditions**“ (kapitola 4.3, str. 40). Nejdříve bylo zjištěno, že v případě absence Trk1p a Trk2p je export K^+ po přenesení buněk do média bez K^+ plně zastaven podobně, jako když jsou exportery odstraněny. Dále se ukázalo, že exportu K^+ (při hladovění na K^+)

se účastní hlavně Nha1p a Ena1p a částečně také Tok1p. Po deleci *TRK1* a *TRK2* jsou tedy inhibovány všechny exportery. Jako regulační mechanismus byl identifikován zvýšený $\Delta\Psi$ kmenů postrádajících Trk1p a Trk2p, který stojí za inhibicí aktivity všech tří exportních systémů. Objevený regulační mechanismus výrazně přispívá k objasnění obecných zásad regulace homeostase iontů alkalických kovů.

V rámci čtvrté publikace „**Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter**“ (kapitola 4.4, str. 41) byl poprvé popsána regulace homeostase iontů alkalických kovů pomocí proteinů 14-3-3 u *S. cerevisiae*. Pomocí studia genetických i fyzických interakcí bylo zjištěno, že proteiny 14-3-3 jsou specifickými pozitivními regulátory (aktivátory) antiporteru Nha1 a že s ním také fyzicky interagují. Bylo prokázáno, že existuje pravděpodobně více míst interakce, protože proteiny 14-3-3 interagují jak s transmembránovou polovinou, tak C-koncovou hydrofilní polovinou Nha1p. Druhým nově identifikovaným regulátorem Nha1p je jedna z podjednotek kaseinkinasy 2 (CK2), katalytická podjednotka Cka1p. Genetická interakce mezi *CKA1* a *NHA1* byla objevena v rámci páté publikace „**Pleiotropic role of CKA1 in salt tolerance and cation homeostasis**“ (kapitola 4.5, str. 42). Ukázalo se, že již dříve popsaná schopnost Cka1p regulovat expresi *ENA1* není jedinou cestou, kterou Cka1p ovlivňuje homeostasi iontů alkalických kovů. Kinasa Cka1 byla v rámci publikace poprvé popsána jako pozitivní regulátor (aktivátor) Nha1p. Hledání místa interakce (fosforylace) Cka1p v sekvenci Nha1p bylo (i přes použití *in silico* predikce) neúspěšné, ale bylo prokázáno, že pro interakci není nutná C-koncová hydrofilní část proteinu. Kromě regulace exprese *ENA1* a regulace aktivity Nha1p byla poprvé identifikovaná také další účast Cka1p v homeostasi iontů alkalických kovů nezávislá na přítomnosti exporterů Nha1 a Ena. V rámci čtvrté a páté publikace tedy byly identifikovány dva dosud neznámé pozitivní regulátory aktivity Nha1p.

Na^+/H^+ antiporter byl studován rovněž v šesté publikaci „**Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae***“ (kapitola 4.6, str. 44), která na rozdíl od ostatních popisuje studii zaměřenou na lidský Na^+/H^+ antiporter NHAoc/NHA2, homolog *ScNHA1*. NHAoc/NHA2 je nutný pro správnou diferenciaci lidských osteoklastů. cDNA savčího genu byla v rámci této studie úspěšně exprimována v mutantním kmeni *S. cerevisiae* postrádajícím vlastní exportery iontů alkalických kovů a byla testována aktivita exprimovaného proteinu a vliv specifických mutací na aktivitu. Na základě studie byly identifikovány důležité aminokyseliny, po jejichž mutaci (nebo kombinaci více mutací) docházelo k výraznému poklesu transportní aktivity proteinu. Tímto přístupem bylo odhaleno, že i samotná mutace v jednom ze tří identifikovaných AA zbytků může zásadně ovlivnit aktivitu transporteru a v lidském organismu může taková mutace stát za poruchami tvorby kostí.

Součástí této disertační práce jsou také nepublikované výsledky projektu aplikovaného výzkumu (kapitola 4.7, str. 45). V rámci získaného grantu probíhala spolupráce s firmou DEL, a.s. zaměřenou na vývoj software pro průmyslové podniky. Výsledkem spolupráce byl vznik funkční aplikace Ocellaris (www.ocellaris.cz) pro automatickou analýsu mikroskopických snímků, která poskytuje výpočetní podporu a *de facto* umožňuje měření pH v mikroskopu v jednotlivých buňkách kvasinek exprimujících pH sensitive verzi zeleného fluorescenčního proteinu (pHluorin).

4.1 Publikace č. 1 – *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance

V oblasti základního výzkumu je celosvětově standardně používáno pouze několik tzv. laboratorních kmenů *S. cerevisiae*. Také v oblasti výzkumu homeostase iontů alkalických kovů je skupina standardně používaných laboratorních kmenů poměrně ustálená, přesto jsou v rámci jednotlivých laboratoří používány ke stejným pokusům různé kmeny. Tento fakt často nemusí být významný, ale v řadě případů se v minulosti ukázalo, že není vždy možné srovnávat výsledky získané s různými kmeny. V naší laboratoři byl po dlouhá léta k výzkumu homeostase iontů alkalických kovů využíván kmen W303-1A (viz např. [63]) a od něj odvozené mutanty. Na základě vývoje ve vědecké komunitě, výběru kmenů, u kterých byla v relevantní dobu již známa sekvence genomu, a také na základě nově vznikajících projektů a spoluprací se objevila potřeba vyměnit dosud používaný kmen W303 za kmen BY4741. Pro zachování kontinuity a možnosti využití dřívějších výsledků laboratoře bylo potřeba provést intenzivní porovnání základních fyziologických parametrů obou kmenů, a také srovnat jejich chování (a chování odvozených mutantů) v přítomnosti extrémně vysokých nebo nízkých koncentracích iontů alkalických kovů.

Základní fyziologické parametry obou kmenů (a příslušných odvozených mutantních kmenů) byly současně charakterisovány a bylo zjištěno, že buňky obou kmenů se vzájemně liší ve velikosti, objemu, váze sušiny, obsahu K^+ , toleranci k iontům alkalických kovů, amonným a organickým kationtům (např. hygromycin B) a pravděpodobně také v $\Delta\Psi$. Mimo vzájemné srovnání obou kmenů byl v této práci poprvé odhalen negativní vztah mezi růstovou fází a vnitrobuněčným obsahem K^+ . Buňky ve velmi časně růstové fázi měly v obou zkoumaných kmenech mnohem vyšší obsah K^+ , než buňky v pozdější fázi růstu buněčné kultury.

Práce tedy ukázala na značné rozdíly v absolutních hodnotách výsledků, které je možné nalézt u dvou běžně používaných kmenů *S. cerevisiae*, poukázala na fakt, že variabilita v rámci jednoho druhu může být významná, a přispěla do diskuse o tom, jestli je při dalším výzkumu důležité pozorované fenotypy ověřovat ve více kmenech.

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

4.2 Publikace č. 2 – Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions

Při studiu homeostase iontů alkalických kovů byla nejprve věnována pozornost importerům K^+ Trk1 a Trk2. Mezi fenotypy delece *trk1* a *trk2* patří neschopnost růstu při snížené koncentraci K^+ , zvýšení relativního $\Delta\Psi$ a vyšší citlivost k organickým kationtům (např. spermin), Li^+ a Na^+ [12, 30, 34]. V rámci dříve publikovaných studií však dosud nebyl podrobně studován přechod buněk z prostředí s nelimitující koncentrací K^+ do prostředí s nízkým obsahem K^+ , dalším problémem dřívějších studií byla často relativně vysoká přirozená koncentrace K^+ v médiu. Aby bylo možné proces hladovění na K^+ studovat, bylo v rámci této práce navrženo a na objednávku vyrobeno růstové médium, jehož použití umožňovalo pozorovat chování buněk v přítomnosti dostatečného množství všech živin kromě K^+ .

V první části práce byl sledován růst buněk (BY4741 a kmene postrádajícího *TRK1* a/nebo *TRK2*) v přítomnosti různých koncentrací K^+ a za různého pH. Zároveň byl měřen relativní $\Delta\Psi$, vnitrobuněčné pH, míra okyselování okolí buňkami, ale také citlivost na Na^+ , Li^+ a některé organické kationty. Při mnohem lépe definované koncentraci K^+ v médiu byly potvrzeny výsledky předchozích studií tak, že kmeny postrádající *TRK1* (platí stejně pro kmen postrádající současně *TRK1* a *TRK2*) jsou hyperpolarisované, citlivé ke kationtům (Na^+ , Li^+ a organickým kationtům) a také ke snížené koncentraci K^+ . Dále bylo pozorováno snížené vnitrobuněčné pH a snížená schopnost okyselování prostředí jako důsledek delece *trk1*. Vliv delece *trk1* byl pozorován také v prostředí s nelimitujícím (cca 50 – 100 mM) množstvím K^+ (např. snížení vnitrobuněčného pH, okyselování okolí buněk a rozdíl v $\Delta\Psi$).

V druhé části byla studována časová závislost dějů, které probíhají po přenesení buněk do prostředí bez K^+ . Také zde byly porovnávány charakteristiky buněk BY4741 s derivátem tohoto kmene postrádajícím *TRK1* a *TRK2*. Po přenesení buněk do média bez K^+ byl pozorován intenzivní pokles vnitrobuněčného obsahu K^+ u buněk BY4741 v čase, zatímco u buněk bez *TRK1* a *TRK2* byl pokles mnohem pomalejší. Současně se ztrátou K^+ docházelo k poklesu velikosti buněk BY4741 a tento pokles byl opět mnohem slabší u kmenů postrádajících *TRK1* a *TRK2*. Rozdíl $\Delta\Psi$ mezi oběma kmeny (hyperpolarisace kmene bez importerů K^+), který je značný i při dostatku K^+ , se v prostředí bez K^+ zvětšil. Překvapivě, nebyla pozorována zásadní změna vnitrobuněčného pH v čase u obou kmenů. pH se během hladovění buněk na K^+ jen velmi pozvolna zvyšovalo (rovnoměrně) u obou kmenů. V práci byly také stanoveny kinetické parametry vstupu (K_T a V_{max} ; měřením vstupu Rb^+ jako analoga K^+) u obou kmenů v závislosti na obsahu K^+ v prostředí. Kinetické parametry se v závislosti na koncentraci

K^+ měnily pouze u kmene BY4741, zatímco u kmene postrádajícího *TRK1* a *TRK2* byly konstantní, což potvrzuje, že po deleci importerů nedochází ke specifickému importu K^+ .

Výsledky z této práce, a to především pozorované zastavení výstupu K^+ během hladovění buněk na K^+ u kmene bez *TRK1* a *TRK2*, se staly východiskem pro další práci (kapitola 4.3, str. 40), ve které bylo zastavení exportu vlivem delece importerů podrobněji studováno.

Navarrete, C., Petrezselyová, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahrádka, J., Arino, J., Sychrová, H., Ramos, J.: Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **10**, 508-517 (2010).

4.3 Publikace č. 3 – Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium limiting conditions

Na základě výsledků získaných v rámci předchozí publikace (kapitola 4.2, str. 38) vyvstala řada otázek. Výstup K^+ z buněk během hladovění na K^+ byl pozorován u kmene BY4741, ale po deleci genů *TRK1* a *TRK2* se tento výstup zastavil. To naznačovalo, že s odstraněním *TRK1* a *TRK2* je snížený výstup, takže u některého ze tří exporterů došlo ke snížení jeho aktivity. Pro objasnění toho, který z exporterů se výstupu K^+ při hladovění účastní, byly použity kmeny postrádající jednotlivě geny *ENA*, *NHA1* a *TOK1*, dále kombinace dvojic a také kmen postrádající všechny tři exportní systémy. Výsledky z předchozí publikace (kapitola 4.2; výstup K^+ z buněk v čase) byly opakovány a porovnány s kmenem postrádajícím všechny důležité transportery K^+ v PM (delece *trk1*, *trk2*, *tok1*, *nha1* a geny *ena1-5*). Na základě těchto experimentů bylo zřejmé, že pozorovaný výstup K^+ probíhá částečně přes všechny exportní systémy a že všechny tyto exportery (Ena, Tok1 a Nha1) mají po deleci *trk1* a *trk2* výrazně nižší aktivitu.

Současná nefunkčnost všech tří exporterů majících odlišný mechanismus transportu (kanál, antiporter, ATPasa) a také rozdílnou regulaci (regulace exprese, či post-translační modifikace) naznačovala, že se jedná o obecný regulační jev, který byl schopen inhibovat aktivitu všech exporterů. Bylo zjištěno, že zvýšený $\Delta\Psi$ je tím regulačním prvkem upravujícím aktivitu všech exporterů. Pomocí delece *tok1* v kmeni postrádajícím *TRK1* a *TRK2* byla tato skutečnost prokázána, protože následně došlo k poklesu $\Delta\Psi$, opětovnému odblokování exportu K^+ a zmenšování buněk při hladovění na K^+ jako v kmeni rodičovském.

V rámci této publikace bylo poprvé objeveno, že se všechny exportery podílejí na exportu K^+ při sníženém obsahu K^+ v okolí a všechny mohou být společně inhibovány pomocí zvýšeného $\Delta\Psi$.

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

4.4 Publikace č. 4 – Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter

Vzájemný regulační vztah mezi importery a exportery iontů alkalických kovů byl na základě publikací č. 2 a 3 objeven a prokázán (kapitola 4.2 a 4.3). Dalším úkolem této disertační práce tedy bylo pokusit se identifikovat proteiny, které by se na regulaci aktivity studovaných transporterů mohly podílet.

Na základě nedávno publikovaných dat [29, 186-188] byly proteiny 14-3-3 (kódované v *S. cerevisiae* geny *BMH1* a *BMH2*) identifikovány jako potenciální regulátory homeostase iontů alkalických kovů. Systematickou přípravou a testováním kmenů s různými kombinacemi delecí transporterů iontů alkalických kovů v kombinaci s delecí genu *BMH1* či *BMH2* bylo zjištěno, že jediným interakčním partnerem proteinů 14-3-3 je antiporter Nha1. Nepřítomnost *BMH1* vedla u buněk nesoucích gen *NHA1* ke snížení tolerance k iontům alkalických kovů a také k organickým kationtům (např. spermin). Dále bylo zjištěno, že vlivem delece *bmh1* nedochází ke změnám membránového potenciálu a že citlivost k organickým kationtům nesouvisí s objevenou interakcí proteinů 14-3-3 s Nha1p, ale jde pravděpodobně o regulaci intracelulární detoxifikace organických kationtů (např. sekvestrace do vakuol). Dále bylo prokázáno, že při absenci *BMH1*, může být role Bmh1p zastoupena umělým zvýšením exprese *BHM2*, oba geny tedy hrají v homeostasi iontů alkalických kovů stejnou úlohu, ale liší se úrovní exprese.

V druhé části práce bylo objasněno, že nejde pouze o interakci genů, ale také o přímou fyzickou interakci antiporteru Nha1 s proteiny 14-3-3 (na úrovni proteinů). Při hledání místa interakce v sekvenci Nha1p bylo zjištěno, že interakce probíhá na více místech, alespoň jednom v C-koncové cytosolické části Nha1p a alespoň jednom v části transmembránové (např. na jednom z konců poblíž zanoření proteinu do membrány nebo v cytosolicky orientovaných smyčkách; [81]). Na základě průzkumu specializovaných databází bylo (kromě AA zbytků fosforylovaných Hog1p; [86]) nalezeno dvanáct nových míst fosforylace (potenciálních míst vazby proteinů 14-3-3) v sekvenci Nha1p (viz Supplementary table 1 v této publikaci). Vzhledem k vysoké pravděpodobnosti, že by bylo nutné otestovat ještě více potenciálních míst interakce, bylo rozhodnuto výsledky publikovat a identifikaci místa interakce v budoucnu řešit jako samostatný projekt.

V rámci této práce došlo k odhalení nového regulátoru homeostase iontů alkalických kovů v kvasinkách, proteinů 14-3-3, které se účastní regulace prostřednictvím více přímých interakcí s Nha1p. Proteiny 14-3-3 působí jako pozitivní regulátory Nha1p odpovědné za plnou aktivaci antiporteru.

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 849-858 (2012).

4.5 Rukopis č. 5 – Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis

Stejně jako předchozí publikace se také tato zabývá identifikací nových interakčních partnerů a proteinů schopných regulovat transportery iontů alkalických kovů. Jak již bylo uvedeno v předchozí publikaci (kapitola 4.4, str. 41), ve specializovaných databázích bylo možné nalézt celkem čtrnáct míst fosforylace Nha1p, u kterých byla fosforylace prokázána metodou hmotnostní spektroskopie, ale pouze u dvou z nich byla prokázána fosforylace kinasou Hog1 [86]. U ostatních dvanácti AA zbytků byla fosforylace za určitých podmínek prokázána, ale odpovědná kinasa nebyla nalezena. V rámci této práce bylo provedeno hledání charakteristických sekvenčních motivů kvasinkových kinas pro identifikovaná místa fosforylace a po odborné konzultaci (Dr. O. Schmidt, Freiburg, Německo) byla jako odpovědná kinasa pro fosforylacii zbytků S669 a S683 identifikována kaseinkinasa 2 (CK2). Jelikož byla jedna z katalytických podjednotek CK2, Cka1p již dříve identifikována jako pozitivní regulátor exprese *ENA1* [153], bylo rozhodnuto se touto podjednotkou zabývat detailněji a zjistit, jestli je regulace exprese *ENA1* jedinou cestu, kterou Cka1p může do homeostase iontů alkalických kovů zasáhnout.

V první části práce byla připravena sada kmenů postrádajících jednotlivé geny, nebo různé kombinace genů *NHA1*, *ENA* a *CKA1*. Testy citlivosti k iontům alkalických kovů a měření rychlosti exportu K^+ a Na^+ odhalily, že Cka1p hraje důležitou roli v regulaci homeostase iontů alkalických kovů nejen prostřednictvím regulace *ENA1*, ale také regulací aktivity Nha1p a dále ještě alespoň jedním mechanismem nezávislým na exporterech Ena a Nha1, který je pravděpodobně spojen s regulací $\Delta\Psi$. Dále bylo prokázáno, že při konstitutivní expresi *ENA1* není regulována aktivita Ena1p pomocí Cka1p (pomocí Cka1p je tedy regulována výhradně exprese *ENA1*). Na druhou stranu, Nha1p je regulován i při uměle zvýšené stabilní expresi a zdá se, že regulace probíhá (na rozdíl od Ena1p) právě na úrovni regulace aktivity transporteru pomocí Cka1p.

V druhé části bylo hledáno místo interakce (pravděpodobně fosforylace některého AA zbytku Nha1p) mezi Nha1p a Cka1p. Na základě již zmíněné analýsy dat z databází byla provedena cílené mutace v Nha1p tak, že zbytky S669 a S683 (a několik okolních S a T) byly nahrazeny alaninem. Po charakterisaci fenotypů bylo zřejmé, že žádný z testovaných AA zbytků nebyl odpovědným za regulaci Nha1p pomocí Cka1p. Vzhledem k velkému množství možností, které by bylo nutné otestovat v sekvenci Nha1p, byla testována nejdříve zkrácená verze Nha1-472p, které obsahovala pouze transmembránovou část Nha1p (prvních 472 AA; [82]) a téměř celý cytosolický C-konec chyběl. Překvapivě bylo zjištěno, že AA zbytek (nebo více zbytků) odpovědný za interakci Nha1p s Cka1p se pravděpodobně nachází v některé z intracelulárních smyček, nebo krátkých, cytosolicky

orientovaných koncích (N-konec a začátek C-konce) v rámci prvních 472 AA. Na základě dříve publikovaného modelu topologie Nha1p [82], dat dostupných ve specializovaných databázích [189-191] a *in silico* predikčních nástrojů [190] bylo identifikováno celkem 13 předpokládaných míst fosforylace Nha1p kinasou Cka1, které je nutno v budoucnu otestovat.

V rámci této práce byly identifikovány dosud neznámé cesty, kterými je podjednotka CK2, kinasa Cka1 schopna regulovat homeostasi iontů alkalických kovů. Kromě dříve popsané regulace exprese *ENA1* byla poprvé popsána schopnost Cka1p regulovat transportní aktivitu Nha1p (jako pozitivní regulátor). Poprvé byla popsána také schopnost Cka1p zapojit se do regulace homeostase iontů alkalických kovů bez přítomnosti exporterů Ena a Nha1, v tomto případě se pravděpodobně jedná o regulaci prostřednictvím změn v $\Delta\Psi$.

Tato publikace byla zařazena ve formě rukopisu, který je připravován k zaslání do časopisu *Microbiology (SGM)*.

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis. *rukopis* (2013).

4.6 Publikace č. 6 – Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae*

V předchozích publikacích byla homeostase iontů alkalických kovů studována z mnoha podhledů. V této práci bylo využito získaných znalostí a existence řady vhodných mutantů *S. cerevisiae* byla využita jako nástroj pro studium lidského antiporteru. Díky relativně nízkým nárokům a jednoduchosti práce s kvasinkovými buňkami a relativně vysokému stupni sekvenční podobnosti s transportery jiných eukaryotních organismů mohou být buňky *S. cerevisiae* s výhodou využity pro studium transporterů jiných organismů (viz kapitola 2.1.6, str. 20). Jedním z nedávno objevených antiporterů, který je sekvenčně podobný Nha1p z *S. cerevisiae* je lidský Na^+/H^+ -antiporter NHAoc/NHA2, který je exprimován ve vysokém množství pouze v osteoklastech (viz kapitola 2.1.6, str. 20; [118, 192]). Ačkoli byl tento gen objeven teprve nedávno, bylo zjištěno, že je důležitý pro správnou diferenciaci osteoklastů a mutace v tomto antiporteru by mohly stát za mnohdy smrtelným onemocněním tvorby kostní tkáně (*osteopetrosa*).

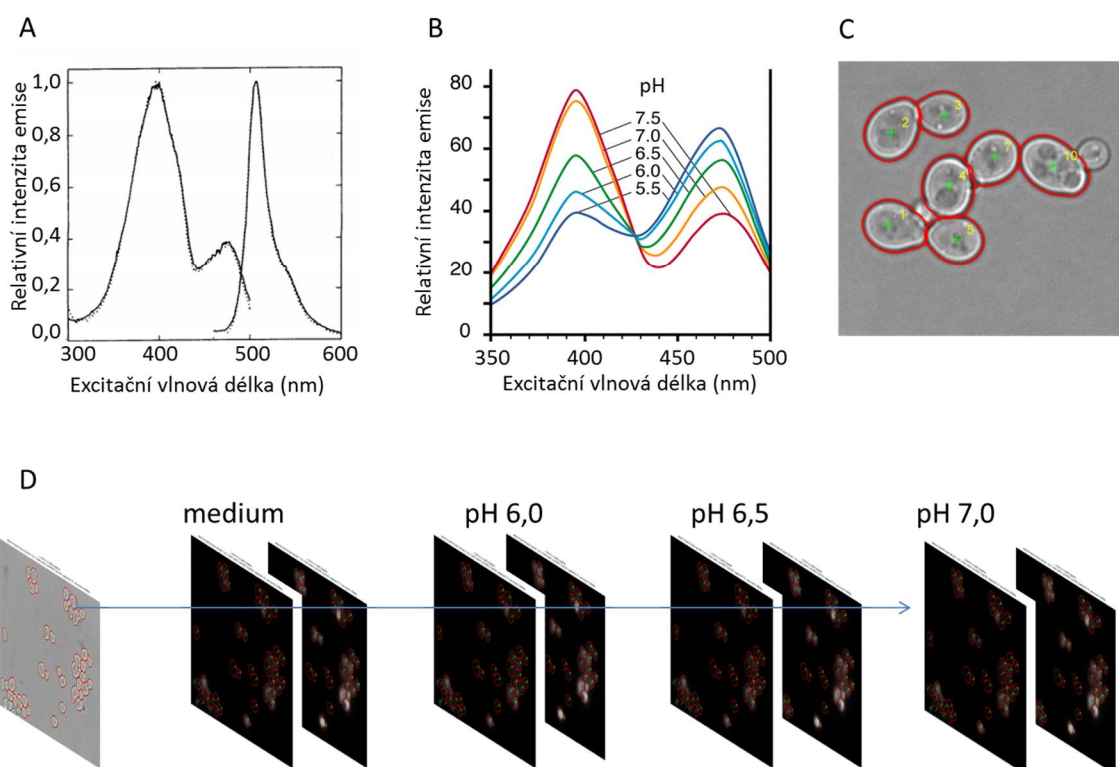
V rámci této práce byla cDNA lidského NHAoc/NHA2 exprimována v kvasinkových buňkách postrádajících kromě *NHA1* také geny *ENA*. Aktivita antiporteru byla následně testována jak pomocí měření tolerance buněk k NaCl, tak experimenty sledujícími v čase výstup Na^+ z buněk. Na základě informací uveřejněných v souhrnných databázích [193] byly identifikovány tři AA zbytky v sekvenci NHAoc/NHA2 (I159, V161 a F357), k jejichž záměně může v lidských buňkách docházet vlivem jednonukleotidových polymorfismů (SNP; single nucleotide polymorphism). SNP jsou takové nukleotidy v sekvenci DNA, u kterých často dochází k záměně nukleotidů, proto jsou považovány za zdroj genetické charakterisace jednotlivce. SNP v NHAoc/NHA2 byly v minulosti označeny jako důležité faktory vzniku a rozvoje onemocnění tvorby kostní tkáně. Ve AA zbytcích vybraných na základě SNP byla provedena cílená mutace (vždy pouze jedna z mutací I159T, V161A a F357C) a aktivita mutovaného proteinu byla sledována. Zavedením každé z mutací došlo k poklesu aktivity antiporteru a s tím spojeným zvýšením citlivosti k NaCl. S podobným výsledkem byly testovány také další vybrané evolučně konservované AA zbytky.

Na základě získaných dat bylo zřejmé, že mutace v evolučně konservovaných zbytcích a ve zbytcích, které mohou být mutovány díky SNP, zásadně ovlivňují aktivitu lidského antiporteru NHAoc/NHA2 a tím mohou pravděpodobně ovlivňovat správnou diferenciaci kostních buněk a stát v pozadí rozvoje poruch tvorby kostí. Místa SNP vedoucí v lidském organismu k mutacím ve sledovaných AA zbytcích tak pravděpodobně jsou důležitým faktorem určujícím predispozici k těmto poruchám.

Huang, X., Morse, L.R., Xu, Y., Zahrádka, J., Sychrová, H., Stashenko, P., Fan, F., Battaglino, R.A.: Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1241-1247 (2010).

4.7 Další nepublikované výsledky, metodika měření vnitrobuněčného pH

Při výzkumu prováděném v rámci této disertační práce byla využita řada pokročilých metod z oblasti molekulární biologie, biochemie a fyzikální chemie. Mezi nejpokročilejší z nich patří měření vnitrobuněčného pH *in vivo* pomocí pH sensitive verze zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), pHluorinu, který je v buňkách heterologně exprimován [194, 195]. Metoda využívá změny v excitačním spektru pHluorinu způsobené změnou pH. Dva výrazné vrcholy, 398 nm a 477 nm, které byly nalezen již v excitačním spektru původního GFP (obr. 4.7.1A; [196]) jsou přítomny také u pHluorinu a s klesajícím pH dochází k poklesu intenzity u původně dominantního vrcholu 398 nm a roste intenzita vrcholu 477 nm (obr. 4.7.1B; [195]). S využitím vhodných kalibračních pufrů a vhodného poměru excitačních vlnových délek (např. 410/470 nm) získáme po vynesené do grafu v závislosti na pH téměř lineární kalibrační křivku, kterou je možné využít na stanovení absolutní hodnoty pH v buňkách na základě naměřených poměrů excitačních vlnových délek [195].



Obr. 4.7.1 pHluorin a jeho využití v měření pH v mikroskopu

Obrázek zachycuje excitační a emisní spektrum GFP (A), změnu intenzity emise pHluorinu v závislosti na excitační vlnové délce v různém pH (B), ukázka identifikace středů a obrysů buněk aplikací Ocellaris na obrázku z mikroskopu ve viditelném světle (C) a schéma měření pH v jednotlivých buňkách s využitím aplikace Ocellaris a systému CellASIC (D).

zdroj: upraveno podle [195, 196] (A-B) a vlastní tvorba (C-D)

Měření vnitrobuněčného pH je v laboratoři obvykle prováděno ve formátu 96 jamkových destiček s buněčnou suspenzí, který umožňuje měření většího množství vzorků současně a měření ve více

paralelách, dále vede k úsporám jak časovým, tak materiálním [194]. Ačkoli je metoda široce využívána, vyskytuje se řada problémů a limitací způsobených např. nehomogenitou signálu z buněčné suspenze nebo fluorescencí růstového média či buněk samotných.

Ve snaze posunout možnosti metody, získat přesnější data, ale také rozšířit množství údajů, které je možné z měření získat, byla v rámci této práce vyvíjena nová metoda pro měření pH v jednotlivých buňkách v mikroskopu. Pro vývoj metody byla získána podpora v letech 2011 – 2012 pro řešení projektů aplikovaného výzkumu financovaná Technologickou Agenturou ČR jako projekt Alfa s názvem: „SW analýza změn v mikroskopických obrazech buněčných indikátorů“. Cílem tohoto projektu bylo ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR, v.v.i. a firmou DEL a.s. vytvořit software pro automatické vyhodnocení mikroskopického obrazu, který umožní měření vnitrobuněčného pH s použitím pHluorinu.

Pro potřeby tohoto projektu bylo vytvořeno několik plasmidů umožňujících stabilní a co nejvíce homogenní expresi pHluorinu v buňkách *S. cerevisiae*. Tyto plasmidy byly exprimovány v buňkách BY4741 a v odvozeném mutantním kmeni postrádajícím *TRK1* a *TRK2*, protože rozdíl v pH těchto dvou kmenů byl znám již z předchozích měření (viz kapitola 4.2, str. 38). S využitím těchto kmenů byla optimalizována metoda ve dvou provedeních. Nejdříve bylo využito klasických podložních a krycích sklíček tak, že byla buněčná suspenze (s kalibračním pufrem nebo bez) aplikována na sklíčko a bylo pořízeno několik trojic mikroskopických snímků (viditelné světlo, excitace 410 nm a excitace 470 nm). Snímky byly následně vyhodnoceny s použitím vyvíjené aplikace tak, že nejdříve byl odečten obrys buněk z první fotografie z trojice (viditelné světlo; obr. 4.7.1C) a tento obrys byl využit pro odečet fluorescence v jednotlivých buňkách na dalších fotografiích z trojice. V tomto nastavení vznikl každý kalibrační bod i hodnoty vzorku na jiném sklíčku (a tedy na jiných buňkách).

Druhou variantou měření bylo využití mikrokapilárového systému CellASIC (CellASIC Corporation), který umožňuje fixaci živých buněk pod objektivem a zároveň plynulé promývání zvolenými roztoky a médii. Bez ohledu na vysokou cenu nabízí druhá varianta řadu výhod, protože buňky ležící ve vybraném zorném poli bylo možné sledovat za různých podmínek. Zpravidla byly vybrané buňky nejdříve promývány růstovým médiem a následně promývány jednotlivými pufrů. Pro každé médium i kalibrační pufr byla pořízena již zmíněná trojice fotografií stále stejného zorného pole. Díky tomu bylo následně možné sledování změn pH ve stejných buňkách, v jakých byl provedena kalibrace (obr. 4.7.1D). Každá jednotlivá buňka tak měla vlastní kalibrační křivku, která byla využita ke stanovení vnitrobuněčného pH příslušné buňky za různých podmínek (např. v různých médiích). Ke každé buňce bylo navíc možné přiřadit její parametry získané analýzou fotografie ve viditelném světle, jako je velikost, obvod a tvar buňky, případně, jestli se buňka dělí, a bylo možné sledovat, jestli rozdílné pH

jednotlivých buněk nezávisí na některém z těchto parametrů. Po vyhodnocení bylo možné např. pozorovat individuální odchylky buněk, vyřadit buňky s nedostatečnou intenzitou signál, identifikovat přítomnost subpopulací se stejnými vlastnostmi nebo specifické chování buněk ve stejném fyziologickém stavu (např. dělících se buněk).

Nově vytvořenou metodou za použití destičky CellASIC byly nejdříve ověřeny výsledky publikované v rámci druhé publikace (kapitola 4.2, str. 38), které prokázaly, že buňky postrádající *TRK1* a *TRK2* mají signifikantně nižší pH než buňky BY4741. Následně byla prověřena schopnost metody identifikovat více subpopulací z hlediska pH a dalších parametrů. Jednou z výhod této metody bylo také to, že z měření bylo možné odstranit buňky s nedostatečnou expresí pHLuorinu, nebo např. takové, jejichž kalibrační křivka byla nestandardní (to bylo pozorováno často u starých a zjevně narušených buněk s vysokou autofluorescencí). Odstranění těchto buněk z analýzy bylo zpravidla dosaženo mnohem přesnějších výsledků, než které bylo možné získat dříve používanou metodou s 96 jamkovou destičkou.

Výstupem projektu byl vznik software Ocellaris (www.ocellaris.cz), který je v současné době ve formě funkční testovací verze, a na jehož dokončení a komercializaci se v současnosti dále pracuje.

5 Souhrnná diskuse

Předkládaná disertační práce svým tématem volně navazuje na diplomovou práci s názvem „Příprava a charakterisace plasmidu YEX-GFP-Nha1 a jeho využití pro studium proteinu Nha1 ze *Saccharomyces cerevisiae*“ obhájenou v roce 2008 na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy [33]. V diplomové práci byla, mimo jiné, studována role vybraných aminokyselinových zbytků z transmembránové oblasti Nha1p na aktivitu a substrátovou specifitu tohoto velice důležitého transporteru a bylo vytvořeno několik nástrojů (nové plasmidy a mutantní kmen), které byly využity pro další studium úlohy a regulace Nha1p v homeostasi iontů alkalických kovů. V rámci této disertační práce nebyla věnována pozornost pouze Nha1p, ale problematika udržování homeostase iontů alkalických kovů a regulace transporterů Na^+ a K^+ byla studována mnohem komplexněji. Práce vedla k objevu dosud neznámé dráhy regulace exportních systémů pomocí změn v membránovém potenciálu a byly objeveny dva nové regulátory antiporteru Nha1, které jsou nezbytné pro jeho správnou funkci. Získané zkušenosti a znalosti byly dále využity ke studiu lidského Na^+/H^+ antiporteru NHAoc/NHA2 a objasnění, které mutace by mohly stát za závažným onemocněním. V neposlední řadě byla v rámci práce vyvinuta nová metoda a softwarová aplikace, která má v budoucnu posunout možnosti dalších studií homeostase kationtů a pH v jednotlivých buňkách.

Výsledky zahrnuté do této práce přinášejí mnoho nového. Z hlediska vědeckého přínosu do problematiky je zásadní objev vzájemné regulace vstupních a výstupních transporterů iontů alkalických kovů. Již delší dobu se předpokládalo, že neustálá cirkulace K^+ přes plasmatickou membránu je u kvasinek důležitá pro udržování optimálního membránového potenciálu a pro mnoho fyziologických dějů. Až na základě této práce (kapitoly 4.2 a 4.3) bylo překvapivě prokázáno, že k neustálému výstupu K^+ dochází také v prostředí s nedostatkem K^+ . Navíc bylo poprvé ukázáno, že ATPasy Ena jsou přítomné a funkční také bez indukce jejich exprese a v případě absence antiporteru Nha1 jsou schopny Nha1p zastoupit při udržování cirkulace K^+ . Zjištění jsou o to překvapivější, že v prostředí s nedostatkem K^+ by se mohlo zdát logičtější to, že budou exportery nefunkční proto, aby nedocházelo k zbytečnému úniku potřebného K^+ z buněk. Důležitost udržení cirkulace je potvrzena také tím, že výstup K^+ neprobíhá pouze jedním exportním systémem, ale je jistěn tak, že v případě poruchy (delece) jednoho exporteru zastoupí jeho úlohu exporter další a rychlost celkového výstupu K^+ není ovlivněna. Předpokladem pro neustálou aktivitu exportních systémů je, že zároveň s exportem probíhá také mnohem účinnější vysokoafinitní import K^+ , který umožňuje nejen získávat exportovaný K^+ zpět, ale také efektivně akumulovat další K^+ z prostředí, aby mohly buňky růst a dělit se. Z výsledků je zřejmé, že výstup a cirkulace K^+ probíhá i v případech, kdy to je pro buňku zjevně energeticky náročné, což svědčí o mimořádné důležitosti tohoto děje pro buněčnou fyziologii. Na

narušení vstupu K^+ (deleci genů pro transportery *TRK1* a *TRK2*) proto buňky reagují významným snížením výstupu K^+ tak, aby nedocházelo k přílišným ztrátám K^+ , obdobně jako v případě narušení výstupu (např. delece *nha1*) se sníží afinita transporterů Trk ke K^+ [149]. Až na základě studií zahrnutých v této disertační práci bylo prokázáno, že aktivita importerů a exporterů je synchronizována, navzájem se ovlivňují a že jedním ze spojujících prvků je regulace membránového potenciálu. Výsledky uvedené v této práci umožnily důležitý posun v chápání komplexnosti systému regulace homeostase iontů alkalických kovů, bez těchto výsledků bylo pravděpodobně nemohl vzniknout ani nedávno publikovaný komplexní model homeostase K^+ v kvasinkových buňkách [14].

Až do vzniku této práce byl dosud detailněji prostudován pouze jediný regulátor antiporteru Nha1, kinasa Hog1, která je schopna fosforylovat dva AA zbytky v C-koncové části Nha1p, tím omezit výstup K^+ z buněk a následně zlepšit toleranci k Na^+ a sorbitolu [83, 86]. V této disertační práci byly objeveny dva další regulátory Nha1p, a to kinasa Cka1 a proteiny 14-3-3. Přítomnost obou těchto pozitivních regulátorů je důležitá pro zajištění plné aktivity Nha1p hlavně za podmínek solného stresu. Zajímavé je, že Cka1p působí na několika úrovních najednou a svou úlohou připomíná Hog1p, protože obě kinasy regulují jak expresi genu *ENA1*, tak aktivitu proteinu Nha1, ale do homeostase iontů alkalických kovů mohou zasáhnout ještě dalšími mechanismy (účast Hog1p v regulaci osmotického stresu a regulace $\Delta\Psi$ pomocí Cka1p). Přestože předkládaná práce přinesla celou řadu nových poznatků o úlohách Nha1p a regulaci jeho aktivity, téma ještě není zdaleka vyčerpáno. Nejméně 12 dalších AA zbytků Nha1p je fosforylováno avšak ani odpovědná kinasa, ani k čemu tato fosforylace slouží (viz kapitola 4.4, str. 41), není známo. S velkou pravděpodobností je také možno říci, že v předcházejících studiích (např. [189]) nebyla identifikována všechna místa fosforylace, a to především taková, která mohou být fosforylována/ defosforylována pouze za specifických podmínek a která by právě proto mohla být z hlediska regulace homeostase iontů alkalických kovů klíčová.

Porovnání dvou laboratorních kmenů, které bylo provedeno v první publikaci (kapitola 4.1, str. 37) naznačilo, že výsledky mohou být značně ovlivněny výběrem použitého kmene a že rozdíly v rámci jednoho kmene mohou být z hlediska fenotypu velmi důležité. Vznik této práce nepřímo navázal na vývoj ve vědecké komunitě, kde se s příchodem vysokokapacitních studií zkoumajících rozsáhlé knihovny mutantních kmenů objevila potřeba verifikovat získaná data ve více genetických pozadích. Na základě této filosofie musí být pozorovaný fenotyp nezávislý na určitém kmeni *S. cerevisiae* a výsledky jsou považovány za relevantní až po ověření ve více kmenech (viz např. [29]). Jelikož se v oblasti homeostase iontů alkalických kovů této otázce dříve nikdo systematicky nevěnoval, jsou získané výsledky pro dotčenou vědeckou komunitu dosti zásadní.

Získané zkušenosti a poznatky byly také využity při studiu vlastností savčího antiporteru a při vývoji nové metody. Studie zaměřená na lidský NHAoc/NHA2 (kapitola 4.6, str. 44) ukazuje mimo jiné to, že využití heterologní exprese v *S. cerevisiae* může přinést zajímavé a relevantní výsledky při studiu proteinů vyšších eukaryot, zároveň jsou zachovány přednosti práce s kvasinkami, jako je např. relativní jednoduchost a rychlost práce, přesně definované a dobře prozkoumané genetické pozadí, dobře fungující nástroje molekulární biologie a nižší náklady. Je zřejmé, že i v dnešní době může *S. cerevisiae* nabídnout mnoho možností ve vědecké práci a zdaleka se nejedná o přežitý modelový organismus. To potvrzuje také to, že k rychlému vývoji dochází i na poli metodologie a sledování nových trendů a zavádění nových metod je nezbytné pro udržení vysoké kvality prováděného výzkumu. Nová metoda měření vnitrobuněčného pH v mikroskopu, která byla vyvinuta v rámci této práce (kapitola 4.7, str. 45), byla navržena na základě identifikované poptávky vědecké komunity po tzv. „single cell“ metodách a měření individuálních rozdílů u jednotlivých buněk. Při vývoji byl využit pokročilý mikrokapilární systém CellASIC v kombinaci s moderní technikou pro fluorescenční mikroskopii a pokročilým matematickým aparátem tak, že vznikla unikátní metoda umožňující získávat ve srovnání s dříve používanými metodami mnohem podrobnější data. Zároveň bylo vyvinuto řešení cenově mnohem dostupnější než metody průtokové cytometrie, které jako jediné umožňují získání podobných dat na úrovni jednotlivých buněk. Vytvořená aplikace, která popsané měření umožňuje, je v současné době ve fázi testování (www.Ocellaris.cz) a přípravy na fázi komercializace, nicméně lze předpokládat, že by se měla v blízké budoucnosti začít používat v laboratorní praxi, protože již dnes existuje konkrétní poptávka ze strany zahraničních pracovišť.

6 Závěr

Výsledky uvedené v této disertační práci byly publikovány v pěti článcích a jeden další rukopis byl připraven pro odeslání k recenzi. Z těchto šesti publikací je u třech z nich uveden autor této disertační práce na prvním místě. Pro experimentální práci bylo připraveno a použito více než 20 nových mutantních kmenů *S. cerevisiae* a více než 10 nových plasmidů a byla využita celá řada pokročilých metod z oblasti molekulární biologie, biochemie, buněčné fyziologie a biofyzikální chemie. Na základě krátké zahraniční stáže byla převzata a v naší laboratoři zavedena metoda pro měření interakcí proteinů *in vivo* (metoda BiFC viz kapitola 4.4, str. 41), dále byla zavedena nová metoda na měření velikosti buněk pomocí přístroje (CASY TT, Roche) a byla vytvořena aplikace pro automatické a snadné vyhodnocení naměřených dat, která byla využita při měření výsledků uvedených v této práci (např. kapitola 4.3, str. 40). V neposlední řadě byla v rámci spolupráce s komerční firmou navržena a vytvořena softwarová aplikace umožňující unikátní sledování změn vnitrobuněčného pH *in vivo* v reálném čase v jednotlivých buňkách v různém prostředí.

V rámci této práce:

- 1) Bylo zjištěno, že mezi dvěma laboratorními kmeny *S. cerevisiae* a jejich mutanty existují značné rozdíly nejen v obsahu iontů alkalických kovů, ale také např. ve velikosti buněk a citlivosti k solím. Práce upozornila na fakt, že rozdíly mezi kmeny v rámci jednoho druhu mohou být významné a proto lze předpokládat pouze omezenou možnost ztotožňování výsledků z různých kmenů *S. cerevisiae*.
- 2) Vznikly výsledky, které pomohly lépe pochopit problematiku vzájemných interakcí vstupních a výstupních transporterů K^+ , přinesly nové světlo do regulace transporterů odpovědných za export iontů alkalických kovů, antiporteru Nha1 a ATPas Ena, a jejich zapojení do funkčního celku společně s importery K^+ .
- 3) Byly nalezeny dva dosud neznámé regulátory antiporteru Nha1, proteiny 14-3-3 a kinasa Cka1p. V obou případech se jedná o pozitivní regulátory aktivity Nha1p a jejich přítomnost je nezbytná pro plnou aktivaci Nha1p v prostředí solného stresu.
- 4) Získané znalosti byly využity při studiu lidského antiporteru NHAoc/NHA2 heterologně exprimovaného v kvasinkách. Byla studována závislost aktivity transporteru na mutacích specificky zavedených do jeho cDNA a bylo nalezeno několik AA zbytků, jejichž mutace mohou pravděpodobně ovlivnit vznik a rozvoj závažné choroby u lidí.

Výsledky práce byly publikovány v renomovaných mezinárodních časopisech a prezentovány na zahraničních kongresech a konferencích. Vytýčené cíle této disertační práce tak byly v plné šíři splněny.

7 Seznam zkratek

$\Delta\Psi$	membránový potenciál
AA	aminokyselina/y
CK2	kaseinkinasa 2
GFP	zelený fluorescenční protein
PKA	proteinkinasa A
PM	plasmatická membrána
ppm	particles per milion; označení pro 0,0001%
SNP	single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus
TMS	transmembránový segment

8 Přehled použité literatury

1. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G.: Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547 (1996).
2. Botstein, D., Chervitz, S., Cherry, M.: Yeast as a Model Organism. *Science* **277**, 1259-1260 (1997).
3. Mager, W.H., Winderickx, J.: Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 265-273 (2005).
4. Armstrong, W.M., Rothstein, A.: Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J Gen Physiol* **48**, 61-71 (1964).
5. Rodriguez-Navarro, A.: Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 1-30 (2000).
6. Arino, J., Ramos, J., Sychrova, H.: Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 95-120 (2010).
7. Sychrova, H.: Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S91-98 (2004).
8. Taylor, S.R., McLennan, S.M.: The geochemical evolution of the continental crust. *Rev Geophys* **33**, 241-265 (1995).
9. Armstrong, W.M., Rothstein, A.: Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J Gen Physiol* **50**, 967-988 (1967).
10. Shannon, R.: Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr Sect A* **32**, 751-767 (1976).
11. Voet, D., Voet, J. G. Biochemistry, in, Edn. Third Edition 382-389, 739-750 (Wiley International Edition, 2004).
12. Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., Rodriguez-Navarro, A.: Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**, 14838-14844 (1998).
13. Kinclova-Zimmermannova, O., Gaskova, D., Sychrova, H.: The Na⁺,K⁺/H⁺ -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**, 792-800 (2006).
14. Ke, R., Ingram, P.J., Haynes, K.: An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol* **9**, e1002879 (2013).
15. Maresova, L., Urbankova, E., Gaskova, D., Sychrova, H.: Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* **6**, 1039-1046 (2006).
16. Ramos, J., Contreras, P., Rodríguez-Navarro, A.: A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **143**, 5 (1985).
17. Benito, B., Garciadeblas, B., Rodriguez-Navarro, A.: Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* **148**, 933-941 (2002).

18. Serrano, R., Mulet, J., Rios, G., Marquez, J., Larrinoa, I.d., Leube, M., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C.: A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* **50**, 1023-1036 (1999).
19. Hohmann, S.: Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-372 (2002).
20. Serrano, R.: Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* **165**, 1-52 (1996).
21. Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A.: Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 399-404 (2001).
22. Murguia, J.R., Belles, J.M., Serrano, R.: The yeast *HAL2* nucleotidase is an *in vivo* target of salt toxicity. *J Biol Chem* **271**, 29029-29033 (1996).
23. Rodriguez-Navarro, A., Ramos, J.: Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**, 940-945 (1984).
24. Alijo, R., Ramos, J.: Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. *Biochim Biophys Acta* **1179**, 224-228 (1993).
25. Fell, G.L., Munson, A.M., Croston, M.A., Rosenwald, A.G.: Identification of yeast genes involved in k homeostasis: loss of membrane traffic genes affects k uptake. *G3 (Bethesda)* **1**, 43-56 (2011).
26. Csutora, P., Strasz, A., Boldizsar, F., Nemeth, P., Sipos, K., Aiello, D.P., Bedwell, D.M., Miseta, A.: Inhibition of phosphoglucomutase activity by lithium alters cellular calcium homeostasis and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C58-67 (2005).
27. Masuda, C.A., Xavier, M.A., Mattos, K.A., Galina, A., Montero-Lomeli, M.: Phosphoglucomutase is an *in vivo* lithium target in yeast. *J Biol Chem* **276**, 37794-37801 (2001).
28. Ghasemi, M., Schachter, S.C.: The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. *Epilepsy Behav* **22**, 617-640 (2011).
29. Barreto, L., Canadell, D., Petrezselyova, S., Navarrete, C., Maresova, L., Perez-Valle, J., Herrera, R., Olier, I., Giraldo, J., Sychrova, H., Yenush, L., Ramos, J., Arino, J.: A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **10**, 1241-1250 (2011).
30. Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P.O.: Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* **47**, 767-780 (2003).
31. Haro, R., Rodriguez-Navarro, A.: Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the *TRK1* transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1564**, 114-122 (2002).
32. Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., Rodriguez-Navarro, A.: *TRK2* is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**, 249-252 (1994).
33. Zahradka, J.: Příprava a charakterizace plasmidu YEX-GFP-Nha1 a jeho využití pro studium proteinu Nha1 ze *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Universita Karlova v Praze (2008).

34. Gaber, R.F., Styles, C.A., Fink, G.R.: *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2848-2859 (1988).
35. Ko, C.H., Buckley, A.M., Gaber, R.F.: *TRK2* is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**, 305-312 (1990).
36. Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., Fink, G.R.: Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**, 689-693 (1986).
37. Seto-Young, D., Perlin, D.S.: Effect of membrane voltage on the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 1383-1389 (1991).
38. Petrežselyova, S., Ramos, J., Sychrova, H.: Trk2 transporter is a relevant player in K⁺ supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* **56**, 23-28 (2011).
39. Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., Serrano, R.: The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**, 920-929 (2002).
40. Merchan, S., Bernal, D., Serrano, R., Yenush, L.: Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot Cell* **3**, 100-107 (2004).
41. Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R.: A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* **19**, 3328-3337 (1999).
42. Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C.L., Rivetta, A.: Chloride channel function in the yeast *TRK*-potassium transporters. *J Membr Biol* **198**, 177-192 (2004).
43. Ko, C.H., Gaber, R.F.: *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 4266-4273 (1991).
44. Michel, B., Lozano, C., Rodriguez, M., Coria, R., Ramirez, J., Pena, A.: The yeast potassium transporter *TRK2* is able to substitute for *TRK1* in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* **23**, 581-589 (2006).
45. Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A.: NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **432**, 59-64 (1998).
46. Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A.: Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**, 109-118 (2002).
47. Liang, H., Ko, C.H., Herman, T., Gaber, R.F.: Trinucleotide insertions, deletions, and point mutations in glucose transporters confer K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**, 926-935 (1998).
48. Martinez, P., Persson, B.L.: Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**, 628-638 (1998).
49. Zvyagil'skaya, R.A., Lundh, F., Samyn, D., Pattison-Granberg, J., Mouillon, J.M., Popova, Y., Thevelein, J.M., Persson, B.L.: Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **8**, 685-696 (2008).
50. Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B.: Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 885-929 (2012).

51. Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M.R., Kung, C.: Ion channels in yeast. *Science* **233**, 1195-1197 (1986).
52. Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.: A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695 (1995).
53. Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D.: Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* **132**, 183-199 (1993).
54. Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C., Slayman, C.L.: Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, *DUK1 (TOK1)*, *in situ*. *J Membr Biol* **162**, 67-80 (1998).
55. Vergani, P., Miosga, T., Jarvis, S.M., Blatt, M.R.: Extracellular K⁺ and Ba²⁺ mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K⁺ channel encoded by the yeast gene *TOK1*. *FEBS Lett* **405**, 337-344 (1997).
56. Fairman, C., Zhou, X., Kung, C.: Potassium uptake through the *TOK1* K⁺ channel in the budding yeast. *J Membr Biol* **168**, 149-157 (1999).
57. Haro, R., Garciadeblas, B., Rodriguez-Navarro, A.: A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**, 189-191 (1991).
58. Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H.K.: The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**, 3870-3882 (1995).
59. Daran-Lapujade, P., Daran, J.M., Luttkik, M.A., Almering, M.J., Pronk, J.T., Kotter, P.: An atypical *PMR2* locus is responsible for hypersensitivity to sodium and lithium cations in the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. *FEMS Yeast Res* **9**, 789-792 (2009).
60. Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R.: A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**, 409-419 (1989).
61. Daran-Lapujade, P., Daran, J.M., Kotter, P., Petit, T., Piper, M.D., Pronk, J.T.: Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays. *FEMS Yeast Res* **4**, 259-269 (2003).
62. Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S.: Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-741 (2003).
63. Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., Potier, S.: The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144** 2749-2758 (1998).
64. Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., Arino, J.: The transcriptional response of the yeast Na⁺-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* **281**, 36632-36642 (2006).
65. Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrova, H.: Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**, 89-93 (1996).
66. Pribylova, L., Papouskova, K., Zavrel, M., Souciet, J.L., Sychrova, H.: Exploration of yeast alkali metal cation/H⁺ antiporters: sequence and structure comparison. *Folia Microbiol* **51**, 413-424 (2006).

67. Sychrova, H., Ramirez, J., Pena, A.: Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**, 167-172 (1999).
68. Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., Kanazawa, H.: Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta* **1720**, 125-136 (2005).
69. Brett, C.L., Donowitz, M., Rao, R.: Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C223-239 (2005).
70. Orłowski, J., Grinstein, S.: Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* **447**, 549-565 (2004).
71. Ramos, J., Arino, J., Sychrova, H.: Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* **317**, 1-8 (2011).
72. Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K.: The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6896-6901 (2000).
73. Xiang, M., Feng, M., Muend, S., Rao, R.: A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18677-18681 (2007).
74. Dibrov, P., Young, P.G., Fliegel, L.: Functional analysis of amino acid residues essential for activity in the Na⁺/H⁺ exchanger of fission yeast. *Biochemistry* **37**, 8282-8288 (1998).
75. Kinclova-Zimmermannová, O., Zavrel, M., Sychrova, H.: Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *J Biol Chem* **280**, 30638-30647 (2005).
76. Kinclova-Zimmermannová, O., Zavrel, M., Sychrova, H.: Importance of the seryl and threonyl residues of the fifth transmembrane domain to the substrate specificity of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *Mol Membr Biol* **23**, 349-361 (2006).
77. Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., Arino, J.: A screening for high copy suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **276**, 29740-29747 (2001).
78. Wiebe, C.A., Rieder, C., Young, P.G., Dibrov, P., Fliegel, L.: Functional analysis of amino acids of the Na⁺/H⁺ exchanger that are important for proton translocation. *Mol Cell Biochem* **254**, 117-124 (2003).
79. Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., Michel, H.: Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* **435**, 1197-1202 (2005).
80. Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujike, S., Haga, M., Nakamura, N., Inoue, H., Sakajo, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kanazawa, H.: Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na⁺/H⁺ antiporters (Nha1p). *J Biochem* **131**, 821-831 (2002).
81. Mitsui, K., Kamauchi, S., Nakamura, N., Inoue, H., Kanazawa, H.: A conserved domain in the tail region of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter (Nha1p) plays important roles in localization and salinity-resistant cell-growth. *J Biochem* **135**, 139-148 (2004).
82. Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S., Sychrova, H.: Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**, 656-668 (2001).

83. Kinclova-Zimmermannova, O., Sychrova, H.: Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* **49**, 229-236 (2006).
84. Kinclova, O., Potier, S., Sychrova, H.: Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters into two subfamilies. *Microbiology* **148**, 1225-1232 (2002).
85. Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., Kanazawa, H.: Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺/H⁺ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1712**, 185-196 (2005).
86. Proft, M., Struhl, K.: MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**, 351-361 (2004).
87. Simon, E., Barcelo, A., Arino, J.: Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na⁺/H⁺ antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett* **545**, 239-245 (2003).
88. Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., Rao, R.: The yeast endosomal Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **16**, 1396-1405 (2005).
89. Maresova, L., Sychrova, H.: Genetic interactions among the Arl1 GTPase and intracellular Na⁺/H⁺ antiporters in pH homeostasis and cation detoxification. *FEMS Yeast Res* **10**, 802-811 (2010).
90. Maresova, L., Vydareny, T., Sychrova, H.: Comparison of the influence of small GTPases Arl1 and Ypt6 on yeast cells' tolerance to various stress factors. *FEMS Yeast Res* **12**, 332-340 (2012).
91. Petrezselyova, S., Kinclova-Zimmermannova, O., Sychrova, H.: 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. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 623-631 (2012).
92. Nass, R., Rao, R.: Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **273**, 21054-21060 (1998).
93. Maresova, L., Sychrova, H.: Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**, 588-600 (2005).
94. Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., Blumwald, E.: Identification and characterization of vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent Cation/H⁺ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**, 24284-24293 (2007).
95. Froschauer, E., Nowikovsky, K., Schweyen, R.J.: Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1711**, 41-48 (2005).
96. Zotova, L., Aleschko, M., Sponder, G., Baumgartner, R., Reipert, S., Prinz, M., Schweyen, R.J., Nowikovsky, K.: Novel components of an active mitochondrial K⁺/H⁺ exchange. *J Biol Chem* **285**, 14399-14414 (2010).
97. Quintero, F.J., Blatt, M.R., Pardo, J.M.: Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett* **471**, 224-228 (2000).
98. Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R.: Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**, 26145-26152 (1997).

99. Nass, R., Rao, R.: The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **145 (Pt 11)**, 3221-3228 (1999).
100. Flis, K., Hinzpeter, A., Edelman, A., Kurlandzka, A.: The functioning of mammalian ClC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochem J* **390**, 655-664 (2005).
101. Cagnac, O., Aranda-Sicilia, M.N., Leterrier, M., Rodriguez-Rosales, M.P., Venema, K.: Vacuolar cation/H⁺ antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**, 33914-33922 (2010).
102. Mitchell, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148 (1961).
103. Pina, C., Goncalves, P., Prista, C., Loureiro-Dias, M.C.: Ffz1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology* **150**, 2429-2433 (2004).
104. Tulha, J., Lima, A., Lucas, C., Ferreira, C.: *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given. *Microb Cell Fact* **9**, 82 (2010).
105. Toulmay, A., Schneiter, R.: Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: a model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie* **89**, 249-254 (2007).
106. Supply, P., Wach, A., Goffeau, A.: Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**, 19753-19759 (1993).
107. Stevens, T.H., Forgac, M.: Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 779-808 (1997).
108. Kane, P.M.: The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 177-191 (2006).
109. Samarao, S.S., Teodoro, C.E., Silva, F.E., Ribeiro, C.C., Granato, T.M., Bernardes, N.R., Retamal, C.A., Facanha, A.R., Okorokova-Facanha, A.L., Okorokov, L.A.: V H⁺-ATPase along the yeast secretory pathway: energization of the ER and Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 303-313 (2009).
110. Saroussi, S., Nelson, N.: Vacuolar H⁺-ATPase-an enzyme for all seasons. *Pflugers Arch* **457**, 581-587 (2009).
111. Kane, P.M.: Targeting reversible disassembly as a mechanism of controlling V-ATPase activity. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 117-123 (2012).
112. Velkova, K., Sychrova, H.: The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**, 27-34 (2006).
113. Krauke, Y., Sychrova, H.: Functional comparison of plasma-membrane Na⁺/H⁺ antiporters from two pathogenic *Candida* species. *BMC Microbiol* **8**, 80 (2008).
114. Krauke, Y., Sychrova, H.: Cnh1 Na⁺ /H⁺ antiporter and Ena1 Na⁺-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* **11**, 29-41 (2011).
115. Kinclova-Zimmermannova, O., Flegelova, H., Sychrova, H.: Rice Na⁺/H⁺-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters. *Folia Microbiol* **49**, 519-525 (2004).
116. Maresova, L., Sychrova, H.: *Arabidopsis thaliana* CHX17 gene complements the *kha1* deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 1167-1171 (2006).

117. Beltran, A.R., Ramirez, M.A., Carraro-Lacroix, L.R., Hiraki, Y., Reboucas, N.A., Malnic, G.: NHE1, NHE2, and NHE4 contribute to regulation of cell pH in T84 colon cancer cells. *Pflugers Arch* **455**, 799-810 (2008).
118. Battaglino, R.A., Pham, L., Morse, L.R., Vokes, M., Sharma, A., Odgren, P.R., Yang, M., Sasaki, H., Stashenko, P.: NHA-oc/NHA2: a mitochondrial cation-proton antiporter selectively expressed in osteoclasts. *Bone* **42**, 180-192 (2008).
119. Flegelova, H., Haguenaer-Tsapis, R., Sychrova, H.: Heterologous expression of mammalian Na/H antiporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 504-516 (2006).
120. Flegelova, H., Sychrova, H.: Mammalian NHE2 Na⁺/H⁺ exchanger mediates efflux of potassium upon heterologous expression in yeast. *FEBS Lett* **579**, 4733-4738 (2005).
121. Stock, C., Ludwig, F.T., Schwab, A.: Is the multifunctional Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 a potential therapeutic target in cancer? *Curr Med Chem* **19**, 647-660 (2012).
122. Kolacna, L., Zimmermannova, O., Hasenbrink, G., Schwarzer, S., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Sychrova, H.: New phenotypes of functional expression of the mKir2.1 channel in potassium efflux-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* **22**, 1315-1323 (2005).
123. Mokdad-Gargouri, R., Abdelmoula-Soussi, S., Hadiji-Abbes, N., Amor, I.Y., Borchani-Chabchoub, I., Gargouri, A.: Yeasts as a tool for heterologous gene expression. *Methods Mol Biol* **824**, 359-370 (2012).
124. Balagopal, V., Fluch, L., Nissan, T.: Ways and means of eukaryotic mRNA decay. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 593-603 (2012).
125. Jacob, F., Monod, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318-356 (1961).
126. Hampsey, M., Singh, B.N., Ansari, A., Laine, J.P., Krishnamurthy, S.: Control of eukaryotic gene expression: gene loops and transcriptional memory. *Adv Enzyme Regul* **51**, 118-125 (2011).
127. Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Perez-Ortin, J.E., Alepuz, P.: Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* **15**, 1110-1120 (2009).
128. Saito, H., Posas, F.: Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**, 289-318 (2012).
129. Rando, O.J., Winston, F.: Chromatin and transcription in yeast. *Genetics* **190**, 351-387 (2012).
130. de Nadal, E., Posas, F.: Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* **29**, 4-13 (2010).
131. Chang, S.S., Zhang, Z., Liu, Y.: RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu Rev Microbiol* **66**, 305-323 (2012).
132. Harrison, B.R., Yazgan, O., Krebs, J.E.: Life without RNAi: noncoding RNAs and their functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Cell Biol* **87**, 767-779 (2009).
133. Ba, A.N., Moses, A.M.: Evolution of characterized phosphorylation sites in budding yeast. *Mol Biol Evol* **27**, 2027-2037 (2010).
134. Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlshmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., Opekarova, M., Tanner, W.: Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* **183**, 1075-1088 (2008).
135. Mitsui, K., Hatakeyama, K., Matsushita, M., Kanazawa, H.: *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p associates with lipid rafts and requires sphingolipid for stable localization to the plasma membrane. *J Biochem* **145**, 709-720 (2009).

136. Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., Serrano, R.: pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* **25**, 8683-8692 (2005).
137. Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A., Pardo, J.M.: The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 8792-8796 (1994).
138. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O.: Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241-4257 (2000).
139. Vidal, M., Buckley, A.M., Yohn, C., Hoepfner, D.J., Gaber, R.F.: Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of *TRK2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2370-2374 (1995).
140. Portillo, F., Mulet, J.M., Serrano, R.: A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett* **579**, 512-516 (2005).
141. Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R., Yenush, L.: Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol Cell Biol* **27**, 5725-5736 (2007).
142. Perez-Valle, J., Rothe, J., Primo, C., Martinez Pastor, M., Arino, J., Pascual-Ahuir, A., Mulet, J.M., Serrano, R., Yenush, L.: Hal4 and Hal5 protein kinases are required for general control of carbon and nitrogen uptake and metabolism. *Eukaryot Cell* **9**, 1881-1890 (2010).
143. Casado, C., Yenush, L., Melero, C., Ruiz Mdel, C., Serrano, R., Perez-Valle, J., Arino, J., Ramos, J.: Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett* **584**, 2415-2420 (2010).
144. Marquina, M., Gonzalez, A., Barreto, L., Gelis, S., Munoz, I., Ruiz, A., Alvarez, M.C., Ramos, J., Arino, J.: Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin. *Genetics* **190**, 1355-1364 (2012).
145. Ferrando, A., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R.: Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol Cell Biol* **15**, 5470-5481 (1995).
146. Forment, J., Mulet, J.M., Vicente, O., Serrano, R.: The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 36-40 (2002).
147. Erez, O., Kahana, C.: Deletions of *SKY1* or *PTK2* in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Δ trk2Δ* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 1142-1149 (2002).
148. Munson, A.M., Haydon, D.H., Love, S.L., Fell, G.L., Palanivel, V.R., Rosenwald, A.G.: Yeast *ARL1* encodes a regulator of K⁺ influx. *J Cell Sci* **117**, 2309-2320 (2004).
149. Banuelos, M.A., Ruiz, M.C., Jimenez, A., Souciet, J.L., Potier, S., Ramos, J.: Role of the Nha1 antiporter in regulating K⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 9-15 (2002).
150. Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., Ruis, H.: The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J* **13**, 4382-4389 (1994).

151. de Nadal, E., Alepuz, P.M., Posas, F.: Dealing with osmopressure through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**, 735-740 (2002).
152. Marquez, J.A., Serrano, R.: Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* **382**, 89-92 (1996).
153. Berkey, C.D., Carlson, M.: A specific catalytic subunit isoform of protein kinase CK2 is required for phosphorylation of the repressor Nrg1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **50**, 1-10 (2006).
154. Vyas, V.K., Berkey, C.D., Miyao, T., Carlson, M.: Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 1882-1891 (2005).
155. Hermosilla, G.H., Tapia, J.C., Allende, J.E.: Minimal CK2 activity required for yeast growth. *Mol Cell Biochem* **274**, 39-46 (2005).
156. Sajnaga, E., Kubinski, K., Szyszka, R.: Catalytic activity of mutants of yeast protein kinase CK2alpha. *Acta Biochim Pol* **55**, 767-776 (2008).
157. Pickin, K.A., Ezenwajiaku, N., Overcash, H., Sethi, M., Knecht, M.R., Paumi, C.M.: Suppression of Ycf1p function by Cka1p-dependent phosphorylation is attenuated in response to salt stress. *FEMS Yeast Res* **10**, 839-857 (2010).
158. Hibbs, M.A., Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Li, K., Troyanskaya, O.G.: Exploring the functional landscape of gene expression: directed search of large microarray compendia. *Bioinformatics* **23**, 2692-2699 (2007).
159. Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., Arino, J.: The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**, 17249-17255 (2000).
160. Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., Posas, F.: Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**, 1123-1133 (2001).
161. Proft, M., Serrano, R.: Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**, 537-546 (1999).
162. De Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P.M., Sumoy, L., Mas, G., Posas, F.: The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoreponsive genes. *Nature* **427**, 370-374 (2004).
163. Ruiz, A., Gonzalez, A., Garcia-Salcedo, R., Ramos, J., Arino, J.: Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **62**, 263-277 (2006).
164. Denis, V., Cyert, M.S.: Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* **156**, 29-34 (2002).
165. Matsumoto, T.K., Ellsmore, A.J., Cessna, S.G., Low, P.S., Pardo, J.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.: An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 33075-33080 (2002).
166. Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Serrano, R., de Larrinoa, I.F.: Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol Genet Genomics* **265**, 801-811 (2001).
167. Ruiz, A., Arino, J.: Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ENA* sodium ATPase system. *Eukaryot Cell* **6**, 2175-2183 (2007).

168. de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., Arino, J.: The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7357-7362 (1998).
169. Lamb, T.M., Mitchell, A.P.: The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**, 677-686 (2003).
170. Lamb, T.M., Xu, W., Diamond, A., Mitchell, A.P.: Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* **276**, 1850-1856 (2001).
171. Mira, N.P., Lourenco, A.B., Fernandes, A.R., Becker, J.D., Sa-Correia, I.: The *RIM101* pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res* **9**, 202-216 (2009).
172. Alepuz, P.M., Cunningham, K.W., Estruch, F.: Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* **26**, 91-98 (1997).
173. Crespo, J.L., Hall, M.N.: Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 579-591, table of contents (2002).
174. Powers, T., Dilova, I., Chen, C.Y., Wedaman, K.: Yeast TOR signaling: a mechanism for metabolic regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 39-51 (2004).
175. Crespo, J.L., Daicho, K., Ushimaru, T., Hall, M.N.: The GATA transcription factors *GLN3* and *GAT1* link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 34441-34444 (2001).
176. Masuda, C.A., Ramirez, J., Pena, A., Montero-Lomeli, M.: Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the Ser-Thr protein phosphatase *SIT4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 30957-30961 (2000).
177. Manlandro, C.M., Haydon, D.H., Rosenwald, A.G.: Ability of Sit4p to promote K⁺ efflux via Nha1p is modulated by Sap155p and Sap185p. *Eukaryot Cell* **4**, 1041-1049 (2005).
178. Mitsui, K., Ochi, F., Nakamura, N., Doi, Y., Inoue, H., Kanazawa, H.: A novel membrane protein capable of binding the Na⁺/H⁺ antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 12438-12447 (2004).
179. Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., Michnick, S.W.: An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465-1470 (2008).
180. Aitken, A.: 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**, 162-172 (2006).
181. MacKintosh, C.: Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* **381**, 329-342 (2004).
182. Morrison, D.: The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* **19**, 16-23 (2009).
183. Obsilova, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., Obsil, T.: 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res* **57**, S11-21 (2008).
184. van Heusden, G.P.H.: 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* **94**, 287-293 (2009).
185. Kakiuchi, K., Yamauchi, Y., Taoka, M., Iwago, M., Fujita, T., Ito, T., Song, S.Y., Sakai, A., Isobe, T., Ichimura, T.: Proteomic analysis of *in vivo* 14-3-3 interactions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **46**, 7781-7792 (2007).

186. Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Shimizu, H.: Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**, 32-44 (2009).
187. Lehoux, S., Abe, J., Florian, J.A., Berk, B.C.: 14-3-3 Binding to Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchange. *J Biol Chem* **276**, 15794-15800 (2001).
188. Latz, A., Becker, D., Hekman, M., Muller, T., Beyhl, D., Marten, I., Eing, C., Fischer, A., Dunkel, M., Bertl, A., Rapp, U.R., Hedrich, R.: TPK1, a Ca²⁺-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K⁺ channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* **52**, 449-459 (2007).
189. Gnad, F., de Godoy, L.M., Cox, J., Neuhauser, N., Ren, S., Olsen, J.V., Mann, M.: High-accuracy identification and bioinformatic analysis of in vivo protein phosphorylation sites in yeast. *Proteomics* **9**, 4642-4652 (2009).
190. Gnad, F., Ren, S., Cox, J., Olsen, J.V., Macek, B., Oroshi, M., Mann, M.: PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol* **8**, R250 (2007).
191. Gruhler, A., Olsen, J.V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N.J., Mann, M., Jensen, O.N.: Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* **4**, 310-327 (2005).
192. Pham, L., Purcell, P., Morse, L., Stashenko, P., Battaglino, R.A.: Expression analysis of nha-oc/NHA2: a novel gene selectively expressed in osteoclasts. *Gene Expr Patterns* **7**, 846-851 (2007).
193. Rebhan, M., Chalifa-Caspi, V., Prilusky, J., Lancet, D.: GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. *Trends Genet* **13**, 163 (1997).
194. Maresova, L., Hoskova, B., Urbankova, E., Chaloupka, R., Sychrova, H.: New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**, 317-325 (2010).
195. Miesenbock, G., De Angelis, D.A., Rothman, J.E.: Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195 (1998).
196. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805 (1994).