

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

**Úloha  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány  
ve fyziologii kvasinkových buněk**

**Mgr. Klára Papoušková, roz. Velková**

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha 2006

Disertační práce vznikla v Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR v letech 2003 – 2006 za finanční podpory těchto grantových projektů:  
IAA5011407 (2004 – 2007) Úloha přenašečů  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  v buněčné fyziologii – kvasinky jako modelový organismus pro expresi a charakterizaci (poskytnut Grantovou agenturou Akademie věd České republiky),  
LC 531 (2005 – 2009) Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek (poskytnut Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy),  
204/03/H066 (2003 - 2007) Molekulární mechanismy buněčných interakcí (poskytnut Grantovou agenturou České republiky)  
a 206/05/0035 (2005 - 2007) Charakterizace Na/H antiporterů z *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica* (poskytnut Grantovou agenturou České republiky).

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce za odborné vedení a cenné rady, které mi v průběhu vzniku práce poskytovala.

Všem kolegům z laboratoře děkuji za veškerou pomoc a vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

Svým nejbližším děkuji za jejich neustálou podporu.

---

**OBSAH**

1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Transportní systémy pro kationty alkalických kovů modelové kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	10
2.1.1 Systémy zajišťující vstup draselných kationtů do buněk	10
2.1.1.1 Proteiny Trk1 a Trk2	11
2.1.1.2 Nespecifický iontový kanál NSC1	12
2.1.1.3 Fosfátový transportér Pho89p	12
2.1.2 Vnitrobuněčné transportní systémy pro kationty alkalických kovů	13
2.1.2.1 Protein Nhx1	13
2.1.2.2 Protein Kha1	13
2.1.2.3 Mitochondriální přenašeč Mkh1	14
2.1.3 Systémy zajišťující výstup kationtů alkalických kovů z buněk	14
2.1.3.1 Draselný kanál Tok1p	14
2.1.3.2 Na <sup>+</sup> -ATPasy Ena	15
2.1.3.3 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter Nha1p	15
2.2 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery v ostatních kvasinkách	19
2.2.1 Antiporter sod2 kvasinky <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
2.2.2 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery osmotolerantní kvasinky <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	22
2.2.3 Antiporter Cnh1p kvasinky <i>Candida albicans</i>	23
2.2.4 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery kvasinky <i>Pichia sorbitophila</i>	24
2.2.5 Antiporter Nha1 kvasinky <i>Candida tropicalis</i>	24
2.2.6 Dvě podrodiny kvasinkových Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány	24
2.3 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery v bakteriálních, rostlinných a živočišných buňkách	25
2.3.1 Bakteriální Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery	25
2.3.2 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery v rostlinných buňkách	26
2.3.3 Živočišné Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportery typu Nhe	28
2.4 Nekonvenční kvasinky <i>Debaryomyces hansenii</i> a <i>Yarrowia lipolytica</i>	32

---

2.4.1 Osmotolerantní kvasinka <i>D. hansenii</i>	32
2.4.2 Dimorfní kvasinka <i>Y. lipolytica</i>	33
3. CÍLE PRÁCE	35
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	37
4.1 Publikace č. 1 - Studium kvasinkových přenašečů kationtů alkalických kovů: Srovnání sekvencí a struktury	41
4.2 Publikace č. 2 - Gen <i>NHA1</i> kvasinky <i>D. hansenii</i> kóduje přenašeč kationtů alkalických kovů se širokou substrátovou specifitou	42
4.3 Publikace č. 3 - <i>Y. lipolytica</i> obsahuje dva $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery plasmatické membrány s odlišnou funkcí ve fyziologii buňky	43
4.4 Zvýšení tolerance kmenů <i>S. cerevisiae</i> k přítomnosti NaCl v médiu při heterologní expresi genu <i>YINHA2</i>	44
4.4.1 Úvod	44
4.4.2 Materiál a metody	44
4.4.2.1 Použité kvasinkové kmeny, plasmidy a média	44
4.4.2.2 Kapkové testy	45
4.4.3 Výsledky a diskuse	45
4.5 Publikace č. 4 - <i>S. pombe</i> obsahuje dva $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery plasmatické membrány s odlišnou substrátovou specifitou	48
4.6 Měření výstupu kationtů z buněk <i>S. cerevisiae</i> produkujících $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter <i>ZrNha1</i> osmotolerantní kvasinky <i>Z. rouxii</i>	50
4.6.1 Úvod	50
4.6.2 Materiál a metody	51
4.6.2.1 Použitý kvasinkový kmen, plasmidy a médium	51
4.6.2.2 Měření výstupu kationtů z buněk	52
4.6.3 Výsledky a diskuse	52
4.7 Publikace č. 5 - Spolupůsobení osmotického a teplotního stresu vede ke zlepšení růstu buněk <i>D. hansenii</i>	56
4.8 Závěr	57

5. SOUHRN	60
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	63
7. PŘÍLOHY	81
7.1 Seznam použitých zkratk	82
7.2 Seznam autorčiných publikací a rukopisů, na nichž je založena výsledková část disertační práce	84

## **1. ÚVOD**

Živé buňky jsou od svého okolí odděleny plasmatickou membránou, strukturou, jež slouží nejen jako bariéra bránící úniku buněčného obsahu a jeho smíchání s prostředím, ale která zajišťuje také transport živin do buněk, export odpadních látek, nebo komunikaci s okolím. Většinu těchto úloh zajišťují v membráně proteiny působící jako přenašeče, kanály či receptory. Podobnou roli, jakou má plasmatická membrána v životě celé buňky, hrají v eukaryotických buňkách i vnitrobuněčné membrány na úrovni organel; udržují charakteristické rozdíly ve složení a funkci jednotlivých buněčných kompartmentů.

Transport iontů přes membránu je pro buňku velmi důležitý, neboť vnitřní iontové složení buněk je značně odlišné od iontového složení prostředí a tento rozdíl je mimořádně významný pro život a funkce buněk. Ionty nemohou přes membránu procházet samovolně, jejich přenos se děje vždy činností specializovaných proteinů, jejichž aktivita je tak nezbytná pro správné fungování buněčných procesů.

Hlavním cílem této disertační práce bylo přinést více poznatků o možných funkcích  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány ve fyziologii kvasinkových buněk. Tyto proteiny exportují v kvasinkách kationty alkalických kovů vně buňky za současného importu  $\text{H}^+$ . Vzhledem k tomu, že buňky mohou zároveň produkovat různé systémy podílející se na exportu kationtů alkalických kovů, aktivity těchto systémů se mohou překrývat. Často není snadné studovat vlastnosti přenašečů přímo v mateřském organismu, ale s výhodou je možno charakterizovat antiportery při heterologní expresi kódujících genů v buňkách modelové kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tato kvasinka se vyznačuje svou levnou a nenáročnou kultivací, ale především také dostupností metod genového inženýrství, které umožňují snadné manipulace s jejím genomem, jehož kompletní sekvence je známa (GOFFEAU *et al.* 1996). Využití mutovaných kmenů kvasinky *S. cerevisiae*, které postrádají své vlastní systémy pro export kationtů alkalických kovů, je tak ideálním nástrojem pro studium vlastností přenašečů nejen jiných kvasinek, ale i vyšších organismů včetně rostlin a savců (SYCHROVÁ 2004).

Úloha  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány ve fyziologii kvasinkových buněk je jedním z hlavních témat, jimiž se naše laboratoř zabývá. Jak je podrobněji popsáno v kap. 2.2.6 Literárního přehledu, tyto proteiny mohou být podle substrátové specifity rozděleny do dvou podrodin (KINCLOVÁ *et al.* 2002) lišících se svou úlohou v životě buněk. První podrodina antiporterů rozpoznává jako substrát pouze toxické ionty  $\text{Na}^+$  či  $\text{Li}^+$  a její hlavní role tak spočívá v detoxifikaci buněk. Zástupci druhé skupiny kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány transportují kromě toxických kationtů i hlavní vnitrobuněčný kation  $\text{K}^+$ , případně jeho analog  $\text{Rb}^+$ . Fyziologická funkce

---

těchto proteinů se zdá být komplexnější; kromě eliminace toxických iontů z buněk se podílejí i na udržování stabilní vnitrobuněčné koncentrace  $K^+$ , stálého buněčného objemu či pH. Existence zmíněných dvou skupin kvasinkových  $Na^+/H^+$  antiporterů plasmatické membrány tak vyvolává dosud nezodpovězenou otázku, jaká by mohla být primární fyziologická úloha těchto proteinů (eliminace toxických iontů z buněk či komplexnější role s podílem na udržování stálého obsahu draselných kationtů v buňkách, stabilního objemu buněk a pH cytoplasmy). V této disertační práci jsme se pokusili přinést více poznatků o  $Na^+/H^+$  antiporterech plasmatické membrány z fylogeneticky vzdálených, vzájemně nepříbuzných kvasinkových druhů a rozšířit tak naše znalosti o možných úlohách těchto proteinů ve fyziologii kvasinek.

Výsledková a diskusní část disertační práce je prezentována ve formě čtyř prací, které již byly publikovány nebo byly přijaty do tisku, jednoho rukopisu, který byl odeslán k recenznímu řízení, a dále dvou kapitol obsahujících dosud nezveřejněné výsledky a jejich diskusi. Seznam autorčiných publikací a rukopisů, na nichž je založena výsledková část disertace, je uveden jako příloha disertační práce.



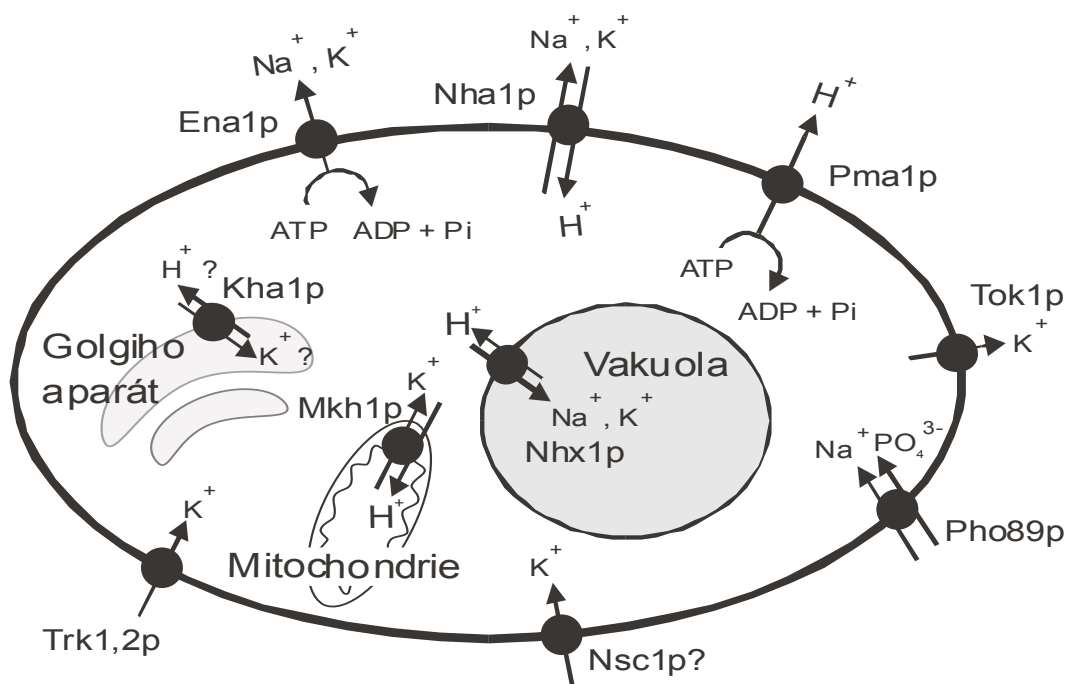
## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## 2.1 Transportní systémy pro kationty alkalických kovů modelové kvasinky *S. cerevisiae*

Udržování vnitrobuněčné iontové homeostáze je pro kvasinkové buňky zcela nezbytné (RODRIGUEZ-NAVARRO 2000, SYCHROVÁ 2004). Optimální cytoplasmatická koncentrace draselných kationtů, jejichž přítomnost je nutná pro mnoho fyziologických procesů, je vyšší, než koncentrace těchto kationtů v mnoha přirozených prostředích. Na druhou stranu, sodné kationty, které se v prostředí nacházejí často ve vysokých koncentracích, jsou pro živé buňky toxické. Jednotlivé kmeny *S. cerevisiae* se sice vzájemně liší svou schopností růst v přítomnosti vysokých koncentrací solí, nicméně obecně je tolerance k  $\text{Na}^+$  u této kvasinky nižší než tolerance ke  $\text{K}^+$  (např. kmen X2180-1B neroste na miskách s minimálním médiem v přítomnosti vyšších koncentrací NaCl než 1M, ale je schopen tolerovat přítomnost 1,5 M KCl, publikace č. 2). Tato rozdílná tolerance buněk *S. cerevisiae* k sodným a draselným kationtům tak dokumentuje toxicitu  $\text{Na}^+$  pro kvasinku. Nachází-li se tedy kvasinková buňka v prostředí s vyšší koncentrací iontů  $\text{Na}^+$ , musí je pro udržení jejich nízké vnitrobuněčné koncentrace aktivně odstraňovat z cytoplasmy. K udržování optimálních koncentrací kationtů alkalických kovů v cytoplasmě využívá modelová kvasinka *S. cerevisiae* rozličné transportní systémy, které budou podrobněji popsány v následujících kapitolách (schematické znázornění těchto systémů je ukázáno na Obr. 1).

### 2.1.1 Systémy zajišťující vstup draselných kationtů do buněk

*S. cerevisiae* obsahuje dva systémy zajišťující specifický vstup draselných kationtů do buňky. Tyto transportéry jsou kódovány geny *TRK1* (GABER *et al.* 1988) a *TRK2* (KO *et al.* 1990). Elektrofyzilogickým měřením byla dále ukázána transportní aktivita pro  $\text{K}^+$  nspecifického kationtového kanálu označovaného jako NSC1 (BIHLER *et al.* 1998). Pro sodné či lithné kationty, jejichž zvýšená vnitrobuněčná koncentrace je pro *S. cerevisiae* toxická, v buňkách žádné specifické systémy zajišťující aktivní import těchto kationtů neexistují, i když sodné kationty mohou do buněk vstupovat po svém koncentračním spádu v kotransportu s fosfátovými anionty díky činnosti přenašeče Pho89p (MARTINEZ a PERSSON 1998).



**Obr. 1:** Schematické znázornění transportních systémů pro kationty alkalických kovů v kvasince *S. cerevisiae*.

### 2.1.1.1 Proteiny Trk1 a Trk2

Trk1p (GABER *et al.* 1988) a Trk2p (KO *et al.* 1990, KO a GABER 1991) jsou vzájemně homologní proteiny transportující draselné kationty do buňky, liší se však transportní kapacitou pro svůj substrát. Protein Trk1 představuje vysokoafinní transportní systém umožňující buňce přežít v prostředí s velmi nízkou (mikromolární) koncentrací  $K^+$  (GABER *et al.* 1988). Buňky postrádající tento systém vyžadují pro svůj růst vyšší (milimolární) koncentrace  $K^+$  v médiu. Za takových podmínek je vstup draselných kationtů do buněk zprostředkován proteinem Trk2 (KO a GABER 1991, RAMOS *et al.* 1994, BERTL *et al.* 2003). Buňky, které mají deletovány oba geny *TRK*, nejsou schopny růst v médiu s koncentrací  $K^+$  nižší než 10 mM. Za přítomnosti vyšších koncentrací draselných kationtů je jejich růst umožněn díky aktivitě nízkoafinních nespecifických systémů (BIHLER *et al.* 1998, MADRID *et al.* 1998).

Kinetické studie ukázaly, že Trk1p obsahuje dvě vazebná místa, která za podmínek hladovění na  $K^+$  vážou s vysokou afinitou dva draselné kationty (HARO a RODRIGUEZ-NAVARRO 2002). Kotransportem dvou kationtů může do buněk vstoupit i  $Na^+$ . Tento

kation má však velmi nízkou afinitu ke druhému vazebnému místu v proteinu Trk1 a je tedy importován do buněk pouze při kritickém poměru  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  společně s kationtem  $\text{K}^+$ .

Specifický import draselných kationtů do buněk *S. cerevisiae* je aktivován nejen hladověním na  $\text{K}^+$ , ale také stresem způsobeným přítomností toxických sodných iontů (RAMOS *et al.* 1990). Aktivita transportérů Trk se zdá být ovlivňována řadou proteinů, především kinas či fosfatas (MENDOZA *et al.* 1994, MULET *et al.* 1999, YENUSH *et al.* 2005).

Elektrofyzilogickou metodou terčíkového zámku bylo také ukázáno, že kromě vstupu  $\text{K}^+$  do buňky mohou transportéry Trk zprostředkovávat i výstup chloridových aniontů z buněk (KURODA *et al.* 2004). Amplituda měřených chloridových proudů závisí na vnitrobuněčné koncentraci  $\text{Cl}^-$  a je silně zvýšena nízkým extracelulárním pH (RIVETTA *et al.* 2005). Podle navrženého modelu procházejí chloridové anionty centrálním pórem vytvořeným v membráně symetrickou agregací čtyř monomerů proteinů Trk (RIVETTA *et al.* 2005).

### 2.1.1.2 Nespecifický iontový kanál NSC1

Existence neselektivního iontového kanálu označovaného jako NSC1 byla prokázána metodou terčíkového zámku (BIHLER *et al.* 1998). Přestože sekvence genomu kvasinky *S. cerevisiae* je známa (GOFFEAU *et al.* 1996), gen kódující tento iontový kanál nebyl doposud nalezen; zdá se, že genom *S. cerevisiae* neobsahuje žádný doposud necharakterizovaný otevřený čtecí rámec, který by mohl kódovat protein příbuzný draselným kanálům z jiných organismů. NSC1 zajišťuje nízkoafinní vstup draselných kationtů do buněk; kromě vstupu  $\text{K}^+$  však může tento systém zprostředkovat import různých jiných kationtů, včetně  $\text{Li}^+$  nebo  $\text{NH}_4^+$  (BIHLER *et al.* 2002). Aktivita NSC1 je inhibována za přítomnosti vápenatých kationtů, případně v médiu s nízkým pH.

### 2.1.1.3 Fosfátový transportér Pho89p

Gen *PHO89* kóduje jeden z vysokoafinních systémů zajišťujících vstup fosfátových aniontů do buněk *S. cerevisiae* (MARTINEZ a PERSSON 1998). Zdrojem energie pro transport fosfátů do buněk je v případě tohoto přenašeče gradient  $\text{Na}^+$  přes plasmatickou membránu, při vstupu fosfátových aniontů tak tedy zároveň dochází i k importu sodných kationtů. Exprese genu *PHO89* je indukována za podmínek hladovění buněk na fosfát,

přenašeč je aktivní především při vyšších hodnotách pH okolí (MARTINEZ a PERSSON 1998) a jeho činnost je možno detekovat hlavně v časně růstové fázi buněk (PATTISON-GRANBERG a PERSSON 2000).

### 2.1.2 Vnitrobuněčné transportní systémy pro kationty alkalických kovů

Vnitrobuněčné systémy transportující kationty alkalických kovů se mohou podílet na jejich sekvestraci do organel. Příkladem je protein Nhx1 (NASS *et al.* 1997) lokalizovaný v prevakuolárních kompartmentech nebo méně charakterizovaný Kha1p (RAMIREZ *et al.* 1998, MAREŠOVÁ a SYCHROVÁ 2005) nacházející se v Golgiho aparátu. Pro export  $K^+$  z mitochondrií je významný protein kódovaný genem *YOL027c* (*MKH1*, FROSCHAUER *et al.* 2005).

#### 2.1.2.1 Protein Nhx1

Gen *NHX1* kóduje  $Na^+/H^+$  antiporter, který se podílí na snižování cytoplasmatické koncentrace  $Na^+$  sekvestrací těchto iontů do vakuoly (NASS *et al.* 1997). Protein nebyl detekován přímo v membráně vakuoly, ale v prevakuolárních kompartmentech, které jsou ekvivalentní živočišným pozdním endosomům (NASS a RAO 1998). Kromě zajištění tolerance buněk k přítomnosti  $Na^+$  je tento vnitrobuněčný antiporter významný také v odpovědi buněk na osmotický šok (NASS a RAO 1999) a podílí se i na sekvestraci draselných kationtů, které jsou jeho dalším substrátem (BRETT *et al.* 2005a). Nhx1p svou činností ovlivňuje pH uvnitř vakuoly i v cytoplasmě a díky svému vlivu na pH uvnitř endosomálních váčků působí na jejich správný pohyb v buňce (BRETT *et al.* 2005a) a tím i na lokalizaci vakuolárních proteinů (BOWERS *et al.* 2000). Význam antiporteru pro pohyb vnitrobuněčných váčků byl dále podpořen zjištěním, že Nhx1p svým C-koncem interaguje s proteinem Gyp6, který aktivuje GTPasovou aktivitu proteinů z rodiny Ypt/Rab (ALI *et al.* 2004). Gyp6p působí jako negativní regulátor Nhx1p.

#### 2.1.2.2 Protein Kha1

Úloha proteinu Kha1p jako antiporteru transportujícího kationty alkalických kovů v jednom směru a protony ve směru opačném byla navržena na základě homologie proteinu s  $Na^+/H^+$  antiporterem NapA z *Enterococcus hirae* (WASER *et al.* 1992) a

proteinem KefC z *Escherichia coli* (MUNRO *et al.* 1991). V prvotní práci zabývající se úlohou Kha1p v buňkách *S. cerevisiae* byla navržena jeho lokalizace v plasmatické membráně buněk a název proteinu byl odvozen z předpokládané funkce jako  $K^+/H^+$  antiporteru (RAMIREZ *et al.* 1998). Nicméně, fluorescenčním značením proteinu Kha1 byla prokázána jeho vnitrobuněčná lokalizace ve středním Golgiho aparátu (FLIS *et al.* 2005) a úloha proteinu ve výstupu  $K^+$  z buněk nebyla potvrzena (MAREŠOVÁ a SYCHROVÁ 2005). Jedinými dvěma fenotypy buněk postrádajících Kha1p potvrzenými zpětným vnesením genu *KHA1* na plasmidu jsou citlivost buněk k vysokému pH média nebo přítomnosti hygromycinu (MAREŠOVÁ a SYCHROVÁ 2005). Fyziologická úloha tohoto proteinu v sekreční dráze buňky by mohla být podobná roli Nhx1p v ovlivnění správného transportu váčků z prevakuolárních kompartmentů do vakuoly.

### 2.1.2.3 Mitochondriální přenašeč Mkh1

Protein Mkh1 je lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně (NOWIKOVSKY *et al.* 2004) a je esenciální pro  $K^+/H^+$  antiport probíhající přes tuto membránu (FROSCHAUER *et al.* 2005). Jeho aktivita je významná pro udržování obsahu  $K^+$  v mitochondriích a objemu této organely (NOWIKOVSKY *et al.* 2004).

### 2.1.3 Systémy zajišťující výstup kationtů alkalických kovů z buněk

Kvasinka *S. cerevisiae* obsahuje tři různé transportní systémy zajišťující výstup kationtů alkalických kovů z buněk. Jedná se o iontový kanál Tok1, specifický pro draselné kationty (KETCHUM *et al.* 1995), a dále dva systémy umožňující kromě výstupu  $K^+$  také aktivní export toxických iontů  $Na^+$  (či  $Li^+$ ): ATPasy Ena (HARO *et al.* 1991) a  $Na^+/H^+$  antiporter Nha1p (PRIOR *et al.* 1996), jemuž bude věnována zvláštní pozornost.

#### 2.1.3.1 Draselný kanál Tok1p

Gen *TOK1* kóduje napětově řízený draselný kanál zprostředkující výstup kationtů z buněk (KETCHUM *et al.* 1995, REID *et al.* 1996, BERTL *et al.* 1998). Tok1p obsahuje dvě domény P (vytvářející pór kanálu), struktury typické pro všechny známé kanály selektivní pro draselné kationty (KETCHUM *et al.* 1995). Kromě napětí je Tok1p ovlivňován také přítomností extracelulárního  $K^+$  (VERGANI *et al.* 1997). Fyziologická

úloha Tok1p zůstává prozatím spíše nejasná. Delece genu *TOK1* neovlivňuje viabilitu buněk, přítomnost funkčního proteinu však zvyšuje citlivost buněk k přítomnosti cesných kationtů za podmínek, kdy není účinný nespecifický systém NSC1 (BERTL *et al.* 2003). Nedávno byl také ukázán význam tohoto proteinu pro udržování membránového potenciálu buněk (MAREŠOVÁ *et al.* 2006).

### 2.1.3.2 Na<sup>+</sup>-ATPasy Ena

Lokus *ENA/PMR2* kóduje Na<sup>+</sup>-ATPasy typu P (HARO *et al.* 1991), využívající k exportu kationtů alkalických kovů z buněk energii získanou štěpením molekul ATP. Počet téměř identických genů v lokusu je závislý na kmeni *S. cerevisiae* (WIELAND *et al.* 1995), přičemž jednotlivé geny *ENA* se liší mírou exprese (GARCIADÉBLAS *et al.* 1993). Gen *ENAI* je indukován přítomností sodných kationtů v médiu nebo vysokým extracelulárním pH (GARCIADÉBLAS *et al.* 1993, MARQUEZ a SERRANO 1996, SERRANO *et al.* 2002). Indukce genu v přítomnosti Na<sup>+</sup> je závislá jednak na dráze zahrnující fosfatasu kalcineurin, zároveň je však Ena1p i jedním ze systémů podílejících se na odpovědi buněk na osmotický šok díky indukci exprese genu *ENAI* kinasou Hog1 (MARQUEZ a SERRANO 1996). Ena1p umožňuje především růst buněk v přítomnosti Na<sup>+</sup> nebo K<sup>+</sup> v médiích o vyšším pH a jeho funkce je tak komplementární s Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterem Nha1p (BAÑUELOS *et al.* 1998, kap. 2.1.3.3).

### 2.1.3.3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1p

Gen *NHA1* byl izolován z genomové knihovny *S. cerevisiae* na základě schopnosti kódovaného proteinu zlepšit růst kmene citlivého k přítomnosti solí po přidání NaCl do média (PRIOR *et al.* 1996). Gen kóduje Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter tvořený řetězcem 985 aminokyselinových zbytků. Nha1p je lokalizován v plasmatické membráně (KINCLOVÁ *et al.* 2001a), kde zprostředkovává výstup kationtů alkalických kovů z buněk; zdrojem energie pro export kationtů je gradient protonů vytvářený činností H<sup>+</sup>-ATPasy Pma1. Substrátová specifita proteinu je široká; Nha1p exportuje z buněk sodné, lithné, draselné i rubidné kationty (BAÑUELOS *et al.* 1998, KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Díky závislosti funkce Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru na přítomnosti elektrochemického gradientu H<sup>+</sup> přes plasmatickou membránu se Nha1p podílí na halotoleranci buněk především v prostředích s nízkým pH (BAÑUELOS *et al.* 1998). Nicméně, exprese genu *NHA1* je konstitutivní a

nížká, není tedy, na rozdíl od exprese genů *ENA* kódujících ATPasy, indukována přítomností solí v médiu (BAÑUELOS *et al.* 1998).

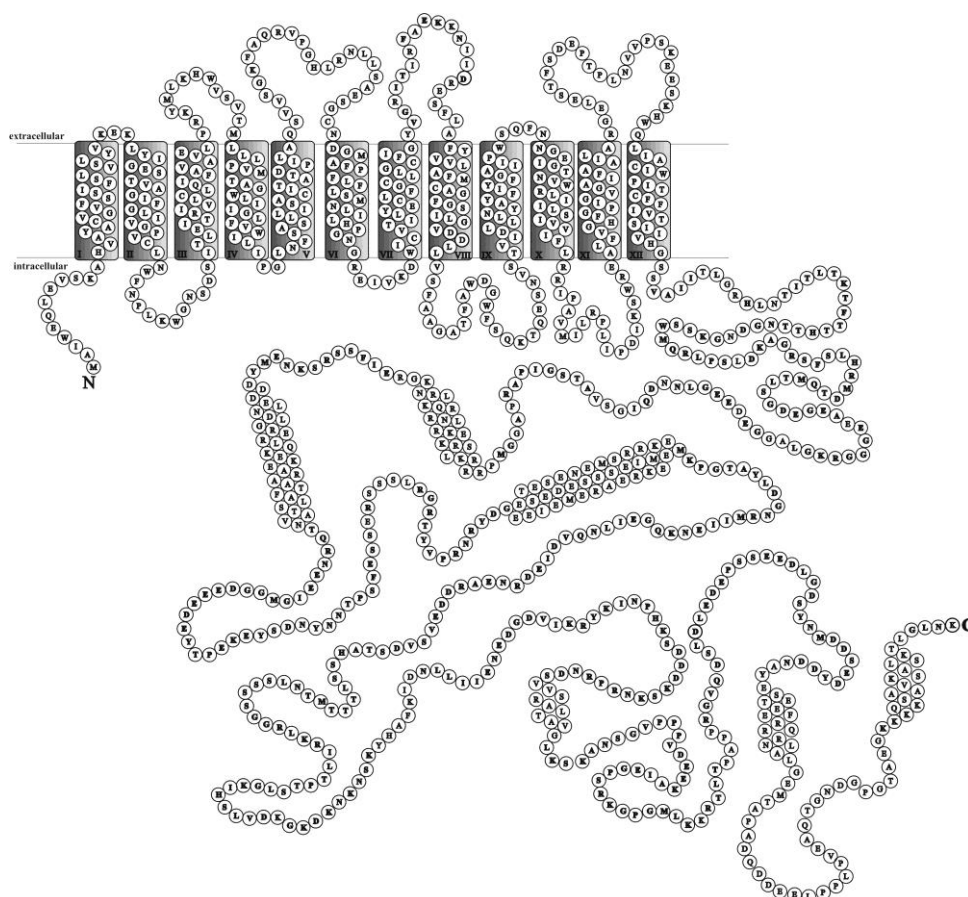
Podobně jako vnitrobuněčný antiporter *Nhx1p*, účastní se i *Nha1p* regulace cytoplasmatického pH. Kmeny postrádající *Nha1p* mají vyšší vnitrobuněčné pH než kmeny s funkčním proteinem (SYCHROVÁ *et al.* 1999). Kromě toho, *Nha1p* by mohl fungovat jako jakási pojistka pro udržení stabilního pH cytoplasmy v případě její náhlé alkalizace. Buňky produkující jako jediný systém zajišťující výstup kationtů alkalických kovů *Nha1p* inkubované v pufru o pH 8,0 nevykazují velký výstup  $K^+$ , souhlasně se závislostí funkce proteinu na nízkém pH prostředí. Dojde-li ale za těchto podmínek k alkalizaci cytoplasmy, *Nha1p* zprostředkuje rychlý výstup draselných kationtů a zároveň tedy i vtok protonů do buněk (BAÑUELOS *et al.* 1998, KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Úloha *Nha1p* ve fyziologii kvasinky se tedy zdá poněkud komplexnější než pouze podíl na halotoleranci buněk; kromě zvyšování tolerance k solím v prostředích s nízkým pH může *Nha1p* hrát roli v udržování stabilního vnitrobuněčného obsahu  $K^+$ , buněčného objemu a cytoplasmatického pH (KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Svou činností také *Nha1p* ovlivňuje membránový potenciál buněk, nadprodukce proteinu způsobuje hyperpolarizaci plasmatické membrány (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2006a).

Studie funkce nově syntetizovaného proteinu *Nha1* v izolovaných sekrečních vácích ukázaly, že antiport zprostředkovaný tímto proteinem je elektrogenní, dochází k transportu většího počtu protonů proti jednomu sodnému kationtu (OHGAKI *et al.* 2005).

*Nha1p* je typickým membránovým proteinem tvořeným, podle modelu založeného na sledování jeho hydropatického profilu (KINCLOVÁ *et al.* 2001a, Obr. 2), krátkým cytoplasmatickým N-koncem (12 aa), 12 transmembránovými segmenty propojenými krátkými hydrofilními smyčkami (dohromady 419 aa) a velmi dlouhým hydrofilním C-koncem (554 aa).

Úloha C-konce proteinu není doposud zcela objasněna. Zkrácení proteinu na 472 aminokyselin (tedy zkrácení C-konce *Nha1p* na 41 aminokyselin podle Obr. 2) neovlivňuje lokalizaci proteinu v plasmatické membráně, ani jeho schopnost exportovat kationty a nemá vliv na substrátovou specifitu proteinu (KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Pro lokalizaci i aktivitu *Nha1p* se však zdá být důležitá část C-konce proteinu bezprostředně následující za 12. transmembránovým segmentem (viz dále, MITSUI *et al.* 2004a).





**Obr. 2:** Struktura proteinu Nha1 kvasinky *S. cerevisiae*. Převzato z KINCLOVÁ *et al.* 2001a.

Postupné zkracování C-konce Nha1p ukázalo, že tento úsek proteinu by se mohl podílet na regulaci transportní aktivity Nha1p (KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Odstranění 70 aminokyselinových zbytků od konce proteinu (tedy zkrácení Nha1p na 915 aminokyselin) zlepšuje toleranci buněk k  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  a  $\text{Rb}^+$ . Koncová oblast antiporteru má tedy zřejmě schopnost „inhibovat“ maximální aktivitu Nha1p. Přítomnost aminokyselinových zbytků 883-928 je naopak nezbytná pro maximální schopnost Nha1p transportovat toxické lithné a sodné kationty. V případě draselných kationtů se zdá, že přítomnost C-konce Nha1p může ovlivnit vnitrobuněčný obsah  $\text{K}^+$ .

Srovnání sekvence Nha1p se sekvencemi homologních antiporterů z několika druhů kvasinek a *Aspergillus nidulans* odhalilo přítomnost 6 konzervovaných domén v C-konci proteinu, označovaných C1 – C6 (KAMAUCHI *et al.* 2002). Oblast C1 (nacházející se na začátku C-koncové části Nha1p, bezprostředně za posledním transmembránovým segmentem) je významná nejen pro správnou lokalizaci proteinu, ale má zřejmě vliv i na

transportní aktivitu Nha1p (MITSUI *et al.* 2004a). Peptid obsahující domény C1 a C2 C-koncové části Nha1p interaguje s nově identifikovaným membránovým proteinem Cos3 (MITSUI *et al.* 2004b). V buňkách produkujících Nha1p vede nadprodukce Cos3p ke zvýšení tolerance k solím, Cos3p by tedy mohl působit jako pozitivní regulátor transportní aktivity proteinu Nha1.

C-konec Nha1p je však také významný v odpovědi buněk na osmotický šok (KINCLOVÁ *et al.* 2001a, KINCLOVÁ-ZIMMERMANNNOVÁ a SYCHROVÁ 2006). Při vystavení buněk hyperosmotickému šoku dojde nejprve k mobilizaci systémů zabraňujících ztrátě iontů z buněk a tím také ztrátě vody. Během adaptace na stresové podmínky pak dochází k akumulaci kompatibilních sloučenin, např. glycerolu. Jednou z prvních odpovědí buněk na osmotický stres je fosforylace C-konce Nha1p kinasou Hog1 (PROFT a STRUHL 2004). Není-li přítomen C-konec proteinu (a nemůže tedy podléhat fosforylaci), Nha1p po vystavení buněk hyperosmotickému šoku (způsobenému přítomností sorbitolu v médiu) exportuje  $K^+$ , snižuje vnitrobuněčnou osmolaritu a činí tak buňky citlivými k přítomnosti sorbitolu. Obsahují-li buňky Nha1p plné délky, aktivita proteinu je při hyperosmotickém šoku zřejmě v důsledku fosforylace snížena, nedochází ke ztrátě draselných kationtů z buněk a ty se lépe vyrovnávají se zvýšeným osmotickým tlakem v prostředí (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNNOVÁ a SYCHROVÁ 2006).

Dále byla ukázána role Nha1p a jeho dlouhého C-konce v regulaci buněčného cyklu (SIMÓN *et al.* 2001). Nadprodukce Nha1p je totiž schopna překonat blok buněk postrádajících proteiny Sit4 a Hal3 (regulující průchod buněčným cyklem) v přechodu z fáze G1 do fáze S. Tato schopnost proteinu Nha1 je nezávislá na schopnosti transportovat kationty a vyžaduje přítomnost poměrně velkého úseku C-konce proteinu (aminokyselinových zbytků 800 až 948). Většina aminokyselinových zbytků důležitých pro zmíněný proces byla podrobněji lokalizována především do dvou oblastí C-konce proteinu (mezi zbytky 869 až 876 a 918 až 927, SIMÓN *et al.* 2003), které však nekorespondují se žádnou ze šesti konzervovaných domén C-konce proteinu zmíněných výše.

Struktura proteinu Nha1 není známa, nicméně předpokládá se, že by mohla být podobná struktuře bakteriálního proteinu NhaA, který je doposud jediným krystalizovaným  $Na^+/H^+$  antiporterem (WILLIAMS 2000, kap. 2.3.1). V plasmatické membráně se Nha1p pravděpodobně nachází jako dimer, který může být vytvářen již v endoplasmatickém retikulu na počátku sekreční dráhy (MITSUI *et al.* 2005). Oligomerizace proteinu se zdá být významná pro jeho transportní aktivitu.

Předpokládá se, že pro vazbu a transport kationtů alkalických kovů a případně protonů antiportery jsou významné především nabitě aminokyselinové zbytky, které jsou lokalizovány v jinak hydrofobních transmembránových segmentech proteinů (DIBROV a FLIEGEL 1998). Některé z těchto aminokyselinových zbytků jsou konzervované nejen mezi homologními kvasinkovými antiportery, ale podobné aminokyselinové motivy je možno nalézt i v sekvencích bakteriálních antiporterů. Cílená mutagenese některých takových zbytků prokázala jejich význam pro funkčnost těchto proteinů v bakteriích a následně i v kvasinkách (INOUE *et al.* 1995, DIBROV *et al.* 1998, SOONG *et al.* 2000). V případě proteinu Nha1 kvasinky *S. cerevisiae* mutagenese konzervovaných záporně nabitých aminokyselinových zbytků nacházejících se v 8. transmembránovém segmentu odhalila, že mutovaný protein obsahující místo aspartátu 266 (případně i 267) asparagin je schopen zprostředkovat výstup draselných, nikoli však sodných kationtů z buněk (SIMÓN *et al.* 2001, OHGAKI *et al.* 2005). Tyto aminokyselinové zbytky jsou tedy zřejmě významné pro vazbu Na<sup>+</sup>. Naopak, mutace Asp241 na Asn postihuje schopnost Nha1p exportovat K<sup>+</sup>, ale nikoli Na<sup>+</sup> (SIMÓN *et al.* 2001). Náhodnou anebo cílenou mutagenesí nalezené verze proteinu obsahující záměny Ser27 na Tyr, Asp145 na Asn, Asp226 na Asn nebo Ser433 na Ala nejsou schopny udělit halosensitivním buňkám zvýšenou toleranci k NaCl (MITSUI *et al.* 2005). Mutovaný protein se záměnou Asp145 na Asn není lokalizovaný v plasmatické membráně buněk, ale je zadržován uvnitř buňky. Aspartátový zbytek 145 by se mohl účastnit dimerizace proteinu Nha1 (MITSUI *et al.* 2005). Mutace konzervovaného prolinového zbytku 146 na serin snižuje schopnost antiporteru exportovat sodné i draselné kationty (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNNOVÁ *et al.* 2005, viz také kap. 2.2.2).

## 2.2 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery v ostatních kvasinkách

Geny kódující proteiny homologní k antiporterům Nha1, Nhx1 nebo Kha1 kvasinky *S. cerevisiae* byly nalezeny i v sekvencích genomů jiných kvasinek. Vzhledem k tomu, že funkčně byly doposud charakterizovány pouze antiportery homologní k proteinu ScNha1p, budou následující kapitoly věnovány právě těmto proteinům.

Geny homologní k *ScNHAI* byly nalezeny ve všech doposud sekvenovaných kvasinkových genomech. Antiportery typu Nha1 se tak zdají být evolučně konzervovanými kvasinkovými proteiny s významnou úlohou ve fyziologii buněk. Jak

ukazují Tab. 1 a 2, antiportery z jednotlivých kvasinkových druhů se liší nejen délkou a sekvencí, ale i substrátovou specifitou. Rozdíly délek jsou patrné především v C-koncových oblastech proteinů, které jsou také velice sekvenčně variabilní. Sekvenční identita celých proteinů (včetně C-konců) je vždy nižší než identita více konzervovaných transmembránových úseků (transmembránových segmentů spojených navzájem smyčkami) antiporterů. V následujících kapitolách budou shrnuty poznatky o doposud charakterizovaných antiporterech z jiných druhů kvasinek než *S. cerevisiae*.

**Tab. 1** Struktura kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány

Kvasinka	Antiporter	Substrátová specifita	Počet aminokyselinových zbytků			
			Celý protein	N-konec	TMS	C-konec
<i>S. cerevisiae</i>	Nha1p	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup>	985	12	419	554
<i>C. albicans</i>	Cnh1p	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup>	800	11	419	370
<i>Z. rouxii</i>	Sod2-22p	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>	806	11	418	377
<i>S. pombe</i>	sod2p	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup>	468	11	414	43

TMS – 12 transmembránových segmentů spojených hydrofilními smyčkami

Údaje převzaty z KINCLOVÁ *et al.* 2002.

**Tab. 2** Sekvenční identita kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány

Antiporter	Identita (%) <b>celých proteinů</b> / transmembránových částí proteinů*			
	ScNha1p	CaCnh1p	ZrSod2-22p	Spsod2p
ScNha1p	100	<b>53,9</b> / 69,3	<b>57,7</b> / 76,7	<b>41,1</b> / 43,5
CaCnh1p	<b>53,9</b> / 69,3	100	<b>50,2</b> / 65,6	<b>43,8</b> / 44,8
ZrSod2-22p	<b>57,7</b> / 76,7	<b>50,2</b> / 65,6	100	<b>42,1</b> / 44,0
Spsod2p	<b>41,1</b> / 43,5	<b>43,8</b> / 44,8	<b>42,1</b> / 44,0	100

\*Transmembránové části proteinů jsou tvořeny 12 transmembránovými segmenty a spojujícími hydrofilními smyčkami

Údaje převzaty z KINCLOVÁ *et al.* 2002.

### 2.2.1 Antiporter sod2 kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*

Antiporter sod2 příčně se dělicí kvasinky *S. pombe* byl prvním popsáním kvasinkovým Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterem plasmatické membrány (JIA *et al.* 1992). Protein o délce 468 aminokyselinových zbytků byl nalezen díky své schopnosti zvýšit toleranci buněk *S. pombe* k toxickým lithným kationtům. Jejich přítomnost vede v genomu *S. pombe* k amplifikaci genu *sod2*. Podrobnější studie mechanismu amplifikace genu *sod2* ukázaly, že v přítomnosti Li<sup>+</sup> vznikají především lineární extrachromosomální amplikony o délce 180 nebo 225 kbp (PATTERSON *et al.* 1999, ALBRECHT *et al.* 2000). Tyto amplikony obsahují sekvence telomer a stabilní jsou jen za přítomnosti selekčního tlaku vyvolaného Li<sup>+</sup>. Disrupce genu *sod2* snižuje kromě tolerance k Li<sup>+</sup> také toleranci buněk *S. pombe* k přítomnosti Na<sup>+</sup>. Na rozdíl od proteinu ScNha1 popsaného v kap. 2.1.3.3 sod2p zřejmě neexportuje z buněk K<sup>+</sup>. Lokalizace proteinu v plasmatické membráně buněk byla ověřena imunocytochemicky (DIBROV *et al.* 1997) a značením proteinu pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (FLIEGEL *et al.* 2005). Sod2p byl detekován kromě plasmatické membrány také v perinukleárním kompartmentu a dalším doposud blíže necharakterizovaném vnitrobuněčném membránovém systému, který by mohl představovat část endoplasmatického retikula.

Cílená mutagenese konzervovaných nabitých aminokyselinových zbytků v sekvenci antiporteru sod2 umožnila nalezení některých aminokyselin nezbytných pro správnou funkci tohoto proteinu (DIBROV *et al.* 1998, WIEBE *et al.* 2003, FLIEGEL 2005). Jedná se především o nabité aminokyselinové zbytky, které jsou lokalizovány v jinak hydrofobních transmembránových segmentech proteinu, u nichž je tedy pravděpodobná úloha ve vazbě a transportu substrátů antiporteru (DIBROV a FLIEGEL 1998, viz také kap. 2.1.3.3). Jako kritické pro správnou funkci sod2p se ukázaly zbytky Asp145, 266, 267 a Glu173. Současná mutace konzervovaného páru zbytků kyseliny asparagové (Asp266 a 267) zcela znemožňuje funkci antiporteru a ani přítomnost jiné záporně nabité aminokyseliny (kyseliny glutamové) v těchto místech proteinu jeho funkci neobnoví. Asp241 není pro funkci sod2 zcela nezbytný, jeho přítomnost však podporuje plnou aktivitu proteinu. Pro ovlivnění aktivity bakteriálního Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru NhaA v závislosti na pH je významný kromě jiných aminokyselinových zbytků i His225 (GERCHMAN *et al.* 1993, kap. 2.3.1). Cílená mutagenese všech histidinových zbytků v proteinu sod2 odhalila, že podobnou úlohu „sensoru pH“ hraje v tomto antiporteru aminokyselinový zbytek His367 (DIBROV *et al.* 1998).

Vlastnosti proteinu *sod2* byly také studovány po heterologní expresi genu *sod2* v buňkách *S. cerevisiae* (HAHNENBERGER *et al.* 1996, KINCLOVÁ *et al.* 2002). Sod2p je nejkratším dosud známým kvasinkovým antiporterem typu Nha1, především téměř postrádá C-koncovou část proteinu, jejíž délka je mezi jednotlivými antiportery z různých druhů velmi variabilní (Tab. 1). Jeho substrátová specifita je i v buňkách *S. cerevisiae* úzká, protein exportuje pouze  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$ . Srovnání funkce *sod2p* s antiportery z jiných kvasinkových druhů produkovanými za stejných podmínek v buňkách *S. cerevisiae* citlivých k přítomnosti solí (*ena1-4Δ nha1Δ*, KINCLOVÁ *et al.* 2002) odhalilo, že funkce *sod2p* je nejvíce závislá na pH prostředí, v němž se buňky nachází (jeho schopnost udílet buňkám vyšší toleranci k solím výrazně klesá při zvýšení extracelulárního pH), a transport zprostředkovaný tímto systémem je velmi pomalý.

### 2.2.2 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery osmotolerantní kvasinky *Zygosaccharomyces rouxii*

*Z. rouxii* je haploidní kvasinka schopná růst v prostředí s vysokou koncentrací solí. V této kvasince byl nejprve nalezen gen *ZSOD2* (WATANABE *et al.* 1995) kódující  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter; disrupce genu vedla v buňkách *Z. rouxii* ke snížení tolerance vůči NaCl. Ve stejném kmeni *Z. rouxii* (ATCC 42981) byl nalezen gen *ZSOD22*, homologní s dříve charakterizovaným *ZSOD2* (IWAKI *et al.* 1998). Geny kódují proteiny s vysokou sekvenční identitou (81 %). Oba geny byly izolovány a heterologně exprimovány v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících  $\text{Na}^+$ -ATPasy *Ena*, kde zvyšovaly toleranci buněk k sodným a lithným kationtům. Nicméně, skutečnost, že disrupce genu *ZSOD22* v *Z. rouxii* nevedla ke snížení tolerance buněk k solím, a neschopnost detekovat v buňkách mRNA kódující *ZSod22p* vedly autory k závěru, že gen *ZSOD22* je v kmeni *Z. rouxii* ATCC 42981 pravděpodobně transkribován velmi málo, případně vůbec ne.

Počet kopií genu kódujícího  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter v *Z. rouxii* je závislý na studovaném kmeni (KINCLOVÁ *et al.* 2001b). Kmen CBS 732 obsahuje pouze jeden gen homologní k *ZSOD2* a *ZSOD22*, označený jako *ZrSOD2-22*. Tento gen je velmi podobný genu *ZSOD2*, obsahuje však úsek 15 aminokyselinových zbytků, který byl nalezen v genu *ZSOD22*. Protein *ZrSod2-22p* produkovaný v halosensitivních buňkách *S. cerevisiae* velmi účinně zvyšuje toleranci buněk k sodným a lithným kationtům, nemá však vliv na růst buněk v přítomnosti  $\text{K}^+$  nebo  $\text{Rb}^+$  (KINCLOVÁ *et al.* 2001b, KINCLOVÁ *et al.* 2002).

Snaha nalézt aminokyselinové zbytky, jež by mohly být zodpovědné za determinaci substrátové specifity antiporterů, vedla k identifikaci Pro145 proteinu *ZrSod2-22*

(nacházejícího se v páté transmembránové doméně proteinu a konzervovaného v sekvencích kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů) jako velmi důležité aminokyseliny pro správné fungování i substrátovou specifitu antiporteru (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2005). Záměna prolinu za aminokyselinu obsahující hydroxylovou skupinu (Ser, Thr) rozšiřuje substrátovou specifitu proteinu pro  $\text{K}^+$ . Je-li na místě Pro145 přítomen glycin, aktivita antiporteru se výrazně snižuje a záměna prolinu za aminokyselinu s nabitým postranním řetězcem zcela ruší funkčnost *ZrSod2-22p*. Tato studie proteinu *ZrSod2-22* tak poprvé ukázala, že i aminokyselinové zbytky bez náboje v postranním řetězci hrají významnou roli ve správné funkci a případně substrátové specifitě kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů. Kromě prolinového zbytku 145 mají na substrátovou specifitu antiporteru vliv i další aminokyseliny páté transmembránové domény, jmenovitě ty, které obsahují v postranním řetězci hydroxylovou skupinu (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2006b).

### 2.2.3 Antiporter Cnh1p kvasinky *Candida albicans*

V patogenní kvasince *C. albicans* byl gen kódující  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter plasmatické membrány nazván *CNHI* (SOONG *et al.* 2000). Delece obou alel genu vedla v diploidní kvasince ke změně povrchu kolonií z hladkých na drsné a ke zvýšenému výskytu prodloužených buněk v koloniích za podmínek, kdy kmen s funkčním genem *CNHI* upřednostňuje kvasinkový růst. Delece *CNHI* dále způsobila prodloužení doby zdvojení buněk *C. albicans*, ale neměla velký vliv na toleranci buněk k  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Li}^+$  v médiu. Důsledkem pomalejšího růstu mutovaného kmene je pravděpodobně také lepší přežívání myši infikovaných kmenem postrádajícím obě alely *CNHI* v porovnání se zvířaty infikovanými kmenem s funkčním proteinem.

Vlastnosti Cnh1p byly také studovány po heterologní expresi *CNHI* v halosensitivních buňkách *S. cerevisiae* (SOONG *et al.* 2000, KINCLOVÁ *et al.* 2001c). Podobně jako *ScNha1p*,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter *C. albicans* má širokou substrátovou specifitu, je schopen transportovat  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Rb}^+$ . Mutace konzervovaného páru zbytků kyseliny asparagové (Asp310 a 311) na asparaginové zbytky vedla, stejně jako v případě *sod2p* kvasinky *S. pombe*, ke ztrátě funkčnosti proteinu (SOONG *et al.* 2000). Lokalizace Cnh1p v plasmatické membráně buněk *S. cerevisiae* byla ověřena sledováním lokalizace fúzního proteinu Cnh1-GFP (KINCLOVÁ *et al.* 2001c).

### 2.2.4 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery kvasinky *Pichia sorbitophila*

Dvě alely genu *NHA1* (označované jako *PsNHA1* a *PsNHA2*) byly izolovány z diploidní osmotolerantní kvasinky *P. sorbitophila* (BAÑUELOS *et al.* 2002). Sekvence obou alel si jsou vzájemně velmi podobné (sekvenční identita 91 %), kódované proteiny jsou nejpříbuznější antiporteru Cnh1 z kvasinky *C. albicans*. Oba proteiny byly studovány po heterologní expresi v halosensitivních buňkách *S. cerevisiae*, z nichž byly schopny exportovat Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>. Zvýšení tolerance buněk *S. cerevisiae* k Li<sup>+</sup> bylo pozorováno pouze v případě exprese genu *PsNHA1*; tento výsledek by mohl naznačovat, že protein *PsNha2* nerozpoznává lithné kationty jako svůj substrát.

### 2.2.5 Antiporter Nha1 kvasinky *Candida tropicalis*

Heterologní exprese genu *NHA1* kvasinky *C. tropicalis* v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících vlastní systémy pro export kationtů alkalických kovů zvyšuje toleranci buněk k sodným, lithným i draselným kationtům (KAMAUCHI *et al.* 2002). Byl také studován vliv konzervovaných domén C- konce (nalezených srovnáním sekvence *ScNha1p* se sekvencemi homologních antiporterů z několika druhů kvasinek a *A. nidulans*, domény C1 – C6, viz kap. 2.1.3.3) na aktivitu proteinu. Některé z těchto oblastí mají zřejmě inhibiční vliv na aktivitu proteinu, jiné pravděpodobně přispívají k aktivaci *CtNha1p*. Oblast C1 (první z těchto domén, následuje za 12. transmembránovým segmentem, viz také kap. 2.1.3.3) se, podobně jako v případě proteinu *ScNha1*, ukázala být pro aktivitu antiporteru jako nezbytná (KAMAUCHI *et al.* 2002).

### 2.2.6 Dvě podrodiny kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány

Charakterizace Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány z rozličných kvasinkových druhů a srovnání jejich vlastností ukázaly, že podle substrátové specifity je možno tyto proteiny rozdělit do dvou podrodin (KINCLOVÁ *et al.* 2002). První podrodina je zastoupena proteiny *ZrSod2-22* a *Spsod2*, které rozpoznávají jako substrát pouze sodné a lithné kationty, tedy ionty ve vyšší koncentraci pro buňky toxické. Hlavní úloha těchto antiporterů ve fyziologii kvasinek spočívá zřejmě v detoxifikaci buněk. Druhá skupina antiporterů (*ScNha1p*, *CaCnh1p*, *PsNha1p*, *CtNha1p*) má širokou substrátovou specifitu a



kromě toxických kationtů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  je schopna z buněk exportovat i hlavní vnitrobuněčný kation  $\text{K}^+$ , případně jeho analog  $\text{Rb}^+$ . Úloha takových proteinů ve fyziologii buněk je zřejmě komplexnější; kromě podílu na odstraňování toxických iontů z cytoplasmy hrají tyto antiportery pravděpodobně roli i v udržování optimální vnitrobuněčné koncentrace  $\text{K}^+$ , buněčného objemu a stálého pH cytoplasmy (KINCLOVÁ *et al.* 2002). Jak je vidět z údajů v Tab. 2, rozdělení antiporterů do dvou podrodin nesouvisí s jejich sekvenční podobností; ZrSod2-22p je z proteinů uvedených v Tab. 2 nejpříbuznější s antiporterem z kvasinky *S. cerevisiae*, podle substrátové specifity ale oba proteiny spadají do odlišných skupin.

## 2.3 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery v bakteriálních, rostlinných a živočišných buňkách

Antiportery zajišťující výměnu sodných kationtů za protony se zdají být konzervované ve všech organismech (BRETT *et al.* 2005b). Tyto proteiny se účastní svou činností v buňkách různých fyziologických procesů, jako je kontrola buněčného cyklu a proliferace, transepiteliální pohyb sodných kationtů, tolerance k solím anebo transport vnitrobuněčných váčků. V savčích organismech je dysfunkce  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů spojena s takovými patofyziologickými stavy jako hypertenze, epilepsie nebo onemocnění ledvin či trávicího traktu. V následujících kapitolách budou zmíněni alespoň někteří ze zástupců široké rodiny  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů nacházejících se v bakteriálních, rostlinných nebo živočišných buňkách, kteří podle rozsáhlé fylogenetické studie (BRETT *et al.* 2005b) patří, stejně jako proteiny Nha1, Nhx1 nebo Kha1 kvasinky *S. cerevisiae*, do skupiny transportních proteinů CPA1 nebo CPA2 (Cation Proton Antiporter, CHANG *et al.* 2004).

### 2.3.1 Bakteriální $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery

Dobře charakterizovanou skupinou bakteriálních proteinů zajišťujících výměnu  $\text{Na}^+$  (případně  $\text{Li}^+$ ) kationtů za protony jsou antiportery typu NhaA (PADAN a SCHULDINER 1994, PADAN *et al.* 2004). NhaA hraje v buňkách bakterie *Escherichia coli* významnou roli při růstu v prostředí s vysokou koncentrací solí, případně také v alkalickém pH. Transport zprostředkovaný antiporterem NhaA je elektrogení, se stechiometrií 1  $\text{Na}^+$  / 2  $\text{H}^+$  (TAGLICHT *et al.* 1993). Rychlost transportu je závislá na pH; při hodnotách pH nižších než 6,5 je funkce proteinu pozastavena a maximální aktivity dosahuje NhaA při pH

8,5. Zdá se, že při zvýšení cytoplasmatického pH dochází ke konformačním změnám v oblasti vnitrobuněčně lokalizovaného „sensoru pH“, který je částí molekuly antiporteru, a následně k aktivaci proteinu (PADAN *et al.* 2004, HUNTE *et al.* 2005). Protein NhaA bakterie *E. coli* je doposud jediným  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterem, který se podařilo krystalizovat, a byla tak popsána jeho struktura. Detailní studie topologie a krystalové struktury antiporteru (ROTHMAN *et al.* 1996, WILLIAMS 2000, HUNTE *et al.* 2005) odhalily, že *EcNhaA* je tvořen 12 transmembránovými helixy a v membránách buněk se protein nachází jako oligomer (GERCHMAN *et al.* 2001). Pro správnou funkci antiporteru jsou důležité nabitě aminokyselinové zbytky jako např. Asp133, 163 a 164 (INOUE *et al.* 1995) i aminokyseliny bez náboje v postranním řetězci, jako Pro129 a Thr132 (GALILI *et al.* 2002). Pro regulaci aktivity proteinu vnitrobuněčným pH jsou významné např. aminokyselinové zbytky His225, Ala127 a Gly338 (GERCHMAN *et al.* 1993, OLAMI *et al.* 1997, RIMON *et al.* 1998, GALILI *et al.* 2002).

Bakteriální antiporter NhaP byl původně nalezen v *Pseudomonas aeruginosa* (UTSUGI *et al.* 1998) a je představitelem další skupiny bakteriálních  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů. Přenašeče z rodiny NhaP zajišťují v buňkách výměnu  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Li}^+$  kationtů za protony (HAMADA *et al.* 2001, HELLMER *et al.* 2002) a i funkce těchto antiporterů je závislá na pH prostředí. Mnohé bakteriální druhy obsahují několik rozdílných izoform těchto proteinů, jako např. *Methanococcus janaschii* (představitel archeí), jehož genom obsahuje dva geny kódující proteiny *MjNhaP1* a *MjNhaP2* (HELLMER *et al.* 2002).

Další skupinu bakteriálních proteinů řazených na základě příbuznosti do skupiny  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů představují např. proteiny KefB a KefC z *E. coli*. Tyto systémy zajišťují výstup draselných kationtů z buněk a snížení vnitrobuněčného pH v přítomnosti toxických látek jako methylglyoxal a jejich funkce je řízena glutathionem (FERGUSON *et al.* 1998).

### 2.3.2 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery v rostlinných buňkách

V genomových sekvencích rostlin byla nalezena řada genů kódujících proteiny příbuzné  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterům jiných organismů. Na základě podobnosti sekvencí je možno rozdělit tyto proteiny do několika skupin.

Gen *SOS1* (Salt Overly Sensitive, SHI *et al.* 2000) nalezený v genomu *Arabidopsis thaliana* kóduje  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter lokalizovaný v plasmatické membráně rostlinných buněk. Protein je schopen transportovat kromě  $\text{Na}^+$  také  $\text{Li}^+$  a v buňkách je významný pro

udržení optimálních koncentrací sodných i draselných kationtů. Delece genu činí buňky citlivými k přítomnosti vysokých koncentrací  $\text{Na}^+$  nebo nedostatku  $\text{K}^+$  v prostředí. Exprese genu *SOS1* je indukována přítomností  $\text{NaCl}$  prostřednictvím dráhy zahrnující serin / threoninovou proteinkinazu Sos2 (LIU *et al.* 2000), která je aktivována  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebným proteinem Sos3 (HALFTER *et al.* 2000), příbuzným kvasinkovému kalcineurinu B (LIU a ZHU 1998). Nadprodukce proteinu Sos1 vede v rostlinných buňkách ke snížení akumulace  $\text{Na}^+$  v prostředí s jeho vysokým obsahem a ke zvýšené halotoleranci rostlin (SHI *et al.* 2003).

Další skupina rostlinných  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů je lokalizována vnitrobuněčně, v tonoplastu, membráně vakuoly. Jedná se např. o proteiny *AtNhx1-6* v *A. thaliana* (GAXIOLA *et al.* 1999, MASER *et al.* 2001) nebo proteiny *OsNhx1* a *OsNhx2* v *Oryza sativa* (FUKUDA *et al.* 1999). Exprese genů kódujících antiportery Nhx je indukována přítomností solí a nadprodukce proteinů typu Nhx vede ke zvýšené toleranci rostlin k solnému stresu (APSE *et al.* 1999, FUKUDA *et al.* 2004). Substrátová specifita antiporterů Nhx je široká, proteiny transportují také draselné kationty (VENEMA *et al.* 2002, FUKUDA *et al.* 2004, KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2004). Heterologní exprese mnoha rostlinných proteinů Nhx funkčně komplementuje fenotypy kvasinkových buněk postrádajících svůj vlastní vnitrobuněčný antiporter, *ScNhx1p*, a často je tak používána jako první krok v charakterizaci rostlinných transportérů (např. KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2004).

Mnoho informací není dostupných o rodině rostlinných  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  přenašečů typu Chx. Většina z 28 genů kódujících tyto proteiny v *A. thaliana* je výlučně anebo preferenčně exprimována v samčím gametofytu; antiportery Chx by se tak mohly účastnit vývoje pylového zrna (SZE *et al.* 2004). Gen *AtCHX17* je exprimován v buňkách kořenů a je indukován solným stresem, hladověním na  $\text{K}^+$  nebo nízkým extracelulárním pH (CELLIER *et al.* 2004). Mutované rostliny postrádající tento přenašeč akumulují méně draselných kationtů v kořenech za podmínek solného stresu nebo nedostatku draselných kationtů v prostředí. K objasnění úlohy proteinů Chx ve fyziologii rostlinných buněk by mohla přispět jejich příbuznost s kvasinkovým *Kha1p* (SZE *et al.* 2004). Gen *AtCHX17* byl exprimován v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících protein *Kha1* a kódovaný antiporter byl schopen funkčně komplementovat fenotypy těchto buněk (citlivost ke zvýšenému pH a přítomnosti hygromycinu), což naznačuje, že funkce obou proteinů by mohla být podobná (MAREŠOVÁ a SYCHROVÁ 2006).

Doposud funkčně necharakterizované zůstávají rostlinné transportéry kódované geny *KEA* (př. *AtKEA1-6*, MASER *et al.* 2001), které jsou příbuzné bakteriálním antiporterům zajišťujícím výstup kationtů  $K^+$  z buněk (proteinům Kef).

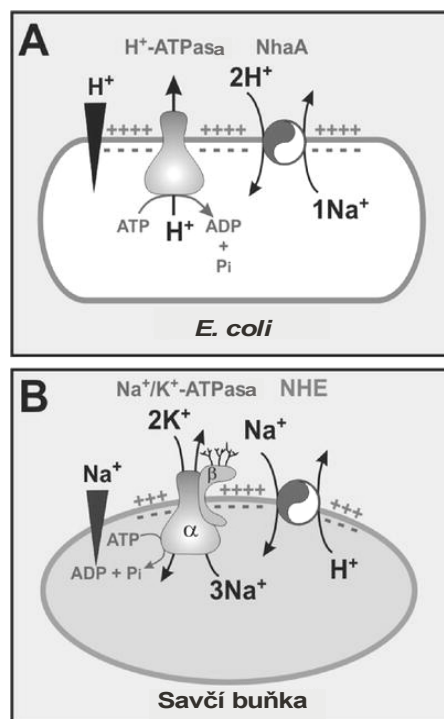
### 2.3.3 Živočišné $Na^+/H^+$ antiportery typu Nhe

Živočišné antiportery se v některých ohledech podstatně odlišují od proteinů bakteriálních, kvasinkových či rostlinných (ORLOWSKI a GRINSTEIN 2004). Zdrojem energie pro transport zprostředkovaný antiportery lokalizovanými v plasmatické membráně buněk je v živočišných buňkách gradient sodných kationtů, vytvářený činností  $Na^+/K^+$ -ATPasy.  $Na^+/H^+$  antiport je opačného směru než v kvasinkových (příp. bakteriálních nebo rostlinných) buňkách a je elektroneutrální (dochází ke vstupu jednoho sodného kationtu do buněk při současném exportu jednoho  $H^+$ , Obr. 3). Jednou z hlavních úloh proteinů Nhe je tak odstraňování přebytečných protonů vznikajících metabolismem buněk a hrají tedy významnou roli v udržování stabilního vnitrobuněčného pH. Nicméně, změny vnitrobuněčného pH vyvolané aktivitou Nhe usnadňují i další buněčné procesy, jako např. buněčnou adhezi, migraci anebo proliferaci. Kromě toho, vstup  $Na^+$  do buněk je důležitý pro regulaci buněčného objemu a absorpci vody a solí epiteliálními buňkami (Obr. 4).

V lidském genomu bylo nalezeno 9 genů kódujících antiportery Nhe1-9 (BRETT *et al.* 2005b). Proteiny se liší místem exprese v rámci lidského organismu a také svou buněčnou lokalizací. Počítačová analýza sekvencí lidských antiporterů Nhe předpovídá obecnou strukturu tvořenou krátkým hydrofilním N-koncem, 12 relativně konzervovanými transmembránovými doménami a variabilnějším hydrofilním C-koncem, lokalizovaným v cytoplasmě buněk (ORLOWSKI a GRINSTEIN 2004). Experimentální evidence podporující tento model pochází např. ze studia dostupnosti proteinových domén pro proteasy (SHRODE *et al.* 1998) nebo přístupnosti substituovaných cysteinových zbytků (WAKABAYASHI *et al.* 2000).

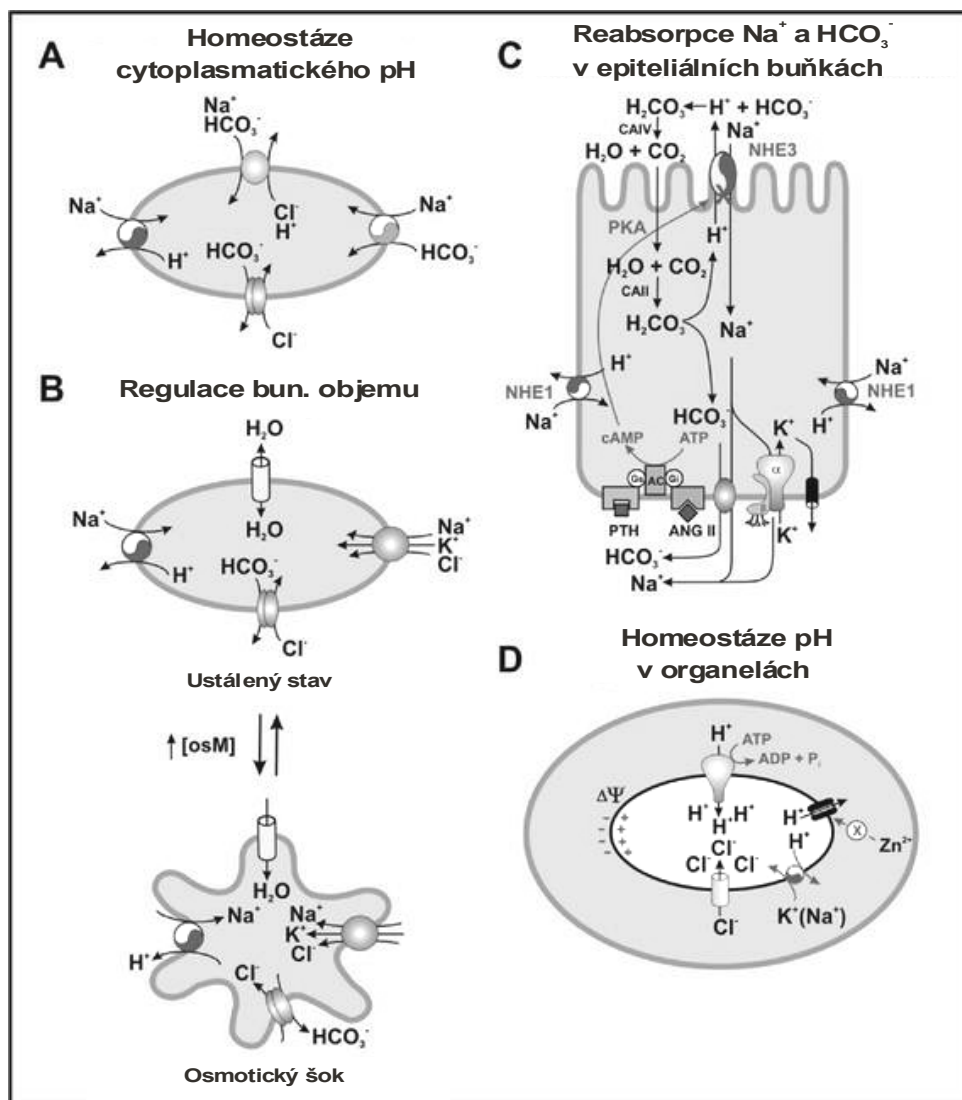
Nhe1p byl prvním popsáním savčím  $Na^+/H^+$  antiporterem (SARDET *et al.* 1989) a stal se tak jakýmsi prototypem těchto proteinů. Nhe1p je lokalizovaný výlučně v plasmatické membráně buněk a nachází se ve většině buněčných typů. V závislosti na tkáni je Nhe1p lokalizován do odlišných oblastí plasmatické membrány; např. v epiteliálních buňkách je protein nalézán v bazolaterální oblasti membrány (BIEMESDERFER *et al.* 1992). Hlavními úlohami tohoto proteinu jsou udržování stálého

vnitrobuněčného pH a zprostředkování vstupu  $\text{Na}^+$  do buněk, spojeného s transportem  $\text{Cl}^-$  a  $\text{H}_2\text{O}$  přes membránu a regulací buněčného objemu např. při náhlém zvýšení osmotického



**Obr. 3:**  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery v bakteriální a savčí buňce. Obrázek znázorňuje také ATPasy vytvářející pro ně svou činností hnací sílu (gradient protonů či  $\text{Na}^+$ ). Převzato z ORLOWSKI a GRINSTEIN 2004.

tlaku v okolí buněk (ROTIN a GRINSTEIN 1989, Obr. 4). V závislosti na buněčném typu a své lokalizaci však protein může hrát i více specializované role ve fyziologii buněk, jako je ovlivnění aktivity sousedních pH-senzitivních proteinů. Nhe1p se také může účastnit regulace buněčné morfologie, adheze a migrace; ve fibroblastech se např. účastní přestavby kortikálního aktinového cytoskeletu a buněčného tvaru (DENKER *et al.* 2000). Cílená mutagenese genu *NHE1* ukázala, že konzervované aminokyselinové zbytky Arg440 a Gly445 a 446 jsou významné pro citlivost proteinu k pH (WAKABAYASHI *et al.* 2003); fenylalaninový zbytek 162 se zřejmě účastní vazby sodného kationtu (TOURET *et al.* 2001).



**Obr. 4:** Schematická reprezentace hlavních úloh živočišných  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů ve fyziologii buněk. Převzato z ORLOWSKI a GRINSTEIN 2004.

Proteiny Nhe2-4 jsou produkovány především v epitelu ledvin a trávicího traktu, ale v nízké míře byly detekovány i v jiných tkáních (ORLOWSKI *et al.* 1992, WANG *et al.* 1993, BRANT *et al.* 1995, MALAKOOTI *et al.* 1999). Nhe3p se účastní především reabsorpce iontů  $\text{Na}^+$  a tekutin v proximálním tubulu v ledvinách (VALLON *et al.* 2000). Sekrece protonů proteiny Nhe3 a Nhe2 má v ledvinách význam i pro reabsorpci  $\text{HCO}_3^-$  (WANG *et al.* 2001). Nhe3p také reguluje bazální i jídlem vyvolanou absorpci  $\text{Na}^+$  v tenkém střevě (YEO *et al.* 1994, MAHER *et al.* 1997). Nhe2p má pravděpodobně význam pro sekreční činnost některých žláz (SCHULTHEIS *et al.* 1998, PARK *et al.* 2001). Nhe4p je lokalizovaný v bazolaterální membráně epiteliálních buněk a jeho funkce

je zřejmě podobná funkci Nhe1p (PETI-PETERDI *et al.* 2000, CHAMBREY *et al.* 2001). Přestože bylo ukázáno, že živočišné antiportery plasmatické membrány, s výjimkou Nhe4p (CHAMBREY *et al.* 1997), rozpoznávají jako substrát pouze Na<sup>+</sup> (příp. Li<sup>+</sup> nebo NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), ale nikoli K<sup>+</sup> (ARONSON 1985, YU *et al.* 1993, ATTAPHITAYA *et al.* 2001), heterologní exprese genu *NHE2* v buňkách *S. cerevisiae* odhalila, že Nhe2p je schopen z kvasinkových buněk exportovat draselné kationty (FLEGELOVÁ a SYCHROVÁ 2005).

Protein Nhe5 je produkován především v oblastech centrálního nervového systému bohatých na neurony (ATTAPHITAYA *et al.* 1999, BAIRD *et al.* 1999). Je lokalizován v plasmatické membráně buněk a internalizován klathrinem zprostředkovanou endocytosou do recyklujících endosomů (SZASZI *et al.* 2002). Předpokládá se, že by Nhe5p mohl hrát úlohu v regulaci kyselosti synaptických váčků.

Geny *NHE6-9* se podstatně liší od genů kódujících živočišné antiportery plasmatické membrány a v rámci fylogenetického stromu tvoří oddělenou skupinu proteinů typu Nhe (ORLOWSKI a GRINSTEIN 2004). Proteiny nejsou tkáňově specifické. Molekula pre-mRNA nesoucí informaci o sekvenci budoucího proteinu Nhe6 prochází zřejmě alternativním sestřihem a dochází tak ke vzniku nejméně tří verzí genu, označovaných jako *NHE6*, *NHE6\_v1* a *NHE6\_v2* (NUMATA *et al.* 1998, MIYAZAKI *et al.* 2001, ORLOWSKI a GRINSTEIN 2004). Nhe6p je lokalizován vnitrobuněčně, při nadprodukcii v savcích buňkách se hromadí hlavně v endosomech (MIYAZAKI *et al.* 2001, BRETT *et al.* 2002). Nhe7p je lokalizován především v trans-Golgiho aparátu a asociovaných endosomálních váčcích (NUMATA a ORLOWSKI 2001). Tento protein je schopen transportovat nejen Na<sup>+</sup>, ale i hlavní vnitrobuněčný kation, K<sup>+</sup>. Vnitrobuněčné antiportery se zřejmě účastní regulace pH vnitrobuněčných váčků, případně také koncentrace K<sup>+</sup> v lumen váčků.

Živočišné antiportery typu Nhe jsou podle fylogenetických studií příbuznější kvasinkovému vnitrobuněčnému antiporteru Nhx1 než proteinu Nha1 lokalizovanému v plasmatické membráně buněk (BRETT *et al.* 2005b). Brett *et al.* (2005b) jako první identifikovali v kompletně sekvenovaných živočišných genomech, včetně lidského, sekvence pravděpodobných antiporterů příbuzných kvasinkovému Nha1p. Lidské geny byly na základě této podobnosti označeny jako *HsNHA1* a *HsNHA2*; kódované proteiny však nebyly doposud blíže charakterizovány.

## 2.4 Nekonvenční kvasinky *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica*

Kvasinky *D. hansenii* a *Y. lipolytica* nepatří mezi nejčastěji studované kvasinkové druhy, díky svým výjimečným vlastnostem však byly spolu s kvasinkami *Candida glabrata* a *Kluyveromyces lactis* vybrány francouzským konsorciem Génolevures pro celkovou sekvenaci genomů (DUJON *et al.* 2004). V rámci této disertační práce byla studována tolerance k solím obou kvasinek a byly charakterizovány geny kódující v těchto organismech  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány. V následujících kapitolách budou obě kvasinky stručně popsány se zřetelem na doposud známé informace o jejich toleranci k solím a případně transportních systémech, které ji zajišťují.

### 2.4.1 Osmotolerantní kvasinka *D. hansenii*

*D. hansenii* je osmotolerantní kvasinka nacházející se především v prostředích s vyšší koncentrací solí jako mořská voda nebo slané potraviny (PRISTA *et al.* 2005). Většina kmenů *D. hansenii* je haploidní, nepohlavně se množí multilaterálním pučením. V průběhu sexuálního cyklu dochází k heterogamnímu nebo izogamnímu spájení následovanému krátkou diploidní fází, meiózou a tvorbou askospor (BREUER a HARMS 2006). Pro potravinářský průmysl je významná její schopnost růst při nízkých teplotách, metabolizovat kyselinu mléčnou a citronovou a produkovat proteasy a lipasy (BREUER a HARMS 2006). Přestože je *D. hansenii* všeobecně považována za nepatogenní, byly popsány infekce spojené s touto kvasinkou a klinické vzorky obsahující *D. hansenii* (WONG *et al.* 1982, NISHIKAWA *et al.* 1996). Částečná sekvenace genomu *D. hansenii* (LEPINGLE *et al.* 2000) odhalila, že tato kvasinka využívá alternativní kvasinkový genetický kód, v němž kodón CUG je používán pro serin namísto leucinu. Nicméně, tento kodón je v kódujících oblastech genomu nalézán jen vzácně. Typový kmen *D. hansenii* CBS 767 obsahuje 7 chromosomů tvořících genom o velikosti přibližně 12 Mbp; průměrná genová hustota je u *D. hansenii* o něco vyšší než u *S. cerevisiae* (79 % oproti 70 %, DUJON *et al.* 2004).

Chování této halotolerantní kvasinky v přítomnosti solí se zdá být v některých ohledech odlišné od chování modelové kvasinky *S. cerevisiae*. Sodný kation pravděpodobně nemá v buňkách *D. hansenii* specifický toxický efekt; *D. hansenii* narozdíl od *S. cerevisiae* toleruje stejné koncentrace  $\text{Na}^+$  jako  $\text{K}^+$  (pro *S. cerevisiae* netoxického



kationtu, viz úvod ke kap. 2) v médiu (NEVES *et al.* 1997, PRISTA *et al.* 1997). Tato kvasinka je také charakteristická akumulací většího množství sodných iontů v buňkách, je-li kultivována v jejich přítomnosti (PRISTA *et al.* 1997, THOME-ORTIZ *et al.* 1998, GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.* 2004). Autoři studující tok sodných a draselných kationtů v buňkách *D. hansenii* za rozličných podmínek navrhli, že  $\text{Na}^+$  není z buněk exportován, tak jako je tomu v kvasince *S. cerevisiae*, ale že metabolické systémy této halotolerantní kvasinky musí být rezistentní k vysokým vnitrobuněčným koncentracím tohoto iontu (GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.* 2004). Nicméně, transportní systémy zajišťující výstup  $\text{Na}^+$  z buněk jsou v *D. hansenii* přítomny. Byly izolovány dva geny kódující v *D. hansenii* sodné ATPasy Ena (*DhENA1* a *DhENA2*) a transportní vlastnosti proteinů byly studovány po heterologní expresi v buňkách *S. cerevisiae* (ALMAGRO *et al.* 2001). Zatímco růst *S. cerevisiae* je inhibován v přítomnosti  $\text{Na}^+$ , někteří autoři pozorovali zlepšení růstu *D. hansenii* v přítomnosti přiměřených koncentrací tohoto kationtu v médiu (PRISTA *et al.* 1997, THOME-ORTIZ *et al.* 1998, GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.* 2004). Přítomnost  $\text{Na}^+$  zřejmě také v *D. hansenii* stimuluje vstup draselných kationtů a sodný kation je schopen funkčně substituovat  $\text{K}^+$ , je-li v prostředí nedostatek draselných kationtů (PRISTA *et al.* 1997). Pozitivní efekt sodných kationtů na růst *D. hansenii* je zvýrazněn za současného působení některých stresových podmínek, jako vysoká teplota a vysoké nebo naopak velmi nízké pH prostředí (ALMAGRO *et al.* 2000). Díky některým ze zmíněných fyziologických zvláštností je někdy chování této kvasinky označováno jako halofilní (PRISTA *et al.* 1997, GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.* 2004).

#### 2.4.2 Dimorfní kvasinka *Y. lipolytica*

*Y. lipolytica* je dimorfní (tvořící kvasinkové buňky i pravé mycelium), obligátně aerobní kvasinka, fylogeneticky vzdálená od *S. cerevisiae* i dělicí se kvasinky *S. pombe*. Typicky je nalézána v potravinách bohatých na lipidy, jako jsou např. produkty mlékárenského průmyslu (VASDINYEI a DEAK 2003). Většina izolovaných kmenů *Y. lipolytica* je haploidní, ke křížení dochází s velmi nízkou frekvencí (BARTH a GAILLARDIN 1997). Za různých kultivačních podmínek tato kvasinka sekretuje extracelulární enzymy jako proteasy, lipasy, RNasy, fosfatasy nebo esterasy (BARTH a GAILLARDIN 1997), což jí dává možnost využívat k růstu neobvyklé zdroje uhlíku (např. mastné kyseliny nebo alkany). Je využívána při výrobě organických kyselin, v potravinářském průmyslu a její schopnost produkovat proteiny do média vedla k vyvinutí

účinného systému pro sekreci heterologních proteinů touto kvasinkou (MADZAK *et al.* 2004). V rámci projektu systematického sekvenování genomů kvasinek Génolevures bylo zjištěno, že *Y. lipolytica* má podstatně větší genom než *S. cerevisiae* (20 Mbp vs. 10 Mbp), celková genová hustota je však u této kvasinky nižší (přibližně jeden gen na 3 kbp, oproti jednomu genu na 2 kbp u *S. cerevisiae*, CASAREGOLA *et al.* 2000, DUJON *et al.* 2004). Kmen CLIB99, jehož genom byl sekvenován, obsahuje 6 chromosomů o velikosti mezi 2,6 až 4,9 Mbp (CASAREGOLA *et al.* 2000, DUJON *et al.* 2004). Genom *Y. lipolytica* se také vyznačuje vyšším obsahem párů GC (průměrně 49 % oproti 38,3 % v genomu *S. cerevisiae*) a vyšším zastoupením genů kódujících molekuly tRNA (510 genů proti 274 genům v genomu *S. cerevisiae*, DUJON *et al.* 2004).

Přes význam této kvasinky pro průmysl je doposud jen velmi málo známo o její toleranci k solím nebo transportu iontů. Průmyslové kmeny *Y. lipolytica* jsou schopny tolerovat vyšší koncentrace NaCl v médiu než kmeny *S. cerevisiae* (PRAPHAILONG a FLEET 1997). Ačkoli skupina genů kódujících iontové přenašeče je v genomu *Y. lipolytica* přítomna ve větším počtu v porovnání s genomy jiných kvasinek (CASAREGOLA *et al.* 2000), doposud byl izolován a charakterizován pouze gen *YIPMRI*, kódující Ca<sup>2+</sup>-ATPasu typu P, nacházející se v sekreční dráze této kvasinky (PARK *et al.* 1998). Nově izolovaný osmotolerantní kmen *Y. lipolytica*, vyznačující se schopností růst v prostředích o vysokém pH, se stal modelem pro studium kotransportu Na<sup>+</sup> a fosfátů do buněk (ZVYAGILSKAYA a PERSSON 2005). Geny kódující jednotlivé přenašeče však nebyly doposud charakterizovány.

### **3. CÍLE PRÁCE**

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole této disertační práce, jedním z hlavních témat, jimiž se zabývá naše laboratoř, je studium úlohy  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány ve fyziologii kvasinkových buněk. Tato práce se především pokusila přinést více informací o vlastnostech a funkcích těchto proteinů v různých, vzájemně nepříbuzných kvasinkách a tím přispět k nalezení odpovědi na otázku, jaká by mohla být primární fyziologická úloha kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány - pouhá eliminace toxických kationtů z buněk anebo komplexnější role s podílem na udržování stabilního vnitrobuněčného obsahu draselných kationtů, stálého objemu buněk a cytoplasmatického pH.

Dílčí cíle této disertační práce je možno shrnout do několika bodů:

1. V dostupných databázích vyhledat sekvence kvasinkových genů kódujících proteiny homologní k Nha1p, Nhx1p nebo Kha1p kvasinky *S. cerevisiae* a tyto sekvence analyzovat
2. Izolovat geny nalezené v databázi Génolevures (DUJON *et al.* 2004) kódující  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány halotolerantní kvasinky *D. hansenii* a fylogeneticky vzdálené kvasinky *Y. lipolytica* a metodou heterologní exprese v buňkách *S. cerevisiae* studovat vlastnosti a funkce kódovaných proteinů
3. Zjistit, zda sekvence genomů kvasinek *S. pombe* a *Z. rouxii*, v nichž byly doposud nalezeny pouze antiportery s úzkou substrátovou specifitou pro  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$ , neobsahují další geny kódující antiportery typu Nha1, jež by mohly transportovat  $\text{K}^+$ , a případně produkty těchto genů charakterizovat

## **4. VÝSLEDKY A DISKUSE**

Výsledky této disertační práce jsou shrnuty ve třech publikovaných pracích (kap. 4.1, 4.2 a 4.3), jedné publikaci přijaté do tisku (kap. 4.5), jednom rukopise odeslaném k recenzi (kap. 4.7) a dvou dalších kapitolách obsahujících výsledky, jež jsou součástí právě připravovaných rukopisů. Materiál a metody použité v rámci disertační práce jsou uvedeny přímo v jednotlivých publikacích nebo kapitolách s dosud nepublikovanými výsledky.

První publikace **„Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure comparison”** se zabývá analýzou sekvencí kvasinkových genů kódujících přenašeče kationtů alkalických kovů i samotných proteinů *in silico*. Studovali jsme vzájemnou příbuznost proteinů z jednotlivých kvasinek, strukturu antiporterů, vyhledali jsme aminokyselinové zbytky či motivy konzervované v rámci jednotlivých skupin antiporterů a zajímala nás i příbuznost kvasinkových proteinů s homologními proteiny z bakterií a vyšších eukaryot.

Několik následujících částí práce je věnováno charakterizaci Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány z různých kvasinkových druhů. Geny kódující tyto proteiny byly izolovány a heterologně exprimovány v halosensitivním kmeni *S. cerevisiae* BW31, který postrádá své vlastní systémy pro export kationtů alkalických kovů (*ena1-4Δ nha1Δ*, KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2005) a je tak vhodným nástrojem pro studium transportních proteinů z jiných organismů (kap. 1). Navíc, studované geny byly vždy exprimovány pod kontrolou promotoru genu *ScNHAI* a vkládány do téhož mnohokopiového vektoru YEp352 (HILL *et al.* 1986). Produkce proteinů za stejných podmínek nám tak umožnila získané výsledky (např. schopnost proteinů udělit buňkám zvýšenou toleranci k přítomnosti solí či transportní aktivitu antiporterů) navzájem porovnávat.

Publikace č. 2 **„The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity”** se zabývá charakterizací Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány dvou kmenů halotolerantní kvasinky *D. hansenii*. Ukázali jsme, že gen *NHA1* kóduje v této kvasince antiporter se širokou substrátovou specifitou (transportující Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> a Rb<sup>+</sup>) a protein *DhNha1* tedy rozšiřuje skupinu kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány s komplexní úlohou ve fyziologii buněk (detoxifikace i podíl na udržování stabilní vnitrobuněčné koncentrace K<sup>+</sup>, stálého buněčného objemu a pH).

Ve třetím článku s názvem **„*Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters with different functions in cell physiology”** jsme

charakterizovali  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány (kódované dvěma geny nalezenými v databázi Génolevures, publikace č. 1) z kvasinky *Y. lipolytica*. Tato fylogeneticky vzdálená dimorfní kvasinka se stala prvním příkladem kvasinky obsahující dva různé antiportery výrazně se lišící afinitou k jednotlivým substrátům a tím i svou pravděpodobnou funkcí. Jeden z proteinů (*YINha2p*) se ukázal být velmi účinným systémem pro detoxifikaci buněk, druhý antiporter (*YINha1p*) se díky své schopnosti exportovat z buněk  $\text{K}^+$  může podílet na udržování stálé koncentrace draselných kationtů uvnitř buněk, stálého buněčného objemu či pH.

V navazující kapitole s dosud nepublikovanými výsledky jsme produkovali protein *YINha2* ve třech různých kmenech *S. cerevisiae*, které nepostrádají své vlastní systémy pro export kationtů alkalických kovů, a zjistili jsme, že by exprese genu *YINHA2* mohla být využita ke zvýšení tolerance k NaCl některých průmyslových kmenů *S. cerevisiae* při nižších hodnotách pH prostředí.

Přítomnost dvou genů kódujících antiportery s různými vlastnostmi i úlohami v genomu *Y. lipolytica* nás přiměla ke studiu dosud nepopsaného proteinu homologního s *ScNha1p* dělicí se kvasinky *S. pombe*. V této kvasince byl již dříve nalezen gen *Spsod2* kódující antiporter transportující pouze  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  (JIA *et al.* 1992, kap. 2.2.1). Ve čtvrté publikaci „*Schizosaccharomyces pombe* possesses two plasma membrane alkali metal cation/ $\text{H}^+$  antiporters differing in their substrate specificity” jsme ukázali, že, podobně jako *Y. lipolytica*, i *S. pombe* obsahuje dva  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány lišící se substrátovou specifitou i pravděpodobnou funkcí. Nově charakterizovaný antiporter, nazvaný *Spsod22p*, je méně účinný v eliminaci  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  z buněk než *Spsod2p*, na rozdíl od původně popsánoho přenašeče však transportuje  $\text{K}^+$  a může tak hrát roli i v jiných buněčných procesech (udržování stabilní vnitrobuněčné koncentrace draselných kationtů, stabilního buněčného objemu a pH).

Ve druhé kapitole s dosud nezveřejněnými výsledky jsme se ve spolupráci s Mgr. L. Příbylovou pokusili zjistit, zda přítomnost alespoň jednoho  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporteru plasmatické membrány se schopností transportovat  $\text{K}^+$  je mezi kvasinkami evolučně konzervovaná. Zaměřili jsme se tedy na osmotolerantní kvasinku *Z. rouxii*, která byla poslední kvasinkou, v níž byl doposud nalezen pouze antiporter exportující z buněk jen toxické ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  (KINCLOVÁ *et al.* 2002). Zjistili jsme, že i genom *Z. rouxii* obsahuje gen kódující další homologní protein (nazvaný *ZrNha1p*) exportující z buněk  $\text{K}^+$ . Také v této kvasince byl tedy objeven  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter plasmatické membrány s možnou rolí v udržování stabilní vnitrobuněčné koncentrace  $\text{K}^+$ , stálého buněčného objemu či pH.

Výsledková a diskusní část dále obsahuje rukopis „**The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells**”. V rukopise jsme se zabývali především vlivem zvýšení osmotického tlaku prostředí na růst halotolerantní kvasinky *D. hansenii* za různých kultivačních teplot. Ukázali jsme, že spolupůsobení dvou různých stresových podmínek (vyšší osmotický tlak média, supraoptimální teplota) vede ke zlepšení růstu buněk. Podobný vliv současné přítomnosti osmotického a teplotního stresu na růst jsme pozorovali i u kvasinek *S. cerevisiae* a *S. pombe*.



## 4.1 Publikace č. 1 - Studium kvasinkových přenašečů kationtů alkalických kovů: Srovnání sekvencí a struktury

Abychom zjistili, jak jsou jednotlivé skupiny kvasinkových přenašečů alkalických kovů fylogeneticky konzervované, vyhledali jsme v dostupných databázích obsahujících kompletně nebo alespoň částečně známé sekvence genomů kvasinek geny kódující proteiny homologní k *ScNha1p*, *ScNhx1p* nebo *ScKha1p*. Na úrovni DNA jsme pak studovali především míru konzervovanosti v lokalizaci jednotlivých genů na chromosomech mezi různými kvasinkovými druhy. Po přeložení nukleotidových sekvencí do sekvencí aminokyselin jsme studovali vzájemnou podobnost kódovaných antiporterů i jejich strukturu. Podle modelů založených na sledování hydropatických profilů proteinů jsme sledovali délky jednotlivých oblastí antiporterů (N-konců, transmembránových úseků tvořených 12 transmembránovými segmenty spojenými smyčkami a C-konců) a stupeň konzervovanosti jednotlivých segmentů v rámci transmembránových částí proteinů, který by mohl vypovídat o významu konkrétních oblastí proteinů pro jejich funkci. Porovnání jednotlivých proteinových řetězců nám také umožnilo vyhledat konzervované nabitě aminokyselinové zbytky nalézající se v transmembránových oblastech proteinů (tyto zbytky by mohly být důležité pro vazbu či transport substrátů, kap. 2.2.1, DIBROV a FLIEGEL 1998), případně konzervované aminokyselinové motivy lokalizované v transmembránových oblastech či C-koncových segmentech antiporterů. Na závěr jsme provedli fylogenetickou studii příbuznosti jednotlivých skupin kvasinkových přenašečů se zástupci bakteriálních, rostlinných či savčích  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů, která ukázala, že proteiny *Nhx1* jsou příbuzné savčím a rostlinným přenašečům, proteiny *Kha1* se zdají být nejpříbuznější s bakteriálními antiportery a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány (rodina *Nha1*) tvoří oddělenou vývojovou větev, jejíž představitelé byli doposud charakterizováni jen v houbových organismech, ačkoli v živočišných genomech byly nalezeny sekvence kódující pravděpodobně přenašeče příbuzné této skupině (BRETT *et al.* 2005b).

## 4.2 Publikace č. 2 - Gen *NHA1* kvasinky *D. hansenii* kóduje přenašeč kationtů alkalických kovů se širokou substrátovou specifitou

V publikaci č. 2 jsme nejprve porovnali toleranci k solím dvou kmenů kvasinky *D. hansenii* (CBS 767, jehož genomová sekvence je známa, a CBS 1793). Vyšší halotolerance druhého kmene nás vedla k rozhodnutí pokusit se izolovat gen *DhNHA1* z obou divokých kmenů kvasinky *D. hansenii*; porovnáním transportní aktivity obou přenašečů bychom mohli zjistit, zda rozdílná tolerance k solím těchto kmenů souvisí s aktivitou proteinu Nha1. Sekvenci alely *Dh767NHA1* z typového kmene CBS 767 jsme našli v databázi Génolevures (DUJON *et al.* 2004). Gen *Dh1793NHA1* z osmotolerantnějšího kmene byl sekvenován v rámci této publikace a sekvence byla uložena v databázi EMBL pod přístupovým číslem AJ876409. Sekvence alely *Dh1793NHA1* i kódovaného antiporteru jsou uvedeny v příloze k publikaci č. 2. Obě alely *DhNHA1* i jimi kódované proteiny byly porovnány na úrovni nukleotidových a aminokyselinových sekvencí, studovali jsme také podobnost proteinů s jinými kvasinkovými antiportery rodiny Nha1. Sledováním tolerance k přítomnosti solí v médiu u buněk *S. cerevisiae* BW31 produkujících proteiny *DhNha1* a dále výstupu kationtů z těchto buněk jsme ukázali, že oba proteiny patří do podrodiny kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány se širokou substrátovou specifitou a mohou tedy hrát ve fyziologii buněk *D. hansenii* roli nejen v odstraňování toxických iontů z buněk, ale i v udržování stálého vnitrobuněčného obsahu draselných kationtů, buněčného objemu i pH. Lokalizace antiporterů *DhNha1* v plasmatické membráně byla potvrzena také značením proteinů na C-konci pomocí zeleného fluorescenčního proteinu. Ve shodě se závislostí funkčnosti  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů na přítomnosti gradientu  $\text{H}^+$  přes plasmatickou membránu buněk byla schopnost *DhNha1p* udělit buňkám *S. cerevisiae* vyšší toleranci k solím a exportovat z nich kationty alkalických kovů závislá na extracelulárním pH. Ukázali jsme také, že *DhNha1p* by, podobně jako *ScNha1p* (BAÑUELOS *et al.* 1998, KINCLOVÁ *et al.* 2001a) mohl sloužit jako „pojistka“ pro udržení stabilního pH cytoplazmy v případě její náhlé alkalizace. Porovnáním vlastností obou proteinů *DhNha1* jsme zjistili, že aktivita těchto antiporterů pravděpodobně není jedním z faktorů, jež určují rozdílnou halotoleranci obou studovaných kmenů *D. hansenii*.

### 4.3 Publikace č. 3 - *Y. lipolytica* obsahuje dva $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery plasmatické membrány s odlišnou funkcí ve fyziologii buňky

Porovnáním růstu dimorfní kvasinky *Y. lipolytica* a modelové kvasinky *S. cerevisiae* v přítomnosti solí jsme zjistili, že *Y. lipolytica* toleruje přítomnost vyšších koncentrací solí než *S. cerevisiae*. Nicméně, jak již bylo zmíněno v kap. 2.4.2, v této kvasince doposud nebyl charakterizován žádný protein, který její halotoleranci podmiňuje. Zajímavostí bylo, že v genomu *Y. lipolytica* byly nalezeny dva geny homologní s genem *ScNHA1* (viz publikace č. 1), označené jako *YINHA1* a *YINHA2*. Studium sekvencí kódovaných proteinů ukázalo, že proteiny *YINha* se vzájemně liší délkou (rozdíl je patrný především v délce C-koncových částí antiporterů) a také jejich sekvenční identita je poměrně nízká. Oba geny *YINHA* byly izolovány a heterologně exprimovány v halosensitivním kmeni *S. cerevisiae* BW31. Studium tolerance k přítomnosti solí v médiu u buněk produkujících protein *YINha1* či *YINha2* a dále výstupu kationtů z těchto buněk ukázalo, že antiportery kvasinky *Y. lipolytica* se navzájem výrazně liší afinitou k jednotlivým substrátům (kationtům alkalických kovů). *YINha2p* se ukázal být velmi účinným systémem pro export toxických iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$ . Jeho schopnost udělit buňkám zvýšenou toleranci k přítomnosti  $\text{K}^+$  v médiu byla mnohem méně výrazná a nebyli jsme schopni detekovat žádný signifikantní výstup draselných kationtů z buněk BW31 produkujících *YINha2p*. *YINha2p* by se tedy mohl v kvasince *Y. lipolytica* účastnit především eliminace toxických kationtů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  z cytoplasmy. Naproti tomu, protein *YINha1* transportuje z buněk  $\text{K}^+$  a není příliš účinným systémem pro zvýšení tolerance buněk k přítomnosti toxických iontů  $\text{Na}^+$  v prostředí. Tento protein se tak pravděpodobně spíše než na detoxifikaci buněk podílí na udržování stabilní koncentrace draselných kationtů v buňkách, stálého buněčného objemu či pH cytoplasmy. *Y. lipolytica* je tak prvním příkladem kvasinky obsahující dva rozdílné  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány s odlišnými funkcemi ve fyziologii buněk.

## 4.4 Zvýšení tolerance kmenů *S. cerevisiae* k přítomnosti NaCl v médiu při heterologní expresi genu *YINHA2*

### 4.4.1 Úvod

Srovnání aktivity čtyř kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány při heterologní expresi v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících systémy pro export kationtů alkalických kovů (*ena1-4Δ nha1Δ*), ukázalo, že nejúčinnějším proteinem zajišťujícím toleranci buněk k  $\text{Na}^+$  je protein osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii*, ZrSod2-22p (KINCLOVÁ *et al.* 2002). Produkce tohoto proteinu je dokonce schopna zajistit zvýšení tolerance k  $\text{Na}^+$  některých „divokých“ kmenů *S. cerevisiae* (kmenů, které nepostrádají své vlastní systémy pro výstup kationtů alkalických kovů) a mohla by tak být využita ke zvýšení tolerance běžně používaných průmyslových kmenů *S. cerevisiae* k sodným kationtům v prostředích s nízkým pH (KINCLOVÁ *et al.* 2001b).

V této disertační práci jsme ukázali, že protein *YINha2* dimorfní kvasinky *Y. lipolytica* je velmi účinným systémem eliminujícím z buněk *S. cerevisiae* BW31 toxické sodné kationty (publikace č. 3). Aktivita *YINha2p* se zdá být také méně negativně ovlivněna zvýšením pH v okolí buněk ve srovnání s proteinem *ScNha1p*. Zajímalo nás tedy, zda bude *YINha2p*, podobně jako *ZrSod2-22p*, schopen udělit vyšší toleranci k  $\text{Na}^+$  i buňkám *S. cerevisiae* nepostrádajícím své vlastní systémy pro výstup kationtů alkalických kovů. Zároveň jsme porovnali aktivitu *YINha2p* a *ZrSod2-22p* v rozdílných kmelech *S. cerevisiae* při růstu buněk na miskách s médii o různém pH (PAPOUŠKOVÁ a SYCHROVÁ rukopis v přípravě).

### 4.4.2 Materiál a metody

#### 4.4.2.1 Použité kvasinkové kmeny, plasmidy a média

Pro heterologní expresi antiporterů byly využity kmeny *S. cerevisiae* W303-1A (*MATa leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal10*, WALLIS *et al.* 1989), BW31 odvozený od W303-1A, obsahující tyto další mutace: *nha1Δ::LEU2 ena1Δ::HIS3::ena4Δ* (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2005),  $\Sigma$ 1278b-clu (HS20-4B, *can1 lyp1 ura3*, SYCHROVÁ a CHEVALLIER 1993), FL100-ut (*ura3 trp1*,

KINCLOVÁ *et al.* 2001b). Buňky obsahovaly „prázdný“ vektor YEp352 (negativní kontrola, HILL *et al.* 1986), nebo do nich byly elektroporací vneseny plasmidy odvozené od tohoto vektoru, obsahující za promotorem genu *ScNHA1* sekvenci kódující *ScNha1p* (pNHA1-985, KINCLOVÁ *et al.* 2001a), *ZrSod2-22p* (pZrSod2-22, KINCLOVÁ *et al.* 2001b), nebo *YNha2p* (publikace č. 3). Buňky byly kultivovány na miskách s pevným minimálním médiem YNB (Difco) obsahujícím 0,5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 2 % glukózu při 30 °C. Soli byly přidávány do média před autoklávováním, auxotrofní přísady po sterilizaci média. Pro snížení pH minimálního média na hodnotu 3,5 jsme do média po autoklávování přidali předem zjištěný objem 1 M kyseliny vinné. Pro přípravu média o pH 5,5 (případně 7,0) jsme do média přidali 20 mM MES (20 mM MOPS) a pH jsme před autoklávováním upravili na požadovanou hodnotu pomocí NaOH.

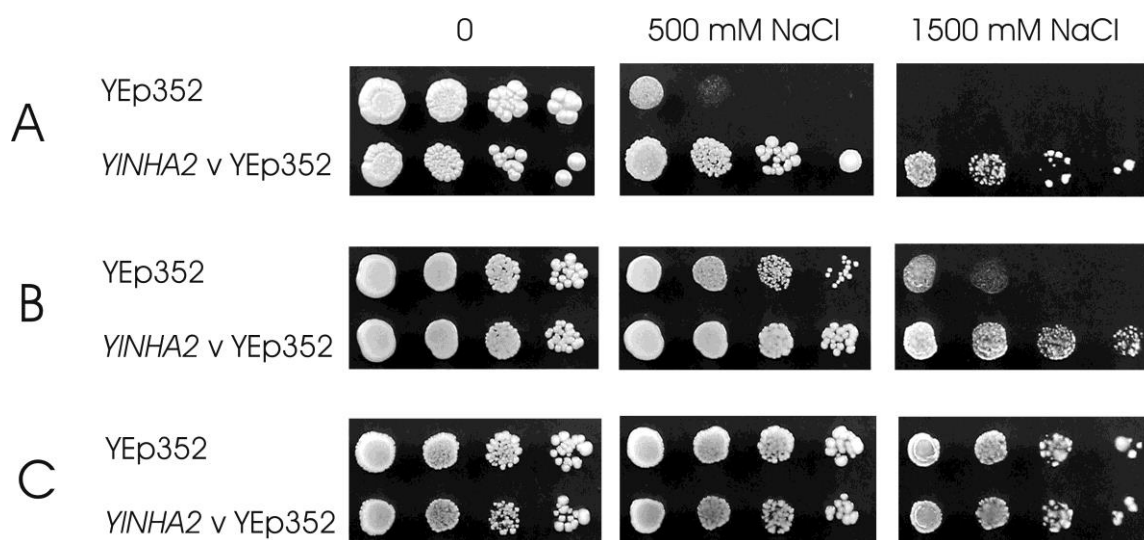
#### 4.4.2.2 Kapkové testy

Postupná desetinásobná ředění výchozích buněčných suspenzí ve vodě byla nanášena na misky s pevným médiem YNB obsahujícím různé koncentrace NaCl (KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Růst kvasinek byl sledován po dobu pěti až sedmi dnů.

#### 4.4.3 Výsledky a diskuse

Heterologní exprese genu *YNHA2* v kmenech *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-clu, FL100-ut a W303-1A z mnohokopiového vektoru ukázala, že nadprodukce kódovaného antiporteru není pro žádný z námi testovaných kmenů toxická, neboť neovlivňuje růst buněk za standardních podmínek (na médiu bez přidaného NaCl, Obr. 5). Obr. 5 také ukazuje, že kmen  $\Sigma$ 1278b-clu je ze všech testovaných kmenů nejcitlivější k přítomnosti  $\text{Na}^+$ ; tato jeho vlastnost je pravděpodobně dána přítomností pouze jedné alely genu *ENA* (WIELAND *et al.* 1995). Nejtolerantnější k NaCl je naopak kmen W303-1A. Za námi testovaných podmínek produkce *YNha2p* účinně zvyšuje toleranci k přítomnosti  $\text{Na}^+$  v buňkách kmenů  $\Sigma$ 1278b-clu a FL100-ut; zatímco samotný kmen  $\Sigma$ 1278b-clu již není schopen růst na misce obsahující médium s 1500 mM NaCl a kmen FL100-ut je za těchto podmínek silně inhibovaný, růst obou kmenů je umožněn, produkují-li buňky *YNha2p*. V halotolerantním kmeni W303-1A jsme žádný vliv přítomnosti *YNha2p* na toleranci buněk k NaCl

nepozorovali. Tato pozorování jsou ve shodě s výsledky získanými při produkci proteinu *ZrSod2-22p*, ve stejných kvasinkových kmenech (KINCLOVÁ *et al.* 2001b).



**Obr. 5:** Růst kmene  $\Sigma 1278b-clu$  (A), FL100-ut (B) a W303-1A (C) transformovaného prázdným vektorem YEp352 nebo produkujícího *YINha2p* na miskách YNB obsahujících různé koncentrace NaCl.

Dále jsme se tedy zaměřili na kmeny  $\Sigma 1278b-clu$  a FL100-ut. Aktivita proteinu *YINha2* v těchto kmenech *S. cerevisiae* byla porovnána s aktivitou proteinu *ZrSod2-22* i vlastního antiporteru *S. cerevisiae*, *ScNha1p*. Pro srovnání jsme také produkovali všechny zmíněné proteiny v halosensitivním kmeni BW31. Sérií kapkových testů na miskách s médiem YNB obsahujícím zvyšující se koncentrace NaCl jsme určili maximální koncentrace soli dovolující signifikantní růst buněk při určitém pH okolí. Jak je patrné z Tab. 3, nadprodukce *ScNha1p* účinně zvyšuje toleranci sensitivního kmene BW31 k přítomnosti NaCl především na médiích s nižšími hodnotami pH (ve shodě se závislostí funkce antiporteru na přítomnosti gradientu  $H^+$  přes plasmatickou membránu). Vliv nadprodukce *ScNha1p* na toleranci kmene  $\Sigma 1278b-clu$  je méně zřetelný, buňky obsahující plasmid pNHA1-985 nedosáhly tolerance pozorované za stejných podmínek u kmene BW31. Tolerance kmene FL100-ut nebyla nadprodukcí vlastního antiporteru *S. cerevisiae* zvýšena; při pH 7,0 jsem naopak pozorovali horší růst buněk transformovaných pNHA1-985 v porovnání s buňkami obsahujícími YEp352, pZrSod2-22 nebo produkujícími *YINha2p*. Heterologní exprese *ZrSOD2-22* nebo *YINHA2* účinně zvýšila toleranci všech studovaných kmenů k přítomnosti NaCl v médiu (v případě kmene FL100-ut pouze na

médiích s nižšími hodnotami pH), *YINha2p* však ve všech případech zvýšil toleranci buněk výrazněji než antiporter kvasinky *Z. rouxii*. Aktivita *YINha2p* se také zdá být méně výrazně negativně ovlivněna zvýšením extracelulárního pH na hodnotu 5,5.

**Tab. 3:** Maximální koncentrace NaCl (mM) v médiu YNB dovolující růst buněk produkujících odlišné Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery při různém pH

Plasmid v buňkách	Kmen pH <sub>vně</sub> =	BW31			Σ1278b-clu			FL100-ut		
		3,5	5,5	7,0	3,5	5,5	7,0	3,5	5,5	7,0
YEp352		300	200	50	200	100	50	1000	500	500
pNHA1-985		1000	500	100	500	300	100	1000	500	300
pZrSod2-22		1500	1250	200	1500	1250	200	1500	1250	500
<i>YINHA2</i> v YEp352		1750	1750	300	1750	1750	300	1750	1750	500

pH<sub>vně</sub> – pH média YNB

Naše pozorování tedy, ve shodě s dříve publikovanými výsledky (KINCLOVÁ *et al.* 2001b), ukazují, že heterologní exprese kvasinkových antiporterů je schopna účinně zvýšit toleranci některých kmenů *S. cerevisiae* k přítomnosti Na<sup>+</sup>, především při nízkých hodnotách extracelulárního pH. Námi studovaný antiporter *YINha2* se zdá být k tomuto účelu ještě vhodnější než *ZrSod2-22p*, neboť jeho produkce zvyšuje toleranci buněk vůči NaCl účinněji než produkce *ZrSod2-22p* a jeho aktivita je také méně negativně ovlivněna zvýšením pH média z hodnoty 3,5 na 5,5. Protein *YINha2* by tak mohl být vhodným systémem zajišťujícím zvýšenou toleranci některých průmyslových kmenů *S. cerevisiae* k přítomnosti NaCl v prostředích s pH nižším než 7,0.

#### 4.5 Publikace č. 4 - *S. pombe* obsahuje dva Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery plasmatické membrány s odlišnou substrátovou specifitou

Existence dvou různých antiporterů kvasinky *Y. lipolytica*, které se liší svými pravděpodobnými funkcemi ve fyziologii buněk (publikace č. 3), nás přiměla k bližšímu prozkoumání Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů v příčně se dělící kvasince *S. pombe*. Genom této kvasinky (WOOD *et al.* 2002) obsahuje, podobně jako genom *Y. lipolytica*, dva geny kódující proteiny homologní k *ScNha1p* (publikace č. 1). O proteinu *Spsod2* bylo blíže pojednáno v kap. 2.2.1, jedná se o jeden z kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů plasmatické membrány rozpoznávajících jako substrát pouze Na<sup>+</sup> či Li<sup>+</sup>. Protein kódovaný druhým genem kvasinky *S. pombe* homologním k *ScNHAI* jsme nazvali *Spsod22p*. Tento protein je výrazně delší než *Spsod2p* a, analogicky k situaci v *Y. lipolytica*, sekvenční identita obou antiporterů není příliš vysoká. Z obou proteinů je *Spsod22p* podobnější *ScNha1p* a dalším kvasinkovým antiporterům, jež jsou schopny z buněk transportovat K<sup>+</sup>. Abychom tedy zjistili, jaká je substrátová specifita a případná úloha *Spsod22p* ve fyziologii kvasinky *S. pombe*, izolovali jsme gen *Spsod22* a heterologně jsme ho exprimovali v halosensitivním kmeni *S. cerevisiae* BW31. Nově charakterizovaný protein zvyšoval toleranci buněk *S. cerevisiae* BW31 k Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup> méně účinně než *Spsod2p*, na rozdíl od kratšího antiporteru však udělil buňkám vyšší toleranci ke K<sup>+</sup> a Rb<sup>+</sup>. Podobně jako v případě *Spsod2p* (KINCLOVÁ *et al.* 2002), i funkce *Spsod22p* byla velmi výrazně negativně ovlivněna zvýšením pH okolí buněk. Výstup kationtů z buněk zprostředkovaný *Spsod22p* je pravděpodobně příliš pomalý, abychom ho dokázali detekovat standardním postupem úspěšně využitým při charakterizaci antiporterů z jiných kvasinek. Skutečnost, že zvýšení tolerance buněk k přítomnosti solí v médiu je dáno exportem kationtů z buněk, jsme tak ověřili kultivací buněk v přítomnosti NaCl a následným změřením obsahu Na<sup>+</sup> uvnitř buněk. Tento experiment prokázal, že buňky produkující *Spsod22p* obsahují za těchto podmínek v porovnání s negativní kontrolou výrazně méně sodných kationtů, které jsou tedy proteinem aktivně z buněk vylučovány. Kvasinka *S. pombe* tak obsahuje, podobně jako *Y. lipolytica*, dva různé Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery plasmatické membrány s odlišnou substrátovou specifitou a pravděpodobně i odlišnými funkcemi ve fyziologii buněk. Zatímco *Spsod2p* je především systémem udílejícím buňkám vyšší toleranci k přítomnosti toxických kationtů v prostředí, *Spsod22p* se zdá být v této funkci méně účinný než



*Spsod2p* a mohl by tak díky své schopnosti transportovat  $K^+$  hrát v buňkách roli především v udržování stálé koncentrace  $K^+$  uvnitř buněk, buněčného objemu a pH cytoplasmy.

## 4.6 Měření výstupu kationtů z buněk *S. cerevisiae* produkujících Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *ZrNha1* osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii*

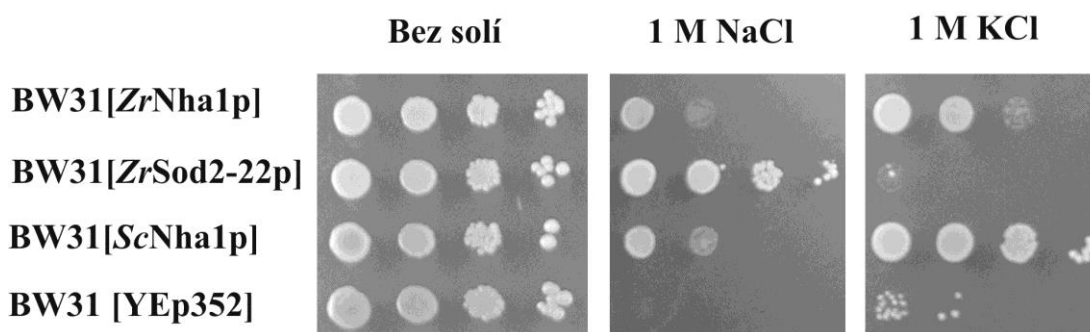
### 4.6.1 Úvod

Poslední kvasinkou, v níž byl doposud znám pouze antiporter rodiny Nha1 s úzkou substrátovou specifitou pro Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup>, byla osmotolerantní kvasinka *Z. rouxii*. Zajímalo nás tedy, zda i tato kvasinka neobsahuje Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plasmatické membrány se schopností transportovat draselné kationty. Kompletní sekvenace genomu kmene CBS 732 této kvasinky probíhá v rámci projektu Génolevures (dosud nepublikované výsledky). Kolegyni z laboratoře, Mgr. L. Příbylové, byl umožněn přístup do prozatím neanotované databáze se sekvencí genomu *Z. rouxii*, v níž se jí podařilo nalézt gen *ZrNHA1* kódující Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plasmatické membrány (PŘIBYLOVÁ *et al.* rukopis v přípravě). *ZrNha1p* je tvořen 994 aminokyselinovými zbytky a, studujeme-li sekvenční identitu konzervovaných transmembránových oblastí antiporterů, je trochu podobnější proteinu Nha1 kvasinky *S. cerevisiae* než druhému antiporteru, *ZrSod2-22p*, původně nalezenému ve studovaném kmeni *Z. rouxii* (Tab. 4).

**Tab. 4:** Sekvenční identita (%) transmembránových oblastí antiporterů

Antiporter	<i>ScNha1p</i>	<i>ZrSod2-22p</i>	<i>ZrNha1p</i>
<i>ZrSod2-22p</i>	76,1	-	76,1
<i>ZrNha1p</i>	78,3	76,1	-

Mgr. L. Příbylová gen *ZrNHA1* izolovala a vložila do mnohokopiového kvasinkového vektoru YEp352 za promotor genu *ScNHA1*. Získaný plasmid vnesla do kmene *S. cerevisiae* postrádajícího vlastní systémy pro výstup kationtů alkalických kovů (kmen BW31, *nha1Δ ena1-4Δ*). Vlastnosti nového antiporteru tak bylo možno studovat za stejných podmínek jako vlastnosti proteinů z *D. hansenii*, *Y. lipolytica* či *S. pombe*. Protein *ZrNha1* zvýšil toleranci buněk *S. cerevisiae* k přítomnosti Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> v médiu (Obr. 6). Tento výsledek naznačil, že *ZrNha1p* má, podobně jako *ScNha1p*, širokou substrátovou specifitu.



**Obr. 6:** Růst buněk kmene BW31 produkujících *ZrNha1p*, *ZrSod2-22p* nebo *ScNha1p* (exprese kódujících genů probíhala z plasmidů odvozených od YEp352) a buněk transformovaných prázdným vektorem na miskách s médiem YNB obsahujícím různé soli. Převzato od Mgr. L. Příbylové.

Abychom ověřili, zda zvýšení tolerance k solím buněk BW31 produkujících antiporter *ZrNha1* patrné z Obr. 6 je skutečně způsobeno exportem kationtů z buněk, studovali jsme v rámci této disertační práce výstup sodných a draselných kationtů z buněk BW31 produkujících nově nalezený protein *ZrNha1*. Funkčnost proteinu byla porovnána s aktivitou druhého antiporteru *Z. rouxii* (*ZrSod2-22p*) majícího úzkou substrátovou specifitu a proteinu *Nha1* modelové kvasinky *S. cerevisiae* transportujícího z buněk i draselné kationty.

## 4.6.2 Materiál a metody

### 4.6.2.1 Použitý kvasinkový kmen, plasmidy a médium

Pro heterologní expresi antiporterů byl využit kmen *S. cerevisiae* BW31, postrádající systémy pro výstup kationtů alkalických kovů (*nha1Δ ena1-4Δ*, KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2005). Buňky obsahovaly „prázdný“ vektor YEp352 (HILL *et al.* 1986), nebo plasmidy odvozené od tohoto vektoru obsahující za promotorem genu *ScNHA1* sekvence kódující *ScNha1p* (pNHA1-985, KINCLOVÁ *et al.* 2001a), *ZrSod2-22p* (pZrSod2-22, KINCLOVÁ *et al.* 2001b), nebo *ZrNha1p* (PŘIBYLOVÁ *et al.* rukopis v přípravě). Buňky BW31 byly kultivovány aerobně za stálého třepání v tekutém

minimálním médiu YNB (Difco) obsahujícím 0,5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 % glukózu a auxotrofní přídavky při 30 °C.

#### 4.6.2.2 Měření výstupu kationtů z buněk

Pro měření výstupu  $\text{K}^+$  byly buňky v časné exponenciální fázi růstu ( $\text{OD}_{600}$  přibližně 0,2) sklizeny, promyty deionizovanou vodou a resuspendovány v 50 ml inkubačního pufru o pH 4,5 (10 mM Tris, 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 % glukóza; pH bylo nejprve upraveno pomocí kyseliny citronové na hodnotu 4,4 a následně zvýšeno přidáním  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na hodnotu 4,5) obsahujícím 20 mM  $\text{RbCl}$  pro zabránění zpětnému vstupu  $\text{K}^+$  do buněk. Devět alikvótů buněčné suspence (5 ml) bylo odebráno v průběhu 120 min.

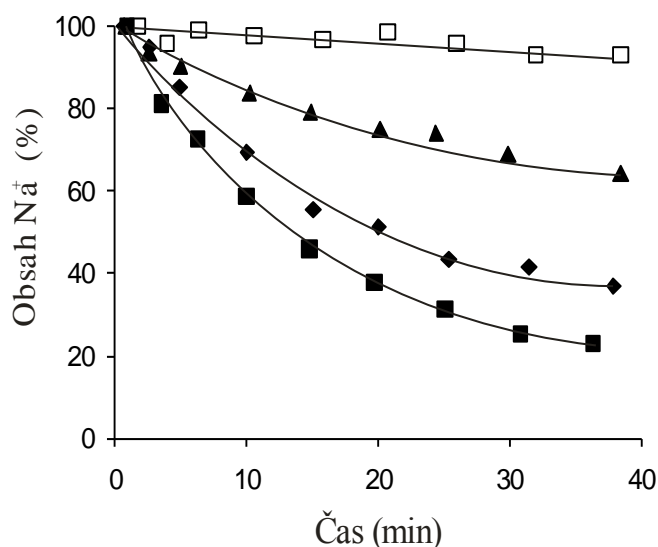
Pro měření výstupu  $\text{Na}^+$  byly buňky v časné exponenciální fázi růstu nejprve preinkubovány po dobu 1 hod v médiu YNB obsahujícím 100 mM  $\text{NaCl}$  o pH 7,0 (pH média bylo zvýšeno přidáním  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Po preinkubaci byly buňky sklizeny, promyty a resuspendovány v 50 ml inkubačního pufru o pH 4,5 obsahujícím 20 mM  $\text{KCl}$  pro zabránění zpětnému vstupu  $\text{Na}^+$  do buněk. Devět alikvótů buněčné suspence (5 ml) bylo odebráno v průběhu 40 min.

Odebrané vzorky buněk byly filtrovány, promyty 20 mM  $\text{MgCl}_2$  a lyzovány v roztoku obsahujícím 10 mM  $\text{MgCl}_2$  a 0,2 M  $\text{HCl}$ . Obsah kationtů ve vzorcích buněk byl stanoven pomocí plamenové atomové absorpční spektrofotometrie (KINCLOVÁ *et al.* 2001a). Experimenty byly opakovány třikrát, ukázán je reprezentativní výsledek.

#### 4.6.3 Výsledky a diskuse

Pro měření výstupu sodných kationtů z buněk produkujících testované antiportery bylo nutno nejprve buňky preinkubovat v médiu obsahujícím  $\text{NaCl}$ , abychom zvýšili vnitrobuněčnou koncentraci těchto kationtů. Hodnota pH média použitého pro preinkubaci byla upravena na 7,0, abychom během této preinkubace minimalizovali export  $\text{Na}^+$  z buněk činností studovaných antiporterů, jejichž funkčnost je závislá na pH prostředí. Inkubační pufr, v němž jsme měřili výstup kationtů z buněk, měl naopak nízké pH (4,5), abychom zajistili vytvoření výrazného gradientu protonů přes plasmatickou membránu buněk, který je nezbytný pro funkci antiporterů.

Jak je patrné z Obr. 7, buňky neobsahující žádný systém pro výstup kationtů alkalických kovů (negativní kontrola, buňky transformované „prázdným“ YEp352) ztrácejí v průběhu experimentu jen minimum vnitrobuněčného  $\text{Na}^+$ . Naproti tomu, v buňkách produkujících kterýkoli ze studovaných antiporterů se v průběhu pokusu obsah  $\text{Na}^+$  snižuje, dochází tedy k exportu těchto kationtů. Výstup  $\text{Na}^+$  z buněk produkujících ZrSod2-22p byl menší než v případě produkce proteinu ScNha1, ve shodě s dříve popsány výsledky (KINCLOVÁ *et al.* 2002). Buňky obsahující ZrNha1p během pokusu ztratily přibližně 40 % původního obsahu  $\text{Na}^+$ , což je méně než v případě buněk produkujících ScNha1p nebo ZrSod2-22p. Získané výsledky potvrzují, že zvýšená tolerance k přítomnosti NaCl kmene BW31 produkujícího ZrNha1p v porovnání s negativní kontrolou (Obr. 6) je dána aktivním exportem sodných kationtů z buněk *S. cerevisiae*.

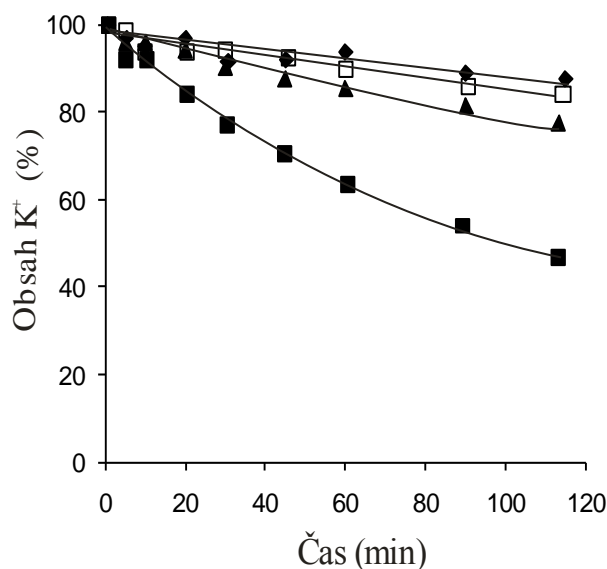


**Obr. 7:** Výstup sodných kationtů z buněk BW31 produkujících různé  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány. □ Buňky transformované YEp352, ■ buňky produkující ScNha1p, ◆ buňky produkující ZrSod2-22p, ▲ buňky produkující ZrNha1p.

Pro měření výstupu draselných kationtů z buněk není třeba žádná preinkubace, neboť buňky přirozeně obsahují dostatečné množství  $\text{K}^+$  v cytoplasmě. Jak je patrné z Obr. 8, určitý malý výstup  $\text{K}^+$  jsme zaznamenali i v případě buněk transformovaných YEp352 a

buněk exprimujících *ZrSOD2-22* (gen kódující protein nerozpoznávající  $K^+$  jako substrát). Zřetelnější výstup  $K^+$  jsme však naměřili z buněk produkujících *ZrNha1p*, ačkoli byl tento výstup podstatně nižší než z buněk produkujících *ScNha1p*.

Jak je patrné z Tab. 5, buňky neobsahující systém pro výstup  $K^+$  (transformované YEp352 nebo pZrSod2-22) ztrácí v průběhu 120 min přibližně 70 – 100 nmol  $K^+$ /mg suché váhy buněk. Buňky exprimující *ZrNHA1* exportují za 120 min přibližně 1,7 až 2,3krát více draselných kationtů než obě negativní kontroly. Největší výstup draselných kationtů jsme souhlasně s kapkovými testy naměřili z buněk produkujících *ScNha1p*. Přestože se zdá být výstup  $K^+$  z buněk exprimujících *ZrNHA1* pomalý ve srovnání s buňkami exprimujícími *ScNHA1*, je zřejmě zcela dostačující pro umožnění růstu buněk za přítomnosti vyšších koncentrací  $K^+$  v médiu (Obr. 6). Takový rozdíl mezi zvýšenou tolerancí buněk ke  $K^+$  v médiu a rychlostí transportu byl již pozorován v případě mutovaných verzí proteinu *ZrSod2-22* se schopností transportovat  $K^+$  (KINCLOVÁ-ZIMMERMANNOVÁ *et al.* 2005), delšího antiporteru *Y. lipolytica* (publikace č. 3), případně antiporteru *Spsod22* kvasinky *S. pombe* (publikace č. 4).



**Obr. 8:** Výstup draselných kationtů z buněk BW31 produkujících různé  $Na^+/H^+$  antiportery plasmatické membrány. □ Buňky transformované YEp352, ■ buňky produkující *ScNha1p*, ◆ buňky produkující *ZrSod2-22p*, ▲ buňky produkující *ZrNha1p*.

**Tab. 5:** Průměrná ztráta  $K^+$  z buněk BW31 produkujících různé antiportery během 120 min

Antiporter produkovaný BW31	Průměrná ztráta $K^+$ (nmol/mg suché váhy)
Žádný (YEp352)	96,63 ± 2,54
<i>ScNha1p</i>	290,07 ± 26,29
<i>ZrSod2-22p</i>	70,85 ± 3,70
<i>ZrNha1p</i>	160,00 ± 10,78

*Z. rouxii* (kmen CBS 732) tedy obsahuje kromě proteinu *ZrSod2-22p* eliminujícího z buněk toxické kationty i další přenašeč z rodiny  $Na^+/H^+$  antiporterů plasmatické membrány, který transportuje  $K^+$  a může se tak v buňkách podílet na udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $K^+$ , stálého buněčného objemu nebo pH cytoplasmy.

## 4.7 Publikace č. 5 - Spolupůsobení osmotického a teplotního stresu vede ke zlepšení růstu buněk *D. hansenii*

V našich prvotních experimentech studujících halotoleranci dvou divokých kmenů *D. hansenii* (CBS 767 a CBS 1793, publikace č. 2) jsme zjistili, že kmen CBS 767 roste lépe při teplotě nižší než 30 °C, což je obvyklá teplota pro kultivaci kvasinek. Tato teplota pro kmen CBS 767 zřejmě již představuje teplotní stres. *D. hansenii* je jednou z kvasinek často nalézáných jako kontaminanty v různých druzích potravin. Vzhledem k tomu, že teplota i přítomnost solí jsou důležité parametry v potravinářském průmyslu, zajímalo nás, zda zlepšení růstu *D. hansenii* v přítomnosti solí (popsané za běžných kultivačních teplot 28 – 30 °C jako jedna z typických vlastností této kvasinky odlišujících ji od *S. cerevisiae*, viz kap. 2.4.1) bude patrné i za teploty nižší a vhodnější pro kultivaci této kvasinky. Ukázali jsme, že zlepšení růstu *D. hansenii* CBS 767 za přítomnosti NaCl je signifikantní pouze při teplotě, která již představuje pro tuto kvasinku teplotní stres. Při nižší teplotě (vhodnější pro *D. hansenii* CBS 767) jsme nepozorovali stimulaci růstu za přítomnosti NaCl. Kromě toho, růst *D. hansenii* CBS 767 při supraoptimální teplotě je zlepšen i přidáním KCl či sorbitolu do média. Jedná se tedy zřejmě o účinek spolupůsobení osmotického a teplotního stresu na kvasinku, který vede ke stimulaci jejího růstu. Tento efekt přítomnosti dvou různých stresových podmínek není závislý na použitém kmeni kvasinky (je možné ho pozorovat i pro halotolerantnější kmen CBS 1793) a není dokonce typický ani pro tuto kvasinku, neboť zlepšení růstu za podmínek spolupůsobení osmotického a teplotního stresu jsme pozorovali i u buněk *S. cerevisiae* či *S. pombe*. Studovali jsme také vliv přítomnosti NaCl na růst *D. hansenii* v prostředí obsahujícím kyselinu benzoovou (často používaný konzervační prostředek v potravinářském průmyslu); v tomto případě však přítomnost soli růst buněk nezlepšuje.



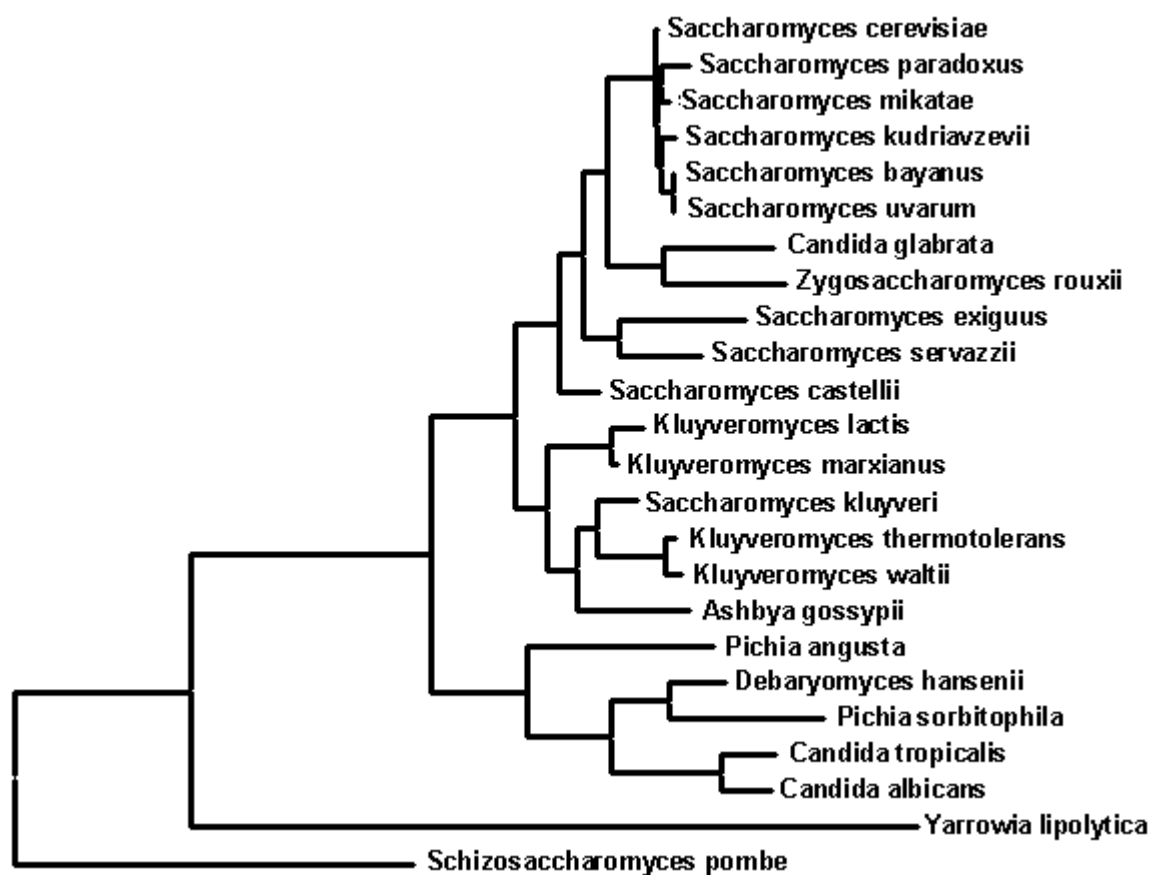
## 4.8 Závěr

V této disertační práci jsme se především pokusili přinést více poznatků o vlastnostech a funkcích  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány v různých, vzájemně nepříbuzných kvasinkách a tím přispět k nalezení odpovědi na otázku, jaká by mohla být primární fyziologická úloha těchto proteinů (eliminace toxických kationtů z buněk anebo komplexnější role s účastí na udržování stabilního vnitrobuněčného obsahu draselných kationtů, stálého objemu buněk a cytoplasmatického pH). Sekvence kódující antiportery typu Nha1 byly nalezeny ve všech známých kvasinkových genomových sekvencích (publikace č. 1), což naznačuje, že se jedná o fylogeneticky konzervované přenašeče s významnou rolí ve fyziologii buněk.

Podle substrátové specifity byly tyto proteiny rozděleny do dvou skupin (kap. 2.2.6, KINCLOVÁ *et al.* 2002). První podrodina těchto antiporterů (zastoupená proteiny *ZrSod2-22* a *Spsod2*, které rozpoznávají jako substrát pouze toxické sodné a lithné kationty) hraje ve fyziologii kvasinek roli zřejmě především v detoxifikaci buněk. Proteiny patřící do druhé skupiny těchto přenašečů (*ScNha1p*, *CaCnh1p*, *PsNha1p*, *CtNha1p*) mají širokou substrátovou specifitu a kromě toxických kationtů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  jsou schopny z buněk exportovat i hlavní vnitrobuněčný kation  $\text{K}^+$ , případně jeho analog  $\text{Rb}^+$ . Úloha takových proteinů ve fyziologii buněk je zřejmě komplexnější; kromě podílu na odstraňování toxických iontů z cytoplasmy hrají tyto antiportery pravděpodobně roli i v udržování optimální vnitrobuněčné koncentrace  $\text{K}^+$ , buněčného objemu a stálého pH cytoplasmy (KINCLOVÁ *et al.* 2002).

Studium substrátové specifity, transportních vlastností a také pravděpodobných funkcí  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány z různých, vzájemně nepříbuzných kvasinkových druhů v rámci této disertační práce ukázalo, že antiporter *DhNha1* halotolerantní kvasinky *D. hansenii* rozšiřuje skupinu přenašečů se širokou substrátovou specifitou a genomové sekvence tří kvasinkových druhů (*Y. lipolytica*, *S. pombe* a *Z. rouxii*) kódují dva různé geny, jejichž produkty jsou  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány s odlišnou substrátovou specifitou (případně afinitou k jednotlivým substrátům) a pravděpodobně i funkcí. Jeden z antiporterů se v těchto kvasinkách zřejmě účastní především eliminace toxických sodných anebo lithných kationtů, druhý přenašeč rozpoznává jako substrát  $\text{K}^+$  a může tak v kvasinkách hrát roli v zajištění optimální

vnitrobuněčné koncentrace tohoto kationtu, stálého buněčného objemu a cytoplasmatického pH.



**Obr. 9:** Fylogenetický strom kvasinkových druhů s částečně nebo kompletně sekvenovanými genomy. Převzato ze stránek projektu Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>).

V tuto chvíli není známa žádná kvasinka, která by neobsahovala gen kódující  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter plasmatické membrány se schopností transportovat  $\text{K}^+$ ; zdá se tedy, že přítomnost alespoň jednoho antiporteru se schopností exportovat z buněk draselné kationty a podílet se tak na udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $\text{K}^+$ , stálého buněčného objemu či pH cytoplasmy je mezi kvasinkami evolučně konzervovaná. Druhy fylogeneticky bližší kvasince *S. cerevisiae* (*P. sorbitophila*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *D. hansenii*, fylogenetický strom viz Obr. 9) i sama tato kvasinka obvykle obsahují jeden antiporter typu Nha, který má širokou substrátovou specifitu a v buňkách se může účastnit nejen eliminace toxických kationtů, ale i dalších buněčných procesů (udržování stálého

vnitrobuněčného obsahu  $K^+$ , stabilního buněčného objemu či cytoplasmatického pH). Druhy fylogeneticky vzdálené od *S. cerevisiae* (*Y. lipolytica*, *S. pombe*) obsahují dva navzájem si nepříliš podobné  $Na^+/H^+$  antiportery plasmatické membrány, z nichž jeden se podílí na detoxifikaci buněk a druhý může díky své schopnosti transportovat draselné kationty hrát roli v zajištění stabilní koncentrace  $K^+$  v buňkách, stálého buněčného objemu a pH cytoplasmy. Dva  $Na^+/H^+$  antiportery plasmatické membrány obsahuje i osmotolerantní kvasinka *Z. rouxii*, fylogeneticky blízká *S. cerevisiae*. Podobně jako v případě *Y. lipolytica* či *S. pombe*, proteiny se liší substrátovou specifitou i pravděpodobnou funkcí. Vzhledem k tomu, že kvasinkové druhy fylogeneticky starší než *Z. rouxii* (např. *C. albicans* či *D. hansenii*) i fylogeneticky mladší než tato kvasinka (*S. cerevisiae*) obsahují pouze jeden antiporter typu Nha1, je pravděpodobné, že existence dvou těchto přenašečů v kvasince *Z. rouxii* nesouvisí s přítomností dvou různých genů kódujících  $Na^+/H^+$  antiportery plasmatické membrány ve fylogeneticky velmi vzdálených kvasinkách *Y. lipolytica* a *S. pombe*, ale je spíše důsledkem duplikace jednoho prekurzorového genu v *Z. rouxii* a následným rozrůzněním vlastností i funkcí kódovaných proteinů.

Shrneme-li tedy doposud známé poznatky o kvasinkových  $Na^+/H^+$  antiporterech plasmatické membrány, je pravděpodobné, že fyziologická úloha těchto proteinů je komplexnější než pouhý podíl na eliminaci toxických sodných či lithných kationtů z buněk. Přenašeče se schopností exportovat z buněk hlavní vnitrobuněčný kation  $K^+$  se mohou v kvasinkách významně účastnit zajištění optimální koncentrace tohoto kationtu v cytoplasmě, udržení stabilního buněčného objemu i regulaci pH cytoplasmy např. v případě její náhlé alkalizace.

## **5. SOUHRN**

Nejdůležitější výsledky získané v rámci této disertační práce, která přispěla k porozumění fyziologické roli kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány, je možno shrnout do těchto bodů:

1. Studium kvasinkových  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů na úrovni jejich sekvencí (publikace č. 1) ukázalo, že struktura všech tří skupin antiporterů (Nha1, Nhx1 i Kha1) pravděpodobně obsahuje 12 transmembránových segmentů, v sekvencích proteinů jsme našli některé konzervované aminokyseliny či motivy, jež by mohly být významné pro aktivitu antiporterů, a námi provedená fylogenetická studie ukázala, že proteiny Nhx1 jsou příbuzné savčím a rostlinným  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterům, proteiny Kha1 se zdají být nejpříbuznější s bakteriálními antiportery a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány (rodina Nha1) tvoří oddělenou vývojovou větev, jejíž představitelé byli doposud charakterizováni jen v houbových organismech.
2. Gen *DhNHA1* kvasinky *D. hansenii* kóduje  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter plasmatické membrány se širokou substrátovou specifitou (publikace č. 2). Tento protein se tedy může v *D. hansenii* podílet na eliminaci toxických kationtů  $\text{Na}^+$  ( $\text{Li}^+$ ) z buněk i na udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $\text{K}^+$ , stálého buněčného objemu a pH cytoplasmy díky své schopnosti exportovat z buněk draselné kationty. V publikaci č. 2 jsme také zjistili sekvenci genu *NHA1* kmene CBS 1793 kvasinky *D. hansenii*; sekvence byla uložena v databázi EMBL pod přístupovým číslem AJ876409.
3. Kvasinka *Y. lipolytica* obsahuje dva  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány s odlišnou úlohou ve fyziologii buněk (publikace č. 3). Protein *YNha1* se v buňkách díky své schopnosti exportovat draselné kationty pravděpodobně účastní udržování stálého vnitrobuněčného obsahu  $\text{K}^+$ , stabilního buněčného objemu a cytoplasmatického pH. *YNha2p* se ukázal být velmi účinným systémem pro eliminaci toxických iontů  $\text{Na}^+$  ( $\text{Li}^+$ ) z buněk. Tato schopnost *YNha2p* by mohla být využita pro zvýšení tolerance k NaCl průmyslových kmenů *S. cerevisiae* při nižších hodnotách pH prostředí (kap. 4.4).
4. Podobně jako *Y. lipolytica*, i *S. pombe* obsahuje dva různé  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery plasmatické membrány mající zřejmě odlišné úlohy ve fyziologii buněk (publikace č. 4). Na rozdíl od dříve popsaného antiporteru *Spsod2*, je námi charakterizovaný protein

*Spsod22* schopen transportovat  $K^+$  a hrát tak roli v udržování stabilní vnitrobuněčné koncentrace  $K^+$ , stálého buněčného objemu a pH cytoplasmy.

5. Gen *ZrNHA1* nalezený při systematické sekvenaci genomu kmene CBS 732 kvasinky *Z. rouxii* kóduje antiporter se schopností exportovat z buněk sodné i draselné kationty. I tato kvasinka tedy obsahuje kromě proteinu *ZrSod2-22p* eliminujícího z buněk toxické kationty další  $Na^+/H^+$  antiporter plasmatické membrány, který transportuje  $K^+$  a může se tak v buňkách podílet na udržování stabilního obsahu  $K^+$  uvnitř buněk, stálého buněčného objemu anebo cytoplasmatického pH (kap. 4.6).
6. Studium substrátové specifity, transportních vlastností a také pravděpodobných funkcí  $Na^+/H^+$  antiporterů plasmatické membrány z různých, vzájemně nepříbuzných kvasinkových druhů ukázalo, že přítomnost alespoň jednoho antiporteru se schopností exportovat z buněk draselné kationty a podílet se tak na udržování stabilní cytoplasmatické koncentrace  $K^+$ , stálého buněčného objemu či pH cytoplasmy je mezi kvasinkami evolučně konzervovaná. Zdá se tedy, že fyziologická role těchto proteinů je komplexní a nespočívá pouze v podílu na eliminaci toxických kationtů z buněk.
7. Spolupůsobení osmotického a teplotního stresu vede v kvasince *D. hansenii* ke stimulaci jejího růstu, při snížení teploty kultivace na hodnotu vhodnější pro růst kvasinky tento efekt vyššího osmotického tlaku prostředí možné pozorovat není (publikace č. 5). Toto spolupůsobení osmotického a teplotního stresu navíc není typické pouze pro *D. hansenii*, zlepšení růstu v přítomnosti obou stresových podmínek je možno nalézt i u *S. cerevisiae* či *S. pombe*.

## **6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY**

- Albrecht EB, Hunyady AB, Stark GR, Patterson TE (2000) Mechanisms of *sod2* gene amplification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **11**: 873-886
- Ali R, Brett CL, Mukherjee S, Rao R (2004) Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem* **279**: 4498-4506
- Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int J Food Microbiol* **56**: 191-197
- Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J (2001) Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**: 3251-3255
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258
- Aronson PS (1985) Kinetic properties of the plasma membrane Na-H exchanger. *Annu Rev Physiol* **47**: 545-560
- Attaphitaya S, Park K, Melvin JE (1999) Molecular cloning and functional expression of a rat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* **274**: 4383-4388
- Attaphitaya S, Nehrke K, Melvin JE (2001) Acute inhibition of brain-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 by protein kinases A and C and cell shrinkage. *Am J Physiol* **281**: C1146-C1157
- Baird NR, Orłowski J, Szabo EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG, Shull GE (1999) Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* **274**: 4377-4382
- Bañuelos MA, Sychrová H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**: 2749-2758
- Bañuelos MA, Ramos J, Calero F, Braun V, Potier S (2002) Cation/H<sup>+</sup> antiporters mediate potassium and sodium fluxes in *Pichia sorbitophila*. Cloning of the *PsNHA1* and *PsNHA2* genes and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 1365-1372



- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 219-237
- Bertl A, Bihler H, Reid JD, Kettner C, Slayman CL (1998) Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K<sup>+</sup> channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J Membr Biol* **162**: 67-80
- Bertl A, Ramos J, Ludwig J, Lichtenberg-Frate H, Reid J, Bihler H, Calero F, Martinez P, Ljungdahl PO (2003) 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
- Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, Aronson PS (1992) Immunocytochemical characterization of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am J Physiol* **263**: F833-F840
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A (1998) NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **432**: 59-64
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A (2002) Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**: 109-118
- Bowers K, Levi BP, Patel FI, Stevens TH (2000) The sodium/proton exchanger Nhxl is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 4277-4294
- Brant SR, Yun CHC, Donowitz M, Tse C-M (1995) Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol* **269**: C198-C206
- Brett CL, Wei Y, Donowitz M, Rao R (2002) Human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C1031-C1041
- Brett CL, Tukaye DN, Mukherjee S, Rao RJ (2005a) The yeast endosomal Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger Nhxl regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **16**: 1396-1405

- Brett CL, Donowitz M, Rao R (2005b) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C223-C239
- Breuer U, Harms H (2006) *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**: 415-437
- Casaregola S, Neuveglise C, Lepingle A, Bon E, Feynerol C, Artiguenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett* **487**: 95-100
- Cellier F, Conejero G, Ricaud L, Luu DT, Lepetit M, Gosti F, Casse F (2004) Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant J* **39**: 834-846
- Chambrey R, Achard JM, and Warnock DG (1997) Heterologous expression of rat NHE4: a highly amiloride-resistant Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform. *Am J Physiol Cell Physiol* **272**: C90-C98
- Chambrey R, St John PL, Eladari D, Quentin F, Warnock DG, Abrahamson DR, Podevin RA, Paillard M (2001) Localization and functional characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol* **281**: F707-F717
- Chang AB, Lin R, Studley WK, Tran CV, Saier MH (2004) Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol Membr Biol* **21**: 171-181
- Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H, Barber DL (2000) Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H<sup>+</sup> translocation. *Mol Cell* **6**: 1425-1436
- Dibrov P, Smith JJ, Young PG, Fliegel L (1997) Identification and localization of the *sod2* gene product in fission yeast. *FEBS Lett* **405**: 119-124
- Dibrov P, Fliegel L (1998) Comparative molecular analysis of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers: a unified model for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport? *FEBS Lett* **424**: 1-5
- Dibrov P, Young PG, Fliegel L (1998) Functional analysis of amino acid residues essential for activity in the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger of fission yeast. *Biochemistry* **37**: 8282-8288
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, de Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V,

- Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, de Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44
- Ferguson GP, Totemeyer S, MacLean MJ, Booth IR (1998) Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Arch Microbiol* **170**: 209-218
- Flegelová H, Sychrová H (2005) Mammalian NHE2 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger mediates efflux of potassium upon heterologous expression in yeast. *FEBS Lett* **579**: 4733-4738
- Fliegel L (2005) Identification of conserved polar residues important for salt tolerance by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biochem* **268**: 83-92
- Fliegel L, Wiebe C, Chua G, Young PG (2005) Functional expression and cellular localization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Sod2 of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Physiol Pharmacol* **83**: 565-572
- Flis K, Hinzpeter A, Edelman A, Kurlandzka A (2005) The functioning of mammalian CIC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochem J* **390**: 655-664
- Froschauer E, Nowikovsky K, Schweyen RJ (2005) Electroneutral K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1711**: 41-48
- Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y (1999) Molecular cloning and expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 149-155
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y (2004) Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol* **45**: 146-159

- Gaber RF, Styles CA, Fink GR (1988) *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**: 2848-2859
- Galili L, Rothman A, Kozachkov L, Rimon A, Padan E (2002) Trans membrane domain IV is involved in ion transport activity and pH regulation of the NhaA-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**: 609-617
- Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Banuelos MA, Haro R, Rodriguez-Navarro A (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**: 363-368
- Gaxiola RA, Rao RI, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1 can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1480–1485
- Gerchman Y, Olami Y, Rimon A, Taglicht D, Schuldiner S, Padan E (1993) Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1212-1216
- Gerchman Y, Rimon A, Venturi M, Padan E (2001) Oligomerization of NhaA, the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. *Biochemistry* **40**: 3403-3412
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-567
- Gonzalez-Hernandez JC, Cardenas-Monroy CA, Pena A (2004) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **21**: 403-412
- Hahnenberger KM, Jia Z, Young PG (1996) Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5031-5036
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3735-3740

- Hamada A, Hibino T, Nakamura T, Takabe T (2001) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Synechocystis* species PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity. *Plant Physiol* **125**: 437–446
- Haro R, Garciadeblas B, Rodriguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**: 189-191
- Haro R, Rodriguez-Navarro A (2002) Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1564**: 114-122
- Hellmer J, Patzold R, Zeilinger C (2002) Identification of a pH regulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Methanococcus jannaschii*. *FEBS Lett* **527**: 245–249
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, Tzagoloff A (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167
- Hunte C, Screpanti E, Venturi M, Rimon A, Padan E, Michel H (2005) Structure of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* **435**: 1197-1202
- Inoue H, Noumi T, Tsuchiya T, Kanazawa H (1995) Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164, in the transmembrane helices of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (NhaA) from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **363**: 264-268
- Iwaki T, Higashida Y, Tsuji H, Tamai Y, Watanabe Y (1998) Characterization of a second gene (ZSOD22) of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of ZSOD2 and ZSOD22 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1167-1174
- Jia ZP, McCullough N, Martel R, Hemmingsen S, Young PG (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J* **11**: 1631-1640
- Kamauchi S, Mitsui K, Ujike S, Haga M, Nakamura N, Inoue H, Sakajo S, Ueda M, Tanaka A, Kanazawa H (2002) Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (Nha1p). *J Biochem* **131**: 821-831

- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**: 690-695
- Kinclová O, Ramos J, Potier S, Sychrová H (2001a) Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**: 656-668
- Kinclová O, Potier S, Sychrová H (2001b) The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes. *J Biotechnol* **88**: 151-158
- Kinclová O, Potier S, Sychrová H (2001c) The *Candida albicans* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter exports potassium and rubidium. *FEBS Lett* **504**: 11-15
- Kinclová O, Potier S, Sychrová H (2002) Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H<sup>+</sup> antiporters into two subfamilies. *Microbiology* **148**: 1225-1232
- Kinclová-Zimmermannová O, Flegelová H, Sychrová H (2004) Rice Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters. *Folia Microbiol* **49**: 519-525
- Kinclová-Zimmermannová O, Zavřel M, Sychrová H (2005) Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *J Biol Chem* **280**: 30638-30647
- Kinclová-Zimmermannová O, Sychrová H (2006) Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* **49**: 229-236
- Kinclová-Zimmermannová O, Gášková D, Sychrová H (2006a) The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**: 792-800
- Kinclová-Zimmermannová O, Zavřel M, Sychrová H (2006b) Importance of seryl and threonyl residues of the fifth transmembrane domain to the substrate specificity of yeast plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *Mol Membr Biol* **23**: 349-361
- Ko CH, Buckley AM, Gaber RF (1990) *TRK2* is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**: 305-312

- Ko CH, Gaber RF (1991) *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 4266-4273
- Kuroda T, Bihler H, Bashi E, Slayman CL, Rivetta A (2004) Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J Membr Biol* **198**: 177-192
- Lepingle A, Casaregola S, Neuveglise C, Bon E, Nguyen H, Artiguenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Lett* **487**: 82-86
- Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* **280**: 1943-1945
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu J (2000) The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3730-3734
- Madrid R, Gomez MJ, Ramos J, Rodriguez-Navarro A (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**: 14838-14844
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* **109**: 63-81
- Maher MM, Gontarek JD, Bess RS, Donowitz M, Yeo CJ (1997) The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange isoform NHE3 regulates basal canine ileal Na<sup>+</sup> absorption in vivo. *Gastroenterology* **112**: 174-183
- Malakooti J, Dahdal RY, Schmidt L, Layden TJ, Dudeja PK, Ramaswamy K (1999) Molecular cloning, tissue distribution, and functional expression of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE2. *Am J Physiol* **277**: G383-G390
- Marešová L, Sychrová H (2005) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**: 588-600
- Marešová L, Urbánková E, Gášková D, Sychrová H (2006) Measurements of plasma membrane potential changes in *S. cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* **6**: 1039-1046
- Marešová L, Sychrová H (2006) *Arabidopsis thaliana* *CHX17* gene complements the *kha1* deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* in press

- Marquez JA, Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* **382**: 89-92
- Martinez P, Persson BL (1998) Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**: 628–638
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 1646–1667
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 8792–8796
- Mitsui K, Kamauchi S, Nakamura N, Inoue H, Kanazawa H (2004a) A conserved domain in the tail region of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) plays important roles in localization and salinity-resistant cell-growth. *J Biochem* **135**: 139-148
- Mitsui K, Ochi F, Nakamura N, Doi Y, Inoue H, Kanazawa H (2004b) A novel membrane protein capable of binding the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 12438-12447
- Mitsui K, Yasui H, Nakamura N, Kanazawa H (2005) Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1p: implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta* **1720**: 125-136
- Miyazaki E, Sakaguchi M, Wakabayashi, S, Shikegawa M, Mihara K (2001) NHE6 protein possesses a signal peptide destined for endoplasmic reticulum membrane and localizes in secretory organelles of the cell. *J Biol Chem* **276**: 49221-49227
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR, Serrano R (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* **19**: 3328-3337
- Munro AW, Ritchie GY, Lamb AJ, Douglas RM, Booth IR (1991) The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium-efflux system KefC of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 607-616



- Nass R, Cunningham KW, Rao R (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**: 26145-26152
- Nass R, Rao R (1998) Novel localization of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **273**: 21054-21060
- Nass R, Rao R (1999) The yeast endosomal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **145**: 3221-3228
- Neves ML, Oliveira RP, Lucas CM (1997) Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **143**: 1133-1139
- Nishikawa A, Tomomatsu H, Sugita T, Ikeda R, Shinoda T (1996) Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *J Med Vet Mycol* **34**: 411-419
- Nowikovsky K, Froschauer EM, Zsurka G, Samaj J, Reipert S, Kolisek M, Wiesenberger G, Schweyen RJ (2004) The *LETMI/YOL027* gene family encodes a factor of the mitochondrial  $\text{K}^+$  homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* **279**: 30307-30315
- Numata M, Petrecca K, Lake N, Orlowski J (1998) Identification of a mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *J Biol Chem* **273**: 6951-6959
- Numata M, Orlowski J (2001) Molecular cloning and characterization of a novel  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)/\text{H}^+$  exchanger localized to the *trans*-Golgi network. *J Biol Chem* **276**: 17387-17394
- Ohgaki R, Nakamura N, Mitsui K, Kanazawa H (2005) Characterization of the ion transport activity of the budding yeast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1712**: 185-196
- Olami Y, Rimon A, Gerchman Y, Rothman A, Padan E (1997) Histidine 225, a residue of the NhaA- $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *Escherichia coli* is exposed and faces the cell exterior. *J Biol Chem* **272**: 1761-1768
- Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE (1992) Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence,

- and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* **267**: 9331–9339
- Orlowski J, Grinstein S (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger *SLC9* gene family. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* **447**: 549-565
- Padan E, Schuldiner S (1994) Molecular physiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, key transporters in circulation of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> in cells. *Biochim Biophys Acta* **1185**: 129-151
- Padan E, Tzuberly T, Herz K, Kozachkov L, Rimon A, Galili L (2004) NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1658**: 2-13
- Papoušková K, Sychrová H (2006a) *Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters with different functions in cell physiology. *FEBS Lett* **580**: 1971-1976
- Papoušková K, Sychrová H (2006b) *Schizosaccharomyces pombe* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters differing in their substrate specificity. *FEMS Yeast Res* in press
- Papoušková K, Sychrová H (2006c) The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* submitted
- Papoušková K, Sychrová H Production of *Yarrowia lipolytica* Nha2 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter improves the salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Manuscript in preparation
- Park CS, Kim JY, Crispino C, Chang CC, Ryu DD (1998) Molecular cloning of *YIPMR1*, a *S. cerevisiae* *PMR1* homologue encoding a novel P-type secretory pathway Ca<sup>2+</sup> - ATPase, in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **206**: 107-116
- Park K, Evans RL, Watson GE, Nehrke K, Richardson L, Bell SM, Schultheis PJ, Hand AR, Shull GE, Melvin JE (2001) Defective fluid secretion and NaCl absorption in the parotid glands of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-deficient mice. *J Biol Chem* **276**: 27042–27050
- Patterson TE, Albrecht EB, Nurse P, Sazer S, Stark GR (1999) Effects of genome position and the DNA damage checkpoint on the structure and frequency of *sod2* gene amplification in fission yeast. *Mol Biol Cell* **10**: 2199-2208

- Pattison-Granberg J, Persson BL (2000) Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**: 5017–5019
- Peti-Peterdi J, Chambrey R, Bebok Z, Biemesderfer D, St John PL, Abrahamson DR, Warnock DG, Bell PD (2000) Macula densa Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activities mediated by apical NHE2 and basolateral NHE4 isoforms. *Am J Physiol* **278**: F452–F463
- Praphailong W, Fleet GH (1997) The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol* **14**: 459–468
- Příbylová L, Papoušková K, Zavřel M, Souciet J-L, Sychrová H (2006) Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure comparison. *Folia Microbiol* **51**: 413–424
- Příbylová L, Papoušková K, de Montigny J, Sychrová H Characterization of *Zygosaccharomyces rouxii* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. Manuscript in preparation
- Prior C, Potier S, Souciet JL, Sychrová H (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**: 89–93
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4005–4009
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, Garcia R, Ramos J (2005) Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **5**: 693–701
- Proft M, Struhl K (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351–361
- Ramirez J, Ramirez O, Saldana C, Coria R, Pena A (1998) A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Bacteriol* **180**: 5860–5865
- Ramos J, Haro R, Rodriguez-Navarro A (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1029**: 211–217
- Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodriguez-Navarro A (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**: 249–252
- Reid JD, Lukas W, Shafaatian R, Bertl A, Scheurmann-Kettner C, Guy HR, North RA (1996) The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies

- a new family of channels with duplicated pore domains. *Receptors Channels* **4**: 51-62
- Rimon A, Gerchman Y, Kariv Z, Padan E (1998) A point mutation (G338S) and its suppressor mutations affect both the pH response of the NhaA-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter as well as the growth phenotype of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**: 26470-26476
- Rivetta A, Slayman C, Kuroda T (2005) Quantitative modeling of chloride conductance in yeast TRK potassium transporters. *Biophys J* **89**: 2412-2426
- Rodriguez-Navarro A (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 1-30
- Rothman A, Padan E, Schuldiner S (1996) Topological analysis of NhaA, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 32288-32292
- Rotin D, Grinstein S (1989) Impaired cell volume regulation in Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange-deficient mutants. *Am J Physiol* **257**: C1158-C1165
- Sardet C, Franchi A, Pouysségur J (1989) Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na/H antiporter. *Cell* **56**: 271-280
- Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Harline M, Boivin GP, Stemmermann G, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML, Shull GE (1998) Targeted disruption of the murine Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest* **101**: 1243-1253
- Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Arino J (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* **46**: 1319-1333
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6896-6901
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **21**: 81-85

- Shrode LD, Gan BS, D'Souza SJ, Orłowski J, Grinstein S (1998) Topological analysis of NHE1, the ubiquitous Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger using chymotryptic cleavage. *Am J Physiol* **275**: C431–C439
- Simón E, Clotet J, Calero F, Ramos J, Arino J (2001) A screening for high copy suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **276**: 29740-29747
- Simón E, Barcelo A, Arino J (2003) Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett* **545**: 239-245
- Soong TW, Yong TF, Ramanan N, Wang Y (2000) The *Candida albicans* antiporter gene *CNHI* has a role in Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1035-1044
- Sychrová H, Chevallier MR (1993) Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *LYP1* coding for a lysine-specific permease. *Yeast* **9**: 771-782
- Sychrová H, Ramirez J, Peña A (1999) Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**: 167-172
- Sychrová H (2004) Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* **53**: S91-S98
- Szaszi K, Paulsen A, Szabo EZ, Numata M, Grinstein S, Orłowski J (2002) Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE5 isoform. Regulation by phosphatidylinositol 3'-kinase and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **277**: 42623-42632
- Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conejero G, Li X, Twell D, Ward JM, Hirschi KD (2004) Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiol* **136**: 1–16
- Taglicht D, Padan E, Schuldiner S (1993) Proton-sodium stoichiometry of NhaA, an electrogenic antiporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 5382-5387
- Thome-Ortiz PE, Peña A, Ramirez J (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* **14**: 1355-1371

- Touret N, Poujeol P, Counillon L (2001) Second-site revertants of a low-sodium-affinity mutant of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger reveal the participation of TM4 into a highly constrained sodium-binding site. *Biochemistry* **40**: 5095-5101
- Utsugi J, Inaba K, Kuroda T, Tsuda M, Tsuchiya T (1998) Cloning and sequencing of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1398**: 330–334
- Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M (2000) Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am J Physiol* **278**: F375–F379
- Vasdinyei R, Deak T (2003) Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int J Food Microbiol* **86**: 123-130
- Velková K, Sychrová H (2006) The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**: 27-34
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP (2002) The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger *AtNHX1* catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem* **277**: 2413–2418
- Vergani P, Miosga T, Jarvis SM, Blatt MR (1997) Extracellular K<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup> mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K<sup>+</sup> channel encoded by the yeast gene *TOK1*. *FEBS Lett* **405**: 337-344
- Wakabayashi S, Pang T, Su X, Shigekawa M (2000) A novel topology model of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1. *J Biol Chem* **275**: 7942–7949
- Wakabayashi S, Hisamitsu T, Pang T, Shigekawa M (2003) Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 oppositely change pH sensing of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1. *J Biol Chem* **278**: 11828–11835
- Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419
- Wang T, Hropot M, Aronson PS, Giebisch G (2001) Role of NHE isoforms in mediating bicarbonate reabsorption along the nephron. *Am J Physiol* **281**: F1117–F1122

- Wang Z, Orłowski J, Shull GE (1993) Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem* **268**: 11925–11928
- Waser M, Hess-Bienz D, Davies K, Solioz M (1992) Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **267**: 5396-5400
- Watanabe Y, Miwa S, Tamai Y (1995) Characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter gene closely related to the salt-tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **11**: 829-838
- Wiebe CA, Rieder C, Young PG, Dibrov P, Fliegel L (2003) Functional analysis of amino acids of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger that are important for proton translocation. *Mol Cell Biochem* **254**: 117-124
- Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H, Rudolph HK (1995) The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**: 3870-3882
- Williams KA (2000) Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* **403**: 112-115
- Wong B, Kiehn TE, Edwards F, Bernard EM, Marcove RC, de Harven E, Armstrong D (1982) Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *J Clin Microbiol* **16**: 545-548
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schafer M, Muller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Dusterhoft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Lelaure V,

- Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sanchez M, del Rey F, Benito J, Dominguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880
- Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R (2005) pH-responsive, post-translational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* **25**: 8683-8692
- Yeo CJ, Barry MK, Gontarek JD, Donowitz M (1994) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange mediates meal-stimulated ileal absorption. *Surgery* **116**: 388–395
- Yu, FH, Shull GE, and Orłowski J (1993) Functional properties of the rat Na/H exchanger NHE-2 isoform expressed in Na/H exchanger-deficient Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **268**: 25536-25541
- Zvyagil'skaya R, Persson BL (2005) A novel alkali-tolerant *Yarrowia lipolytica* strain for dissecting Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transport systems in yeasts. *Cell Biol Int* **29**: 87-94



## **7. PŘÍLOHY**

## 7.1 Seznam použitých zkratk

aa	počet aminokyselinových zbytků
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
ATPasa	adenosintrifosfatasa
bp	pár bází
kbp	tisíc párů bází
Mbp	milion párů bází
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GFP	zelený fluorescenční protein
GTPasa	guanosintrifosfatasa
MES	2-[N-morpholino]-ethansulfonová kyselina
min	minuta
MOPS	3-[N-morpholino]-propansulfonová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
pre-mRNA	prekurzor molekuly mRNA
OD <sub>600</sub>	optická denzita měřená při vlnové délce 600 nm
p	protein, následuje za jeho názvem
P <sub>i</sub>	fosfátový anion
RNasa	ribonukleasa
TMS	transmembránová oblast antiporterů
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
YNB	„Yeast Nitrogen Base“

V názvech genů a proteinů jsou používány tyto dvoupísmenné zkratky označující mateřský organismus:

<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Ca</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Ct</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Dh</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>

<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Mj</i>	<i>Methanococcus janaschii</i>
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>Ps</i>	<i>Pichia sorbitophila</i>
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sp</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Yl</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Zr</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

## 7.2 Seznam autorčiných publikací a rukopisů, na nichž je založena výsledková část disertační práce

### Publikované práce a publikace přijaté do tisku:

Publikace č. 1: Příbylová L, Papoušková K, Zavřel M, Souciet J-L, Sychrová H: Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: Sequence and structure comparison. *Folia Microbiol* 2006 (**51**: 413-424).

Publikace č. 2: Velková K, Sychrová H: The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* 2006 (**369**: 27-34).

Publikace č. 3: Papoušková K, Sychrová H: *Yarrowia lipolytica* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters with different functions in cell physiology. *FEBS Lett* 2006 (**580**: 1971-1976).

Publikace č. 4: Papoušková K, Sychrová H: *Schizosaccharomyces pombe* possesses two plasma membrane alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters differing in their substrate specificity. *FEMS Yeast Res* (v tisku).

### Rukopis odeslaný k recenznímu řízení:

Publikace č. 5: Papoušková K, Sychrová H: The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. (*Int J Food Microbiol*, odesláno k recenzi).

### Připravované rukopisy:

Papoušková K, Sychrová H: Production of *Yarrowia lipolytica* *Nha2* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter improves the salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.

---

Příbylová L, Papoušková K, de Montigny J, Sychrová H: Characterization of *Zygosaccharomyces rouxii* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters.