UNIVERZITA KARLOVA UNIVERSITÉ LOUIS-PASTEUR

Charakterizace Na⁺/H⁺- antiportních systémů plasmatické membrány kvasinek

Dizertační práce

2001

Ing. Olga Kinclová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE UNIVERSITÉ LOUIS-PASTEUR

Charakterizace Na⁺/H⁺- antiportních systémů plasmatické membrány kvasinek

Dizertační práce

2001

Ing. Olga Kinclová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE UNIVERSITÉ LOUIS-PASTEUR - STRASBOURG

Charakterizace Na⁺/H⁺- antiportních systémů plasmatické membrány kvasinek

Etude fonctionnelle des antiporteurs membranaires de cations monovalents codés par le gène *NHA1* de *Saccharomyces cerevisiae* et par ses orthologues

Dizertační práce Thèse de doctorat

Ing. Olga Kinclová

2001

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla nejvíce poděkovat RNDr. Haně Sychrové, CSc. a Prof. Sergi Potierovi za odborné vedení při vytváření této práce, jejich všestrannou pomoc, ochotu a cenné rady během celého studia.

Mé poděkování patří také Dr. Marii A. Bañuelos za podnětné diskuze a za obětavou pomoc při realizaci experimentální práce v laboratoři ve Štrasburku.

Velké poděkování patří všem spolupracovníkům z oddělení Membránového transportu na Fyziologickém ústavu AVČR v Praze a z Laboratoře mikrobiologie a genetiky Botanického ústavu ve Štrasburku za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí pro vypracování této práce. Za všestrannou pomoc při pobytech ve Štrasburku bych chtěla poděkovat Collège Doctoral Européen.

Chtěla bych také poděkovat Prof. Josému Ramosovi za jeho odbornou pomoc v oblastech stanovování obsahu alkalických kationtů v buňkách a spolu s ním také jeho spolupracovníkům, zejména Dr. Fernandu Calerovi, za vlídné přijetí v laboratoři v Cordobě a pomoc při experimentální práci. Za pomoc při mikroskopických pozorováních buněk bych chtěla poděkovat Dr. Axelle Balguerie, Dr. Marcu Bonneuovi a Prof. Michelu Aigleovi z laboratoře Ústavu biochemie a genetiky buněk v Bordeaux, Doc. Zdeně Pálkové z Přírodovědecké fakulty UK v Praze a RNDr. Lucii Kubínové, CSc. z Fyziologického ústavu AVČR v Praze a za pomoc při stanovování obsahu kationtů atomovou absorpční spektroskopií patří můj dík také RNDr. Vlastě Korunové z Ústavu analytické chemie AVČR v Praze.

Zvláštní poděkování patří všem mým nejbližším, rodičům a přátelům za jejich trpělivost a podporu během celé doby studia.

Remerciements

Je tiens à remercier le Docteur Hana Sychrová et le Professeur Serge Potier pour m'avoir dirigée durant ce travail, ainsi que pour leur disponibilité et leurs conseils précieux pour mener à bien ce projet.

Je remercie le Docteur Maria A. Bañuelos pour nos nombreuses discussions et son aide dans la réalisation du travail expérimental au laboratoire de Strasbourg.

Merci a tous mes ami(e)s et collègues du Département du Transport Membranaire de l'Institut de Physiologie à Prague et du Laboratoire de Microbiologie et Génétique de l'Institut Botanique à Strasbourg pour tous les coups de mains, les conseils et les fous rires. Je voudrais aussi remercier le Collège Doctoral Européen pour son aide lors mes séjours à Strasbourg.

Je remercie vivement le Professeur José Ramos de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Cordoba et son aide concernant la détermination du contenu en cations monovalents dans les cellules. Je ne saurais oublier tous les collègues de son laboratoire pour leur sympathique accueil et en particulier le Dr. Fernando Calero, qui m'a aussi aidé lors mes expériences. Je remercie le Dr. Vlasta Korunová de l'Institut de Chimie Analytique à Prague pour son aide lors de la détermination du contenu en cations monovalents dans les cellules par spectroscopie d'absorption atomique. Je tiens aussi à remercier le Professeur Michel Aigle et les Dr. Axelle Balguerie et Marc Bonneu de l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires à Bordeaux ainsi que les Dr. Zdena Pálková de Faculté de Sciences Naturelles de l'Université Charles et Lucie Kubínová de l'Institut de Physiologie à Prague pour la réalisation des observations microscopiques

Enfin, tout particulièrement, je voudrai remercier ma famille et mes ami(e)s pour leurs encouragements et leur soutien constant tout au long de ces années.

Obsah

Předmlu	va	8
Préface		9
1	Současný stav problematiky	10
1.1	Saccharomyces cerevisiae	11
1.2	Transport alkalických kationtů v kvasinkách	12
1. 2. 1	Charakterizace transportních systémů alkalických kationtů	
	v S. cerevisiae	12
1.3	Buněčná odpověď na osmotický stres	18
1.3.1	Signální dráha HOG	21
1.4	Na ⁺ /H ⁺ -antiportní systémy	24
1.4.1	Bakteriální Na ⁺ /H ⁺ -antiportní systémy	27
1.4.2	Na ⁺ /H ⁺ -antiportní systémy kvasinek	28
1.4.2.1	Srovnání struktury a vlastností Na ⁺ /H ⁺ -antiportních systémů	
	plasmatické membrány kvasinek	31
1.4.3	Rostlinné Na ⁺ /H ⁺ -antiportní systémy	33
1.4.4	Na ⁺ /H ⁺ -antiportní systémy živočichů	35
2	Cíl práce	42
2A	Les objectifs	43
3	Materiál a metody	44
3.1	Materiál	44
3.1.1	Kultivační půdy	44
3.1.2	Kmeny baktérií a kvasinek	44
3.1.3	Vektory	45
3.2	Metody	46
3. 2. 1	Molekulárně-biologické metody	46
3.2.2	Biochemické metody	50
3.2.3	Fyziologické metody	51

4	Přehled výsledků a diskuze	54				
4.1	Funkční studium C-konce proteinu Nha1p z kvasinky S. cerevisiae					
4.1.1	Lokalizace zkrácených verzí proteinu Nha1p v buňce					
4.1.2	Vliv transkripčního faktoru Imp2p na expresi genu NHA1					
4.2	Izolace a charakterizace genů z dalších kvasinek					
4.2.1	C. albicans CAN1	64				
4.2.2	Z. rouxii ZrSOD2-22	65				
4.2.3	Z. rouxii ZrHOG1	65				
4.2.4	S. pombe sod2	66				
4.2.5	Charakterizace transportních vlastností Na ⁺ /H ⁺ -antiporterů z kvasinek	68				
4.2.6	Konstrukce chimérního přenašeče Nha1p-sod2p a jeho exprese					
	v S. cerevisiae	71				
4.2.7	Mutageneze genu ZrSOD2-22	73				
4.2.8	Studium lokalizace proteinů ZrSod2-22p a sod2p exprimovaných					
	v S. cerevisiae	77				
4.3	Exprese živočišných genů kódujících Na ⁺ /H ⁺ -antiportní systémy					
	v S. cerevisiae	80				
4.3.1	Klonování cDNA antiporterů NHE1-3 za promotor NHA1	80				
4.3.2	Exprese NHE1 a NHE2 v kvasince <i>S. cerevisiae</i> 8					
4.3.3	Studium lokalizace a funkce přenašečů NHE1 a NHE2					
	exprimovaných v S. cerevisiae	85				
Publikace	e č. 1: Functional study of the Saccharomyces cerevisiae Nha1p C-					
	terminus	88				
Publikace	e č. 2: The <i>Candida albicans</i> Na^+/H^+ antiporter exports potassium and					
	rubidium	89				
Publikace	e č. 3: The Zygosaccharomyces rouxii strain CBS732 contains only					
	one copy of the HOG1 and the SOD2 genes	90				
Publikace	e č. 4: The difference in substrate specificity divides the yeast alkali-					
	metal-cation/ H^+ antiporters in two subfamilies	91				
5	Závěr	92				

6	Seznam použitých symbolů a zkratek	94
7	Seznam literatury	95
8	Résumé de la thèse	121

Předmluva

Předkládaná dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného česko-francouzského postgraduálního studia "doctorat en co-tutelle" mezi Univerzitou Karlovou v Praze a Univerzitou Louise Pastera ve Štrasburku a je založena zejména na následujících publikacích:

Publikace č. 1: <u>Kinclová, O.</u>, Ramos, J., Potier, S., and Sychrová, H.: Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* 40, 656-668 (2001).

Publikace č. 2: <u>Kinclová, O.</u>, Potier, S., and Sychrová, H.: The *Candida albicans* Na⁺/H⁺ antiporter transport potassium and rubidium. *FEBS Lett.* 504, 11-15 (2001).

Publikace č. 3: <u>Kinclová, O.</u>, Potier, S., and Sychrová, H.: The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and *SOD2* genes. *J. Biotechnol.* 88 (2) 151-158 (2001).

Publikace č. 4: <u>Kinclová, O.</u>, Potier, S., and Sychrová, H.: Two subfamilies of yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters. *Microbiology UK*, v tisku (2001).

Výsledky obsažené v práci jsem získala na oddělení Membránového transportu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky a během tří šestiměsíčních stáží v Laboratoři mikrobiologie a genetiky ve Štrasburku ve Francii. Metody měření výstupu alkalických kationtů z buněk a stanovení obsahu těchto kationtů v buňkách jsem si osvojila v rámci pobytu v laboratoři Mikrobiologického ústavu E.T.S.I.A.M. Univerzity v Cordobě ve Španělsku. Zkušenosti v oblasti fluorescenční mikroskopie kvasinek jsem získala během pobytu v laboratoři Institutu biochemie a genetiky buněk v Bordeaux ve Francii.

Préface

La thèse du doctorat a été élaborée dans le cadre des études de doctorat combiné tchèque français, "doctorat en co-tutelle" entre l'Université Charles à Prague et l'Université Louis Pasteur à Strasbourg. La thèse est basée principalement sur les publications suivantes :

Publication no. 1: <u>Kinclová, O.</u>, Ramos, J., Potier, S., and Sychrová, H.: Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* 40, 656-668 (2001).

Publication no. 2: <u>Kinclová, O.</u>, Potier, S., and Sychrová, H.: The *Candida albicans* Na⁺/H⁺ antiporter transport potassium and rubidium. *FEBS Lett.* 504, 11-15 (2001).

Publication no. 3: <u>Kinclová, O.</u>, Potier, S., and Sychrová, H.: The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and *SOD2* genes. *J. Biotechnol.* 88 (2) 151-158 (2001).

Publication no. 4: <u>Kinclová, O.</u>, Potier, S., and Sychrová, H.: Two subfamilies of yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters. *Microbiology UK*, sous presse (2001).

Je suis également co-auteur d'un article dont les résultats ne sont pas rapportés dans ce manuscrit (Matejčková-Forejtová A., <u>Kinclová O.</u>, Sychrová H.: *FEMS Microbiol. Lett.* 176 (1) 257-62 (1999)).

Le travail expérimental a été réalisé dans le laboratoire du Département du Transport Membranaire de l'Institut de Physiologie de l'Académie des Sciences de la République tchèque et pendant les trois séjours de six mois dans le Laboratoire de Microbiologie et Génétique de l'Institut Botanique à Strasbourg en France. J'ai appris les méthodes de détermination du contenu en cations monovalents dans les cellules au cours de mon séjour d'un mois dans le laboratoire de l'Institute de Microbiologie E. T. S. I. A. M. de l'Université à Córdoba en Espagne. Les expériences de microscopie par fluorescence des levures ont été réalisées lors de mon séjour de 2 semaines dans le laboratoire de l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires à Bordeaux en France.

1 Současný stav problematiky

1.1 Saccharomyces cerevisiae

Kvasinka *S. cerevisiae* patří mezi nejlépe prostudované eukaryotní mikroorganismy. Buňky rodu *Saccharomyces* mají elipsoidní až protáhlý tvar a rozmnožují se multilaterálním pučením (obr. 1. 1 A) (Šilhánková, 1983).



Obr. 1.1 (A) Buňky kvasinky *S. cerevisiae* ve světelném mikroskopu (Nomarski, zvětšeno 1000 x), (B) životní cyklus kvasinky *S. cerevisiae*.

Na obr. 1. 1 B je zobrazen životní cyklus kvasinky *S. cerevisiae*: Většina kmenů *S. cerevisiae* tvoří tzv. heterothalické kmeny, tj. kmeny pohlavně odlišené, jednotlivé párovací typy se označují *MATa* a *MATa*. Splynutím dvou haploidních buněk opačného párovacího typu vzniká diploidní buňka zygota, která se může dále buď vegetativně rozmnožovat v diploidním stavu, nebo, za nepříznivých životních podmínek, v ní proběhne sporulace (meiotické dělení jádra) za vzniku čtyř pohlavně odlišených spor a celá buňka se přemění ve vřecko (askus). V příznivých růstových podmínkách se spory mohou vegetativně rozmnožovat, vznikají klony haploidních buněk o určitém párovacím typu. U haploidních buněk opačného párovacího typu může dojít opět ke spájení za vzniku zygoty, čímž se celý cyklus uzavře (Šilhánková,

1983, obr. 1. 1 B). Vhodným křížením kmenů opačných párovacích typů nesoucích různé mutace a následnou sporulací diploidních buněk tak lze poměrně snadno konstruovat nové haploidní kmeny s různými kombinacemi mutací v metabolických drahách, transportu látek přes membrány, buněčném cyklu, biogenezi jednotlivých organel atd., kterých se využívá při studiu biologie buňky.

Haploidní jádro kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje 16 chromosomů různé velikosti (nejmenší je chromosom I o velikosti 230 kb a největší chromosom IV o velikosti 1532 kb). Kvasinka *S. cerevisiae* se stala prvním eukaryotním organismem, jehož genom o velikosti 13 125 kb (včetně mitochondriální DNA a repetitivních sekvencí) byl kompletně sekvenován (Goffeau, et al., 1996 a Saccharomyces Genome Database, 2001). Celkový počet genů kódujících proteiny však zatím není jasný (Goffeau, 2000). Podle posledních odhadů se v sekvenci nachází asi 6000 otevřených čtecích rámců, avšak u více než třetiny jejich produktů je funkce zatím neznámá.

Nenáročná manipulace, rychlá kultivace a snadné získání genomově homologních kmenů umožňuje buňky *S. cerevisiae* s úspěchem využívat nejen v mnoha průmyslových odvětvích, ale také v oblastech biochemie, genetiky a fyziologie jako modelový systém ke studiu biologických procesů na molekulové úrovni.

1.2 Transport alkalických kationtů v kvasinkách

Jednou ze základních podmínek v živých systémech je udržování stálých koncentrací iontů uvnitř buněk. Vnitrobuněčné kationty a anionty se účastní v buňkách mnoha fyziologických procesů, včetně adaptace buněk ke změnám ve vnějším prostředí. Ve volné přírodě je jedním z nejrozšířenějších kationtů sodík (Na⁺), zatímco draslík (K⁺) je zastoupen v mnohem nižších koncentracích (Rodríguez-Navarro, 2000). V živých buňkách je však draslík akumulován ve velkém množství, jelikož je draselný kation nepostradatelný pro mnoho fyziologických funkcí (např. v regulaci buněčného objemu a vnitrobuněčného pH, syntéze proteinů, aktivaci enzymů) (Rodríguez-Navarro, 2000). Na druhou stranu, vysoké vnitrobuněčné koncentrace sodíku jsou pro buňku toxické a jejich přítomnost narušuje v buňkách termodynamickou rovnováhu vody a iontů (způsobuje tzv.

osmotický šok, viz. kap. 1. 3) (Serrano, et al., 1997). Toxicita kationtů Na⁺ (nebo kationtů Li⁺ analogických k Na⁺) spočívá zejména v tom, že působí namísto kationtů K⁺ a nepříznivě tak ovlivňují důležité biochemické pochody probíhající v buňce (např. jedním z enzymů inhibovaných kationty Na⁺ a Li⁺ je fosfatáza Hal2p, což má za následek narušení asimilace sulfátu a také transkripci DNA v buňkách (Dichtl, et al., 1997; Murguia, et al., 1996)). Buňky kvasinek, jako i všechny jiné typy buněk, se tedy neustále snaží zachovávat optimální koncentrace všech kationtů v cytoplasmě a k tomu jim slouží mnoho transportních systémů. Jednotlivé systémy se liší svou substrátovou specifitou a mechanismem transportu. Činnost transportních systémů kontroluje celá řada regulačních proteinů zahrnujících kinázy, fosfatázy a proteiny s dosud neobjasněným mechanismem působení (Serrano, 1996).

1. 2. 1 Charakterizace transportních systémů alkalických kationtů v *S. cerevisiae*

Na základě analýzy sekvence celého genomu kvasinky *S. cerevisiae* se v současnosti předpokládá, že membránové transportní systémy kóduje 271 genů (tj. asi 5 % ze všech genů) (Van Belle a Andre, 2001). Na obr. 1. 2 jsou zobrazeny transportní systémy, které se v *S. cerevisiae* podílejí na transportu alkalických kationtů.

Nejprve je potřeba se zmínit o nejdůležitějším transportním systému plasmatické membrány kvasinek, H⁺-ATPáze P-typu (obr. 1. 2), která je kódovaná esenciálním genem *PMA1* (Serrano, et al., 1986). Tento enzym tvoří 10 až 15 % z celkového množství všech proteinů v membráně a jeho hlavní funkcí je transport protonů ven z buňky (energie se získává hydrolýzou ATP na ADP a P_i), přičemž vzniká elektrochemický gradient protonů přes membránu. Gradient protonů je pak využíván jako zdroj energie všemi sekundárními transportními systémy (příjemsymport nebo vylučování-antiport látek) a pro regulaci vnitrobuněčného pH (Serrano, 1988). Aktivita H⁺-ATPázy plasmatické membrány je velmi přesně regulována a růstové podmínky (např. nedostatek zdroje dusíku, stres, nepříznivá teplota) ovlivňují její aktivitu (Portillo, 2000). Přítomnost glukosy zvyšuje jak expresi genu *PMA1* (Capieaux, et al., 1989; Garcia-Arranz, et al., 1994; Rao, et al., 1993), tak i katalytickou aktivitu enzymu (Serrano, 1983; Venema a Palmgren,

1995). Také snížením pH ve vnějším prostředí dochází k acidifikaci vnitrobuněčného pH, následkem čehož se zvyšuje transport protonů prostřednictvím H^+ -ATPázy (Eraso a Gancedo, 1987). Činnost H⁺-ATPázy je modulována konformačními změnami a vzájemnými interakcemi různých částí polypeptidového řetězce proteinu (Ambesi, et al., 2000; Portillo, et al., 1989; Portillo, et al., 1991) a posttranslačními modifikacemi (fosforylací) (de la Fuente, et al., 1997; Goossens, et al., 2000; Chang a Slayman, 1991). Homologní gen, PMA2, kóduje také H⁺-ATPázu plasmatické membrány, ale narozdíl od Pma1p, je exprese Pma2p velmi nízká a její úloha v buňce není zcela jasná (Schlesser, et al., 1988; Supply, et al., 1993). Uvnitř buněk v membránách endosomů a vakuoly se nachází H⁺-ATPáza V-typu složená z mnoha podjednotek, která se podílí na udržování pH v těchto vnitřních kompartmentech. Tato ATPáza však není pro buňky kvasinek esenciální (Stevens and Forgac, 1997). Ve vnitřní membráně mitochondrií se nachází H^+ -ATPáza typu F_0F_1 , která na rozdíl od předchozích ATPáz spotřebovává energii gradientu protonů přes membránu na syntézu ATP. Uplatňuje se pouze při aerobním metabolismu kvasinek (Janderová a Bendová, 1999).

Vysoká koncentrace draslíku uvnitř buněk S. cerevisiae je výsledkem ustáleného stavu mezi zároveň probíhajícím vstupem a výstupem iontů K⁺ přes plasmatickou membránu (Rodríguez-Navarro, 2000). Transport K⁺ do buněk je zprostředkováván hlavně pomocí dvou systémů Trk1p (Gaber, et al., 1988) a Trk2p (Ko a Gaber, 1991) (obr. 1. 2). Oba systémy jsou neustále intenzivně studovány, ale přesný mechanismus transportu iontů K^+ se zatím nepodařilo objasnit. Trk1p se jeví jako transportní systém s vysokou afinitou k iontům K⁺ (Gaber, et al., 1988; Ramos, et al., 1985), zatímco afinita Trk2p je v porovnání s Trk1p nižší (Ramos, et al., 1994). Afinita i maximální rychlost transportu K⁺ obou systémů se však mění v závislosti na růstových podmínkách, např. při nedostatku K^+ se afinita Trk1p zvýší až tisíckrát (Ramos, et al., 1985; Ramos a Rodriguez-Navarro, 1986; Rodríguez-Navarro a Ramos, 1984). Není také zcela zřejmé, zda oba systémy fungují nezávisle (Ko a Gaber, 1991), nebo, což je pravděpodobnější, jestli Trk1p a Trk2p jsou součástí komplexního systému transportujícího ionty K^+ do (Ramos, et al., 1994). Také není vyloučeno, že na transport K^+ do buněk prostřednictvím těchto systémů je využíván gradient protonů přes membránu (Bihler, et al., 1999; Madrid, et al., 1998). Nedávno bylo zjištěno, že aktivace Trk1p a Trk2p se přímo účastní dvě homologní kinázy Hal4p a Hal5p (Mulet, et al., 1999).

Stejně jako H⁺-ATPáza plasmatické membrány se transportní systémy Trk1p a Trk2p svojí aktivitou významně podílejí na regulaci membránového potenciálu (Bihler, et al., 1999; Madrid, et al., 1998). U buněk kmene postrádajícího oba geny ($trk1\Delta trk2\Delta$) dochází k hyperpolarizaci membrány (negativní náboj je uvnitř). Mutantní buňky $trk1\Delta trk2\Delta$ vyžadují pro normální růst desetkrát vyšší koncentrace K⁺ v médiu než buňky divokého kmene. Navíc je jejich růst silně inhibován v kyselém prostředí (pH<4,5) (Ko a Gaber, 1991).



Obr. 1. 2 Transportní systémy, které se v *S. cerevisiae* ovlivňují hladiny alkalických kationtů v buňkách. Jednotlivé systémy jsou popsány v textu.

Výstup draslíku z buněk je v buňkách *S. cerevisiae* zprostředkováván zejména pomocí kanálu vysoce selektivního pro kationty K⁺ (Gustin, et al., 1986), který byl charakterizován jako *TOK1* (Ketchum, et al., 1995) (obr. 1. 2) nebo *YCK1* (Zhou, et al., 1995), popř. *DUK1* (Reid, et al., 1996) nebo *YORK* (Lesage, et al., 1996). Bylo zjištěno, že kanál Tok1 je propustný také pro alkalické kationty Rb⁺ a Cs⁺, zatímco kationty Na⁺ nemohou tímto systémem procházet (Bertl, et al., 1998). Činnost kanálu je závislá na napětí membrány (depolarizace membrány vede k otevření kanálu) a je složitě regulována (Bertl, et al., 1993). Zvýšená exprese genu *TOK1* v mutantním kmeni postrádajícím systémy, kterými draslík do buňky vstupuje

(*trk1* Δ *trk2* Δ popř. *trk1* Δ *trk2* Δ *tok1* Δ), vede k obnovení růstu buněk na médiích s nízkou koncentrací draslíku. Bylo ukázáno, že za těchto podmínek mohou ionty K⁺ do buňky vstupovat prostřednictvím Tok1p (Bertl, et al., 2001; Fairman, et al., 1999). Jak bylo nedávno zjištěno, draselný kanál Tok1p je zřejmě také jedním z cílů působení tzv. killer toxinů, jež produkují některé kmeny *S. cerevisiae* (Ahmed, et al., 1999; Sesti, et al., 2001).

Na výstupu draslíku z buněk (obr. 1. 2) se dále podílejí K⁺/H⁺-antiportní systémy: Kha1p (Ramírez, et al., 1996), jehož lokalizace v plasmatické membráně ale nebyla dosud prokázána, a Nha1p a také ATPáza Ena1p (viz. níže a kap. 1. 4. 2) (Bañuelos, et al., 1998).

Tok monovalentních kationtů do buněk, včetně K⁺, nezávislý na Trk1p, Trk2p a Tok1p je navíc zprostředkováván systémem označovaným jako nespecifický kanál pro kationty Nsc1 (<u>non-specific cation c</u>hannel) (obr. 1. 2), který však byl charakterizován pouze pomocí elektrofyziologických experimentů (patch-clamp analysis) (Bihler, et al., 1998; Roberts, et al., 1999). Tento systém je propustný pro ionty K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Na⁺, Li⁺ a také NH₄⁺, naopak přítomností dvojmocných kationtů Ca²⁺, Mg²⁺ a Ba²⁺ je inhibován (Bihler, et al., 1998; Roberts, et al., 1999). Pomocí elektrofyziologických metod byl v *S. cerevisiae* detekován také kanál senzitivní na mechanické podněty, který je propustný pro kationty i anionty a je pro buňku pravděpodobně důležitý hlavně při rychlé odpovědi na změny osmolarity prostředí (kap. 1. 3, (Gustin, et al., 1988)). Ani pro jeden z těchto systémů však není zatím známa jeho molekulární podstata (gen). Dále bylo prokázáno, že různé transportní systémy cukrů nebo aminokyselin mohou být za určitých podmínek (nedostatek K⁺) spontánně mutovány, takže se stanou proteiny transportujícími draselné kationty (Ko, et al., 1993; Wright, et al., 1997).

Jak již bylo zmíněno, na rozdíl od draslíku jsou sodné kationty pro buňky kvasinek toxické. Jejich vnitrobuněčná koncentrace závisí na množství Na⁺ ve vnějším prostředí. Buňky rostoucí v prostředí s nízkou koncentrací NaCl obsahují zanedbatelné množství sodíku. Se zvyšujícím se množstvím NaCl v médiu roste i hladina vnitrobuněčného Na⁺. Sodné kationty se do buněk dostávají pravděpodobně jako nízkoafinní substrát transportními systémy pro kationty, zejména těmi, jež transportují K⁺ (Rodríguez-Navarro, 2000). Sekundární symportní přenašeč Na⁺/P_i (obr. 1. 2) kódovaný genem *PHO89* je v *S. cerevisiae* jediným známým systémem, který transportuje Na⁺ do buněk, jelikož využívá gradient sodných iontů jako zdroj

energie pro transport fosfátu (Martinez a Persson, 1998). Tento systém je však aktivní pouze za specifických růstových podmínek (nedostatek fosfátu, alkalické pH) a slouží v buňce spíše jako doplňkový systém pro příjem fosfátu (Martinez a Persson, 1998; Pattison-Granberg a Persson, 2000). Proti akumulaci iontů Na⁺ v cytoplasmě se buňky kvasinek brání třemi různými mechanismy: omezením vstupu Na⁺ do buňky, aktivním vylučováním kationtů Na⁺ ven z buňky a v menší míře přesunem a zadržením Na⁺ ve vakuole (Darley, et al., 2000).

Nejdůležitější transportní systém pro příjem draslíku, Trk1p, je schopen rozlišit od sebe draselné a sodné kationty a za přítomnosti Na⁺ v médiu se jeho afinita k draslíku zvyšuje, čímž dojde k omezení vstupu Na⁺ do buňky (Haro, et al., 1993). Důležitou roli v této regulaci hraje fosfatáza proteinů kalcineurin, jejíž aktivita závisí na hladině kationtů vápníku v buňce a kalmodulinu, proteinu vázajícího Ca²⁺ (Mendoza, et al., 1994).

Hlavním systémem, kterým je nadbytek Na⁺ (a také Li⁺) vylučován ven z buněk je ATPáza P-typu lokalizovaná v plasmatické membráně (Ena1p v obr. 1. 2) kódovaná skupinou čtyř nebo pěti (v závislosti na kmeni *S. cerevisiae*) po sobě následujících téměř identických genů (*ENA1-4/PMR2A-E*; (Haro, et al., 1991; Wieland, et al., 1995)). Exprese genů *ENA2-4* je za všech podmínek velmi nízká (tj. konstitutivní), naopak gen *ENA1* podléhá na úrovni transkripce složité regulaci. Jeho exprese se zvyšuje nejen v rámci buněčné odpovědi na osmotický stres způsobený NaCl (LiCl) (Garciadeblas, et al., 1993), ale také nedostatkem glukosy (Alepuz, et al., 1997) nebo za vyšších hodnot pH (Garciadeblas, et al., 1993).

Zesílení exprese *ENA1* za přítomnosti solí probíhá prostřednictvím dvou nezávislých signálních drah (Márquez a Serrano, 1996): (i) signální dráhou, která se v buňce spouští vlivem osmotického šoku (<u>high o</u>smolarity glycerol (HOG) pathway, viz. kap. 1. 3. 1) - v tomto případě dochází ke zvýšení exprese pravděpodobně uvolněním represoru Sko1p společně s komplexem korepresoru Ssn6-Tup1p z vazby na promotor genu *ENA1* (Proft, et al., 2001)) a (ii) signální kaskádou zahrnující Ca²⁺, kalmodulin a kalcineurin (je specifická pro vysoké koncentrace Na⁺) a v tomto případě dochází k indukci exprese působením transkripčního faktoru Crz1p (Mendizabal, et al., 2001)). Kalmodulin a kationty Ca²⁺ zřejmě modulují výstup iontů Na⁺ prostřednictvím Ena1p také přímou vazbou na ATPázu (Wieland, et al., 1995). Nedávno byla charakterizovaná ještě třetí cesta vedoucí ke zvýšené expresi *ENA1* v odpovědi na stres způsobený zvýšením koncentrace Na⁺ ve vnějším

prostředí, která obsahuje proteiny Psr1p a Psr2p (Siniossoglou, et al., 2000). Exprese genu *ENA1* při zvýšení vnitrobuněčného pH je indukována zřejmě pomocí signální dráhy označované RIM101 (Lamb, et al., 2001). Negativně je gen *ENA1* regulován proteinkinázou A prostřednictvím signální dráhy RAS-cAMP, která koordinuje odpovědi buňky na nutriční signály a různé stresové signály přicházející z vnějšího prostředí (Hirata, et al., 1995; Márquez a Serrano, 1996). Byla charakterizována celá řada genů, jejichž produkty tvoří součásti uvedených signálních drah a podílejí se tak nejen na regulaci exprese genu *ENA1*, ale i na zachování celkové homeostáze iontů v buňkách.

Vedle hlavních systémů (ATPáz Ena) vylučujících z buněk toxické kationty sodíku a lithia se na eliminaci těchto iontů podílí sekundární transportní systém, Na⁺/H⁺-antiporter Nha1p (obr. 1. 2, viz. také kap. 1. 4. 2) kódovaný, na rozdíl od *ENA1*, konstitutivně exprimovaným genem *NHA1* (Bañuelos, et al., 1998; Prior, et al., 1996). Jeho transportní aktivita závisí na velikosti gradientu protonů přes membránu vytvářeného H⁺-ATPázou plasmatické membrány. Jak již bylo zmíněno, oba systémy, antiporter Nha1p a ATPáza Ena1p, transportují ven z buňky také ionty K⁺ (Bañuelos, et al., 1998). Zvýšená exprese genů *ENA1* a *NHA1* v kmeni nesoucím mutace *ena1-4 nha1* ukázala, že antiporter Nha1p je zodpovědný za toleranci buněk k vysokým koncentracím K⁺ a Na⁺ hlavně v kyselém prostředí, zatímco Ena1p ATPáza je nezbytná pro toleranci buněk k těmto kationtům při vyšších pH. Oba systémy se tedy vzájemně doplňují při udržování nízké hladiny Na⁺ a optimálních koncentrací K⁺ uvnitř buněk (Bañuelos, et al., 1998).

V membránách prevakuolárních/endosomálních váčků se nachází jiný Na⁺/H⁺-antiporter Nhx1p (obr. 1. 2) kódovaný genem *NHX1/VPS44*, který výměnou za protony zprostředkovává hromadění toxických iontů Na⁺ v těchto organelách (Bowers, et al., 2000; Nass, et al., 1997; Nass a Rao, 1998). Gradient protonů pro transport přes membránu tonoplastu vytváří vakuolární protonová V-ATPáza (Quintero, et al., 2000). Kromě toho, antiporter Nhx1p zastává v buňce ještě další funkce: v odpovědi buňky na hyperosmotický šok způsobený sorbitolem (Nass a Rao, 1999) (viz. kap. 1. 3) a v udržování rovnováhy iontů v endosomech, což má vliv na regulaci biogeneze a biodegradace proteinů v buňce (pro tuto jeho funkci však není zapotřebí přítomnost funkční V-ATPázy) (Bowers, et al., 2000).

Nemalý vliv na transport kationtů má také lipidové složení membrán. Například mutace genu *ERG6* kódujícího methyltransferázu závislou na S- adenosylmethioninu, která je součástí metabolické dráhy biosyntézy ergosterolu, zvyšuje vstup iontů Na⁺ do buňky a snižuje tak její toleranci k sodíku (Welihinda, et al., 1994)). Z plasmatické membrány byly extrahovány také malé hydrofobní proteiny (proteolipidy) Pmp1p a Pmp2p (oba dlouhé 38 aa) a Pmp3p (55 aa) ovlivňující transport. Delece genů kódujících proteolipidy Pmp1p a Pmp2p snižuje aktivitu H⁺-ATPázy Pma1 (Navarre, et al., 1994; Navarre, et al., 1992). V buňkách s mutací *pmp3* Δ dochází k hyperpolarizaci membrány, což pravděpodobně zvyšuje nespecifický tok monovalentních kationtů do buňky (Navarre a Goffeau, 2000).

Díky relativně snadným genetickým a biochemickým přístupům patří transportní systémy podílející se na udržování homeostázy kationtů v modelové kvasince *S. cerevisiae* mezi nejlépe prostudované. Jelikož struktura a způsoby regulace transportních systémů v relativně jednoduchých buňkách kvasinek jsou zachovány i u vyšších eukaryot, poznatky získané při zkoumání transportních mechanismů v *S. cerevisiae* je možné využívat i při studiu transportu a tolerance buněk rostlin a živočichů.

1.3 Buněčná odpověď na osmotický stres

Buňky kvasinek i jiných organismů jsou velmi často vystaveny nepříznivým podmínkám, mezi něž patří náhlé změny koncentrace vody a v ní rozpuštěných látek, tj. změny osmolarity prostředí. Aby si kvasinky zachovaly turgorový tlak a tvar, osmolarita uvnitř buněk musí být vyšší než osmolarita jejich okolí (Hohmann, 1997). Tolerance buněk *S. cerevisiae* k náhlým změnám osmotického tlaku ve vnějším prostředí (osmotickému šoku) závisí na jejich fyziologickém stavu. Rychle se dělící buňky kvasinek z exponenciální fáze růstu jsou zpravidla mnohem citlivější než nerostoucí buňky ze stacionární fáze (Mager a Ferreira, 1993). V laboratorních podmínkách se pro studium osmotických jevů používají média obsahující vyšší koncentrace cukrů, sorbitolu nebo solí (NaCl). Vysoké koncentrace NaCl způsobují buňkám nejen hyperosmotický šok, ale je nutné uvažovat i toxický efekt sodných iontů, jejichž nadbytek musí být z buňky vyloučen (kap. 1. 2). Buněčná odpovědť na osmotický šok se skládá ze dvou fází. Na nenadálé změny osmolarity prostředí buňka musí okamžitě odpovědět a k tomu jí slouží tzv. rychlý záchranný mechanismus. Při dlouhodobějším efektu je nutné, aby se buňka adaptovala na nepříznivé podmínky

prostřednictvím trvalejších změn v metabolismu (tzv. osmoregulace) (Hohmann, 1997).

Bezprostředně po přenesení buněk do média se sorbitolem nebo NaCl (hyperosmotickém šoku) dochází k zastavení růstu buněk, buňky ztrácí vodu a během 1 minuty dochází k jejich dehydrataci a scvrknutí (Blomberg, 1997; Morris, et al., 1986). Pokud je osmotický šok příliš silný, stane se následná ztráta vody pro buňky letální (Blomberg, 1997). Základním předpokladem rychlého záchranného mechanismu, který se v této fázi uplatňuje, je, že exprese jednotlivých složek v buňkách je konstitutivní, tj. musí být přítomny v buňkách již před osmotickým šokem, a musí fungovat nezávisle na adaptačním mechanismu (Hohmann, 1997). Předpokládá se, že rychlé odpovědi buňky na hyperosmotický šok se účastní, podobně jako u vyšších eukaryot, transportní systémy pro ionty (kap. 1. 2).

Významnou roli v časné fázi odpovědi má pravděpodobně vakuola, protože různé mutantní kmeny S. cerevisiae s poškozenou biogenezí vakuol jsou velmi citlivé ke změnám osmolarity prostředí (Banta, et al., 1988; Latterich and Watson, 1993). Vakuola, která za normálních podmínek slouží jako zásobárna aminokyselin, polyfosfátů a iontů, je zřejmě i rezervoárem vody, který je možné využít, pokud dojde ke ztrátě vody z cytosolu přidáním osmoticky aktivní látky do růstového média (Hohmann, 1997). S funkcí vakuol v buňkách je spojována činnost Na⁺/H⁺antiporteru Nhx1p (kap. 1. 2) (Nass a Rao, 1999). Za normálních podmínek v buňkách, které se nacházejí na konci exponenciální fáze růstu nebo ve fázi stacionární, Nhx1p zprostředkovává transport iontů Na⁺ do pozdních endosomů nebo vakuoly, čímž napomáhá k zadržování vody v těchto kompartmentech (Nass a Rao, 1999). O jeho činnosti při hyperosmotickém šoku se předpokládá, že scvrknutí buněk by mohlo vést k výstupu kationtů Na⁺ z vakuoly systémem Nhx1p nutně provázaným výstupem vody do cytosolu. Zdá se, že Nhx1p má svou úlohu i v pozdější fázi adaptace, kdy, jak bylo zmíněno již v kap. 1. 2, transportem Na⁺ zpět do vnitřních organel přispívá Nhx1p k ochraně cytosolových proteinů před toxickým působením iontů Na⁺ (Nass a Rao, 1999). Jelikož Nhx1p je funkční pouze na konci exponenciální fáze růstu buněk a ve fázi stacionární, předpokládá se, že podobný systém zajišťující funkce Nhx1p v regulaci buněčné osmolarity existuje v buňkách i během exponenciální fáze růstu (Nass a Rao, 1999).

Důležitou látkou v kvasinkách *S. cerevisiae*, která napomáhá buňkám přežít velké změny osmolarity v prostředí, ale také prudké změny teploty a jiných

stresových faktorů, je vnitrobuněčná trehalosa (Hounsa, et al., 1998; Mackenzie, et al., 1988). Tento zásobní disacharid se akumuluje v buňkách ve stacionární fázi, přispívá k ochraně nativních konformací proteinů před denaturací (Singer a Lindquist, 1998) a k zachování fluidity membrány (Iwahashi, et al., 1995).

Délka druhé, adaptační fáze osmoregulace závisí na síle aplikovaného stresu. Během této fáze se buňky snaží kompenzovat osmotický tlak přicházející z vnějšího prostředí, a proto akumulují uvnitř vhodnou rozpuštěnou látku (tzv. "compatible solute"). V případě kvasinek *S. cerevisiae* se jedná o akumulaci glycerolu (Brown, 1978). Hladina glycerolu v *S. cerevisiae* stoupá jednak zvýšením syntézy glycerolu (Albertyn, et al., 1994), jednak snížením jeho výstupu z buněk (Luyten, et al., 1995; Tamás, et al., 1999) a pravděpodobně také aktivním transportem glycerolu do buňky (Holst, et al., 2000). Akumulace glycerolu vede ke snížení osmotického potenciálu v cytoplasmě a zpětnému vstupu molekul vody do buněk, čímž se zvětšuje objem a turgorový tlak v buňkách, nezbytné parametry pro znovuobnovení růstu a dělení buněk (Blomberg, 2000). Rychlost dělení buněk po adaptaci však bývá nižší než před osmotickým šokem (Blomberg, 1997).

Fáze osmoregulace se sestává ze tří částí: (i) paralelně s časnou fází odpovědi receptory na povrchu buňky přijímají signál o změně osmolarity vnějšího prostředí a (ii) přenáší ho do buňky, což vede (iii) k metabolickým změnám a tím k adaptaci buněk na nové podmínky. Přizpůsobení metabolismu buněk předchází změny v expresi mnoha genů (Blomberg, 1997; Morris, et al., 1986; Norbeck a Blomberg, 1997; Posas, et al., 2000; Yale a Bohnert, 2001). Hlavní úlohu v regulaci transkripce genů, která nastává po osmotickém šoku, zastává signální dráha HOG (high osmolarity glycerol response pathway) (Brewster, et al., 1993), která je aktivována zejména vlivem změny turgorového tlaku v buňce (Tamás, et al., 2000).

1.3.1 Signální dráha HOG

Signální dráha HOG, která se spouští vlivem osmotického šoku, patří mezi tzv. signální dráhy kináz MAP (MAPKKK = <u>m</u>itogen-<u>a</u>ctivated <u>p</u>rotein <u>k</u>inase <u>k</u>inase <u>k</u>inase, MAPKK = <u>m</u>itogen-<u>a</u>ctivated <u>p</u>rotein <u>k</u>inase, MAPK = <u>m</u>itogen-<u>a</u>ctivated <u>p</u>rotein <u>k</u>inase odpovědná za danou funkci v buňce). Tři po sobě následující

kinázy jsou aktivovány fosforylacemi na dvou aminokyselinových zbytcích serinu(threoninu) a tyrosinu (Banuett, 1998). Poprvé byla signální dráha HOG objevena v kvasince *S. cerevisiae* (Brewster, et al., 1993), ale jednotlivé homologní proteiny této signální dráhy byly později identifikovány i v jiných druzích kvasinek, např. *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* nebo *Zygosaccharomyces rouxii* (Gorner, et al., 1999). Hlavní složky signální kaskády HOG jsou znázorněny na obr. 1. 3.



Obr. 1.3 Schéma signální dráhy HOG aktivované osmotickým stresem v kvasince *S. cerevisiae* (jednotlivé komponenty jsou blíže vysvětleny v textu).

Roli MAPK v signální dráze HOG zastává protein Hog1p, který je aktivován MAPKK Pbs2p (Brewster, et al., 1993). Činnost Pbs2p je stimulována hyperosmotickým šokem prostřednictvím dvou nezávislých signálních cest (SLN a SHO, obr. 1. 3) (Maeda, et al., 1995; Maeda, et al., 1994). Avšak předpokládá se existence ještě jedné další cesty aktivující přímo kinázu Hog1p (Van Wuytswinkel, et al., 2000).

Membránový protein Sln1p se skládá z N-koncové extracelulární domény, a dvou domén (histidin-kinázové a akceptorové C-koncové domény) nacházejících se v cytoplasmě. Za normálních podmínek aktivovaná histidin-kinázová doména Sln1p váže autofosforylací fosfát na aminokyselinový zbytek histidinu (H576), který je poté přenesen na aminokyselinový zbytek aspartátu (D1144) v akceptorové C-koncové doméně Sln1p. Pomocí dalších fosforylačních reakcí je fosfát přenášen dál přes protein Ypd1p na aspartátový zbytek (D554) regulátorového proteinu signální dráhy Ssk1p. Fosforylovaný Ssk1p není schopen aktivovat kaskádu kináz MAP (Posas, et al., 1996). Pokud dojde ke zvýšení osmolarity prostředí, aktivita histidin-kinázové domény Sln1p je ihibována a nefosforylovaný Ssk1p interaguje s nekatalytickými doménami MAPKKK Ssk2p a Ssk22p v kaskádě MAP kináz, což následně vede k posloupnosti fosforylací od Ssk2p a Ssk22p (MAPKKK) přes Pbs2p (MAPKK) na Hog1p (MAPK) (Banuett, 1998) (obr. 1. 3).

Ve druhém případě aktivace (SHO, obr. 1. 3), se Sho1p, který je tvořen čtyřmi transmembránovými doménami na N-konci proteinu a hydrofilní C-koncovou částí v cytoplasmě, přímo váže prostřednictvím svého C-konce k N-koncové části proteinu Pbs2p bohaté na aminokyselinové zbytky prolinu (Maeda, et al., 1995). Ačkoliv se dříve předpokládalo, že Sho1p je podobně jako Sln1p senzorem osmotických změn ve vnějším prostředí, nedávno vyšlo najevo, že Sho1p je v buňce lokalizován v plasmatické membráně převážně v místech vzniku pupene nebo, kde dochází k růstu buňky směrem k buňce opačného párovacího typu (shmoo tip), a že jeho hlavním úkolem je pouze udržovat protein Pbs2p v těchto místech (Raitt, et al., 2000). MAPKK Pbs2p je aktivována proteinem Stell konstitutivně vázaným na Ste50p a pro přenos signálu je nezbytná přítomnost také proteinu Ste20 (Maeda, et al., 1995; O'Rourke a Herskowitz, 1998) (obr. 1. 3). Tyto elementy propojují signální dráhu HOG se signální dráhou pseudohyfálního růstu (Posas, et al., 1998). Po objevení nové role proteinu Sho1p není zatím jasné, jakým způsobem je cesta SHO při osmoadaptaci buněk vlastně aktivována, ale její význam by mohl spočívat v monitorování osmolarity prostředí na zranitelných místech buňky, kde dochází k morfologickým změnám (Raitt, et al., 2000).

25

Aktivovaná MAPK Hog1p přechází z cytoplazmy do jádra buňky (Ferrigno, et al., 1998; Reiser, et al., 1999), což vede k indukci exprese genů potřebných pro přežití buněk v hyperosmotickém prostředí (Posas, et al., 2000). Mechanismus regulace exprese kontrolovaný Hog1p není zatím přesně objasněn, nejnovější poznatky však naznačují, že pravděpodobně regulace spočívá na úrovni promotoru v složité kombinaci působení pozitivních a negativních regulačních proteinů (Márquez, et al., 1998), do nichž se zapojuje i sám Hog1p (Alepuz, et al., 2001). V promotorové oblasti některých cílových genů (např. CTT1 kódující katalázu T) se nacházejí tzv. sekvence STRE (stress response elements, CCCCT nebo AGGGG), prostřednictvím nichž je transkripce genů aktivována (Schuller, et al., 1994). Jediným traskripčním regulátorem, u něhož bylo prokázáno, že je přímým substrátem MAP kinázy Hog1p je Sko1p (Proft, et al., 2001; Proft a Serrano, 1999; Rep, et al., 2001). Proteinkináza Rck2p, jejíž funkce však zatím není známa, je druhým substrátem, který Hog1p fosforyluje (Bilslandmarchesan, et al., 2000). Negativně signální dráhu HOG ovlivňují fosfatázy Ptc1p, Ptp2p a Ptp3p, které defosforylují Hog1p (obr. 1. 3), čímž dochází k jeho inaktivaci. Ptp2p a Ptp3p modulují také lokalizaci Hog1p v buňce (transfer mezi cytoplazmou a jádrem) (Jacoby, et al., 1997; Mattison a Ota, 2000). Mezi další pravděpodobné transkripční faktory stimulované signální dráhou HOG patří např. proteiny Msn2p a Msn4p fungující při obecné odpovědi buňky na jakékoliv stresové podmínky (Gorner, et al., 1999), nebo transkripční regulátory Hot1p a Msn1p (Rep, et al., 1999a). Na stimulaci exprese některých genů na principu dereprese se částečně podílí společně se Skolp korepresorový komplex Ssn6p-Tup1p (viz. exprese genu ENA1, kap. 1. 2. 1) (Márquez, et al., 1998; Proft, et al., 2001).

Mezi cílové geny ovlivňované signální dráhou HOG patří např. gen *GPD1* kódující klíčový enzym pro produkci glycerolu, glycerol-3-fosfátdehydrogenázu (Blomberg a Adler, 1989; Larsson, et al., 1993), dvě izogenní formy *GPP1*, *GPP2* kódující glycerol-3-fosfát fosfatázu (Pahlman, et al., 2001), *ENA1* kódující Na⁺-ATPázu (kap. 1. 2. 1), *HAL1* kódující regulační protein neznámé funkce, který se však uplatňuje v zachování homeostáze Na⁺/K⁺ v buňkách (Gaxiola, et al., 1992; Márquez, et al., 1998; Ríos, et al., 1997), a mnohé další.

Podobné mechanismy buněčné odpovědi na osmotický stres jako v kvasinkách jsou zachovány ve všech živých buňkách, od bakterií (vlastní dvousložkový fosforylační systém EnvZ-OmpR (Csonka a Hanson, 1991) podobný cestě přes Sln1p; obr. 1. 3), až po rostliny a živočišné buňky (Kültz a Burg, 1998). Některé složky signální kaskády v *S. cerevisiae* je možné nahradit homologními proteiny nejen z jiných kvasinek (Iwaki, et al., 1999), ale i z rostlinných (Popping, et al., 1996; Urao, et al., 1999) nebo ze živočišných buněk (Galcheva Gargova, et al., 1994; Han, et al., 1994).

1.4 Na⁺/H⁺-antiportní systémy

V kapitole 1. 2. 1 bylo uvedeno, že na regulaci homeostáze kationtů v *S. cerevisiae* se podílí také antiportní mechanismus kationtů Na^+/H^+ . Obecně jsou Na^+/H^+ -antiportní systémy sekundární aktivní transportní systémy lokalizované v plasmatických membránách a v membránách vnitrobuněčných organel. Vyskytují se takřka ve všech typech buněk, od baktérií přes buňky nižších eukaryot, rostlin, až po buňky živočichů. Antiportery Na^+/H^+ zprostředkovávají transport kationtů Na^+ a H^+ přes membránu v opačném směru. Výměna iontů Na^+ a H^+ může být elektrogenní (baktérie, kap. 1. 4. 1) nebo elektroneutrální (kvasinky, rostliny, živočichové, kap. 1. 4. 2-4). Všechny Na^+/H^+ -antiportní systémy přenášejí přes membránu kromě kationtů Na^+ také Li^+ (některé také K^+). U nižších organismů a rostlin jsou ionty Na^+ výměnou za protony vylučovány z buněk, v živočišných buňkách probíhá tento transport opačně (viz. kap. 1. 4. 4). V obou případech antiport Na^+/H^+ zastává v buňkách významnou roli v regulaci buněčného objemu a vnitrobuněčného pH. V buňkách baktérií, kvasinek a rostlin ovlivňuje také jejich toleranci k solím.



Obr. 1. 4 Fylogenetický strom rodiny Na⁺/H⁺-antiporterů pocházejících z různých organismů (*Rn – Rattus norvegicus, Sc – S. cerevisiae, At – Arabidopsis thaliana, Sp – S. pombe, Zr – Z. rouxii, Ca - C. albicans, Vp – Vibrio parahaemolyticus, Ec – Escherichia coli*). Jednotlivé rodiny jsou barevně odlišeny (zeleně – bakteriální proteiny, červeně – aniportery plazmatické membrány kvasinek, modře – skupina transportních systémů podobných živočišným NHE antiporterům).

Na obrázku 1. 4 je znázorněn fylogenetický strom rodiny Na⁺/H⁺antiportních systémů. Z diagramu vyplývá, že celou rodinu Na⁺/H⁺-antiporterů je možné rozdělit na tři základní skupiny: (i) rodina, do níž patří bakteriální antiportery, (ii) rodina Na⁺/H⁺ antiporterů plazmatické membrány kvasinek a (iii) rodina živočišných transportních systémů NHE a jejich homologů, do níž patří např. rostlinné antiportery a také přenašeč Nhx1 lokalizovaný v membránách pozdních endosomů a vakuoly kvasinky *S. cerevisiae*. V současné době jsou známy desítky genů izolovaných z různých organismů, na obrázku je uvedeno pouze několik zástupců jednotlivých skupin.



Obr. 1. 5 Zjednodušený model struktury Na⁺/H⁺-antiporteru Nha1p z kvasinky S. cerevisiae. Červeně jsou vyznačeny konzervativní aminokyselinové zbytky, které byly identifikovány jako důležité pro transportní aktivitu Nha1p i homologních přenašečů sod2p z S. pombe a Cnh1p z C. albicans, zeleně jsou vyznačeny dvě různé verze Nha1p – původně klonovaná zkrácená forma (888 aa) a kompletní přenašeč (985 aa) (viz. kap. 1. 4. 2). Model byl vytvořen při studiu funkce C-konce Nha1p v rámci této dizertační práce (kap. 4. 1 a publikace č. 1).

Rodinu Na⁺/H⁺-antiporterů tvoří membránové proteiny, které se skládají z N-koncové hydrofobní transmembránové části s 10-12 transmembránovými segmenty a hydrofilní C-koncové části orientované pravděpodobně do cytoplasmy (na obr. 1. 5 je uveden zjednodušený model sekundární struktury Na⁺/H⁺-antiporteru Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae*). Přenašeče jednotlivých skupin vykazují různé stupně podobnosti. Aminokyselinové sekvence transmembránových části proteinů jsou zachovány více než délky a aminokyselinové složení hydrofilních C-koncových částí proteinů. Transmembránová část proteinů je odpovědná za vazbu a transport kationtů (u několika Na⁺/H⁺-antiporterů byly v této oblasti identifikovány aminokyselinové zbytky důležité pro transportní aktivitu přenašečů, viz. níže), hydrofilní C-konce přenašečů jsou důležité zejména pro regulaci transportní aktivity.

1. 4. 1 Bakteriální Na⁺/H⁺ antiportní systémy

V nejlépe prozkoumané bakterii *Escherichia coli* byly nalezeny tři různé geny kódující Na⁺/H⁺-antiportní systémy, *nhaA* (Goldberg, et al., 1987; Karpel, et al., 1988), *nhaB* (Pinner, et al., 1992) a *chaA* (Ivey, et al., 1993). Antiporter NhaA je hlavní systém zodpovědný za toleranci buněk *E. coli* k vysokým koncentracím NaCl (LiCl) a za schopnost jejich růstu v prostředí s alkalickým pH (Padan, et al., 1989). Exprese genu *nhaA* je pozitivně regulována proteinem NhaR a je indukována za přítomnosti iontů Na⁺ v závislosti na pH (Carmel, et al., 1994; Karpel, et al., 1991; Rahav Manor, et al., 1992). Antiporter NhaB přispívá k celkové toleranci buněk k solím méně než NhaA a, na rozdíl od NhaA, jeho aktivita není závislá na pH (Pinner, et al., 1992). Třetím transportním systémem je Ca²⁺/H⁺-antiporter ChaA, u

něhož bylo prokázáno, že v prostředí s alkalickým pH transportuje kromě Ca^{2+} také kationty Na⁺ (Ohyama, et al., 1994).

Systémy NhaA a NhaB zprostředkovávají elektrogenní transport se stechiometrií 2H⁺/Na⁺ (NhaA) a 3H⁺/2Na⁺ (NhaB) (Taglicht, et al., 1991). V sekvenci NhaA (388 aa) byly identifikovány aminokyselinové zbytky aspartátu (D133, D163 a D164) nepostradatelné pro vazbu a přenos kationtů přes membránu (Inoue, et al., 1995), které jsou zachovány v sekvencích antiporterů z jiných bakterií i z kvasinek (Dibrov and Fliegel, 1998). Navíc, aminokyselinové zbytky histidinu (H225, (Gerchman, et al., 1993)) a glycinu (G338, (Rimon, et al., 1998)) byly nezávisle na sobě identifikovány jako důležité pro zachování citlivosti aktivity antiporteru ke změnám pH. Změny pH vyvolávají konformační změny v proteinu (zejména hydrofilní smyčky mezi membránovými segmenty M8 a M9 (Gerchman, et al., 1993) a na N-konci NhaA (Venturi, et al., 2000)), jež vedou k aktivaci transportu v rozmezí pH 7,5-8,5.

Přenašeč NhaA se stal vhodným modelem při studiu struktury sekundárních transportních systémů. Nejprve se podařilo připravit dvourozměrné krystaly (Williams, et al., 1999), načež Karen A. Williamsová odhalila také trojrozměrnou strukturu tohoto antiporteru (Williams, 2000). Protein opravdu tvoří 12 transmembránových domén, z nichž šest leží v jedné rovině a dalších šest přiléhá k této rovině ve formě svazku (Williams, 2000). NhaA krystalizuje jako dimer a nedávno bylo také pomocí genetických a biochemických pokusů dokázáno, že i v plasmatické membráně existuje NhaA ve formě homooligomeru pravděpodobně se dvěmi molekulami NhaA (Gerchman, et al., 2001). Mezimolekulové interakce se vytvářejí zřejmě prostřednictvím hydrofilních smyček mezi membránovými segmenty M8 a M9 Gerchman, 2001 #4519].

Celkovým aminokyselinovým složením se Na^+/H^+ -antiportery dosud identifikované v různých druzích bakteriích od sebe hodně odlišují. Antiportery sekvenčně podobné NhaA byly klonovány např. v mořských bakteriích *Vibrio alginolyticus* (Nakamura, et al., 1994) nebo *V. parahaemolyticus* (Kuroda, et al., 1994b). Konzervativní zbytky D125, D155, D156 transmembránové části antiporteru NhaA z *V. alginolyticus* jsou podobně jako u NhaA nezbytné pro funkci tohoto antiporteru (Nakamura, et al., 1995). Narozdíl od NhaA z *E. coli*, jsou však antiportey z Vibrií inhibovány amiloridem, látkou specificky inhibující antiportery z rodiny živočišných antiporterů (Kuroda, et al., 1994a).

1. 4. 2 Na⁺/H⁺-antiportní systémy kvasinek

Do stále rostoucí rodiny Na⁺/H⁺-antiporterů plazmatické membrány kvasinek patří v současné době několik genů izolovaných ze čtyř druhů kvasinek: *S. pombe*, *Z. rouxii*, *S. cerevisiae* a *C. albicans*.

První gen (*sod2*) patřící do této rodiny byl klonován v osmosenzitivní dělící se kvasince *S. pombe* (Jia, et al., 1992). Gen *sod2* (obsahuje 77 nukleotidů dlouhý intron) kóduje z celé rodiny nejkratší Na⁺/H⁺-antiporter sod2p (468 aa, viz. kap. 1. 4. 2. 1), který je zatím jediným identifikovaným systémem v *S. pombe* eliminujícím toxické kationty Na⁺ a Li⁺ z buněk a určuje tak jejich toleranci k solím. Protože mutantní kmeny *S. pombe* postrádající gen *sod2* nemohou růst na médiích s pH vyšším než 6,5, antiporter sod2p se v *S. pombe* zřejmě podílí na regulaci vnitrobuněčného pH (Jia, et al., 1992). Nedávno byl dokončen projekt sekvenování genomu *S. pombe*, přičemž v sekvenci (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/) byl nalezen ještě jeden otevřený čtecí rámec (*CPA1*) kódující pravděpodobně Na⁺/H⁺-antiporter. Zatím však není jisté, zda je tento gen v *S. pombe* vůbec exprimován.

Pokud jsou buňky *S. pombe* pěstovány delší dobu za přítomnosti LiCl, jejich tolerance k LiCl/NaCl se zvýší. Důvodem získané rezistence je, že v genomu *S.pombe* dochází k amplifikaci úseku DNA obsahujícího gen *sod2*, což vede ke zvýšení i počtu kopií přenašeče v buňce (Jia, et al., 1992). Tento proces slouží v současné době jako velmi užitečný model při studiu mechanismu amplifikace DNA v eukaryotních buňkách (Albrecht, et al., 2000; Patterson, et al., 1999).

Při charakterizaci sod2p v *S. pombe*, imunofluorescenční mikroskopie buněk nesoucích přenašeč sod2p značený hemagglutininem ukázala, že tento transportní systém není v plasmatické membráně distribuován rovnoměrně, ale nachází se zejména na koncích podlouhlých buněk. Význam této nerovnoměrné distribuce sod2p není zcela objasněn (Dibrov, et al., 1997). Na základě analogie s bakteriálním přenašečem NhaA (kap. 1. 4. 1), byly v sod2p identifikovány aminokyselinové zbytky důležité pro jeho transportní funkci. Jedná se o tři aspartátové zbytky (D241, D266, D267) a jeden zbytek histidinu (H367) (Dibrov, et al., 1998). Tyto aminokyseliny jsou dobře zachovány i u jiných přenašečů rodiny a jejich pravděpodobná pozice je vyznačena v modelu přenašeče Nha1p z *S. cerevisiae* na obr. 1. 5. Mutace zbytků D266, D267 vede k neschopnosti přenašeče transportovat Na⁺, zatímco výstup Na⁺ z buněk nesoucích přenašeč s mutací zbytku D241 je stejný jako v buňkách s nemodifikovaným sod2p. Tyto buňky však nemohou růst na médiích za přítomnosti LiCl. To naznačuje, že přenašeč je pravděpodobně schopen rozlišovat mezi těmito kationty. Podobné výsledky byly získány také při studiu Nha1p z *S. cerevisiae* (viz. níže). Přenašeč sod2p byl funkčně exprimován i v kmeni *S. cerevisiae* postrádajícím geny kódující Na⁺-ATPázy (*ena1-4* Δ) (Hahnenberger, et al., 1996).

Kvasinka Z. rouxii patřící mezi osmotolerantní druhy kvasinek, je schopna růst za přítomnosti vysokých koncentrací cukrů a solí (až 3M NaCl) (Onishi, 1963). Osmotolerance Z. rouxii k solím (vyplývající z udržování nízké koncentrace NaCl v buňkách) je zajištěna hlavně činností Na⁺/H⁺-antiporteru v plasmatické membráně. V kmeni Z. rouxii ATCC42981 byly identifikovány dva homologní geny (Z-SOD2, Z-SOD22) kódující Na⁺/H⁺-antiportní systémy (Iwaki, et al., 1998; Watanabe, et al., 1995). Ačkoliv oba geny byly funkčně exprimovány v kmeni S. cerevisiae (ena1-4 Δ), k celkové toleranci Z. rouxii k solím přispívá zejména Z-SOD2. Transkripční produkt genu Z-SOD22 se nepodařilo v buňkách Z. rouxii vůbec detekovat (Iwaki, et al., 1998). V genomu Z. rouxii byl na základě homologie s genem S. cerevisiae ENA1 (kap. 1. 2. 1) charakterizován i gen ZENA1 kódující Na⁺-ATPázu. Tato ATPáza se, na rozdíl od S. cerevisiae, kde ATPáza Ena1 je hlavní systém eliminující Na⁺ (Li⁺) z buněk, podílí na celkové toleranci Z. rouxii velmi málo (Watanabe, et al., 1999).

V kapitole 1. 2. 1 bylo již uvedeno, že schopnost růstu modelové kvasinky *S. cerevisiae* na médiích obsahujících sole alkalických kovů je částečně dána přítomností Na⁺/H⁺-antiporteru Nha1. Nha1p patří do rodiny antiporterů z plazmatické membrány kvasinek (obr. 1. 4) a je v *S. cerevisiae* exprimován kostitutivně (gen *NHA1* (Prior, et al., 1996)). Jak je popsáno v kap. 1. 2. 1, Nha1p je schopen transportovat přes plazmatickou membránu nejen kationty Na⁺ a Li⁺, ale také K⁺ (jedná se tedy o Na⁺, K⁺/H⁺-antiporter) a společně s ATPázou Ena1 se podílí na udržování stálých koncentrací K⁺ a Na⁺ uvnitř buněk (kap. 1. 2. 1, (Bañuelos, et al., 1998)). Původně byl gen *NHA1* získán z genové banky *S. cerevisiae* ve zkrácené formě (na 3' konci byl kratší asi o 300 nt) (Prior, et al., 1996) (obr. 1. 5). Zkrácená verze i kompletní gen byly exprimovány v mutantním kmeni *S. cerevisiae* B31 velmi citlivém k solím alkalických kovů (postrádá geny kódující Na⁺-ATPázy i samotný

přenašeč Nhalp, *enal-4* Δ *nhal* Δ) a překvapivě bylo zjištěno, že buňky obsahující zkrácenou verzi Nhalp (dlouhou 888 aa) byly tolerantnější k NaCl než buňky s kompletním přenašečem (985 aa) (Bañuelos, et al., 1998). Tento rozdíl se projevil i při přímém měření transportní aktivity. Výstup Na⁺ z buněk byl v případě verze Nhalp s 888 aa vyšší (Bañuelos, et al., 1998). Navíc bylo zjištěno, že při náhlém zvýšení vnitrobuněčného pH antiporter Nhal zprostředkovává rychlý výstup kationtů K⁺, což naznačuje jeho roli v regulaci vnitrobuněčného pH (Bañuelos, et al., 1998). To bylo potvrzeno také přímo měřením pH cytoplasmy v buňkách obsahujících gen *NHA1* a v buňkách, u nichž byl gen *NHA1* deletován (*nha1* Δ) (Sychrová, et al., 1999).

Zcela nedávno vyšla publikace, v níž se autoři zabývají mimo jiné také studiem aminokyselinových zbytků důležitých pro transportní aktivitu Nha1p. Byly analyzovány aspartátové zbytky D241, D266 a D267. Podobně jako v případě sod2p *S. pombe*, mutace zbytků D266 a D267 vedla k neschopnosti přenašeče transportovat sodné kationty, zatímco transport K⁺ nebyl ovlivněn. Naopak záměna zbytku aspartátu za asparigin v pozici 241 neměla vliv na transport Na⁺, ale snižovala transportní aktivitu pro draslík (Simón, et al., 2001). Opět to naznačuje schopnost přenašeče rozeznat dva rozdílné kationty.

Další gen kódující Na⁺/H⁺-antiporter (*CNH1*) patřící do této rodiny byl izolován z kvasinky *C. albicans* (kmen SC5314), gen *CNH1* (Soong, et al., 2000). Kvasinka *C. albicans* je významný lidský patogen existující ve dvou formách, jednobuněčné nebo vláknité, tj. patogenní. Přechod mezi oběma formami je ovlivněn změnami ve vnějším prostředí, jako jsou pH, dostatek živin nebo teplota (Odds, 1985). Delece genu *CNH1* má v *C. albicans* malý vliv na toleranci buněk k NaCl nebo LiCl, vede však k retardaci jejich růstu a k prodloužení buněk (Soong, et al., 2000). Funkce Na⁺/H⁺-antiporteru by tedy mohla ovlivňovat morfogenezi buněk *C. albicans*.

Exprese genu *CNH1* v mutantním kmeni *S. cerevisiae* B31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ) zvýšila toleranci buněk jak k LiCl, tak k NaCl a opět mutace konzervativních zbytků D266 a D267 měla negativní dopad na schopnost přenašeče transportovat ionty Na⁺ (Soong, et al., 2000). Tyto dva aminokyselinové zbytky se tak zdají být velmi dobrými kandidáty na vazebné místo kationtů sodíku.

1. 4. 2. 1 Srovnání struktury a vlastností Na⁺/H⁺ antiportních systémů plazmatické membrány kvasinek

Všechny antiportery patřící do rodiny Na⁺/H⁺ antiporterů plazmatických membrán kvasinek vykazují podobné strukturní vlastnosti (obr. 1. 5 v kap. 1. 4). V tabulkách 1. 1 a 1. 2 jsou uvedena podrobnější srovnání strukturních parametrů a procentuálně vyjádřena srovnání aminokyselinových sekvencí vybraných zástupců této rodiny.

Z uvedených údajů vyplývá, že přenašeče se shodně skládají z krátkého hydrofilního N-konce a transmembránové hydrofobní části (pravděpodobně s 12 transmembránovými segmenty). Sekvence v těchto úsecích jsou si podobné i z hlediska srovnání aminokyselinových sekvencí (tab. 1. 2). Přenašeče se však vzájemně značně odlišují v délce i aminokyselinovém složení svých C-koncových domén.

		Délka (aa)			
Kmen	Antiporter	celkem	N-konec	tms + smyčky	C-konec
<i>Sp</i> (972h ⁻)	sod2	468	11	414	43
Zr (ATCC42981)	Z-Sod2	791	11	417	361
<i>Sc</i> (Σ1278b)	Nha1	985	12	419	554
<i>Ca</i> (SC5314)	Cnh1	796	11	419	366

Tab 1.1 Primární struktura proteinů Na⁺/H⁺-antiportních systémů kvasinek.

Tab 1. 2Podobnost aminokyselinových sekvencí Na⁺/H⁺-antiportních systémů
kvasinek

	% identity (celkově / <u>tms+smyčky</u> / <i>C-konce</i>)				
Antiporter	sod2p	Z-Sod2p	Nha1p	Cnh1p	
sod2p	100	41,6 / <u>44,0</u> / 34,9	40,8 / <u>43,2</u> / 30,2	42,4 / <u>44,8</u> / <i>33,3</i>	
Z-Sod2p		100	58, 6 / <u>76,6</u> / 34,2	46,0 / <u>65,3</u> / 26,4	
Nha1p			100	49,2 / <u>69,9</u> / 36,6	

(tučně – % identity při srovnání celých sekvencí, <u>podtrženě</u> – % identity při srovnání Nkoncových transmembránových úseků, *proloženě* – % identity při srovnání sekvencí hydrofilních C-koncových domén)

Ze srovnání jednotlivých členů rodiny a z poznatků uvedených v kapitole 1. 4. 2 je možné poukázat na výjimečné postavení nejdelšího proteinu této rodiny antiporteru Nha1p z *S. cerevisiae* a zejména jeho neobvykle dlouhého C-konce (554 aminokyselin, tj. 56,2 % celého proteinu, Tab. 1. 1).

(i) Narozdíl od ostatních přenašečů z *S. pombe, Z. rouxii* a *C. albicans*, o nichž se předpokládá, že transportují pouze sodík a lithium, je Nha1p schopen transportovat také draselné kationty (Bañuelos, et al., 1998). Pro tuto výjimečnou substrátovou specifitu Nha1p by mohl být významný extrémně dlouhý C-konec přenašeče.

(ii) Jak bylo zmíněno v kap 1. 4. 2, buňky nesoucí původně klonovaný gen *NHA1*, kratší na 3' konci asi o 300 nukleotidů (Prior, et al., 1996), byly tolerantnější k NaCl i LiCl než buňky s kompletním *NHA1* (Bañuelos, et al., 1998), proto C-konec Nha1p by tak mohl ovlivňovat transportní aktivitu přenašeče, podobně jako bylo pozorováno u jiných typů transportních proteinů (např. u přenašečů aminokyselin v kvasinkách Gap1p (Stanbrough a Magasanik, 1995) a Bap2p (Grauslund, et al., 1995; Omura, et al., 2001), u H⁺-ATPázy plazmatické membrány kvasinek nebo rostlin (Palmgren, et al., 1991; Portillo, et al., 1989) nebo u Na⁺/H⁺ antiportních systémů živočichů (kap. 1. 4. 4)). Navíc, C-konec proteinu Nha1p by se mohl účastnit nějaké signalizace analogicky jako C-konce membránových proteinů Snf3p a Rgt2p, signalizujících množství glukosy v médiu (Lafuente, et al., 2000; Özcan, et al., 1998) nebo jako Ssy1p, který prostřednictvím svého N-konce monitoruje vnější koncentraci aminokyselin (Klasson, et al., 1999).

(iii) Jelikož bylo zjištěno, že Nha1p ovlivňuje vnitrobuněčné pH (Sychrová, et al., 1999), dlouhý C-konec proteinu by se mohl podílet na této jeho funkci, podobně jako např. u živočišného antiporteru NHE1 (Wakabayashi, et al., 1992).

Všechny uvedené antiportery z kvasinek *S. pombe*, *Z. rouxii* a *C. albicans* byly funkčně exprimovány v kmenech *S. cerevisiae*, avšak za použití různých expresních systémů (různé vektory a promotory). Také jejich případná substrátová specifita, ani transportní aktivita nebyly nikdy přímo stanovovány. Byla pouze

sledována tolerance buněk exprimujících tyto geny k vysokým koncentracím NaCl a LiCl.

1. 4. 1 Rostlinné Na⁺/H⁺ antiportery

Vlivem zhoršování životního prostředí dochází neustále ke zvyšování koncentrace solí (NaCl) v půdách (Serrano, et al., 1997), což nepříznivě působí na růst a rozmnožování rostlin. Závažným důsledkem pak je snižování rostlinné produkce v zemědělství. Proto je studium transportních systémů zodpovědných v rostlinných buňkách za jejich toleranci k solím velmi významné a získané poznatky mohou vést ke zlepšování odolnosti rostlin k NaCl. Tak jako *S. cerevisiae* je modelovým organismem u kvasinek, modelem pro studium procesů probíhajících přímo v rostlinných buňkách je hojně rozšířená rostlina huseníček Thalův (*Arabidopsis thaliana*).

V rostlinných buňkách fungují podobné mechanismy (kap. 1. 2. 1 a 1. 3) zajišťující toleranci k NaCl jako v buňkách kvasinek (Serrano a Rodríguez-Navarro, 2001). Toxické kationty Na⁺ mohou do buněk vstupovat pravděpodobně prostřednictvím iontových kanálů nebo vysokoafinitních transportních systémů pro draslík (rodina HKT), které vykazují různý stupeň aktivity pro kationty Na⁺ (Rodríguez-Navarro, 2000; Uozumi, et al., 2000). Nízká hladina sodných kationtů v cytoplazmě je zajišťována přítomností dvou Na⁺/H⁺-antiporterů (rostlinné buňky postrádají Na⁺-ATPázu) lokalizovaných v plasmatické membráně a ve vakuole. V *A. thaliana* je Na⁺/H⁺-antiporter plasmatické membrány kódován genem *SOS1* (Shi, et al., 2000) a vakuolární antiporter genem *AtNHX1* (Apse, et al., 1999). Oba transportní systémy patří svou primární strukturou spíše do rodiny živočišných antiporterů (obr. 1. 4). V genomu *Arabidopsis* existuje více než 40 genů kódujících homologní Na⁺/H⁺-antiportery (Maser, et al., 2001). Homologní antiporter byl klonován také např. v rýži (*Oryza sativa*, gen *OsNHX1*, (Fukuda, et al., 1999)).

Antiporter SOS1 je v buňkách nezbytný pro zachování homeostáze nejen kationtů Na⁺, ale i K⁺ a možná je, tak jako Nha1p v *S. cerevisiae*, schopen transportovat draslík (Zhu, et al., 1998). Stejně jako Nha1p se SOS1 vyznačuje velmi dlouhou C-koncovou hydrofilní doménou (tvoří 61 % celého proteinu) důležitou pro funkci přenašeče (Shi, et al., 2000). Gen *SOS1* však není konstitutivní (narozdíl od

NHA1), ale za přítomnosti NaCl dochází ke zvýšení jeho exprese, na němž se pravděpodobně podílí komplex proteinkináz SOS3-SOS2 (Shi, et al., 2000). Přenašeč SOS1 je exprimován zejména v pletivech na okraji xylému, což naznačuje jeho význam pro homeostázi kationtů Na⁺ a K⁺ v těchto částech rostliny (Zhou, et al., 2000).

Na⁺/H⁺-antiporter AtNHX1 (538 aa) byl identifikován na základě homologie s antiporterem Nhx1 v S. cerevisiae (Gaxiola, et al., 1999; Quintero, et 2000) a vlastnosti obou přenašečů mají podobné rysy (nízkoafinní al., elektroneutrální transportní systémy inhibované amiloridem). Rostlinný AtNhx1p je schopen plně funkčně nahradit chybějící Nhx1p v S. cerevisiae (Darley, et al., 2000). A. thaliana nepatří mezi rostliny dobře rezistentní k NaCl, ale její toleranci lze zvýšit nadměrnou expresí genu AtNHXI (Apse, et al., 1999). Přítomností NaCl je exprese AtNHX1 indukována pouze v některých částech rostliny (listy) (Quintero, et al., 2000). Avšak více než detoxifikace je hlavní funkcí AtNHX1 v rostlinných buňkách regulace pH vakuoly (Darley, et al., 2000). To bylo velmi dobře ukázáno např. při studiu funkce homologního antiporteru InNHX1 v japonském svlačci Ipomea nil, u něhož dochází při rozkvétání vlivem zvýšení pH ve vakuole ke změně barvy (poupata jsou načervenalá až purpurová, zatímco květy jsou modré). V mutantní I. nil postrádající gen InNHX1 není tato změna pH dostatečná a květy zůstávají purpurové (Yamaguchi, et al., 2001). Exprese genu InNHX1 se značně zvyšuje dvanáct hodin před rozkvětem (Yamaguchi, et al., 2001).

Poznání, že systémy pocházející z buněk kvasinek a z rostlinných buněk jsou si velmi podobné, umožňuje v dnešní době používat kvasinky jako heterologní expresní systém pro analýzu strukturních a regulačních vlastností rostlinných Na⁺/H⁺-aniporterů.



Obr. 1.6 Schématické znázornění mechanismu transportu Na⁺/H⁺-antiporterů NHE v živočišných buňkách.

1. 4. 1 Živočišné Na⁺/H⁺ antiportní systémy

Buňky živočichů nejsou chráněny před vnějšími změnami osmolarity pevnou buněčnou stěnou jako je tomu u mikroorganismů a rostlin. Jsou tedy mnohem citlivější na působení faktorů, které ovlivňují objem buněk, a pro udržování stálého vnitrobuněčného objemu potřebují velmi přesný regulační mechanismus. Nepostradatelnou úlohu v regulaci objemu živočišných buněk a vnitrobuněčného pH zastávají Na⁺/H⁺-antiportery NHE. Na rozdíl od systémů uvedených v předchozích podkapitolách, aktivace Na⁺/H⁺-antiporterů v živočišných buňkách vede ke vstupu iontů Na⁺ do buněk a vylučování protonů (elektrochemický gradient sodných kationtů potřebný pro transport vytváří např. Na⁺, K⁺-ATPáza, což je schématicky znázorněno na obr. 1. 6). S mnoha systémy NHE operuje zároveň antiporter Cl /HCO3⁻. Důsledkem souladu činností obou transportních systémů je vstup NaCl do buňky, což současně vede k příjmu molekul vody buňkou a následnému zvětšení jejího objemu. Antiport iontů Na^+/H^+ je nejen potřebný pro regulaci objemu buněk, ale uplatňuje se také při zpětné resorpci anorganických látek v epiteliálních tkáních ledvin, tenkého střeva a dalších orgánů. Navíc vylučování protonů výměnou za kationty Na^+ je jedním z nejúčinnějších prostředků, kterým se aktivně metabolizující buňky zbavují nadbytku kyselosti, a zachovávají si tak stálou hodnotu vnitrobuněčného pH (Orlowski a Grinstein, 1997; Ritter, et al., 2001).

Sedm různých izoforem Na⁺/H⁺-antiporterů, označovaných NHE1-7, bylo dosud klonováno v různých živočišných buňkách savců (např. myš, potkan, králík, člověk), obojživelníků (např. ropucha, mlok) a ryb (např. kapr, platýs). Jednotlivé izoformy jsou lokalizovány buď v plasmatické membráně buněk (NHE1-5) nebo v membránách vnitrobuněčných organel (NHE6-7). Izoformy NHE1, NHE6 a pravděpodobně i NHE7 jsou obsaženy ve všech buňkách, zatímco ostatní izoformy jsou exprimovány pouze ve specializovaných tkáních jako jsou vylučovací a trávící ústrojí nebo mozek. Podobnost aminokyselinových sekvencí se u jednotlivých izoforem liší, od 20-60 %. Všechny se však skládají, jako v případě již uvedených antiporterů, ze dvou funkčních domén (Wakabayashi, et al., 1992). Obr. 1. 7
zachycuje model struktury izoformy NHE1. N-koncovou hydrofobní část tvoří 12 transmembránových segmentů. Mezi jednotlivými členy rodiny živočišných antiporterů jsou nejvíce konzervovány segmenty M3-M12. U antiporteru NHE1 je asparagin N75 v první extracelulární smyčce glykosylován (obr. 1. 7, (Counillon, et al., 1994)). V dlouhé, méně konzervativní C-koncové doméně bylo identifikováno několik oblastí podílejících se na regulaci transportní aktivity přenašečů, mezi něž, jak zobrazuje obr. 1. 7, patří např. místa, kde dochází k fosforylaci proteinů různými proteinkinázami, vysoce konzervativní sekvence blízko plasmatické membrány (⁵⁴⁰HYGHHH⁵⁴⁵ u NHE1), která se uplatňuje v jemném modulování funkce antiporteru v závislosti na pH, vazebné místo pro Ca²⁺/kalmodulin, místo citlivé na hladinu ATP v buňkách a další úseky, o nichž se předpokládá, že interagují s jinými proteiny v buňce (Orlowski a Grinstein, 1997; Wiebe, et al., 2001).



Obr. 1. 7 Schématické vyjádření charakteristických strukturních rysů lidského Na⁺/H⁺ antiporteru NHE1 (N = glykosylace, CaM-A a CaM-B = vysokoa nízkoafinní vazebná místa pro kalmodulin, P = místa fosforylovaná proteinkinázou C, CHP-R = vazebné místo pro protein CHP homologní ke kalcineurinu B vážícího kationty Ca^{2+} , VOL = funkční doména reagující na změny buněčného objemu, ATP? = pravděpodobné místo citlivé na úroveň hladiny ATP nebo PIP₂ v cytoplazmě). Převzato z (Orlowski a Grinstein, 1997). Nedávno byla struktura transmembránové časti NHE1 upřesněna: hydrofilní smyčky mezi membránovými segmenty 4 a 5, 8 a 9, 11 a 12 jsou částečně zanořeny do membrány a jsou zřejmě dostupné z obou stran membrány, což naznačuje jejich potenciální roli v transportu iontů (Wakabayashi, et al., 2000).

Transport kationtů prostřednictvím živočišných Na⁺/H⁺-antiporterů je elektroneutrální (stechiometrie 1:1) (Aronson, 1985). Extracelulární vazebné místo není selektivní pouze pro kationty Na⁺, ale se sodnými ionty mohou o vazbu soutěžit také protony a kationty Li⁺. Naopak, draselné kationty nejsou transportovány (výjimku tvoří nově objevený NHE7) a u některých izoforem dochází přímo k inhibici transportní aktivity v přítomnosti draselných kationtů (NHE1). Na transportní aktivitu NHE2, NHE3 a NHE5 nemají kationty K⁺ žádný vliv (Orlowski, 1993; Szabo, et al., 2000). Aminokyselinové zbytky důležité pro vazbu transportovaných kationtů však nebyly dosud přesně určeny. Kompetitivním inhibitorem přenašečů patřících do rodiny antiporterů NHE je diuretická látka amilorid nebo jeho analogy a také benzoylguanidiniovými sloučeninami. Vazebná místa pro tyto látky jsou umístěna zejména v transmembránových segmentech M4 a M9 (obr. 1. 7). Citlivost jednotlivých izoforem k těmto látkám je však různá (amilorid: NHE1>NHE2>>NHE3>NHE4 (Noël a Pouyssegur, 1995)). Jak bylo zmíněno v úvodu kapitoly 1. 4, transport pomocí Na^+/H^+ -antiporterů je řízen chemickými gradienty kationtů Na^+ a H^+ přes membránu a nevyžaduje tedy přímo spotřebu energie, přesto se zdá, že hladina intracelulárního ATP ovlivňuje aktivitu přenašečů NHE (Wakabayashi, et al., 1997). Nedávno bylo publikováno, že citlivost NHE1 na nedostatek ATP je částečně způsobena nedostatkem fosfatidylinositolbisfosfátu (PIP₂), jehož hladina v se buňkách vyčerpáním ATP značně snižuje (Aharonovitz, et al., 2000). Mimo již uvedené regulační faktory, bylo prokázáno, že činnost NHE je regulována také mechanickými vlivy (hyperosmotickým stresem nebo zvětšením objemu buněk). Zatímco u izoforem NHE1, 2 a 4 dochází zvýšením osmolarity k aktivaci antiporterů, přenašeč NHE3 není hyperosmolaritou prostředí

ovlivněn nebo je dokonce inhibován (Good, et al., 2000; Soleimani, et al., 1994a; Soleimani, et al., 1994b).

Zatím nejvíce prostudovaná izoforma NHE1 je exprimována v živočišných organismech prakticky ve všech buňkách všech tkání. Tomuto antiporteru se přisuzuje obecná role v zachování vnitrobuněčného pH a objemu buněk, tzv. "housekeeping" funkce (Wakabayashi, et al., 1997). Rozmístění NHE1 v buňkách není rovnoměrné a v epiteliálních buňkách se vyskytuje pouze na bazolatelární straně (Noël, et al., 1996; Petrecca, et al., 1999). Jakým způsobem je aktivita NHE1 regulována není zcela přesně známo. Přenašeč NHE1 je na několika místech konstitutivně fosforylován a k dalším fosforylacím dochází během aktivace např. růstovými hormony (Wakabayashi, et al., 1997). Konstitutivní fosforylace pravděpodobně napomáhají interakci NHE1 s jinými proteiny. Některé příklady NHE1-vazebných proteinů (např. kalmodulinu, proteinu CHP homologního ke kalcineurinu B) jsou uvedeny na obr. 1. 7. Aktivace NHE1 nastává změnou afinity k protonům ihned, pokud dojde ke změně objemu buněk (Krump, et al., 1997), nebo pokud vnitrobuněčné pH klesne pod neutrální pH (Aronson, et al., 1982; Paris a Pouyssegur, 1983). Bylo prokázáno, že přenašeč NHE1 hraje v organismu zásadní role v mnoha fyziologických procesech, jako jsou např. buněčná proliferace, obranná funkce organismu (fagocytóza), dýchání (regulace objemu povrchové tekutiny v dýchacích cestách), činnost srdce a mozku (Ritter, et al., 2001). Odstranění tohoto antiporteru není sice pro organismus letální, ale u transgenních myší postrádajících antiporter NHE1, označují se SWE (Slow Wave Epilepsy), dochází k retardaci růstu, poruše koordinace pohybu a po odstavení od matky se u nich vyskytují záchvaty epilepsie (Bell, et al., 1999).

Izoforma NHE2 byla identifikována zejména na apikální straně epiteliálních buněk tkání ledvin, tenkého střeva a v kosterním svalstvu (Malakooti, et al., 2001; Wakabayashi, et al., 1997). V C-koncové doméně této izoformy se nacházejí dva úseky bohaté na aminokyselinové zbytky prolinu (tzv. SH3 domény) důležité zřejmě pro lokalizaci proteinu v membráně (Chow, 1999). Fyziologická funkce NHE2 v organismu však není dosud zcela objasněna, pravděpodobně doplňuje funkce antiporteru NHE3. Ten se v živočišných organismech nachází zejména v epiteliálních tkáních tenkého střeva a ledvin, na apikální straně buněk (Wakabayashi, et al., 1997). U transgenních myší postrádajících tento antiporter dochází ke snížení krevního tlaku, jsou acidózní a vykazují defekty v absorpci látek ve střevu i v ledvinách. Přenašeč NHE3 se tak zdá zodpovědný, vzhledem k jiným izoformám (NHE1, 2, 4), za většinu absorpčních procesů probíhajících v těchto orgánech (Schultheis, et al., 1998). Regulace aktivity NHE3 je naprosto odlišná od izoformy NHE1. Změny aktivity nenastávají změnami jeho afinity k vnitrobuněčným protonům jako v případě NHE1, ale dochází ke změnám velikosti maximální rychlosti transportu (Nath, et al., 1996). Při studiu lokalizace NHE3 v jednotlivých buňkách bylo zjištěno, že se vyskytuje jak v plasmatické membráně tak i v membránových váčcích uvnitř buněk (D'Souza, et al., 1998). Jeho aktivita je spíše regulována přesunem jednotlivých molekul přenašeče mezi plazmatickou membránou a endosomy v buňce (Kurashima, et al., 1999). Tento proces i samotná aktivita NHE3 je závislá na organizaci cytoskeletu (hlavně aktinu) (Chalumeau, et al., 2001; Szaszi, et al., 2000). Nedávno bylo publikováno, že NHE3 existuje v ledvinových buňkách ve dvou formách, volné aktivní formě (v membráně) nebo v neaktivní formě vázané na molekulu receptoru megalinu lokalizované v mikrodoménách uvnitř buňky (Biemesderfer, et al., 2001).

Ačkoliv závislost rychlosti transportu na koncentraci Na⁺ sleduje u ostatních izoforem hyperbolickou křivku Michaelise a Mentenové, čtvrtá izoforma NHE4 vykazuje závislost sigmoidní, což naznačuje možnost allosterické aktivace tohoto přenašeče nebo jeho spolupráce s jinými proteiny (Bookstein, et al., 1996). Tato izoforma je rozšířená zejména v žaludku a v ledvinách, nepatrně také ve střevu a v mozku v hippocampu (Wakabayashi, et al., 1997). V kůře ledvin jsou buňky normálně vystaveny velmi hyperosmotickému prostředí, proto se předpokládá, že antiporter NHE4 zde zřejmě zastává specializovanou funkci v zachování buněčného objemu (Bookstein, et al., 1996; Chambrey, et al., 1997).

Izoforma živočišných Na⁺/H⁺-antiporterů NHE5, nejvíce podobná NHE3, se nachází hlavně v neepiteliálních tkáních v mozku, malé množství této izoformy bylo detekováno také ve slezině, varlatech a kosterním svalstvu (Klanke, et al., 1995). Zajímavostí u tohoto přenašeče ovlivňujícího pravděpodobně činnost mozku je, že je velmi citlivý na přítomnost kationtů Li⁺ a jeho transportní aktivita je kompletně inhibována při vyčerpání ATP v buňkách (Szabo, et al., 2000).

Na⁺/H⁺-antiporter NHE6 byl detekován ve vnitřní membráně mitochondrií, zejména v tkáních mozku a kosterního svalstva. Zajišťuje vylučování sodných kationtů z alkalického matrix metabolicky aktivních mitochondrií, čímž významně přispívá k regulaci objemu těchto organel a nepřímo se pravděpodobně podílí na usnadnění výstupu Ca^{2+} a NH_4^+ z matrix (Numata, et al., 1998).

Nedávno byl izolován nový Na⁺/H⁺-antiporter z lidských buněk kostní dřeně. Izoforma NHE7 je nejvíce podobná mitochondriálnímu antiporteru NHE6 (Numata a Orlowski, 2001). Antiporter NHE7 je lokalizován v sekrečních váčcích trans-sítě Golgiho aparátu a zprostředkovává výměnou za protony transport jak kationtů Na⁺ tak i K⁺ směrem dovnitř váčků. Jelikož draselné kationty jsou v cytoplazmě zastoupeny mnohem více než sodné, za fyziologických podmínek se zřejmě jedná spíše o antiport K⁺/H⁺. O jeho fyziologické funkci se zatím moc neví, ale mohl by se pravděpodobně podílet na regulaci pH uvnitř sekrečních váčků a na regulaci objemu a morfologie těchto organel (Numata a Orlowski, 2001). Navíc by NHE7 mohl v živočišných buňkách zastávat podobnou funkci jako antiporter Nhx1p v *S. cerevisiae*, tj. regulace biogeneze a biodegradace proteinů v buňce (Bowers, et al., 2000).

Z uvedeného přehledu o živočišných antiporterech NHE vyplývá, že jejich funkce jsou pro organismus a jeho zdraví velmi důležité. Bohužel, je známo jen velmi málo informací o jednotlivých aminokyselinách, které by ovlivňovaly transport a mohly tvořit vazebná místa pro ionty v těchto přenašečích. Studium procesů probíhajících v živočišných buňkách na molekulární úrovni je navíc velmi obtížné, proto se nabízí možné řešení – funkční exprese antiporterů v kvasinkách.

2 Cíl práce

Cílem této práce, která navazuje na předchozí výsledky studia Na⁺, K⁺/H⁺antiportního systému Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae*, bylo:

- Objasnit význam dlouhého C-konce antiportního přenašeče Nha1 pro jeho funkci v buňkách S. cerevisiae.
- Pomocí heterologní exprese v S. cerevisiae charakterizovat transportní vlastnosti (substrátovou specifitu a transportní aktivitu) homologních antiporterů Na⁺/H⁺ identifikovaných v jiných kvasinkách (C. albicans, Z.

rouxii a *S. pombe*) a porovnat je s transportním systémem Nha1p z *S. cerevisiae*.

3. Pokusit se funkčně exprimovat a případně charakterizovat Na⁺/H⁺-antiportní systémy plazmatické membrány savčích buněk v kvasince *S. cerevisiae*.

2A Les objectifs

Ce travail a pour point de départ les résultats concernant Na^+ , K^+/H^+ l'antiporteur Nha1p de la levure *S. cerevisiae* acquis en majorité dans le laboratoire de Strasbourg. Trois objectifs ont été définis :

- Étudier en détail le domaine C-terminal de l'antiporteur Nha1p qui semblait jouer un rôle important dans la reconnaissance des substrats de l'antiporteur et dans la réponse au choc osmotique.
- Identifier et étudier des Na⁺/H⁺ antiporteurs orthologues de *C. abicans*, *Z. rouxii*, *S. pombe* par expression hétérologue chez *S. cerevisiae* afin de comparer leurs propriétés de transport (la specificité de substrat et l'activité de transport) à celles de Nha1p.
- 3. Exprimer fonctionnellement les cADN de Na⁺/H⁺-antiporteurs de la membrane plasmique des cellules de mammifères dans le contexte hétérologue de *S. cerevisiae* afin de tester leurs propriétés de transport sachant qu'ils ont préférentiellement un rôle dans l'import de Na⁺ alors que la protéine de levure joue un rôle dans l'export de Na⁺ et de K⁺.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Použité chemikálie byly vždy nejvyšší dostupné čistoty, pokud možno čistoty pro molekulární biologii, od firem Sigma (USA) nebo Lachema (ČR). Používané enzymy pro restrikční štěpení DNA a DNA ligaci byly, pokud neuvedeno jinak, od firem Boehringer (USA), Fermentas (Litva), Sigma (USA) nebo Gibco (USA).

3.1.1 Kultivační půdy

Pro přípravu médií byly používány komerčně připravené směsi od firmy Difco (USA). Pro pěstování bakterií byly používány tekuté nebo pevné půdy LB (1 % Bactotryptone, 0,5 % Yeast extract, 1 % chlorid sodný, pH 7,5), do nichž v případě potřeby byl přidáván ampicilin (100 µg/ml) nebo kanamycin (40 µg/ml). Kvasinky byly kultivovány ve standardních médiích YPG (1 % Yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % glukosa) nebo YNB (1 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 2 % glukosa) obsahujících v případě potřeby auxotrofní sloučeniny (15 µg/ml).

3. 1. 2 Kmeny bakterií a kvasinek

Pro selekci a amplifikaci plazmidové DNA byl používán kmen bakterií *E. coli* XL1-Blue (genotyp: *supE*44 *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*46 *thi relA*1 *lac*⁻ $F'[proAB^+ lacI^q lacZ\Delta$ M15 Tn10(*tet*^r)]). Kmen *E. coli* nesoucí mutaci v genu *dam*, který kóduje enzym metylující adenin v pozici N⁶ v sekvenci DNA 5'-GATC-3', byl používán v případě, že izolovaná DNA byla štěpena restrikčním enzymem *Cla*I (štěpí pouze DNA nemetylovanou enzymem dam).

Pro expresi genů a charakterizaci byly používány mutantní kmeny S. cerevisiae B31 (genotyp: enalΔ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 (Bañuelos, et al.,

1998) a JYM2 (genotyp: $ena1\Delta$::HIS3:: $ena4\Delta$ imp2 Δ ::LEU2 (Masson a Ramotar, 1998)), odvozené od divokého kmene W303.1A (*MATa leu2-3/112 ura3-1 trp1-1* $his3-11/15 \ ade2-1 \ can1-100$) (Wallis, et al., 1989)) a YSH (genotyp: $hog1\Delta$::LEU2 (Rep, et al., 1999b), odvozený od divokého kmene W303.1B (*MATa leu2-3/112* $ura3-1 \ trp1-1 \ his3-11/15 \ ade2-1 \ can1-100$) (Wallis, et al., 1989)).

Pro expresi přenašeče ZrSod2-22p byly používány tyto divoké kmeny *S. cerevisae*: YPH250, (mutant *ura3* divokého kmene S288C (Sikorski a Hieter, 1989)); *can1 lyp1 ura3* Δ (mutant *ura3* divokého kmene Σ 1278b, (Sychrova a Chevallier, 1993)); *ura3* Δ *trp1-4* (mutant *ura3* divokého kmene FL100 (Lacroute, 1968)). Genomová DNA z kmene FL100 byla použita také pro amplifikaci úseků DNA odpovídajících genu NHA1.

Pro klonování Na⁺/H⁺-přenašečů byla genomová DNA izolována z kmenů *C. albicans* MEN (Schep, et al., 1995), *Z. rouxii* CBS732 a *S. pombe* 972h⁻.

3.1.3 Vektory

V práci byly používány tyto vektory:

YEp352 (5,18 kb, *URA3*, 2μ , *Amp^R*, *ori*) je podvojný mnohokopiový vektor pro klonování v *E. coli* a v *S. cerevisiae* (Hill, et al., 1986).

p426 ADH (7,46 kb, *URA3*, 2 μ , *Amp^R*, *ori*) je podvojný mnohokopiový vektor odvozený z vektoru pRS426 (Sikorski a Hieter, 1989) obsahující konstitutivní promotor z genu kódujícího alkoholdehydrogenázu (promotor *ADH*) a terminátor z genu pro cytochrom-c-oxidázu (terminátor *CYC1*) (Mumberg, et al., 1995).

p416 GPD (5,80 kb, *URA3*, 2μ , *Amp^R*, *ori*) je podvojný centromerový vektor odvozený z vektoru pRS416 (Sikorski a Hieter, 1989) obsahující konstitutivní promotor z genu kódujícího glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (promotor *GPD*) a terminátor z genu pro cytochrom-c-oxidázu (terminátor *CYC1*) (Mumberg, et al., 1995).

pGRU1 (5,84 kb, URA3, 2 μ , GFP, Amp^R , ori) je podvojný mnohokopiový vektor odvozený z vektoru pUC19 (Yanisch-Perron, et al., 1985). Za polylinkrem následuje cDNA genu z medúzy *Aequorea victoria* kódující zelený fluorescenční protein GFP. Vektor slouží ke konstrukci proteinů značených na C-konci GFP (dar od Dr. B. Daignan-Forniera).

YEp357R (5,50 kb, *URA3*, 2µ, *lacZ*, *Amp^R*, *ori*) je podvojný mnohokopiový vektor vhodný pro testování promotorů kvasinek. Umožňuje fúzi sekvence promotoru s kódující sekvencí genu *lacZ* pro β -galaktosidázu z *E. coli* (Myers, et al., 1986).

pXA1 je odvozen od YEp357R, do něhož před sekvenci genu *lacZ* byl klonován úsek DNA (-674 až +62 nt) odpovídající promotoru a počátečním 62 nt genu *NHA1* z kvasinky *S. cerevisae* (dar od Dr. M. A. Bañuelos).

pCSMEmyc je plasmid obsahující kompletní gen *NHA1* s vlastním promotorem a sekvencí c-*myc* připojenou na 3' konci (Bañuelos, et al., 1998).

pBK-CMV-CNH1 je plasmid obsahující úsek genomové DNA (4,0 kb) z kvasinky *C. albicans* SC5314, který obsahuje gen kódující přenašeč Cnh1p (Soong, et al., 2000).

pCRII-TOPO je vektor, který je součástí soupravy TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA), který umožňuje rychlé klonování produktů po PCR s *Taq* polymerázou.

pCMV-NHE1, pCMV-NHE2 a pCMV-NHE3 jsou odvozeny od plasmidu pCMV, vhodného pro expresi genů v živočišných buňkách, a obsahují kompletní cDNA genů NHE1, NHE2 a NHE3 z potkana (*Rattus norvegicus*) (Collins, et al., 1993; Orlowski, 1993) (dar od RNDr. J. Páchy, CSc.).

3.2 Metody

Tato kapitola zahrnuje seznam všech použitých metod. Detailněji jsou popsány pouze metody neuvedené v publikacích č. 1-4.

3. 2. 1 Molekulárně-biologické metody

Izolace DNA z E. coli a z kvasinek

Plasmidová DNA z bakterií byla izolována tzv. "boiling" metodou (Holmes and Quigley, 1981) nebo v případě potřeby většího množství čisté pDNA byla použita souprava od firmy Bio Rad (USA) – Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit. Z kvasinek byla plasmidová nebo genomová DNA izolována podobným postupem založeným na rozbíjení buněk pomocí skleněných kuliček ve směsi fenolu a chloroformu (Hoffman a Winston, 1987).

Manipulace s DNA

Purifikace a precipitace DNA, restrikční štěpení, modifikace a ligace DNA *in vitro* byly prováděny podle standardních laboratorních protokolů (Sambrook, et al., 1989).

Polymerázová řetězová reakce

DNA byla amplifikována pomocí PCR v přístroji Eppendorf Master Cycler 5330 (USA) nebo Peltier Master Cycler, PTC-200 MJ Research (USA). Pro amplifikaci byla používána DNA-polymeráza *Pfu* (Stratagene, USA) nebo *Taq* (Sigma nebo Boehringer, USA). V případě amplifikace cDNA po reverzní transkripci z *S. pombe* (viz. níže) byla použita také souprava ExpandTM High Fidelity PCR System obsahující směs dvou termostabilních DNA polymeráz *Taq* a *Pwo* (Boehringer, USA).

Elektroforetická analýza DNA, izolace DNA z gelu

K analýze fragmentů DNA po restrikčním štěpení nebo PCR byla používána horizontální elektroforéza v 1 % agarózovém gelu. Fragmenty DNA z gelu byly izolovány pomocí soupravy Geneclean II Kit od firmy BIO 101 (USA).

Sekvenování DNA a analýza sekvencí

Vždy oba řetězce izolovaných fragmentů DNA byly sekvenovány v automatickém sekvenátoru dideoxynukleotidovou terminační metodou (Sanger, et al., 1977) pomocí soupravy Thermo Sequenase Sequencing Kit (Amersham Life Science Inc., USA). Sekvence DNA i proteinů byly analyzovány pomocí softwarového programu Lassergene99 (DNASTAR Inc., USA).

DNA-DNA hybridizace (Southern blot)

Přenos elektroforeticky rozdělené štěpené genomové DNA na nylonovou membránu a hybridizace s digoxigeninem značenou DNA-sondou byl prováděn podle standardních protokolů (Sambrook, et al., 1989). Použité sondy jsou vyznačeny na obr. 1 a 2 v publikaci č. 3.

Transformace kompetentních buněk E. coli

Kompetentních buňky *E. coli* pro transformaci byly připravovány podle standardního laboratorního protokolu (Sambrook, et al., 1989). Pro transformaci bakterií plasmidovou DNA byla používána elektroporace v přístroji Bio Rad (USA) podle návodu výrobce při napětí 2,5 kV, odporu 200 Ω , kapacitě 25 μ F, což odpovídalo době impulsu 3,8 – 5 ms.

Transformace kvasinek S. cerevisiae

Buňky kvasinek byly transformovány buď pomocí metody za použití octanu lithného (Soni, et al., 1993) nebo elektroporací v přístroji Bio Rad (USA) za podmínek: napětí 1,5 kV, odpor 400 Ω , kapacita 125 µF. Časová konstanta nabývala hodnot 6,8 – 7,5 ms. Před elektroporací byly buňky rostoucí v bohatém médiu YPG do exponenciální fáze růstu (OD₆₀₀ ≈ 0,8) promyty vodou, inkubovány 15 min v roztoku 25 mM dithiotreitolu, opět promyty a rozsuspendovány v elektroporačním pufru TpEB (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM MgCl2, 270 mM sacharosa, pH 7,5).

Izolace RNA z kvasinek a reverzní transkripce

Celková RNA byla z kvasinek *S. pombe* izolována z kvasinek za použití diethylkarbonátu (DEPC), inhibitoru ribonukleáz (Carlson a Botstein, 1982). cDNA byla syntetizována reverzní transkripcí pomocí soupravy First Strand cDNA Synthesis Kit od firmy Pharmacia Biotech (USA).

Extrakce proteinů z kvasinek

Proteiny byly izolovány z buněčné kultury v exponenciální fázi růstu metodou založenou na alkalické lýzy buněk pomocí čerstvě připraveného roztoku 1,85 M NaOH obsahujícího 7 % 2-merkaptoetanolu (Matějčková, 1997; Silve, et al., 1991). Proteiny byly následně precipitovány 50 % kyselinou trichloroctovou. Sediment proteinů byl promyt roztokem 1 M Tris a rozpuštěn v roztoku 2 x SB (4 % dodecylsulfát sodný, 0,1 M Tris, pH 6,8, 4 mM EDTA, 20 % glycerol, 2 % merkaptoetanol, 0,02 % bromfenolová modř). Ke vzorkům byly přidávány inhibitory proteáz (leupeptin, antipain, chymostatin a pepstatin v konečné koncentraci 1 µg/ml, PMSF v konečné koncentraci 2 mM). Po inkubaci 10 min při 37 °C byly extrakty rovnou použity pro elektroforézu nebo skladovány při -80 °C.

Elektroforéza v SDS polyakrylamidovém gelu

Proteiny extrahované z kvasinek byly elektroforeticky děleny (vertikální elektroforéza pro analýzu proteinů od firmy BioRad, USA) v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Připravován byl standardní 4 % zaostřovací gel a 10 % dělící gel (Hoefer, 1994). Po elektroforéze byly gely použity pro přenos rozdělených proteinů na membránu nebo byly barveny v roztoku 0,025 % Coomassie Brilliant Blue R 250 pro vizuální detekci proteinů.

Membrána	Výrobce
PVDF, Immobilon-P	Millipore, Sigma, USA
NC, Immobilon-NC	Milipore, Sigma, USA
ZETA-PROBE	BioRad, USA
Blotovací pufr	Složení
Blotovací pufr polosuchý blot	Složení 48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,075 % SDS, 20 % MetOH
Blotovací pufr polosuchý blot mokrý blot	Složení 48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,075 % SDS, 20 % MetOH 25 mM Tris, 190 mM glycin, 20 % MetOH
Blotovací pufr polosuchý blot mokrý blot CAPS	Složení 48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,075 % SDS, 20 % MetOH 25 mM Tris, 190 mM glycin, 20 % MetOH 10 mM CAPS, pH 11 (upraveno pomocí 10 N NaOH)

pufr CAPS obsahující 10 % MetOH

Tab 3. 1 Přehled blotovacích membrán a pufrů používaných v této práci.

Hybridizace elektroforeticky rozdělených proteinů s protilátkou

CAPS-M

Pro detekci zkrácených verzí Na⁺/H⁺-antiporteru Nha1p s připojenou sekvencí epitopu byla použita imunochemická metoda "Western blot", při níž jsou proteiny přeneseny z gelu na membránu a následně detekovány pomocí protilátek.

Pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu byl nejprve používán tzv. "polosuchý blot" (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, USA). Použitý postup vrstvení blotovacího "sendviče" byl již dříve popsán (Kinclová, 1997; Matějčková, 1997). Byly vyzkoušeny různé typy membrán a blotovacích pufrů, viz. tab. 3. 1. Přenos proteinů probíhal při konstantním proudu o velikosti asi 1,5 mA na 1 cm² membrány. Doba přenosu trvala od 1,5 do 5,5 h.

Jelikož polosuchý blot nevedl k úspěšné detekci proteinů, pro přenos proteinů byl vyzkoušen také tzv. "mokrý blot" (Tank Transfer Cell, BioRad, USA; blotovací pufr viz tab. 3.1). Blotovací "sendvič" byl postupně vrstven od záporné elektrody: houbička, 3MM filtrační papíry (4 ks), gel, membrána, 3MM filtrační papíry (4 ks), houbička. Filtrační papíry, membrána i gel byly předem namočeny minimálně 15 minut v blotovacím pufru. Přenos proteinů z gelu o rozměrech 8 x 5 cm probíhal při konstantním proudu 12,5 mA po dobu 15 hod a teplotě 4 °C.

Pro imunochemickou detekci přenašeče značeného epitopem c-*myc* pomocí protilátek byl používán stejný postup jako v případě detekce přenašeče Can1p^{c-myc} z kvasinky *C. albicans* exprimovaného v *S. cerevisiae* (Kinclová, 1997). Použita byla primární myší monoklonální protilátka anti-c-*myc* (Santa Cruz Biotechnology, USA) a sekundární anti-myší IgG protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma, USA). Protilátka specificky navázaná na přenašeč byla detekována na principu chemiluminiscence (souprava ECL, Amersham, USA).

3. 2. 2 Biochemické metody

Měření transportu a stanovení vnitrobuněčné koncentrace alkalických kationtů v buňkách kvasinek

Postup měření výstupu a vstupu alkalických kationtů a stanovení vnitrobuněčné koncentrace Na⁺ a K⁺ v kvasinkách je detailně uveden v publikacích č. 1 a 4. Po kyselé extrakci buněk byl obsah kationtů v jednotlivých vzorcích stanoven atomovou absorpční spektroskopií (Haro, et al., 1991; Rodríguez-Navarro a Ramos, 1984).

Stanovení aktivity β-galaktosidázy

Ke studiu regulace exprese genu *NHA1* byla použita metoda fúze promotoru *NHA1* s genem *lacZ* kódujícím bakteriální enzym β-galaktosidázu (Yocum, et al., 1984). Aktivita β-galaktosidázy v buňkách kvasinek odpovídající expresi pod vlivem promotoru *NHA1* byla stanovena metodou permeabilizace buněk a následným měřením enzymové aktivity (Sambrook, et al., 1989). Přidaný substrát o-nitrofenylβ-D-galaktopyranosid (OMPG) se působením β-galaktosidázy štěpí za uvolnění žlutě zbarveného o-nitrofenolu. Měřením absorbance při 420 nm bylo stanoveno množství uvolněného o-nitrofenolu odpovídající aktivitě β-galaktosidázy (Sambrook, et al., 1989).

Stanovení glycerolu

Celkové množství glycerolu syntetizované v buňkách obsahujících různé verze přenašeče Nha1p (publikace č. 1) bylo stanoveno přesně podle návodu v soupravě pro stanovení glycerolu (Boehringer, USA). Princip stanovení spočívá v tom, že glycerol uvolněný z permeabilizovaných buněk se převede pomocí glycerolkinázy za spotřeby ATP na L-glycerol-3-fosfát. ADP, které při této reakci vzniká je použito v další reakci s fosfoenolpyruvátem. Reakce je katalyzována pyruvátkinázou a vzniká při ní pyruvát, který je následně redukován pomocí L-laktátdehydrogenázy na L-laktát, přičemž se NADH oxiduje na NAD⁺. Množství oxidovaného NADH se určí měřením absorbance světla o vlnové délce 340 nm a stechiometricky odpovídá množství glycerolu.

3.2.3 Fyziologické metody

Mikroskopie kvasinek

Pro mikroskopickou analýzu buněk nesoucích proteiny značené GFP byl používán 1) fluorescenční mikroskop Leica DMRXA s fluorescein isothiokyanátovým filtrem (FITC) pro GFP nebo filtrem pro pozorování barvené DNA a 2) fluorescenční mikroskop Olympus BX60 s filtrem U-MWIB. Pro konfokální mikroskopii byl používán laserový mikroskop Bio-Rad MRC600 s imerzním objektivem (60x, NA = 1,4). Jaderná DNA byla vizualizována přímo v rostoucí kultuře buněk (barvení Hoechst 33342, Molecular Probe, USA) nebo po fixaci buněk formaldehydem (barvení pomocí 4,6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI), Molecular Probe (USA)).

Stanovení tolerance k solím

Tolerance buněk kvasinek k alkalickým kationtům za různých hodnot vnějšího pH byla testovány pomocí kapkových testů na pevných médiích YNB obsahujících LiCl, NaCl, KCl nebo RbCl jako je popsáno v publikaci č. 1.

Sledování růstu buněk v tekutém médiu

Růst transformantů kvasinek v tekutém médiu byl sledován v minimálním médiu YNB-NH₄ s různým obsahem solí po dobu 24 hodin. Kultury byly zaočkovány do stejné $OD_{600} \approx 0,02$) z předem napěstovaného inokula, kultivovány za stálého třepání při 30 °C a růst byl sledován měřením OD při 600 nm (viz. také publikace č. 4).

Stanovení bezvodé buněčné hmotnosti (sušiny) buněk

Při měření transportu kationtů v kvasinkách (publikace č. 1, 2, 4) bylo potřeba přepočíst hodnoty koncentrací kationtů v jednotlivých vzorcích na hmotnost sušiny buněk. Sušina byla u jednotlivých transformantů kmene B31 stanovena následujícím způsobem: 250 ml minimálního média bylo zaočkováno z inokula do $OD_{600} \approx 0.02$ a kultury byly kultivovány za stálého třepání při 30 °C. Během růstu, který byl sledován měřením OD při 600 nm, byly odebrány čtyři alikvoty kultury (50 ml). Buňky byly dvakrát promyty vodou, rozsuspendovány v 1 ml ledové vody a přeneseny do předem zvážených minizkumavek. Zkumavky byly umístěny po dobu 4 h v sušárně při teplotě 90 °C. Po vychladnutí byly minizkumavky zváženy a od získaných hodnot byly odečteny hmotnosti prázdných minizkumavek. Takto získané hodnoty sušin byly vyneseny do grafu proti hodnotám OD₆₀₀, při kterých byly alikvoty odebírány, a z lineární závislosti byla stanovena hmotnost suché váhy buněk odpovídající $OD_{600} = 1,0$. Jelikož se jednalo o buňky stejného kmene S. cerevisiae (B31), ve všech případech bylo dosaženo stejného výsledku, kdy $OD_{600} = 1,0$ odpovídala sušina 0,85 mg/ml. Tato hodnota byla používána pro výpočet vnitrobuněčné koncentrace kationtů při všech měření transportu i při stanovení celkových vnitrobuněčných koncentrací iontů.

Osmotický šok a testování přežití buněk

Reakce buněk na osmotický šok byla sledována v tekutém médiu YNB obsahujícím 35 % sorbitol nebo na miskách obsahujících tuhé médium YNB s různými koncentracemi sorbitolu jak přesně popisuje publikace č. 1. Publikace č. 1

také obsahuje popis metody, jakou byla testována schopnost buněk přežívat náhlé změny pH a osmolarity vnějšího prostředí.

Mutageneze

Pro zavedení mutací do přenašeče ZrSod2-22p byla použita metoda náhodné mutageneze pomocí UV-záření (Wagner, et al., 2001). Závislost přežití buněk na době působení UV-záření byla sledována tak, že buňky rostoucí v minimálním médiu do $OD_{600} \approx 1.0$ byly vysety rovnoměrně na misky s médiem YPG (10^3 buněk/misku). Bohaté médium YPG v této fázi experimentu usnadňovalo buňkám znovunabytí normálního buněčného cyklu po stresu způsobeném UV-zářením. Otevřené misky pak byly ozářeny po různě dlouhou dobu (viz. kapitola 4. 2. 6) světlem o vlnové délce 254 nm ze vzdálenosti 40 cm UV-lampou (Vývojové dílny ČSAV, ČR). Množství buněk, které přežilo působení UV-záření bylo odhadnuto počtem kolonií, které na miskách vyrostly za 48 h při 30 °C.

Při vlastní mutagenezi genu *ZrSOD2-22* bylo na jednu misku s YPG médiem vyseto 10^5 buněk a misky byly po ozáření inkubovány 72 hodin při 30 °C. Buňky z kolonií, které vyrostly na jednotlivých miskách, byly přeneseny do zkumavky se sterilní vodou a suspenze buněk byla rovnoměrně vyseta vždy na 5 misek s minimálním (YNB) selekčním médiem s vysokou koncentrací KCl (1.8 M) obsahujícím příslušné auxotrofní složky (viz. kap. 4. 2. 7).

4 Přehled výsledků a diskuze

Publikace č. 1-4, které vznikly na základě výsledků zabývajících se charakterizací transportních systémů rodiny Na⁺/H⁺-antiporterů plasmatické membrány kvasinek, jsou zařazeny na konci této kapitoly. V přehledu výsledků jsou zahrnuty jednak kapitoly, které odkazují na tyto publikace, ale také kapitoly obsahující výsledky a pozorování v publikacích neobsažené. Před započetím studia byly známy geny kódující přenašeče rodiny ve třech druzích kvasinek: S. cerevisiae, S. pombe a Z. rouxii, klonování homologního přenašeče z patogenní kvasinky C. albicans bylo publikováno v roce 2000 (Soong, et al., 2000). V rámci této práce byl nejprve studován transportní systém Nha1p z kvasinky S. cerevisiae, zejména vliv Ckoncové hydrofilní domény proteinu na substrátovou specifitu a transportní aktivitu přenašeče a na jeho další funkce v buňkách. Pro porovnaní transportních vlastností Nhalp s jeho homology, byly geny kódující přenašeče z kvasinek Z. rouxii, C. albicans a S. pombe heterologně exprimovány za stejných podmínek v S. cerevisiae a byla stanovena substrátová specifita a transportní aktivita jednotlivých přenašečů této rodiny. Jelikož kvasinky slouží jako vhodný model pro studium biologických pochodů, včetně membránového transportu, probíhajících i ve vyšších eukaryotních organismech byla dále studována možnost exprimovat v kvasinkách geny kódující živočišné antiportery Na⁺/H⁺.

4. 1 Funkční studium C-konce proteinu Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae*

Jak již bylo uvedeno v kap. 1. 4. 2. 1, přenašeče rodiny Na⁺/H⁺-antiportních systémů plasmatické membrány kvasinek se skládají z krátkého hydrofilního N-konce, 12 transmembránových domén a hydrofilního C-konce. Ačkoliv sekvence N-koncových částí, transmembránových domén a hydrofilních smyček, které je spojují, vykazují u všech přenašečů značnou podobnost, proteiny se liší v délce a aminokyselinovém složení hydrofilních C-konců (viz. tab. 1. 1 a 1. 2 v kap. 1. 4. 2). Přenašeč Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae* je nejdelší člen rodiny (985 aa) s extrémně dlouhým C-koncem (554 aa, t. j. 56,2 % z celého proteinu). Na rozdíl od ostatních

přenašečů Na^+/H^+ z různých organismů včetně živočichů, u nichž se vždy předpokládalo, že transportují pouze malé toxické alkalické kationty, sodík a lithium, zprostředkovává přes plasmatickou membránu také výstup draslíku ven z buňky (Bañuelos, et al., 1998). Nejprve bylo tedy studováno, jakou roli hraje dlouhý C-konec proteinu Nha1p v substrátové specifitě (transport K⁺) a transportní aktivitě přenašeče a výsledky tohoto studia popisuje publikace č. 1.

Nejdříve byla zkonstruována série 13 mnohokopiových plasmidů (odvozených od vektoru YEp352) obsahujících zkrácené verze genu NHA1, od nejdelší kódující kompletní protein (2955 nt, 985 aa) po nejkratší (1416 nt, 472 aa) končící pouze 41 aminokyselinových zbytků za poslední transmembránovou doménou. Všechny verze NHA1 byly exprimovány pod vlivem vlastního slabého konstitutivního promotoru NHA1 (nt -674 až -1), protože exprese NHA1 pod kontrolou silných promotorů (PGK1, ADH1, GPD1) nevedla ke zvýšení tolerance buněk k Na⁺ (Bañuelos, et al., 1998). Navíc, při nadměrné expresi membránových proteinů může sice docházet k vyšší produkci proteinu, ale protein pak nemusí být správně zabudováván do membrány a jeho nadměrné množství se může pro buňku stát toxickým. Tento jev byl například pozorován při zvýšené expresi přenašeče bazických aminokyselin plazmatické membrány kvasinky C. albicans Can1p pod vlivem silných promotorů v S. cerevisiae (Kinclová, 1997). Plazmidy nesoucí zkrácené verze genu NHA1 byly transformovány do mutantního kmene S. cerevisiae velmi citlivého k alkalickým kationtům (kmen B31; genotyp enal-4 Δ nhal Δ , postrádá jaderné geny kódující transportní systémy pro eliminaci alkalických kationtů z buněk: Na^+ -ATPázu a samotný Na^+/H^+ -antiporter, viz. kap. 1. 2). U transformantů nesoucích zkrácené verze proteinu Nhalp byla sledována lokalizace proteinů v buňce, tolerance buněk k alkalickým kationtům, transportní aktivita jednotlivých verzí přenašeče Nha1p (výstup iontů z buněk nesoucích zkrácené verze Nhalp). Poněvadž již dříve bylo zjištěno, že Nhalp se podílí na regulaci vnitrobuněčného pH (Bañuelos, et al., 1998; Sychrová, et al., 1999), bylo také zkoumáno, jakou roli hraje C-konec proteinu Nha1p v této funkci. Dále byla zjišťována úloha C-koncové části proteinu Nha1p v odpovědi buňky na hyperosmotický šok. Výsledky získané studiem transportní aktivity proteinů s různě dlouhým C-koncem obsažené v publikaci č. 1 je možné je shrnout takto:

Pro určení lokalizace zkrácených verzí proteinu Nha1p byla použita metoda značení proteinů zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), jak je popsáno níže

v kapitole 4. 1. 1. Pomocí této metody bylo zjištěno, že C-koncová hydrofilní doména proteinu Nha1p (aa 472-985) je postradatelná pro správné umístění proteinu v plasmatické membráně (obr. 2 a 3 v publikaci č. 1).



Obr. 4. 1 Maximální koncentrace solí NaCl, LiCl a KCl tolerované při vnějším pH 5.5 buňkami B31 obsahujícími jednotlivé verze proteinu Nha1p (od nejkratší dlouhé 472 aa až po kompletní s 985 aa). Podobné rozdíly v toleranci mezi jednotlivými verzemi jako je vyznačeno pro NaCl byly pozorovány také v případě sledování tolerance buněk k RbCl. C jsou kontrolní buňky transformované prázdným vektorem.

Role C- konce proteinu Nha1p v toleranci buněk k alkalickým kationtům byla sledována za různých pH (3.5, 5.5 a 7.0) pomocí kapkových testů na miskách s médiem YNB obsahujícím zvyšující se koncentrace solí LiCl, NaCl, KCl a RbCl. Jelikož transportní aktivita antiportního systému Na⁺/H⁺ je závislá na velikosti gradientu protonů přes membránu, nejvyšší tolerance buněk nesoucích různé verze přenašeče Nha1p byly zjištěny na miskách s kyselým pH 3,5. Kapkové testy dále prokázaly neočekávaný výsledek, že odstranění C-koncové domény Nha1p nemá žádný vliv na toleranci buněk k draslíku. Buňky nesoucí nejkratší verzi proteinu (Nha1p dlouhý 472 aa) tolerovaly stejné množství KCl v médiu jako buňky se všemi delšími verzemi, včetně kompletního Nha1p (985 aa) (obr. 4. 1). Pomocí kapkových testů bylo dále zjištěno, že Nha1p je schopen transportovat také další alkalický kation rubidium (Rb⁺). Částečné zkrácení C-konce asi o 70 koncových aminokyselin vedlo ke zvýšení tolerance buněk k Na⁺, Li⁺ a Rb⁺ (obr. 4. 1). Měření výstupu alkalických

kationtů z buněk nesoucích různé verze přenašeče Nha1p potvrdila, že rozdíly v tolerancích buněk k solím pozorované na miskách byly opravdu dány transportní aktivitou jednotlivých verzí přenašeče Nha1p (obr. 6 v publikaci č. 1). Podrobnějším studiem byla oblast C-konce přenašeče Nha1p (aa 883-928) identifikována jako nejdůležitější pro zachování maximální transportní aktivity přenašeče Nha1p pro transport sodíku a lithia. Tato část C-konce je zajímavá tím, že je velmi bohatá na kyselé aspartátové a glutamátové zbytky a že podle předpovězené sekundární struktury proteinu se zde nachází motiv α -helixu (obr. 1. 5 nebo obr. 1 v publikaci č. 1). Konformační změny α -helixu by se mohly podílet na regulaci transportní aktivity přenašeče. Poslední část C-konce proteinu (aa 945-985) působí pravděpodobně autoinhibičně na aktivitu přenašeče a zatím není možné vyloučit, zda tato část C-konce není nějak posttranslačně modifikována (např. fosforylací) nebo za určitých podmínek dokonce úplně odštěpena.

V případě draslíku, C-konec Nha1p neměl vliv nejen na toleranci buněk ke KCl (obr. 4. 1), ale ani na počáteční rychlost výstupu draslíku z buněk prostřednictvím Nha1p. Z buněk obsahujících Nha1p dlouhý 472 aa vystupovaly ionty K^+ za stejných podmínek se stejnou počáteční rychlostí. Na druhou stranu hladina vnitrobuněčného draslíku se v buňkách s nejkratší verzí Nha1p (472 aa) vždy ustálila na vyšší úrovni než v buňkách obsahujících kompletní Nha1p (985 aa) (obr. 6 C v publikaci č. 1), z čehož vyplývá, že C-koncová část proteinu Nha1p by mohla hrát nějakou roli v regulaci množství K⁺ uvnitř buněk.

Již dříve bylo také pozorováno, že při náhlém zvýšení cytoplasmatického pH dochází pomocí Nha1p k rychlému výstupu draslíku z buněk (Bañuelos, et al., 1998), což naznačuje, že Nha1p se svojí transportní aktivitou může podílet na regulaci vnitrobuněčného pH. Podle naší hypotézy se antiportním mechanismem za využití gradientu K⁺ orientovaného směrem ven z buňky (za daných experimentálních podmínek byl používán inkubační pufr, který neobsahoval ionty K⁺) mohou do buňky dostat protony, čímž dojde k opětnému snížení pH cytoplasmy. V případě buněk obsahujících Nha1p bez C-konce (verze se 472 aa) nebyla odpověď (výstup draslíku) na náhlou změnu vnitrobuněčného pH tak účinná jako v případě kompletního Nha1p (obr. 7 v publikaci č. 1), což naznačuje další úlohu hydrofilního C-konce přenašeče Nha1: v regulaci vnitrobuněčného pH.

Draslík patří mezi osmoticky aktivní látky, které se podílejí na buněčné osmotoleranci (Rodríguez-Navarro, 2000). Pozorování, že C-konec proteinu Nha1p

zřejmě ovlivňuje vnitrobuněčnou koncentraci kationtů K⁺, vedlo ke snaze zjistit, jakou roli může C-konec proteinu Nha1p hrát v odpovědi buňky na hyperosmotický šok. Buňky obsahující Nha1p bez C-konce (472 aa) byly v porovnání s buňkami nesoucími kompletní verzi Nha1p (985 aa) více citlivé ke zvýšení osmotického tlaku při pokusech prováděných jak v tekutém médiu se sorbitolem (obr. 8 v publikaci č. 1), tak i na miskách s pevným médiem obsahujícím vysoké koncentrace sorbitolu. Z toho vyplývá, že Nha1p a jeho C-konec jsou pro buňku významné také v okamžiku, kdy buňka je náhle vystavena změně osmolarity prostředí způsobené jiným solutem než solemi alkalických kovů. Přenašeč Nha1p tak pravděpodobně náleží mezi složky rychlého záchranného systému, který zajišťuje buňkám *S. cerevisiae* přežití nepříznivých podmínek (publikace č. 1 a (Hohmann, 1997)).

V době sepisování této práce bylo publikováno, že Nha1p se pravděpodobně podílí také na regulaci buněčného cyklu, jelikož zvýšená exprese genu NHA1 potlačovala v S. cerevisiae za normálních podmínek letální účinek kombinace mutací genů sit4 a hal3 (Simón, et al., 2001). Gen SIT4 kóduje Ser/Thr-fosfatázu, typ 2A, která je potřebná jak pro správnou replikaci DNA, tak pro vznik pupene při buněčném dělení. U buněk postrádajících tento gen dochází ke zpomalení růstu nebo k úplnému zablokování buněk na přechodu mezi G1 a S fázemi buněčného cyklu (Stark, 1996). Produkt genu HAL3 ovlivňuje toleranci buněk k vysokým koncentracím sodíku a lithia (Ferrando, et al., 1995). Hal3p se však zdá být také součástí aparátu regulujícího buněčný cyklus a byl identifikován jako negativní regulační podjednotka jiné Ser/Thr-fosfátázy, Ppz1p, která hraje opačnou roli v buněčném cyklu než Sit4p (Clotet, et al., 1999; Nadal, et al., 1998). Simón a jeho spolupracovníci zjistili, že funkce Nha1p v buněčném cyklu se nijak nevztahuje k jeho schopnosti exportovat kationty (Simón, et al., 2001). Pro zachování této funkce byla ale nezbytná oblast C-koncové hydrofilní domény proteinu mezi aminokyselinovými zbytky 800-948. Podobně jako v naší práci, autoři zkonstruovali různě dlouhé verze proteinu Nhalp, které exprimovali ve stejném kmeni S. *cerevisiae* (B31; *ena1-4* Δ *nha1* Δ). Na rozdíl od naší práce, však autoři považují oblast C-konce proteinu Nha1p mezi aminokyselinami 800 a 948 za postradatelnou pro toleranci buněk k Na⁺ (autoři ve své práci netestovali toleranci k lithiu ani k rubidiu). Podle našich výsledků se rozdíly v toleranci buněk vůči Na⁺ v závislosti na délce Nha1p projevují až při koncentracích vyšších než 800 mM NaCl. V jejich případě byl však růst buněk obsahujících zkrácené verze Nha1p testován v médiích s mnohem nižší koncentrací NaCl (400 mM). Při této koncentraci autoři tedy nemohli pozorovat rozdíly v růstu mezi buňkami s různými verzemi Nha1p. Ačkoliv v naší práci bylo zjištěno, že C-konec proteinu Nha1p nemá vliv ani na toleranci buněk obsahujících Nha1p k draslíku ani na počáteční rychlost transportu K⁺ prostřednictvím Nha1p (publikace č. 1), Simón a jeho kolegové považují oblast C-konce Nha1p (800-948 aa) za nezbytnou pro transport K⁺. Protichůdné výsledky týkající se transportu K⁺ pomocí Nha1p není zatím možné vysvětlit. V současné době se však snažíme navázat spolupráci s autory publikace (Simón, et al., 2001) a pokusit se o vysvětlení protikladných pozorování. V každém případě se zdá, že protein Nha1p obsahuje strukturní domény, které pravděpodobně modulují jednotlivé funkce proteinu v buňce. S autory se také shodujeme v tom, že Nha1p by mohl být dalším z membránových signálních proteinů, jež by prostřednictvím svého C-konce umožňoval přenos impulsů z vnějšího prostředí do buňky.

4. 1. 1 Studium lokalizace zkrácených verzí proteinu Nha1p v buňce

Výsledky získané při sledování tolerance buněk k solím či měření výstupu iontů z buněk (publikace č. 1) naznačovaly, že všechny zkonstruované verze Nha1p jsou v buňkách funkční, a tudíž i správně umístěny v membráně. Kompletní přenašeč (985 aa) byl již dříve lokalizován v plasmatické membráně imunodetkcí (Western blot) proteinu Nha1p označeného na C-konci epitopem c-*myc* (Bañuelos, et al., 1998). Tato metoda byla také nejdříve vyzkoušena pro ověření správné lokalizace zkrácených verzí Nha1p v buňkách. Aniž by došlo k přerušení čtecího rámce byla na úrovni DNA na 3'- konce různě dlouhých verzí genu *NHA1* napojena sekvence kódující 11 aminokyselin epitopu c-*myc* (EQKLISEEDLN).

Plasmidy obsahující různé verze genu *NHA1* s napojenou sekvencí epitopu c-*myc* byly zkonstruovány podobným způsobem, jako je popsáno v publikaci č. 1 pro neznačené verze. Byl zkonstruován modifikovaný plasmid pNHA1-985^{c-myc} (podobný pNHA1-985 z publikace č. 1), v němž se na 3'- konci mezi místem *SmaI* a STOP kodonem nacházela sekvence kódující epitop c-*myc*. Stejným způsobem jako v případě konstrukce epitopem c-*myc* neznačených verzí (viz. publikace č. 1) byl úsek *ClaI-SmaI* (2,3 kb) nahrazen jednotlivými fragmenty získanými PCR (S470 až S947) odpovídajícími zkráceným verzím. Výsledné plasmidy byly označeny stejně

jako v publikaci č. 1 a s indexem c-*myc*. Bezchybné napojení sekvencí v místě *Cla*I genu *NHA1* a epitopu c-*myc* na 3'-konci bylo u všech konstruktů ověřeno sekvenováním.

Osm takto zkonstruovaných plasmidů nesoucích různě dlouhé verze genu *NHA1* fúzovaného s epitopem c-*myc* (verze přenašeče Nha1p s 985, 945, 915, 883, 774, 680, 568 a 472 aa) bylo transformováno do kmene *S. cerevisiae* B31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ). Připojení epitopu nemělo vliv na toleranci buněk k alkalickým kationtům, jak bylo zjištěno pomocí kapkových testů na miskách obsahujících zvyšující se koncentrace solí NaCl, LiCl a KCl. Buňky nesoucí epitopem c-*myc* označené verze Nha1p tolerovaly stejné množství solí jako buňky nesoucí verze neznačené. Pouze v případě buněk nesoucích Nha1p dlouhý 915 aa připojení epitopu mírně zvýšilo toleranci buněk k LiCl ve srovnání s buňkami obsahujícími Nha1p-915 bez epitopu c-*myc* (z 30 na 35 mM LiCl při pH_{out} 5,6). Tento jev byl pozorován opakovaně testováním několika nezávislých transformantů.

				epitop c <i>-myc</i>											
Nha1-915p ^{c-myc}	915	Α	V	E	Q	K	L	Ι	S	E	E	D	L	Ν	927
Nha1-928p	915	A	Y	Е	S	Е	Т	Е	F	Е	R	Q	R	R	927

Obr. 4. 2 Porovnání aminokyselinové sekvence oblasti C-konce proteinu Nha1p mezi aminokyselinami 915 a 927 (zkrácená verze s 928 aa) a odpovídající sekvence epitopem c-*myc* značené verze Nha1-915p.

Verze přenašeče Nha1p dlouhá 915 aa se napojením sekvence epitopu cmyc (obsahuje několik záporně a kladně nabitých aminokyselinových zbytků, obr. 4. 2) prodlouží na C-konci o 12 aa (celková délka proteinu 927 aa). Oblast Nha1p 923-928, která obsahuje také záporně a kladně nabité aminokyselinové zbytky (obr. 4. 2), byla identifikována jako nejdůležitější pro zachování maximální transportní aktivity Nha1p pro Na⁺ a zejména Li⁺ (publikace č.1). Tolerance buněk obsahujících Nha1p dlouhý 923 nebo 928 aa k LiCl byla vyšší než tolerance buněk s Nha1p dlouhým 915 aa. Podobnost sekvence epitopu c-*myc* a úseku Nha1p následujícím za aa 915 (obr. 4. 2) mohla vést ke zvýšení tolerance buněk obsahujících Nha1p-915^{c-myc} k Li⁺ vzhledem k buňkám nesoucím verzi Nha1p-915 epitopem c-*myc* neznačenou.

Buňky nesoucí verze Nhalp s připojeným epitopem c-myc byly použity pro detekci proteinů v buňkách pomocí protilátek anti-c-myc. Proteiny Nha1^{c-myc} byly extrahovány z celých buněk, elektroforeticky rozděleny, přeneseny na membránu a detekovány pomocí monoklonální protilátky anti-c-myc. Ačkoliv bylo vyzkoušeno několik možných postupů přenosu proteinů na membránu ("mokrý" nebo "polosuchý" blot, různá doba přenosu), několik druhů membrán (nitrocelulózová membrána, PVDF, ZETA-PROBE) a pufrů (Tris-Glycin-SDS-methanolový pufr, CAPS pufr), nepodařilo se touto metodou v žádném případě optimalizovat podmínky pokusu tak, aby všechny verze proteinu Nha1p byly detekovány současně, což byl nezbytný požadavek pro kvantitativní srovnání množství jednotlivých verzí Nha1p v buňkách. Široký rozsah molekulových hmotností (od 109,4 kDa pro kompletní Nhalp až po 52,1 kDa pro nejkratší verzi) a různě velká celková hydrofobicita proteinů mohly způsobit, že při kratší době přenosu proteinů na membránu se verze s vyšší molekulovou hmotností nepřenesly zcela na membránu a zůstaly zachyceny v gelu, zatímco delší doba přenosu naopak mohla způsobit, že kratší verze prošly zcela přes membránu do blotovacího pufru. Také velmi nízká exprese proteinu pod vlivem vlastního slabého promotoru ztěžovala zřejmě jeho detekci. Pro přesné kvantitativní stanovení by bylo pravděpodobně nutné izolovat proteiny z plasmatických membrán či použít imunoprecipitaci.

Zejména časová náročnost detekce proteinů pomocí protilátek nás vedla k použití jiné, rychlejší a snadnější metody, která se během posledních let hojně rozšířila nejen pro detekování lokalizace proteinů v buňkách, ale také pro studium celých biologických procesů probíhajících uvnitř buněk. Jedná se o fúzi studovaného proteinu (na úrovni genu) se zeleným fluorescenčním proteinem (green fluorescent protein, GFP) z medúzy *Aequorea victoria* (Niedenthal, et al., 1996). Protein GFP je dlouhý 238 aa a obsahuje chromofor (p-hydroxybenzylidenimidazolinon), jenž se samovolně formuje cyklizací tří aminokyselinových zbytků 65-67 (Ser-Tyr-Gly) a následnou oxidací zbytku tyrosinu vzdušným kyslíkem. Protein vyzařuje zelené fluorescenční světlo o vlnové délce 508 nm a jeho výhoda spočívá v tom, že funguje bez dodaní jakýchkoliv exogenních substrátů či kofaktorů a je tedy vhodný k použití přímo v živých systémech (Tsien, 1998). V nedávné minulosti bylo zkonstruováno mnoho různých vektorů obsahujících cDNA genu kódujícího GFP, jež umožňují fúzi GFP se studovaným proteinem na N- nebo C-konci. Následně pak pomocí fluorescenční mikroskopie je možné určit lokalizaci sledovaného proteinu

označeného GFP v buňce (Niedenthal, et al., 1996). Fúzí GFP k C-koncům kompletního (985 aa) i nejkratšího (472 aa) Nha1p se podařilo obě verze přenašeče Nhalp lokalizovat v plasmatické membráně a dokázat tak, že hydrofilní C-konec proteinu Nhalp není důležitý pro biogenezi proteinu a jeho správné zabudování do plasmatické membrány (výsledky zahrnuje publikace č. 1). Dále bylo zjištěno, že lokalizace fluorescence v buňkách s oběma verzemi Nhalp částečně závisí na stáří buněk a na růstovém médiu (tekuté vs. tuhé médium). Zatímco u exponenciálně rostoucích buněk (OD₆₀₀ \approx 0,2-0,3) byla fluorescence pozorována výhradně v perifériích buněk (tzn. v plasmatické membráně), u buněk rostoucích v tekutém médiu do počáteční či pozdní stacionární fáze růstu nebo u buněk rostoucích na miskách při 30 °C, popř. u starých buněk, které byly uchovávány na miskách při 4 °C již několik dnů, byla fluorescence pozorována nejen v plasmatické membráně, ale také uvnitř buněk (zejména ve vakuole a v endoplasmatickém retikulu). Se stářím buněk se podíl fluorescence uvnitř buněk zvyšoval. Z toho důvodu byly v dalších experimentech (měření výstupu iontů, sledování vlivu osmotického šoku na chování buněk) používány vždy buňky z časné exponenciální fáze růstu v tekutém médiu.

4. 1. 2 Vliv transkripčního faktoru Imp2p na expresi genu NHA1

Buňky *S. cerevisiae* postrádající transkripční faktor Imp2p jsou velmi senzitivní na působení oxidačních látek poškozujících DNA (např. bleomycinu nebo peroxidu vodíku) (Masson a Ramotar, 1996) a také k vysokým koncentracím monovalentních (Na⁺, Li⁺) a divalentních (Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) kationtů (Masson a Ramotar, 1998). Transkripční faktor Imp2p tedy patří mezi proteiny, které se účastní buněčné odpovědi na stres způsobený vysokými koncentracemi solí a/nebo oxidačních činidel. Jelikož bylo zjištěno, že z hlediska tolerance k monovalentním kationtům (Na⁺, Li⁺) faktor Imp2p nijak neovlivňuje expresi genu *ENA1* kódujícího nejdůležitější systém v *S. cerevisiae* eliminující toxické ionty sodíku a lithia z buňky, Na⁺(Li⁺)-ATPázu (kap. 1. 2. 1), Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p byl navržen mezi kandidáty, jehož expresi by mohl Imp2p regulovat (Masson a Ramotar, 1998). Abychom zjistili, zda se Imp2p opravdu podílí na řízení exprese genu *NHA1*, byl za promotor genu *NHA1* klonován gen *lacZ* (plazmid pXA1) a následně byla v buňkách obsahujících transkripční faktor Imp2p měřena aktivita enzymu β-

galaktosidázy. Plasmid pXA1 byl transformován jednak do divokého kmene *S. cerevisiae* W303-1A a jednak do jeho mutantu *imp2* Δ .

Buňky *S. cerevisiae* W303-1A nebo *imp2* Δ nesoucí plasmid pXA1 nebo prázdný vektor YEp357R (kontrola) byly pěstovány v tekutém médiu do časné exponenciální fáze (OD₆₀₀ = 0,3) a byla stanovena aktivita β -galaktosidázy. *S. cerevisiae* postrádá za normálních podmínek β -galaktosidázovou aktivitu, tudíž v kontrolních buňkách obsahujících prázdný vektor nebyla naměřena žádná aktivita. Aktivita β -galaktosidázy byla také téměř stejná v buňkách divokého kmene (18 U) i mutantu *imp2* Δ (20 U) transformovaných plazmidem pXA1 (uvedené hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření). Z tohoto výsledku vyplývá, že úroveň exprese genu *NHA1* zřejmě není řízena transkripčním faktorem Imp2p. Faktor Imp2p se pravděpodobně podílí na regulaci homeostáze monovalentních kationtů v buňkách jiným, zatím neznámým způsobem. Imp2p by např. mohl svým působením ovlivňovat expresi systémů, které se účastní regulace vstupu toxických iontů do buňky, popř. akumulace iontů v buněčných kompartmentech.

4. 2 Izolace a charakterizace genů z dalších kvasinek

Pro chrakterizaci transportních vlastností (substrátové specifity a transportní aktivity) Na⁺/H⁺ antiportních systémů z jiných kvasinek (*C. albicans, Z. rouxii* a *S. pombe*) a jejich porovnání s přenašečem Nha1p z *S. cerevisiae* bylo nutné klonovat geny kódující příslušné přenašeče a exprimovat je za stejných podmínek jako *NHA1* v *S. cerevisiae* (viz. kapitola 4. 1. 1. a publikace č. 1). Výsledky této části práce, při níž, mimo jiné, byly klonovány také tři nové alely genů: *CNH1*-G23 z kmene *C. albicans* MEN a *ZrSOD2-22* a *ZrHOG1* z kmene *Z. rouxii* CBS732, jsou z velké části obsaženy v publikacích č. 2, 3 a 4.

4. 2. 1 C. albicans CAN1

V kvasince *C. albicans* byl poprvé přenašeč (gen *CNH1*) patřící do rodiny Na⁺/H⁺-antiportních systémů plasmatických membrán kvasinek klonován v kmeni SC5314 (Soong, et al., 2000). Gen *CNH1* byl v předkládané práci amplifikován pomocí PCR, kde jako matrice sloužila genomová DNA z kmene MEN kvasinky *C*.

albicans. Srovnání sekvence amplifikovaného fragmentu, nazvaného později *CNH1*-G23 se sekvencí genu *CNH1* z kmene SC5314 (v této práci byl amplifikován pomocí PCR, kde jako templát sloužil plasmid pBK-CMV-CNH1 (Soong, et al., 2000) a označen *CNH1*-M18) odhalilo rozdíly mezi sekvencemi z obou kmenů (publikace č. 2). Otevřený čtecí rámec genu *CNH1*-G23 kóduje protein dlouhý 800 aa, zatímco přenašeč z kmene *C. albicans* SC5314 je dlouhý 795 aa. V sekvenci *CNH1*-G23 bylo nalezeno (i) 22 záměn nt, které se neprojevily na úrovni proteinu, (ii) šest záměn nt, které vedly ke změnám aminokyselin a (iii) inzert 15 bp blízko 3' konce genu, který se v genu *CNH1*-M18 nevyskytuje (obr. 1 v publikaci č. 2).

Oba geny *CNH1*-G23 a *CNH1*-M18 z kmenů MEN a SC5314 kvasinky *C. albicans* byly klonovány za promotor *NHA1* do vektoru YEp352 (plasmidy pCNH1-G23 a pCNH1-M18), jak je popsáno v publikaci č. 2.

4. 2. 2 Z. rouxii ZrSOD2-22

Kvasinka Z. rouxii je vysoce osmotolerantní mikrorganismus, jejíž mechanismus osmotolerance je intenzivně studován. K toleranci Z. rouxii k vysokým tolerancím NaCl významně přispívá Na⁺/H⁺-antiportní systém v plazmatické membráně, který eliminuje toxické ionty z buněk Z. rouxii podobně jako Nha1p v S. cerevisiae (Watanabe, et al., 1999). Jak již bylo zmíněno v kapitole 1. 4. 2, v kmeni Z. rouxii ATCC42981 byly identifikovány dva homologní geny kódující Na⁺/H⁺antiportery plazmatické membrány Z-SOD2 a Z-SOD22 (Iwaki, et al., 1998; Watanabe, et al., 1995). V naší práci byla pro amplifikaci genů kódujících oba tyto přenašeče použita genomová DNA z jiného kmene Z. rouxii CBS732. Při PCR s oligonukleotidy vhodnými pro Z-SOD22 nevznikl vůbec žádný fragment DNA. Pouze s oligonukleotidy, které odpovídaly genu Z-SOD2, se podařilo získat produkt PCR o správné velikosti (2,5 kb). Sekvenováním vyšlo najevo, že se jedná o novou alelu genu kódujícího Na⁺/H⁺-antiporter pojmenovaný později ZrSod2-22p dlouhý 806 aa (gen ZrSOD2-22, Acc. No. AJ252273), který je svou aminokyselinovou sekvencí velmi podobný proteinu Z-Sod2p z kmene ATCC42981. Pouze blízko 3'konce genu ZrSOD2-22 se nachází 45 bp dlouhý inzert kódující 15 aa, které odpovídají proteinu Z-Sod22p (publikace č. 3). Další experimenty (Southern blot,

chromoblot, PCR) prokázaly, že kmen *Z. rouxii* CBS732 obsahuje pouze jednu kopii genu kódujícího Na⁺/H⁺-antiporter, a to *ZrSOD2-22* (publikace č. 3).

Gen *ZrSOD2-22* byl klonován stejně jako geny pro přenašeče z *C. albicans* za promotor *NHA1* do vektoru YEp352 (plasmid pZrSOD2-22, publikace č. 3).

4. 2. 3 Z. rouxii ZrHOG1

V Z. rouxii se předpokládá existence podobné dráhy signalizující buňce zvýšení osmotického tlaku okolí jako se nachází v S. cerevisiae (signální dráha HOG - kap. 1. 3. 1). Poslední MAP (mitogen-activated protein) kináza v této signální dráze se nazývá Hog1p (viz. kapitola 1. 3. 1, obr. 1. 3). Na základě podobnosti s genem HOG1 kvasinky S. cerevisiae byly v kmeni Z. rouxii ATCC42981 klonovány dva homologní geny kódující MAP-kinázy Z-HOG1 a Z-HOG2 (Iwaki, et al., 1999). Kmen Z. rouxii CBS732, jak dokazují výsledky popsané v publikaci č. 3, však obsahuje pouze jeden gen kódujícího tuto kinázu (ZrHOG1, Acc. No. AJ132606), která na proteinové úrovni je ve srovnání s jejími homology z kmene ATCC42981 kratší (380 aa vs 407 a 420 aa) a vykazuje vyšší podobnost se Z-Hog2p. Exprese genu ZrHOG1 v mutantním kmeni S. cerevisiae $hog1\Delta$ vedla ke zvýšení osmotolerance buněk na úroveň divokého kmene, což znamená, že ZrHog1p je schopen plně nahradit funkci chybějícího Hog1p v S. cerevisiae (publikace č. 3). Existence pouze jedné kopie genu kódujícího tuto MAP-kinázu v kmeni Z. rouxii CBS732 byla opět potvrzena DNA-DNA hybridizací (Southern blot), PCR a lokalizací genu na chromosomu IV pomocí chromoblotu (publikace č. 3).

Různé kmeny kvasinky *Z. rouxii* se vzájemně liší počtem i velikostí jednotlivých chromosomů (Oda a Tonomura, 1995; Torok, et al., 1993). Tento polymorfismus může být jedním z důvodů rozdílného počtu kopií genů kódujících Na^+/H^+ -antiporter a MAP-kinázu Hog1p mezi kmenem *Z. rouxii* CBS732 a kmenem ATCC42981 (viz. publikace č. 3).

4. 2. 4 *S. pombe sod2*

Gen *sod2* kódující Na⁺/H⁺-antiporter kvasinky *S. pombe* obsahuje 77 bp dlouhý intron (Jia, et al., 1992), proto byla izolována z mRNA *S. pombe* pomocí

reverzní transkripce příslušná cDNA, ta byla amplifikována pomocí PCR a klonována do vektoru YEp352 za promotor NHA1 (plasmid pSpsod2, publikace č.4). Paralelně vedle PCR s Tag DNA polymerázou (publikace č. 4) byla cDNA genu sod2 po reverzní transkripci amplifikována za použití stejných oligonukleotidů s pomocí soupravy, která obsahuje směs dvou termostabilních DNA polymeráz, Taq a Pwo (kap. 3. 2. 1). Tato souprava se vyznačuje vysokým výtěžkem, bezchybností a vysokou specifitou polymerázové reakce. Také touto reakcí byl získán DNA fragment (1,5 kb) odpovídající cDNA genu sod2, který byl nejdříve klonován do vektoru pCRII-TOPO (publikace č. 4). Transformací do E. coli byla získána pouze jedna kolonie obsahující plasmid s inzertem o správné velikosti. Pomocí zavedených restrikčních míst BamHI a EcoRI byl inzert překlonován do vektoru YEp352 za promotor NHA1 (výsledný plasmid pSpsod2-I), jako je popsáno v publikaci č. 4. Sekvenováním amplifikovaného fragmentu DNA však neočekávaně vyšlo najevo, že se nejedná o cDNA genu sod2, ale o celý gen sod2 i s intronem. Jedním možným vysvětlením tohoto jevu by bylo znečištění izolované RNA genomovou DNA S. pombe, což však nebyl náš případ, protože PCR provedenou s DNA polymerázou za stejných podmínek, kde jako matrice však byla použita přímo směs izolované RNA, nevznikl žádný fragment.

Pro izolaci RNA z buněk *S. pombe*, byly buňky pěstovány za přítomnosti 60 mM LiCl, aby se zvýšil počet kopií genu *sod2* v buňkách (Jia, et al., 1992). Toxicita lithia v buňkách mimo jiné spočívá v tom, že inhibuje aktivitu enzymů zajišťujících posttranskripční úpravy RNA (Dichtl, et al., 1997), proto pravděpodobnějším vysvětlením klonování nesestřižené cDNA je, že ne ve všech buňkách *S. pombe* v důsledku přítomnosti Li⁺ proběhl sestřih pre-mRNA odpovídající genu *sod2* zcela správně. Tato nesprávně sestřižená mRNA však byla zřejmě přepsána reverzní transkripcí do cDNA.

V buňkách *S. cerevisiae* B31 transformovaných plasmidem pSpsod2 obsahujícím bezchybnou cDNA genu *sod2* byl antiporter sod2p funkční (viz. publikace č. 4). Bylo však zajímavé zjistit, zda může být v *S. cerevisiae*, v jejímž genomu se vyskytuje jen velmi malé procento genů s introny (pouze asi 3,6 %), funkčně exprimován i gen *sod2* obsahující intron. Proto byl zkonstruovaný plasmid pSpsod2-I transformován do kmene *S. cerevisiae* B31 a byla sledována tolerance buněk k NaCl, LiCl a KCl. Buňky s plasmidem pSpsod2-I však tolerovaly stejné množství solí v médiu jako kontrolní buňky transformované prázdným vektorem, na

67

rozdíl od transformantů obsahujících plasmid s cDNA genu *sod2* (pSpsod2), jejichž tolerance k LiCl a NaCl byla vyšší (publikace č. 4). Tento výsledek naznačuje, že přenašeč sod2p nebyl v buňkách *S. cerevisiae* s plasmidem pSpsod2-I buď vůbec syntetizován nebo, s větší pravděpodobností, v důsledku nerozpoznání sekvence intronu v genu *sod2* docházelo k posunu čtecího rámce a tím také k předčasnému ukončení syntézy proteinu (pokud nedojde k vyštěpení intronu, stop kodon se nachází po přečtení prvních 244 bází). Přestože aparát i mechanismus sestřihu pre-mRNA jsou ve všech eukaryotních buňkách podobné (Kunze, et al., 2000), sekvence, které jsou rozpoznávány jako místa sestřihu, se mezi *S. pombe* a *S. cerevisiae* liší (Kaufer a Potashkin, 2000).

4. 2. 5 Charakterizace transportních vlastností Na⁺/H⁺-antiporterů z kvasinek

Z předchozích údajů vyplývá, že rodina Na⁺/H⁺-antiporterů plasmatické membrány kvasinek zahrnuje v současnosti několik genů ze čtyř druhů kvasinek. Přenašeč Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae* transportuje kromě sodíku a lithia také draslík a rubidium ((Bañuelos, et al., 1998), publikace č. 1). Ačkoliv homologní systémy identifikované v kvasinkách *C. albicans, Z. rouxii* a *S. pombe* byly charakterizovány a funkčně exprimovány i v *S. cerevisiae*, jejich specifita k iontům K⁺ či Rb⁺ a transportní aktivita pro všechny kationty nebyly nikdy přímo stanoveny.

V původní práci, která se týkala Na⁺/H⁺-antiportního systému Cnh1p z kvasinky *C. albicans* bylo prokázáno, že delece *CNH1* v *C. albicans* vede ke zpomalení růstu a prodloužení buněk a že snižuje jejich toleranci k sodíku a lithiu (Soong, et al., 2000). Vzhledem k tomu, že *C. albicans* je patogenní mikroorganismus existující ve dvou morfologických formách (jednobuněčné a patogenní vláknité) a že mezi důležité faktory, které ovlivňují změnu morfologie buněk, patří také změny pH a koncentrace draslíku uvnitř buněk (Biswas, et al., 2000; Kaur a Mishra, 1991), pokusili jsme se zjistit, zda přenašeč Cnh1p z *C. albicans* se může podílet na transportu a i na regulaci homeostáze draslíku v buňkách podobně jako Nha1p z *S. cerevisiae*. Publikace č. 2 tedy popisuje výsledky srovnání transportních vlastností obou přenašečů z *C. albicans* (Cnh1p-G23 a Cnh1p-M18, kap. 4. 2. 1) s přenašečem Nha1p z *S. cerevisiae*. Geny *CNH1*-G23 a *CNH1*-M18

z kmenů MEN a SC5314 kvasinky *C. albicans* byly funkčně exprimovány v mutantním kmeni B31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ) kvasinky *S. cerevisiae* pod vlivem *NHA1* promotoru (plasmidy pCNH1-G23 a pCNH1-M18) a pomocí značení GFP lokalizovány v plasmatické membráně buněk (obr. 2 v publikaci č. 2). Oba přenašeče z *C. albicans* byly identifikovány, podobně jako Nha1p, jako transportní systémy se širokou substrátovou specifitou pro všechny čtyři alkalické kationty (Na⁺, Li⁺, K⁺, Rb⁺). V případě sodíku, draslíku a rubidia byli oba přenašeče Cnh1p méně účinné než vlastní přenašeč Nha1p. Naopak, úroveň tolerance k lithiu byla u buněk *S. cerevisiae* nesoucích Cnh1-M18p a zejména Cnh1-G23p významně vyšší než tolerance buněk obsahujících Nha1p. Tyto výsledky byly také potvrzeny měřením transportní aktivity Cnh1p ve srovnání s aktivitou Nha1p (publikace č. 2).

U celého (Bañuelos, et al., 1998) i zkrácených verzí (publikaci č. 1) Nha1p bylo prokázáno, že se podílí také na regulaci vnitrobuněčného pH, když při náhlém zvýšení cytoplasmatického pH dochází okamžitě k rychlému výstupu draslíku z buněk pomocí Nha1p (viz. kap. 4. 1). Při heterologní expresi přenašečů z *C. albicans* v *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že oba Cnh1p také zprostředkovávají rychlý výstup draslíku z buněk po náhlém zvýšení vnitrobuněčného pH (obr. 5 v publikaci č. 2), což naznačuje, že Na⁺/H⁺-antiportní systém Cnh1p by mohl hrát v buňkách *C. albicans* důležitou roli nejen v regulaci vnitrobuněčné koncentrace draslíku, ale i vnitrobuněčného pH. Pro objasnění skutečné role Cnh1p v homeostázi kationtů a/nebo v morfogenezi *C. albicans* bude nutné provést více experimentů přímo s buňkami *C. albicans* (např. měření transportu iontů v kvasinkách *C. albicans* a různých podmínek). Práci přímo s kvasinkami *C. albicans* ztěžuje fakt, že se jedná o diploidní mikroorganismus, u něhož dosud nebyl prokázán sexuální cyklus, a bude tedy nejprve nutné provést v kmeni *C. albicans* MEN disrupci obou alel genu kódujícího antiporter Cnh1p-G23.

Publikace č. 4 zahrnuje výsledky studia substrátové specifity a transportní aktivity Na⁺/H⁺-antiporterů ZrSod2-22p ze *Z. rouxii* CBS732 a sod2p z *S. pombe* v porovnání s Nha1p z *S. cerevisiae* a Cnh1p-G23 z *C. albicans* MEN.

Oba přenašeče ZrSod2-22p a sod2p byly, stejně jako v případě antiporterů z *C. albicans*, funkčně exprimovány v mutantním kmeni B31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ) kvasinky *S. cerevisiae* pod vlivem *NHA1* promotoru (plasmidy pZrSOD2-22 a pSpsod2) a byla sledována tolerance transformantů ke kationtům alkalických kovů. Výsledky popsané v publikaci č. 4 prokázaly, že na rozdíl od transportních systémů Nha1p z *S. cerevisiae* a Cnh1p z *C. albicans*, přenašeče ZrSod2-22p z kvasinky *Z. rouxii* ani sod2p z *S. pombe* nejsou schopny transportovat ionty K^+ a Rb^+ . Na druhou stranu, bylo zjištěno, že ZrSod2-22p je ze všech čtyř studovaných Na⁺/H⁺-antiporterů nejúčinnějším systémem transportujícím sodík a lithium. Tolerance buněk obsahujících ostatní přenašeče (Nha1p, Cnh1p a sod2p) k Na⁺ a Li⁺ byla nižší ve srovnání s buňkami exprimujícími ZrSod2-22p (publikace č. 2 a 4). Také měření výstupu iontů z buněk nesoucích ZrSod2-22p dokázala jeho vysokou transportní kapacitu ZrSod2-22p pro ionty Na⁺ a Li⁺. Nejméně efektivním systémem z celé rodiny se zdá být přenašeč sod2p z halosenzitivní kvasinky *S. pombe*. Jeho nízká transportní aktivita je pravděpodobně důsledkem velmi krátké C-koncové hydrofilní domény (pouze 43 aa, tab. 1. 1 v kap. 1. 4. 2. 1), poněvadž, jak bylo například zjištěno v případě Nha1p, odstranění C-konce proteinu vede ke značnému snížení transportní aktivity přenašeče pro sodík a lithium (publikace č. 1).

Aby buňka mohla normálně růst i za přítomnosti NaCl v médiu, poměr množství vnitrobuněčného Na⁺ k K⁺ nesmí být vyšší než 2 (Bañuelos, et al., 1998; Camacho, et al., 1981). Jelikož Na⁺/H⁺-antiportní systémy se svojí aktivitou podílejí na udržování poměru koncentrací K^+ a Na⁺ uvnitř buňky, bylo při srovnávání Na⁺/H⁺-antiporterů kvasinek také sledováno, jak jednotlivé přenašeče přispívají k celkové toleranci buněk k NaCl (publikace č. 4). Vysoká kapacita transportu přenašeče ZrSod2-22p pro ionty Na⁺ se odrážela i v tom, že při růstu v médiu s NaCl byl poměr koncentrací K^+ a Na⁺ v buňkách se ZrSod2-22p zachováván vždy nejvyšší v porovnání s buňkami obsahujícími ostatní antiportery (obr. 4 v publikaci č. 4). Také expresí ZrSod2-22p v některých divokých kmenech S. cerevisiae se podařilo značně zvýšit toleranci buněk k sodíku a zejména k lithiu (publikace č. 3). Proto heterologní exprese Na⁺/H⁺-antiportního systému ZrSod2-22p by mohla být dále využívána např. ke zlepšení tolerance Na^+ a Li^+ u některých kmenů kvasinek potřebných v různých odvětvích potravinářského průmyslu nebo ke zvýšení osmotolerance zemědělských plodin v místech, kde se potýkají s vysokou koncentrací NaCl v půdě.

Hlavní úlohou přenašečů ZrSod2-22p a sod2p z kvasinek *Z. rouxii* a *S. pombe*, které rozpoznávají pouze Na⁺ a Li⁺, je spíše eliminace těchto toxických kationtů z buněk. Přenašeče Nha1p z *S. cerevisiae* a Cnh1p z *C. albicans*, jež transportují kromě Na⁺ a Li⁺ také kationty K⁺ a Rb⁺, však zřejmě zastávají v buňkách, kromě eliminace toxických iontů, ještě další funkce (např. při regulaci

koncentrace draslíku uvnitř buněk, regulaci vnitrobuněčného pH nebo buněčného objemu).

4. 2. 6 Konstrukce chimérního přenašeče Nha1p-sod2p a jeho exprese v *S. cerevisiae*

Jak již bylo zmíněno, aminokyselinové sekvence N-koncových hydrofobních částí přenašečů rodiny Na^+/H^+ -antiporterů kvasinek jsou velmi konzervativní, naopak liší se v délce a složení hydrofilních C-konců proteinů (tab. 1. 2). Z výsledků uvedených v publikaci č. 1 vyplývá, že substrátová specifita přenašeče Nha1p pro ionty K⁺ je dána sekvencí transmembránové části proteinu. Jelikož *S. pombe* antiporter sod2p byl při heterologní expresi v *S. cerevisiae* funkční (publikace č. 4), zajímalo nás, zda je možné zaměnit části transmembránových oblastí mezi přenašeči Nha1p a sod2p a vytvořit tak funkční chimerní přenašeč, který by případně transportoval draslík jako Nha1p.

Plasmid pNHA1-985, který byl použit pro konstrukci všech zkrácených verzí genu *NHA1* (publikace č. 1), byl využit i pro konstrukci plasmidu pNHA1– sod2 kódujícího chimérní protein Nha1-sod2p (obr. 4. 3). Chimérní DNA obsahovala úsek genu *NHA1* s promotorem *NHA1* (od místa *Xba*I v promotorové oblasti až po unikátní restrikční místo *Cla*I) kódující aminokyseliny 1-240, na nějž navazovala bez přerušení čtecího rámce část cDNA genu *sod2* kódující aminokyseliny 241-468. V genu *sod2* se normálně sekvence rozpoznávaná enzymem *Cla*I ve stejné oblasti jako v genu *NHA1* nevyskytuje, ale záměnou jednoho nukleotidu ($T^{798} \rightarrow C$) bylo možné toto místo v dané oblasti vytvořit, aniž by došlo k záměně odpovídajícího aminokyselinového zbytku v proteinu. Fragment kódující úseku cDNA genu *sod2* byl syntetizován PCR, přičemž výše zmíněné místo *Cla*I bylo zavedeno pomocí oligonukleotidu SODZMA (5'-TAATCCCGGGGCGTAATCTTCCTGT -3') bylo vytvořeno místo *Sma*I těsně před kodonem STOP genu *sod2*. Plasmid pNHA1-sod2 obsahující chimérní gen pak vznikl nahrazením úseku *Cla*I-*Sma*I (2,3 kb) v

pNHA1-985 za 0,7 kb dlouhý PCR fragment cDNA genu *sod2* štěpený enzymy *Cla*I a *Sma*I (obr. 4. 3). Správné napojení sekvencí bylo ověřeno sekvenováním.



Obr. 4. 3 Schéma konstrukce plasmidu pNHA1-sod2. (A) Pomocí PCR byla syntetizována část cDNA genu sod2, přičemž použitím oligonukleotidu SODCLA (hybridizuje s nukleotidy 786–807 cDNA genu sod2) bylo v této oblasti zavedeno restrikční místo ClaI a pomocí oligonukleotidu SODXMA místo SmaI před STOP kodonem. Po štěpení enzymy ClaI a SmaI byl fragment genu sod2 zaměněn za úsek ClaI-SmaI v plasmidu pNHA1-985. (B) K napojení sekvencí došlo v oblasti odpovídající aminokyselinám 240 a 241 (proloženě je vyznačena záměna nukleotidu, tučně je vyznačena sekvence v chimérním proteinu).

Aminokyselinový zbytek D241, kde došlo k napojení sekvencí, patří mezi čtyři aminokyselinové zbytky, které jsou konzervativní v sekvencích všech členů rodiny Na⁺/H⁺-antiporterů, jež byly identifikovány jako důležité pro zachování

transportní aktivity přenašeče sod2p (obr. 1. 5 v kap. 1. 4). Mutace D241 \rightarrow N v sod2p neměla žádný vliv na transport sodíku, avšak kmen S. pombe nesoucí takto mutovaný přenašeč nebyl schopen růstu za přítomnosti LiCl (Dibrov a Fliegel, 1998). Mutace stejného zbytku v sekvenci Nha1p také neměla vliv na toleranci buněk k Na⁺, ale takto modifikovaný přenašeč netransportoval K⁺ (Simón, et al., 2001). Z těchto dvou výsledků vyplývá, že D241 je pravděpodobně důležitý pro zachování transportní aktivity u obou přenašečů. Z hlediska pravděpodobné sekundární struktury proteinu se D241 nachází v hydrofilní smyčce mezi transmembránovými doménami VII a VIII (obr. 1. 5). Ačkoliv nedošlo ke změně D241 při vzniku chimérního proteinu Nha1-sod2p, sekvence v okolí D241 jsou u Nhalp a sod2p méně konzervativní (obr. 4. 3). Navíc na vzniku vazebného místa pro ionty se pravděpodobně podílí strukturní motivy z různých oblastí transmembránové části proteinu, které u jednotlivých přenašečů Nha1p a sod2p nemusí být zcela shodné. Všechny tyto změny v sekvenci mohly zapříčinit, že chimérní přenašeč Nha1-sod2p netransportoval K⁺ a byl téměř nefunkční i v případě iontů Na⁺ a Li⁺. Pro přesné objasnění velmi nízké aktivity kombinovaného přenašeče Nha1-sod2p by však byla zapotřebí mnohem podrobnější analýza (např. ověření správné lokalizace chimérního proteinu v membráně či měření výstupu iontů z buněk nesoucích kombinovaný přenašeč).

4. 2. 7 Mutageneze genu ZrSOD2-22

Srovnání aktivit Na⁺/H⁺-antiportních systémů kvasinek (publikace č. 4) ukazuje, že přenašeč ZrSod2-22p rozpoznává jako své substráty pouze ionty sodíku a lithia. Zajímalo nás tedy, zda by bylo možné mutací některého aminokyselinového zbytku v sekvenci ZrSod2-22p rozšířit jeho substrátovou specifitu tak, aby transportoval draslík. Pro mutagenezi genu *ZrSOD2-22* byla zvolena metoda pomocí UV záření (Wagner, et al., 2001). Tuto, u kvasinek velmi rozšířenou metodu lze použít jednak k zavedení mutací do chromosomálních genů, ale také do genů umístěných na plasmidech, které jsou v buňkách obsaženy v jedné nebo několika málo kopiích (centromerové vektory). Při použití mnohokopiových vektorů, kdy v jednotlivých buňkách je 20-30 kopií daného genu, velký poměr počtu plasmidů obsahujících gen nemutovaný vůči těm, u nichž došlo k mutaci, v jedné buňce

snižuje pravděpodobnost izolace plazmidu nesoucího mutovaný gen. Fenotyp, který by buňka získala přítomností mutovaného genu, by mohl překrývat fenotyp získaný z dalších kopií daného genu, kde nedošlo k mutaci.

Gen Zr-SOD2-22 bylo proto nejdříve nutné překlonovat z mnohokopiového plasmidu YEp352 (plazmid pZrSOD2-22 v publikacích č. 3 a 4) do centromerového vektoru (obr. 4. 4). K tomu byl využit podvojný vektor p416GPD (Mumberg, et al., 1995). Z plasmidu pZrSOD2-22 byl štěpením restrikčními endonukleázami *SacI* a *SalI* získán fragment (3,04 kb) odpovídající promotoru genu *NHA1* a genu *ZrSOD2-22*. Tento fragment byl vložen do p416 GPD namísto promotorové oblasti GPD (obr. 4. 4). Výsledný centromerový plasmid obsahující gen *ZrSOD2-22* s promotorovou oblastí *NHA1* byl označen p4G-ZrSOD2-22.



Obr. 4. 4 Schéma konstrukce plasmidu p4G-ZrSOD2-22. Úsek *SacI-Sal*I ve vektoru p416 GPD byl nahrazen *SacI-Sal*I fragmentem DNA vyštěpeným z plasmidu pZrSOD2-22 obsahujícím promotor *NHA1* a gen *ZrSOD2-22*.

Plasmid p4G-ZrSOD2-22 byl transformován do kmene B31 kvasinky *S. cerevisiae* a u transformantů bylo ověřeno sledováním jejich tolerance vůči NaCl a LiCl, že přenašeč ZrSod2-22p exprimovaný z plasmidu p4G-ZrSOD2-22 je funkční. Přítomností plasmidu p4G-ZrSOD2-22 v buňkách došlo ke zvýšení tolerance buněk
k LiCl i NaCl vzhledem ke kontrolním buňkám s prázdným vektorem (tab. 4. 1). Tolerance buněk obsahujících centromerový plasmid p4G-ZrSOD2-22 k sodíku a lithiu byla nižší v porovnání s buňkami nesoucími mnohokopiový plasmid pZrSOD2-22 (tab. 4. 1) zřejmě v důsledku nižšího počtu kopií genu *ZrSOD2-22* v buňkách a tím i nižšího počtu molekul přenašeče. Transformanty obsahující plasmid p4G-ZrSOD2-22 byly dále použity pro mutagenezi pomocí UV-záření.

Tab. 4. 1 Maximální koncentrace NaCl a LiCl tolerované buňkami kmene S. cerevisiae B31 obsahujícími vektor p416GPD, mnohokopiový plasmid pZrSOD2-22 nebo centromerový plasmid p4G-ZrSOD2-22.

B31 (ena1-4∆ nha1∆)	LiCl [mM]	NaCl [mM]
[p416GPD]	20	200
[pZrSOD2-22]	150	2000
[p4G-ZrSOD2-22]	60	1400



Obr. 4. 5 Graf závislosti přežití buněk na době působení UV-záření.

Nejprve bylo nutné zjistit závislost přežití buněk na době působení UVzáření. Jak je popsáno v metodách (kap. 3. 2. 3), stejné množství buněk B31 [p4G-ZrSOD2-22] bylo vyseto na misky s bohatým médiem YPG a jednotlivé misky byly ozářeny ultrafialovým zářením po různě dlouhou dobu (0, 5, 10, 15, 25, 30 s). Na obr. 4. 5 je znázorněn graf závislosti počtu přežitých buněk (odhadnuto počtem kolonií, které na miskách po působení UV světla vyrostly) na době ozáření. Aby mutageneze byla dostatečně účinná je potřeba, aby ozáření nepřežilo 50-95 % buněk (Evans, 1996). Z grafu na obr. 4. 5 vyplývá, že při působení UV záření po dobu 10 s přežívá kolem 22 % buněk. Tato doba působení byla také vybrána pro další experimenty.

Pro případ statistického vyhodnocení pravděpodobnosti vzniku mutace v daném místě se při mutagenezi genu ZrSOD2-22 vycházelo z osmi nezávisle na sobě napěstovaných kultur buněk B31[p4G-ZrSOD2-22] a s každou kulturou byl proveden stejný postup jako je popsáno v metodách (kap. 3. 2. 3). Suspenze buněk po mutagenezi (pocházející původně z jedné nezávislé kolonie) byly rovnoměrně vysety vždy na 5 misek s minimálním (YNB) selekčním médiem s vysokou koncentrací KCl (1.8 M) obsahujícím příslušné auxotrofní složky (adenin a tryptofan). Toto selekční médium bylo vybráno z několika důvodů: (i) Kmen B31 obsahuje mutaci ura3-1 a nemůže růst na médiích bez uracilu. Minimální médium bez uracilu tedy umožňovalo růst pouze buňkám obsahujícím plasmid p4G-ZrSOD2-22 s nepoškozeným genem URA3. (ii) Buňky kmene B31 transformované nemutovaným plasmidem p4G-ZrSOD2-22 jsou velmi citlivé k vysokým koncentracím KCl. Pokud by došlo mutací v genu ZrSOD2-22 k rozšíření substrátové specifity přenašeče ZrSod2-22p o draslík a přenašeč by transportoval ionty K⁺, buňky by mohly začít růst i na vysokých koncentracích KCl. Koncentrace 1,8 M KCl byla nakonec použita, protože při selekcích na nižších koncentracích KCl (1,2 M, 1,4 M) v pilotních experimentech se vždy objevovalo velké množství spontánních mutantů. Na všech miskách se selekčním médiem se po sedmi dnech inkubace při 30 °C objevilo několik kolonií kvasinek, z nichž bylo celkem 23 (vždy 2-4 kolonie pocházející z jedné nezávislé buněčné kultury na počátku pokusu) dvakrát po sobě přeočkováno na nové misky se selekčním minimálním médiem YNB + 1,8 M KCl, aby se ověřila rezistence buněk k vysokým koncentracím KCl. Čtyři z 23 kolonií na nových miskách s KCl již nevyrostly.

Zda schopnost růstu mutantů na vysokých koncentracích KCl byla vázána na přítomnost plasmidu p4G-Zr-SOD2-22 nebo zda se jednalo o mutaci v chromosomální DNA, bylo zjišťováno tak, že ze všech 19 kolonií byla izolována plasmidová DNA a pomnožena v *E. coli. Z E. coli* byla plasmidová DNA izolována minipreparací a restrikční analýzou plasmidů bylo zjištěno, že ve všech 19 případech izolovaná plasmidová DNA odpovídala plasmidu p4G-ZrSOD2-22. Zpětnou transformací z *E. coli* izolovaných plasmidů do kmene B31 byly získány nové transformanty, u nichž byla testována tolerance ke KCl pomocí kapkových testů. Ani v jednom případě však nedošlo k obnovení původního fenotypu (schopnosti růstu buněk za přítomnosti 1.8 M KCl), z čehož vyplývá, že tolerance původních mutantů získaných po UV mutagenezi k draslíku nebyla závislá na přítomnosti plazmidu p4G-ZrSOD2-22. Tímto způsobem se tedy nepodařilo rozšířit substrátovou specifitu přenašeče ZrSod2-22p. Mutageneze plasmidové DNA *in vitro* pomocí chemických činidel (např. hydroxylaminu) nebo cílená mutageneze některých zbytků v transmembránové oblasti přenašeče ZrSod2-22p získat. Pro tuto práci bude možné využít zkonstruovaný plasmid p4G-ZrSOD2-22.

4. 2. 8 Studium lokalizace ZrSod2-22p a sod2p exprimovaných v *S. cerevisiae*

Výsledky uvedené v publikacích č. 3 a 4 (zvýšení tolerance buněk a měření výstupu iontů z buněk nesoucích heterologní přenašeče ZrSod2-22p ze Z. rouxii a sod2p ze S. pombe) ukazují, že oba transportní systémy jsou v buňkách funkční a tedy i správně lokalizovány v membráně. Pro potvrzení lokalizace obou heterologních systémů sod2p a ZrSod2-22p byla použita stejná metoda značení proteinů GFP na jejich C-koncích jako v případě proteinů Nha1p a Cnh1p (publikace č. 1 a 2). Pro klonování genu ZrSOD2-22 a cDNA genu sod2 do vektoru pGRU1 (obsahuje sekvenci kódující GFP protein), byly fragmenty DNA odpovídající promotoru NHA1 s připojenou sekvencí genu ZrSOD2-22 nebo cDNA genu sod2 nejdříve syntetizovány pomocí PCR. Jako matrice pro PCR sloužily plasmidy pZrSOD2-22 a pSpsod2. Při této polymerázové reakci bylo u obou fragmentů pomocí oligonukleotidu ZSOSAC2 (5'-CAGGTGAGCTCTAGACTGGGAGAAG-3') zavedeno místo SacI před místo XbaI promotoru NHA1 a pomocí oligonukleotidů ZSOSMA (5'-TCCCCCGGGAATCAGCATGGTCCTTAAC-3', pro ZrSOD2-22) a SpsodSMA2 (5'- TCCCCCGGGAAACGTAATCTTCCTGTG -3', pro *sod2*) zavedeno unikátní restrikční místo rozpoznávané enzymem SmaI namísto kodonu STOP. Pomocí těchto míst byly fragmenty klonovány do vektoru pGRU1 tak, aby

nedošlo k přerušení čtecího rámce mezi sekvencemi kódujícími přenašeče a sekvencí GFP. Zkonstruované plasmidy kódující přenašeče značené GFP byly nazvány pZrSOD2-22GFP a pSpsod2GFP. Správné napojení sekvencí bylo opět ověřeno sekvenováním.

Oba plasmidy byly transformovány do kmene B31 kvasinky S. cerevisiae a nejdříve bylo testováno, zda připojení GFP na C-konce proteinů nemá vliv na funkci heterologních přenašečů v S. cerevisiae. Z kapkového testu na obr. 4. 6 je patrné, že buňky obsahující plasmid pZrSOD2-22GFP tolerovaly stejné množství NaCl a LiCl jako buňky ZrSod2-22p bez GFP. Podobný výsledek byl získán také s transformanty nesoucími plasmidy pSpsod2GFP nebo pSpsod2. Z toho vyplývá, že připojení sekvence GFP nemělo vliv na aktivitu přenašečů a zřejmě ani na jejich množství v buňkách. Avšak při pozorování buněk (v exponenciální i stacionární fázi růstu) ve fluorescenčním mikroskopu, nebyla fluorescence lokalizována v buňkách exprimujících přenašeč ZrSod2-22p značený GFP na periferii buňky jako v případě Nhalp nebo Cnhlp (publikace č. 1 a 2), ale v ohraničených shlucích (obr. 4. 7). Pozorování buněk v konfokálním mikroskopu, pomocí něhož jsme se snažili zjistit, kde se tyto shluky v buňce nachází, prokázala, že shluky nejsou lokalizovány v plasmatické membráně buněk, ale uvnitř buňky avšak mimo vakuolu. V buňkách obsahujících přenašeč sod2p značený GFP nebyla pozorována vůbec žádná fluorescence.



Obr. 4. 6 Tolerance buněk kmene B31 transformovaných prázdným vektorem (negativní kontrola) nebo plazmidem kódujícím neznačený (pZrSOD2-22, pozitivní kontrola) či GFP značený (pZrSOD2-22GFP) přenašeč ZrSod2-22 k sodíku a lithiu byla sledována na YNB-miskách obsahujících NaCl nebo LiCl.



Obr. 4. 7 Buňky kmene B31 kvasinky *S. cerevisiae* exprimující přenašeč *Z. rouxii* ZrSod2-22p značený GFP ve fluorescenčním mikroskopu.

Tento neočekávaný výsledek by mohl znamenat, že přenašeče ZrSod2-22p i sod2p značené GFP jsou v buňkách špatně lokalizovány, čemuž ale neodpovídá zachování fenotypu buněk nesoucích GFP značené verze (zvýšená tolerance buněk k NaCl a LiCl, viz. obr. 4. 6). Nezdá se také, že by v buňkách exprimujících GFP značenou verzi ZrSod2-22p docházelo k rychlému metabolismu celého heterologního proteinu a zbylý protein GFP, který je relativně rezistentní k proteolýze vakuolárními proteázami (Burd, 2000), by se v buňkách akumuloval. Pravděpodobnějším vysvětlením zřejmě je, že v buňkách dochází k odštěpení GFP z proteinu ZrSod2-22^{GFP} některou proteázou v endoplasmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu (např. na C-konci ZrSod2-22p se nachází několik restrikčních míst, KK, RR, KR, RK, která jsou rozpoznávána proteázou Kex2p nacházející se v cisternách Golgiho aparátu (Fuller, et al., 1989; Zhang, et al., 2001)). V tomto případě by přenašeč ZrSod2-22p bez GFP byl správně lokalizován v plasmatické membráně, aby zajišťoval buňkám toleranci k sodíku a lithiu, a pozorovaná fluorescence by byla výsledkem akumulace pouze odštěpeného proteinu GFP. Subcelulární frakcionace buněk a následná imunodetekce proteinu GFP pomocí protilátek anti-GFP by umožnila ověřit, zda k odštěpení GFP opravdu dochází a kde je protein lokalizován. U buněk s přenašečem sod2p^{GFP} je možné, že ačkoliv protein sod2p obsahuje sekvenci GFP, je správně lokalizován v membráně, ale např. ze stérických důvodů, není chromofor GFP správně poskládán (vzniká samovolnou cyklizací tří aminokyselinových zbytků, viz. kapitola 4. 1. 1) a nedochází tak k vyzařování žádné fluorescence.

4. 3 Exprese živočišných genů kódujících Na⁺/H⁺antiportní systémy v *S. cerevisiae*

Vzhledem k podobnosti struktury všech eukaryotních buněk a procesů probíhajících v nich, se kvasinky s úspěchem využívají jako modelové organismy i ke studiu biologických systémů z vyšších eukaryot. V živočišných buňkách, jak popisuje také kapitola 1. 4. 4, Na⁺/H⁺-antiportery využitím koncentračního spádu sodných iontů přes membránu zprostředkovávají aktivní výstup protonů z buněk a podílejí se tak na regulaci vnitrobuněčného pH, na zachovávání buněčného objemu a také na transportu sodných iontů mezi vrstvami epiteliálních buněk (Wakabayashi, et al., 1997). V této práci bylo studováno, zda je možné funkčně exprimovat živočišné Na⁺/H⁺-antiportery (izoformy NHE1-3) v kvasinkách, což by významně usnadnilo jejich charakterizaci na molekulové úrovni.

4. 3. 1 Klonování cDNA genů NHE1-3 za promotor NHA1

DNA kódující přenašeče NHE1-3 použité v této práci byly izolovány z různých tkání potkana (*R. norvegicus*) (Collins, et al., 1993; Orlowski, et al., 1992). Pro expresi v *S. cerevisiae* byl nejdříve zvolen stejný expresní systém jako v případě exprese heterologních antiporterů z kvasinek (promotor *NHA1*, mnohokopiový vektor YEp352). Pro konstrukci plasmidů nesoucích jednotlivé izoformy, byly cDNA genů NHE1-3 nejprve amplifikovány PCR, při níž pomocí oligonukleotidů uvedených na obr. 4. 8 a v dalším textu byla zavedena vhodná restrikční místa pro jejich klonování do vektoru YEp352. Jako templáty pro reakce PCR sloužily plasmidy pCMV-NHE1, pCMV-NHE2, pCMV-NHE3 obsahující kompletní cDNA kódující jednotlivé izoformy Na⁺/H⁺ antiporterů (Collins, et al., 1993; Orlowski, 1993), které se liší svou délkou (obr. 4. 8) i funkcí v živočišných buňkách (viz. kap. 1. 4. 4).

V případě cDNA izoformy NHE1, bylo pomocí oligonukleotidu N1BAM (5'-GG<u>GGATCC</u>GTATGATGCTAAG-3') zavedeno restrikční místo *Bam*HI před startovní kodon a pomocí oligonukleotidu N1ECO (5'-G<u>GAATTC</u>CAGGAGGCAGGAGCAAG-3') restrikční místo *Eco*RI za kodon

STOP cDNA genu a PCR syntetizovaný fragment (2,5 kb) byl pomocí těchto míst vložen do vektoru YEp352. Výsledný plasmid byl označen pNHE1. Vložení sekvence promotoru NHA1 před cDNA genu NHE1 bylo provedeno následujícím způsobem: Pomocí PCR byl nejdříve syntetizován fragment DNA odpovídající promotoru NHA1 (-674 až –2). Jako templát sloužila genomová DNA z kmene S. oligonukleotidy (5'cerevisiae FL100: byly použity NHAXBA TTGCATTTGGAAGTAGCC-3') hybridizující se sekvencí nacházející se těsně před místem XbaI v promotoru NHA1 (nt -674), a oligonukleotid NHABGL (5'-CATAAGATCTAGCTAAGT-3'), pomocí něhož byla na konec promotoru NHA1 zavedena sekvence rozpoznávaná restrikčním enzymem Bg/II. Fragment promotoru po úpravě restrikčními enzymy XbaI a BglII bylo možné ve správné orientaci vložit do plasmidu pNHE1 linearizovaného enzymy XbaI a BamHI. Výsledný plasmid byl nazván pPNHA1-NHE1. PCR-fragment XbaI-Bg/II promotoru NHA1 byl zároveň vložen do prázdného vektoru YEp352 štěpeného enzymy XbaI a BamHI a výsledný plasmid pPROMNHA1 byl dále použit pro klonování verzí NHE2 a NHE3 (viz. také publikace č. 2, 3, 4 - klonování genů CNH1, ZrSOD2-22 a sod2).

A pCMV-NHE1 (NHE1^{cDNA} 2463 nt, 820 aa)



B pCMV-NHE2 (NHE2^{cDNA} 2094 nt, 697 aa)



C pCMV-NHE3 (NHE3^{cDNA} 2496 nt, 831 aa)



Obr. 4.8 Schéma PCR reakcí pomocí nichž byly amplifikovány cDNA genů kódujících verze Na⁺/H⁺ antiporterů z potkana: NHE1 (A), NHE2 (B) a NHE3 (C).

Pro amplifikaci cDNA genu NHE2 byly použity oligonukleotidy N2SMA (5'-TGT<u>CCCGGGGAGCTGTCTTCTC-3')</u> a N2SAC (5'-CTTT<u>GAGCTC</u>ATATCATGGCTTTTC-3') (obr. 4. 8), pomocí nichž byly zavedeny sekvence rozpoznávané enzymem *Sma*I před startovním kodonem a *Sac*I za kodonem STOP cDNA kódující NHE2. *Sma*I-*Sac*I fragment (2,1 kb) byl vložen ve správné orientaci za sekvenci promotoru *NHA1* do plasmidu pPROMNHA1 linearizovaného stejnými enzymy. Výsledný plasmid byl nazván pPNHA1-NHE2.

cDNA genu NHE3 byla nejprve amplifikována pomocí oligonukleotidů N3SMA (5'-GGCTCCCGGGGGCTGAGCAGCAG-3') а N3ECO (5'-GGGAGGAATTCGTGCTGGGCAGC-3'). Sekvenováním však bylo zjištěno, že syntetizovaný DNA fragment je o 288 nt kratší na 5' konci (na úrovni proteinu zkrácení o 96 aa na jeho N-konci), pravděpodobně v důsledku toho, že oligonukleotid N3SMA hybridizoval nesprávně se sekvencí DNA předcházející nt 289 (je podobná sekvenci na 5' konci před startovním kodonem cDNA NHE3). V sekvenci následující za nukleotidem 289 se nachází kodon ATG ve vzdálenosti 382 nt od původního počátečního ATG, který by případně mohl být rozpoznán jako startovní kodon pro syntézu zkráceného proteinu. Došlo by však ke zkrácení proteinu na N-konci o 127 aa, což by pravděpodobně ovlivnilo jak lokalizaci, tak i funkci proteinu. Také exprese tohoto konstruktu v kmeni B31 S. cerevisiae neměla vůbec žádný vliv na toleranci buněk k alkalickým kationtům. Vzhledem k tomu, že ani navržením nových oligonukleotidů (N3KPN (5'-GCACGAGGTACCACGGTATG-3') a N3SSE (5'-GGAATTCATGCATGCGTGTGTGGACTCAGGGGAAGCG-3'), Obr. 4. 8) se nepodařilo cDNA genu NHE3 naklonovat, pro další práci byly použity pouze plasmidy pPNHA1-NHE1 a pPNHA1-NHE2 obsahující bezchybně klonované cDNA potkaních antiporterů NHE1 a NHE2.

4. 3. 2 Exprese NHE1 a NHE2 v kvasince S. cerevisiae

Plasmidy pPNHA1-NHE1 a pPNHA1-NHE2 byly transformovány do kmene B31 a byla sledována tolerance transformantů k Na⁺, Li⁺ a K⁺ pomocí kapkových testů na miskách obsahujících různé množství chloridových solí těchto tří alkalických kationtů. Jelikož oba přenašeče NHE1 a NHE2 v živočišných buňkách transportují protony ven z buňky a Na⁺ (Li⁺) ionty do buněk, v případě funkční exprese přenašečů v S. cerevisiae a jejich správné lokalizaci v plasmatické membráně, by buňky kvasinek byly více citlivé ke kationtům Na⁺ a Li⁺. Na miskách s NaCl a KCl nebyl pozorován žádný rozdíl v toleranci mezi buňkami obsahujícími plasmidy kódující savčí antiportery a kontrolními buňkami transformovanými prázdným vektorem. Pouze na miskách s 15 mM LiCl (kationty Li⁺ jsou pro buňku desetkrát více toxické než Na⁺) buňky obsahující plazmid pPNHA1-NHE1 rostly pomaleji než kontrolní buňky a naopak, buňky obsahující plazmid pPNHA1-NHE2 rostly nepatrně lépe. Rozdíl mezi buňkami na miskách, kdy byl růst buněk pozorován po dobu několika dnů, se však neprojevil při sledování růstu buněk v tekutém médiu (během 24 hodin) za přítomnosti LiCl (5, 10, 15 mM LiCl). Rychlost dělení buněk obsahujících prázdný vektor nebo plasmid pPNHA1-NHE1 či pPNHA1-NHE2 byla za daných podmínek stejná, což alespoň naznačovalo, že cDNA odpovídající živočišným genům není pro buňky kvasinek toxická.

V další práci bylo provedeno několik počátečních experimentů (exprese NHE1 pod vlivem silnějšího promotoru a fúze proteinů NHE1 a NHE2 s proteinem GFP), které by mohly vést k objasnění, zda nepatrný fenotyp pozorovaný na miskách je opravdu dán transportní aktivitou přenašečů, a které by v budoucnosti mohly přispět k optimalizaci exprese živočišných membránových proteinů v kvasinkách.



Obr. 4.9 Schéma konstrukce plasmidu pADH-NHE1. cDNA odpovídající přenašeči NHE1 byla vyštěpena z plasmidu pNHE1 pomocí enzymů rozpoznávajících restrikční místa *Bam*HI a *Eco*RI a vložena do odpovídajících míst v polylinkeru plasmidu p426-ADH za promotor ADH.

Zvýšená citlivost buněk kvasinek obsahujících plasmid pNHA1-NHE1 k LiCl naznačovala, že by přenašeč NHE1 mohl být alespoň nepatrně aktivní i v buňkách S. cerevisiae. Potom zvýšený počet kopií přenašeče v buňkách by mohl vést ke zvýraznění fenotypu (rozdílu v citlivosti na LiCl mezi buňkami obsahujícími přenašeč a buňkami s prázdným vektorem), proto byl další v fázi přenašeč NHE1 v buňkách vlivem exprimován **B31** pod silnějšího promotoru (alkoholdehydrogenázového promotoru, ADH (Hitzeman, et al., 1981)). Jak je vyznačeno na obr. 4. 9 pomocí restrikčních míst *Bam*HI a *Eco*RI byla cDNA kódující přenašeč NHE1 klonována ve správné orientaci za promotor ADH do mnohokopiového plazmidu p426-ADH (Mumberg, et al., 1995). Výsledný plasmid byl nazván pADH-NHE1.

Plasmid pADH-NHE1 byl transformován do kmene *S. cerevisiae* B31 a opět byla sledována tolerance buněk k solím. Buňky exprimující NHE1 antiporter pod vlivem silnějšího promotoru byly opravdu více citlivé k LiCl (buňky už nerostly na 15 mM LiCl) než buňky s plasmidem pNHA1-NHE1 a než buňky kontrolní, transformované prázdným vektorem. Na miskách s NaCl nebyl pozorován žádný rozdíl. Z tohoto výsledku se zdá, že živočišný Na⁺/H⁺ antiporter NHE1 je v kvasinkách skutečně exprimován, ale jeho transportní aktivita je pravděpodobně velmi nízká.

4. 3. 3 Studium lokalizace a funkce přenašečů NHE1 a NHE2 exprimovaných v *S. cerevisiae*

Ke studiu lokalizace živočišných přenašečů NHE1 a NHE2 exprimovaných v *S. cerevisiae* byla použita stejná metoda jako v případě transportních systémů z kvasinek: fúze fluorescenčního proteinu GFP k C-koncům přenašečů NHE1 a NHE2.

Ke klonování cDNA kódujících přenašeče NHE1 či NHE2 s promotorem *NHA1* do vektoru pGRU1 (obsahuje sekvenci kódující GFP protein) bylo v obou případech využito restrikční místo *Xba*I nacházející se v sekvenci promotoru *NHA1* (pro PCR bylo využito univerzálního oligonukleotidu, který hybridizuje se sekvencí nacházející se ve vektoru YEp352). Restrikční místo *Sph*I (bylo zavedeno při polymerázové reakci namísto kodonů STOP pomocí oligonukleotidu N1SPH2 (5'-GCCTG<u>GCATGC</u>CTGCCCTTTGGGGGATG-3' pro NHE1) a N2SPH2 (5'-TCATA<u>GCATGC</u>CTTTCGTTGCCAAGGCGG-3' pro NHE2)) umožnilo bez přerušení čtecího rámce napojení sekvence kódující daný přenašeč se sekvencí GFP při ligaci do vektoru pGRU1. Zkonstruované plasmidy kódující GFP značené přenašeče byly nazvány pPROMNHA1-NHE1GFP a pPROMNHA1-NHE2GFP. Správné napojení sekvencí bylo ověřeno sekvenováním.

Plasmidy pPROMNHA1-NHE1GFP a pPROMNHA1-NHE2GFP byly transformovány do kmene B31 kvasinky *S. cerevisiae* a buňky rostoucí na miskách i v tekutém médiu (v exponenciální i stacionární fázi růstu) byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu. Stejně jako v případě exprese Na⁺/H⁺-antiporteru z kvasinky *S. pombe* označeného GFP (kap. 4. 2. 8), fluorescence specifická pro GFP nebyla nalezena za žádných podmínek v buňkách obsahujících plasmid pPROMNHA1-NHE1GFP. Na druhou stranu, jak ukazuje obr. 4. 10, v buňkách obsahujících plasmid pPROMNHA1-NHE2GFP byla fluorescence lokalizována uvnitř buněk v cytoplasmě mimo vakuolu. Přenašeč NHE2 značený GFP se tak zdá být buď zadržován v membránách endoplasmatického retikula nebo by mohl být směrován do jiných buněčných kompartmentů, např. podobně jako *S. cerevisiae*

vlastní Na^+/H^+ -antiporter Nhx1p, který je lokalizován v pozdních endosomálních/prevakuolárních kompartmentech, kde se podílí na vnitrobuněčné sekvestraci Na^+ (Nass, et al., 1997; Nass a Rao, 1998). Akumulace proteinu v membránách uvnitř buňky by vysvětlovala také nepatrně zvýšenou toleranci buněk obsahujících neznačený přenašeč k LiCl (kapitola 4. 3. 2). Činností NHE2 by se ionty Li⁺ uvnitř buňky transportovaly do buněčných kompartmentů, čímž by se snížila toxicita působení lithia v buněčné cytoplazmě.



Obr. 4. 10Mikroskopická pozorování (A - Nomarski, B - fluorescence) buněk B31
transformovaných plasmidem pPROMNHA1-NHE2GFP
z exponenciální fáze růstu v tekutém médiu.

V kvasinkách byla úspěšně exprimována celá řada rozpustných proteinů savců, na druhou stranu exprese živočišných membránových proteinů v kvasinkách není tak snadná. Mezi transportní systémy izolované z vyšších eukaryot, které se podařilo v kvasinkách funkčně exprimovat patří např. sodno-fosfátový symportní systém izolovaný z ledvin potkana (Bernhardt, et al., 1999). V případě exprese podjednotky α a β epiteliálního sodného kanálu savců ENaC bylo zjištěno na základě imunodetekce, že v kvasinkách dochází k expresi proteinu, jeho funkčnost však byla předpovězena také pouze na základě sledování růstu na médiích s NaCl (zvýšená citlivost buněk k Na⁺) (Gupta a Canessa, 2000). Transportní aktivita přenašeče nebyla přímo stanovena. Podobně tomu bylo také v případech exprese draselného kanálu gpIRK1 izolovaného ze srdeční tkáně morčete (Tang, et al., 1995) nebo při expresi dvou podjednotek Kir 6.1 a Kir 6.2 tvořících pór savčího draselného kanálu senzitivního k ATP (Graves a Tinker, 2000). Navíc, exprese lidského transportního systému pro glukosu Glut1p v *S. cerevisiae* ukázala, že ačkoliv byl protein v buňkách

získána pouze, pokud v genomu S. cerevisiae byl mutován gen FGY1 kódující protein, který pravděpodobně reguluje v S. cerevisiae katalytickou aktivitu hexosových přenašečů (Boles, et al., 2000). Pro různé membránové proteiny z vyšších organizmů je pravděpodobně nezbytné vyvinout v kvasinkách specifické podmínky zajišťující jejich funkční expresi. V laboratoři Dr. M. Montero-Lomelí se pokoušeli také o expresi Na⁺/H⁺ antiporteru NHE1 izolovaného z prasečí ledvinové tkáně v kmenech S. cerevisiae (Montero-Lomelí a Facanha, 1999). V jejich případě bylo zjištěno pomocí protilátek proti úseku 40 aa na C-konci proteinu, že, přestože dochází k syntéze proteinu NHE1, protein je zadržován v membránách endoplasmatického retikula. Transportní aktivita specifická pro NHE1 byla detekována pouze v proteoliposomových váčcích, které byly rekonstituovány z membrán izolovaných z buněk kvasinek nesoucích cDNA kódující NHE1 (Montero-Lomelí a Facanha, 1999). Zadržování živočišných proteinů uvnitř buněk může způsobovat kontrolní systém kvasinek, který rozpoznává abnormální proteiny syntetizované na drsném ER a zabraňuje jejich postupu sekreční dráhou končící v plasmatické membráně (Ellgaard, et al., 1999). Transportní aktivita Na⁺/H⁺antiportních systémů NHE je v živočišných buňkách také regulována pomocí posttranslačních modifikací (glykosylace, fosforylace) (Orlowski a Grinstein, 1997). Právě proces glykosylace proteinů v sekreční dráze je v buňkách kvasinek a živočichů velmi odlišný (Munro, 2001). Proto pro objasnění všech výsledků dosažených v této práci a pro optimalizaci exprese živočišných Na⁺/H⁺ antiporterů v kvasinkách bude potřeba provést mnoho další experimentální práce, která by odhalila jednotlivé limitní kroky heterologní exprese (např. detekce produktů transkripce cDNA, přesné určení lokalizace proteinů pomocí protilátek, měření transportní aktivity). V každém případě se kvasinky zdají jako vhodný expresní sytém užitečný ke studiu struktury a funkce živočišných proteinů, který může napomoci k charakterizaci proteinů na molekulové úrovni, například k identifikaci mutací, které mají vliv na transport iontů pomocí přenašečů a na regulaci transportu. V neposlední řadě je exprese v S. cerevisiae vhodným nástrojem ke studiu citlivosti transportních systémů k toxickým látkám, popř. k léčivům.

PUBLIKACE Č.1



[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Functional study of the Saccharomyces cerevisiae Nha1p C-terminus

Olga Kinclová, José Ramos, Serge Potier and Hana Sychrová

Molecular Microbiology, 2001, Vol. 40 Page 656-668

Pages 656 à 668 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2001.02412.x

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

PUBLIKACE Č.2



[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The Candida albicans Na⁺/H⁺ antiporter exports potassium and rubidium

Olga Kinclová, Serge Potier and Hana Sychrová

FEBS Letters, 2001, Vol. 504, Pages 11-15

Pages 11 à 15 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02755-7

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

PUBLIKACE Č.3



[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the *HOG1* and the *SOD2* genes

Olga Kinclová, Serge Potier et Hana Sychrová

Journal of Biotechnology, 2001, Vol. 88, Pages 151-158

Pages 151 à 158 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00274-7</u>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

PUBLIKACE Č.4

(rukopis přijatý do tisku)



[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/ H^+ antiporters in two subfamilies

Olga Kinclova, Serge Potier et Hana Sychrova

Microbiology, 2002, Vol. 148, Pages 1225–1232

Pages 1225 à 1232 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

5 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo (1) funkčně charakterizovat Na⁺, K⁺/H⁺antiportní systém Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae*, zejména význam extrémně dlouhé hydrofilní C-koncové domény proteinu na jeho aktivitu a funkci v buňce, a (2) porovnat transportní vlastnosti Nha1p s chováním Na⁺/H⁺-antiporterů z jiných kvasinek (*C. albicans*, *Z. rouxii* a *S. pombe*) exprimovaných za stejných podmínek v *S. cerevisiae*.

Bylo zjištěno, že hydrofilní C-koncová část přenašeče Nha1p z kvasinky *S. cerevisiae*, která tvoří více než 56 % proteinu, nemá vliv ani (i) na lokalizaci proteinu v buňce ani (ii) na substrátovou specifitu přenašeče. Naopak, C-koncová oblast (iii) ovlivňuje transportní aktivitu Nha1p pro sodík, lithium a rubidium (nalezeno jako čtvrtý substrát přenašeče). Byla identifikována oblast C-konce proteinu (aminokyseliny 883-928), která je nezbytná pro zachování maximální transportní aktivity přenašeče pro sodík a lithium. Dále bylo zjištěno, že se C-koncová část proteinu Nha1p podílí (iv) na regulaci hladiny draselných iontů v buňce a (v) na odpovědi buňky k náhlým změnám vnitrobuněčného pH a osmolarity prostředí (publikace č. 1). Navíc, pomocí fúze promotoru *NHA1* s genem kódujícím β -galaktosidázu, byla vyvrácena hypotéza (Masson a Ramotar, 1998), že by transkripční faktor Imp2p, který se v *S. cerevisiae* podílí na zajištění tolerance buněk k vysokým koncentracím monovalentních kationtů, mohl řídit expresi genu *NHA1*.

V rámci charakterizace Na^+/H^+ -antiporterů z jiných kvasinek bylo zjištěno, že podobně jako Nha1p, Na^+/H^+ -antiporter z patogenní kvasinky *C. albicans* zprostředkovává transport nejen sodíku a lithia ale i draslíku a rubidia, a je také schopen se podílet na regulaci vnitrobuněčného pH při heterologní expresi v *S. cerevisiae* (publikace č. 2). Tyto výsledky by mohly významně přispět k poznatkům zabývajícím se morfologickými změnami a patogenními vlastnostmi *C. albicans*. Přenašeč ZrSod2-22p z osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii* byl shledán jako velmi účinný systém s vysokou transportní kapacitou pro sodík a lithium, avšak, stejně jako antiporter sod2p z *S. pombe*, není schopen rozpoznat jako své substráty ionty draslíku a rubidia (publikace č. 3 a 4). Dosažené výsledky srovnání vlastností (substrátové specifity a funkce) homologních přenašečů umožňují rozdělit rodinu Na⁺/H⁺-antiporterů plasmatické membrány kvasinek (TC 2.A.36) na dvě podrodiny:

- Podrodina antiportních systémů se substrátovou specifitou pouze pro sodík a lithium (*S. pombe*, *Z. rouxii*), jejichž hlavní funkcí v buňkách je eliminace toxických kationtů.
- (2) Podrodina s antiportními systémy (S. cerevisiae, C. albicans), které zprostředkovávají transport všech alkalických kationtů (Na⁺, Li⁺, K⁺, Rb⁺) a které zastávají v buňkách více funkcí. Kromě odstraňování toxických kationtů se zřejmě podílejí na regulaci vnitrobuněčné koncentrace draslíku, vnitrobuněčného pH či buněčného objemu.

Třetím cílem této práce bylo pokusit se v kvasince *S. cerevisiae* funkčně exprimovat Na⁺/H⁺-transportní systémy savčích buněk. Byly zkonstruovány plasmidy pPNHA1–NHE1 a pPNHA1-NHE2 obsahující cDNA kódující Na⁺/H⁺⁻ antiportery NHE1 a NHE2 ze srdce a z epiteliální tkáně tenkého střeva potkana za promotorem *NHA1 z S. cerevisiae*, které byly transformovány do kmene *S. cerevisiae* B31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ). Na základě sledování tolerance buněk B31 obsahujících expresní vektory s cDNA genů NHE1 a NHE2 k solím alkalických kovů se zdá, že dochází k expresi obou přenašečů, ale jejich transportní aktivita je velmi nízká. Použitá metoda určení lokalizace přenašečů v buňkách pomocí značení GFP není zřejmě v případě savčích Na⁺/H⁺-antiporterů příliš vhodná. Získané poznatky budou sloužit pro další experimenty týkající se exprese živočišných membránových proteinů v *S. cerevisiae*.

Kromě toho se v rámci této dizertační práce podařilo naklonovat nové alely genů kódujících Na⁺/H⁺-antiportery v kvasinkách *C. albicans* MEN (*CNH1*-G23, Acc. No. AF375984) a *Z. rouxii* CBS732 (*ZrSOD2-22*, Acc. No. AJ252273) a také alelu genu kódujícího v *Z. rouxii* CBS732 MAP-kinázu ZrHog1p (*ZrHOG1*, Acc. No. AJ132606).

6 Seznam použitých symbolů a zkratek

aa	aminokyselina, aminokyselinový zbytek
ADH	alkoholdehydrogenáza
ADP	adenosindifosfát
Amp ^R	rezistence k ampicilinu
ARS	autonomně se replikující sekvence
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
CAPS	3-[cyklohexylamino]-1-propansulfonová kyselina
CEN	centromera
CYC	cytochrom-c-oxidáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
GFP	green fluorescent protein
GPD	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
kb	kilobáze, 1000 párů bází
kDa	kilodalton
mRNA	mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
nt	nukleotid
OD ₆₀₀	absorbance (optical density) při vlnové délce 600 nm
ORF	otevřený čtecí rámec
ORI	počátek replikace v <i>E. coli</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGK	fosfoglycerátkináza
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
UV	ultrafialový
Δ	delece

7 Seznam literatury

- Aharonovitz, O., Zaun, H. C., Balla, T., York, J. D., Orlowski, J. a Grinstein, S. (2000). Intracellular pH regulation by Na⁺/H⁺ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 213-24.
- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L. a Goldstein, S. A. N. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell* 99, 283-291.
- Albertyn, J., Hohmann, S. a Prior, B. A. (1994). Characterization of the osmoticstress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr Genet* 25, 12-8.
- Albrecht, E. B., Hunyady, A. B., Stark, G. R. a Patterson, T. E. (2000). Mechanisms of sod2 gene amplification in Schizosaccharomyces pombe. Mol Biol Cell 11, 873-886.
- Alepuz, P. M., Cunningham, K. W. a Estruch, F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* 26, 91-8.
- Alepuz, P. M., Jovanovic, A., Reiser, V. a Ammerer, G. (2001). Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 7, 767-77.
- Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V. V. a Slayman, C. W. (2000). Biogenesis and function of the plasma-membrane H⁺-ATPase. *J Exp Biol* 203, 155-160.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. a Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.
- Aronson, P. S. (1985). Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol* **47**, 545-60.
- Aronson, P. S., Nee, J. a Suhm, M. A. (1982). Modifier role of internal pH in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299, 161-163.

- Banta, L. M., Robinson, J. S., Klionsky, D. J. a Emr, S. D. (1988). Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol* 107, 1369-83.
- Bañuelos, M. A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. a Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144, 2749-2758.
- Banuett, F. (1998). Signalling in the yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 249.
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Schultheis, P. J., Miller, M. L., Evans, R. L., Vorhees, C. V., Shull, G. E. a Scott, W. J. (1999). Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol* 276, C788-95.
- Bernhardt, F., Schoner, W., Schröeder, B., Breves, G. a Scheinerbobis, G. (1999).
 Functional expression and characterization of the wild-type mammalian renal cortex sodium/phosphate cotransporter and an R-215 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38, 13551-13559.
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C. a Slayman, C. L. (1998). Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J Membr Biol* 162, 67-80.
- Bertl, A., Natura, G. a Bihler, H. (2001). A role for Tok1 in K⁺ uptake in yeast. 19th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. Chania, Crete, Greece, s. 17.
- Bertl, A., Slayman, C. L. a Gradmann, D. (1993). Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. J Membr Biol 132, 183-99.
- Biemesderfer, D., DeGray, B. a Aronson, P. S. (2001). Active (9.6 S) and inactive (21 S) oligomers of NHE3 in microdomains of the renal brush border. *J Biol Chem* 276, 10161-10167.
- Bihler, H., Gaber, R. F., Slayman, C. L. a Bertl, A. (1999). The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H⁺-dependent, K⁺independent current. *FEBS Lett* 447, 115-120.
- Bihler, H., Slayman, C. L. a Bertl, A. (1998). NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Let* **432**, 59-64.

- Bilslandmarchesan, E., Ariño, J., Saito, H., Sunnerhagen, P. a Posas, F. (2000). Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **20**, 3887-3895.
- Biswas, S. K., Yokoyama, K., Nishimura, K. a Miyaji, M. (2000). Effect of pH, carbon source and K⁺ on the Na⁺-inhibited germ tube formation of *Candida albicans*. *Med Mycol* **38**, 363-9.
- Blomberg, A. (1997). Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* **18**, 1429-40.
- Blomberg, A. (2000). Metabolic surprises in Saccharomyces cerevisiae during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. FEMS Microbiol Lett 182, 1-8.
- Blomberg, A. a Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **171**, 1087-92.
- Boles, E., Wieczorke, R. a Krampe, S. (2000). Glucose transport in yeast: Redundancy and regulation. *Abstract book of the 10th International Symposium on Yeast*. Papendal, Arnhem, The Netherlands, s. 197.
- Bookstein, C., Musch, M. W., DePaoli, A., Xie, Y., Rabenau, K., Villereal, M., Rao, M. C. a Chang, E. B. (1996). Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus. *Am J Physiol* 271, C1629-38.
- Bowers, K., Levi, B. P., Patel, F. I. a Stevens, T. H. (2000). The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell* **11**, 4277-94.
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E. a Gustin, M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-3.
- Brown, A. D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro- organisms. Adv Microb Physiol 17, 181-242.
- Burd, C. G. (2000). Visualizing protein dynamics in yeast with green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **327**, 61-9.
- Camacho, M., Ramos, J. a Rodríguez-Navarro, A. (1981). Potassium requirements of Saccharomyces cerevisiae. Curr Microbiol 6, 295-299.

- Capieaux, E., Vignais, M. L., Sentenac, A. a Goffeau, A. (1989). The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J Biol Chem* **264**, 7437-46.
- Carlson, M. and Botstein, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145-54.
- Carmel, O., Dover, N., Rahav Manor, O., Dibrov, P., Kirsch, D., Karpel, R., Schuldiner, S. a Padan, E. (1994). A single amino acid substitution (Glu134-->Ala) in NhaR1 increases the inducibility by Na⁺ of the product of nhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter gene in *Escherichia coli*. *EMBO J* 13, 1981-9.
- Clotet, J., Gari, E., Aldea, M. a Ariño, J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **19**, 2408-15.
- Collins, J. F., Honda, T., Knobel, S., Bulus, N. M., Conary, J., DuBois, R. a Ghishan, F. K. (1993). Molecular cloning, sequencing, tissue distribution, and functional expression of a Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3938-42.
- Counillon, L., Pouyssegur, J. a Reithmeier, R. A. (1994). The Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 possesses N- and O-linked glycosylation restricted to the first N-terminal extracellular domain. *Biochemistry* **33**, 10463-9.
- Csonka, L. N. a Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**, 569-606.
- Darley, C. P., Vanwuytswinkel, O. C. M., Vanderwoude, K., Mager, W. H. a Deboer,
 A. H. (2000). Arabidopsis thaliana and Saccharomyces cerevisiae NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. Biochem J 351, 241-249.
- de la Fuente, N., Maldonado, A. M. a Portillo, F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Lett* **411**, 308-12.
- Dibrov, P. a Fliegel, L. (1998). Comparative molecular analysis of Na^+/H^+ exchangers: a unified model for Na^+/H^+ antiport? *FEBS Lett* **424**, 1-5.
- Dibrov, P., Smith, J. J., Young, P. G. a Fliege, L. (1997). Identification and localization of the sod2 gene product in fission yeast. *FEBS Lett* 405, 119-124.

- Dibrov, P., Young, P. G. a Fliegel, L. (1998). Functional analysis of amino acid residues essential for activity in the Na⁺/H⁺ exchanger of fission yeast. *Biochemistry* **37**, 8282-8288.
- Dichtl, B., Stevens, A. a Tollervey, D. (1997). Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *EMBO J* 16, 7184-7195.
- D'Souza, S., Garcia-Cabado, A., Yu, F., Teter, K., Lukacs, G., Skorecki, K., Moore, H. P., Orlowski, J. a Grinstein, S. (1998). The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J Biol Chem* 273, 2035-43.
- Ellgaard, L., Molinari, M. a Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-8.
- Eraso, P. a Gancedo, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett* **224**, 187-92.
- Evans, I. H. (1996). *Methods in Molecular Biology: Yeast Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- Fairman, C., Zhou, X. L. a Kung, C. (1999). Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J Membr Biol* **168**, 149-157.
- Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R. a Serrano, R. (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol Cell Biol* 15, 5470-81.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. a Silver, P. A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* 17, 5606-14.
- Fukuda, A., Nakamura, A. a Tanaka, Y. (1999). Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in Oryza sativa. *Biochim Biophys Acta* 1446, 149-55.
- Fuller, R. S., Brake, A. a Thorner, J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca²⁺- dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci* USA 86, 1434-8.
- Gaber, R. F., Styles, C. A. a Fink, G. R. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 2848-59.
- Galcheva Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I. H. a Davis, R. J. (1994). An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* **265**, 806-8.

- Garcia-Arranz, M., Maldonado, A. M., Mazon, M. J. a Portillo, F. (1994).
 Transcriptional control of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose.
 Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation. *J Biol Chem* 269, 18076-82.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F. J., Bañuelos, M. A., Haro, R. a Rodríguez-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, R., de Larrinoa, I. F., Villalba, J. M. a Serrano, R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J* 11, 3157-64.
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L. a Fink, G. R. (1999).
 The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1480-5.
- Gerchman, Y., Olami, Y., Rimon, A., Taglicht, D., Schuldiner, S. a Padan, E. (1993).
 Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1212-6.
- Gerchman, Y., Rimon, A., Venturi, M. a Padan, E. (2001). Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. *Biochemistry* **40**, 3403-3412.
- Goffeau, A. (2000). Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Lett* **480**, 37-41.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H.,
 Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H.
 W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. a Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-7.
- Goldberg, E. B., Arbel, T., Chen, J., Karpel, R., Mackie, G. A., Schuldiner, S. a Padan, E. (1987). Characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2615-9.
- Good, D. W., Di Mari, J. F. a Watts, B. A., 3rd (2000). Hyposmolality stimulates Na⁺/H⁺ exchange and HCO(3)(-) absorption in thick ascending limb via PI 3-kinase. *Am J Physiol* **279**, C1443-54.

- Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R. a Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* **20**, 7654-61.
- Gorner, M., Schuller, C. a Ruis, H. (1999). Being at the right place at the right time: The role of nuclear transport in dynamic transcriptional regulation in yeast. *Biol Chem* 380, 147-150.
- Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M. C. a Andersen, H. A. (1995). BAP2, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta 1269, 275-280.
- Graves, F. M. a Tinker, A. (2000). Functional expression of the pore forming subunit of the ATP-sensitive potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 403-9.
- Gupta, S. S. a Canessa, C. M. (2000). Heterologous expression of a mammalian epithelial sodium channel in yeast. *FEBS Lett* **481**, 77-80.
- Gustin, M. C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M. R. a Kung, C. (1986). Ion channels in yeast. *Science* 233, 1195-7.
- Gustin, M. C., Zhou, X. L., Martinac, B. a Kung, C. (1988). A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* **242**, 762-5.
- Hahnenberger, K. M., Jia, Z. a Young, P. G. (1996). Functional expression of the Schizosaccharomyces pombe Na⁺/H⁺ antiporter gene, sod2, in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5031-5036.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. a Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-11.
- Haro, R., Bañuelos, M. A., Quintero, F. J., Rubio, F. a Rodríguez-Navarro, A. (1993). Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiologia Plantarum* 89, 868-874.
- Haro, R., Garciadeblas, B. a Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**, 189-191.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. a Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167.
- Hirata, D., Harada, S., Namba, H. a Miyakawa, T. (1995). Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca²⁺/calmodulin-

dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol Gen Genet* **249**, 257-64.

- Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goeddel, D. V., Ammerer, G. a Hall, B. D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature* 293, 717-22.
- Hoefer (1994). Protein electrophoresis: Applications guide. Hoefer Scientific Instruments, USA.
- Hoffman, C. S. a Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Hohmann, S. (1997). Shaping up: The response of yeast to osmotic stress v Hohmann, S. and Mager, W. H. (Eds), *Yeast stress responses*, R. G. Landes, Austin, TX, USA, s. 101-145.
- Holmes, D. S. a Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114, 193-7.
- Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C. a Kielland-Brandt, M. C. (2000). *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembranespanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 37, 108-24.
- Hounsa, C. G., Brandt, E. V., Thevelein, J., Hohmann, S. and Prior, B. A. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144, 671-80.
- Chalumeau, C., du Cheyron, D., Defontaine, N., Kellermann, O., Paillard, M. a Poggioli, J. (2001). NHE3 activity and trafficking depend on the state of actin organization in proximal tubule. *Am J Physiol* 280, F283-90.
- Chambrey, R., Achard, J. M., St John, P. L., Abrahamson, D. R. a Warnock, D. G. (1997). Evidence for an amiloride-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger in rat renal cortical tubules. *Am J Physiol* 273, C1064-74.
- Chang, A. a Slayman, C. W. (1991). Maturation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J Cell Biol* 115, 289-95.
- Chow, C. W. (1999). Regulation and intracellular localization of the epithelial isoforms of the Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3. *Clin Invest Med* **22**, 195-206.

Šilhánková, L. (1983). Mikrobiologie. SNTL, Praha.

- Inoue, H., Noumi, T., Tsuchiya, T. a Kanazawa, H. (1995). Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164, in the transmembrane helices of a Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **363**, 264-8.
- Ivey, D. M., Guffanti, A. A., Zemsky, J., Pinner, E., Karpel, R., Padan, E., Schuldiner, S. a Krulwich, T. A. (1993). Cloning and characterization of a putative Ca²⁺/H⁺ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na⁺/H⁺ antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. *J Biol Chem* 268, 11296-303.
- Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. a Komatsu, Y. (1995). The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 41, 763-9.
- Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y. a Watanabe, Y. (1998). Characterization of a second gene (*ZSOD22*) of Na⁺/H⁺ antiporter from salttolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of *ZSOD2* and *ZSOD22* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1167-1174.
- Iwaki, T., Tamai, Y. a Watanabe, Y. (1999). Two putative MAP kinase genes, ZrHOG1 and ZrHOG2. cloned from the salt-tolerant yeast Zygosaccharomyces functionally homologous rouxii are to the Saccharomyces cerevisiae HOG1 gene. Microbiology 145, 241-248.
- Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A. G., Mattison, C. a Ota, I. (1997). Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem* 272, 17749-17755.
- Janderová, B. a Bendová, O. (1999). *Úvod do biologie kvasinek*. , Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova, Praha.
- Jia, Z.-P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. a Young, P. G. (1992). Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J* **11**, 1631-1640.
- Karpel, R., Alon, T., Glaser, G., Schuldiner, S. a Padan, E. (1991). Expression of a sodium proton antiporter (NhaA) in *Escherichia coli* is induced by Na⁺ and Li⁺ ions. *J Biol Chem* 266, 21753-9.

- Karpel, R., Olami, Y., Taglicht, D., Schuldiner, S. a Padan, E. (1988). Sequencing of the gene ant which affects the Na⁺/H⁺ antiporter activity in *Escherichia coli*. J *Biol Chem* 263, 10408-14.
- Kaufer, N. F. a Potashkin, J. (2000). Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res* 28, 3003-10.
- Kaur, S. a Mishra, P. (1991). Dimorphism-associated changes in plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* **156**, 412-5.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K. a Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-5.
- Kinclová, O. (1997). Regulovaná exprese heterologního membránového přenašeče v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. VŠCHT Praha (diplomová práce).
- Klanke, C. A., Su, Y. R., Callen, D. F., Wang, Z., Meneton, P., Baird, N., Kandasamy, R. A., Orlowski, J., Otterud, B. E., Leppert, M. a et al. (1995).
 Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 25, 615-22.
- Klasson, H., Fink, G. R. a Ljungdahl, P. O. (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* 19, 5405-5416.
- Ko, C. H. a Gaber, R. F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 4266-73.
- Ko, C. H., Liang, H. a Gaber, R. F. (1993). Roles of multiple glucose transporters in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 13, 638-48.
- Krump, E., Nikitas, K. a Grinstein, S. (1997). Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. J Biol Chem 272, 17303-11.
- Kültz, D. a Burg, M. (1998). Evolution of osmotic stress signaling via map kinase cascades. J Exp Biol 201, 3015-3021.
- Kunze, B., Hellwig-Burgel, T., Weichenhan, D. a Traut, W. (2000). Transcription and proper splicing of a mammalian gene in yeast. *Gene* **246**, 93-102.

- Kurashima, K., D'Souza, S., Szaszi, K., Ramjeesingh, R., Orlowski, J. a Grinstein, S. (1999). The apical Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 274, 29843-9.
- Kuroda, T., Shimamoto, T., Inaba, K., Kayahara, T., Tsuda, M. a Tsuchiya, T. (1994a). Properties of the Na⁺/H⁺ antiporter in *Vibrio parahaemolyticus*. J Biochem (Tokyo) 115, 1162-5.
- Kuroda, T., Shimamoto, T., Inaba, K., Tsuda, M. a Tsuchiya, T. (1994b). Properties and sequence of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Biochem (Tokyo)* **116**, 1030-8.
- Lacroute, F. (1968). Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **95**, 824-32.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafuente, M. J., Gancedo, C., Jauniaux, J. C. a Gancedo, J. M. (2000). Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 35, 161-172.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A. a Mitchell, A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. J *Biol Chem* 276, 1850-6.
- Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P. a Adler, L. (1993). A gene encoding sn-glycerol
 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 10, 1101-11.
- Latterich, M. a Watson, M. D. (1993). Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochem Biophys Res Commun 191, 1111-7.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. a Barhanin, J. (1996). A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* **271**, 4183-7.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M. a Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* 14, 1360-71.
- Mackenzie, K. F., Singh, K. K. a Brown, A. D. (1988). Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol 134, 1661-6.
- Madrid, R., Goméz, M. J., Ramos, J. a Rodríguez-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.
- Maeda, T., Takekawa, M. a Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3- containing osmosensor. *Science* **269**, 554-8.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. a Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-5.
- Mager, W. H. a Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem J* 290, 1-13.
- Malakooti, J., Dahdal, R. Y., Dudeja, P. K., Layden, T. J. a Ramaswamy, K. (2001). The human Na⁺/H⁺ exchanger NHE2 gene: genomic organization and promoter characterization. *Am J Physiol* 280, G763-73.
- Márquez, J. A., Pascual Ahuir, A., Proft, M. a Serrano, R. (1998). The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J* **17**, 2543-53.
- Márquez, J. A. a Serrano, R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* 382, 89-92.
- Martinez, P. a Persson, B. L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258, 628-638.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.
 N., Amtmann, A., Maathuis, F. J. M., Sanders, D., Harper, J. F., Tchieu, J.,
 Gribskov, M., Persans, M. W., Salt, D. E., Kim, S. A. a Guerinot, M. L.
 (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126, 1646-1667.
- Masson, J. Y. a Ramotar, D. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae IMP2* gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Mol Cell Biol* **16**, 2091-100.

- Masson, J.-Y. a Ramotar, D. (1998). The transcriptional activator Imp2p maintains ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149**, 893-901.
- Matějčková, A. (1997). Biogeneze a degradace přenašeče bazických aminokyselin Can1 kvasinky *Candida albicans* exprimovaného v *Saccharomyces cerevisiae*, Fyziologický ústav Akademie věd ČR a 1. Lékařská fakulta University Karlovy (dizertační práce).
- Mattison, C. P. a Ota, I. M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* 14, 1229-35.
- Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Serrano, R. a de Larrinoa, I. F. (2001). Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol Gen Genom* 265, 801-811.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A. a Pardo, J. M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 269, 8792-8796.
- Montero-Lomelí, M. a Facanha, A. L. O. (1999). Expression of a mammalian Na⁺/H⁺ antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Cell Biology* **77**, 25-31.
- Morris, G. J., Winters, L., Coulson, G. E. a Clarke, K. J. (1986). Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol 132, 2023-34.
- Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R. a 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.
- Mumberg, D., Muller, R. a Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-22.
- Munro, S. (2001). What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett* **498**, 223-227.
- Murguia, J. R., Belles, J. M. a Serrano, R. (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J Biol Chem* **271**, 29029-29033.

- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M. a Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**, 299-310.
- Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N. a Ariño, J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7357-62.
- Nakamura, T., Komano, Y., Itaya, E., Tsukamoto, K., Tsuchiya, T. a Unemoto, T. (1994). Cloning and sequencing of an Na⁺/H⁺ antiporter gene from the marine bacterium Vibrio alginolyticus. *Biochim Biophys Acta* **1190**, 465-8.
- Nakamura, T., Komano, Y. a Unemoto, T. (1995). Three aspartic residues in membrane-spanning regions of Na⁺/H⁺ antiporter from *Vibrio alginolyticus* play a role in the activity of the carrier. *Biochim Biophys Acta* **1230**, 170-6.
- Nass, R., Cunningham, K. W. a Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**, 26145-26152.
- Nass, R. a Rao, R. (1998). Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 273, 21054-21060.
- Nass, R. a Rao, R. (1999). The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **145**, 3221-3228.
- Nath, S. K., Hang, C. Y., Levine, S. A., Yun, C. H., Montrose, M. H., Donowitz, M. a Tse, C. M. (1996). Hyperosmolarity inhibits the Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE2 and NHE3: an effect opposite to that on NHE1. *Am J Physiol* 270, G431-41.
- Navarre, C., Catty, P., Leterme, S., Dietrich, F. a Goffeau, A. (1994). Two distinct genes encode small isoproteolipids affecting plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 21262-8.
- Navarre, C., Ghislain, M., Leterme, S., Ferroud, C., Dufour, J. P. a Goffeau, A. (1992). Purification and complete sequence of a small proteolipid associated with the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267, 6425-8.

- Navarre, C. a Goffeau, A. (2000). Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of *PMP3*, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *EMBO J* **19**, 2515-2524.
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M. a Hegemann, J. H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12, 773-86.
- Noël, J. a Pouyssegur, J. (1995). Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am J Physiol* **268**, C283-96.
- Noël, J., Roux, D. a Pouyssegur, J. (1996). Differential localization of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. *J Cell Sci* **109**, 929-39.
- Norbeck, J. a Blomberg, A. (1997). Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem* **272**, 5544-54.
- Numata, M. a Orlowski, J. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel $(Na^+,K^+)/H^+$ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem* **276**, 17387-17394.
- Numata, M., Petrecca, K., Lake, N. a Orlowski, J. (1998). Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **273**, 6951-6959.
- Oda, Y. a Tonomura, K. (1995). Electrophoretic karyotyping of the yeast genus Torulaspora. *Lett Appl Microbiol* **21**, 190-3.
- Odds, F. C. (1985). Morphogenesis in *Candida albicans. Crit. Rev. Microbiol.* 12, 45-93.
- Ohyama, T., Igarashi, K. a Kobayashi, H. (1994). Physiological role of the *chaA* gene in sodium and calcium circulations at a high pH in *Escherichia coli*. J Bacteriol **176**, 4311-5.
- Omura, F., Kodama, Y. a Ashikari, T. (2001). The basal turnover of yeast branchedchain amino acid permease Bap2p requires its C-terminal tail. *FEMS Microbiol Lett* **194**, 207-14.
- Onishi, H. (1963). Osmophilic Yeasts. Adv. Food Res. 12, 53-94.
- Orlowski, J. (1993). Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **268**, 16369-77.

- Orlowski, J. a Grinstein, S. (1997). Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* 272, 22373-6.
- Orlowski, J., Kandasamy, R. A. a Shull, G. E. (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**, 9331-9.
- O'Rourke, S. M. a Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways *in Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**, 2874-86.
- Özcan, S., Dover, J. a Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**, 2566-2573.
- Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpel, R. a Schuldiner, S. (1989). Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na⁺/H⁺ antiporter system(s). *J Biol Chem* 264, 20297-302.
- Pahlman, A. K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S. a Adler, L. (2001). The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* 276, 3555-63.
- Palmgren, M. G., Sommarin, M., Serrano, R. a Larsson, C. (1991). Identification of an anhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 266, 20470-20475.
- Paris, S. a Pouyssegur, J. (1983). Biochemical characterization of the amiloridesensitive Na⁺/H⁺ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 258, 3503-8.
- Patterson, T. E., Albrecht, E. B., Nurse, P., Sazer, S. a Stark, G. R. (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, 2199-208.
- Pattison-Granberg, J. a Persson, B. L. (2000). Regulation of cation-coupled highaffinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 182, 5017-9.

- Petrecca, K., Atanasiu, R., Grinstein, S., Orlowski, J. a Shrier, A. (1999). Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol* 276, H709-17.
- Pinner, E., Padan, E. a Schuldiner, S. (1992). Cloning, sequencing, and expression of the *nhaB* gene, encoding a Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267, 11064-8.
- Popping, B., Gibbons, T. a Watson, M. D. (1996). The *Pisum sativum* MAP kinase homologue (PsMAPK) rescues the *Saccharomyces cerevisiae hog1* deletion mutant under conditions of high osmotic stress. *Plant Mol Biol* **31**, 355-63.
- Portillo, F. (2000). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* **1469**, 31-42.
- Portillo, F., de-Larrinoa, I. F. a Serrano, R. (1989). Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Lett* **247**, 381-385.
- Portillo, F., Eraso, P. a Serrano, R. (1991). Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett* **287**, 71-4.
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E. a Ariño, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275, 17249-55.
- Posas, F., Takekawa, M. a Saito, H. (1998). Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Currt Opin Microbiol* **1**, 175-182.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C. a Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86, 865-875.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J. L. a Sychrová, H. (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett 387, 89-93.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Ariño, J., Serrano, R. a Posas, F. (2001). Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* 20, 1123-1133.

- Proft, M. a Serrano, R. (1999). Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* 19, 537-46.
- Quintero, F. J., Blatt, M. R. a Pardo, J. M. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett* **471**, 224-228.
- Rahav Manor, O., Carmel, O., Karpel, R., Taglicht, D., Glaser, G., Schuldiner, S. a Padan, E. (1992). NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR), regulates *nhaA*, the sodium proton antiporter gene in *Escherichia coli*. J Biol Chem 267, 10433-8.
- Raitt, D. C., Posas, F. a Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J* 19, 4623-31.
- Ramírez, J., Peña, A. a Montero-Lomelí, M. (1996). H⁺/K⁺ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1285**, 175-182.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R. a Rodríguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a lowaffinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 176, 249-52.
- Ramos, J., Contreras, P. a Rodríguez-Navarro, A. (1985). A potassium transport mutant of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol 143, 88-93.
- Ramos, J. a Rodríguez-Navarro, A. (1986). Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur J Biochem* 154, 307-11.
- Rao, R., Drummond-Barbosa, D. a Slayman, C. W. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast *PMA1* gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* 9, 1075-84.
- Reid, J. D., Lukas, W., Shafaatian, R., Bertl, A., Scheurmann-Kettner, C., Guy, H. R. a North, R. A. (1996). The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains. *Receptors Channels* 4, 51-62.
- Reiser, V., Ruis, H. a Ammerer, G. (1999). Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogenactivated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 1147-1161.

- Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J. M., Prior, B. A. a Hohmann, S. (1999a). Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145, 715-727.
- Rep, M., Proft, M., Remize, F., Tamás, M., Serrano, R., Thevelein, J. M. a Hohmann, S. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* 40, 1067-83.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G. a Ruis, H. (1999b). Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol* **19**, 5474-85.
- Rimon, A., Gerchman, Y., Kariv, Z. a Padan, E. (1998). A point mutation (G338S) and its suppressor mutations affect both the pH response of the NhaA Na⁺/H⁺- antiporter as well as the growth phenotype of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273, 26470-6.
- Ríos, G., Ferrando, A. a Serrano, R. (1997). Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the *HAL1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 515-528.
- Ritter, M., Fuerst, J., Woll, E., Chwatal, S., Gschwentner, M., Lang, F., Deetjen, P. a Paulmichl, M. (2001). Na⁺/H⁺ exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell function. *Cell Physiol Biochem* **11**, 1-18.
- Roberts, S. K., Fischer, M., Dixon, G. K. a Sanders, D. (1999). Divalent cation block of inward currents and low-affinity K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. J *Bacteriol* 181, 291-7.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A. a Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**, 940-945.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. a Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. a Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

- Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* **156**, 11-4.
- Serrano, R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim Biophys Acta* 947, 1-28.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **165**, 1-52.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. a Fink, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(Na^+ + K^+)$, K^+ and Ca^{2+} -ATPases. *Nature* **319**, 689-93.
- Serrano, R., Márquez, J. A. a Ríos, G. (1997). Crucial Factors in Salt Stress Tolerance in Hohmann, S. and Marger, W. H. (Eds), *Yeast Stress Responses*, Springer, pp. 147-169.
- Serrano, R. a Rodríguez-Navarro, A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 399-404.
- Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N. a Goldstein, S. A. N. (2001). Immunity to K1 killer toxin: Internal TOK1 blockade. *Cell* 105, 637-644.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. a Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6896-6901.
- Schep, L. J., Jones, D. S. a Shepherd, M. G. (1995). Primary interactions of three quaternary ammonium compounds with blastospores of *Candida albicans* (MEN strain). *Pharm. Res.* 12, 649-52.
- Schlesser, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M. a Goffeau, A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**, 19480-7.
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. a Ruis, H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae CTT1* gene. *EMBO J* 13, 4382-9.
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., Riddle, T. M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Wang, T., Giebisch, G., Aronson, P. S., Lorenz, J. N. a Shull, G. E. (1998). Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 19, 282-5.

- Sikorski, R. S. a Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Silve, S., Volland, C., Garnier, C., Jund, R., Chevallier, M. R. a Haguenauer-Tsapis, R. (1991). Membrane insertion of uracil permease, a polytopic yeast plasma membrane protein. *Mol Cell Biol* 11, 1114-24.
- Simón, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J. a Ariño, 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.
- Singer, M. A. a Lindquist, S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* **16**, 460-468.
- Siniossoglou, S., Hurt, E. C. a Pelham, H. R. (2000). Psr1p/Psr2p, two plasma membrane phosphatases with an essential DXDX(T/V) motif required for sodium stress response in yeast. *J Biol Chem* 275, 19352-60.
- Soleimani, M., Bookstein, C., McAteer, J. A., Hattabaugh, Y. J., Bizal, G. L., Musch, M. W., Villereal, M., Rao, M. C., Howard, R. L. a Chang, E. B. (1994a). Effect of high osmolality on Na⁺/H⁺ exchange in renal proximal tubule cells. *J Biol Chem* 269, 15613-8.
- Soleimani, M., Singh, G., Bizal, G. L., Gullans, S. R. a McAteer, J. A. (1994b). Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medullary collecting duct cells. Expression, functional localization, and differential regulation. J Biol Chem 269, 27973-8.
- Soni, R., Carmichael, J. P. a Murray, J. A. (1993). Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. *Curr Genet* 24, 455-9.
- Soong, T. W., Yong, T. F., Ramanan, N. a Wang, Y. (2000). The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na⁺ and H⁺ transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiology* **146**, 1035-1044.
- Stanbrough, M. a Magasanik, B. (1995). Trancriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 177, 94-102.
- Stark, M. J. (1996). Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12, 1647-75.

- Stevens, T. H. a Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 779-808.
- Supply, P., Wach, A. a Goffeau, A. (1993). Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H⁺-ATPase of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 268, 19753-9.
- Sychrová, H. a Chevallier, M. R. (1993). Cloning and sequencing of the Saccharomyces cerevisiae gene LYP1 coding for a lysine-specific permease. Yeast 9, 771-82.
- Sychrová, H., Ramírez, J. a Peña, A. (1999). Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Lett. 171, 167-172.
- Szabo, E. Z., Numata, M., Shull, G. E. a Orlowski, J. (2000). Kinetic and pharmacological properties of human brain Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 275, 6302-7.
- Szaszi, K., Grinstein, S., Orlowski, J. a Kapus, A. (2000). Regulation of the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform by the cytoskeleton. *Cell Physiol Biochem* **10**, 265-272.
- Taglicht, D., Padan, E. a Schuldiner, S. (1991). Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by nhaA (ant) from *Escherichia coli*. J *Biol Chem* 266, 11289-94.
- Tamás, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C. W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B. A., Killan, S. G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J. M. a Hohmann, S. (1999). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* 31, 1087-1104.
- Tamás, M. J., Rep, M., Thevelein, J. M. a Hohmann, S. (2000). Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett* 472, 159-165.
- Tang, W., Ruknudin, A., Yang, W. P., Shaw, S. Y., Knickerbocker, A. a Kurtz, S. (1995). Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K⁺ channel in yeast. *Mol Biol Cell* 6, 1231-40.

- Torok, T., Rockhold, D. a King, A. D., Jr. (1993). Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *Int J Food Microbiol* **19**, 63-80.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 67, 509-44.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.
 P., Nakamura, T. a Schröeder, J. I. (2000). The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 122, 1249-1259.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. a Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743-54.
- Van Belle, D. a Andre, B. (2001). A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 389-98.
- Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M. C., Ammerer, G., Ruis, H. a Mager, W. H. (2000). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol* 37, 382-97.
- Venema, K. a Palmgren, M. G. (1995). Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* **270**, 19659-67.
- Venturi, M., Rimon, A., Gerchman, Y., Hunte, C., Padan, E. a Michel, H. (2000). The monoclonal antibody 1F6 identifies a pH-dependent conformational change in the hydrophilic NH(2) terminus of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli. J Biol Chem* 275, 4734-42.
- Wagner, R., Straub, M. L., Souciet, J. L., Potier, S. a de Montigny, J. (2001). New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine- cytosine permease affinity mutants. *J Bacteriol* 183, 4386-8.
- Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet, C. a Pouyssegur, J. (1992). The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2424-2428.
- Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X. a Shigekawa, M. (2000). A novel topology model of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *J Biol Chem* **275**, 7942-9.
- Wakabayashi, S., Shigekawa, M. a Pouyssegur, J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* **77**, 51-74.

- Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. a Rothstein, R. (1989). A hyperrecombination mutation in *Saccharomyces cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58, 409-19.
- Watanabe, Y., Iwaki, T., Shimono, Y., Ichimiya, A., Nagaoka, Y. a Tamai, Y. (1999). Characterization of the Na⁺-ATPase gene (*ZENA1*) from the salttolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng* 88, 136-142.
- Watanabe, Y., Miwa, S. a Tamai, Y. (1995). Characterization of Na⁺/H⁺ antiporter gene closely related to the salt -tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* 11, 829-838.
- Welihinda, A. A., Beavis, A. D. a Trumbly, R. J. (1994). Mutations in *LIS1 (ERG6)* gene confer increased sodium and lithium uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1193**, 107-17.
- Wiebe, C. A., Dibattista, E. R. a Fliegel, L. (2001). Functional role of polar amino acid residues in Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochem J* **357**, 1-10.
- Wieland, J., Nitsche, A. M., Strayle, J., Steiner, H. a Rudolph, H. K. (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14, 3870-82.
- Williams, K. A. (2000). Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* **403**, 112-5.
- Williams, K. A., Geldmacher-Kaufer, U., Padan, E., Schuldiner, S. a Kuhlbrandt, W. (1999). Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 A resolution. *EMBO J* 18, 3558-63.
- Wright, M. B., Ramos, J., Gomez, M. J., Moulder, K., Scherrer, M., Munson, G. a Gaber, R. F. (1997). Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272, 13647-52.
- Yale, J. a Bohnert, H. J. (2001). Transcript expression in Saccharomyces cerevisiae at high salinity. J Biol Chem 276, 15996-16007.
- Yamaguchi, T., FukadaTanaka, S., Inagaki, Y., Saito, N., YonekuraSakakibara, K., Tanaka, Y., Kusumi, T. a Iida, S. (2001). Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol* 42, 451-461.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. a Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19.

- Yocum, R. R., Hanley, S., West, R., Jr. a Ptashne, M. (1984). Use of *lacZ* fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**, 1985-98.
- Zhang, B. Y., Chang, A., Kjeldsen, T. B. a Arvan, P. (2001). Intracellular retention of newly synthesized insulin in yeast is caused by endoproteolytic processing in the golgi complex. *J Cell Biol* 153, 1187-1197.
- Zhou, F. X., Cocco, M. J., Russ, W. P., Brunger, A. T. a Engelman, D. M. (2000). Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol* 7, 154-60.
- Zhou, X.-L., Vaillant, B., Loukin, S. H., Kung, C. a Saimi, M. (1995). YKC1 encodes the depolarization-activated K⁺ channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett* **373**, 170-176.
- Zhu, J. K., Liu, J. a Xiong, L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10, 1181-91.

8 Résumé de la thèse de Doctorat en co-tutelle

1 Introduction

Le maintien d'ions à des concentrations intracellulaires constantes est essentiel à la survie des cellules. Les principaux cations concernés sont le potassium (K^+), qui est indispensable au bon fonctionnement des levures, ainsi que le sodium (Na^+) et le lithium (Li^+) qui sont toxiques lorsqu'ils sont présents en concentration trop importante dans la cellule.

En effet, le potassium est indispensable à de nombreuses fonctions physiologiques et intervient dans le maintien de la pression osmotique. Ce cation ne présente pas de toxicité pour la cellule mais sa concentration doit être limitée afin que la pression osmotique intracellulaire soit compatible avec le bon fonctionnement de la cellule. Par contre, les ions Na⁺ et Li⁺ sont toxiques pour la plupart des levures. Les seuils de tolérance aux ions toxiques et à la pression osmotique sont très variables d'une souche de levure à une autre.

Le maintien de la concentration intracellulaire de ces ions compatible avec le fonctionnement cellulaire est assurée chez les levures par des mécanismes actifs ayant pour fonction de transporter les cations monovalents. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, K^+ , Na⁺ et Li⁺ sont exportés par les mêmes systèmes de transport (Bañuelos *et al.*, 1998). Le système le plus efficace, et en particulier à pH voisin de la neutralité, est constitué d'ATPases codées par les gènes *ENA1-4*. La dégradation de l'ATP fournit dans ce cas l'énergie nécessaire au transport. Par ailleurs, il existe un antiporteur codé par le gène *NHA1* qui fonctionne à pH acide parce qu'il utilise le flux entrant de protons (H⁺) pour assurer l'efflux de cations. L'expression du gène *NHA1* (YLR138w) est constitutive et faible. Il code pour une protéine de 985 aminoacides localisée dans la membrane plasmique. Enfin il faut noter que des travaux antérieurs effectués au laboratoire suggèrent que le transporteur Nha1p aurait des fonctions plus générales dans la cellule et il participerait en particulier à la régulation du pH intracellulaire (Sychrová *et al.*, 1999).

Sur le plan de la structure, Nha1p possède une extrémité N-terminale courte, un domaine intermédiaire hydrophobe formé de 12 segments transmembranaires et un domaine C-terminal hydrophile probablement à localisation intracellulaire. La structure a été comparée aux produits de gènes orthologues des levures *Schizosaccharomyces pombe* (Jia *et al.*, 1992) et *Zygosaccharomyces rouxii* (Iwaki *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1995) les 2 seuls connus au début de ce travail, ainsi qu'à celui trouvé plus récemment de *Candida albicans* (Soong *et al.*, 2000). Le degré de similarité entre les protéines est important dans les parties N-terminales et intermédiaires tandis que le segment C-terminal présente des différences notables: chez *Saccharomyces cerevisiae*, il est exceptionnellement long (554 aa, 56,2 % de la protéine total) en comparaison des autres levures. Par ailleurs, les antiporteurs des autres levures avaient été décrits comme étant uniquement des transporteurs à Na⁺ et Li⁺. Ceci semblait donc suggérer un rôle particulier pour ce long domaine hydrophile de Nha1p: rôle dans le transport de plusieurs cations, dans la réponse au stress osmotique ou encore dans la régulation du pH intracellulaire. C'est ce que nous nous sommes attaché à tester au cours de ce travail.

2 Résultats

2.1 Etude fonctionnelle du domaine C-terminal de la protéine Nha1p de *Saccharomyces cerevisiae*

Une série de délétions de la partie codant le domaine C-terminal du gène *NHA1* a été construite par PCR. Nous disposions ainsi de 13 allèles allant du gène complet (2955 nt, 985 aa) jusqu'à la version la plus courte (1416 nt, 472 aa) ne comprenant que 41 aminoacides après le dernier domaine transmembranaire. Les versions délétées ont été clonées derrière le promoteur de *NHA1* (faible et constitutif) dans un plasmide épisomique à nombre de copie élevé (YEp352). Les plasmides portant les différentes versions du gène *NHA1* ont été introduits dans la souche B31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ) de *S. cerevisiae* dont les gènes chromosomiques, *ENA1-4* codant pour des ATPases à Na⁺ et le gène *NHA1*, ont été délétés. Cette souche est donc très sensible aux métaux alcalins.

2. 1. 1 Le domaine C-terminal de la protéine Nha1p n'est pas important pour sa localisation dans la cellule

Nous avons d'abord vérifié que le raccourcissement de la protéine n'avait pas d'effet sur sa localisation membranaire à l'aide de techniques de marquage à la GFP (green fluorescent protein (Niedenthal *et al.*, 1996)). Le gène codant pour la protéine GFP a été fusionné dans les domaines C-terminaux de la version complète (985 aa) de la protéine Nha1p et de la plus courte (472 aa). L'observation des deux protéines marquées par microscopie fluorescente et confocale a montré alors que les protéines étaient localisées dans la membrane plasmique de la cellule. Ces résultats démontrent donc que le domaine C-terminal de la protéine Nha1p n'est pas impliqué dans la localisation subcellulaire de la protéine.

2. 1. 2 Rôles du domaine C-terminal dans la spécificité de substrat et dans l'activité de la protéine Nha1p

La tolérance aux cations Na⁺, Li⁺, Rb⁺ et K⁺ des cellules portant les différentes délétions de Nha1p a été testée sur milieu de culture solide à différent pH. Le Rb⁺ (rubidium) a été identifié comme le quatrième substrat de Nha1p. De même, la cinétique d'efflux des cations a été mesurée. L'ensemble des résultats démontre que le domaine C-terminal de Nha1p contient des régions importantes impliquées dans la tolérance au sodium, lithium et rubidium. En effet, la délétion des 70 derniers acides aminés faisant passer la protéine de 985 à 915 aa améliore la tolérance aux 3 cations. Par contre, une délétion plus importante (Nha1p longue 883–472 aa) diminue la tolérance à ces cations. Par ailleurs, pratiquement aucun effet sur la tolérance au Li⁺ n'a été noté en présence de la version de Nha1p la plus courte (472 aa). L'activité maximale du transport de ces 2 ions semble liée à la région de Nha1p située entre les aa 883 et 928, région riche en résidus acides.

Dans le cas du quatrième substrat de Nha1p, K⁺, le raccourcissement progressif du domaine C-terminal n'a aucun effet sur le niveau de tolérance ni sur la vitesse initiale de transport suggérant fortement que ce domaine ne joue pas de rôle dans le transport de potassium. Par contre, ce domaine joue un rôle dans la régulation de la concentration intracellulaire du potassium. En effet, les cellules contenant la version la plus courte de Nha1p (472 aa) entièrement dépourvue du domaine C- terminal ont un niveau de K⁺ intracellulaire à celui des cellules possédant la protéine native (985 aa).

2. 1. 3 Rôles de Nha1p et de son domaine C-terminal dans la réponse de la cellule au changement du pH intracellulaire et dans la réponse au choc osmotique

L'antiporteur Nha1p a la capacité dans des conditions de brusque alcalinisation intracellulaire de fonctionner à l'envers de sa fonction classique et d'exporter massivement les ions K^+ . Ceci a pour conséquence de provoquer une entrée équivalente de protons et donc de baisser le pH intracellulaire afin de le ramener à une valeur physiologique (Bañuelos et al., 1998). Dans ce cas, Nha1p joue un rôle que nous avons nommé " valve de sécurité " étant capable de réguler rapidement le pH intracellulaire quitte à subir une perte important de K⁺.

Les résultats montrent que la réponse des cellules possédant la version la plus courte de Nha1p est moins efficace à réguler son pH intracellulaire que celle des cellules sauvages. Quoi qu'il en soit, les deux types de cellules survivent à ce stress ce qui suggère que la perte du domaine C-terminal n'affecte pas significativement la fonction de " valve de sécurité ".

Les expériences précédentes ont montré que l'élimination du domaine Cterminal de Nha1p influence le niveau de potassium intracellulaire qui est un composant supposé impliqué dans la réponse de la cellule à un choc osmotique. Nous avons donc étudié la possible participation de Nha1p à la réponse des cellules à un choc osmotique qui se décompose en une phase précoce de quelques minutes puis une phase plus tardive de plusieurs heures. Les levures contenant Nha1p complète (985 aa) ou Nha1p raccourcie (472 aa) ont été cultivées dans des conditions classiques puis exposées à une concentration de sorbitol suffisante pour provoquer un choc osmotique. Les expériences ont été réalisées en milieu liquide et en milieu solide. Dans toutes les conditions, la survie et la croissance de cellules après le choc ont été testées. Les cellules contenant Nha1p dépourvu du domaine C-terminal (472 aa) sont significativement plus affectées que les cellules renfermant la forme native de Nha1p (985 aa) lors la phase précoce de la réponse. Ces résultats montrent l'importance du domaine C-terminal lors de la réponse précoce au stress osmotique. La phase tardive par contre ne semble pas affectée.

2. 2 Comparaison des propriétés de transport des différents antiporteurs de levures

Pour caractériser les propriétés des antiporteurs homologues à Nha1p, nous avons recloné les gènes orthologues de *S. pombe (sod2), Z. rouxii (ZrSOD2-22)* et *C. albicans (CNH1)* par des techniques de PCR. Les gènes ont été mis sous le contrôle du promoteur *NHA1* dans le plasmide YEp352. Les plasmides ont alors été introduits dans la souche de *S. cerevisiae* B31 (*ena1-4, nha1*) décrite précédemment et les propriétés de transport des différents antiporteurs (spécificité de substrat et activité) ont été testées ainsi que leurs effets sur la tolérance des cellules aux sels.

2. 2. 1 Spécificité de substrat et activité des antiporteurs Na⁺/H⁺ homologues de levures

La spécificité de substrat a d'abord été établie par culture sur des milieux sélectifs contenant des quantités croissantes des différents ions et dans différentes conditions de pH. L'activité des antiporteurs était examinée par mesure d'efflux des cations métaux alcalins. Pour la détermination de la contribution des différents antiporteurs à la tolérance aux sels des cellules, la croissance des cellules en milieu liquide additionné de NaCl et la concentration intracellulaire de cations étaient suivies.

L'antiporteur ZrSod2-22 de la levure Z. rouxii a la plus grande capacité de transport de sodium et du lithium, mais, comme l'antiporteur sod2 de S. pombe, ne reconnaît ni K⁺ ni Rb⁺ comme étant un de ses substrats. Seul l'antiporteur Cnh1p de C. albicans présentait comme Nha1p de S. cerevisiae une large spécificité de substrat et transportait les quatre métaux alcalins (Na⁺, Li⁺, K⁺ et Rb⁺). Par contre, il est moins efficace dans la tolérance globale des cellules aux fortes concentrations externes de cations toxiques (Na⁺ et Li⁺) que les antiporteurs de S. pombe et de Z. rouxii.

2. 1. 2 L'antiporteur Cnh1p de *C. albicans* est impliqué dans la réponse de la cellule au changement du pH intracellulaire

Comme l'antiporteur Cnh1p de *C. albicans* est capable de transporter le potassium comme Nha1p, nous avons testé son rôle dans la réponse de la cellule à l'alcalinisation du milieu intracellulaire et obtenu des résultats comparables: l'antiporteur Cnh1p exprimé chez *S. cerevisiae*, tout comme l'antiporteur Nha1p, est capable d'exporter les ions K^+ en réponse à l'augmentation de pH cytosolique. Les résultats suggèrent que Cnh1p est peut être aussi impliqué dans la régulation de pH intracellulaire et dans le maintien de la concentration de potassium dans les cellules de *C. albicans*.

3 Conclusions

Ce travail contribue à la caractérisation des propriétés des antiporteurs Na^+/H^+ identifiés jusqu'à présent dans différents levures. Sur la base des résultats obtenus et, en dépit de la grande similarité entre les séquences des protéines, la famille des antiporteurs Na^+/H^+ de la membrane plasmique des levures peut être divisée, en considérant à la fois la spécificité de substrat et probablement la fonction cellulaire, en deux sous-familles distinctes: (1) la sous-famille d'antiporteurs spécifique des ions Na^+ et Li⁺ uniquement (antiporteurs de *S. pombe* et *Z. rouxii*) et ayant pour fonction primaire la détoxication de la cellule, et (2) la sous-famille d'antiporteurs (*S. cerevisiae, C. albicans*) effectuant le transport de tous les cations métalliques alcalins qui, en plus de l'élimination des cations toxiques, joue probablement un rôle dans d'autres fonctions cellulaires comme la régulation de la concentration intracellulaire de K⁺, du pH interne, du volume cellulaire et la réponse précoce au choc osmotique.

Enfin, cette étude démontre le rôle spécifique du domaine C-terminal de Nha1p qui pourrait entrer en interaction avec d'autres facteurs cellulaires permettant ainsi de transmettre des signaux nécessaires aux différents processus. Cette observation ouvre la perspective d'identifier ces éventuels facteurs par une approche de type double-hybride en utilisant comme appât le long domaine C-terminal de Nha1p.

4 Références

- Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., and Potier, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144: 2749-2758.
- Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y., and Watanabe, Y. (1998) Characterization of a second gene (ZSOD22) of Na⁺/H⁺ antiporter from salt-tolerant yeast Zygosaccharomyces rouxii and functional expression of ZSOD2 and ZSOD22 in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 14: 1167-1174.
- Jia, Z.-P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S., and Young, P.G. (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J.* **11**: 1631-1640.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., and Hegemann, J.H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12: 773-786.
- Soong, T.W., Yong, T.F., Ramanan, N., and Wang, Y. (2000) The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na⁺ and H⁺ transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1035-1044.
- Sychrová, H., Ramírez, J., and Peña, A. (1999) Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Lett. 171: 167-172.
- Watanabe, Y., Miwa, S., and Tamai, Y. (1995) Characterization of Na⁺/H⁺ antiporter gene closely related to the salt -tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **11**: 829-838.