

## Abstrakt

Jedním z klíčových předpokladů pro dělení kvasinkových buněk je příjem základních živin a iontů, jako je draslík. Draslík je důležitý, monovalentní kation a jeho dostatečná intracelulární koncentrace je rozhodující pro různé procesy, například regulaci membránového potenciálu a buněčného turgoru, enzymatickou aktivitu a syntézu proteinů. Dostatečná vnitřní koncentrace draslíku je také jedním z klíčových signálů pro buněčné dělení. Nicméně protože také přebytek draslíku může vést k nepříznivým fyziologickým důsledkům v kvasinkách, jako jsou deacidifikace vakuol a depolarizace plazmatické membrány, je pro kvasinkové buňky nezbytné, aby celý proces získávání draslíku byl přísně regulován, aby se udržela jeho správná homeostáze. V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* je za klíčového hráče v příjmu draslíku považován uniportér Trk1. Cílem předkládané disertační práce bylo získat nové poznatky týkající se proteinu Trk1, konkrétněji studovat jeho schopnost modifikovat vlastní kapacitu pro příjem draslíku, regulaci pomocí fosforylace a také zapojení do přežití buněčné smrti vyvolané glukózou (GICD). Dále byly také charakterizovány systémy příjmu draslíku u vybraných nekonvenčních, kvasinkových druhů.

Nejvýraznějším rysem Trk1 je jeho schopnost přepínat mezi dvěma afinitními stavy, nízko- a vysoce-afinitní stav, jako reakce na změny vnější koncentrace draslíku. V naší práci jsme provedli podrobnou charakterizaci procesu "afinitního přepínání" a zjistili jsme, že spíše, než přepínání mezi dvěma stavy byl Trk1 schopen přesně upravit jak svou afinitu, tak maximální rychlost transportu v závislosti od dostupnosti draslíku. Kromě toho jsme také identifikovali nové signály, které pravděpodobně řídí výše uvedené změny v kapacitě transportu zprostředkovaném proteinem Trk1: vnitřní obsah draslíku a membránový potenciál. Naše výsledky také naznačily zapojení specifických subdomén Trk1, P-helixů, do procesů modifikace afinity proteinu Trk1.

Navzdory nepostradatelné roli proteinu Trk1 ve fyziologii kvasinek, existuje značný nedostatek detailních znalostí o jeho regulaci. Již dříve bylo prokázáno, že transportér Trk1 je exprimován na nízké úrovni bez ohledu na vnější podmínky, a proto se předpokládá, že jeho regulace probíhá na post translační úrovni, zejména ve formě fosforylace. V naší práci jsme identifikovali dvě nová potenciální fosforylační místa: Ser882 a Thr900, obě lokalizované rámci vysoce konzervované, intracelulární subdomény proteinu Trk1. Kromě toho bylo také studováno zapojení malých, regulačních proteinů 14-3-3 do regulace aktivity Trk1, stejně tak jako jejich specifická vazebná místa v rámci sekvence proteinu Trk1.

Kromě proteinu Trk1, genom *S. cerevisiae* také kóduje druhý Trk-transportér a paralog Trk1, Trk2. Navzdory vysokému stupni homologie mezi těmito dvěma transportéry je role Trk2 v příjmu draslíku považována za okrajovou a jeho přesná fyziologická role zůstává nejasná. Studium role Trk-transportérů v souvislosti s GICD jsme zjistili, že Trk1 i Trk2 byli důležité pro přežití GICD, přičemž hlavní roli plnil právě transportér Trk2. Navíc bylo také pozorováno funkční spojení mezi Trk2 a H<sup>+</sup>-ATPázou Pma1. Tyto výsledky poukázali na potenciální, nové fyziologické role transportéru Trk2.

Již několikrát bylo prokázáno, že dostatečný příjem draslíku a také zlepšená funkce transportéru Trk1, vede ke zlepšení přežití a výkonnosti kvasinek během biotechnologické produkce. Je proto velmi žádoucí studovat procesy získávání draslíku a draslíkové homeostázy také u biotechnologicky významných, často nekonvenčních druhů. V naší práci jsme se proto zabývali také základní charakterizací dvou systémů importu draslíku u druhu *Kluyveromyces marxianus*: Trk1 a Hak1. Zjistili jsme, že Hak1 je hlavním přenašečem při nízkých vnějších koncentracích draslíku a Trk1 pravděpodobně funguje za podmínky, kdy externí koncentrace draslíku není omezující. Dále byl také studován individuální přínos obou transportérů k přežití různých typů externích stresů.

Celkově vzato, prezentovaná práce poskytuje nové znalosti týkající se transportéru Trk1, a to jeho schopnosti reagovat na změny v dostupnosti substrátu změnou celkové kapacity pro příjem draslíku a také možností regulace pomocí fosforylací a asociací s proteiny 14-3-3. Prezentované výsledky také poukazují na nové, dříve necharakterizované fyziologické role transportéru Trk2. Kromě toho byly systémy příjmu draslíku studovány také u nekonvenčního, biotechnologicky relevantního druhu *K. marxianus*.

**Klíčová slova:** *Saccharomyces cerevisiae*, draslíková homeostáza, Trk1, Trk2, regulace, afinita, fosforylace, 14-3-3 proteiny, *Kluyveromyces marxianus*, Hak1