



Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Molekulární a buněčná biologie,
genetika a virologie



**Úloha transportních systémů pro draselné
kationty ve fyziologii kvasinky**
Saccharomyces cerevisiae

Disertační práce

Mgr. Lydie Marešová

školitelka:
RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha 2005

Předkládaná disertační práce byla vypracována v letech 2001-2005 v Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v rámci grantových projektů GA AV ČR A5011005/00 a IAA5011407 a dále v rámci výzkumného Centra molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek LC 531.

Úvodem bych ráda poděkovala RNDr. Haně Sychrové, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotnou pomoc při vypracování této práce. Za příjemné pracovní prostředí děkuji všem kolegům z Oddělení membránového transportu a dalším pracovníkům Fyziologického ústavu. Ing. Olze Zimmermannové pak obzvlášť děkuji za pomoc při stanovení obsahu draslíku v buňkách a při transportních pokusech.

Hlávkově nadaci děkuji za sponzorský příspěvek, který mi umožnil účast na konferenci SMYTE na Azorských ostrovech v r. 2004.

Zvláštní poděkování za všestrannou podporu během celého studia patří především mým rodičům, ale i sourozencům a přátelům.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	Kvasinky a jejich význam pro člověka	8
2.2	Kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.3	Transportní systémy v buňkách	11
2.3.1	Mechanismy transportu	12
2.4	Transport alkalických kationtů	14
2.4.1	Transport přes plasmatickou membránu	14
2.4.2	Vnitrobuněčný transport	16
2.4.3	Využití <i>S. cerevisiae</i> pro studium Na ⁺ /H ⁺ antiporterů	17
2.4.3.1	Rozdíly mezi buňkou kvasničnou a buňkami vyšších eukaryot	18
2.4.4	Transportní systémy alkalických kationtů v <i>S. cerevisiae</i>	19
2.4.4.1	Vstup kationtů do buněk	20
2.4.4.2	Výstup kationtů z buněk	23
2.4.4.3	Vnitrobuněčné přenašeče	26
2.5	Transportní systém Kha1	27
2.5.1	Publikované fenotypy kmenů s delecí <i>kha1</i>	29
2.5.2	Lokalizace proteinu Kha1	31
2.5.3	Přehled mikroarrayových výsledků	31
2.5.4	Interakce proteinu Kha1	32
2.5.5	Homologní geny a proteiny v dalších organismech	32
2.5.5.1	Bakteriální homology	33
2.5.5.2	Kvasinkové homology	33
2.5.5.3	Další houbové organismy	35
2.5.5.4	Vyšší eukaryota	36
3	CÍL PRÁCE	37

4	MATERIÁL A METODY	38
4.1	Materiál	38
4.1.1	Kultivační média	38
4.1.2	Kmeny kvasinek	41
4.1.3	Kmen bakterií	43
4.1.4	Vektory	43
4.1.5	Oligonukleotidy	45
4.1.6	Roztoky a pufry	48
4.1.7	Enzymy a kity	49
4.1.7.1	Enzymy	49
4.1.7.2	Kity	49
4.1.8	Přístroje	50
4.1.9	Další pomůcky a materiál	51
4.2	Metody	52
4.2.1	Molekulárně-biologické metody	52
4.2.1.1	Transformace buněk <i>E. coli</i>	52
4.2.1.2	Izolace plasmidové DNA z bakterií	53
4.2.1.3	Restrikční štěpení, modifikace a ligace DNA	53
4.2.1.4	Purifikace a precipitace DNA	54
4.2.1.5	Elektroforetická analýza DNA	54
4.2.1.6	Izolace genomové DNA z kvasinek	55
4.2.1.7	Příprava plasmidů homologní rekombinací	55
4.2.1.8	Izolace plasmidové DNA z kvasinek	56
4.2.1.9	Transformace kvasinek	57
4.2.1.10	Polymerasová řetězcová reakce (PCR)	57
4.2.1.11	Příprava templátu pro „colony“ PCR	58
4.2.1.12	Sekvenování DNA a analýza sekvencí	58
4.2.2	Biochemické a biofyzikální metody	58
4.2.2.1	Měření transportu a stanovení koncentrace K^+ v buňkách kvasinek	58
4.2.2.2	Měření membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy diS-C ₃ (3)	59
4.2.3	Mikrobiologické a fyziologické metody	61
4.2.3.1	Uchovávání a kultivace buněk	61
4.2.3.2	Mikroskopie kvasinek	62
4.2.3.3	Růstové křivky	62
4.2.3.4	Charakterizace růstu buněk pomocí kapkových testů	62

5	PŘEHLED VÝSLEDKŮ.....	64
5.1	Hledání fenotypového projevu mutace <i>kha1Δ</i>	64
5.1.1	Srovnání dříve popsáných kmenů	64
5.1.2	Srovnání kmene BW31 a KKB 11c	66
5.1.3	Příprava plasmidů pro komplementaci delece <i>kha1</i>	68
5.1.4	Růst transformovaných kmenů	70
5.1.5	Srovnání širší série kmenů	72
5.1.5.1	Tolerance k solím	73
5.1.5.2	Asimilace zdrojů uhlíku	75
5.1.5.3	Růst na médiích se zvýšeným pH	77
5.1.6	Ověření delece genu <i>KHAI</i> pomocí PCR	78
5.2	Komplementace citlivosti ke zvýšenému pH	79
5.3	Příprava mutantních kmenů <i>kha1Δ</i> a <i>tok1-kha1Δ</i>	80
5.3.1	Delece genu <i>KHAI</i> nebo lokusu <i>TOK1-KHAI</i>	80
5.3.2	Odstranění deleční kazety	81
5.4	Potvrzení fenotypu delece <i>kha1</i>	82
5.5	Obsah a transport K^+	83
5.5.1	Obsah K^+ v buňkách	83
5.5.2	Výstup K^+ z buněk	84
5.6	Srovnání <i>Kha1p</i> s <i>Nhx1p</i>	87
5.6.1	Citlivost k hygromycinu B	87
5.6.2	Komplementace citlivosti k hygromycinu	89
5.7	Lokalizace proteinu <i>Kha1</i>	90
5.7.1	Expese <i>Kha1p</i> -GFP v kmeni 27061b	92
5.7.2	Kolokalizace s proteinem <i>Sec7</i>	92
5.7.2.1	Příprava kmenů TPR100 a TPR200	93
5.7.2.2	Fluorescenční mikroskopie dvojité značených buněk	94
5.7.3	Kolokalizace s dalšími značenými proteiny	97
5.7.4	Uzavření kolokalizačních pokusů	98
5.8	Regulace exprese genu <i>KHAI</i>	99
5.8.1	Příprava plasmidů pro expresi β -galaktosidasy	99
5.8.2	Indukce zvýšeným pH	99
5.8.3	Další podmínky indukce	100

5.9	Dvojité mutanty <i>gef1Δ kha1Δ</i>	104
5.10	Měření membránového potenciálu	110
5.10.1	Ověření relevance metody	110
5.10.2	Porovnání membránového potenciálu kmenů BW31, LMB 01 a LMB 02	113
5.10.3	Příprava mutantních kmenů <i>tok1Δ</i>	115
5.10.4	Vliv mutace <i>tok1Δ</i> na membránový potenciál kvasinek	117
5.10.4.1	Depolarizace kmenů s delecí <i>tok1</i>	117
5.10.4.2	Komplementace fenotypu delecce <i>tok1</i> genem <i>TOK1</i> v plasmidu	118
5.11	Komplementace mutace <i>kha1Δ</i> rostlinným proteinem <i>AtChx17</i>	122
5.11.1	Komplementace citlivosti ke zvýšenému pH média	123
5.11.2	Komplementace citlivosti k hygromycinu	124
5.11.3	Označení proteinu <i>AtChx17</i> GFP	124
5.11.3.1	Vložení genu <i>AtCHX17</i> do plasmidu pGRU1	124
5.11.3.2	Vložení genu <i>AtCHX17</i> do plasmidu pYEX	126
5.11.4	Lokalizace <i>AtChx17p</i> v <i>S. cerevisiae</i>	127
5.12	Příloha č. 1 – sekvence lokusu <i>TOK1 - KHA1</i>	129
5.13	Příloha č. 2 – publikace (Marešová a Sychrová, 2005)	130
5.14	Příloha č. 3 – rukopis (Marešová <i>et al.</i>, 2006)	131
5.15	Příloha č. 4 – rukopis (Marešová a Sychrová, 2006)	132
6	DISKUSE.....	133
6.1	Role proteinu <i>Kha1</i> v buňkách	133
6.1.1	Vysvětlení nesrovnalostí mezi dříve publikovanými výsledky a současnými znalostmi o proteinu <i>Kha1</i>	133
6.1.2	Potvrzené fenotypy mutantů <i>kha1Δ</i>	134
6.2	Vliv transportních proteinů pro K^+ na membránový potenciál buněk	137
6.2.1	Hyperpolarizace kmene <i>trk1Δ trk2Δ</i> při hladovění na draslík	137
6.2.2	Ostatní transportní systémy pro K^+	138
6.2.3	Depolarizace způsobená delecí <i>tok1</i>	140
6.3	Heterologní exprese rostlinného K^+/H^+ antiporteru v <i>S. cerevisiae</i>	141
7	SOUHRN	143
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	145
9	SEZNAM LITERATURY	147

1 Úvod

Předkládaná disertační práce byla vypracována v oddělení Membránového transportu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v letech 2001-2005. Zabývá se studiem transportních systémů pro draselné kationty v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, především dosud málo charakterizovanými proteiny Kha1 a Tok1.

Výsledky této práce byly průběžně prezentovány formou přednášek a plakátových sdělení na českých i mezinárodních vědeckých konferencích. Z výsledků práce vznikly tři publikace:

1. Marešová, L. a Sychrová, H. (2005) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**: 588-600.
2. Marešová, L., Urbánková, E., Gášková, D. a Sychrová, H. (2006) Measurements of plasma membrane potential changes in *S. cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *Biochim Biophys Acta*: odesláno do tisku.
3. Marešová L. a Sychrová H. (2006) *AtCHX17* complements the *kha1*Δ phenotypes in *S. cerevisiae*. *FEBS Letters*: připravováno do tisku.

2 Literární přehled

2.1 Kvasinky a jejich význam pro člověka

Kvasinky jsou jednobuněčné houby charakteristické značným rozšířením v nejrůznějších ekosystémech. V přírodě se běžně nacházejí na listech, květech a plodech rostlin, v půdě i ve vodě, ale také na povrchu těla a v zažívacím ústrojí živočichů, kde mohou žít symbioticky nebo jako parazité.

V historii lidské populace zaujímají kvasinky významné místo z ekonomického, sociálního i zdravotního hlediska. Jsou často popisovány jako nejstarší domestikované organismy, které jsou po tisíciletí využívány k produkci kvašených nápojů a kynutého pečiva.

Teprve objev mikroskopu koncem 17. století však umožnil odhalení mikroorganismů způsobujících kvasné procesy. V průběhu vývoje biologických věd se pak hromadily poznatky o kvasinkách nejen jako o původcích již dlouho známého kvašení v potravinářském průmyslu, ale postupně byla objevována i řada jejich dalších důležitých vlastností. V současné době jsou kvasinky využívány v mnoha biotechnologických procesech od výroby léků, vitaminů a enzymů přes testování cytotoxických účinků chemikálií až po čištění odpadních vod.

Kvasinky jsou zároveň neocenitelným nástrojem pro výzkum životních procesů v eukaryotických buňkách na molekulární úrovni. Mnohé děje probíhající v rostlinných a živočišných buňkách mají v kvasinkách své analogy. Pěstování kvasinek je přitom finančně a metodicky nenáročné, buňky se rychle množí a mohou růst na přesně definovaných syntetických médiích. Mezi nejstudovanější druhy patří *Saccharomyces cerevisiae* (množící se pučením) a *Schizosaccharomyces pombe* (množící se příčným dělením).

Za objevy v oblasti molekulární biologie kvasinek bylo v uděleno několik Nobelových cen: Už v roce 1907 bylo toto prestižní ocenění uděleno německému chemikovi Eduardu Buchnerovi, který dokázal, že alkoholové kvašení způsobují enzymy přítomné v kvasinkách a k tomuto procesu tedy nejsou potřeba živé buňky. V roce 2001 pak byla Nobelova cena udělena Lelandu H. Hartwellovi za stanovení role

genů CDC v buněčném cyklu *S. cerevisiae* a Siru Paulu Nurseovi za objev genu *cdc2* v *S. pombe* a později jeho homologu CDK1 v lidských buňkách.

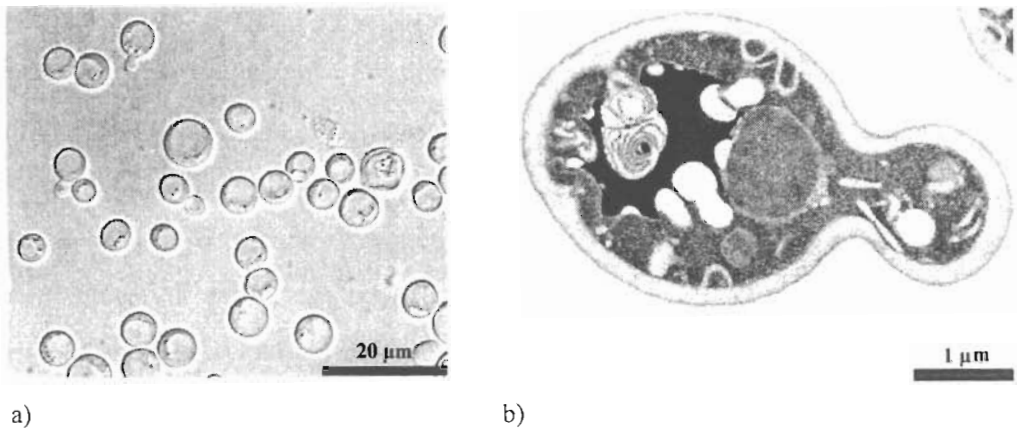
V budoucnu lze předpokládat ještě větší zapojení kvasinek do dalších průmyslových oblastí, jako je obnova zdrojů energie, environmentální biotechnologie a biodegradace odpadů.

Je ovšem nutno zmínit, že ne všechny kvasinky člověku poslušně slouží k dobrému. Některé druhy (např. z rodu *Zygosaccharomyces*) mohou způsobit kažení potravin i nápojů. Další kvasinky např. z rodů *Candida*, *Cryptococcus* a *Trichosporon* způsobují závažná kožní, slizniční i systémová onemocnění. Kvasinkové infekce jsou obzvláště nebezpečné pro jedince s oslabeným imunitním systémem, jako jsou například lidé trpící nemocí AIDS, pacienti léčení imunosupresivou nebo chemoterapií. Kromě základního výzkumu kvasinek jako modelových eukaryotických organismů probíhá tedy stále paralelně i výzkum lékařský s cílem efektivně a specificky hubit infekční druhy (Kelly *et al.*, 2005; Pfaller a Diekema, 2004).

2.2 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Mezi nejznámější a komerčně nejdůležitější kvasinky patří bezesporu druh *Saccharomyces cerevisiae*, řazený do řádu *Saccharomycetales*. Kromě již tradičního využití pro výrobu kynutého pečiva, krmných směsí, alkoholických nápojů a ethanolu pro chemický průmysl se tato kvasinka přibližně v sedmdesátých letech minulého století stala modelem pro výzkum v oblasti molekulární a buněčné biologie. Krátce po zavedení technik genového inženýrství začala být využívána pro produkci cizorodých proteinů, např. již v osmdesátých letech minulého století se uplatnila při výrobě vakcíny proti hepatitidě B (McAleer *et al.*, 1984). Následovalo mnoho dalších produktů, včetně lidských hormonů (insulin (Thim *et al.*, 1987), růstový hormon (Tokunaga *et al.*, 1985) aj.). V současné době se sice pro výrobu většího množství cizorodých proteinů používají častěji kvasinky rodu *Pichia*, které poskytují vyšší výtěžky (Werten *et al.*, 1999) a nezpůsobují nadměrnou glykosylaci produktu (Grinna a Tschopp, 1989), přesto má však kvasinka *S. cerevisiae* stále nezastupitelný význam i ve farmaceutickém průmyslu jako zdroj vitaminů skupiny B a beta-glukanů, které působí coby stimulatory imunitního systému (Hunter *et al.*, 2002), efektivně podporují onkologickou léčbu a zmírňují vedlejší příznaky chemoterapie a radioterapie (Hong *et al.*, 2004).

Kromě průmyslového využití představuje *S. cerevisiae* v současnosti jeden z nejdůležitějších a nejlépe charakterizovaných modelových organismů využívaných pro studium molekulární úrovně biologických procesů probíhajících v eukaryotických buňkách.



Obr. 2.1 Kvasinka *S. cerevisiae*

- a) populace buněk snímaná optikou Nomarského
- b) řez buňkou v elektronovém mikroskopu

Při volbě *S. cerevisiae* (obr. 2.1) jako modelového organismu hrála bezpochyby roli skutečnost, že tato kvasinka nepatří k patogenním druhům, což významně snižuje riziko infekce a potřebu bezpečnostních opatření při vědecké práci.

Na rozdíl od většiny mikroorganismů mají kmeny *S. cerevisiae* stabilní haploidní i diploidní stádium a přechod mezi těmito stádii je poměrně snadno regulovatelný (Kassir a Simchen, 1976). Bez velkých obtíží mohou být tedy izolovány například kmeny s recesivními mutacemi, jejichž fenotyp se projeví v haploidním stádiu a po křížení s kmenem nesoucím dominantní alelu se pak prokáže komplementace ve stádiu diploidním (Zimmermann *et al.*, 1969). Změnou kultivačních podmínek lze u diploidního stádia navodit meiotické dělení (sporulaci), při kterém vzniká tetráda – čtveřice haploidních spor v uzavřeném vřecku, umožňující analýzu segregace chromosomů tzv. tetradovou analýzou (Brenesponales *et al.*, 1956).

Díky rozvinutým technikám transformace buněk (Delorme, 1989; Gietz a Woods, 2002) je zároveň možné komplementovat nejrůznější mutace pomocí genů vnesených do *S. cerevisiae* „zvenku“. Do buněk mohou být vnášeny plasmidy buď jako samostatně se replikující kruhové molekuly DNA (Beggs, 1978) nebo jako konstrukty pro integraci

do genomu (Hill, 1989; Shortle *et al.*, 1982). Integrace DNA probíhá v *S. cerevisiae* téměř stoprocentně mechanismem homologní rekombinace (Aylon a Kupiec, 2004), takže exogenní DNA je možné integrovat do přesně určeného místa genomu, přičemž úseky homologní s cílovým lokusem nemusí být příliš dlouhé, obvykle stačí 30-45 nukleotidů (Manivasakam *et al.*, 1995).

Pro laboratorní potřeby byly připraveny kmeny *S. cerevisiae* s mnohonásobnými tzv. markerovými mutacemi (Wallis *et al.*, 1989), umožňující vícenásobnou transformaci plasmidy s různými selekčními znaky. V poslední době ovšem i u této kvasinky stoupá obliba plasmidů s tzv. dominantními selekčními znaky (nejčastěji rezistence k antibiotikům, např. geneticinu (Wach *et al.*, 1994)), které nevyžadují přítomnost recesivní mutace v transformovaných buňkách a umožňují i opakované použití téhož selekčního znaku (Güldener *et al.*, 1996).

O významu *S. cerevisiae* pro studium molekulární úrovně biologických procesů svědčí mimo jiné i skutečnost, že v roce 1996 se právě tato kvasinka stala prvním eukaryotickým organismem, jehož genom (o velikosti 12 068 kb) byl kompletně sekvenován (Goffeau *et al.*, 1996). Následovala příprava série kmenů s delecemi jednotlivých otevřených čtecích rámců (sbírka EUROSCARF) a studium příslušných fenotypových projevů, např. (Entian *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002), umožňující odhad přibližné fyziologické funkce dosud necharakterizovaných proteinů. Další projekty se zaměřily na postupné označení všech proteinů *S. cerevisiae* fluorescenčními markery za účelem stanovení jejich vnitrobuněčné lokalizace, např. (Habeler *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003; Kals *et al.*, 2005).

Dobře vypracované metody genového inženýrství v kombinaci s dostupností mnoha různých mutantních kmenů učinily z této kvasinky rovněž oblíbený hostitelský organismus pro studium heterologně exprimovaných proteinů z vyšších eukaryot (Sychrová, 2004).

2.3 Transportní systémy v buňkách

Schopnost buněk regulovat pohyb chemických látek a různých signálů přes buněčné membrány je jednou ze základních charakteristik živých organismů. Selektivní usměrnění přenosu látek, energie a informací je nutné pro zachování integrity buněk a organel.

Některé plyny a nenabitě organické molekuly mohou hydrofobními oblastmi fosfolipidových dvouvrstev membrán procházet samovolně tzv. nespecifickou permeací, tedy difundovat do buněk nebo z buněk do vyrovnání koncentrací. Většina transportních procesů přes buněčné membrány je však zprostředkovávána integrálními membránovými proteiny, které jsou někdy funkčně propojeny v komplexu s extracelulárními receptorovými proteiny a stejně tak s cytoplasmatickými proteiny s funkcí energetickou nebo signální (Saier, 2000). Protein nebo proteinový komplex umožňující průchod látek přes membránu bývá nazýván transportní systém, transportér nebo permeasa.

Permeasy jsou tedy proteiny katalyzující spíše přesun substrátu než jeho chemickou přeměnu. Přesto bývají často popisovány jako katalytické proteiny analogické enzymům a enzymovým komplexům. Podobně jako u enzymů hovoříme o substrátové specifitě, afinitě a konstantě saturace. Na rozdíl od rychlosti přeměny substrátu v produkt se ovšem u transportních systémů měří tzv. transportní aktivita, tj. rychlost přenosu substrátu z jedné strany membrány na druhou.

Transportní systémy se podílejí na mnoha biologických procesech v buňkách: umožňují přísun všech základních živin do cytoplasmy a následně do organel, napomáhají regulaci koncentrace metabolitů a exkreci konečných produktů metabolických drah z organel a z buněk ven, zprostředkovávají aktivní vylučování toxických látek z cytoplasmy. Dále se podílejí na udržování potřebné vnitrobuněčné koncentrace iontů, která se v mnoha případech radikálně liší od koncentrace těchto iontů ve vnějším prostředí. Zároveň je tak regulován i osmotický tlak uvnitř buňky, její objem a membránový potenciál. Integrální membránové proteiny hrají roli i v buněčné signalizaci, některé z nich pouze změnou konformace (ty se neřadí mezi transportní proteiny), jiné přenosem signálních molekul z buněk nebo do buněk. Z toho je vidět, že transportní mechanismy jsou nesmírně důležité prakticky pro všechny životní funkce buněk (Saier, 2000; Van Belle a André, 2001).

2.3.1 Mechanismy transportu

Transport substrátu přes membránu pomocí integrálních membránových proteinů může probíhat několika různými mechanismy (Horák *et al.*, 1984, schéma rozdělení transportních mechanismů je na obr. 2.2).

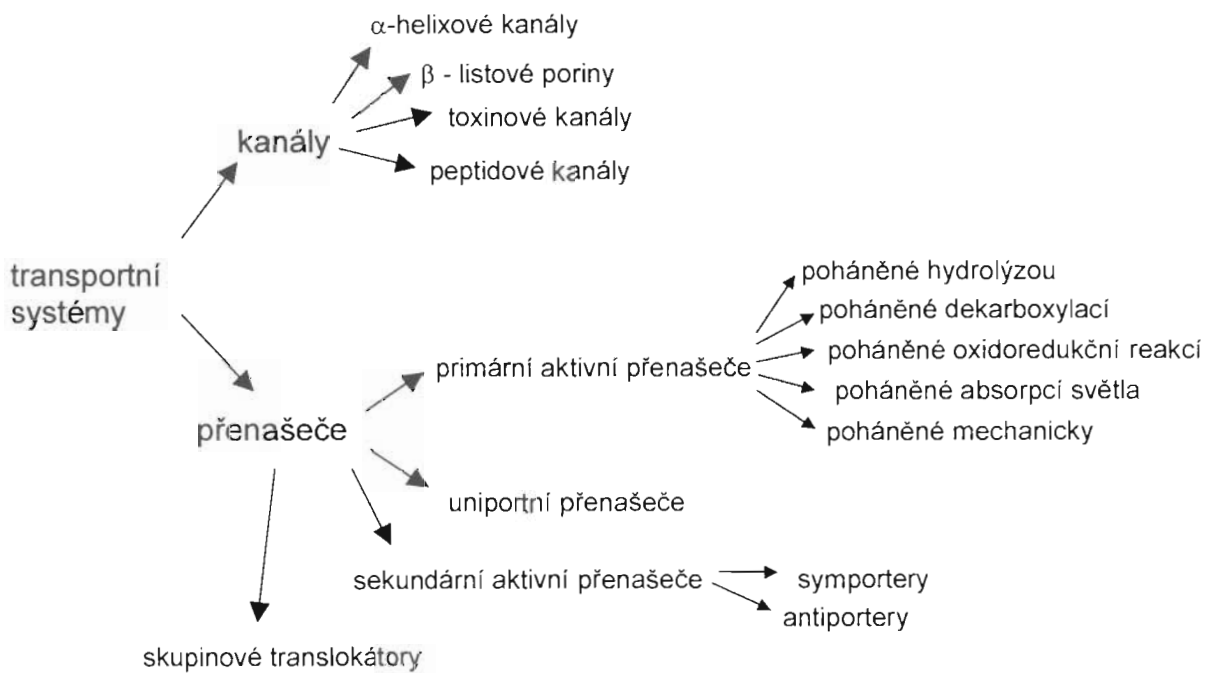
Prvním z nich je usnadněná difuze (Ebel, 1985). Není spojena se spotřebou energie, a proto nemůže být využita pro transport látek proti koncentračnímu spádu. Usnadněná difuze může probíhat přes tzv. selektivní kanály, například aquaporiny pro molekuly vody (Bonhivers *et al.*, 1998), nebo pomocí tzv. uniportních přenašečů. Tímto mechanismem probíhá například transport glukosy do buněk kvasinky *S. cerevisiae* (Lagunas, 1993). Proteiny zprostředkovávající usnadněnou difuzi často vlastní uzavírací mechanismus pro případ, že transport látky po směru koncentračního spádu není pro buňku žádoucí (např. Fps1p – glycerolový kanál cytoplasmatické membrány v *S. cerevisiae*, Luyten *et al.*, 1995).

Dochází-li při přenosu substrátu přes membránu ke spotřebě energie, nazývá se tento proces aktivní transport. Tzv. primární aktivní transport je spojen s primárním zdrojem energie – chemickou reakcí, absorpcí světla nebo tokem elektronů. Mezi primární transportní systémy patří například tzv. ATPasy, tj. přenašeče poháněné hydrolýzou ATP (Wach *et al.*, 1990), jako je třeba protonová ATPasa plasmatické membrány *S. cerevisiae* (Pma1p) tvořící gradient protonů přes plasmatickou membránu (Serrano, 1978).

Sekundární aktivní transport je spojen se sekundárním zdrojem energie – elektrochemickým gradientem iontů, který vzniká na náklady primárního zdroje energie. Dochází tedy k přesunu nejméně dvou různých substrátů zároveň, přičemž koncentrační gradient jednoho ze substrátů slouží jako zdroj energie pro přenos druhého substrátu proti koncentračnímu spádu. Elektrochemický gradient protonů bývá označován jako PMF (proton motive force – protonmotorická síla), gradient Na^+ jako SMF (sodium motive force) (Saier, 2000).

Sekundární aktivní transport může probíhat mechanismem symportu nebo antiportu. Při symportu (nazývaném též kotransport) přenáší transportér dva nebo více různých substrátů stejným směrem. V symportu s protony je v *S. cerevisiae* transportována většina živin, vitamínů i stopových prvků. V symportu s Na^+ je transportován například fosforečnanový anion (PO_4^{3-}) přes permeasu Pho89 (Martinez a Persson, 1998). Při antiportu dochází k výměně dvou různých substrátů přes membránu. Příkladem takového transportéru v *S. cerevisiae* je $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporter Nha1, využívající gradient protonů pro aktivní vylučování kationtů alkalických kovů (Prior *et al.*, 1996).

Některé přenašeče během transportu **modifikují** přenášený substrát. Například bakteriální fosfotransferasa přenáší cukry a zároveň je fosforyluje (Kundig *et al.*, 1964; Meadow a Roseman, 1982). Procesy, při nichž se substrát během přenosu modifikuje, se nazývají skupinová translokace. U kvasinek tento druh transportního mechanismu nebyl popsán.



Obr. 2.2 Rozdělení buněčných transportních systémů podle mechanismu (upraveno podle Saier (2000)).

2.4 Transport alkalických kationtů

2.4.1 Transport přes plasmatickou membránu

Jednou ze základních podmínek života všech organismů je udržování stálých koncentrací iontů uvnitř buněk. Vnitrobuněčné anorganické kationty a anionty se účastní mnoha fyziologických procesů, včetně adaptace buněk ke změnám ve vnějším prostředí. Nutnost vytvoření mechanismů adaptace na změny vnějšího prostředí je zvláště zřejmá u organismů nepohyblivých (mezi něž patří i kvasinky), které nemohou před nepříznivými podmínkami uniknout přemístěním v prostoru.

Transportní systémy, které se na udržování homeostasy kationtů podílejí, mají však zásadní význam nejen pro mikroorganismy, ale i pro vyšší eukaryota. Chybná funkce nebo nepřítomnost těchto transportérů značně omezuje schopnost zemědělských plodin tolerovat zvyšující se obsah sodných iontů v půdě. Zvýšená exprese některých přenašečů pro alkalické kationty naopak zvyšuje toleranci rostlin k solím – například nadprodukce vakuolárního Na^+/H^+ antiporteru *AtNhx1* zvýší toleranci k NaCl až na 200 mM nejen v rodičovském organismu *A. thaliana* (Apse *et al.*, 1999), ale i v transgenních rostlinách rajčete (Zhang a Blumwald, 2001). Nadbytečné sodné ionty se v těchto rostlinách ukládají do vakuol, čímž se předejde toxickým efektům Na^+ v cytosolu.

I v živočišných buňkách (včetně buněk lidských) hrají transportní systémy velmi důležitou roli. Některá závažná onemocnění jsou způsobena právě nesprávnou funkcí některého přenašeče iontů (např. autosomálně dědičná hluchota způsobená poruchou draselného kanálu *KCNQ4* nebo cystická fibrosa způsobená nesprávnou funkcí chloridového kanálu *CFTR* (Jentsch *et al.*, 2004)).

Ve volné přírodě jsou draselné kationty (K^+) zastoupeny v mnohem nižších koncentracích (řádově μM), než v živých buňkách, kde je draslík akumulován ve velkém množství (např. 200-300 mM v buňkách *S. cerevisiae* (Serrano *et al.*, 1997), protože draselný kation je potřebný pro mnoho fyziologických funkcí buněk (regulace buněčného objemu a vnitrobuněčného pH, syntéza proteinů, aktivace enzymů atp.). Vysoká vnitrobuněčná koncentrace sodných kationtů je naopak pro buňky toxická (Na^+ se váže do vazebných míst pro K^+ , ale neplní jeho funkci). Protože draslík je schopen nepříznivé efekty sodíku do určité míry kompenzovat (Gomez *et al.*, 1996), snaží se buňky v cytosolu udržovat stálý vysoký poměr K^+/Na^+ , a to pomocí tří různých strategií:

- 1) Vysoká specifita rozpoznávání kationtů na úrovni vstupu do buněk (vyšší afinita transportních systémů pro K^+ než pro Na^+)
- 2) Aktivní vylučování toxických kationtů z buněk ven
- 3) Selektivní ukládání kationtů v organelách

Pro efektivní vylučování sodných iontů využívají buňky aktivní transportní systémy, především ATPasy a sodno-protonové antiportery. Některé z těchto transportních systémů, primárně sloužících k vylučování Na^+ , jsou ovšem schopny

transportovat i K^+ v případě, že se buňky v přírodě dostanou do prostředí s nadbytečným množstvím draselných solí a vnitrobuněčná koncentrace K^+ se zvýší nad fyziologické optimum. $Na^+(K^+)/H^+$ antiportery mohou v některých případech sloužit i k regulaci vnitrobuněčného pH a buněčného objemu (při náhlém zvýšení vnitrobuněčného pH rychlý výstup K^+ z buněk po směru koncentračního spádu umožní vstup protonů proti koncentračnímu spádu) (Kinclová *et al.*, 2001). V laboratorních podmínkách bylo ověřeno, že většina transportních systémů pro sodné ionty efektivně transportuje i jejich analogy, ionty lithné (Garcia-deblás *et al.*, 1993). Jako analogy draselných iontů jsou některými přenašeči transportovány i ionty rubidné (Rodríguez-Navarro, 2000).

2.4.2 Vnitrobuněčný transport

Jak již je zmíněno výše, v eukaryotických buňkách probíhá transport kationtů alkalických kovů nejen přes plasmatickou membránu, ale i přes membrány vnitrobuněčných organel. Transportní systémy se tak podílejí jednak na udržování homeostáze kationtů (např. selektivním ukládáním Na^+ do vakuol) a dále na regulaci vnitroorganelového pH. Vnitřní pH membránových váček je jedním z klíčových faktorů pro jejich směrování do cílové organely nebo (v případě exocytosy) k plasmatické membráně. Organely sekreční a endocytické dráhy vykazují snižování pH směrem k místu určení: od endoplasmatického retikula (pH asi 7,1) ke Golgiho aparátu (pH asi 7,0-6,2), přes tzv. TGN (*trans*-sít' Golgiho aparátu, pH asi 6,0) k sekrečním váčkům (pH asi 5,0); nebo přes ranné a pozdní endosomy (pH asi 6,5) k lysosomu/vakuole (pH asi 4,5-5,8) (Futai *et al.*, 2000; Mellman, 1992; Nakamura *et al.*, 2005). Chybná regulace pH endosomů například v glomerulech ledvin vede k vylučování krátkých proteinů z buněk (místo degradace na aminokyseliny v lysosomu a zpětného vstřebání do krevního řečiště) a k nemoci zvané proteinurie (Maranda *et al.*, 2001).

Molekulární podstata regulace vnitřního pH organel je zatím poměrně málo prostudována (Brett *et al.*, 2005b). Je známo, že čtyři z devíti lidských Na^+/H^+ antiporterů Nhe jsou lokalizovány v membránách Golgiho aparátu a tzv. ranných endosomů (*early endosomes*, *post-Golgi endosomes*) a podílejí se na regulaci organelového pH (Nakamura *et al.*, 2005; Numata a Orłowski, 2001). Sodno-protonové antiportery lokalizované v membránách organel byly charakterizovány i v několika

rostlinných druzích, např. *AtNhx1*, *OsNhx1*, *LeNhx2* atd. (Fukuda *et al.*, 2004; Venema *et al.*, 2003). Regulace organelového pH Na^+/H^+ antiporterem se výrazně projevuje například v květech svlačce (*Ioponema nil*), kde recesivní mutace v genu kódujícím vakuolární antiporter *InNhx1* způsobí odlišné zbarvení květních plátků, které je závislé na pH vakuol (Fukada-Tanaka *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2001).

Nejlépe prostudovaným zástupcem skupiny intracelulárních Na^+/H^+ přenašečů však zůstává kvasničný antiporter *ScNhx1*. Bylo prokázáno, že tento protein se podílí jak na sekvestraci nadbytečných kationtů alkalických kovů do vakuol, tak na regulaci pH cytosolu i vakuol (Brett *et al.*, 2005b; Nass *et al.*, 1997). V kapitole 2.4.4.3 se o proteinu *ScNhx1* bude hovořit podrobněji.

2.4.3 Využití *S. cerevisiae* pro studium Na^+/H^+ antiporterů

Antiportní přenašeče pro kationty alkalických kovů patří ke konzervovaným transportním systémům napříč všemi typy organismů (achaea, bakterie, prvoci, houby, rostliny, živočichové). Jejich struktura, substrátová specifita a úloha v buněčné fyziologii se ovšem může do značné míry lišit. Zatímco většina mikroorganismů a rostlin využívá pro aktivní vylučování alkalických kationtů z buněk gradient protonů tvořený H^+ -ATPasou plasmatické membrány, živočišné buňky naopak využívají gradient Na^+ tvořený Na^+/K^+ -ATPasou pro vylučování nadbytečných protonů a regulaci vnitrobuněčného pH.

Buňky vyšších eukaryot obvykle exprimují paralelně několik isoform Na^+/H^+ antiporterů, například 9 isoform proteinu *Nhe* v lidských buňkách (Nakamura *et al.*, 2005; Orłowski a Grinstein, 2004), 28 isoform proteinu *Chx* v *Arabidopsis thaliana* (Sze *et al.*, 2004) apod. Přesná biochemická a fyziologická charakterizace přenašeče z rostlinné nebo živočišné buňky je tedy obvykle silně komplikována přítomností dalších transportních systémů s podobnou substrátovou specifitou a podobným mechanismem transportu. Příprava mutantních kmenů exprimujících pouze jednu ze studovaných isoform je u mnohobuněčných organismů často velmi obtížná, v některých případech dokonce nemožná.

Nabízí se proto podstatně jednodušší řešení – heterologní exprese studovaného proteinu v hostitelském organismu postrádajícím vlastní přenašeče pro příslušný substrát. Jedním z nejčastěji používaných organismů pro heterologní expresi transportérů z vyšších eukaryot je právě kvasinka *S. cerevisiae*, protože většina systémů podílejících se na transportu alkalických kationtů přes plasmatickou membránu této kvasinky je poměrně dobře charakterizována a jsou dostupné mutantní kmeny s různými kombinacemi deletovaných genů pro tyto přenašeče, (např. Bañuelos *et al.*, 1998; Bertl *et al.*, 2003). Stále ovšem ještě existují určité nedostatky v poznacích o vnitro-buněčných transportérech. Součástí snahy o charakterizaci vlastních přenašečů alkalických kationtů kvasinky *S. cerevisiae* je i tato disertační práce.

2.4.3.1 Rozdíly mezi buňkou kvasničnou a buňkami vyšších eukaryot

Při heterologní expresi proteinů z vyšších eukaryot je samozřejmě třeba mít na paměti, že ačkoliv *S. cerevisiae* je eukaryotickým organismem, stavba i fyziologie její buňky se od buněk rostlinných a živočišných v některých aspektech významně liší. Zatímco živočišné buňky vůbec nemají buněčnou stěnu a hlavním stavebním materiálem rostlinné buněčné stěny je celulóza, buněčná stěna kvasinky se skládá z chitinu, β -glukanů a mananproteinů. Rovněž zastoupení fosfolipidů a sterolů v plasmatické membráně je u živočišných buněk dost odlišné od kvasinky, což může negativně ovlivňovat funkci heterologně exprimovaných živočišných membránových proteinů (Opekarová a Tanner, 2003). Exprese rostlinných membránových proteinů v kvasinkách je z tohoto hlediska obvykle méně problematická. Jednou z vlastností, v níž se buňky kvasinek naopak podobají spíše buňkám živočišným, je ukládání zásobních látek v podobě glykogenu, na rozdíl od buněk rostlinných, které zásoby ukládají nejčastěji v podobě škrobu.

I v udržování optimálních koncentrací kationtů alkalických kovů jsou rozdíly mezi buňkami živočišnými, rostlinnými a kvasničnými. Buňky kvasinek se v tomto případě opět podobají spíše buňkám rostlinným než živočišným. V živočišných buňkách je koncentrace iontů K^+ a Na^+ regulována především činností Na^+/K^+ ATPasy, která exportuje Na^+ a importuje K^+ v poměru 3:2. Je tak zároveň udržován membránový potenciál buněk a gradient Na^+ , který slouží jako zdroj energie pro sekundární aktivní transportéry živin. Rostlinné ani kvasinkové buňky takovou ATPasu nemají.

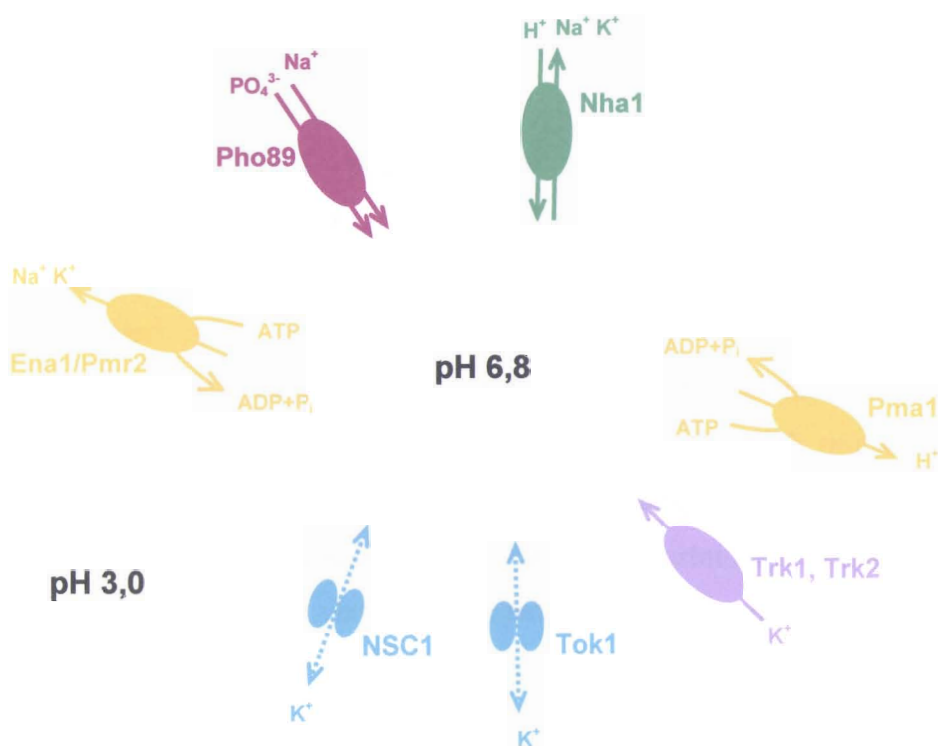
Membránový potenciál je tvořen především činností protonové ATPasy, draselné kationy jsou do buněk transportovány sekundárním aktivním transportem. Sekundární aktivní transport živin do buněk je zprostředkováván nejčastěji v symportu s protony, jejichž gradient je rovněž vytvářen činností protonové ATPasy plasmatické membrány.

Vnitrobuněčná koncentrace draselných iontů je v rostlinných a živočišných buňkách podobná (asi 100-200 mM). V laboratorních kmenech *S. cerevisiae* byly naměřeny hodnoty o něco vyšší, většinou kolem 300 mM.

Zajímavé je, že přestože genom *S. cerevisiae* je kompletně sekvenován, není v této kvasince znám žádný protonový kanál a rovněž export iontů Cl^- přes plasmatickou membránu není uspokojivě vyjasněn. Jediný kvasničný homolog savčích chloridových kanálů, protein Gef1, je lokalizován intracelulárně a nemůže tedy zprostředkovávat export Cl^- z buněk (Schwappach *et al.*, 1998).

2.4.4 Transportní systémy alkalických kationtů v *S. cerevisiae*

Přehled transportních systémů plasmatické membrány, které se podílejí na transportu sodných a draselných iontů v *S. cerevisiae*, je na obr. 2.3. Jak je již zmíněno výše, i transport iontů alkalických kovů probíhá přes integrální membránové proteiny s různým mechanismem transportu. V této kapitole ovšem nejsou rozděleny podle mechanismu, kterým jsou ionty přenášeny, ale spíše podle fyziologické funkce v buňkách.



Obr. 2.3 Transportní systémy v plasmatické membráně *S. cerevisiae*, které ovlivňují vnitrobuněčnou koncentraci kationtů alkalických kovů (podle Sychrová (2004)).

2.4.4.1 Vstup kationtů do buněk

Kationty alkalických kovů mohou do buněk *S. cerevisiae* vstupovat buď nespecificky ve směru koncentračního spádu, nebo vysoce specifickým aktivním transportem proti koncentračnímu spádu. Aktivním transportem jsou však do buněk vnášeny pouze ionty draselné, které jsou obvykle v životním prostředí kvasinek zastoupeny v mnohem nižší koncentraci, než je optimální koncentrace vnitrobuněčná. Ionty sodné jsou naopak v okolí buněk obvykle v nadbytku a nespecifické pronikání přes transportní systémy pro draslík plně pokrývá (a často překračuje) potřebu sodných iontů v buňce. Je tedy logické, že buňky během evoluce neměly důvod vyvinout specifický aktivní přenašeč pro sodné kationty.

Trk1, Trk2

Pro aktivní vstup kationtů draslíku do buněk slouží především proteiny Trk1 a Trk2 (Ko a Gaber, 1991). Trk1p je vysokoafinní přenašeč K^+ umožňující buňkám růst při mikromolární koncentraci draselných iontů v médiu (Gaber *et al.*, 1988). Kvasinky

s mutací *trk1* potřebují k růstu milimolární koncentraci K^+ , vstup draslíku do buněk jim zprostředkovává slabě exprimovaný *Trk2p* (Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1995). Kvasinky s dvojitou mutací *trk1 trk2* nejsou schopné růst při nižší koncentraci K^+ než 10 mM, ale při koncentraci nad 50 mM již rostou stejně dobře jako divoký kmen (Bertl *et al.*, 2003). Vstup draselných iontů do buněk s touto dvojitou mutací je zajišťován nespecifickými transportními mechanismy, zmíněnými níže v této kapitole.

Při pěstování kvasinek s dvojitou mutací *trk1 trk2* na médiích s nízkým obsahem K^+ dochází často ke spontánnímu vzniku supresorových mutací například v genech kódujících transportní systémy pro glukosu (Liang *et al.*, 1998) nebo pro aminokyseliny (Wright *et al.*, 1997), které umožní těmto transportním systémům transportovat draselné ionty. Pro zachování vlastností charakteristických pro mutantní kmeny *trk1 trk2* je tedy nutné uchovávat tyto kmeny na médiích s dostatečným obsahem K^+ (obvykle stačí 50 mM KCl).

Buňky *S. cerevisiae* jsou díky proteinům *Trk1* a *Trk2* schopny akumulovat draslík proti koncentračnímu spádu až stotisíckrát. Hnací silou tohoto energeticky náročného procesu by mohl být elektrochemický membránový potenciál tvořený především ATPasou plasmatické membrány *Pma1* (Rodríguez-Navarro, 2000). Mechanismus transportu se však zatím nepodařilo plně objasnit. Původně se předpokládalo, že draselné kationty vstupují do buněk v symportu s protony (Rodríguez-Navarro, 2000), později byla tato hypotéza zpochybněna tím, že transport K^+ je nezávislý na pH (Haro a Rodríguez-Navarro, 2002). V současné době se předpokládá, že proteiny *Trk1* a *Trk2* mají dvě vazebná místa pro kationty, z nichž jedno je vysoce specifické pro K^+ a do druhého se mohou vázat různé kationty – K^+ , Na^+ , H^+ a další (Haro a Rodríguez-Navarro, 2002; Kuroda *et al.*, 2004). Nedávno byly dokonce publikovány experimenty naznačující, že jedinou funkcí proteinů *Trk1* a *Trk2* nemusí být jen transport K^+ , ale že tyto proteiny jsou schopny zároveň fungovat jako chloridové kanály (Kuroda *et al.*, 2004; Rivetta *et al.*, 2005).

Proteiny *Trk1* a *Trk2* s vysokou specifitou rozlišují mezi ionty K^+ a Na^+ , poměr mezi $K_m [K^+]$ a $K_m [Na^+]$ může být až 1/700. Znamená to, že je-li poměr koncentrací Na^+/K^+ v prostředí nižší než 700:1, do buněk vstupuje tímto transportním systémem více iontů draselných než sodných (Rodríguez-Navarro, 2000). Pouze v případě, že

koncentrace sodných iontů více než 700x převyšuje koncentraci iontů draselných, vstup Na^+ do buněk přes systém Trk1 Trk2 převyší vstup K^+ .

Posttranslační regulace aktivity proteinů Trk1 a Trk2 je zprostředkovávána proteinkinasami Snf1, Hal4 a Hal5, které transport K^+ aktivují (fenotypový projev mutantních kmenů *hal4 hal5* je podobný jako kmenů *trk1 trk2* (Mulet *et al.*, 1999; Portillo *et al.*, 2005)), a dále fosfatasami Ppz1 a Ppz2, které úroveň transportu snižují (Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005).

NSC1

Analýza transportu iontů metodou terčíkového zámku ukázala, že v buňkách *S. cerevisiae* se nachází neselektivní nízkoafinní iontový kanál schopný transportovat do buněk širokou škálu kationtů včetně K^+ , Li^+ a NH_4^+ (Bihler *et al.*, 1998, 2002). Protože se dosud nepodařilo identifikovat gen (geny) kódující tento kanál, byl kanál provizorně pojmenován NSC1 (non-selective cation channel). NSC1 pravděpodobně umožňuje mutantním kmenům *trk1 trk2* růst na médiích s dostatečným obsahem draselných kationtů. Vstup iontů do buněk přes NSC1 může být blokován dvojmocnými kationty kovů (např. Ca^{2+}), hygromycinem B nebo nízkým pH.

Pho89

Primární funkcí proteinu Pho89 není transport kationtů alkalických kovů, ačkoli se skrze něj dostávají do buněk sodné ionty. Jedná se o Na^+/P_i symporter exprimovaný za podmínek limitace fosfátem (Martinez a Persson, 1998). Společně s proteiny Pho84, Pho87, Pho90 a Pho91 se podílí na aktivním transportu PO_4^{3-} do buněk (Auesukaree *et al.*, 2003). Pho89p je dosud jediným identifikovaným transportním systémem využívajícím jako zdroj energie gradient Na^+ přes plasmatickou membránu *S. cerevisiae* (Persson *et al.*, 1998; Werner a Kinne, 2001).

Pma1

Protonová ATPasa plasmatické membrány buněk *S. cerevisiae* (Serrano, 1978) patří do rodiny ATPas P-typu. Transportuje protony z buněk proti koncentračnímu spádu na úkor energie vzniklé štěpením molekul ATP (Goffeau a Slayman, 1981; Serrano, 1988). Pro buňky je esenciální (Cid *et al.*, 1987), je silně exprimována ve všech růstových fázích kvasinky (Ghaemmaghami *et al.*, 2003) a má dlouhý poločas života (Benito *et al.*, 1991). Pma1 tvoří přibližně 15–25 % všech proteinů plasmatické

membrány (Ambesi *et al.*, 2000) a spotřebovává 25–40 % buněčného ATP (Cid *et al.*, 1987; Rao and Slayman, 1996).

Její činnost je regulována především na posttranslační úrovni metabolismem glukosy (Goossens *et al.*, 2000), změnami pH cytosolu (snížení pH cytosolu aktivuje Pma1p) (Portillo, 2000). Aktivitu Pma1 lze blokovat některými oxidačními činidly (Stadler *et al.*, 2001). Činností Pma1p vzniká gradient protonů přes plasmatickou membránu, který slouží jako zdroj energie pro mnohé další transportní systémy (např. Nha1p). Zároveň se podílí i na tvorbě elektrochemického membránového potenciálu $\Delta\Psi$ (Holoubek *et al.*, 2003; Perlin *et al.*, 1988), využívaného systémem Trk1 Trk2. Pma1p nepatří tedy přímo mezi transportní systémy pro kationty alkalických kovů, ale její činností jsou mnohé z těchto systémů ovlivněny.

2.4.4.2 Výstup kationtů z buněk

Narozdíl od transportních systémů pro vstup do buněk, specificky upřednostňujících K^+ , vlastní kvasinka *S. cerevisiae* exportní systémy schopné aktivně vylučovat z buněk ionty Li^+ , Na^+ , K^+ i Rb^+ (Haro *et al.*, 1991; Kinclová *et al.*, 2002). Kterýkoliv z těchto iontů se totiž může vyskytnout ve zvýšené koncentraci v životním prostředí kvasinky, vstoupit do buněk nespecifickými transportními systémy a stát se pro buňku toxickým. Z toho plyne potřeba exportu iontů přes plasmatickou membránu proti jejich koncentračnímu spádu.

Ena1-4/Pmr2a-e

ATPasa plasmatické membrány schopná vylučovat kationty alkalických kationtů z buněk je v *S. cerevisiae* kódována tandemovou repeticí několika (3-5) téměř identických genů (Garcia-deblás *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995). První z těchto genů (*ENAI*) byl klonován na základě schopnosti zvyšovat toleranci citlivých buněk k Li^+ (Haro *et al.*, 1991). Vzhledem k sekvenční podobnosti s ATPasami P-typu bylo předpovězeno, že se jedná o sodnou ATPasu. Překvapivým zjištěním bylo, že deleční mutant je citlivý ke zvýšené koncentraci K^+ a zvýšenému pH média (Haro *et al.*, 1991). Později bylo prokázáno, že ATPasy kvasinkových buněk jsou skutečně schopny transportovat jak lithné a sodné, tak i draselné kationty (Bañuelos a Rodríguez-Navarro, 1998; Benito *et al.*, 1997).

Zatímco ATPasy *Ena2-3* jsou syntetizovány konstitutivně (Garcia-deblás *et al.*, 1993), exprese ATPasy *Ena1* je indukovatelná ionty Na^+ a Li^+ , osmotickým tlakem nebo zvýšeným pH. Exprese *Ena1* je regulována signální drahou HOG-MAPK (při nízkých koncentracích solí) nebo protein-fosfatasou zvanou calcineurin (při vysokých koncentracích solí) (Márquez a Serrano, 1996).

Protože ATPasa *Ena1* je aktivní především při vyšších hodnotách pH, už v roce 1985 byla předpovězena existence dalšího transportního systému pro kationty alkalických kovů, který by lépe fungoval v kyselém prostředí (Ortega a Rodríguez-Navarro, 1985). Izolace a charakterizace genu *NHA1* potvrdily tento předpoklad (Prior *et al.*, 1996).

Nha1

Gen *NHA1* byl selektován z genomové knihovny na základě schopnosti zlepšit růst kmene citlivého k solím na médiu s vysokou koncentrací NaCl (Prior *et al.*, 1996). Protein kódovaný tímto genem (antiporter *Nha1p*) je však schopen transportovat nejen ionty sodné, ale i lithné, draselné a rubidné (Bañuelos *et al.*, 1998; Kinclová *et al.*, 2001). Ve funkci vylučování přebytečných kationtů alkalických kovů se proteiny *Ena1* a *Nha1* vzájemně doplňují - *Ena1p* umožňuje buňkám růst při vysokých koncentracích solí v alkalickém prostředí a *Nha1p* v kyselém prostředí (Bañuelos *et al.*, 1998). Exprese *Nha1p* však na rozdíl od *Ena1p* není indukovatelná solemi ani osmotickým tlakem, ale je konstitutivní a poměrně nízká (Bañuelos *et al.*, 1998).

Mechanismus transportu $\text{K}^+(\text{Na}^+)$ v antiportu proti protonům byl potvrzen měřeními transportu H^+ na izolovaných membránových váčcích připravených z plasmatických membrán kmenů exprimujících gen *NHA1* v porovnání s kmeny, které gen *NHA1* nemají (Sychrová *et al.*, 1999). Původně se předpokládalo, že transport přes protein *Nha1* je elektroneutrální (1 sodný kationt proti 1 protonu), nedávno však bylo publikováno, že se jedná o transport elektrogenní (několik H^+ proti jednomu Na^+ iontu (Ohgaki *et al.*, 2005)).

Protein *Nha1* se také podílí na regulaci vnitrobuněčného pH. Kmeny s delecí *nha1* mají vyšší vnitrobuněčné pH než kmeny kontrolní (Brett *et al.*, 2005b; Sychrová *et al.*, 1999). Při náhlém zvýšení vnitrobuněčného pH je *Nha1p* schopen aktivně transportovat protony do buněk za předpokladu, že gradient K^+ může sloužit jako zdroj energie, tzn. v extracelulárním prostředí je nižší koncentrace K^+ než uvnitř buněk (kde je obvykle asi

200-300 mM K⁺). Znamená to, že kromě detoxifikační funkce může Nha1p sloužit i jako „bezpečnostní ventil“ pro zachování fyziologického pH v buňkách. Dále byla popsána i role proteinu Nha1 v reakci na osmotický šok způsobený sorbitolem (tedy nesouvisející s přítomností kationtů alkalických kovů) (Kinclová *et al.*, 2001). 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*, důležitých pro správný průběh buněčného cyklu (Simon *et al.*, 2001).

Protein Nha1 se skládá z poměrně krátkého hydrofilního N-konce, dvanácti transmembránových domén a velmi dlouhého hydrofilního C-konce (56,2 % délky proteinu). Zajímavé je, že i zkrácená verze proteinu, končící pouhých 41 aminokyselin za poslední transmembránovou doménou, byla v buňkách správně lokalizována a schopna plnit funkci exportu kationtů (Kinclová *et al.*, 2001). Pro transport kationtů je tedy podstatná především hydrofobní transmembránová část proteinu.

Tok1

Tok1p je napětově řízený kanál plasmatické membrány *S. cerevisiae* pro draselné kationty (Bertl *et al.*, 1993), primárně usměřující jejich tok směrem ven z buněk, ačkoli za určitých specifických podmínek přes něj mohou ionty K⁺ i vstupovat do buněk (Fairman *et al.*, 1999). Tok1p patří do zvláštní rodiny draselných kanálů s dvěma doménami P (tzv. „pore-forming domains“) (Ketchum *et al.*, 1995). Má osm transmembránových domén (domény P se nacházejí za 5. a za 7. TMD), krátký hydrofilní N-konec (66 aa) a o něco delší hydrofilní C-konec (234 aa), který se podílí na regulaci uzavírání kanálu (Loukin *et al.*, 2002; Loukin a Saimi, 2002). Přestože je popsána jeho struktura a biofyzikální vlastnosti jsou dobře charakterizovány metodou terčíkového zámku (Bertl *et al.*, 1998), fyziologická funkce tohoto proteinu nebyla dosud jasně stanovena. V několika pracích byl Tok1p popsán jako cíl působení killer toxinu K1 (Ahmed *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2001), později však tato teorie byla zpochybněna (Breinig *et al.*, 2002).

Buňky s mutací *tok1* jsou schopny normálního růstu, není změněna jejich tolerance ke K⁺. Jediným dosud popsaným růstovým fenotypem delece *tok1* je zvýšená tolerance mutantních buněk k iontům cesným (Bertl *et al.*, 2003).

2.4.4.3 Vnitrobuněčné přenašeče

Nhx1

Nhx1p je vnitrobuněčný přenašeč kationtů alkalických kovů, který se podílí na jejich sekvestraci do vakuol. Delece genu *NHX1* se v buňkách projeví zvýšením citlivosti k solím alkalických kovů (LiCl, NaCl, KCl), k hygromycinu B (Gaxiola *et al.*, 1999), citlivostí na nízké pH růstového média a snížením pH vakuol i cytosolu (Brett *et al.*, 2005b). Původně se předpokládalo, že tento antiporter je lokalizován v membráně vakuol (Nass *et al.*, 1997) nebo mitochondrií (Numata *et al.*, 1998), později se však ukázalo, že se protein Nhx1 výrazně podílí i na regulaci transportu endosomálních váček (tzv. prevakuolárních kompartmentů, PVC), a to především regulací vnitřního pH těchto organel (Brett *et al.*, 2005b). V současné době tedy převládá názor, že protein Nhx1 je lokalizován v membráně PVC (Nass a Rao, 1998), do nich transportuje nadbytečné kationty alkalických kovů a případně směřuje jejich transport směrem k vakuole.

Kha1

Protein Kha1 byl původně charakterizován jako K^+/H^+ antiporter plasmatické membrány (Ramírez *et al.*, 1998). Podle autorů článku by tedy měl být řazen mezi proteiny zprostředkovávající výstup K^+ z buněk. V rámci této disertační práce je ukázáno, že Kha1p výstup draselných iontů z buněk nezprostředkovává a není lokalizován v plasmatické membráně, nýbrž reguluje pH homeostázi kationtů alkalických kovů v Golgiho aparátu. Proto byl tento protein zařazen mezi přenašeče vnitrobuněčné, kam podle výsledků předkládané práce spadá. Protože podstatná část této disertační práce je věnována právě studiu proteinu Kha1, dosud publikované výsledky o něm jsou popsány podrobněji v kap. 2.5.

Mkh1

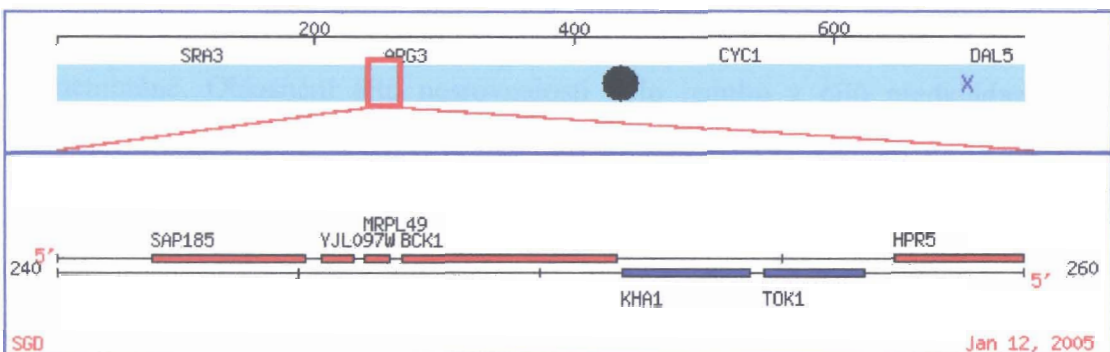
Proteinový produkt ORFu YOL027c byl nejdříve nazýván Mdm38 (mitochondrial distribution and morphology) (Dimmer *et al.*, 2002), později bylo rakouskou skupinou prof. R. Schweyena z Universität Wien navrženo přejmenování na Mkh1 (mitochondrial K⁺/H⁺ antiporter) (Froschauer *et al.*, 2005). Jedná se o homolog lidského proteinu LetM1, jehož absence má za následek chorobu zvanou Wolf-Hirschhornův syndrom

(Zollino *et al.*, 2003). Lidský protein LetM1 i kvasničný homolog Mkh1 jsou lokalizovány ve vnitřní membráně mitochondrií a podílejí se na udržování homeostáze K^+ a regulace objemu mitochondrií (Nowikovskiy *et al.*, 2004). Mutantní kmeny *S. cerevisiae mkh1* nerostou na nefermentovatelných zdrojích uhlíku, což napovídá o chybné funkci mitochondrií. Lidský gen *LETM1* je schopen tento defekt komplementovat (Nowikovskiy *et al.*, 2004). Mechanismus antiportu K^+/H^+ byl prokázán pomocí fluorescenčních sond PBFI a BCECF na izolovaných submitochondriálních částicích izolovaných z kmene exprimujícího Mkh1 v porovnání s mutantním kmenem *mkh1Δ* (Froschauer *et al.*, 2005).

2.5 Transportní systém Kha1

Gen *KHA1* byl identifikován po úplné sekvenaci genomu *S. cerevisiae* na základě sekvenční podobnosti ORFu YJL094c s bakteriálními geny kódujícími transportní systémy kationtů alkalických kovů – *KEFC* z *E. coli* a *NAPA* z *E. hirae* (Ramírez *et al.*, 1998).

V *S. cerevisiae* leží gen *KHA1* na levém rameni desátého chromosomu mezi geny *TOK1* a *BCK1*, narozdíl od genu *BCK1* (YJL095w) jsou ovšem geny *KHA1* (YJL094c) a *TOK1* (YJL093c) kódovány Crickovým řetězcem (obr. 2.4).



Obr. 2.4 Umístění genů *KHA1* a *TOK1* na chromosomu X (<http://www.yeastgenome.org/>)

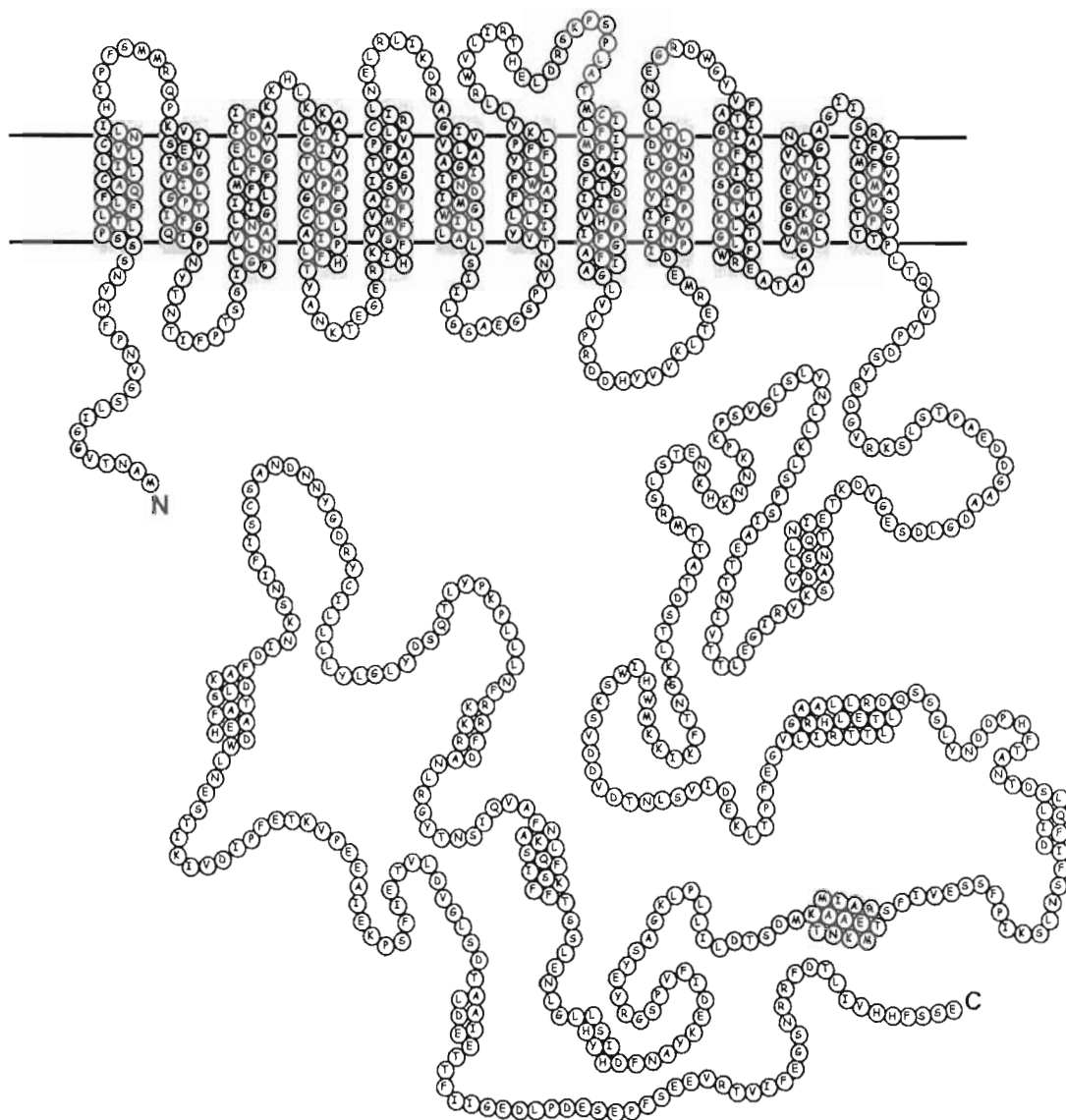
Protein Kha1 má 873 aminokyselin, krátký hydrofilní N-konec (19 aa), 12 transmembránových segmentů propojených krátkými hydrofilními smyčkami a dlouhý hydrofilní C-konec (451 aa). Na základě informací dostupných v internetových databázích byl v rámci předkládané disertační práce vytvořen model sekundární struktury Kha1p (obr. 2.5). Transmembránové oblasti byly určeny podle informací v databázi

SGD [http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/protein/protein?dbid= S000003630](http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/protein/protein?dbid=S000003630). Sekundární struktura hydrofilního C-konce byla určena pomocí internetové služby „Network Protein Sequence Analysis“ http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3dautomat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html, (Combet *et al.*, 2000).

Autoři původní publikace o proteinu Kha1 předpokládali, že tento protein by mohl plnit podobnou funkci v transportu draselných iontů, jako protein Nha1 pro ionty sodné (Ramírez *et al.*, 1998). Transport K^+ v antiportu proti protonům přes plasmatickou membránu byl již dříve předpovězen (Ortega a Rodríguez-Navarro, 1985), proto se tato funkce pro nově objevený protein se sekvencí odpovídající K^+/H^+ antiporteru zdála velmi pravděpodobná. Dalším zjištěním podporujícím tuto hypotézu byla zvýšená vnitrobuněčná koncentrace K^+ u mutantního kmene s genem *KHA1* disruptovaným pomocí kazety *URA3* (Ramírez *et al.*, 1998).

Autoři ovšem nevěděli, že protein Nha1 je schopen transportovat i draslík (Bañuelos *et al.*, 1998) a že tedy není nutné hledat další protein pro objasnění transportu K^+ přes plasmatickou membránu v antiportu proti protonům. Transportní vlastnosti proteinu Kha1 nebyly v této práci změřeny a ani lokalizace proteinu nebyla stanovena (Ramírez *et al.*, 1998).

Při měření transportních vlastností kmene *S. cerevisiae* B31 s deletovanými geny *ENA1-4* a *NHA1* nebyl naměřen žádný export K^+ závislý na pH (Kinclová *et al.*, 2001), což poněkud zpochybňovalo existenci dalšího K^+/H^+ antiporteru v plasmatické membráně. Objasnění této nesrovnalosti bylo jedním z cílů předkládané disertační práce.



Obr. 2.5 Model sekundární struktury proteinu Kha1

2.5.1 Publikované fenotypy kmenů s delecí *kha1*

Jak je již zmíněno výše, jedním z hlavních důvodů pro popsání proteinu Kha1 jako K^+/H^+ antiporteru v plasmatické membráně byla zvýšená vnitrobuněčná koncentrace draselných kationtů v mutantním kmeni *kha1::URA3* (Ramírez *et al.*, 1998). Mezi další pozorované fenotypy kmene s disruptovaným genem *kha1* patřil kratší generační čas ve standardním médiu YPG, zvýšené vnitrobuněčné pH

a membránový potenciál, rychlejší růst a tvorba větších kolonií na médiích se zvýšeným pH nebo obsahem solí, intenzivnější fermentace a respirace, větší výtěžek biomasy v přepočtu na spotřebovanou glukosu a o něco menší buňky (Ramírez *et al.*, 1998). Je ovšem potřeba zmínit, že autoři porovnávali rodičovský kmen W303, který je auxotrofní na uracil, s kmenem, ve kterém byl gen *KHA1* disruptován kazetou *URA3* (A. Peña, ústní sdělení). Kmen s disruptovaným genem *KHA1* byl tedy na uracil prototrofní. Nedá se proto s jistotou určit, zda se pozorované fenotypy mutantního kmene vážou k absenci genu *KHA1* nebo k metabolismu uracilu.

Gen *KHA1* je dále zmiňován ve dvou pracích různých skupin zabývajících se hledáním fenotypů mutantních kmenů, v nichž byly deletovány ORFy kódující proteiny s dosud neznámou funkcí (Entian *et al.*, 1999; Steinmetz *et al.*, 2002).

Skupina dr. L. M. Steinmetze z Lékařské fakulty ve Stanfordu v Kalifornii použila soubor 5791 heterozygotních a 4706 homozygotních delečních kmenů a testovala růst na různých zdrojích uhlíku (glukosa, ethanol, glycerol, laktát). Všechny deleční kmeny byly pěstovány ve společné kultuře, poté byla ze vzorků izolována genomová DNA a pomocí PCR a statistických metod bylo stanoveno zastoupení jednotlivých delečních mutantů v kulturách. Tímto způsobem dospěli autoři k závěru, že kmen s delecí *kha1* má zhoršený růst na všech testovaných nefermentovatelných zdrojích uhlíku (Steinmetz *et al.*, 2002), což je v přímém rozporu s intenzivnější respirací kmenů s disruptovaným genem *KHA1* pozorovanou u Ramírez *et al.* (1998).

Skupina dr. K. D. Entiana z Mikrobiologického ústavu University J. W. Goethe ve Frankfurtu nad Mohanem v Německu také testovala různé zdroje uhlíku (glukosa, fruktosa, manosa, galaktosa, ethanol, glycerol a octan), a dále růst v přítomnosti solí a dalších chemikálií, odolnost k UV záření, schopnost párování, invazivního růstu a morfologickou strukturu buněk. Testovali pouze 150 mutantních kmenů s delecemi málo prostudovaných ORFů, a růstové experimenty prováděli na pevných půdách pro každý kmen zvlášť. Podle výsledků této skupiny vykazují mutanty s delecí *kha1* výrazně zhoršený růst pouze na octanu. Na ethanolu a glycerolu rostly stejně jako na zdrojích fermentovatelných (Entian *et al.*, 1999). Skupina dr. Entiana dále pozorovala mírně zvýšenou toleranci kmene *kha1Δ* k NaCl a zvýšené procento buněk v S fázi (v porovnání s rodičovským kmenem, stanoveno pomocí tzv. fluorescence-activated cell sorting, FACS).

Výsledky tří různých skupin ohledně asimilace nefermentovatelných zdrojů uhlíku nejsou tedy jednotné, což se dá poměrně snadno vysvětlit (1) porovnáváním kmenů s rozdílným metabolismem uracilu v případě mexické skupiny (Ramírez *et al.*, 1998) a (2) výrazně odlišnou metodou stanovení a širokým záběrem experimentu v obou dalších skupinách. Žádná ze zmiňovaných skupin (a to ani autoři původní publikace o proteinu Kha1) se nepokusila potvrdit souvislost mezi pozorovanými fenotypovými projevy a genem *KHAI* tím, že by gen v plasmidu vnesli zpět do buněk a obnovili tak fenotyp rodičovského kmene. Popsané fenotypy mutantních kmenů bylo tedy nutno brát jako neověřené a některé z nich byly ověřovány a dále studovány v rámci této disertační práce.

2.5.2 Lokalizace proteinu Kha1

Autoři původní publikace o proteinu Kha1 předpověděli lokalizaci v plasmatické membráně na základě předpokládané funkce proteinu (Ramírez *et al.*, 1998). Z této hypotézy vycházeli i ostatní autoři zmiňující protein Kha1 (např. (Cellier *et al.*, 2004; Erez a Kahana, 2002)), aniž by bylo provedeno označení proteinu a lokalizace ověřena mikroskopicky.

Internetové databáze proteinů značených GFP neobsahují informaci o lokalizaci proteinu Kha1. V databázi YPL.Db (<http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html>, Habeler *et al.*, 2002; Kals *et al.*, 2005) není o Kha1p vůbec žádná zmínka; v projektu Yeast GFP Fusion Localization Database (<http://yeastgfp.ucsf.edu/>, Huh *et al.*, 2003) se sice pokusili označit protein Kha1 GFP připojením kódující sekvence GFP na chromosom za ORF *KHAI*, značený protein se však nepodařilo vizualizovat. Stanovení lokalizace proteinu Kha1 v buňkách bylo dalším z cílů této práce.

2.5.3 Přehled mikroarrayových výsledků

Další informace o genu *KHAI* byly vyhledány v internetových databázích výsledků mikroarrayových experimentů (např. www.transcriptome.ens.fr/yimgv). Exprese genu *KHAI* nepodléhá příliš výrazným změnám, pouze ve 3 % všech mikroarrayových experimentů se exprese měnila více než třikrát, v 6 % dvakrát a v 14 % 1,5 krát.

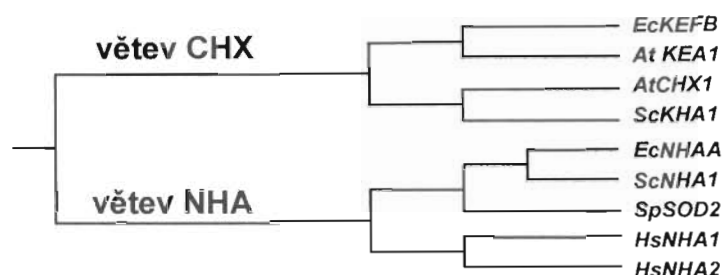
Signifikantní indukce exprese genu *KHAI* byla pozorována při přechodu buněk do stacionární fáze (Gasch *et al.*, 2000), při působení 7% ethanolu (Alexandre *et al.*, 2001), při pH 8 (Viladevall *et al.*, 2004) a při pH 3 (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005). Vzhledem k celkově nízké expresi tohoto genu nelze v mikroarrayových experimentech získat přesné údaje o jeho represi, protože tyto hodnoty většinou leží v rozmezí experimentální chyby.

2.5.4 Interakce proteinu Kha1

V rámci projektu dvouhybridové analýzy proteinových interakcí byl nalezen jeden kandidát interagující s proteinem Kha1, a to protein kódovaný ORFem YLR193c (Ito *et al.*, 2001). Tento protein však nebyl dosud charakterizován, jediný dostupný údaj o něm, kromě interakce s Kha1p, je předpovězená lokalizace v mitochondriích (Huh *et al.*, 2003), a proto z této interakce nebylo možné odvodit další vlastnosti proteinu Kha1.

2.5.5 Homologní geny a proteiny v dalších organismech

Gen *KHAI* patří do rodiny genů kódujících přenašeče jednomocných kationtů proti protonům (tzv. CPA cation-proton antiporters). Tato rodina genů kódujících transportní systémy byla dále rozdělena na tři podrodiny (CPA1, CPA2 a NaT-DC) podle předpokládaných společných prokaryotických předků (Chang *et al.*, 2004). Podrodina CPA2 (do níž patří *KHAI*) se dále dělí na dvě větve: větev CHX zahrnuje kromě *KHAI* především rostlinné geny typu *CHX* a *KEA1-3*, dále bakteriální geny typu *KEFB* a *KEFC*. Druhá větev (NHA) pak zahrnuje kvasničné geny typu *NHA1/SOD2*, lidské geny typu *NHA*, bakteriální geny typu *NHAA* a rostlinné geny *KEA4-6* (Brett *et al.*, 2005a). Zjednodušený fylogenetický strom podrodiny CPA2 sestavený na základě podobnosti odvozených proteinových sekvencí je na obr. 2.6. Podrodina přenašečů CPA1 zahrnuje například geny vnitrobuněčných Na^+/H^+ antiporterů typu *NHX1* a savčí geny typu *NHE1-9* (Brett *et al.*, 2005a).



Obr. 2.6 Zařazení homologních genů v podrodině CPA2

2.5.5.1 Bakteriální homology

Nejbližším bakteriálním homologem genu *KHA1* je gen *NAPA* z *Enterococcus hirae* (25,9% identita) a dále *KEFC* z *Escherichia coli* (20,0% identita) (Ramírez *et al.*, 1998). Na základě podobnosti s těmito geny byl gen *KHA1* identifikován v genomu *S. cerevisiae* a předpovězena jeho funkce. Proteiny kódované geny *NAPA* a *KEFC* se v bakteriích podílejí na transportu kationtů alkalických kovů (Reizer *et al.*, 1992). *EhNapA* je domnělý Na^+/H^+ antiporter (Waser *et al.*, 1992). *EcKefC* je v některých pracích popisován jako draselný kanál s uzavíracím mechanismem regulovaným glutathionem (Ferguson *et al.*, 1995), jinde je uváděn jako K^+/H^+ antiporter (Reizer *et al.*, 1992), ve většině případů se však autoři vyhýbají specifikaci transportního mechanismu a nazývají KefC „glutathion-gated K^+ efflux system“ (Brett *et al.*, 2005a; Miller *et al.*, 2000; Munro *et al.*, 1991).

2.5.5.2 Kvasinkové homology

Geny podobné ORF₁ *KHA1* ze *Saccharomyces cerevisiae* byly v plné délce dosud nalezeny v sedmi dalších druzích kvasinek. Jejich přehled je v tab. 2.1, podobnost proteinových sekvencí je v tab. 2.2. ORFy podobné *KHA1*, ale podstatně kratší, byly dále nalezeny v *Saccharomyces mikatae* (gen kóduje produkt o délce 351 aa) a *Candida albicans* (560 aa). Není jisté, zda se nejedná o přerušení čtecího rámce v důsledku chyby v sekvencování, proto tyto proteiny nebyly do srovnání zařazeny.

V tab. 2.1 je vidět, že proteiny *Kha1* všech druhů rodu *Saccharomyces* a druh *C. glabrata* mají srovnatelnou délku (873-879 aa), v druhu *S. pombe* je *Kha1* o něco delší (898 aa) a v druzích *K. lactis* a *D. hansenii* o něco kratší.

Tab. 2.1 Přehled kvasinkových druhů, v nichž byl nalezen gen *KHA1* (L. Příbylová, nepublikované výsledky)

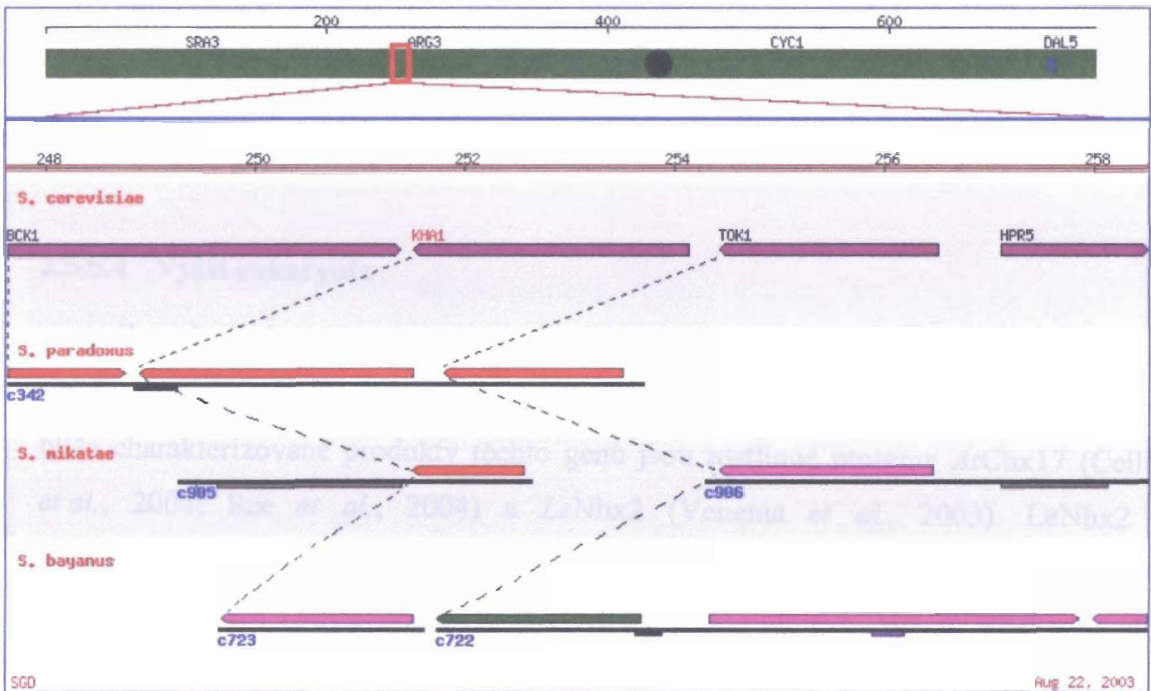
Druh kvasinky	kmen	počet aminokyselin	počet intronů	reference/databáze
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	873	0	(Ramírez <i>et al.</i> , 1998)
<i>Candida glabrata</i>	CBS 138	876	0	(Dujon <i>et al.</i> , 2004)
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	CBS 767	822	0	(Dujon <i>et al.</i> , 2004)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CLIB 210	781	0	(Dujon <i>et al.</i> , 2004)
<i>Saccharomyces bayanus</i>	623-6c	875	0	(Kellis <i>et al.</i> , 2003)
<i>Saccharomyces castelii</i>	NRRL Y-12630	879	0	(Kellis <i>et al.</i> , 2003)
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	NRRL Y-17217	873	0	(Kellis <i>et al.</i> , 2003)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	972	898	3	EBI (Acc. No CAB76234)

Tabulka 2.2 ukazuje, že proteinu Khal ze *S. cerevisiae* je nejpodobnější jeho homolog z *S. paradoxus* a dále ostatní rody druhu *Saccharomyces*. Nejméně podobné z porovnávaných kvasinkových homologů mu jsou Khalp z halotolerantní kvasinky *D. hansenii* a z kvasinky *S. pombe*, která se vyznačuje příčným dělením buněk namísto klasického kvasinkového pučení.

Tab. 2.2 Podobnost (%) a identita (%) odvozené sekvence proteinů Khal v různých kvasinkách (L. Příbylová, nepublikované výsledky)

Khalp	<i>C.glabrata</i>	<i>D.hansenii</i>	<i>K.lactis</i>	<i>S.bayanus</i>	<i>S.castelii</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.paradoxus</i>	<i>S.pombe</i>
<i>C. glabrata</i>	100	45.8	47.1	65.3	64.6	63.7	64.3	46.6
<i>D. hansenii</i>	56.1	100	45.0	51.6	45.1	42.7	49.5	49.5
<i>K. lactis</i>	69.7	55.5	100	54.9	54.9	47.1	54.4	45.7
<i>S. bayanus</i>	73.1	62.6	64.9	100	66.6	87.5	87.5	44.9
<i>S. castelii</i>	72.5	56.3	65.5	73.1	100	69.0	68.6	46.3
<i>S.cerevisiae</i>	79.0	64.8	69.7	91.3	75.5	100	95.8	30.2
<i>S. paradoxus</i>	72.8	59.9	65.0	91.0	75.3	96.9	100	46.2
<i>S. pombe</i>	61.5	63.1	60.1	59.8	61.7	54.0	61.4	100

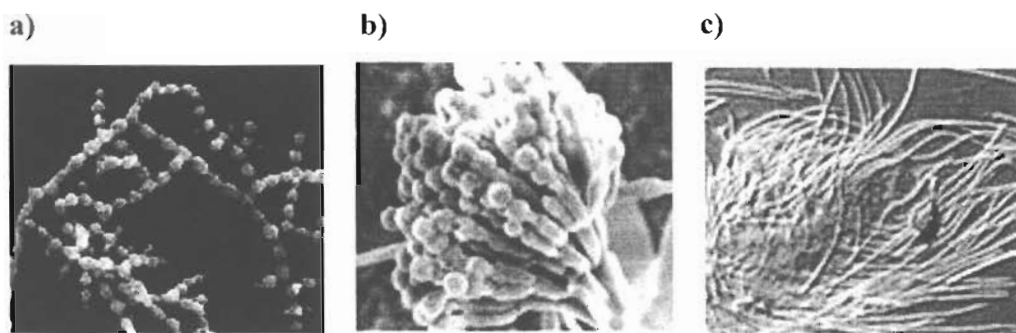
V kvasince *S. cerevisiae* leží geny *TOK1* a *KHAI1* na levém rameni chromosomu X těsně za sebou, nekódující oblast oddělující ORFy je pouze 294 bp. Podobná situace je i v kvasince *S. paradoxus*. Tato syntenie ovšem pro funkci obou genů zřejmě není nezbytná, neboť v kvasinkách *S. mikatae* a *S. bayanus* leží geny *TOK1* a *KHAI1* každý na jiném chromosomu (obr. 2.7).



Obr. 2.7 Umístění genů *KHAI1* a *TOK1* na chromosomech různých druhů rodu *Saccharomyces* (<http://www.yeastgenome.org/>, Kellis *et al.*, 2003)

2.5.5.3 Další houbové organismy

Gen *KHAI1* byl nalezen v genomu vláknité houby *Neurospora crassa* (obr. 2.8a), patogenní houby *Aspergillus nidulans* (obr. 2.8b), rostlinného parazita *Ustilago maydis* (obr. 2.8c) a dalších houbových organismů (<http://db.yeastgenome.org/homolog/images2/chr10/YJL094C.tree.gif>). Ani v jednom z těchto organismů nebyl ovšem proteinový produkt genu blíže charakterizován.



Obr. 2.8 a) *N. crassa*
 b) *A. nidulans*
 c) *U. maydis*

2.5.5.4 Vyšší eukaryota

Geny homologní ke *KHA1* byly nalezeny i v živočišných a rostlinných genomech (např. *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*). Jediné dva blíže charakterizované produkty těchto genů jsou rostlinné proteiny *AtChx17* (Cellier *et al.*, 2004; Sze *et al.*, 2004) a *LeNhx2* (Venema *et al.*, 2003). *LeNhx2* je vnitrobuněčný K^+/H^+ antiporter z rajčete (*Lycopersicon esculentum*), lokalizovaný v prevakuolárních kompartmentech a Golgiho aparátu (Venema *et al.*, 2003). Identita proteinových sekvencí *LeNhx2* a *ScKha1* je 25 %. O proteinu *AtChx17*, přenašeči z *A. thaliana*, je podrobněji psáno v kap. 5.11.

Závěrem by se tedy dalo říci, že geny typu *KHA1* se vyskytují v genomech organismů napříč všemi taxonomickými skupinami. Objasnění funkce proteinu *Kha1* v *S. cerevisiae* a stanovení fenotypu delečních mutantů by výrazně přispělo k možnostem studia podobných proteinů v buňkách vyšších eukaryot.

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo především charakterizovat úlohu proteinu Kha1 ve fyziologii kvasinky *S. cerevisiae*. Dílčími kroky potřebnými k dosažení tohoto cíle bylo:

- Ověřit publikované fenotypy mutace *kha1* v kvasince *S. cerevisiae*
- Nalézt fenotypy mutace *kha1* v kombinaci s dalšími mutacemi v genech kódujících transportní systémy pro kationty alkalických kovů v kvasince *S. cerevisiae*
- Vysvětlit, proč nebyl naměřen žádný výstup K^+ z buněk BW31 exprimujících protein Kha1 při pH 5,5 ani pH 8,0
- Stanovit lokalizaci proteinu Kha1
- Studovat vliv transportních systémů na membránový potenciál *S. cerevisiae*, a to především proteinů Kha1 a Tok1
- Zjistit, které mutantní fenotypy *S. cerevisiae* jsou komplementovány rostlinným přenašečem *AtChx17*, a sledovat jeho vlastnosti při heterologní expresi v *S. cerevisiae*

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Použité chemikálie byly vždy nejvyšší dostupné čistoty, pokud možno čistoty pro molekulární biologii, od firem Difco (USA), Lachema (ČR), Serva (USA) a Sigma (USA).

4.1.1 Kultivační média

Byla připravována tekutá a pevná kultivační média. Postup přípravy byl v obou případech obdobný, do pevných médií byl navíc před sterilizací přidáván 2% agar (v případě pevného média AP nebo médií s vysokou koncentrací solí 2,5% agar). Při přípravě všech médií byla použita destilovaná voda.

Pro bakterie

Bakterie byly kultivovány v médiu LB (Luria-Broth) připraveném z komerčně dodávané směsi (1% Bacto-Trypton, 0,5% kvasničný autolyzát, 1% NaCl, pH upraveno na 7 pomocí NaOH) od firmy Sigma, do nějž byl v případě potřeby po autoklávování přidáván ampicilin ze zásobního roztoku (25 mg/ml, sterilizováno filtrací) do konečné koncentrace 100 µg/ml. Médium LB s ampicilinem je v textu uváděno jako médium LBA.

Pro kvasinky

Pro kultivaci kvasinek byla používána následující média:

- YPG** 1% kvasničný autolyzát, 2% bacto peptone, 2% glukosa, 10 µg/ml adenin
- YNB-NH₄** 0,17% yeast nitrogen base bez aminokyselin a NH₄⁺, 0,5% síran amonný, 2% glukosa (není-li v textu uveden jiný zdroj uhlíku)
- MM** Minimální médium pro sledování indukce exprese β-galaktosidasy bylo připravováno podle (Mináriková *et al.*, 2001): 2% glukosa, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KH₂PO₄, 0,8 mM MgSO₄, 1,7 mM NaCl, 54 mM KOH, po sterilizaci přidán roztok vitaminů 1ml/100ml média a roztok stopových prvků 1ml/100 ml média (složení roztoků viz kap. 4.1.6).

AP Arginin-fosfátové médium bylo připravováno podle (Rodríguez-Navarro a Ramos, 1984):

60 ml H₂O + 55 µl H₃PO₄ titrováno argininem do výsledného pH (většinou 4,5 nebo 6,5), 0,2 ml 1 M MgSO₄, 0,2 ml 0,1 M CaCl₂, 1 ml 100 mM KCl, 2 g glukosa, doplněno vodou do 100 ml. Po sterilizaci přidán 1 ml roztoku vitaminů a 1 ml roztok stopových prvků.

Média s přidavkem bromkresolového purpuru (BKP): Zásobní roztok BKP (10 mg BKP v 1 ml čistého ethanolu, sterilizováno filtrací) byl do média přidáván po autoklávování, předtím byl zředěn sterilní vodou v poměru 1:1. Výsledná koncentrace v médiu byla 100 µg/ml (0,01%) (Palková *et al.*, 1997). BKP je indikátor pH s barevným přechodem od žluté (pod pH 5,2) po fialovou (nad pH 6,8).

Média s přidavkem solí: Některé soli byly přidávány v množství, jehož objemový podíl v médiu nelze zanedbat ani předem odhadnout. Aby byla dodržena výsledná koncentrace soli v daném objemu média, na baňku byl předem vyznačen konečný objem média, potom byly naváženy všechny složky média včetně soli (KCl, NaCl atd.) a byla doplněna destilovaná voda, napřed množství potřebné pro rozpuštění složek média, potom po rysku (před sterilizací).

Média s auxotrofními přísadkami: Není-li v textu uvedeno jinak, auxotrofní přísadky (aminokyseliny, dusíkaté báze) byly do médií přidávány ze sterilních zásobních roztoků (5 mg/ml) po autoklávování do konečné koncentrace 15 µg/ml. Kmenům odvozeným od W303 byl přidáván adenin, histidin, leucin, tryptofan a uracil. Při pěstování kmenů transformovaných plasmidem byl vypuštěn ten auxotrofní přísadka, který umožňoval selekci buněk nesoucích plasmid (nejčastěji uracil).

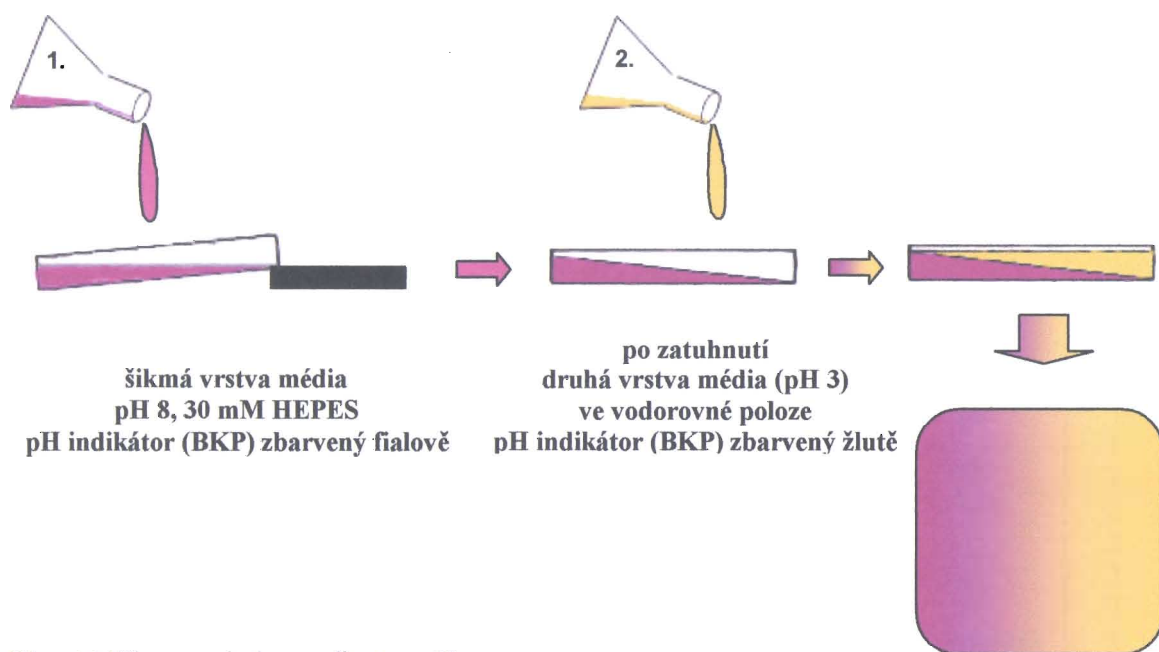
Média s pufovaným pH byla připravována pomocí komerčně dodávaných chemikálií (jejich výsledná koncentrace v médiu byla 20 mM, pokud není v textu uvedeno jinak):

<i>MES</i>	2-[N-morpholino] ethansulfonová kyselina $pK_A (25\text{ }^\circ\text{C}) = 6,1$ použitelné pro pH 5,5 – 6,7
<i>PIPES</i>	sodná sůl kyseliny piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonové] $pK_A (25\text{ }^\circ\text{C}) = 6,8$ použitelné pro pH 6,1 – 7,5
<i>MOPS</i>	3-[N-morpholino] propansulfonová kyselina $pK_A (25\text{ }^\circ\text{C}) = 7,2$ použitelné pro pH 6,5 – 7,9
<i>BICINE</i>	(N,N-bis [2 - hydroxyethyl] glycin) $pK_A (25\text{ }^\circ\text{C}) = 8,3$ použitelné pro pH 7,6 – 9,0

Na potřebnou výslednou hodnotu bylo pH upraveno u tekutých médií před sterilizací pomocí HCl nebo KOH. U pevných médií bylo pH vyšší než 4,5 upravováno také před sterilizací pomocí HCl nebo KOH, při přípravě pevných médií s pH nižším než 4,5 bylo pH upravováno sterilní kyselinou vinnou až po sterilizaci, protože agar se v kyselém prostředí při sterilizaci v autoklávu rozkládá. Potřebné množství kyseliny vinné bylo zjištěno titrací vzorku nesterilního média.

Gradientové misky byly připravovány postupným naléváním dvou vrstev média nestejného složení (obr. 4.1). První vrstva média (obvykle obsahující určité množství solí, toxické látky atp.) byla nalita do mírně nakloněné čtvercové Petriho misky. Po zatuhnutí šikmé vrstvy média byla miska položena do vodorovné polohy a nalita vrstva druhá, složením odpovídající, ale bez soli, resp. bez toxické látky.

V případě gradientu pH obsahovaly obě vrstvy média indikátor pH (BKP), první vrstva média byla pufována na pH 8 a druhá upravena pomocí kyseliny vinné na pH 3.



Obr. 4.1 Příprava misek s gradientem pH

4.1.2 Kmeny kvasinek

V této práci byl používán divoký kmen *Saccharomyces cerevisiae* S288c *MAT α gal2 mal mel* (ATCC 204508), kmeny FL100 *MAT α ura3 Δ trp1-4*, FL200 *MAT α ura3 Δ trp1-4* (dar prof. J.-L. Soucieta, ULP, Štrasburk, Francie), kmen 27061b a od něj odvozené mutanty (dar dr. R. Hagenauer-Tsapis, Inst. J. Monod, Paříž, Francie, viz kap. 5.7.1), série kmenů odvozených od ATCC 201389: *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0* (S288C) s různými geny značenými RFP na chromosomu (dar dr. Won-Ki Huh, University of California, San Francisco, USA) a mutantní kmeny odvozené od kmene W303-1A, *MAT α* nebo W303-1B *MAT α* (Wallis *et al.*, 1989). Kmen W303 nese mutace *ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 mal10*. Ostatní mutace kmenů odvozených od kmene W303-1A jsou uvedeny v tab. 4.1.

Dále byly použity kmeny W303 a W303 *kha1::URA3* získané od prof. A. Peňi z Mexické Univerzity. V textu této práce jsou tyto kmeny uvedeny jako Mex W303, resp. Mex *kha1::URA3*.

Tab. 4.1 Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* odvozené od kmene W303-1A

kmen	genotyp	zdroj
W303 - <i>kha1</i>	<i>MATa kha1Δ::kanMX</i>	1
W303 - <i>tk</i>	<i>MATa tok1Δ::kanMX::kha1Δ</i>	1
KMW 40-1	<i>MATα kha1::URA3</i>	2
KMW 40-4	<i>MATa kha1::URA3</i>	2
CW25	<i>MATa nha1Δ::LEU2</i>	3
C25 - <i>kha1</i>	<i>MATa nha1Δ::LEU2 kha1Δ::kanMX</i>	1
C25 - <i>tk</i>	<i>MATa nha1Δ::LEU2 tok1Δ::kanMX::kha1Δ</i>	1
GW19	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ</i>	3
G19 - <i>tk</i>	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ tok1Δ::kanMX::kha1Δ</i>	1
BW31*	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2</i>	4
B31 - <i>kha1</i>	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 kha1Δ::kanMX</i>	1
B31 - <i>tk</i>	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 tok1Δ::kanMX::kha1Δ</i>	1
KKB 11c	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 kha1Δ::kanMX</i>	2
KKB 16a	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 kha1Δ::kanMX</i>	2
KMB 1b	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 kha1::URA3</i>	2
KTB 1b	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 tok1Δ::kanMX::kha1Δ</i>	2
AB 11c	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 nhx1Δ::TRP1</i>	2
KTA 40-2	<i>MATa ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 nhx1Δ::TRP1 kha1Δ::kanMX</i>	2
MAB 2d	<i>MATα ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3</i>	1
RGY9	<i>MATα ADE2</i>	5
RGY84	<i>MATa ADE2 gef1Δ::LEU2</i>	5
KFYTI-15A	<i>MATa ADE2 gef1Δ::LEU2 kha1Δ::kanMX</i>	5
KFYTI-15B	<i>MATα ADE2 gef1Δ::LEU2 kha1Δ::kanMX</i>	5

* v publikaci č. 1 je tento kmen označen B31.

1. M. A. Bañuelos, Universita L. Pasteura, Štrasburk, Francie
2. H. Sychrová, Fyziologický ústav AV ČR, Praha
3. O. Zimmermannová, Fyziologický ústav AV ČR, Praha (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005a)
4. O. Zimmermannová, Fyziologický ústav AV ČR, Praha (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005b)
5. Krzysztof Flis, Ústav biochemie a biofyziky, Akademie věd, Varšava, Polsko

Některé kmeny získané ze zahraničních laboratoří byly bílé a na standardních médiích rostly rychleji než kmen W303-1A, přestože všechny tyto kmeny by měly nést mutaci *ade2* způsobující akumulaci toxického červeného pigmentu (Woods, 1969). Pravděpodobné vysvětlení tohoto jevu je vznik mutace *ade3* (nebo jiné mutace v genech kódujících enzymy biosyntézy adeninu), která zabrání tvorbě toxického červeného meziprojektu biosyntézy adeninu. Proto byly některé z těchto kmenů zkříženy s kmenem W303-1A, BW31 nebo AB 11c a podrobeny tetrádové analýze za účelem získání růžového haploidního kmene s požadovanou kombinací mutací. Seznam kmenů vzniklých křížením za účelem eliminace mutace *ade3* je v tab. 4.2. Kmeny, které nejsou uvedeny výše v tab. 4.1 (protože nebyly v této práci používány k jiným účelům než pro křížení), jsou v tabulce zvýrazněny tučným písmem a je u nich uveden zdroj a genotyp.

Tab. 4.2 Kmeny vzniklé křížením a následnou tetradovou analýzou

Výsledný kmen	vznikl křížením kmenů	
KMW 40-1	Mex <i>kha1::URA3</i>	W303-1A
KMW 40-4	Mex <i>kha1::URA3</i>	W303-1A
KKB 11c	B31- <i>kha1</i>	BW31
KKB 16a	B31- <i>kha1</i>	BW31
KMB 1b	Mex <i>kha1::URA3</i>	BW31
KTB 1b	B31- <i>tk</i>	BW31
AB 11c	AXT3 (Quintero a Blatt, 1997) <i>ena1Δ::HIS3::ena4Δ; nha1Δ::LEU2; nhx1Δ::TRP1</i>	BW31
KTA 40-2	B31- <i>tk</i>	AB 11c
MAB 2d	MA5 (M. A. Bañuelos, nepublikovaný kmen) <i>ena1Δ::HIS3::ena4Δ; nha1Δ::LEU2; trk1Δ::LEU2; trk2Δ::HIS3</i>	BW31

4.1.3 Kmen bakterií

Bakterie byly v této práci používány pro namnožení plasmidů. Byl používán kmen *Escherichia coli* XL₁ Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F⁺ [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(*ter^r)*]*) od firmy Stratagene, CA, USA.

4.1.4 Vektory

V této práci byly používány podvojně vektory schopné amplifikace v bakteriích i kvasinkách (většinou mnohokopiové, dva centromerové), dále jeden vektor integrativní a dva vektory jako templáty pro PCR. Seznam všech použitých vektorů je v tab. 4.3.

Tab. 4.3 Použité vektory

vektor	velikost (kb)	replikon	selekční znaky	pozn.	zdroj
YCplac33	5,6	ARS-CEN	Amp ^R , <i>URA3</i>		(Gietz a Sugino, 1988)
YEp352	5,2	2 μ	Amp ^R , <i>URA3</i>		(Hill <i>et al.</i> , 1986)
YEp357R	8,0	2 μ	Amp ^R , <i>URA3</i>	pro expresi β-galaktosidasy v kvasinkách	(Myers <i>et al.</i> , 1986)
YEp366	8,4	2 μ	Amp ^R , <i>LEU2</i>	pro expresi β-galaktosidasy v kvasinkách	(Myers <i>et al.</i> , 1986)

pGRU1	5,7	2 μ	Amp^R , <i>URA3</i>	pro značení proteinů GFP na C-konci	Daignan- Fornier B. NCBI, Accession No. AJ249649
pUG6	4,0	není určen pro transformaci kvasinek	Amp^R , <i>kanMX</i>	templát pro přípravu delečních kazet <i>loxP-kanMX- loxP</i>	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)
pSH47	7,0	ARS-CEN	Amp^R , <i>URA3</i>	plasmid nesoucí gen pro rekombinasi Cre	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)
YEplac181mRFP	6,7	2 μ	Amp^R , <i>LEU2</i>	pro značení proteinů mRFP na C-konci	K. Malínská, MBÚ AV ČR
YEplac195mRFP	6,2	2 μ	Amp^R , <i>URA3</i>	pro značení proteinů mRFP na C-konci	K. Malínská, MBÚ AV ČR
pGFPkanMX	4,7	není určen pro transformaci kvasinek	Amp^R , <i>kanMX</i>	templát pro přípravu kazet na integraci GFP do genomu	K. Malínská, MBÚ AV ČR
pYES2	5,9	2 μ	Amp^R , <i>URA3</i>	indukovatelný promotor <i>GAL1</i>	Invitrogen
pYEX	7,9	2 μ	Amp^R , <i>URA3</i>	indukovatelný promotor <i>CUP1</i> , GFP pro značení na N-konci proteinů	Clontech
pTPR76	10,2	integrativní plasmid	Amp^R , <i>TRP1</i>	gen <i>ScSEC7</i> značený fluorescenčním proteinem DsRed v plasmidu YIplac204	T.J. Proszinsky, Max-Planck- Inst., Drážďany, Německo
pPMR1-CFP	12,0	2 μ	Amp^R , <i>URA3</i>	gen <i>PMR1</i> značený CFP	R. Rao, J. Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA

pGYP6-GFP	9,8	2 μ	Amp ^R , URA3	gen <i>GYP6</i> značený GFP	R. Rao, J. Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA
pCHX17	8,3	2 μ	Amp ^R , URA3	gen <i>AtCHX17</i> v plasmidu pYES2	(Cellier <i>et al.</i> , 2004)
pNHA1-985	8,8	2 μ	Amp ^R , URA3	gen <i>ScNHA1</i> v plasmidu YEp352	(Kinclová <i>et al.</i> , 2001)
pNHA1-985GFP	9,3	2 μ	Amp ^R , URA3	gen <i>ScNHA1</i> v plasmidu pGRU1	(Kinclová <i>et al.</i> , 2001)
pXA1	8,7	2 μ	Amp ^R , URA3	promotor <i>ScNHA1</i> v plasmidu YEp357 R	M. A. Bañuelos, Universita L. Pasteura, Štrasburk, Francie
pGFPmKIR2.1	9,2	2 μ	Amp ^R , URA3	gen <i>mKIR2.1</i> značný GFP v plasmidu pYEX	(Hasenbrink <i>et al.</i> , 2005)
pGFP-TOK1	10,0	2 μ	Amp ^R , URA3	gen <i>TOK1</i> značný GFP v plasmidu pYEX	J. Ludwig, Univ. Tübingen, Německo

4.1.5 Oligonukleotidy

Oligonukleotidy jako primery pro PCR byly objednávány od firem VBC-Genomics nebo Sigma-Aldrich. Oligonukleotidy do délky 25 nt byly čištěny odsolením, delší oligonukleotidy byly přečišťovány HPLC. Seznam primerů použitých pro PCR v rámci této práce, jejich poloha na templátu a zavedená restrikční místa jsou uvedena v tab. 4.4. Číslo koncových nukleotidů udává polohu vůči prvnímu nukleotidu (A) ORFu, ke kterému se primer vztahuje (*CHX17*, *KHA1*, *NHX1* nebo *TOK1*). Reversní primery (odpovídající nekódujícímu vláknku DNA) jsou označeny „R“.

Tab. 4.4 Seznam oligonukleotidů

název oligonukleotidu	sekvence	poznámky
<u>Klonování genu <i>KHA1</i> do vektorů YEp352, YCplac33 a pGRU1</u>		
BamKHA1	-23 TTGTATTATTTGGATCCTATCAA	<i>Bam</i> H1 místo podrženo
BamPKHA1	-718 ATTATCAAAAAGGATCAGCCAG	<i>Bam</i> H1 místo podrženo
KHAXSS1 R	+2630 +2622 +2605 TGGCATGCTTATCTAGACGAAAAAT	<i>Xba</i> I a <i>Sph</i> I místa podržena, stop kodón ORFu <i>KHA1</i> vyznačen tučným písmem
<u>Sekvenace genu <i>KHA1</i></u>		
SKHA01	-122 -105 GTAAGGGAAAATAAAAAA	
SKHA02	+360 +377 AGGTATAGTCACTTAGC	
SKHA03	+820 +837 ATTTCTGCTATTTTACG	
SKHA04	+1280 +1297 TTTACCCAGATTCATACC	
SKHA05	+1741 +1756 ACTGAACGGACAACGTGAT	
SKHA06	+2201 +2218 CACAATCCGATTATCTTG	
SKHAZp01 R	-378 -395 CTAATTCCTCTATGTTCT	
SKHAZp02 R	+183 +166 AATAACACCAGATATAAC	
SKHAZp03 R	+593 +576 ATGATACCCGCGCAAGG	
SKHAZp04 R	+1596 +1579 TTTCAATGTGGAATCAGT	
SKHAZp05 R	+2013 +1996 GTATTTTCATCAATGAA	
<u>Vložení promotoru <i>KHA1</i> před gen kódující β-galaktosidasu</u>		
HindPKHA1	-721 -698 TTCATTATCAAAAGCTTCTAGCCC	<i>Hind</i> III místo podrženo
prKHA1MetE R	+18 -3 TCCTACAGAAITCGCCATTTG	<i>Eco</i> RI místo podrženo, tučně je vyznačen iniciační kodón ATG
pKHA1-lacZ	cgcaaacgcctctccccgcgcttgccgattcatccc AGCCCAGAGGGAATACTTCC	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na začátek promotoru <i>KHA1</i>
pKHA1-lacZ R	ccagtcacgacgtgtaaaacgacggcgggagcaagctggga TGCCATTTGATAGAATAAA	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na konec promotoru <i>KHA1</i>
<u>Příprava delečních kazet <i>tok1::kanMX</i>, <i>kha1::kanMX</i> a <i>tok1::kanMX::kha1</i></u>		
KHA-kan	atggcaaacactgtaggaggaattctgctgggtgaaatccg TTCGTACGCTGCAGGTCGAC	malými písmeny je oblast homologní k začátku ORFu <i>KHA1</i> , velkými písmeny část primeru nasedající na začátek deleční kazety <i>loxP-kanMX-loxP</i> v plasmidu pUG6
KHA-zp-kan R	ttatcagcgaataatggtgcacaataagggtgcaaacg GCATAGGCCACTAGTGGA	malými písmeny je oblast homologní ke konci ORFu <i>KHA1</i> , velkými písmeny část primeru nasedající na konec deleční kazety <i>loxP-kanMX-loxP</i> v plasmidu pUG6
TOK-kan	atgacaaggtcatgaacagcttgcacaacaacgctgggatg TTCGTACGCTGCAGGTCGAC	malými písmeny je oblast homologní k začátku ORFu <i>TOK1</i> , velkými písmeny část primeru nasedající na začátek deleční kazety <i>loxP-kanMX-loxP</i> v plasmidu pUG6
TOK-zp-kan R	tcaaaagtctctctatgctcaccacaaaattttttgct GCATAGGCCACTAGTGGA	malými písmeny je oblast homologní ke konci ORFu <i>TOK1</i> , velkými písmeny část primeru nasedající na konec deleční kazety <i>loxP-kanMX-loxP</i> v plasmidu pUG6

Ověření delece genu *KHA1* nebo lokusu *TOK1-KHA1* na gDNA

KanX F1	CATTTGATGCTCGATGA	přímý primer nasedající asi 1580 nt od začátku deleční kazety <i>loxP-kanMX-loxP</i>
KanX R1	CTCTGGCGCATCGGGC	zpětný primer nasedající asi 630 nt od začátku deleční kazety <i>loxP-kanMX-loxP</i>
disTOK1	-87 TCGTAGATCGTGAGCAGATG	přímý primer před ORFem <i>TOK1</i>
disKHA1 R	+3106 TGATATATGGTCTCTGGG	zpětný primer za ORFem <i>KHA1</i>

Ověření integrace plasmidu TPR78 do chromosomu

Sec7 F	+5189 GCAACGACAGAAGGGAGA	přímý primer v ORFu <i>SEC7</i> (839 bp před koncem ORFu)
DsRed R	+149 TGGTCACCTTCAGCTTGG	zpětný primer v sekvenci DsRed

Vložení genu *AtCHX17* do plasmidu pGRU1

<i>AtCHX</i> GFP F	ttattattattacgaagtgtattattattattctatcaac ATGGGAACAAACGGTACAAC	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na začátek ORFu <i>CHX17</i>
<i>AtCHX</i> GFP R	taaagctccggagcttgcctgcctgaggctgactctaga AGGACTCTCAGAATCCTCAACC	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na konec ORFu <i>CHX17</i>

Vložení genů *AtCHX17* a *ScKHA1* do plasmidu pYEX

GFP <i>AtCHX</i> F	aagtcgggactcagatctcgagctcaagcttogaattct ATGGGAACAAACGGTACAACA	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na začátek ORFu <i>CHX17</i>
GFP <i>AtCHX</i> R	gaccttcatttggagtaataatgaattgatccttagtca CTAAGGACTCTCAGAATCCTC	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na konec ORFu <i>CHX17</i>
GFP <i>KHA1</i> F	aagtcgggactcagatctcgagctcaagcttogaattct ATGGCAAACACTGTAGGAGG	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na začátek ORFu <i>KHA1</i>
GFP <i>KHA1</i> R	gaccttcatttggagtaataatgaattgatccttagtca TTATTTCAGACGAAAAATGGTG	malými písmeny je oblast homologní k naštěpenému plasmidu, velkými písmeny část primeru nasedající na konec ORFu <i>KHA1</i>

Sekvenaci genu *AtCHX17*

SCHX01	-436 CAAGACCCGCGCCGAGGTG
SCHX02	+147 TCTCCTCCGTCCTCTCCGGC
SCHX03	+607 GCTGCTTGGATTCTCCTTGC
SCHX04	+1065 AATCATCGGTACAGTCCTAG
SCHX05	+1525 AGAAACGGTCTTCCCTTCTG
SCHX06	+1985 TTGTTCCGGTTTATCCCTAGC

4.1.6 Roztoky a pufrы

Roztok vitaminů 10 ml zásobního roztoku vitaminů obsahuje 4 mg niacin, 4 mg pyridoxin, 4 mg thiamin, 4 mg pantothenát, 2 mg biotin, 5 mg inositol. Sterilizováno filtrací.

Roztok stopových prvků 100 ml zásobního roztoku obsahuje 5 mg H_3BO_3 , 4 mg $MnSO_4$, 4 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 2 mg $MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 mg KI, 0,4 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10 mg kyselina citrónová. Sterilizováno filtrací.

Inkubační pufr pro stanovení obsahu K^+ v buňkách: 0,1 mM $MgCl_2$, 2% glukosa, 20 mM $RbCl$, 20 mM HEPES, upraveno na pH 8 pomocí $Ca(OH)_2$. V některých případech bylo do pufru přidáno 20 mM NH_4Cl (uvedeno v textu).

Extrakční roztok pro stanovení obsahu K^+ v buňkách: 10 mM $MgCl_2$, 0,2 M HCl.

STET 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0, 5% Triton X – 100, 8% sacharosa.

TSN 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA.

TAE 4,84 g Tris Base, 0,68 g octanu sodného, 0,366 g EDTA, 1,35 ml kyseliny octové, H_2O do 1 l

TE 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 nebo 8,0

TpEB 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM $MgCl_2$, 270 mM sacharosa

C-P 1,2 g kyseliny citrónové, 3,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, H_2O do 1 l, pH 6,0

Všechny roztoky a pufrы byly připravovány z destilované vody, kromě roztoků pro stanovení obsahu K^+ , které byly připravovány z deionizované vody (W. Werner SYBRON).

4.1.7 Enzymy a kity

4.1.7.1 Enzymy

Restrikční endonukleasy	MBI Fermentas, Boehringer Mannheim a Amersham
T4 DNA ligasa	MBI Fermentas
Alkalická fosfatasa	Boehringer Mannheim, Roche
TrippleMaster PCR System	Eppendorf
PPP Master Mix	Top-Bio
Platinum Pfx polymerasa	Invitrogen

4.1.7.2 Kity

Geneclean Turbo, Perfectprep Gel Cleanup - izolace DNA z agarosového gelu po elektroforetické analýze	Q-Bio, Eppendorf
GenElute Plasmid Miniprep, Perfectprep Plasmid mini - izolace pDNA z bakterií, výtěžek asi 20 µg / 5 ml kultury	Sigma-Aldrich, Eppendorf
GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep - rychlá izolace pDNA z bakterií, výtěžek asi 1 µg / 0,4 ml kultury	Sigma-Aldrich
Plasmid Midí Kit - izolace pDNA z bakterií pro sekvenci, výtěžek asi 50 µg / 80 ml kultury	Qiagen

4.1.8 Přístroje

Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 800	Perkin-Elmer
Autokláv PS 20A	Chirana
Centrifugy: - stolní minicentrifuga MiniSpin Plus používána pro objemy do 2 ml, do 14,1 tis. g bez chlazení	Eppendorf
- stolní mikrocentrifuga používána pro objemy do 2 ml, do 7 tis. g bez chlazení	Denver Instruments
- stolní centrifuga T62 používána pro objemy do 50 ml, do 3 tis. g bez chlazení	Unimed
- chlazená stolní centrifuga BR4 používána pro objemy do 2 ml do 14 tis. g s chlazením pro objemy do 40 ml do 3 tis. g s chlazením	Jouan
- Sorvall RC-5B používána pro objemy do 250 ml do 15000 g s chlazením	Du Pont Instruments
- Centrifuge 5810 R používána pro objemy do 250 ml do 15000 g s chlazením	Eppendorf
Digitální fotoaparát Coolpix4500	Nikon
Digitální fotoaparát Photo PC 650Z	Epson
Elektromagnetické míchačky: BIBBY	Sterling
Hytrek HTR 8068	IKA Works
ARE s topením	P-Lab
Elektroporátor GHT 1287-B	Jouan
Horizontální elektroforéza pro analýzu DNA	Sigma-Aldrich
Inkubátory: vodní	Memmert
orbitální Gallenkamp	Schoeller Instruments
orbitální Minitron	Infors AG

Mikroskop BX 60	Olympus
Mikroskop AX 70	Olympus
Mikroskop TCS SP2	Leica
Olejová rotační vývěva	MEZ Mohelnice
pH/mV/°C meter	Cole-Parmer
pH metr 3505	Jenway
Spektrofluorimetr FluoroMax 2	Jobin-Yvon, SPEX
Spektrofotometry: Spekol 211	Carl Zeiss
Biophotometer	Eppendorf
Ultrospec 10	Amersham Biosciences
Termostat na 30 °C	Gallenkamp
Termostat na 37 °C TCH100	Laborat. přístroje Praha
Termostat na 37 °C	Memmert
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex	IKA Works

4.1.9 Další pomůcky a materiál

Agarosa	Sigma-Aldrich
Aplikátor typu „ježek“	Sigma-Aldrich
Automatické pipety s nastavitelným objemem	Gilson
Elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm)	Dynex
Filtry Rotilabo 0,22 μm	Roth
Filtry membránové 0,8 μm	Millipore
Filtry Lid _{Bac}	Eppendorf
λ DNA/ <i>Hind</i> III	MBI Fermentas
Mikrotitrační destičky pro imunologické analýzy Elisa	Alpha Laboratories Ltd.

Jednorázový plastový laboratorní materiál (např. špičky, mikrozkuhavky, Petriho misky atd.) byl většinou od firem Gama Group, Eppendorf a P-Lab.

4.2 Metody

4.2.1 Molekulárně-biologické metody

4.2.1.1 Transformace buněk *E. coli*

Příprava kompetentních buněk

10 ml tekutého média LB bylo zaočkováno jednou kolonií buněk *E. coli* a kultura byla kultivována přes noc za intenzivního třepání při teplotě 37 °C. Tímto inokulem bylo zaočkováno 250 ml média LB a buňky byly inkubovány za stálého třepání při teplotě 37 °C do $OD_{600} = 2$ (spektrofotometr Spekol 211). Poté byla kultura ochlazená v ledové lázni (15 – 30 min) a buňky byly sklizeny centrifugací (15 min, 4000g, 4 °C). Odstředěné buňky byly dvakrát promyty sterilní ledovou vodou (250 ml, 125 ml) a jednou ledovým 15% glycerolem (5 ml). Nakonec byly buňky resuspendovány v 1 ml 15% glycerolu (odpovídá konečné koncentraci buněk asi 3×10^{10} buněk/ml). Kompetentní buňky byly skladovány při teplotě -80 °C v alikvotech 100 – 300 μ l.

Transformace kompetentních buněk elektroporací

Kompetentní buňky (40 μ l) byly po rozmrazení v ledu přeneseny do vychlazené elektroporační kyvety a k suspenzi byla přidána plasmidová DNA (0,1 – 10 ng). Elektroporace byla prováděna v přístroji Jouan elektrickým pulsem 1250 V / 8 ms. Pak bylo přidáno 100 μ l ledového média LB, buňky byly inkubovány 10 min při 37 °C, a poté vysety na misky s pevným médiem LBA. V případě transformace bakterií vektorem obsahujícím polylinker uvnitř genu lacZ byly do selekčního média přidány chromogenní substráty β -galaktosidasy X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid; 40 μ l 2% zásobního roztoku v dimethylformamidu na misku s 20 ml média LBA) a IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid; 40 μ l 2% zásobního vodného roztoku na misku s 20 ml média LBA). Chromogenní substráty β -galaktosidasy umožňují rozlišit kolonie transformované prázdným vektorem (modré) od kolonií transformovaných vektorem obsahujícím inzert vložený do polylinkeru uvnitř genu lacZ (bílé).

4.2.1.2 Izolace plasmidové DNA z bakterií

Pro izolaci plasmidové DNA z *E. coli* byla nejčastěji používána tzv. „boiling“ metoda (Holmes a Quigley, 1981). Buňky narostlé přes noc ve 2 ml selekčního média LBA byly sklizeny centrifugací (60 s, 6 000 g) a resuspendovány v 350 μ l roztoku STET. Bylo přidáno 25 μ l roztoku lysozymu (10 mg/ml) v pufru TE, suspenze byla krátce promíchána (vortex, 10 s) a inkubována ve vodní lázni 1 minutu při teplotě 100 °C. Poté byl lyzát centrifugován (15 min, 14 000 g, 4 °C) a sediment odstraněn sterilním párátkem. Plasmidová DNA ze supernatantu byla vysrážena přidáním 400 μ l isopropanolu a sedimentována (15 min, 14 000 g, 4 °C). Sediment byl omyt 80% ethanolem, vysušen a rozpuštěn ve 40 μ l pufru TE s RNasou (75 μ g/ml). Takto byla získána plasmidová DNA o koncentraci asi 0,1 – 0,3 μ g/ μ l.

Pro izolaci plasmidové DNA vyšší čistoty byly používány komerčně dostupné kity od firmy Eppendorf nebo Sigma-Aldrich. Postupováno bylo dle protokolu přiloženého k výrobku. Ze 3-5 ml bakteriální kultury tak bylo získáno 100 μ l plasmidové DNA o koncentraci asi 0,1 – 0,2 μ g/ μ l.

Plasmidová DNA o vyšší koncentraci (např. jako templát pro sekvenování) byla izolována pomocí soupravy Plasmid Midi Kit od firmy Qiagen. Postupováno bylo dle protokolu přiloženého k výrobku. Z 80 ml bakteriální kultury tak bylo získáno 150 μ l plasmidové DNA o koncentraci asi 0,3 μ g/ μ l.

Koncentrace pDNA byla stanovena měřením absorbance při 260 nm (biofotometr Eppendorf) a izolovaná plasmidová DNA byla skladována při teplotě -20 °C.

4.2.1.3 Restrikční štěpení, modifikace a ligace DNA

Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami probíhalo 1,5 až 4 h při teplotě doporučené výrobcem pro daný enzym (většinou 37 °C) v přítomnosti pufrů dodaných výrobcem spolu s enzymy. Pokud byla pDNA štěpena dvěma restrikčními enzymy najednou, byl reakční pufr zvolen tak, aby vyhovoval oběma enzymům, nebo byla DNA štěpena postupně. V tom případě byla po prvním štěpení DNA precipitována ethanolem v přítomnosti octanu sodného (kap. 4.2.1.4), rozpuštěna v pufru TE a poté štěpena druhým enzymem.

Defosforylace 5'-konců lineárních molekul DNA zabráňující jejich zpětnému spojení při ligační reakci byla katalyzována alkalickou fosfatase od firmy Boehringer Mannheim nebo Roche v pufru dodávaném spolu s enzymem. Reakce byla prováděna podle protokolu přiloženého k výrobku. Fosfatasa pak byla inaktivována zahřátím na 65 °C po dobu 10 min v přítomnosti 5 mM EGTA a poté odstraněna extrakcí směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol. DNA byla ze směsi získána srážením ethanolem v přítomnosti octanu sodného (kap.4.2.1.4).

Ligace molekul DNA byla z počátku prováděna přesně podle protokolu dodaného s ligační soupravou od firmy MBI Fermentas. Později se osvědčilo přidávat PEG 4000 (2 µl na 20 µl ligační směsi) i při ligaci molekul DNA s kohezivními konci, přestože protokol doporučuje tento přídavek pouze při ligaci molekul s konci tupými. Ligační reakce byly prováděny v hmotnostním poměru vektoru a inzertu 1:4 (většinou 0,1 µg vektoru a 0,4 µg inzertu). Ligace probíhala přes noc při 16 °C, pak byla ligasa inaktivována zahřátím na 65 °C (10 min). Pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* bylo použito 1-3,5 µl ligační směsi.

4.2.1.4 Purifikace a precipitace DNA

Pro odstranění proteinů po defosforylaci 5'-konců DNA byla používána extrakce směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1). Ke vzorku DNA byla směs přidána v poměru 1:1. Vzorek se směsí byl důkladně promíchán (2 min na vortexu) a stočen (14 000 g, 4 °C, 2 min). Horní vodná fáze byla přenesena do nové minizkumavky a DNA byla vysrážena ethanolem v přítomnosti octanu sodného, tzn. ke vzorku byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 3 objemy ledového absolutního ethanolu. Směs byla opatrně promíchána a ponechána při -20 °C alespoň 20 minut. Pak byla DNA sedimentována centrifugací (14 000 g, 4 °C, 15 min). Sediment byl omyt 80% ethanolem, vysušen a rozpuštěn v pufru TE pH 8,0.

4.2.1.5 Elektroforetická analýza DNA

Fragmenty pDNA po restrikcím štěpení nebo produkty polymerasové řetězcové reakce byly analyzovány pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarosovém gelu v pufru TAE. DNA byla zviditelňována ethidiumbromidem, který byl do gelu přidáván v poměru 1:10⁴ ze zásobního roztoku 5 mg/ml. Pro porovnání velikostí fragmentů DNA

sloužila DNA bakteriofága λ štěpená endonukleasou *Hind*III. Před nanesením do gelu byl ke vzorkům přidáván nanášecí pufr (0,25% bromfenolová modř, 0,25% xyleneová modř, 30% glycerol) v poměru 1:4. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 60 V. Elektroforeogramy byly pořizovány v UV světle fotoaparátem Polaroid nebo Epson Photo PC 650Z.

Pro další použití byla DNA izolována z agarosového gelu pomocí kitu Perfectprep Gel Cleanup od firmy Eppendorf nebo GeneClean Turbo od firmy Q-Bio podle protokolu dodaného s výrobkem.

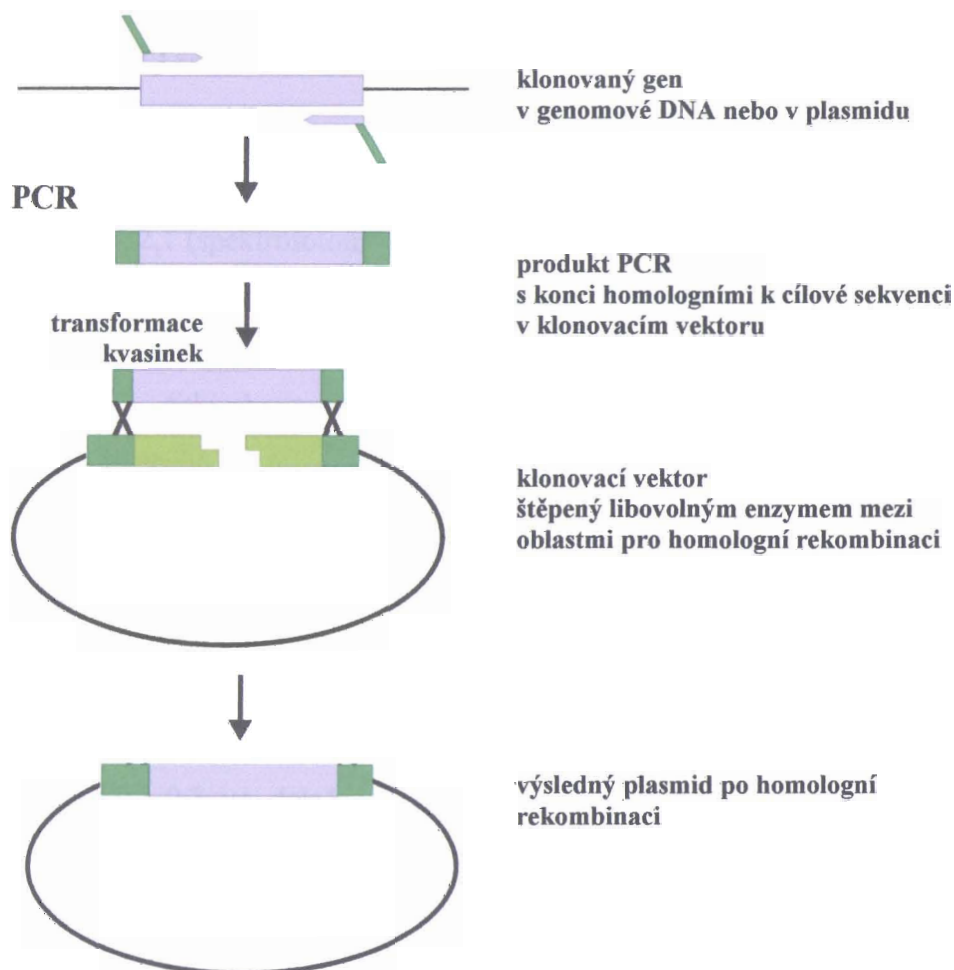
4.2.1.6 Izolace genomové DNA z kvasinek

Pro izolaci genomové DNA byl použit protokol popsáný v Hoffman a Winston (1987). Kvasinky byly přes noc napěstovány v 10 ml tekutého média YPG, stočeny (3000 g, 5 min), pelet byl resuspendován v 0,5 ml vody a přepipetován do sterilních mikrozkušavek. K suspenzi bylo přidáno 0,2 ml roztoku TSN, 0,2 ml směsi fenol–chloroform–isoamylalkohol a 0,3 g sterilních „acid-washed“ skleněných kuliček (příprava kuliček: namočit na 1 h do konc. HNO_3 , promýt dest. H_2O do neutrálního pH, vysterilizovat v autoklávu). Mikrozkušavka byla poté umístěna do ledu a přerušovaně vortexována 8 x po 30 s. Pak bylo přidáno 0,2 ml TE a suspenze byla stočena (14 000 g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkušavky, byl přidán 1 ml absolutního ethanolu, směs byla promíchána otočením a stočena (14 000 g, 15 min, 4°C). Sediment byl resuspendován v 0,4 ml TE s RNAsou (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a inkubován 5 minut při 37 °C. DNA pak byla přesrážena ethanolem (1 ml) v přítomnosti 4 M octanu amonného (10 μl) a resuspendována v 50 μl TE. Velikost fragmentů genomové DNA a jejich množství bylo zjištěno elektroforeticky.

4.2.1.7 Příprava plasmidů homologní rekombinací

Pro přípravu plasmidů byla v některých případech používána metoda homologní rekombinace (Ma *et al.*, 1987; Tucker, 2002). Klonovaný fragment DNA byl namnožen pomocí PCR s použitím primerů obsahujících asi 40 nt přesahy homologní k cílové sekvenci v klonovacím vektoru. Produktem PCR pak byly transformovány buňky *S. cerevisiae* společně s klonovacím vektorem linearizovaným libovolným enzymem mezi oblastmi pro homologní rekombinaci (obr. 4.2). Plasmidy připravené tímto způsobem byly z kvasinek izolovány a po pomnožení v buňkách *E. coli* bylo správné

vložení klonovaného fragmentu ověřeno restrikcčním štěpením, v některých případech i sekvenováním.



Obr. 4.2 Příprava plasmidu homologní rekombinací v *S. cerevisiae*

4.2.1.8 Izolace plasmidové DNA z kvasinek

Pro izolaci plasmidové DNA byl použit protokol popsáný v Hoffman a Winston (1987). Kvasinky byly přes noc napěstovány ve 2 ml tekutého média YNB-NH₄ a sklizeny centrifugací (3000 g, 2 min). K suspenzi bylo přidáno 0,2 ml roztoku TSN, 0,2 ml směsi fenol–chloroform–isoamylalkohol a 0,3 g sterilních „acid-washed“ skleněných kuliček, pak byla mikrozkuhavka umístěna do ledu a přerušovaně vortexována 2 x po 60 s. Suspenze byla stočena (14 000 g, 5 min), horní vrstva byla odebrána do nové mikrozkuhavky, byl přidán 1 objem EtOH, směs byla promíchána, umístěna na 20 min do -20 °C a stočena (14 000 g, 15 min, 4 °C). Sediment byl omyt

80% EtOH a rozpuštěn ve 20 μ l TE. Pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* pak bylo použito 1-3,5 μ l roztoku plasmidu.

4.2.1.9 Transformace kvasinek

Kvasinky *S. cerevisiae* byly transformovány elektroporací (Bloch *et al.*, 1992) pomocí přístroje Jouan. Buňky narostlé přes noc v 80 ml tekutého média YPG do $OD_{600} = 1,8 - 2,1$ (spektrofotometr Eppendorf, odpovídá asi $1,2 \times 10^7$ buněk/ml) byly sklizeny centrifugací (3 min, 3000 g) a promyty sterilní vodou. Odstředěné buňky byly resuspendovány v 8 ml (tj. v 1/10 původního objemu) 25 mM vodného sterilního roztoku dithiothreitolu (DTT, připravený ze zásobního 1 M vodného roztoku skladovaného při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě byly buňky promyty sterilní ledovou vodou a poté sterilním ledovým pufrem TpEB. Nakonec byly buňky resuspendovány v 800 μ l ledového pufru TpEB (tj. v 1/100 původního objemu). Ke 100 μ l suspenze buněk přenesených do vychlazených elektroporačních kyvet byla přidána DNA (asi 0,1-0,3 μ g pDNA izolované z *E. coli* nebo 0,1 μ g neštěpeného plasmidu a 0,2-0,3 μ g insertu pro homologní rekombinaci nebo 0,1-0,3 μ g deleční kazety). Elektroporace byla prováděna elektrickým pulsem 625 V / 24 ms. Poté bylo k buňkám přidáno 100 μ l ledové sterilní vody. Po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě byly buňky vysety na selekční médium.

Jednotlivé kolonie ze selekčních misek byly po dvou až třech dnech přeočkovány na novou misku a alespoň tři kandidáti z každé transformace byli otestováni v kapkových testech. V případě shodného chování byl zvolen jeden z kandidátů a s tím bylo pokračováno v další práci.

4.2.1.10 Polymerasová řetězcová reakce (PCR)

Polymerasová řetězcová reakce byla používána pro namnožení delečních kazet, genů a zavedení cílených mutací do DNA tak, aby vznikla nová restriční místa. Mutace byly vytvořeny v navrhovaných primerech (kap. 4.1.5). Dále byla PCR používána pro ověření úspěšnosti delece genů na chromosomu, případně inserce fluorescenčního markeru. Amplifikace DNA pomocí Tripple Master PCR System, Platinum Pfx polymerase nebo PPP Master Mix probíhala v přístroji Mastercycler gradient (od firmy Eppendorf).

4.2.1.11 Příprava templátu pro „colony“ PCR

Pro vyhledání buněk se správně integrovanou deleční kazetou mezi mnoha koloniemi po transformaci byla používána metoda „colony PCR“ podle upraveného protokolu z (Akada *et al.*, 2000). Čerstvě narostlé kolonie byly resuspendovány v 10 μl H_2O a 7,5 μl suspenze bylo přeneseno do jiné mikrozkušavky, kam bylo předtím napipetováno 2,5 μl čerstvě připraveného 1% SDS. Směs byla 30 s vortexována, pak bylo přidáno 90 μl vody a buňky byly stočeny (3 min, 14 000 x g). Jako templát pro PCR bylo používáno 0,5 μl supernatantu.

4.2.1.12 Sekvenování DNA a analýza sekvencí

Po inzerci fragmentů namnožených PCR do vektorů byly oba řetězce DNA sekvenovány v automatickém sekvenátoru dideoxynukleotidovou terminační metodou (Sanger *et al.*, 1977) pomocí soupravy Thermo Sequenase Sequencing Kit (Amersham Life Science Inc., USA). Sekvenování bylo prováděno ve spolupráci s dr. J. Felsbergem a dr. R. Haugvicovou z Mikrobiologického ústavu AV ČR.

Sekvence DNA i proteinů byly analyzovány pomocí programu Lasergene99 (DNASTAR Inc., USA).

4.2.2 Biochemické a biofyzikální metody

4.2.2.1 Měření transportu a stanovení koncentrace K^+ v buňkách kvasinek

Měření výstupu a stanovení vnitrobuněčné koncentrace K^+ v kvasinkách bylo provedeno podle (Kinclová *et al.*, 2001). Buňky byly napěstovány v 50 ml tekutého média YNB- NH_4 do časně exponenciální fáze (tj. do $\text{OD}_{600} = 0,6 \pm 10\%$; $\text{OD}_{600} = 1$ odpovídá asi $0,5 \times 10^7$ buněk při měření Biophototmetrem Eppendorf), sklizeny centrifugací (3500 ot., 3 min), promyty deionizovanou vodou a resuspendovány v 50 ml bezdraslíkového inkubačního pufru (složení viz kap. 4.1.6). Z buněčné suspenze byly odebírány 5 ml vzorky a přefiltrovány přes membránové filtry Millipore (průměr pórů 0,8 μm). Filtry s buňkami byly rychle promyty 20 mM MgCl_2 a vloženy do zkumavek s extrakčním roztokem (složení viz kap. 4.1.6).

Po kyselé extrakci buněk byl obsah kationtů v jednotlivých vzorcích stanoven atomovou absorpční spektroskopií (Haro *et al.*, 1991; Rodríguez-Navarro a Ramos,

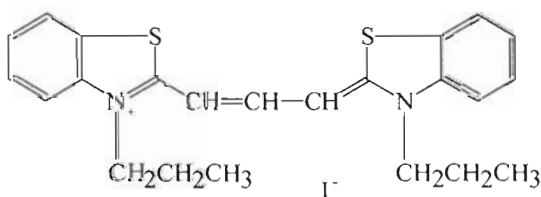
1984) a přepočten na $[K^+]$ (nmol/mg suché váhy). $OD_{600} = 1$ odpovídá asi 0,28 mg suché váhy buněk (Kinclová, ústní sdělení). Stanovení obsahu kationtů ve vzorcích prováděla dr. V. Korunová z ÚIACH AV ČR na přístroji Perkin-Elmer Aanalyst 800.

4.2.2.2 Měření membránového potenciálu pomocí fluorescenční sondy diS-C₃(3)

Měření membránového potenciálu bylo prováděno pomocí distribuční fluorescenční sondy diS-C₃(3) (Denksteinová *et al.*, 1997) ve spolupráci s dr. E. Urbánkovou z Fyzikálního ústavu MFF UK podle dříve publikovaného protokolu (Gášková *et al.*, 1999).

Netransformované kmeny kvasinek byly pěstovány v tekutém médiu YPG. Tekuté preinokulum (10 ml) bylo inkubováno přes noc v rotačním inkubátoru při 30 °C, ráno byla zaočkována hlavní kultura (10 ml) do $OD_{600} = 0,1$ a ta potom rostla do exponenciální fáze ($OD_{600} = 0,8-1,5$). Kmeny transformované plasmidem byly pěstovány v tekutém médiu YNB-NH₄ s auxotrofními přísadkami (adenin, histidin a tryptofan 20 µg/ml, leucin 30 µg/ml). Hlavní kultura byla zaočkována do $OD_{600} = 0,02$ a buňky byly odebírány na měření při $OD_{600} = 0,2 - 0,3$.

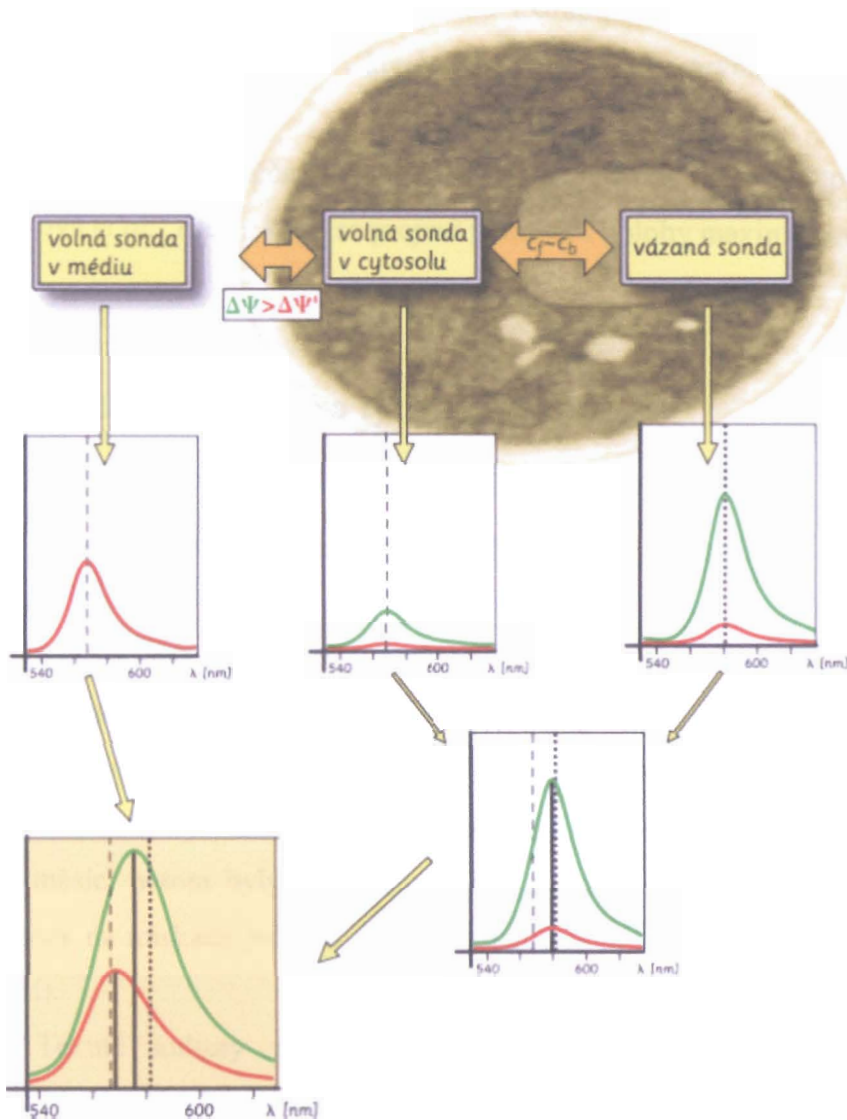
Buňky byly sklizeny centrifugací, promyty vodou a resuspendovány ve 3 ml 10 mM citrát-fosfátového pufru pH 6,0 do $OD_{600} = 0,100 \pm 5\%$. Byla přidána fluorescenční sonda diS-C₃(3) (z 10^{-4} M zásobního roztoku v ethanolu) do výsledné koncentrace 2×10^{-7} M.



Obr. 4.3 Fluorescenční sonda diS-C₃(3)

Emisní spektrum fluorescence bylo měřeno na spektrofluorimetru FluoroMax 2 vybaveném xenonovou lampou. Excitační vlnová délka byla 531 nm, emisní rozmezí 560 – 590 nm, rozptýlené světlo bylo eliminováno oranžovým skleněným filtrem s hraniční vlnovou délkou 540 nm. Trvání jednoho spektrálního skenu bylo 20 s.

Vazba sondy diS-C₃(3) na molekuly uvnitř buňky (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny,...) zvyšuje kvantový výtěžek a posouvá emisní spektrum do červena (obr. 4.4). Poloha maxima emisního spektra je tedy závislá na koncentraci sondy uvnitř buněk (Plášek *et al.*, 1994). Sonda (kladně nabitá) vstupuje do buněk v závislosti na jejich membránovém potenciálu a zároveň je aktivně vylučována pumpami MDR: Pdr5 a Snq2 (Gášková *et al.*, 2002). Za podmínek, kdy by aktivita pump MDR měla být stejná (jako je tomu mezi isogenními kmeny používanými v této práci) by tedy rozdíly v posunu emisního maxima měly odpovídat rozdílům v membránovém potenciálu.



Obr. 4.4 Jednotlivé komponenty spektra diS-C₃(3) (Gášková, 2000).

Posun maxima emisního spektra v závislosti na vazbě sondy diS-C₃(3) na vnitrobuněčné komponenty probíhá v závislosti na čase (obr. 4.5). Přibližně po dvaceti minutách od přidání fluorescenční sondy dochází k ustavení rovnovážného stavu (Čadek *et al.*, 2004). Naměřenými hodnotami byla proložena tzv. barvicí křivka (tj. závislost vlnové délky maxima emisního spektra $\lambda_{\max}(t)$ na čase měření t) podle rovnice

$$\lambda_{\max}(t) = \lambda_{\max}^{eq} + C_1 e^{-C_2 t/60}$$

kde $\lambda_{\max}(t)$ odráží aktuální intracelulární koncentraci sondy, λ_{\max}^{eq} vyjadřuje polohu fluorescenčního maxima v rovnováze, C_2 je rychlost růstu fluorescenčního maxima, C_1 vyjadřuje rozdíl mezi polohou maxima extrapolovanou do nultého času a polohou rovnovážného maxima λ_{\max}^{eq} , která je závislá na čase prvního experimentálního bodu (Maláč *et al.*, 2005).

Přidá-li se k buněčné suspenzi protonofor CCCP, dojde k depolarizaci membrány (Gášková *et al.*, 1998), která se projeví poklesem polohy maxima emisního spektra.

4.2.3 Mikrobiologické a fyziologické metody

4.2.3.1 Uchovávání a kultivace buněk

Kmeny bakterií i kvasinek byly dlouhodobě uchovávány v 20% glycerolu při -80 °C.

Krátkodobě byly bakterie uchovávány na miskách s médiem LBA v lednici (1-2 dny), potom byly použity pro izolaci plasmidu nebo zamraženy. Kultivace bakteriálních kultur (maximálně 24 hodin) probíhala v termostatovaném inkubátoru při 37 °C.

Kvasinky byly na miskách s médiem YPG nebo YNB-NH₄ uchovávány v lednici až 1 měsíc, potom byly zamraženy nebo přeočkovány na čerstvou misku. Kultivace kvasinek na miskách probíhala v termostatovaném inkubátoru při teplotě 28-30 °C (2-10 dní).

Tekuté kultury bakterií i kvasinek do objemu 2 ml byly inkubovány v jednorázových plastových mikrozkušavkách uzavřených filtry Eppendorf Lid_{Bac} při 1400 rpm v přístroji Thermomixer Comfort Eppendorf. Větší objemy byly kultivovány ve skleněných baňkách (objem kultury nepřesahoval ¼ objemu baňky) při 180 rpm v rotačním inkubátoru Minitron, Infors AG.

4.2.3.2 Mikroskopie kvasinek

Fotografie kvasinkových buněk z mikroskopu Olympus AX70 byly snímány digitální kamerou Olympus DP70. Pro vizualizaci proteinů značených fluorescenčními proteiny byly používány různé fluorescenční hranoly, jak je uvedeno v tab. 4.5.

Tab. 4.5 Parametry fluorescence u mikroskopu Olympus

fluorescenční protein	fluorescenční hranol	excitační filtr	bariérový filtr
GFP	U-MWB	450-480 nm	515 nm
RFP, dsRed	U-MWIY	540-580 nm	610 nm
CFP	U-MNV	400-410 nm	455 nm

Pro konfokální mikroskopii byl používán mikroskop Leica TCS SP2 s laserovou excitací a volně nastavitelným rozmezím detekce fluorescence. Konfokální mikroskopie byla prováděna ve spolupráci s Oddělením biomatematiky (Ing. J. Zavadil, Ing. K. Mitrová). Pro detekci emise fluorescenčních proteinů byly používány parametry uvedené v tab. 4.6.

Tab. 4.6 Parametry fluorescence u mikroskopu Leica

fluorescenční protein	laser	detekce
CFP	458 nm	464-482 nm
GFP	488 nm	494-508 nm
YFP	514 nm	540-600 nm

4.2.3.3 Růstové křivky

Růstové křivky byly měřeny jako nárůst optické hustoty buněk v médiu YPG. 25 ml tekutého média bylo zaočkováno do $OD_{600} = 0,01$. Baňky byly inkubovány v termostatovaném vodním rotačním inkubátoru při 30 °C a v pravidelných časových intervalech byly odebírány vzorky pro měření OD_{600} .

4.2.3.4 Charakterizace růstu buněk pomocí kapkových testů

Schopnost růstu kvasinek za různých růstových podmínek (soli v médiu, různé pH, různé zdroje uhlíku atd.) byla testována pomocí tzv. kapkových testů na pevných médiích YPG, YNB-NH₄ nebo AP (jak je uvedeno v textu). Buňky testovaných kmenů byly resuspendovány ve vodě na shodnou výchozí OD_{600} (okolo 1), ve sterilní miktotitrační destičce byla připravena série čtyř desetinásobných ředění a kapky (asi 3 μ l) byly přeneseny na Petriho misky s médiem pomocí aplikátoru typu „ježek“.

V případě gradientových misek (viz kap. 4.1.1) nebylo prováděno ředění buněčných suspenzí. Všechny kapky měly stejnou výchozí OD_{600} , a čím byl kmen tolerantnější vůči testované látce, tím více kapek v řadě mohlo růst. Misky byly inkubovány při 30 °C (obvykle 2 dny) a černobílé nebo barevné snímky byly pořizovány digitálním fotoaparátem Nikon Coolpix4500. Černobílé fotografie byly ve většině případů pro větší názornost převedeny na negativ.

5 Přehled výsledků

První část práce je věnována stanovení lokalizace a funkce proteinu Kha1. V další části pak byly zkoumány jeho interakce a souvislosti s činností dalších proteinů *S. cerevisiae*, především Gef1p a Tok1p. V kvasinkách byla také studována možná funkce rostlinného homologu Kha1p z *Arabidopsis thaliana* – AtChx17p.

5.1 Hledání fenotypového projevu mutace *kha1Δ*

Na základě předpokladu, že protein Kha1 se podílí na transportu alkalických kationtů z buněk (Ramírez *et al.*, 1998), byl nejprve hledán fenotypový projev mutace *kha1* spojený s extracelulární koncentrací draselných kationtů. Je známo, že delece genů kódujících systémy pro export alkalických kationtů z buněk (Ena1-4p a Nha1p) způsobí zvýšení citlivosti buněk k solím alkalických kationtů v médiu (Bañuelos *et al.*, 1998). Pokud by primární funkcí proteinu Kha1 bylo vylučování K^+ z buněk, měl by mutantní kmen *kha1* být citlivější ke zvýšené extracelulární koncentraci K^+ .

5.1.1 Srovnání dříve popsaných kmenů

Mezi kmenem Mex W303 a mutantem Mex *kha1::URA3*, které byly získány od autorů první publikace o proteinu Kha1 (Ramírez *et al.*, 1998), byl sice nalezen rozdíl v toleranci k draselným iontům v médiu, ale přesně opačný, než by odpovídalo funkci proteinu exportujícího K^+ z buněk: kmen Mex W303 toleroval nižší koncentraci KCl v médiu než mutant Mex *kha1::URA3* (obr. 5.1). To by mohlo naznačit opačnou funkci proteinu Kha1 – pokud by transportoval K^+ směrem do buněk, bylo by logické, že mutant je schopen tolerovat vyšší extracelulární koncentraci K^+ . Takovému vysvětlení ovšem neodpovídá skutečnost, že kmen W303-1A používaný dříve v naší laboratoři (na rozdíl od mexického kmene W303) byl schopen tolerovat stejnou koncentraci KCl, jako mexický mutant *kha1::URA3* (obr. 5.1).



Obr. 5.1 Růst kmenů na médiu YNB-NH₄ s KCl. Koncentrace KCl vzrůstá zleva doprava.

I při testování tolerance k dalším solím (NaCl, LiCl) rostl mexický kmen W303 hůře než kmen W303 používaný v naší laboratoři (viz kap. 5.1.5.1). Pro další práci byl tedy využíván „náš“ kmen W303 a mutanty KMW 40-1 (*MAT α khal::URA3*) a KMW 40-4 (*MAT α khal::URA3*), které byly připraveny křížením kmene W303 (používaného v naší laboratoři) s kmenem Mex *khal::URA3* a následnou tetradovou analýzou. Jak je vidět na obr. 5.2, kmen KMW40-1 toleruje stejnou extracelulární koncentraci KCl jako jeho rodičovský kmen W303-1B (*MAT α*). Rovněž kmen KMW 40-4 byl schopen tolerovat stejnou koncentraci KCl v médiu jako kmen W303-1A (*MAT α*).



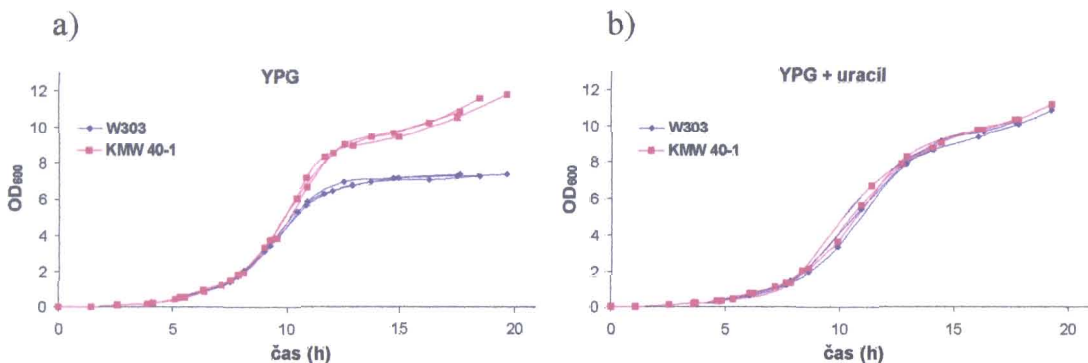
Obr. 5.2 Růst kmenů na médiu YNB-NH₄ s KCl. Koncentrace KCl vzrůstá zleva doprava.

Dále byly měřeny růstové křivky kmenů W303-1B a KMW 40-1 v médiu YPG, protože podle původní publikace o proteinu Kha1 by mutantní kmen *khal* měl růst rychleji než kmen W303 (Ramírez *et al.*, 1998). Autoři publikace se domnívali, že delecí genu kódujícího exportní systém pro K⁺ se zvýší vnitrobuněčný obsah draselných iontů, zvýší se osmotický tlak, zrychlí se metabolismus a proto buňky rostou rychleji (Ramírez *et al.*, 1998).

Jak je vidět na obr. 5.3a, ve standardním médiu YPG rostly kmeny W303 a KMW 40-1 zpočátku stejně rychle, ale okolo 10. hodiny inkubace kmen W303 zpomalil růst, zatímco mutant KMW 40-1 pokračoval v exponenciálním růstu až do 12. hodiny a i potom rostl o něco rychleji než kmen W303. Shodná počáteční rychlost růstu

kmenů vnesla určitou pochybnost do interpretace závislosti rychlosti dělení buněk na genu *KHAI*. Protože kmen W303 je auxotrofní na uracil, zatímco kmen KMW 40-1 nese disruptční kazetu *URA3* a je tedy schopen uracil syntetizovat, byla dále měřena rychlost růstu těchto kmenů v médiu YPG s přidavkem uracilu (20 $\mu\text{g/ml}$).

Na obr. 5.3b je vidět, že při růstu v médiu s přidavkem uracilu kmen W303 dosahoval stejné rychlosti růstu jako mutant KMW 40-1 po celou dobu měření (20 hodin). Z toho vyplývá, že rozdíl růstu kmenů ve standardním médiu YPG není způsoben disruptcí genu *KHAI*, ale přítomností genu *URA3*. Kolem desáté hodiny inkubace zřejmě dojde ke značnému snížení koncentrace uracilu v médiu a kmen W303, který je ura^- (narozdíl od kmene KMW 40-1), je zpomalen v růstu. Přídavek uracilu do média tento rozdíl kompenzuje. Nepotvrdil se tedy ani druhý publikovaný fenotyp delece *kha1* – rychlejší růst v médiu YPG souvisel s genem *URA3*.



Obr. 5.3 Růst kmenů v YPG s přidavkem uracilu (20 $\mu\text{g/ml}$) nebo bez něj. 20 ml média YPG bylo zaočkováno do $\text{OD}_{600} = 0,01$ a inkubováno v rotačním inkubátoru při 30 °C. Od každého kmene byly měřeny tři nezávislé kultury.

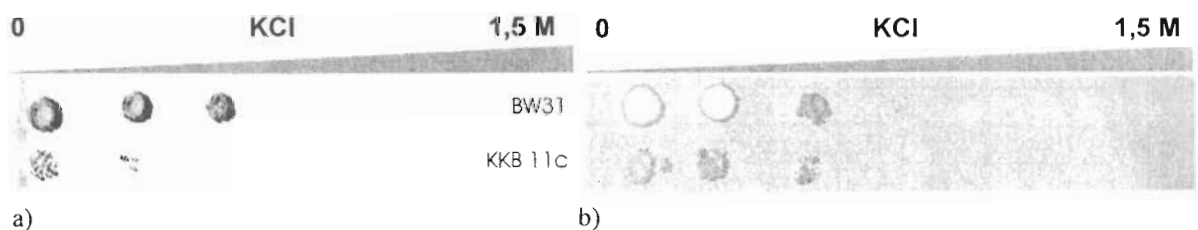
5.1.2 Srovnání kmene BW31 a KKB 11c

Protože nebylo možno zopakovat fenotypy mutace *kha1* publikované v původní práci o proteinu Kha1 (Ramírez *et al.*, 1998), pro další práci byly vybrány kmeny s odlišným genetickým pozadím. Pokud by totiž Kha1p exportoval draselné ionty z buněk, v kmeni W303 by jeho činnost mohla být překryta funkcí dalších proteinů exportujících K^+ , především ATPas Ena1-4 a antiporteru Nha1.

Jako kontrolní kmen byl tedy zvolen kmen BW31 postrádající geny *ENAI-4* a *NHA1*, které kódují známé transportní systémy pro aktivní export K^+ z buněk. Od něj byl odvozen testovaný kmen KKB 11c (*enal-4Δ nha1Δ khalΔ*). Případný fenotypový projev mutace *khal* nemohl tedy být stíněn činností proteinů Enal a Nha1.

S kmeny BW31 a KKB 11c byla provedena široká série kapkových testů a byla sledována jejich citlivost k alkalickým kationtům v závislosti na pH média. Na médiu YNB-NH₄ s neupraveným pH jsou oba kmeny schopny tolerovat nejvýše 0,9 M KCl, 0,3 M NaCl a 3 mM LiCl. Při pH 7 (pufr 20 mM MOPS) kmeny tolerují nejvýše 0,5 M KCl, nad pH 8 nerostou ani v nepřítomnosti solí. Za žádných z těchto podmínek se kmen KKB 11c od kmene BW31 nelišil, a nebylo tedy možné stanovit vliv proteinu Khal na toleranci vůči alkalickým kationtům.

Na minimálním arginin-fosfátovém (AP) médiu byl nalezen jediný výrazný rozdíl v růstu kmene KKB 11c oproti BW31: při pH 6,5 toleroval kmen KKB 11c podstatně nižší koncentraci KCl než kmen BW31 (viz obr. 5.4a). Při pH 4,5 rozdíl nebyl tak výrazný (obr. 5.4b). AP médium je chemicky přesně definované syntetické minimální médium, jehož hlavními složkami jsou arginin (zdroj N) a kyselina fosforečná (úplné složení viz kap. 4.1.1). Používá se pro sledování fenotypových projevů mutací tam, kde není možné najít vhodné podmínky na médiích YPG a YNB-NH₄.



Obr. 5.4 Růst kmenů na médiu AP s KCl, a) pH 6,5; b) pH 4,5

Snížená citlivost kmene s delecí *khal* ke KCl by odpovídala funkci proteinu předpovězené autory publikace (Ramírez *et al.*, 1998). Bylo ovšem zářející, že fenotyp byl výraznější při vyšším pH – antiportery využívající gradient H^+ jako zdroj energie pro transport kationtů alkalických kovů fungují lépe při pH nižším (nadbytek protonů v extracelulárním prostředí usnadňuje export kationtů).

5.1.3 Příprava plasmidů pro komplementaci delece *kha1*

Pro ověření souvislosti mezi pozorovaným fenotypovým projevem a delecí genu *KHA1* byla nejprve připravena série plasmidů nesoucích gen *KHA1* za různě silnými promotory. Byl vybrán silný promotor *PMA1*, slabý konstitutivní promotor *NHA1* a vlastní promotor *KHA1*, aby bylo možno porovnat vlastnosti proteinu v závislosti na úrovni jeho exprese. Ze stejného důvodu byly připraveny některé konstrukty mnohokopiové a jiné centromerové. Například množství proteinu *Kha1* exprimovaného z centromerového vektoru pod regulací vlastního promotoru *KHA1* by mělo odpovídat množství proteinu exprimovaného z chromosomu, zatímco množství proteinu exprimovaného z mnohokopiového vektoru pod regulací silného promotoru *PMA1* by mělo být mnohonásobně vyšší. V některých konstruktech byla k 3'-konci genu *KHA1* připojena sekvence kódující zelený fluorescenční protein (GFP) pro pozdější možnost sledování lokalizace proteinu v buňkách. Přehled konstruktů je v tab. 5.1.

Tab. 5.1 Seznam konstruktů nesoucích kódující oblast pro *Kha1p* připravených pro komplementaci fenotypových projevů delece *kha1*

konstrukt	velikost (bp)	odvozen od	selekční znaky	replikon	promotor	značení
KKYE _p	8489	YE _p 352	Amp ^R , URA3	2μ	<i>KHA1</i>	-
NKYE _p	8533	YE _p 352	Amp ^R , URA3	2μ	<i>NHA1</i>	-
PKYE _p	8577	YE _p 352	Amp ^R , URA3	2μ	<i>PMA1</i>	-
KKG _p	9014	pGRU1	Amp ^R , URA3	2μ	<i>KHA1</i>	GFP
NKG _p	8990	pGRU1	Amp ^R , URA3	2μ	<i>NHA1</i>	GFP
KKYC _p	8909	YCplac33	Amp ^R , URA3	centromera	<i>KHA1</i>	-
NKYC _p	8953	YCplac33	Amp ^R , URA3	centromera	<i>NHA1</i>	-
PKYC _p	8997	YCplac33	Amp ^R , URA3	centromera	<i>PMA1</i>	-
KKGYC _p	9647	YCplac33	Amp ^R , URA3	centromera	<i>KHA1</i>	GFP
NKGYC _p	9643	YCplac33	Amp ^R , URA3	centromera	<i>NHA1</i>	GFP
PKGYC _p	9755	YCplac33	Amp ^R , URA3	centromera	<i>PMA1</i>	GFP

Gen *KHAI* byl amplifikován pomocí PCR a enzymu Tripple Master PCR System od firmy Eppendorf. Při navrhování byla do primerů pro PCR (tab. 4.4) zavedena restrikční místa pro štěpení vhodnými restrikčními endonukleasami a vložení do vektorů pomocí T4 DNA ligasy. Pro přípravu konstruktů, kde exprese genu *KHAI* je regulována jeho vlastním promotorem, byl PCR namnožen úsek DNA odpovídající ORFu *KHAI* plus oblasti 707 bp před ORFem (celková délka PCR produktu byla 3,3 kb). Pro přípravu konstruktů s jinými promotory (*NHAI* nebo *PMAI*) byl PCR namnožen pouze úsek odpovídající ORFu *KHAI* (délka PCR produktu byla 2,6 kb). Tento fragment byl po restrikčním štěpení ligací vložen do vektoru YEp352 a restrikčním štěpením byla ověřena jeho velikost. V dalším kroku byly před gen *KHAI* opět restrikčním štěpením a ligací vloženy promotory *NHAI* nebo *PMAI* vyštěpené z jiných plasmidů.

Do vektorů pGRU1 a YCplac33 byl fragment genu *KHAI* vkládán již s příslušnými promotory (po vyštěpení z konstruktů odvozených od YEp352).

Pro připojení kódující sekvence GFP za ORF *KHAI* bylo těsně před stop kodón zavedeno restrikční místo *XbaI* (tab. 4.4). Štěpení plasmidu pGRU1 enzymem *XbaI* umožňuje napojení sekvencí bez přerušení čtecího rámce (obr. 5.5).

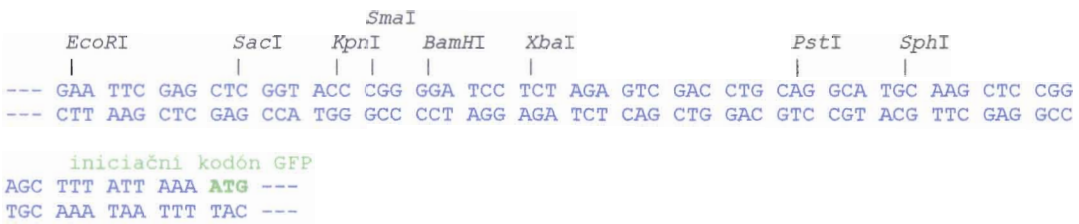
a) zavedení restrikčních míst do sekvence *KHAI*



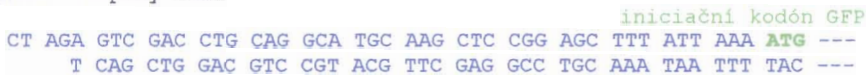
b) konec genu *KHAI* štěpený *XbaI*



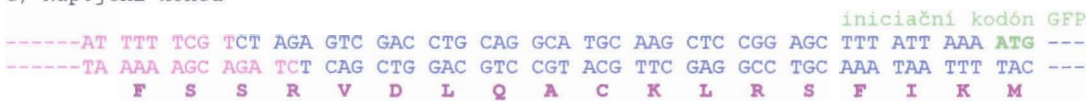
c) polylinker vektoru pGRU1



d) polylinker štěpený *XbaI*



e) Napojení konců



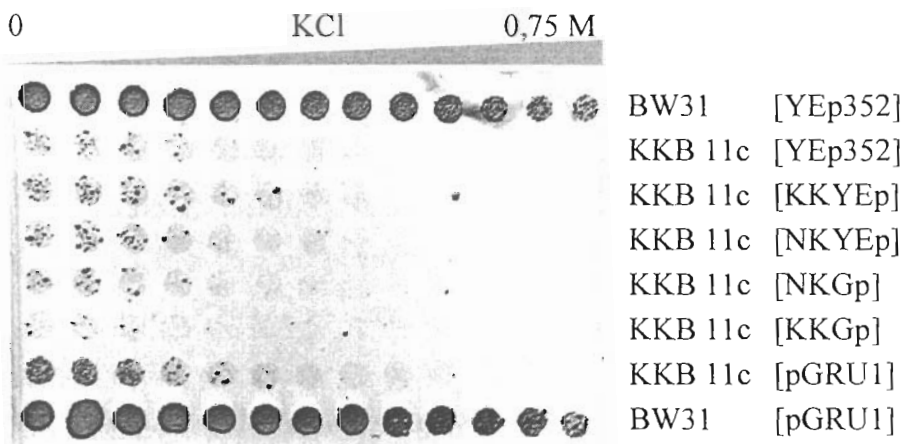
Obr. 5.5 Připojení sekvence kódující GFP ke genu *KHAI* bez přerušení čtecího rámce

5.1.4 Růst transformovaných kmenů

Připravenými konstrukty a kontrolními prázdnými plasmidy (YEplac352, pGRU1 a YCplac33) byl transformován kmen KKB 11c. Kontrolními prázdnými plasmidy byl zároveň transformován i kmen BW31, aby bylo možné porovnání růstu obou kmenů na médiích bez přídavku uracilu a předešlo se tak rozdílnému chování kmenů na základě rozdílného metabolismu uracilu.

S koloniemi získanými po transformaci (Ura^+) byl proveden kapkový test na zjištění komplementace fenotypu kmene KKB 11c. Jak je vidět na obr. 5.6, žádný z testovaných konstruktů nesoucích gen *KHAL* nebyl schopen zvýšit toleranci kmenu KKB 11c ke KCl na médiu AP pH 6,5. Z toho vyplývá, že buď byly konstrukty nefunkční, nebo rozdíl v růstu kmenů za těchto podmínek nebyl způsoben delecí *kha1*.

Při růstu kapek buněčných suspenzí na médiu AP s KCl byl pozorován růst tzv. „single“ kolonií (obr. 5.6, patrné zejména u kmene KKB 11c). Tento jev lze vysvětlit pravděpodobným vznikem spontánních mutací umožňujících transport K^+ v transportních systémech, které původně draselné ionty netransportovaly. Takové mutace jsou poměrně běžné u buněk postrádajících transportní systémy pro vstup K^+ do buněk při nedostatku draselných iontů v médiu (viz kap. 2.4.4.1). Je tedy možné, že v buňkách postrádajících exportní systémy pro K^+ (*Enal-4p* a *Nhalp*) dojde k podobným procesům při zvýšené koncentraci K^+ v médiu.



Obr. 5.6 Růst transformovaných kmenů na médiu AP pH 6,5. Koncentrace KCl se postupně zvyšuje zleva doprava. Kmen BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*) a KKB 11c (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*) transformované různými vektory a konstrukty (KKYEp = *KHAL* s vlastním promotorem v YEp352, NKYEp = *KHAL* s promotorem *NHA1* v YEp352, NKGp = *KHAL* s promotorem *NHA1* v pGRU1, KKGp = *KHAL* s vlastním promotorem v pGRU1).

Konstrukty KKYEp, KKGp a NKGp byly sekvenovány pro ověření zachování celistvosti ORFu *KHAI* a správného napojení GFP bez přerušení čtecího rámce. Bylo zjištěno, že konstrukty nesoucí gen *KHAI* za vlastním promotorem obsahují dvě bodové mutace: v pozici 2110 (adenin místo guaninu), způsobující aminokyselinovou záměnu alaninu 704 za threonin, a v pozici 2212 (cytosin místo thyminu), způsobující záměnu tyrosinu 738 za histidin. V konstruktu NKGp se tyto mutace nenacházely. Vzhledem k tomu, že v kapkových testech se kmen transformovaný konstruktem NKGp choval stejně jako kmeny transformované konstrukty KKYEp a KKGp, neschopnost těchto konstruktů komplementovat rozdíl mezi kmeny KKB11c a BW31 pravděpodobně nebyla způsobena bodovými mutacemi A704T a Y738H v proteinu Kha1. Správnost této hypotézy byla ověřena později, viz kap. 5.2.

5.1.5 Srovnání širší série kmenů

Protože se nedařilo najít jiný rozdíl mezi kmeny BW31 a KKB 11c než toleranci ke KCl na médiu AP, a tento rozdíl nebyl komplementovatelný genem *KHAI* v plasmidu, byla rozšířena skupina testovaných kmenů.

Byly vybrány kmeny (tab. 5.2) s různými kombinacemi mutací v genech pro transportní systémy alkalických kationtů (*ENA1-4*, *NHA1*, *NHX1*, *KHAI* a *TOK1*) a porovnáván jejich růst na pevných médiích lišících se obsahem solí, zdroji uhlíku nebo pH. Kmen KKB 16a se stejným genotypem jako KKB 11c byl do série zařazen jako kontrola pro případ, že by kmen KKB 11c nebyl připraven správně. Jedná se o jiného kandidáta ze stejného křížení kmenů (B31-*kha1* x BW31, tab. 4.2), při kterém vznikl kmen KKB 11c. Do série byly zařazeny jak kmeny odvozené od mexických mutantů (s genem *KHAI* disruptovaným kazetou *URA3*, v tabulce vyznačeny šedě), tak kmeny s genem *KHAI* deletovaným pomocí kazety *kanMX*.

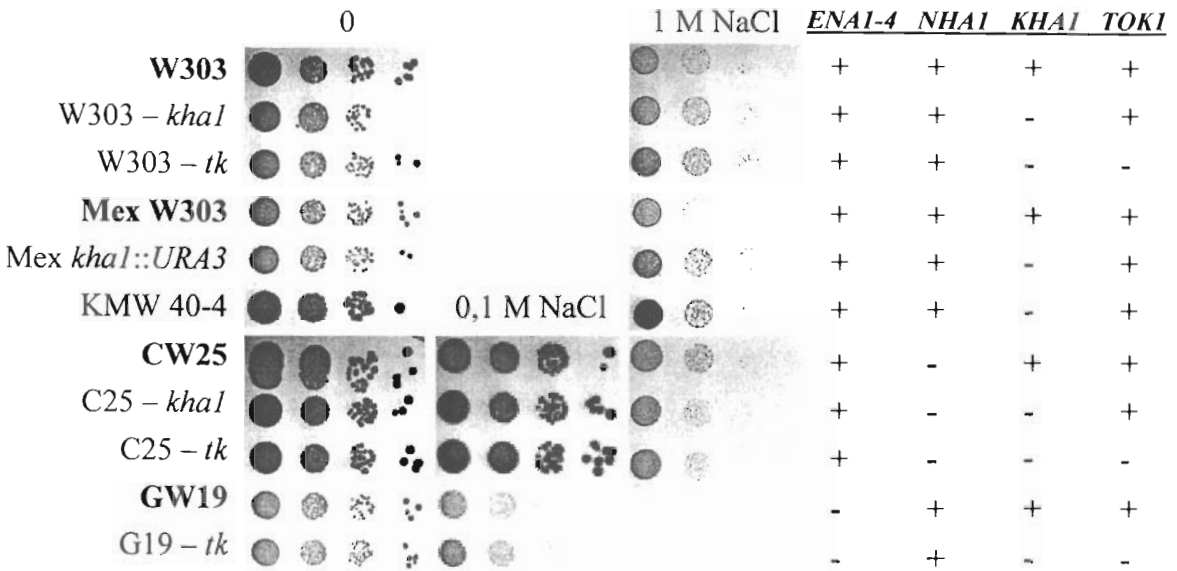
Tab. 5.2 Soubor kmenů používaný pro hledání fenotypového projevu mutace *kha1*

Kmen	<i>ENA1-4</i>	<i>NHA1</i>	<i>NHX1</i>	<i>KHA1</i>	<i>TOK1</i>
W303	+	+	+	+	+
W303 – <i>kha1</i>	+	+	+	-	+
W303 – <i>tk</i>	+	+	+	-	-
Mex W303	+	+	+	+	+
Mex <i>kha1::URA3</i>	+	+	+	-	+
KMW 40-4	+	+	+	-	+
CW25	+	-	+	+	+
C25 – <i>kha1</i>	+	-	+	-	+
C25 – <i>tk</i>	+	-	+	-	-
G19	-	+	+	+	+
G19 – <i>tk</i>	-	+	+	-	-
BW31	-	-	+	+	+
B31 – <i>kha1</i>	-	-	+	-	+
B31 – <i>tk</i>	-	-	+	-	-
KMB 1b	-	-	+	-	+
KTB 1b	-	-	+	-	-
KKB 11c	-	-	+	-	+
KKB 16a	-	-	+	-	+
AB 11c	-	-	-	+	+
KTA 40-2	-	-	-	-	-

5.1.5.1 Tolerance k solím

Skupina 20 kmenů uvedených v tab. 5.2 byla testována na toleranci k chloridům alkalických kovů (LiCl, NaCl, KCl) a k některým solím kovů alkalických zemin (CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄) na médiích YNB-NH₄ a AP pH 6,5. Na žádném z použitých médií nebyl pozorován rozdíl mezi kmeny exprimujícími gen *KHA1* oproti mutantním kmenům *kha1*. Všechny testované kmeny byly schopny ve stejné míře tolerovat 10 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂ a 50 mM MgSO₄.

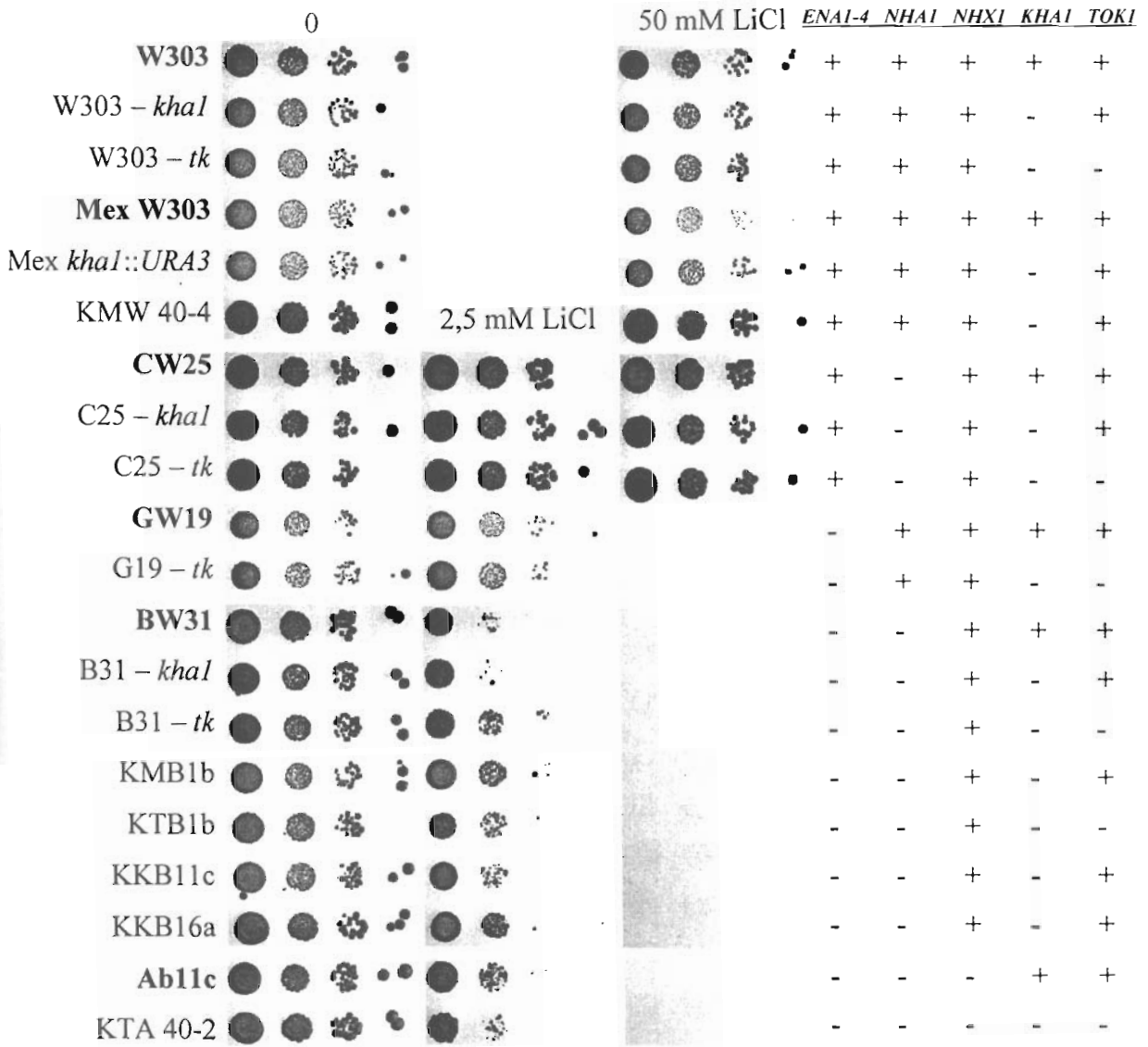
Tolerance k solím alkalických kovů se pro jednotlivé kmeny lišila, ne sice v závislosti na přítomnosti genů *KHA1* a *TOK1*, ale bylo možné pozorovat rozdíly v toleranci k solím v závislosti na přítomnosti genů *ENA1-4*, *NHA1* a *NHX1*. Vlastnosti těchto transportních systémů byly již dříve pozorovány a popsány (např. Bañuelos *et al.*, 1998; Kinclová *et al.*, 2001), v rámci této práce sloužily jako pozitivní kontrola provedení kapkových testů. Ukázky některých kapkových testů se zajímavými výsledky jsou na obrázcích 5.7 a 5.8.



Obr. 5.7 Růst kmenů na médiu AP pH 6,5 v přítomnosti NaCl.

Na obr. 5.7 je vidět, že mexický kmen W303 měl sníženou toleranci k chloridu sodnému (podobně jako u chloridu draselného, obr. 5.2). Dále je možné pozorovat, že kmeny postrádající transportní systémy *Ena1-4* rostly jen při velmi nízkých koncentracích NaCl (kmen BW31, postrádající jak ATPasy *Ena1-4*, tak antiporter *Nha1*, a od něj odvozené mutanty při 0,1 M koncentraci NaCl již nerostly).

Tolerance kmenů k LiCl (obr. 5.8) byla kvalitativně podobná jejich toleranci k NaCl. Je ovšem potřeba zdůraznit, že citlivost jednotlivých kmenů se projevuje již při koncentracích řádově nižších, než v případě NaCl, protože lithné ionty inhibují u kvasinek některé enzymy podílející se na úpravě RNA (Dichtl *et al.*, 1997). Kmeny postrádající ATPasy *Ena1-4* byly citlivější k LiCl než jejich rodičovský kmen a delece genu *NHA1* tuto citlivost ještě mírně zvyšovala. Mexický kmen W303 při vyšší koncentraci LiCl opět rostl hůře než kmen W303 používaný v naší laboratoři.

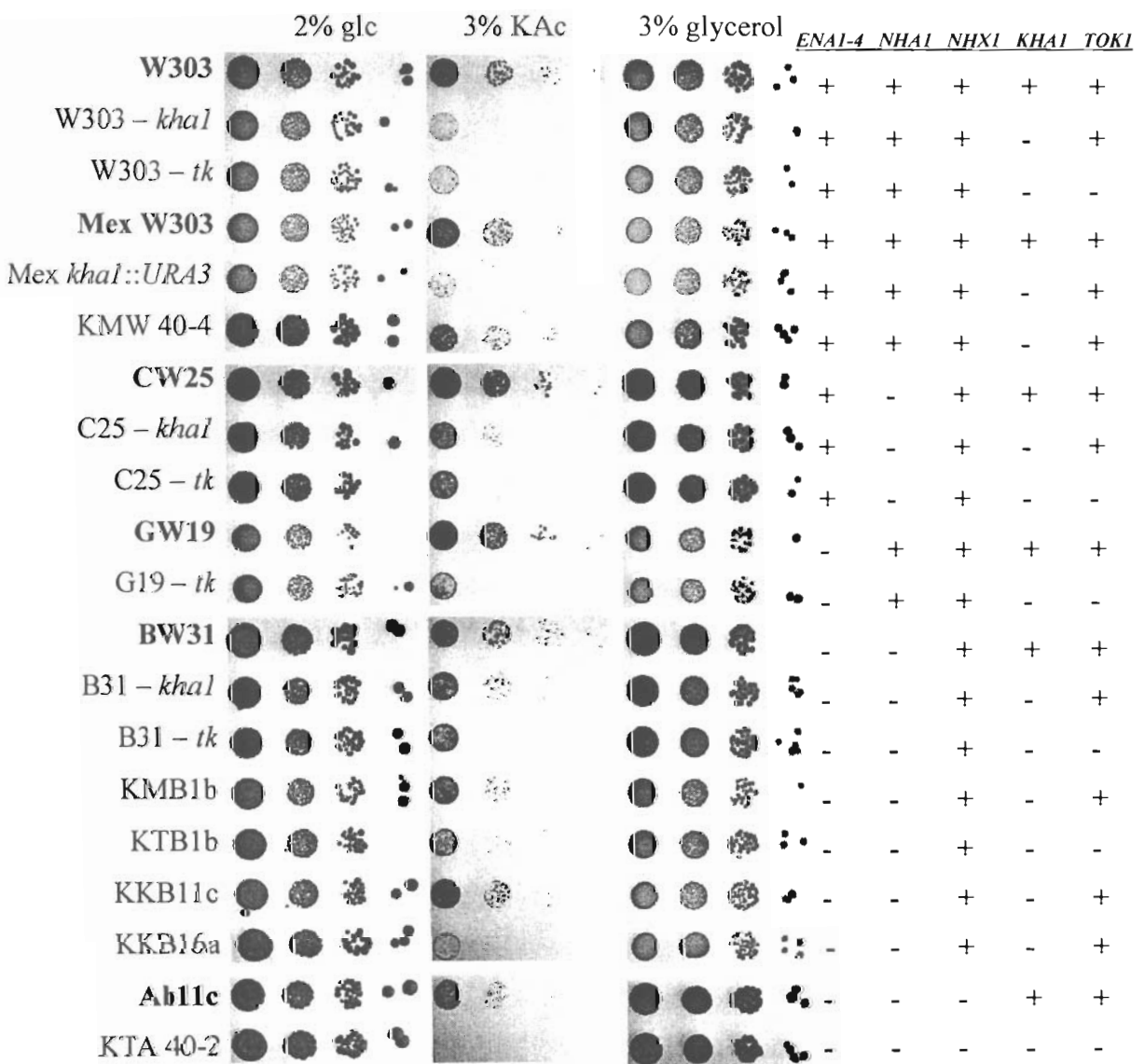
Obr. 5.8 Růst kmenů na médiu YNB-NH₄ v přítomnosti LiCl

5.1.5.2 Asimilace zdrojů uhlíku

Protože se nedařilo najít žádný fenotypový projev mutace *khal* spojený s tolerancí k solím, byla dále testována schopnost kmenů využívat různé zdroje uhlíku. Vlivem mutace *khal* na asimilaci zdroje uhlíku se již dříve zabývaly dvě skupiny v rámci projektů systematického vyhledávání fenotypových projevů delecí genů s neznámou funkcí v *S. cerevisiae* a jejich výsledky nebyly jednotné. Zatímco německá skupina dr. K. D. Entiana pozorovala zhoršený růst kmenů s delecí *khal* pouze na octanu (na ostatních zdrojích uhlíku - glukose, fruktose, manose, galaktose, ethanolu a glycerolu - rostly mutanty dobře) (Entian *et al.*, 1999); kalifornská skupina dr. L. M. Steinmetze

pozorovala neschopnost mutantů *khal* využívat všechny testované nefermentovatelné zdroje uhlíku – ethanol, glycerol a laktát (Steinmetz *et al.*, 2002).

Jak je vidět na obr. 5.9, na médiích s octanem draselným rostly mutantní kmeny *khal* většinou hůře než kmeny kontrolní (kmeny s funkční kopií genu *KHAI* jsou na obrázku zvýrazněny tučným písmem). Tento rozdíl ovšem nebyl pozorován na dalších nefermentovatelných zdrojích uhlíku (např. na glycerolu). Bylo tedy zřejmé, že rozdíl v růstu kmenů není způsoben odlišnou schopností respirace kmenů exprimujících gen *KHAI*.

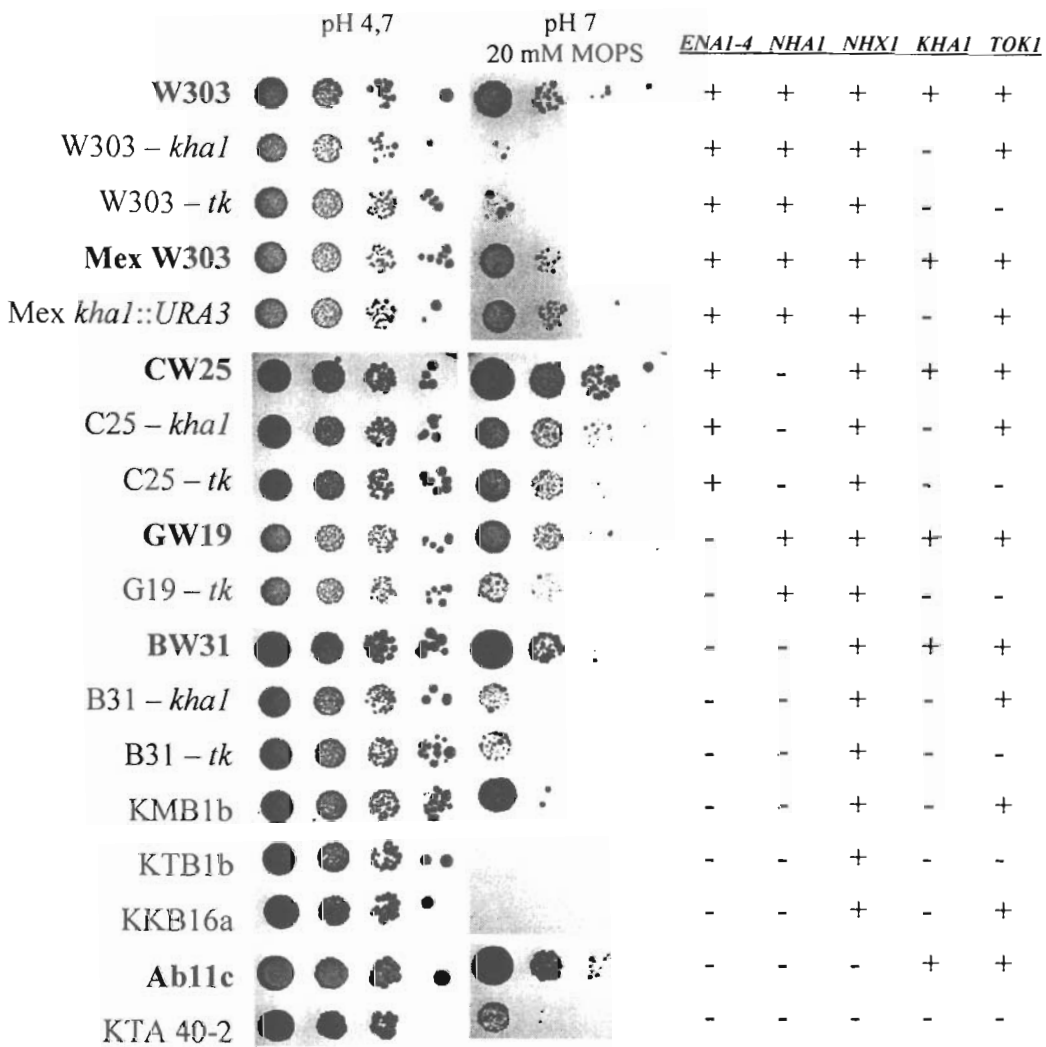


Obr. 5.9 Růst buněk na médiích YNB-NH₄ s různými zdroji uhlíku.

Důvod rozdílného růstu kmenů na médiu s octanem draselným byl odhalen dodatečnou aplikací kapky tekutého indikátoru pH (BKP) na média s různými zdroji uhlíku. Zatímco glukosa, galaktosa, ethanol a glycerol neovlivňují pH média YNB-NH₄ (indikátor se barvil žlutě až žlutohnědě), na miskách s octanem draselným se kapka BKP zabarvila fialově. Přesným měřením nově připraveného tekutého média bylo zjištěno, že 3% octan draselný zvýšil pH média asi na 7,0.

5.1.5.3 Růst na médiích se zvýšeným pH

Pro ověření hypotézy, že zhoršený růst mutantních kmenů *khal* na médiu s octanem draselným byl způsoben zvýšeným pH (a nikoliv nefermentovatelným zdrojem uhlíku), bylo připraveno médium YNB-NH₄ s 2% glukosou a jeho pH bylo upraveno na 7,0 pomocí 20 mM pufru MOPS a KOH (pH média YNB-NH₄ před úpravou bylo 4,7). Jak je vidět na obr. 5.10, i na takto připraveném médiu rostly mutantní kmeny *khal* hůře než kmeny kontrolní.



Obr. 5.10 Růst kmenů při zvýšeném pH

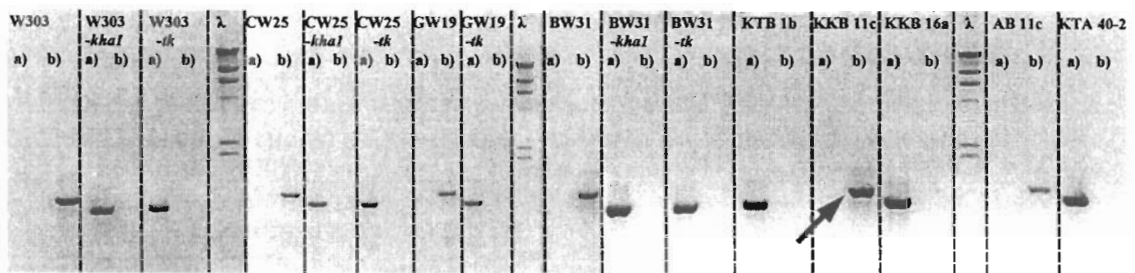
5.1.6 Ověření delece genu *KHAI* pomocí PCR

Protože fenotypový projev mutace *kha1* nebyl u všech kmenů stejně silný a přesvědčivý, byla provedena kontrolní PCR na genomové DNA izolované z kmenů testovaných v kapkových testech. Byly použity dvě kombinace primerů:

- KanXF1* + *disKHA1* – vznikne proužek asi 1,1 kb u kmenů *kha1Δ::kanMX*
- SKHA05* + *disKHA1* – vznikne proužek asi 1,4 kb u kmenů, kde gen *KHAI* nebyl deletován

Touto kombinací primerů nelze testovat kmeny, ve kterých byl gen *KHAI* disruptován pomocí genu *URA3*. Protože však bylo prokázáno, že vnesení genu *URA3*

do lokusu *KHA1* na chromosomu ovlivňuje rychlost růstu kvasinek (obr. 5.3), byly tyto kmeny z dalšího testování vyřazeny. Výsledek kontrolní PCR je na obr. 5.11. Je vidět, že všechny testované kmeny byly v pořádku kromě kmene KKB 11c, který byl bohužel právě zvolen pro počáteční hledání fenotypu delece *khal* a komplementační testy. Šipka v obrázku ukazuje, že u kmene KKB 11c vznikl proužek charakteristický pro kmeny, v kterých gen *KHA1* není deletován.

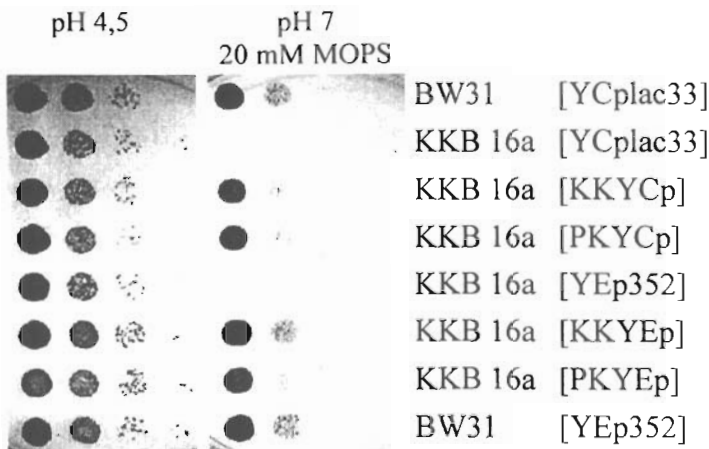


Obr. 5.11 Elektroforetická analýza fragmentů po kontrolní PCR na ověření delece genu *KHA1*. DNA byla barvena ethidiumbromidem, černobílý obrázek pořízený digitálním fotoaparátém v UV světle byl převeden na negativ.

5.2 Komplementace citlivosti ke zvýšenému pH

K dalšímu ověřování komplementace fenotypového projevu mutace *khal* byl tedy zvolen kmen KKB 16a (jiný kandidát ze stejného křížení kmenů BW31 a B31-*khal*). Tento kmen byl transformován genem *KHA1* za vlastním promotorem nebo za promotorem *PMA1* v centromerovém a v mnohokopiovém vektoru.

Jak je vidět na obr. 5.12, všechny konstrukty nesoucí gen *KHA1* zlepšovaly růst kmene KKB 16a na médiu se zvýšeným pH, většinou až na úroveň rodičovského kmene BW31, exprimujícího gen *KHA1* z chromosomu. Nadprodukce proteinu Khal při expresi pod regulací silného promotoru *PMA1* tento efekt nezesilovala, nadbytečné kopie proteinu tedy zřejmě nemohly udělit buňkám vyšší toleranci k zvýšenému pH. Naopak se zdálo, že při kombinaci silného promotoru a mnohokopiového plasmidu by se proteinu Khal mohlo tvořit takové množství, které už začíná být při pH 7 pro buňku mírně toxické (kmen transformovaný konstruktem PKYE_p rostl o něco hůře než ostatní transformanty, exprimující gen *KHA1* v menší míře).



Obr. 5.12 Komplementace fenotypu delecce *kha1* na médiu YNB-NH₄ se zvýšeným pH. Kmen BW31 (*enal-4Δ nhalΔ*) a KKB 16a (*enal-4Δ nhalΔ kha1Δ*) transformované různými vektory a konstrukty (KKYCp = *KHA1* s vlastním promotorem v YCplac33, PKYCp = *KHA1* s promotorem *PMA1* v YCplac33, KKYEp = *KHA1* s vlastním promotorem v YEp352, PKYEp = *KHA1* s promotorem *PMA1* v YEP352).

5.3 Příprava mutantních kmenů *kha1Δ* a *tok1-kha1Δ*

5.3.1 Delece genu *KHA1* nebo lokusu *TOK1-KHA1*

Přestože se zdálo, že kmen KKB 16a je v pořádku a mohl by sloužit pro další srovnávací studium fenotypů delecce *kha1*, bylo rozhodnuto připravit novou sérii delečních kmenů, odvozených od kmenů BW31 (*enal-4Δ nhalΔ*) a MAB 2d (*enal-4Δ nhalΔ trk1Δ trk2Δ*). V těchto kmenech byl deletován buď samotný gen *KHA1*, nebo celý lokus *TOK1-KHA1*. Geny *TOK1* a *KHA1* leží na levém rameni chromosomu X těsně za sebou (nekódující oblast oddělující ORFy je pouze 294 bp, viz kap. 2.5.5.2 a Příloha 1), takže delecí celého lokusu bylo možné provést homologní rekombinací v jednom kroku podle stejného protokolu jako delecí jednotlivých genů (Güldener *et al.*, 1996). Pro přípravu delečních kazet pomocí PCR byly použity primery uvedené v tab. 4.4. Přehled připravených delečních kmenů je v tab. 5.3.

Tab. 5.3 Kmeny připravené delecí genu *KHA1* nebo lokusu *TOK1-KHA1*

kmen	odvozen od	delece
LMB 01	BW31	<i>kha1Δ::loxP-kanMX-loxP</i>
LMB 02	BW31	<i>tok1Δ::loxP-kanMX-loxP::kha1Δ</i>
LMM 03	MAB 2d	<i>kha1Δ::loxP-kanMX-loxP</i>
LMM 04	MAB 2d	<i>tok1Δ::loxP-kanMX-loxP::kha1Δ</i>

5.3.2 Odstranění deleční kazety

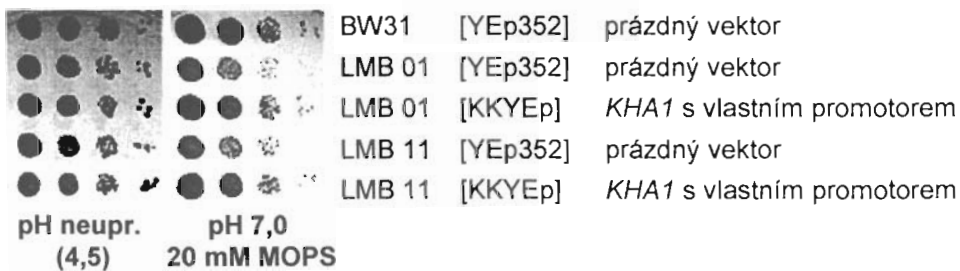
Pro odstranění deleční kazety *kanMX* z genomu kmenů LMB 01, LMB 02, LMM 03 a LMM 04 byla použita metoda popsaná v Güldener *et al.* (1996). Kmeny byly transformovány plasmidem pSH47, který nese gen pro rekombinasi Cre za indukovatelným promotorem *GALI*. Kolonie po transformaci byly přečárkovány na médium YNB-NH₄ s 2% galaktosou (bez glukosy) pro indukci exprese rekombinasy Cre. Rekombinasa způsobí vyštěpení deleční kazety *kanMX* rekombinací mezi místy *loxP* tak, že jedno místo *loxP* zůstane zachováno. Po nárůstu na galaktose byly na médiu YPG rozčárkovány na jednotlivé kolonie a z těch byl proveden kapkový test na médiu YPG a YPG s geneticinem (700 µg/ml). Byly vybrány kolonie citlivé na geneticin, v nichž zřejmě došlo k vyštěpení *kanMX* z chromosomu.

Čtyřnásobným rozčárkováním na médiu YPG byl potom v populaci buněk „vyředen“ plasmid pSH47 – buňky rostoucí na médiu bez selekčního tlaku předávají plasmid do dalších generací s čím dál nižší frekvencí, protože buňky nesoucí plasmid nejsou nijak selekčně zvýhodněny oproti buňkám, které plasmid nemají, spíše naopak – replikace plasmidu a exprese jeho genů je zbytečnou ztrátou energie a stavebních látek. Ztráta plasmidu byla ověřena kapkovým testem (buňky bez plasmidu pSH47, který nese selekční znak *URA3*, nerostou bez uracilu). U výsledných kmenů bylo odstranění deleční kazety ověřeno pomocí PCR. Takto upravené kmeny, v nichž je původní gen nahrazen krátkou sekvencí *loxP* (přehled v tab. 5.4), je možné použít pro delecí dalších genů pomocí deleční kazety *loxP-kanMX-loxP*.

Tab. 5.4 Kmeny s odstraněnou deleční kazetou *kanMX*

kmen	odvozen od	výsledný genotyp
LMB 11	LMB 01	<i>ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 kha1Δ::loxP</i>
LMB 12	LMB 02	<i>ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 tok1Δ::loxP::kha1Δ</i>
LMM 13	LMM 03	<i>ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3 kha1Δ::loxP</i>
LMM 14	LMM 04	<i>ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3 tok1Δ::loxP::kha1Δ</i>

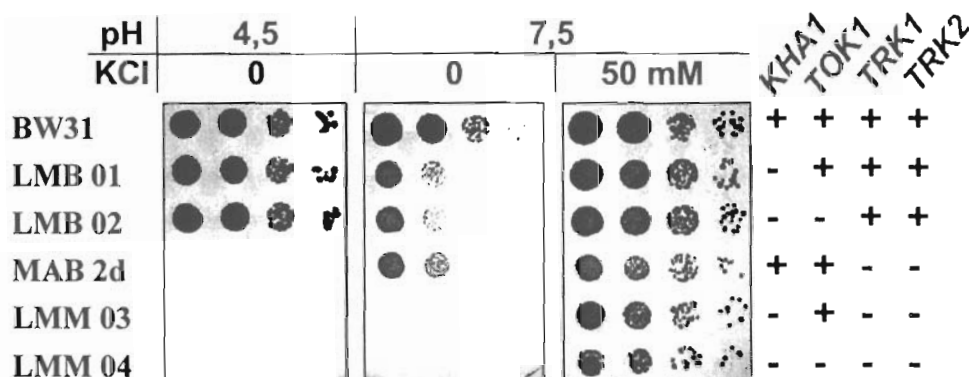
Odstranění deleční kazety nebylo provedeno ihned po vzniku delečních kmenů, takže v následující práci byly nejdříve používány kmeny LMB 01-04 a teprve později byly používány kmeny LMB 11-14. V rámci pokusů prováděných v této práci bylo ověřeno, že se odpovídající dvojice kmenů (LMB 01 a LMB 11, LMB 02 a LMB 12, LMB 03 a LMB 13, LMB 04 a LMB 14) chovají stejně. Příklad srovnání citlivosti kmenů LMB 01 (s deleční kazetou *kanMX*) a LMB 11 (bez deleční kazety) k zvýšenému pH komplementované genem *KHA1* v plasmidu YEp352 je na obr. 5.13.



Obr. 5.13 Srovnání fenotypu delece *khal* na médiu YNB-NH₄ se zvýšeným pH před odstraněním deleční kazety *kanMX* (LMB 01) a po jejím odstranění (LMB 11). Kmeny: BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*), LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ khalΔ::loxP-kanMX-loxP*), LMB 11 (*enal-4Δ nha1Δ khalΔ::loxP*).

5.4 Potvrzení fenotypu delece *khal*

V první řadě bylo testováno, zda se i u nově připravených kmenů s delecí *khal*, resp. *tok1* a *khal* projeví citlivost k zvýšenému pH média. Schopnost růstu kmenů byla testována na médiu YNB-NH₄ s pH upraveným na 7,5 pomocí KOH (bez pufru). Na obr. 5.14 je vidět, že všechny kmeny s delecí *khal* rostou při pH 7,5 hůře než kmeny kontrolní (prostřední sloupec). Přidáním 50 mM KCl do média je tento fenotyp potlačen. Znovu se tím prokázalo, že zhoršený růst delečních mutantů *khal* není způsoben zvýšenou koncentrací K⁺ v médiu, naopak, zvýšená koncentrace K⁺ umožnila delečním mutantům růst při pH 7,5. Přidání NaCl do média fenotyp delece *khal* přesvědčivě nepotlačilo (obrázek neuveden).



Obr. 5.14 Citlivost kmenů k pH 7,5 a vliv KCl na tento fenotyp. Všechny kmeny nesou mutace *enal-4Δ nhalΔ*, ostatní mutace jsou vyznačeny v pravé části obrázku.

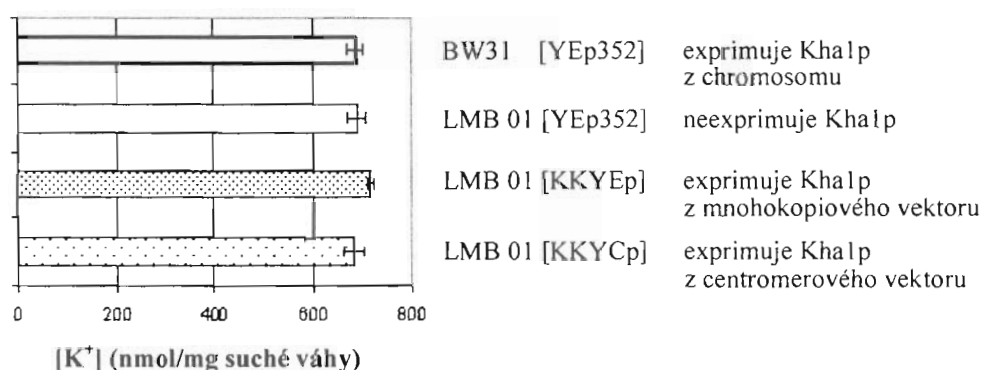
Kmeny s delecí *trk1 trk2* nerostly na kontrolní misce s neupraveným pH 4,5, protože nemají transportní systémy pro aktivní vstup draselných kationtů do buněk. Médium YNB-NH₄ běžně obsahuje asi 8 mM K⁺, což není dostatečné množství pro růst kmenů bez transportních systémů Trk1 a Trk2. Když byl do média přidán 14 mM KOH, zvýšilo se pH na 7,5 a zároveň vzrostla koncentrace K⁺ na 22 mM, což umožnilo růst kmene MAB 2d (obr. 5.14, prostřední panel). Vstup K⁺ do buněk je za těchto okolností zprostředkován pravděpodobně nespecifickým kationtovým kanálem NSC1 (Bihler *et al.*, 1998, 2002). Kmeny LMM 03 a LMM 04 za těchto podmínek nerostou, protože kromě delecí *trk1 trk2*, způsobujících zhoršený růst při nízké koncentraci K⁺, mají ještě delecí *kha1*, a jsou proto citlivé k zvýšenému pH.

5.5 Obsah a transport K⁺

5.5.1 Obsah K⁺ v buňkách

V originální publikaci o proteinu Khal bylo uvedeno, že mutantní kmeny *kha1Δ* akumulují uvnitř přibližně dvojnásobnou koncentraci K⁺ v porovnání s rodičovským kmenem (Ramírez *et al.*, 1998). Tento fenotyp byl uveden jako hlavní důvod pro předpoklad, že úlohou proteinu Khal je export draselných iontů z buněk. Protože z našich pokusů se zdálo, že Khalp tuto funkci neplní, byl studován blíže obsah K⁺ v kmenech lišících se přítomností/absencí funkční alely *KHA1*.

Při měření obsahu draselných iontů v kmenech připravených v rámci této práce se ovšem ukázalo, že obsah K^+ není závislý na přítomnosti proteinu Kha1 (viz obr. 5.15). Kmen LMB 01 obsahoval stejné množství draselných kationtů jako kmen BW31. Nadprodukce proteinu Kha1 z mnohokopiového vektoru nesnížila obsah K^+ v buňkách, jak by se dalo očekávat, pokud by Kha1p exportoval K^+ z buněk.



Obr. 5.15 Obsah draselných kationtů v kmenech s různou úrovní exprese proteinu Kha1. Celkem bylo analyzováno 6 vzorků ze dvou nezávislých pokusů. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

5.5.2 Výstup K^+ z buněk

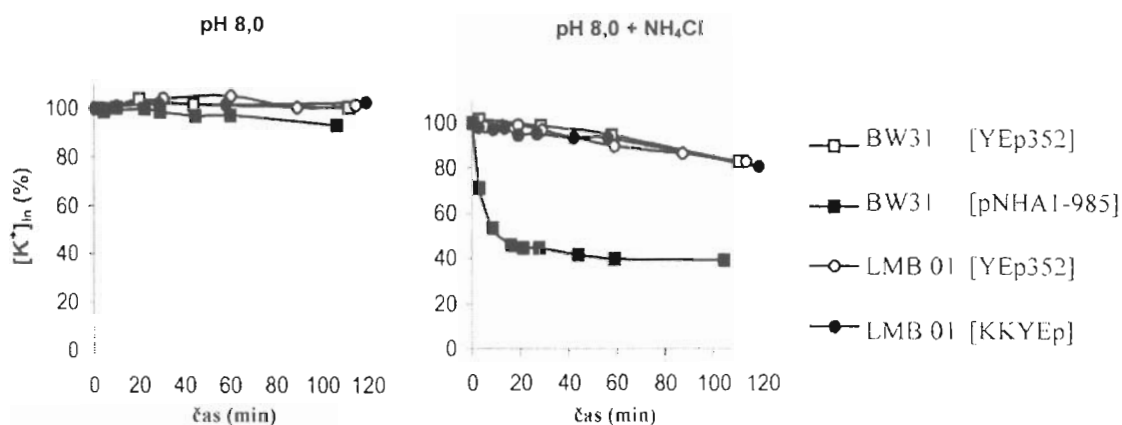
Pro další ověření úlohy proteinu Kha1 v transportu draselných iontů z buněk byl proveden transportní pokus. Výstup K^+ z buněk zbavených genu *KHA1* byl srovnáván s výstupem z buněk exprimujících gen *KHA1* z genomu nebo z plasmidu. Buňky byly resuspendovány v bezdraslíkovém pufru, pomocí RbCl byl zablokován zpětný vstup K^+ do buněk a výstup draselných iontů byl měřen jako časová závislost obsahu K^+ v ekvivalentech buněčné suspenze. Jako pozitivní kontrola výstupu K^+ z buněk byly použity buňky transformované plasmidem nesoucím gen *NHA1*.

Je známo, že při pH 5,5 ani při pH 8,0 draselné ionty z kmene BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*) nevystupují (Kinclová *et al.*, 2001). V buňkách BW31 transformovaných plasmidem nesoucím gen *NHA1* je měřitelný výstup K^+ při pH 5,5 (vnitrobuněčné pH je asi 6,0, gradient protonů slouží jako zdroj energie pro export K^+ pomocí Nha1). Při pH 8,0 není ani v buňkách nesoucích plasmid s genem *NHA1* měřitelný výstup K^+ , protože koncentrační spád protonů směřuje z buněk ven a nemůže sloužit jako zdroj energie pro export iontů. Přidá-li se však do inkubačního pufru NH_4Cl , amonné ionty při pH 8,0

rychle disociují na amoniak a protony. Plynný amoniak vstupuje do buněk prostou difusí, v cytosolu na sebe naváže protony a tak zvýší vnitrobuněčné pH. Buňky exprimující gen *NHA1* na tuto změnu reagují prudkým vypuštěním vnitrobuněčné zásoby K^+ . Transport K^+ ve směru koncentračního spádu (buňky se nalézají v bezdraslíkovém pufru) přes *Nha1* antiporter umožní transport protonů proti koncentračnímu spádu (pH vně = 8,0, pH uvnitř buněk asi 7,0) a buňky tak částečně vyrovnají vzestup pH cytosolu způsobený amoniakem (Kinclová *et al.*, 2001). Za těchto podmínek (pH 8,0 + NH_4Cl) byl pozorován mírný výstup K^+ i z buněk BW31 transformovaných prázdným vektorem (Kinclová *et al.*, 2001). Pro ověření, zda by tento mírný výstup K^+ mohl být zprostředkován proteinem *Kha1*, byl proveden transportní pokus s kmenem LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*). Pokud by v kmeni BW31 mírný výstup K^+ byl umožněn právě proteinem *Kha1*, z kmene LMB 01 by draselné ionty neměly vystupovat vůbec a při zvýšené expresi *Kha1p* by naopak měly vystupovat více.

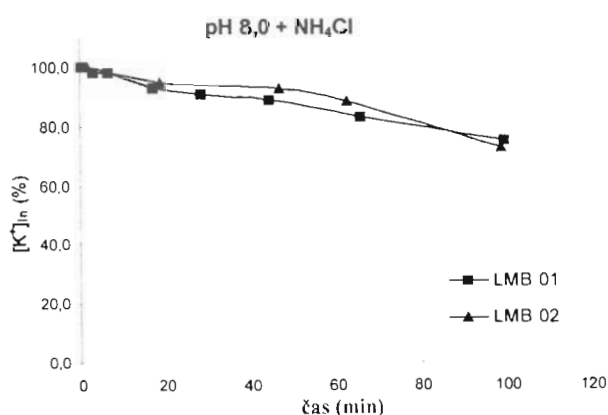
Měření transportu K^+ při pH 5,5 nebylo zařazeno, protože podobně jako při pH 8,0 bez přidání amoniaku nedochází k žádnému výstupu K^+ z buněk kmene BW31 (přestože obsahují funkční protein *Kha1*) a není tedy možné pozorovat, zda delece genu *KHA1* za těchto podmínek transport ovlivňuje či nikoliv.

V transportním pokuse (obr. 5.16) byl porovnán kmen LMB 01 transformovaný prázdným plasmidem nebo nadprodukcující protein *Kha1* z mnohokopiového vektoru (KKYE_p) s kmenem BW31, transformovaným týměž prázdným vektorem nebo nadprodukcujícím protein *Nha1* (pNHA1-985). Je vidět, že z kmene LMB 01 vystupovaly draselné ionty stejnou rychlostí jako z kmene BW31 transformovaného prázdným vektorem. Ani nadprodukce proteinu *Kha1* z mnohokopiového vektoru nezměnila rychlost výstupu K^+ , zatímco nadprodukce antiporteru *Nha1* měla za následek rychlý pokles vnitrobuněčné hladiny draselných kationtů. Lze tedy pokládat za ověřené, že funkce proteinu *Kha1* v buňkách *S. cerevisiae* se výrazně liší od funkce proteinu *Nha1*, a nejedná se tedy o protein plasmatické membrány exportující K^+ z buněk mechanismem antiportu proti protonům, jak bylo původně uváděno v práci Ramírez *et al.* (1998).



Obr. 5.16 Výstup K⁺ z buněk při pH 8,0

Ve snaze objasnit, který transportní systém zprostředkovává mírný výstup K⁺ z buněk kmenů BW31 i LMB 01 při pH 8,0 po přidání NH₄Cl byl kmen LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*) dále srovnán s kmenem LMB 02 (*enal-4Δ nha1Δ tok1-kha1Δ*). Jak je vidět na obr. 5.17, i z kmene LMB 02, který nenesé ani gen pro draselný kanál Tok1, uniká v pufru pH 8,0 po přidání NH₄Cl stejné množství K⁺ jako z kmene LMB 01. Tento nízký výstup draselných kationtů tedy není zprostředkovan ani proteinem Tok1.



Obr. 5.17 Srovnání výstupu K⁺ z kmenů LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*) a LMB 02 (*enal-4Δ nha1Δ tok1-kha1Δ*).

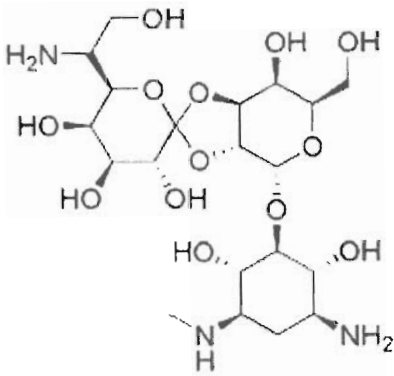
Ukázalo se tedy, že mírný únik kationtů K^+ z buněk po přidání NH_4Cl při extracelulárním pH 8,0 není zprostředkován ani antiporterem *Kha1* ani kanálem *Tok1*. Zajímavá je okolnost, že v kmeni LMB 02 jsou deletovány všechny geny kódující známé transportní systémy specifické pro export K^+ z buněk (*ENA1-4*, *NHA1*, *TOK1*). Znamená to, K^+ za určitých okolností může unikat z buněk bez přispění těchto transportérů nespecifickými systémy, jejichž transportní vlastnosti nebyly dosud charakterizovány. Podmínkou pro takový výstup ovšem je zvýšené intracelulární pH, protože k poklesu vnitrobuněčného obsahu K^+ nedochází při pH 8,0 bez přidání NH_4Cl (obr. 5.16) ani při extracelulárním pH 5,5 (Kinclová *et al.*, 2001).

5.6 Srovnání *Kha1p* s *Nhx1p*

Předchozí výsledky ukázaly, že protein *Kha1* neplní stejnou úlohu jako *Nha1p*. Podle sekvenční podobnosti by se však mělo jednat o sodno(draselno)-protonový antiporter. Proto bylo rozhodnuto porovnat vlastnosti proteinu *Kha1* s intracelulárním $Na^+(K^+)/H^+$ antiporterem *Nhx1*. Jak je zmíněno již v kap. 2.4.4.3, *Nhx1p* je lokalizován v membráně tzv. PVC (prevacuolar compartments) a podílí se na sekvestraci kationtů alkalických kovů do vakuol. Delece genu *NHX1* se projeví jednak mírným zvýšením citlivosti buněk k solím alkalických kovů a dále zvýšením citlivosti k hygromycinu B. Protože delece genu *KHA1* se neprojevuje změnou tolerance k solím (kap. 5.1.5.1), ve srovnání s *Nhx1p* byla testována pouze citlivost k hygromycinu B.

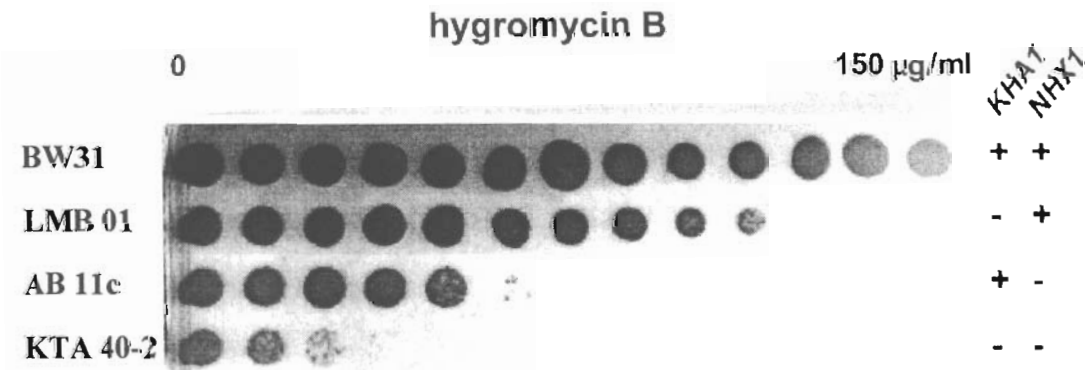
5.6.1 Citlivost k hygromycinu B

Hygromycin B je kladně nabitá organická molekula (obr. 5.18), která se akumuluje v buňkách v závislosti na velikosti membránového potenciálu (McCusker *et al.*, 1987) a inhibuje proteosyntézu v prokaryotických i eukaryotických buňkách (Cabanas *et al.*, 1978). Již dříve bylo pozorováno, že delece některých genů (včetně *NHX1*) zvyšuje citlivost *S. cerevisiae* k tomuto aminoglykosidickému antibiotiku (Gaxiola *et al.*, 1999). U vybraných kmenů s různými kombinacemi delecí *kha1* a *nhx1* byla tedy testována citlivost k hygromycinu B.



Obr. 5.18 Hygromycin B ($C_{20}H_{37}N_3O_{13}$)

Na obr. 5.19 je vidět, že delece genu *KHA1* v kmeni BW31 zvyšovala citlivost buněk k hygromycinu B, i když v menší míře než delece genu *NHX1*. Efekt delecí *kha1* a *nhx1* byl kumulativní – kmen KTA 40-2 (*kha1Δ nhx1Δ*) rostl hůře než kmen LMB 01 (*kha1Δ*) i než kmen AB 11c (*nhx1Δ*).

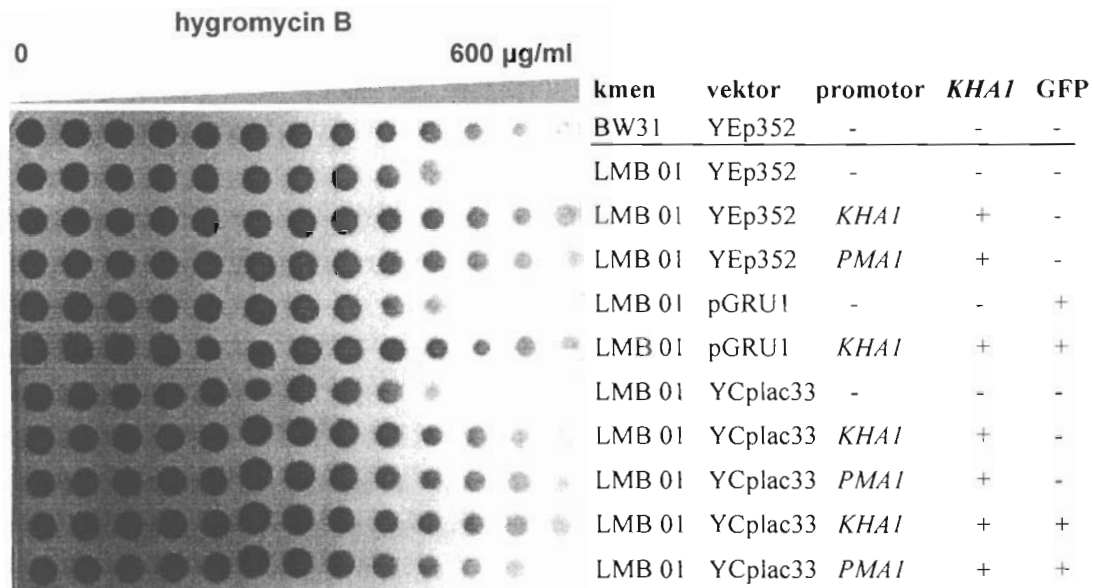


Obr. 5.19 Srovnání růstu kmenů na médiu YPG. Koncentrace hygromycinu se zvyšuje zleva doprava. Všechny kmeny nesou mutace *enal-4Δ nha1Δ*, ostatní mutace jsou vyznačeny v pravé části obrázku.

Zvýšená citlivost buněk k hygromycinu B byla tedy druhým objeveným fenotypovým projevem delece genu *KHA1*.

5.6.2 Komplementace citlivosti k hygromycinu

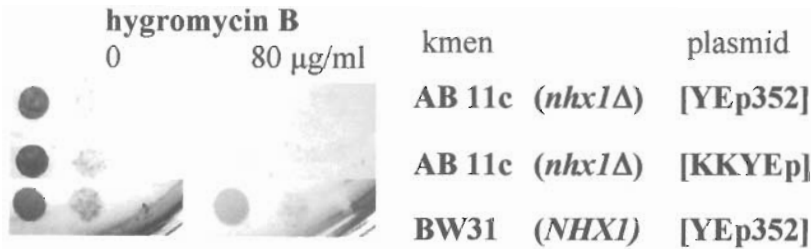
Pro ověření souvislosti mezi zvýšenou citlivostí k hygromycinu B a genem *KHA1* byl použit kmen LMB 01 transformovaný různými plasmidy nesoucími gen *KHA1*, lišícími se počtem kopií v buňce, silou promotoru a přítomností či nepřítomností sekvence kódující GFP (viz tab. 4.3). Jako kontroly byly použity kmeny LMB 01 a BW31 transformované prázdnými vektory (YEp352, pGRU1 a YCplac33). Jak je vidět na obr. 5.20, všechny plasmidy nesoucí gen *KHA1* obnovily schopnost kmene LMB 01 (*enal-4Δ nhalΔ khalΔ*) růst při vyšších koncentracích hygromycinu B na úroveň rodičovského kmene BW31 (*enal-4Δ nhalΔ*).



Obr. 5.20 Komplementace citlivosti k hygromycinu na médiu YNB-NH₄ různými plasmidy nesoucími gen *KHA1*. Koncentrace hygromycinu stoupá zleva doprava.

Protože fenotypový projev delece *khal* v růstu na médiu s hygromycinem B se podobal projevu delece *nhx1*, bylo dále testováno, zda nadprodukce proteinu Kha1 může komplementovat projev delece *nhx1*. Znamenalo by to, že funkce těchto dvou proteinů se může částečně překrývat. Kmen AB 11c byl transformován mnohokopiovým vektorem nesoucím gen *KHA1* s vlastním promotorem (KKYEp) a na médiu s hygromycinem B byl porovnán jeho růst s kmenem transformovaným prázdným

vektorem. Na obr. 5.21 je vidět, že nadprodukce proteinu Kha1 růst kmene AB 11c nezlepšovala. Zvýšený počet kopií genu *KHAI* nebyl tedy schopen nahradit chybějící gen *NHX1*.

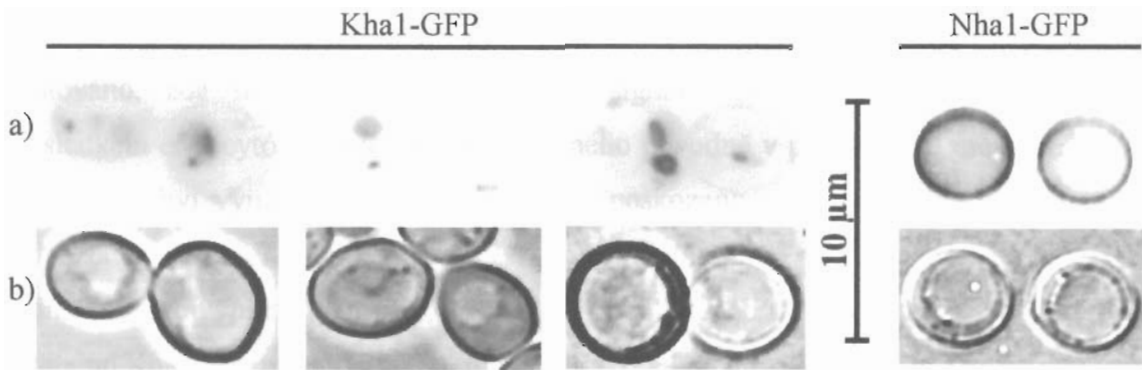


Obr. 5.21 Pokus o komplementaci delece *nhx1* mnohokopiovým plasmidem s genem *KHAI*. Testováno na médiu YNB-NH₄.

5.7 Lokalizace proteinu Kha1

Vzhledem k tomu, že nebylo možno najít žádný fenotyp delece *kha1* spojený s transportem iontů přes plasmatickou membránu a našla se podobnost mezi projevem delece *kha1* a *nhx1* (zvýšená citlivost k hygromycinu), vznikla určitá pochybnost o lokalizaci proteinu Kha1 v plasmatické membráně. Jak je zmíněno již v kap. 5.1.3, byly připraveny plasmidy nesoucí gen *KHAI* s připojenou sekvencí kódující zelený fluorescenční protein.

Kmen LMB 01 transformovaný plasmidy KKGp (*KHAI*-GFP s vlastním promotorem v mnohokopiovém plasmidu), KKGYCp (*KHAI*-GFP s vlastním promotorem v centromerovém plasmidu) a PKGYCp (*KHAI*-GFP se silným promotorem *PMAI* v centromerovém plasmidu) byl pozorován ve fluorescenčním mikroskopu. Jak je vidět na obr. 5.20, tyto plasmidy komplementují fenotyp delece *kha1*. Protein značený GFP na C-konci je tedy schopen plnit svou funkci v buňce. Pozorování Kha1-GFP ukázalo, že tento protein (narozdíl od Nha1p) není lokalizován v plasmatické membráně (obr. 5.22) ale uvnitř buněk v podobě několika váčků různého tvaru a velikosti v každé buňce.



Obr. 5.22 Lokalizace proteinu Kha1 v buňkách v porovnání s Nha1p.

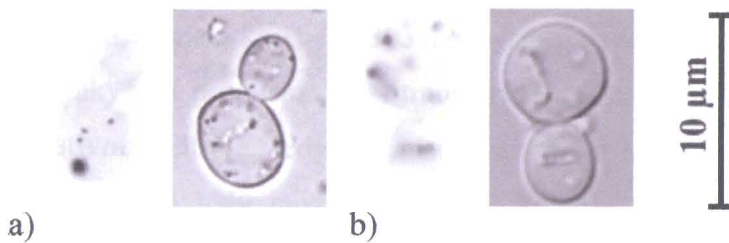
- a) Fluorescence značeného proteinu (snímané obrázky byly pro větší názornost převedeny do černobílého módu a konvertovány na negativ)
 b) Fotografie buněk snímané optikou Nomarského.

Velmi podobně jako buňky kmene LMB 01 transformovaného plasmidem KKGp (obr. 5.22) vypadaly i buňky transformované plasmidem PKGYCp. Mezi fluorescenčním obrazem ani schopností komplementace (obr. 5.20) nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl pro buňky nesoucí plasmid PKGYCp (centromerový, promotor *PMA1*) a plasmid KKGp (mnohokopiový, promotor *KHAI*). Dalo by se tedy říci, že nadprodukce proteinu Kha1 z mnohokopiového vektoru přibližně odpovídá nadprodukci pod regulací silného promotoru z vektoru centromerového.

U buněk transformovaných vektorem KKGp se vůbec nepodařilo zachytit fluorescenční obraz. Přitom i tento vektor byl schopen komplementovat fenotyp delece *kha1* (obr. 5.20) a napojení GFP bez přerušení čtecího rámce bylo ověřeno sekvenováním. Nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto jevu je, že protein exprimovaný z centromerového vektoru pod regulací vlastního promotoru je v buňce v tak malém množství, že nevydává dostatečně silný fluorescenční signál. Tomu by odpovídala i skutečnost, že autorům internetové databáze „Yeast GFP Fusion Localization Database“ (<http://yeastgfp.ucsf.edu/>) se nepodařilo protein Kha1 zviditelnit po označení integrací GFP do chromosomální DNA (Huh *et al.*, 2003). I podle dalších výsledků této skupiny je úroveň exprese genu *KHAI* velmi nízká (172 molekul proteinu na 1 buňku (Ghaemmaghami *et al.*, 2003)).

5.7.1 Exprese Kha1p-GFP v kmeni 27061b

Na základě doporučení dr. R. Hagenauer-Tsapis z Inst. J. Monod v Paříži bylo testováno, zda intracelulárně pozorovaný signál značeného proteinu Kha1 není výsledkem endocytózy proteinu lokalizovaného původně v plasmatické membráně. Pro tento účel byl využit kmen *S. cerevisiae* s poškozenou endocytózou (mutace *end3*) odvozený od kmene 27061b (*ura3 trp1*). Mutant *end3* i rodičovský kmen byly transformovány plasmidem KKGp. Jak je vidět na obr. 5.23, lokalizace značeného proteinu Kha1 je v mutantním kmeni stejná jako v kmeni rodičovském. Z toho vyplývá, že intracelulární lokalizace proteinu Kha1 je primární, nikoliv následkem endocytózy.



Obr. 5.23 Lokalizace proteinu Kha1 značeného GFP v buňce kmene 27061b (a) a od něj odvozeného mutantního kmene *end3* (b). Snímané obrázky fluorescenčního signálu převedeny do černobílého módu a konvertovány na negativ.

5.7.2 Kolokalizace s proteinem Sec7

Při porovnání obrázků z fluorescenčního mikroskopu s dostupnými obrázky v internetových databázích se lokalizace značeného proteinu Kha1 nejvíce podobala lokalizaci proteinů, které se nacházejí v membránách Golgiho aparátu (<http://yeastgfp.ucsf.edu/>). Je známo, že Golgiho aparát (GA) v kvasinkách většinou nemá charakteristický morfologický tvar GA ze savčích buněk – skupinu několika zploštělých váčků nad sebou (Franzusoﬀ a Schekman, 1989). Funkci třídění a post-translační modifikace proteinů putujících sekreční drahou z endoplasmatického retikula do plasmatické membrány, do vakuoly a dalších buněčných kompartmentů vykonávají jednotlivé membránové váčky, které jsou funkčním ekvivalentem savčího GA (Hashimoto *et al.*, 2002; Wooding a Pelham, 1998).

Proto bylo rozhodnuto testovat kolokalizaci proteinu Kha1 se známými markerovými proteiny Golgiho aparátu. Jako první byl pro kolokalizační pokusy

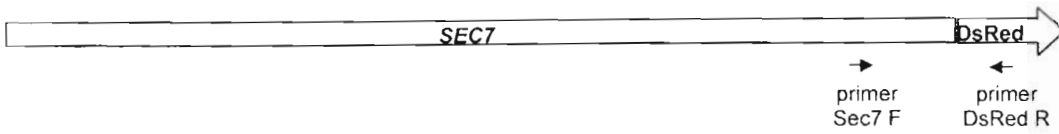
s Kahlp zvolen gen *SEC7*, kódující protein z rodiny tzv. guanine-nucleotide exchange faktorů v GA (Achstetter *et al.*, 1988; Peyroche *et al.*, 1996).

Od dr. T.J. Proszinského z Max-Planck Inst. v Drážďanech byl získán plasmid TPR76. Jedná se o integrativní plasmid, nesoucí gen *SEC7* značený DsRed, červeným fluorescenčním barvivem z mořského korálu *Discosoma* sp. (Wall *et al.*, 2000). Po transformaci kvasinek nesoucích mutaci *trp1* se štěpený plasmid integruje do lokusu *trp1*, a protože nese selekční marker *TRP1*, kvasinky získají schopnost růst bez přídavku tryptofanu do média. Zároveň produkují protein Sec7 značený DsRed.

5.7.2.1 Příprava kmenů TPR100 a TPR200

Při transformaci kmene W303-1A vyšlo najevo, že mutace *trp1-1* v tomto kmeni je tzv. „leaky“, tj. propustná – po transformaci rostlo poměrně velké množství kolonií i na negativní kontrole, tedy na misce bez tryptofanu, kam byly vysety buňky bez plasmidu. Nebylo tedy možné selektovat kolonie buněk, u nichž došlo k integraci plasmidu TPR76 do genomu. Pro další práci byly zvoleny kmeny FL100 a FL200 získané od prof. J. L. Součiety z ULP ve Štrasburku. Tyto kmeny nesou mutace *trp1-4* a *ura3*. Bylo ověřeno, že kmeny FL100 a FL200 skutečně nerostou na médiích bez tryptofanu. Kmeny byly transformovány štěpeným plasmidem TPR76. Enzym *Bsu36I* štěpí uvnitř ORFu *TRP1*, po integraci plasmidu do lokusu *trp1* na chromosomu dojde k obnovení ORFu a buňky získají schopnost syntetizovat tryptofan. Z kolonií vyrostlých na selekčním médiu YNB-NH₄ bez tryptofanu byla izolována genomová DNA a pomocí PCR byla ověřena přítomnost značeného genu *SEC7* v genomu (obr. 5.24).

S použitím primerů Sec7 F a DsRed R (sekvence a přesná poloha viz tab. 4.4) vznikl u kmenů s integrovaným plasmidem produkt o velikosti 988 bp. Uvedená kombinace primerů sice neověřuje integraci do lokusu *trp1* (pouze přítomnost *SEC7*-DsRed v gDNA), ale za prvé vznik prototrofie na tryptofan je dostatečným důkazem správného místa integrace a za druhé pro další práci není tak podstatné, z kterého místa chromosomu se značený protein Sec7 bude exprimovat, jako to, že se vůbec bude exprimovat.



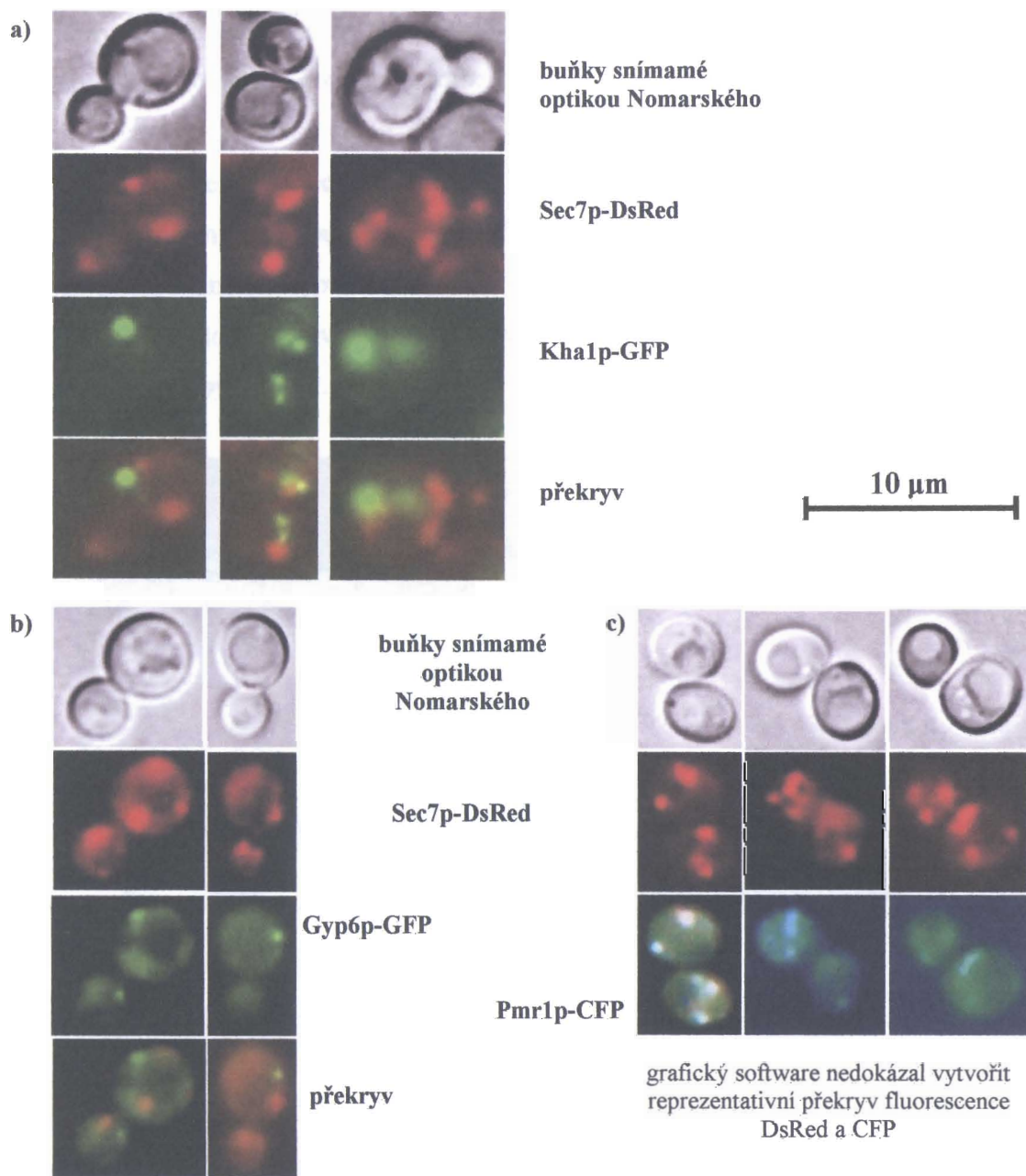
Obr. 5.24 Primery pro ověření přítomnosti značeného genu *SEC7* v genomové DNA

Kmeny s integrovaným plasmidem TPR76 byly pojmenovány TPR100 a TPR200. Vzájemně se liší pouze párovacím typem (TPR100 je *MATa* a TPR200 je *MATα*), v obou kmenech zůstává mutace *ura3* a jsou tedy použitelné pro transformaci plasmidy se selekčním markerem *URA3*.

5.7.2.2 Fluorescenční mikroskopie dvojitě značených buněk

Kmen TPR100 byl transformován plasmidem PKGYCp (centromerový plasmid s genem *KHA1* za promotorem *PMA1*) a zároveň plasmidy GYP6-GFP a PMR1-CFP získanými od dr. R. Rao Johns Hopkins University v Baltimore. Gen *PMR1* kóduje Ca^{2+} -ATPasu Golgiho aparátu (Antebi a Fink, 1992), gen *GYP6* kóduje aktivátor GTPasy Ypt6 lokalizovaný v endosomech (Will a Gallwitz, 2001). Transformované buňky byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70 s použitím parametrů fluorescence uvedených v tab. 4.5 (kap. 4.2.3.2).

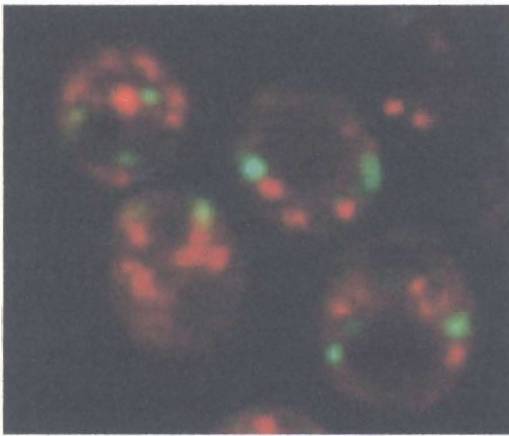
Na obr. 5.25 je vidět, že zatímco značený protein Pmr1 kolokalizuje se Sec7p (fluorescenční signál CFP polohově odpovídá fluorescenčnímu signálu DsRed), proteiny Gyp6 a Kha1 s ním nekolokalizují.



Obr. 5.25 Kolokalizace se Sec7p značeným DsRed

- a) Kha1p značený GFP
- b) Gyp6p značený GFP
- c) Pmr1p značený CFP

Přestože značený protein Kha1 nekolocalizoval s markerem pro GA, nebylo tím vyloučeno, že se v by Kha1p mohl být v některé části GA lokalizován. Již dříve bylo popsáno, že některé proteiny lokalizované v Golgiho aparátu spolu vzájemně nekolocalizují. Například práce dr. A. Nakana z Riken Inst., Saitama v Japonsku ukazuje, že zeleně značený protein Rer1 a červeně značený protein Gos1 ve fluorescenčním mikroskopu vydávají odlišný signál (obr. 5.26). Oba tyto proteiny jsou přitom považovány za typické představitele proteinů lokalizovaných v GA (Nakano, 2004). Autor tento jev vysvětluje lokalizací proteinu Rer1 v tzv. „early“ Golgi, zatímco Gos1p je lokalizován v tzv. „late“ Golgi.



Obr. 5.26 Červeně značený Gos1p a zeleně značený Rer1p. Obrázek z publikace (Nakano, 2004).

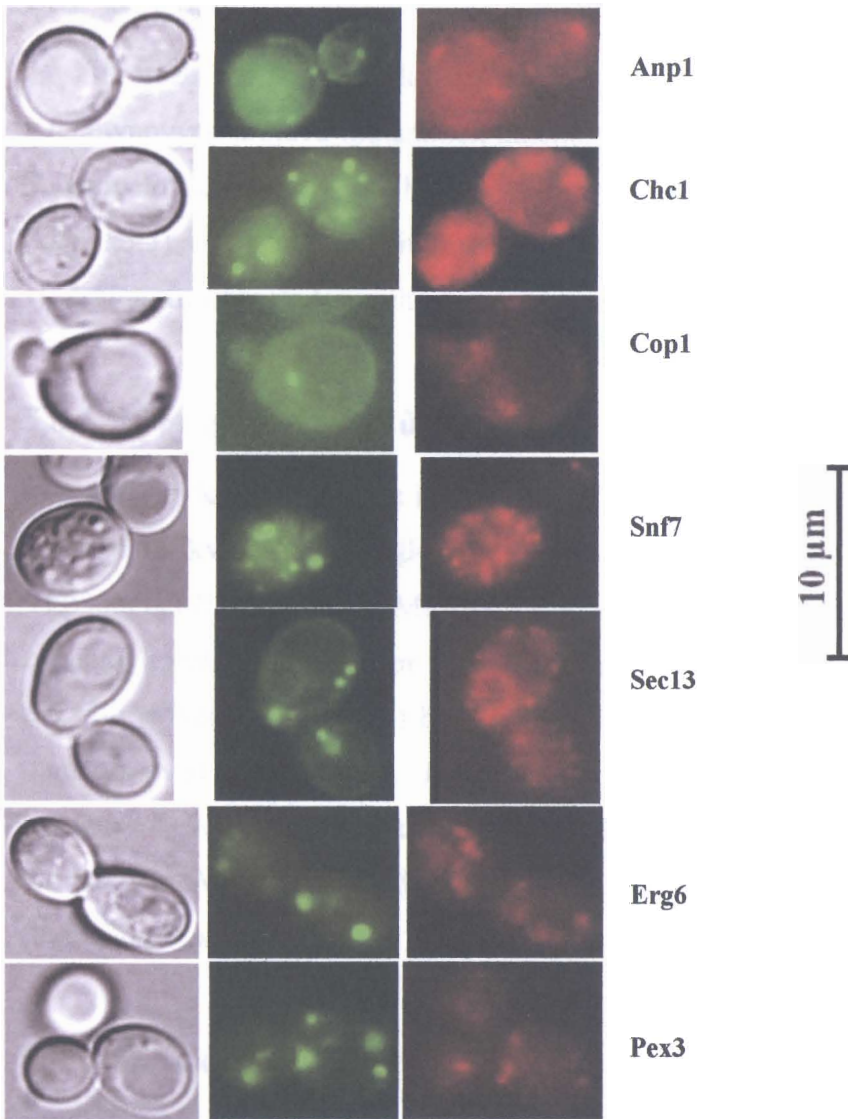
5.7.3 Kolokalizace s dalšími značenými proteiny

Byly tedy hledány další fluorescenčně značené proteiny pro kolokalizaci s Kha1p. Od dr. Won-Ki Huh z Kalifornské Univerzity v San Francisco byla získána série kmenů odvozených od ATCC 201389 (S288C *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) s různými geny značenými RFP na chromosomu. Vybrané kmeny se značenými organelami byly transformovány plasmidy KKG a PKGYCp.

Tab. 5.5 Kmeny s chromosomálním značením RFP použité pro kolokalizaci s Kha1p-GFP

lokalizace	značený ORF
„early“ Golgi	<i>COPI</i>
endosomy	<i>SNF7</i>
váčky z ER do GA	<i>SEC13</i>
Golgiho aparát	<i>ANP1</i>
„late“ Golgi	<i>CHC1</i>
lipidové částice	<i>ERG6</i>
peroxisomy	<i>PEX3</i>

Za podmínek používaných pro vizualizaci DsRed nebylo snadné dokumentovat fluorescenci proteinů značených RFP. Fluorescence byla slabá a rychle vyhasínala. Přesto se dá pokládat za prokázané, že zeleně značený protein Kha1 nekolokalizoval s žádným z testovaných červeně značených proteinů z tab. 5.5, viz obr. 5.27.



Obr. 5.27 Kolokalizace Kha1p-GFP s různými proteiny značenými RFP

5.7.4 Uzavření kolokalizačních pokusů

V průběhu hledání dalšího vhodného markeru pro kolokalizaci s Kha1p byly publikovány výsledky polské skupiny dr. A. Kurlandzké, podle nichž Kha1p kolokalizuje s manosyltransferasou Golgiho aparátu Mnt1 (synonymum Kre2). Z těchto výsledků byl vyvozen závěr, že protein Kha1 je lokalizován v membráně GA podobně jako chloridový kanál Gef1 (Flis *et al.*, 2005). Byla tím potvrzena hypotéza navržená v rámci této disertační práce.

5.8 Regulace exprese genu *KHAI*

Protože nebylo snadné odhadnout fyziologickou funkci proteinu Khal z fenotypových projevů mutantních kmenů, byla dále studována regulace jeho exprese. V internetových databázích byly vyhledány výsledky mikroarrayových experimentů (kap. 2.5.3) a dále byla použita metoda indukce exprese β -galaktosidasy z plasmidu po vložení promotoru studovaného genu před gen kódující β -galaktosidasu.

5.8.1 Příprava plasmidů pro expresi β -galaktosidasy

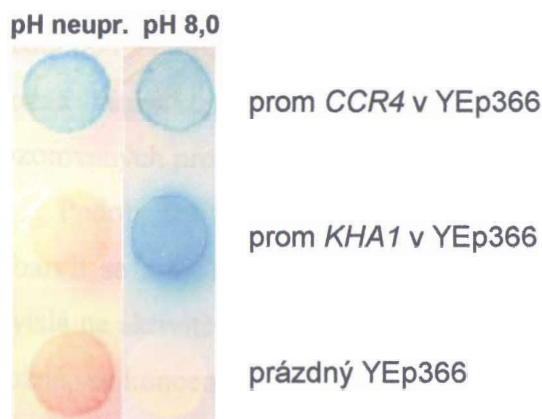
Od Markéty Řiřicové z Přírodovědecké fakulty UK v Praze byl získán konstrukt obsahující sekvenci kódující β -galaktosidasu z *E.coli* za promotorem *CCR4* v plasmidu YEp366, používaný v práci (Mináriková *et al.*, 2001). Restrikčním štěpením a ligací byl z tohoto konstrukt promotor *CCR4* vyštěpen a před gen kódující β -galaktosidasu z *E. coli* (Myers *et al.*, 1986) byl vložen promotor *KHAI*. Těmito konstrukty byl pak transformován kmen W303. Jako kontrola byl použit původní plasmid obsahující promotor *CCR4* nebo plasmid pXA1, ve kterém je exprese β -galaktosidasy regulována promotorem *NHAI*. Předpokládá se, že exprese genu *NHAI* je slabá a konstitutivní (Bañuelos *et al.*, 1998).

5.8.2 Indukce zvýšeným pH

Pro sledování indukce exprese β -galaktosidasy v kvasinkách bylo používáno pevné minimální médium MM (viz kap. 4.1.1), na které bylo povrchově aplikováno 40 μ l roztoku X-gal v dimethylformamidu (20 mg/ml).

Jako kontrola relevantnosti metody byla testována indukce zvýšeným pH. Podle výsledků španělské skupiny dr. Ariña je exprese genu *KHAI* indukována 2,8 krát při pH 8,0 (Viladevall *et al.*, 2004). Na obr. 5.28 je vidět, že pH 8,0 skutečně indukuje expresi β -galaktosidasy regulovanou promotorem *KHAI*. Na médiu s neupraveným pH (6,8) nebyla pozorována exprese β -galaktosidasy z promotoru *KHAI*. To odpovídá už dříve pozorované skutečnosti, že gen *KHAI* je za standardních podmínek poměrně málo exprimovaný ((Ghaemmaghami *et al.*, 2003), kap. 5.7). Naproti tomu promotor *CCR4* reguloval expresi β -galaktosidasy za standardních podmínek stejnou měrou jako při

pH 8,0. I toto pozorování potvrdilo výsledky španělské skupiny, protože v jejich práci gen *CCR4* není uveden mezi geny indukovanými pH 8,0 (Viladevall *et al.*, 2004).



Obr. 5.28 Indukce promotoru *KHA1* při pH 8,0. Kmen W303 produkující β -galaktosidasu z uvedených plasmidů na médiu MM s X-gal (40 μ g/ml).

5.8.3 Další podmínky indukce

Po ověření metody byly hledány další podmínky, které by indukovaly promotor *KHA1* (obr. 5.29). V této fázi už byl promotor *KHA1* srovnáván s promotorem *NHA1*, který měl sloužit jako kontrola slabé konstitutivní exprese (Bañuelos *et al.*, 1998). Byla připravena série misek s médiem MM. Jednotlivé misky se mezi sebou lišily zdrojem uhlíku, obsahem solí, hygromycinu B, pH (upraveno KOH), případně teplotou, při které byly inkubovány.

Výsledky tohoto experimentu slabou konstitutivní expresí genu pod regulací promotoru *NHA1* úplně nepotvrdili - kmen W303 transformovaný plasmidem pXA1 se za různých růstových podmínek barvil různě. Je ovšem nutno připomenout, že intenzita barvení kvasinkových buněk (případně okolního média) není determinována pouze úrovní exprese β -galaktosidasy, ale také aktivitou syntetizovaného proteinu, a ta se za různých okolností může lišit (Ozkanca, 2002). Bylo například pozorováno, že pH optimum pro β -galaktosidasu z *E. coli* je 7,2 (Tenu *et al.*, 1971). V tomto experimentu β -galaktosidasa dobře fungovala až do pH 8,0, ale při pH 5,5 se nebarvil ani jeden z pozorovaných kmenů a při pH 6,8 se kmeny s promotory *KHA1* a *NHA1* barvily velmi

slabě. Je prokázáno, že protein *NHA1* je při pH 5,5 exprimován (Bañuelos *et al.*, 1998). Je vhodné také připomenout, že v buňkách *S. cerevisiae* rostoucích na médiu s glukosou převažuje fermentace nad respirací, zároveň je velmi aktivní ATPasa Pma1 a okolí buněk je intenzivně okyselováno. I na kontrolní misce lze tedy předpokládat pokles pH média pod výchozí hodnotu (6,8) po nárůstu buněk. Absence modrého zbarvení je tedy možná následkem spíše nečinnosti enzymu při sníženém pH než represí všech pozorovaných promotorů.

Podobná situace byla pozorována na miskách s obsahem KCl nebo NaCl – nebarvil se ani jeden z pozorovaných kmenů. Stabilita a aktivita β -galaktosidasy je závislá na aktivitě vody a_w (Matsue a Miyawaki, 2000; Yoshioka *et al.*, 1993) a je tedy možné, že koncentrace solí použitá v tomto experimentu nebyla vhodná pro sledování indukce exprese.

Ostatní sledované růstové podmínky (zdroj uhlíku, hygromycin B, teplota inkubace a pH 7,0 – 8,0) by pro β -galaktosidasu neměly být limitující, ani zde však nelze jednoznačně odlišit indukci exprese genu od posttranslační aktivace enzymu. Buňky exprimující β -galaktosidasu pod regulací promotoru *NHA1* se za těchto podmínek barvily přibližně stejně (což by odpovídalo teorii slabé konstitutivní exprese genu *NHA1*) s výjimkou pH 8,0 kde bylo zbarvení výraznější, a to nejen zbarvení buněk, ale i kruhové zóny média okolo makrokolonie. Indukce promotoru *NHA1* zvýšeným pH je poměrně překvapivým výsledkem vzhledem k tomu, že nejčastěji uváděná fyziologická funkce proteinu Nha1 (export kationtů alkalických kovů z buněk) je závislá na koncentračním spádu protonů směrem do buňky a protein tedy plní svou transportní úlohu především při nízkých pH (Bañuelos *et al.*, 1998). Bylo ovšem popsáno, že protein Nha1 se podílí také na regulaci vnitrobuněčného pH (Sychrová *et al.*, 1999). Schopnost proteinu reagovat na zvýšené pH vylučováním kationtů za účelem importu protonů byla demonstrována i v rámci této práce (kap. 5.5.2, obr. 5.16). Je tedy dobře možné, že buňky reagují na zvýšené extracelulární pH zvýšenou expresí proteinu schopného importovat protony.









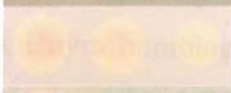



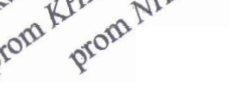
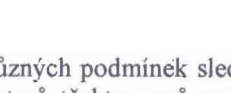
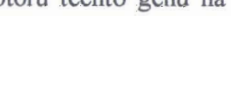
Promotor *KHA1* byl rovněž indukován zvýšeným pH, a to ještě ve větší míře než promotor *NHA1*. To odpovídá skutečnosti, že španělská skupina dr. Ariña neřadí gen *NHA1* mezi geny indukované pH 8,0 (na základě výsledků mikroarrayových experimentů), zatímco gen *KHA1* ano. Úroveň indukce exprese genu *NHA1* zvýšeným


pH byla zřejmě pod hranicí „cut-off“ v jejich experimentu a pokládali ji za nesignifikantní (Viladevall *et al.*, 2004). Indukce exprese genu *KHAI* vysokým pH bezpochyby souvisí s tím, že buňky potřebují protein Khal, aby byly schopné růst při zvýšeném extracelulárním pH.

K mírnému zbarvení buněk exprimujících β -galaktosidasu pod regulací promotory *KHAI* a *NHAI* došlo i na miskách s glycerolem, s ethanolem, s hygromycinem (300 $\mu\text{g/ml}$) a na misce inkubované při 37 °C; u buněk s promotorem *NHAI* navíc i na misce s nižší koncentrací hygromycinu (150 $\mu\text{g/ml}$) a na misce inkubované při 25 °C. Aktivita β -galaktosidasu v rozmezí 25-37 °C stoupá s teplotou (Coker *et al.*, 2003), barvení buněk při 37 °C může být tedy způsobeno zvýšenou aktivitou enzymu místo indukce testovaných promotorů.

Indukce promotoru *KHAI* hygromycinem by mohla souviset se zvýšenou citlivostí delečních mutantů *khal* k této látce (podobně jako indukce zvýšeným pH), je ovšem zvláštní, že jsou zbarveny i buňky exprimující β -galaktosidasu pod regulací promotoru *NHAI* (na rozdíl od kontrolní misky bez hygromycinu). Deleční mutanty *nhal* přitom zvýšenou citlivost k hygromycinu nemají, naopak, ke zvýšení citlivosti vede nadprodukce proteinu Nhal (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005a). Hygromycin v koncentraci 150-300 $\mu\text{g/ml}$ však mírně zvyšuje pH média MM (asi o 0,2), jako další vysvětlení se tedy znovu nabízí zvýšená aktivita enzymu namísto indukované exprese.

Zbarvení buněk na médiu s glycerolem nebo ethanolem mohlo být rovněž ovlivněno různou aktivitou β -galaktosidasu v závislosti na metabolismu buněk. Buňky rostoucí na nefermentovatelném zdroji uhlíku pouze respirují, při čemž nevzniká tolik kyselých produktů jako při fermentaci. Zároveň nemají tak bohatý zdroj energie jako je glukosa v kontrolní misce. Proto je nižší aktivita protonové ATPasy Pma1, okolí buněk není tak intenzivně okyselováno. Je možné, že i intracelulární pH je za těchto okolností bližší pH optimu pro aktivitu β -galaktosidasu.

zdroj uhlíku	teplota inkubace	solí	hygromycin	pH	
glukosa	30 °C	-	-	6,8	
glukosa	30 °C	1 M KCl	-	6,8	
glukosa	30 °C	1,5 M KCl	-	6,8	
glukosa	30 °C	0,5 M NaCl	-	6,8	
glukosa	30 °C	1 M NaCl	-	6,8	
glukosa	30 °C	-	150 µg/ml	6,8	
glukosa	30 °C	-	300 µg/ml	6,8	
glycerol	30 °C	-	-	6,8	
ethanol	30 °C	-	-	6,8	
glukosa	25 °C	-	-	6,8	
glukosa	37 °C	-	-	6,8	
glukosa	30 °C	-	-	5,5	
glukosa	30 °C	-	-	7,0	
glukosa	30 °C	-	-	7,5	
glukosa	30 °C	-	-	8,0	



 prázdný vektor prom *KHA1* prom *NHA1*

Obr. 5.29 Indukce exprese genů *KHA1* a *NHA1* za různých podmínek sledována pomocí exprese β -galaktosidasy pod regulací promotorů těchto genů na médiu MM s X-gal (40 µg/ml).

Z výsledků tohoto pokusu byl učiněn závěr, že metoda indukce exprese β -galaktosidasy přece jen není ideální pro studium regulace promotorů vzhledem k různé aktivitě enzymu za různých růstových podmínek. Variabilita zbarvení buněk by se jen těžko dala dát do souvislosti s indukcí exprese z promotorů *KHA1* a *NHA1*, kontrola nízké konstitutivní exprese (promotor *NHA1*) nefugnovala podle očekávání. Pouze indukce promotoru *KHA1* při pH 8,0 se dá pokládat za prokázanou, protože rozdíl v

barvení byl velmi výrazný v porovnání s nižšími hodnotami pH a přitom optimální pH pro činnost β -galaktosidasy leží přibližně uprostřed rozsahu testovaných hodnot pH.

5.9 Dvojitě mutanty *gef1* Δ *kha1* Δ

Na konferenci ICYGMB (International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology) v Göteborgu roku 2003 byl zveřejněn poster polské skupiny dr. A. Kurlandzké, zabývající se souvislostí mezi činností proteinu Kha1 a chloridových kanálů v *S. cerevisiae* (Flis a Kurlandzka, 2003). Původním záměrem autorů nebylo studium proteinu Kha1. Zabývali se Cl⁻ kanály a snažili se savčím chloridovým kanálem Clc2 (cDNA z *R. norvegicus* (Thiemann *et al.*, 1992)) komplementovat fenotypy delece *gef1* v *S. cerevisiae*. Gef1 je jediným kvasničným homologem savčích chloridových kanálů skupiny CLC (Jentsch *et al.*, 1995; Jentsch a Gunther, 1997) a jedná se o napěťově řízený chloridový kanál v membránách Golgiho aparátu *S. cerevisiae* (Flis *et al.*, 2002; Gaxiola *et al.*, 1998). Mezi fenotypové projevy delece *gef1* patří například porucha respirace na médiích s nízkým obsahem železa (Greene *et al.*, 1993), citlivost k některým dvoumocným kationtům (Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺), ke zvýšenému pH a k hygromycinu B (Gaxiola *et al.*, 1998).

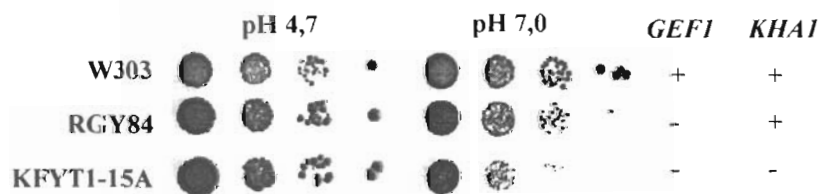
Savčí *CLC2* cDNA integrovaná v genomu mutantního kmene s delecí *gef1* nebyla schopna komplementovat poruchu respirace na médiích s nízkým obsahem železa, citlivost k Mn²⁺ ani k hygromycinu B (Flis a Kurlandzka, 2003). Autoři proto transformovali kmen *S. cerevisiae* *gef1* Δ s integrovaným savčím genem *CLC2* genomovou knihovnou *S. cerevisiae* v mnohokopiovém plasmidu. Kromě plasmidu nesoucího gen *GEF1* to byl právě ještě plasmid nesoucí gen *KHA1*, který byl schopen obnovit růst transformovaného kmene na médiu s nízkým obsahem železa a respiračním zdrojem uhlíku. V kmeni *gef1* Δ bez savčího genu *CLC2* přitom nadprodukce

Kha1p z plasmidu fenotyp *GEF1* neobnovila. Autoři také pozorovali vnitrobuněčnou lokalizaci proteinu Kha1 a vyvodili závěr, že další kopie proteinu Kha1 v buňkách by mohly například ovlivňovat pH Golgiho aparátu a tak umožnit savčímu Clc2p nahradit funkci kvasničného chloridového kanálu Gef1 (Flis a Kurlandzka, 2003).

Autoři posteru se také pokoušeli zjistit, zda v *S. cerevisiae* existuje genetická interakce mezi geny *GEF1* a *KHA1*. Připravili dvojité mutanty *gef1Δ kha1Δ* a hledali růstový fenotyp kvasinek specifický pro dvojitou mutaci. Testovali toleranci kmenů k NaCl, KCl, NaAc, KAc, Mn²⁺ a hygromycinu B a dále využití různých zdrojů uhlíku. Nepodařilo se jim však najít žádný rozdíl mezi dvojitým mutantem *gef1Δ kha1Δ* a jeho rodičovským kmenem (*gef1Δ*) (Flis *et al.*, 2005).

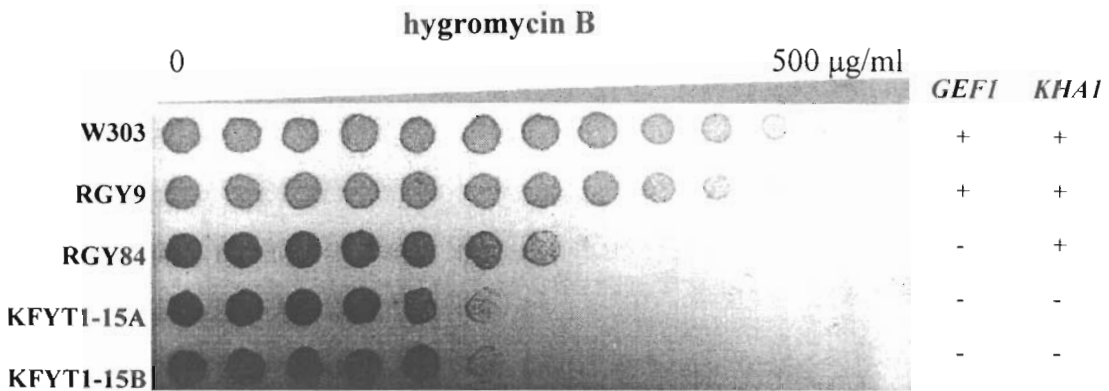
Dvojité mutanty KFYT1-15A (*MATa gef1Δ kha1Δ*), KFYT1-15B (*MATa gef1Δ kha1Δ*) a kontrolní rodičovské kmeny RGY84 (*MATa gef1Δ KHA1*) a RGY9 (*MATa GEF1 KHA1*) byly od polských kolegů získány a v naší laboratoři s nimi byly provedeny další kapkové testy za účelem hledání specifického fenotypu dvojitých mutantů *gef1Δ kha1Δ*.

V první řadě bylo ověřeno, že delece *gef1* způsobuje zpomalení růstu buněk při pH 7, jak bylo dříve publikováno (Gaxiola *et al.*, 1998). Dvojitý mutant *gef1Δ kha1Δ* rostl za těchto podmínek ještě hůře (obr. 5.30), vliv mutací *gef1* a *kha1* na citlivost ke zvýšenému pH je tedy kumulativní a pH 7,0 je jednou z podmínek umožňujících rozlišit dvojitého mutantu *gef1Δ kha1Δ* od jeho rodičovského kmene (*gef1Δ KHA1*).



Obr. 5.30 Citlivost kmenů k pH 7 na arginin-fosfátovém médiu

Rovněž citlivost buněk k hygromycinu B je zvyšována delecí *gef1* (Gaxiola *et al.*, 1998) a delece genu *KHA1* tuto citlivost zvyšovala ještě více (obr. 5.31). Použití média s gradientem hygromycinu B opět umožnilo rozlišení fenotypu dvojitého mutantu *gef1Δ kha1Δ* od rodičovského kmene (*gef1Δ KHA1*), což se nepodařilo v testech polské skupiny (Flis *et al.*, 2005).



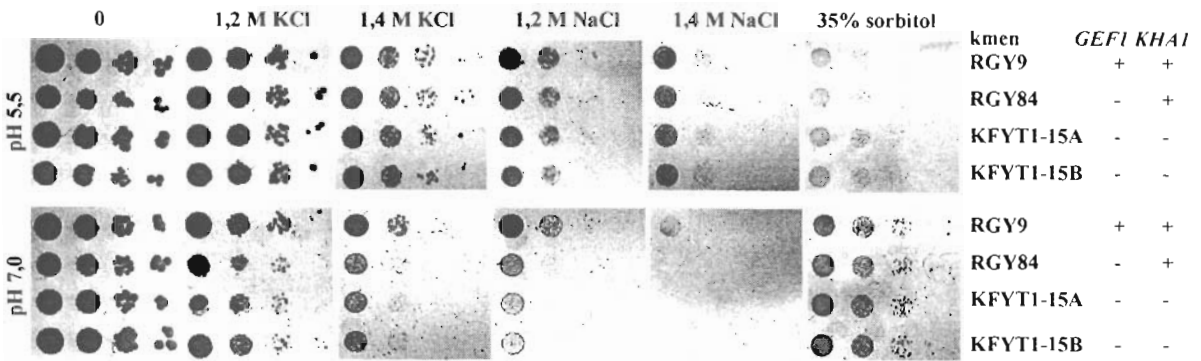
Obr. 5.31: Citlivost kmenů k hygromycinu B na médiu YNB-NH₄. Koncentrace hygromycinu B stoupá zleva doprava.

Na obrázku je vidět, že kmen RGY9 byl o něco citlivější k hygromycinu B než kmen W303, přestože oba tyto kmeny mají funkční kopie genů *GEFI* i *KHAI*. Kmen RGY9 a od něj odvozené mutanty *gef1Δ* však nenesou mutaci *ade2* (viz tab. 4.1). Proto byly kmeny RGY84 (*gef1Δ*) a KFYT1 (*gef1Δ khalΔ*) nadále srovnávány s kmenem RGY9.

Již dříve bylo publikováno, že protein Gef1 se podílí na homeostázi různých kationtů v buňkách (Cu²⁺, Mn²⁺, Na⁺, tetramethylamonium), pravděpodobně proto, že vnitrobuněčná sekvestrace těchto kationtů vyžaduje vhodnou regulaci transportu aniontů Cl⁻ a pH vnitrobuněčných organel (Gaxiola *et al.*, 1998). Proto byla dále testována citlivost kmenů s delecí *gef1* nebo *gef1 khal* k solím v médiu při pH 7,0 a 5,5. Na médiu YPG byla při pH 7,0 (20 mM MOPS) pozorována citlivost kmenů s delecí *gef1* ke KCl a NaCl (obr. 5.32). Kmeny KFYT1 s dvojitou delecí *gef1 khal* rostly stejně jako kmen RGY84 (*gef1Δ*), znovu se tedy potvrdilo, že delece genu *KHAI* neovlivňuje toleranci buněk k solím alkalických kovů. Citlivost kmenů s delecí *gef1* nebyla způsobena osmotickým tlakem solí v médiu, protože 35% sorbitol (odpovídá přibližně koncentraci 1,9 M) rozdíl v růstu nezpůsobil (obr. 5.32). Nově pozorovaným projevem delece *gef1* je tedy citlivost k vysoké koncentraci K⁺ (1,2-1,4 M).

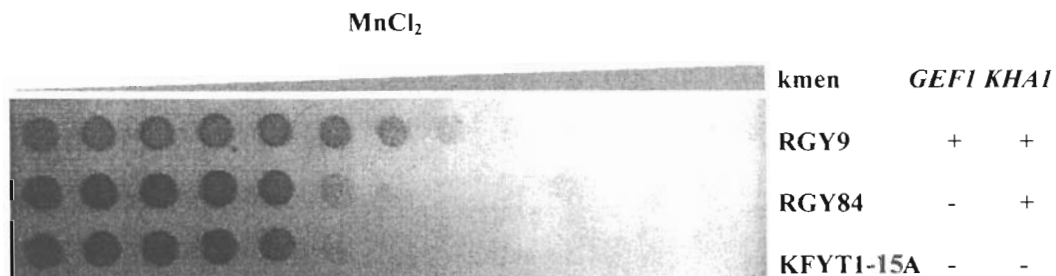
Zajímavé je, že na médiu YPG (obr. 5.32) nebyla pozorována citlivost kmenů s delecí *gef1* nebo *gef1 khal* k pH 7,0 na kontrolní misce bez solí, narozdíl od minimálního arginin-fosfátového média (obr. 5.30). Dostatek živin v bohatém médiu tedy zřejmě umožňuje buňkám snáze se vyrovnat se zvýšeným pH.

Na médiu YPG při pH 5,5 citlivost kmenů s delecí *gef1* k solím pozorována nebyla. Kmeny KFYT1-15A a KFYT1-15B s rozdílným párovacím typem (a stejnou kombinací delecí *gef1 khal*) se v toleranci k hygromycinu B ani k solím alkalických kovů nelišily (obr. 5.31 a 5.32).



Obr. 5.32 Citlivost kmenů k solím a sorbitolu na médiu YPG.

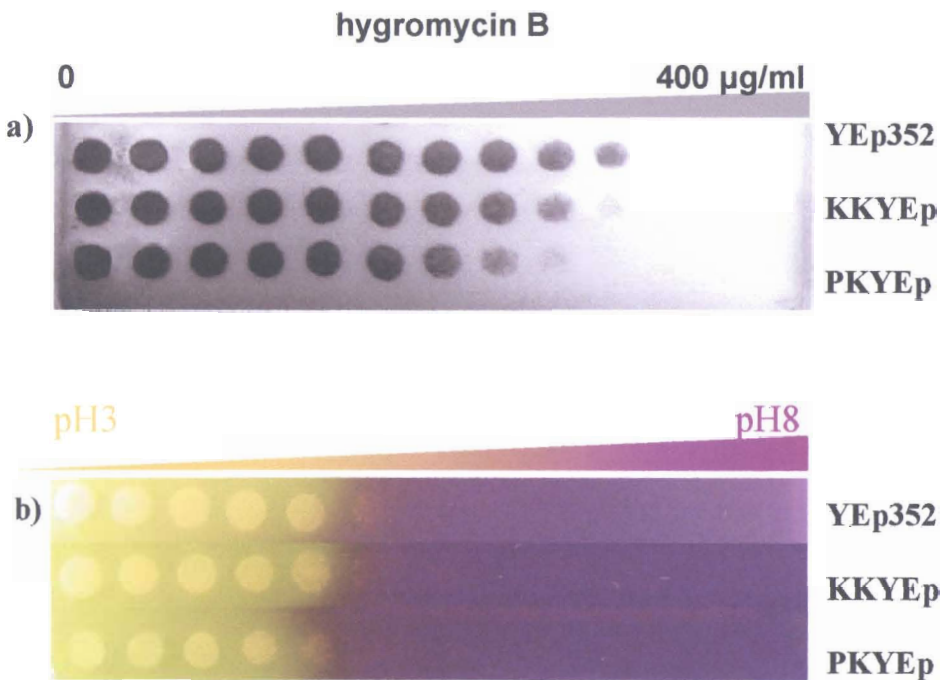
Z dvojmocných kationtů byl testován chlorid manganatý (obr. 5.33). V tomto případě se potvrdily výsledky polské skupiny autorů (Flis *et al.*, 2005), že delece *gef1* sice zvyšuje citlivost k manganatým iontům, ale dvojitý mutant *gef1Δ khalΔ* roste stejně jako jeho rodičovský kmen *gef1Δ*. Delece *khal* tedy citlivost k Mn^{2+} nezvyšovala.



Obr. 5.33 Citlivost kmenů k chloridu manganatému na médiu YNB-NH₄. Koncentrace MnCl₂ stoupá zleva doprava.

I v kmenech s delecí *gef1* se tedy delece *khal* projevuje pouze zvýšením citlivosti ke zvýšenému pH a k hygromycinu B. Žádný další specifický fenotyp dvojitých mutantů *gef1Δ khalΔ* se nepodařilo nalézt.

Kmen RGY84 pak byl transformován mnohokopiovými plasmidy pro zvýšenou expresi genu *KHA1* (KKYE_p – gen *KHA1* s vlastním promotorem, PKYE_p – gen *KHA1* s promotorem *PMA1*), pro ověření, zda nadprodukce proteinu Kha1 nemůže komplementovat fenotyp mutantního kmene *gef1* na zvýšeném pH nebo hygromycinu B. Jak je vidět na obr. 5.34, delece *gef1* skutečně není komplementovatelná nadprodukcí proteinu Kha1. V případě hygromycinu B se tak znovu potvrdily výsledky polské skupiny (Flis *et al.*, 2005) s tím doplněním, že při vyšších koncentracích hygromycinu B působí nadbytečné kopie proteinu Kha1 v buňkách spíše škodlivě (obr. 5.34a). Komplementace růstu při vysokém pH dříve testována nebyla. I v tomto případě platí, že kopie genu *KHA1* přidané do buněk v plasmidu nemohou nahradit chybějící gen *GEF1*. Škodlivost nadbytečných kopií proteinu Kha1 se tady projevuje pouze mírně v případě plasmidu PKYE_p, z kterého je Kha1p exprimován pod regulací silného promotoru *PMA1* (obr. 5.34b).



Obr. 5.34 Růst kmene RGY84 (*gef1*Δ) transformovaného plasmidy pro nadprodukcí proteinu Kha1 na médiu YNB-NH₄ s gradientem hygromycinu B (a) nebo pH 3-8 (b). Do média s gradientem pH byl přidán barevný indikátor pH (BKP).

V této rozšířené sérii kapkových testů se tedy potvrdilo pozorování polské skupiny, že samotný protein Kha1 ani ve větším počtu kopií nemůže komplementovat delecí *gef1* v *S. cerevisiae*, přestože některé fenotypové projevy (citlivost k hygromycinu B a ke zvýšenému pH) mají kmeny s delecí *gef1* a kmeny s delecí *kha1* společné. Kha1p tedy pravděpodobně ovlivňuje funkci Cl⁻ kanálů jen nepřímo, například regulací pH uvnitř organel.

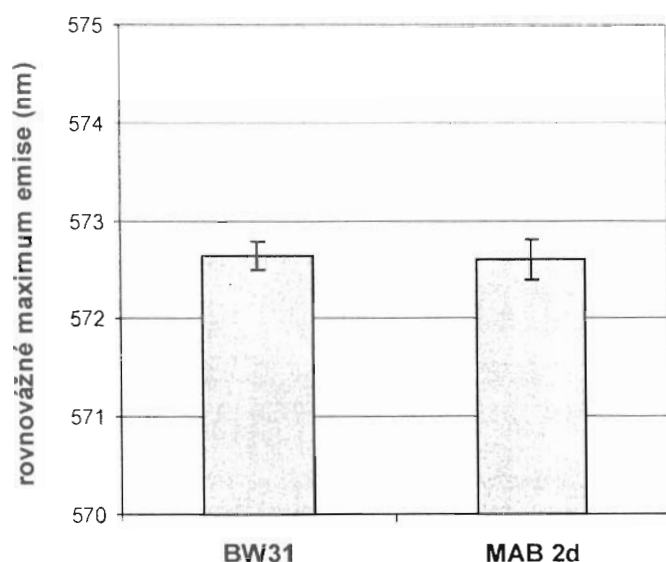
5.10 Měření membránového potenciálu

Na základě citlivosti delečních mutantů *khal* k hygromycinu B bylo rozhodnuto testovat, zda přítomnost nebo absence proteinu Khal v buňkách *S. cerevisiae* ovlivňuje jejich membránový potenciál. Tento postup byl doporučen i profesorem A. Peňou z UNAM v Mexiku, jedním z autorů původní publikace o proteinu Khal (Ramírez *et al.*, 1998). Podle výsledků mexické skupiny měly kmeny s disrupcí *khal::URA3* zvýšený membránový potenciál oproti kontrolním kmenům. Tím by se dala dobře vysvětlit zvýšená citlivost mutantních kmenů k hygromycinu B. Hygromycin B totiž vstupuje do buněk v závislosti na membránovém potenciálu a již dříve bylo prokázáno, že například silně hyperpolarizované mutantní kmeny postrádající transportní systémy Trk1 a Trk2 mají zvýšenou citlivost k hygromycinu B (Madrid *et al.*, 1998), a naopak depolarizované kmeny s mutací *pma1* (snížená aktivita ATPasy plasmatické membrány) jsou schopny tolerovat vyšší koncentrace tohoto toxického kationtu (Perlin *et al.*, 1988; Perlin *et al.*, 1989). Jak už je zmíněno výše, většina fenotypů pozorovaných mexickou skupinou prof. Peňi byla zkreslena porovnáváním kmenů s odlišným metabolismem uracilu. Proto bylo rozhodnuto testovat, zda i kmen s delecí genu *khal* pomocí kazety *loxP-kanMX-loxP* bude mít zvýšený membránový potenciál.

5.10.1 Ověření relevance metody

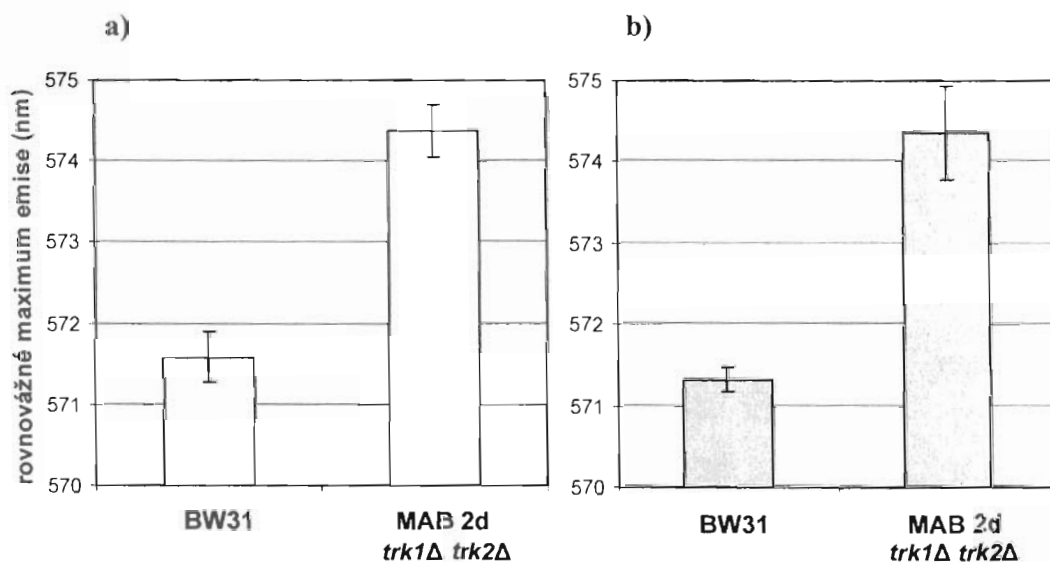
Membránový potenciál buněk byl studován ve spolupráci s Fyzikálním ústavem MFF UK pomocí distribuční fluorescenční sondy diS-C₃(3) (viz kap. 4.2.2.2). Sonda (kladně nabitá) vstupuje do buněk v závislosti na jejich membránovém potenciálu. Vazba sondy diS-C₃(3) na vnitrobuněčné komponenty zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence a posouvá emisní spektrum do červena. Poloha maxima emisního spektra je tedy závislá na koncentraci sondy uvnitř buněk (Plášek *et al.*, 1994) a nepřímou tak odráží velikost membránového potenciálu. Rovnovážné emisní maximum (λ_{\max}^{eq}) volné sondy v pufru je asi 570 nm, maximální naměřené hodnoty hyperpolarizovaných buněk byly okolo 580 nm (O. Zimmermannová, ústní sdělení). V tomto rozmezí tedy lze sledovat změny membránového potenciálu buněk.

Pro ověření vhodnosti metody na porovnávání membránového potenciálu kvasinkových buněk lišících se pouze přítomností/absencí různých transportérů kationtů alkalických kovů byla nejprve měřena fluorescence kmenů BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*) a MAB 2d (*enal-4Δ nha1Δ trk1Δ trk2Δ*). Protože kmen MAB 2d není schopen aktivně importovat K^+ (viz kap. 2.4.4.1), špatně roste při koncentracích K^+ nižších než 50 mM a pro jeho kultivaci se běžně používá médium s přidavkem 100 mM KCl. V takovém médiu roste kmen MAB 2d přibližně stejně rychle jako kontrolní kmen BW31, protože draslík vstupující do buněk nespecifickými transportními systémy (např. NSC1) stačí k pokrytí potřeb buněk. Za těchto okolností žádný rozdíl v membránovém potenciálu mezi kmeny BW31 a MAB 2d pozorován nebyl – rovnovážné maximum emise mělo stejnou vlnovou délku pro oba testované kmeny (obr. 5.35).



Obr. 5.35 Srovnání membránových potenciálů kmenů BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*) a MAB 2d (*enal-4Δ nha1Δ trk1Δ trk2Δ*) rostoucích v médiu YPG se 100 mM KCl. Byly změřeny nejméně 4 vzorky z nejméně dvou nezávislých experimentů. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce.

Kmen MAB 2d, postrádající transportní systémy Trk1 a Trk2, by podle publikovaných údajů (Madrid *et al.*, 1998) měl mít při nízkých koncentracích draslíku v médiu hyperpolarizovanou plasmatickou membránu (v důsledku neschopnosti aktivně transportovat K^+ do buněk). V další fázi pokusu byly tedy oba kmeny hodinu před měřením potenciálu přeneseny z růstového média (YPG + 100 mM KCl) do média YPG bez přidaného KCl. Za těchto podmínek bylo rovnovážné maximum emise (λ_{\max}^{eq}) kmene MAB 2d skutečně podstatně vyšší než λ_{\max}^{eq} kmene BW31 (obr. 5.36a), což odpovídá hyperpolarizaci v následku hladovění na draslík. Kmen BW31 za těchto podmínek na draslík nehladověl, protože draslík obsažený ve standardním médiu YPG je dostatečný pro pokrytí potřeb buněk s transportními systémy Trk1 a Trk2. Podobná situace nastala, když byly kmeny od začátku pokusu pěstovány v médiu YPG s 10 mM KCl. Kmen MAB 2d za těchto podmínek rostl o něco pomaleji a opět byl hyperpolarizován ve srovnání s kmenem BW31 (obr. 5.36b).

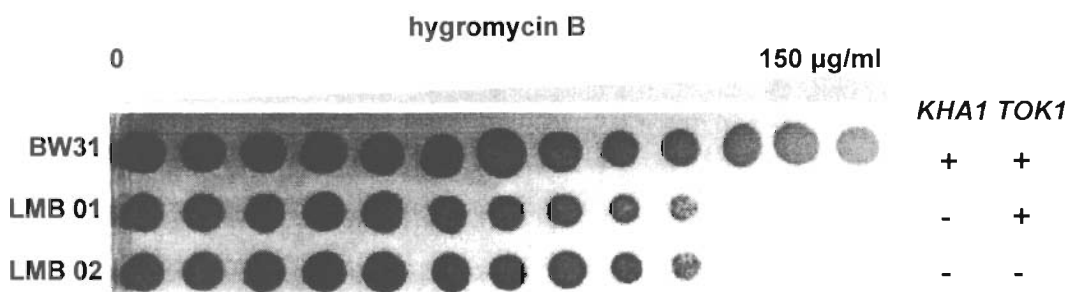


Obr. 5.36 Hyperpolarizace kmene postrádajícího transportní systémy Trk1 a Trk2 po 1 hodině inkubace v YPG bez přidaného KCl (a) a po pěstování v YPG s 10 mM KCl (b). Byly změřeny nejméně 4 vzorky z nejméně dvou nezávislých experimentů. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce.

Podářilo se tedy novou metodou zopakovat výsledky španělské skupiny (hyperpolarizace kmenů s delecí *trk1 trk2*) naměřené pomocí fluorescenční sondy DiOC₆(3) a průtokové cytometrie (Madrid *et al.*, 1998). Metoda měření fluorescence sondy diS-C₃(3) se tím ukázala jako vhodná pro porovnávání membránového potenciálu kvasinkových kmenů lišících se přítomností či absencí transportních systémů pro draselné kationty.

5.10.2 Porovnání membránového potenciálu kmenů BW31, LMB 01 a LMB 02

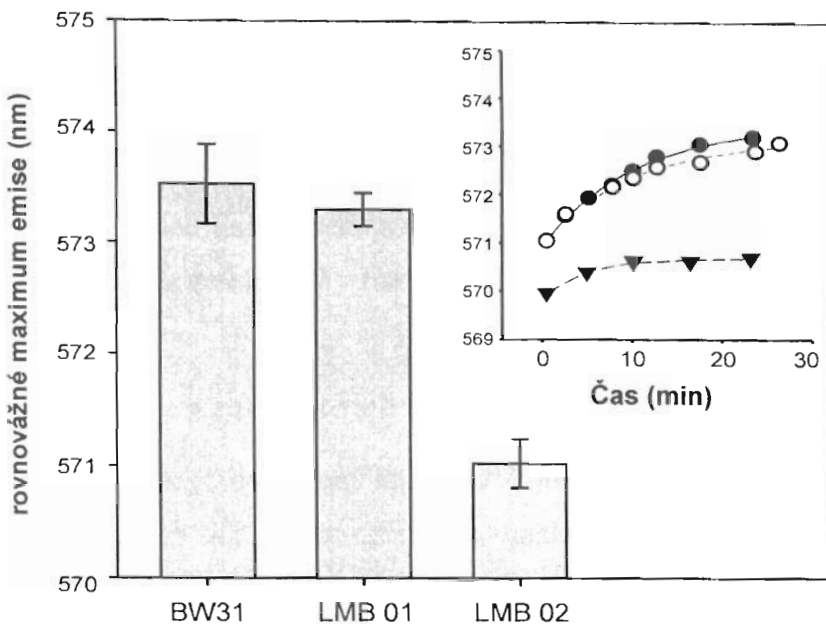
Dále byl testován membránový potenciál delečních mutantů *kha1*, aby se zjistilo, zda jejich zvýšená citlivost k hygromycinu B (obr. 5.19, obr. 5.37) je způsobena vyšším membránovým potenciálem (porovnaným mexickou skupinou prof. Peňi pro kmen s disrupcí *kha1::URA3*, Ramírez *et al.*, 1998). Do testování byl zařazen také deleční mutant *tok1-kha1*, protože i kanál Tok1 byl popsán jako transportní systém pro K⁺ (Bertl *et al.*, 1993; Ketchum *et al.*, 1995), ale membránový potenciál mutantních kmenů nebyl dosud studován. Jak je vidět na obr. 5.37, delece *kha1* zvyšovala citlivost k hygromycinu, zatímco delece *tok1* citlivost neovlivňovala.



Obr. 5.37 Růst kmenů na médiu YPG s hygromycinem B (koncentrace stoupá zleva doprava). Genotypy kmenů: BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*), LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*), LMB 02 (*enal-4Δ nha1Δ tok1-kha1Δ*).

Pokud by tedy citlivost studovaných kmenů k hygromycinu B byla dána pouze jejich membránovým potenciálem, měl by kmen LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*) být hyperpolarizován ve srovnání s kmenem BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*), zatímco delece *tok1* by neměla ovlivnit potenciál kmene LMB 02 (*enal-4Δ nha1Δ tok1-kha1Δ*). Jak je ale vidět z výsledků uvedených níže, membránový potenciál pravděpodobně není jediným faktorem ovlivňujícím citlivost k hygromycinu B.

Srovnání membránového potenciálu kmenů BW31, LMB 01 a LMB 02 pomocí fluorescenčního barvení sondou diS-C₃(3) je znázorněno na obr. 5.38. Je vidět, že delece genu *KHA1* membránový potenciál neovlivňovala (kmen LMB 01 má stejné rovnovážné maximum emise po obarvení sondou diS-C₃(3) jako kmen BW31), zatímco kmen LMB 02 je depolarizován (má nižší vlnovou délku λ_{\max}^{eq}).



Obr. 5.38 Srovnání membránového potenciálu kmenů BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*) LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*) a LMB 02 (*enal-4Δ nha1Δ tok1-kha1Δ*). Vložený graf: Příklad barvicích křivek – závislost intenzity fluorescence na čase od přidání fluorescenční sondy k buněčné suspenzi v pufru CP (● BW31, ○ LMB 01, ▼ LMB 02). Bylo změřeno nejméně 6 vzorků z nejméně tří nezávislých experimentů. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce.

Je tedy vidět, že membránový potenciál není jediným faktorem ovlivňujícím citlivost k hygromycinu B. Již dříve byla v práci (Brett *et al.*, 2005b) diskutována varianta, že například intracelulární antiporter Nhx1 by se na rezistenci k hygromycinu B mohl podílet regulací pH endosomálních váčků a následně sekvestrací této toxické látky ve vakuole. Je tedy pravděpodobné, že i protein Kha1 se na rezistenci k hygromycinu B podílí spíše na úrovni vnitrobuněčné sekvestrace než na úrovni vstupu do buněk, který je závislý na membránovém potenciálu. I v tomto případě byly

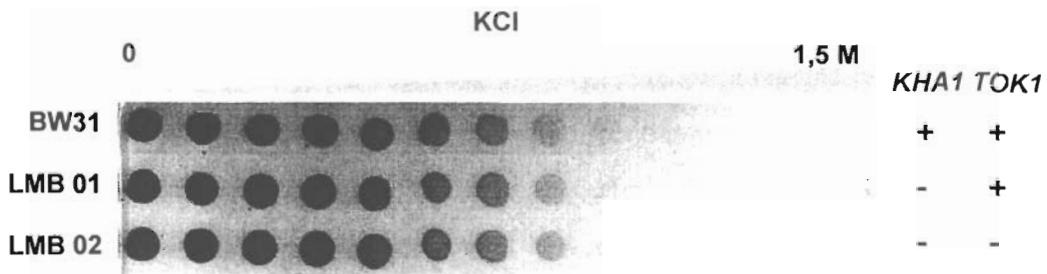
výsledky mexické skupiny prof. Peňi zřejmě zkresleny rozdílným metabolismem uracilu srovnávaných kmenů – pozorované zvýšení membránového potenciálu pro kmen bez proteinu Khal (Ramírez *et al.*, 1998) se v případě delece kazetou *loxP-kanMX-loxP* nepotvrdilo.

Na rozdíl od proteinu Khal se ovšem ukázalo, že protein Tok1 hraje významnou roli v udržování membránového potenciálu *S. cerevisiae*. V této fázi však nebylo zcela jasné, zda se jedná pouze o vliv delece *tok1*, nebo zda depolarizace nastává v důsledku delece posledního exportního systému pro K^+ . Kmen LMB 02 totiž nemá ani ATPasy Enal-4 a antiporter Nha1. Pokud by pro zachování membránového potenciálu stačil jeden z exportních systémů pro K^+ , delece *tok1* by nezpůsobila depolarizaci kmenů s funkční ATPasou Enal a/nebo s funkčním antiporterem Nha1. Bylo proto rozhodnuto připravit kmeny s delecí *tok1* v různých kombinacích s delecemi *enal-4* a *nha1*.

5.10.3 Příprava mutantních kmenů *tok1Δ*

Tok1p je napětově řízený kanál plasmatické membrány *S. cerevisiae* pro draselné kationty (Bertl *et al.*, 1993), upřednostňující tok K^+ směrem ven z buněk, ačkoli za určitých specifických podmínek přes něj mohou ionty K^+ i vstupovat do buněk (Fairman *et al.*, 1999). Přestože je popsána jeho struktura a biofyzikální vlastnosti jsou dobře charakterizovány metodou terčíkového zámku (Bertl *et al.*, 1998), fyziologická funkce tohoto proteinu nebyla dosud jasně stanovena.

Buňky s delecí *tok1* jsou schopny normálního růstu, není změněna jejich tolerance k nízkým ani k vysokým koncentracím K^+ (Bertl *et al.*, 2003). Jediným popsaným růstovým fenotypem delece *tok1* je zvýšená tolerance mutantních buněk k iontům cesným (Bertl *et al.*, 2003). Jak je vidět na obr. 5.39, ani na pozadí delece ostatních genů kódujících exportní systémy pro K^+ (*ENAI-4*, *NHA1*) se delece *tok1* (podobně jako *khal*) neprojevila zvýšením citlivosti ke KCl.



Obr. 5.39 Růst kmenů na médiu s KCl (koncentrace stoupá zleva doprava). Genotypy kmenů: BW31 (*enal-4Δ nha1Δ*), LMB 01 (*enal-4Δ nha1Δ kha1Δ*), LMB 02 (*enal-4Δ nha1Δ tok1-kha1Δ*).

Ani v transportních pokusech (kap. 5.5.2) nebyl zjištěn žádný transport K^+ zprostředkovaný kanálem Tok1 (obr. 5.17). Fyziologická role kanálu Tok1 v transportu draselných kationtů je tedy poměrně nejasná.

Kmeny s delecí *tok1* v různých kombinacích s delecemi *enal-4* a *nha1* byly připraveny homologní rekombinací podle protokolu popsaného v Güldener *et al.* (1996). Pro přípravu deleční kazety pomocí PCR byly použity primery TOK-kan a TOK-zp-kan (tab. 4.4). Kmeny W303, GW19, CW25 a BW31 byly transformovány elektroporací a vysety na selekční médium YPG s geneticinem (800 $\mu\text{g/ml}$). Správná integrace deleční kazety byla ověřena pomocí „colony PCR“ (kap. 4.2.1.11) s primery uvedenými v tab. 4.4. Přehled připravených delečních kmenů je v tab. 5.6.

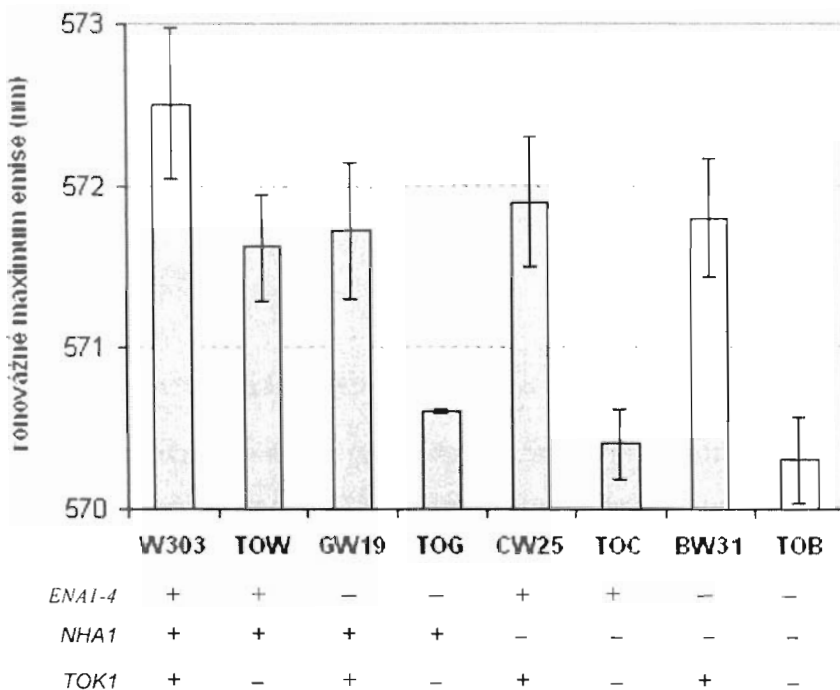
Tab. 5.6 Kmeny s delecí *tok1* připravené pro srovnání membránového potenciálu

rodičovský kmen	odvozený mutant <i>tok1Δ</i>	genotyp
W303-1A	TOW	<i>ENAI-4 NHA1 tok1Δ</i>
GW19	TOG	<i>enal-4Δ NHA1 tok1Δ</i>
CW25	TOC	<i>ENAI-4 nha1Δ tok1Δ</i>
BW31	TOB	<i>enal-4Δ nha1Δ tok1Δ</i>

5.10.4 Vliv mutace *tok1Δ* na membránový potenciál kvasinek

5.10.4.1 Depolarizace kmenů s delecí *tok1*

Připravené kmeny s delecí *tok1* byly porovnány se svými rodičovskými kmeny a mezi sebou navzájem pomocí fluorescenčního barvení sondou diS-C₃(3). Obr. 5.40 znázorňuje rozdíly v membránovém potenciálu jednotlivých kmenů. Je vidět, že delece kteréhokoliv exportního systému pro K⁺ (ATPasy *Ena*, antiporteru *Nha1* nebo kanálu *Tok1*) vede k určitému snížení membránového potenciálu buněk. Nejsilněji depolarizovaný je kmen *TOB*, který nemá ani ATPasy *Ena*, ani antiporter *Nha1*, ani kanál *Tok1*. Ukázalo se tedy, že nejen proteiny *Trk1* a *Trk2*, ale i exportní systémy pro draslík hrají roli v udržování membránového potenciálu.



Obr. 5.40 Srovnání membránového potenciálu kmenů s různými kombinacemi delecí genů *ENA1-4*, *NHA1* a *TOK1*. Byly změřeny nejméně 4 vzorky z nejméně dvou nezávislých experimentů. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce.

Zajímavé je srovnání dvojitých mutantů – je-li jedním z dvojice deletovaných systémů Tok1 (kmeny TOG, TOC), je potenciál podstatně nižší, než při kombinaci delece *Ena* a *Nha1* (kmen BW31). Jinými slovy, je-li z exportních systémů pro K^+ v buňkách přítomen pouze kanál Tok1 (kmen BW31), dokáže udržet membránový potenciál na úrovni srovnatelné s kontrolním kmenem W303, zatímco samotný antiporter *Nha1* (kmen TOG) ani samotné ATPasy *Ena1-4* (kmen TOC) to nedokážou (obr. 5.40). Statistické zhodnocení rozdílů průměrných hodnot λ_{\max}^{eq} dvoustranným t-testem pro strany s různým rozptylem je v tab. 5.7, signifikantní rozdíly (hodnota parametru $p < 5\%$) jsou vyznačeny tučně.

Tab. 5.7 Statistické hodnocení rozdílů v membránovém potenciálu dvoustranným t-testem

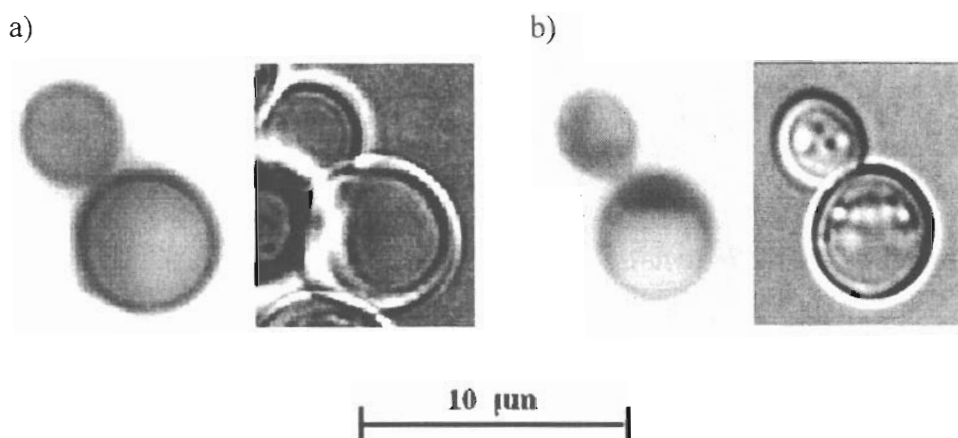
	W303	TOW	GW19	TOG	CW25	TOC	BW31	
TOW	6,88 %							TOW
GW19	3,31 %	76,52 %						GW19
TOG	0,08 %	14,20 %	1,28 %					TOG
CW25	7,41 %	43,14 %	55,53 %	0,73 %				CW25
TOC	0,09 %	6,10 %	0,83 %	41,14 %	0,52 %			TOC
BW31	5,93 %	60,42 %	79,55 %	2,90 %	74,55 %	1,26 %		BW31
TOB	0,01 %	4,57 %	0,29 %	18,74 %	0,14 %	68,69 %	0,57 %	TOB
	W303	TOW	GW19	TOG	CW25	TOC	BW31	

5.10.4.2 Komplementace fenotypu delece *tok1* genem *TOK1* v plasmidu

Aby bylo možno s jistotou tvrdit, že nejvýraznější pozorovaná depolarizace buněk skutečně souvisí s delecí genu *TOK1*, byly vybrané kmeny transformovány plasmidem nesoucím gen *TOK1*. Pro test komplementace byly kmeny W303 (wt), TOW (*tok1* Δ), BW31 (*ena1-4* Δ *nha1* Δ) a TOB (*ena1-4* Δ *nha1* Δ *tok1* Δ) transformovány (1) plasmidem pGFP-TOK1 (tab. 4.3), který byl vytvořen z plasmidu pYEX a nese gen *TOK1* (značený GFP na N-konci) za indukovatelným promotorem *CUP1*, a (2) plasmidem pYEX, exprimujícím za promotorem *CUP1* pouze GFP.

U všech transformantů byla fluorescenční mikroskopií ověřena lokalizace značeného proteinu Tok1 v plasmatické membráně nebo samotného GFP v cytosolu (příklad lokalizace je na obr. 5.41) Fluorescenční parametry GFP (excit. 450-480 nm, em. 490-515 nm) a *diS-C₃(3)* (excit. 531 nm, em. 560-590 nm) jsou natolik rozdílné, že

přítomnost GFP v buňkách nemohla ovlivnit výsledky měření fluorescence diS-C₃(3). Navíc i z prázdného plasmidu pYEX se exprimuje GFP (viz obr. 5.41), takže i kdyby fluorescence GFP byla při měření zaznamenána, neovlivnila by rozdíl mezi kmeny transformovanými prázdným plasmidem a kmeny s plasmidem nesoucím gen *TOK1*.



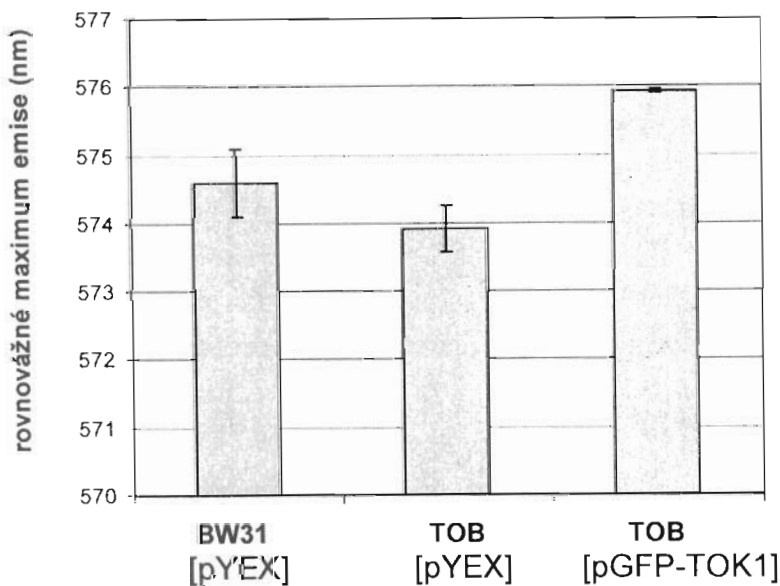
Obr. 5.41 Fluorescence proteinu Tok1 značeného GFP na N-konci (a) a buňky exprimující samotný GFP z vektoru pYEX (b). Snímané obrázky fluorescenčního signálu převedeny do černobílého módu a konvertovány na negativ.

Kmeny transformované plasmidy nebylo možné před vlastním měřením pěstovat v médiu YPG, aby nedošlo ke ztrátě plasmidu. Byly proto inkubovány v médiu YNB-NH₄ s auxotrofními přísadkami (viz kap. 4.2.2.2) a s 20 µM CuSO₄ pro indukci promotoru *CUP1*. Změna inkubačního média vedla k posunu absolutních hodnot rovnovážného maxima emise směrem vzhůru (srov. obr. 5.40 a 5.42). Vzhledem k tomu, že metoda jako taková neslouží ke stanovení absolutní hodnoty membránového potenciálu, ale pouze pro srovnávací účely, není tento posun na překážku porovnání kmenů v rámci stejných experimentálních podmínek mezi sebou. Jinými slovy: nelze porovnat kmen BW31 bez plasmidu (obr. 5.40, rovnovážné maximum emise 571,5 nm) s kmenem BW31 transformovaným prázdným plasmidem pYEX (obr. 5.42, rovnovážné maximum emise 574,6 nm) a vyvodit závěr, že buňky BW31 jsou hyperpolarizovány následkem transformace. Tyto kmeny nebyly pěstovány za stejných podmínek a nelze tedy srovnávat absolutní hodnoty rovnovážného maxima emise diS-C₃(3). V rámci jednoho

experimentu a stejných kultivačních podmínek ovšem kmene srovnávat lze (např. depolarizace netransformovaného kmene TOW oproti W303, obr. 5.40).

Jak je vidět na obr. 5.42, depolarizace kmene TOB oproti BW31 po kultivaci v médiu YNB nebyla tak výrazná jako v YPG – rozdíl v poloze rovnovážného emisního maxima (λ_{\max}^{eq}) byl pouze 0,7 nm a statistický parametr p stanovený dvoustranným Studentovým t -testem byl 14,3 %. Ačkoliv průměrná λ_{\max}^{eq} kmene TOB je nižší než kmene BW31, nedá se tedy hovořit o signifikantním rozdílu. Je pravděpodobné, že několikanásobné zopakování pokusu by parametr p snížilo (pro kmen BW31 bylo měřeno 8 vzorků, pro kmen TOB pouze 4), z časových důvodů však další měření nebyla provedena.

Kmen TOB (*enal-4Δ nhalΔ tok1Δ*) transformovaný genem *TOK1* v mnohokopiovém plasmidu měl λ_{\max}^{eq} o 2 nm vyšší, než tentýž kmen transformovaný prázdným plasmidem. Ačkoliv i zde by pro plné potvrzení výsledků bylo třeba provést vyšší počet měření, v prvním přiblížení se zdá, že gen *TOK1* vnesený do buněk v plasmidu je schopen zvýšit membránový potenciál (pro kmen transformovaný plasmidem s genem *TOK1* byly rovněž změřeny pouze 4 vzorky, parametr p pro srovnání s kmenem s prázdným plasmidem je 7,5 %).



Obr. 5.42 Komplementace depolarizace genem *TOK1* v plasmidu. Byly změřeny nejméně 4 vzorky z nejméně dvou nezávislých experimentů.. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce.

Zvýšení λ_{\max}^{eq} kmene TOB po transformaci genem *TOKI* v plasmidu až nad úroveň λ_{\max}^{eq} kontrolního kmene BW31 se dá vysvětlit jednak tím, že gen byl do buněk vnesen v mnohokopiovém vektoru, a dále indukcí promotoru *CUPI*, pod jehož regulací byl gen *TOKI* z plasmidu exprimován. V buňkách exprimujících gen z plasmidu se tedy proteinu Tok1 tvoří více, než v buňkách kontrolních. Podobný výsledek (mírná hyperpolarizace kmenů nadprodukcujících protein Tok1 z plasmidu) byla pozorována i pro kmeny W303, TOW a BW31.

5.11 Komplementace mutace *khal1*Δ rostlinným proteinem *AtChx17*

AtChx17 je domnělý K^+/H^+ antiporter z rodiny CPA2 (Sze *et al.*, 2004). Je exprimován v kořenových buňkách *A. thaliana* a podílí se pravděpodobně na získání a udržení potřebného množství draselných kationtů (Cellier *et al.*, 2004). Funkce proteinu Chx17 byla stanovena na základě zjištění, že exprese genu je silně indukována hladověním rostliny na draslík nebo stresem NaCl. Mutantní rostliny *chx17* akumulovaly méně draslíku v buňkách kořene než rostliny kontrolní (Cellier *et al.*, 2004).

Autoři publikace (Cellier *et al.*, 2004) izolovali cDNA genu *AtCHX17* a po vložení do expresního vektoru pYES2 se pokoušeli komplementovat fenotypy mutantních kvasinkových kmenů (*nhx1*, *enal*, *trk1-trk2* a *khal*). Testovali různé koncentrace Na^+ a K^+ v médiu, ale nepozorovali žádnou změnu tolerance mutantních kvasinek k těmto iontům po transformaci plasmidem pCHX17 (*AtCHX17* v pYES2).

Srovnání proteinové sekvence *AtChx17* se sekvencemi kvasinkových transportních systémů testovaných v práci (Cellier *et al.*, 2004) je v tab. 5.8.

Tab. 5.8 Srovnání proteinových sekvencí *AtChx17* a vybraných transportních systémů v *S. cerevisiae* (% identity)

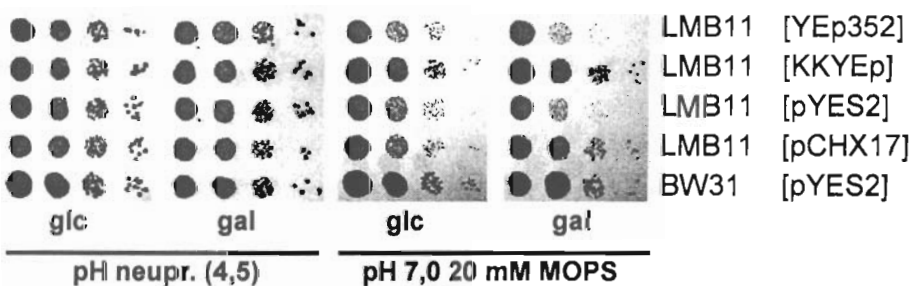
<i>AtChx17</i>	<i>ScEnal</i>	<i>ScKhal</i>	<i>ScNhx1</i>	<i>ScTrk1</i>	<i>ScTrk2</i>	
***	12.1	27.7	12.0	10.5	12.4	<i>AtChx17</i>
	***	10.2	15.1	16.9	17.5	<i>ScEnal</i>
		***	11.0	8.0	9.8	<i>ScKhal</i>
			***	12.3	10.3	<i>ScNhx1</i>
				***	53.8	<i>ScTrk1</i>
					***	<i>ScTrk2</i>

Je zřejmé, že ze všech kvasinkových transportních systémů testovaných v práci (Cellier *et al.*, 2004) rostlinný protein *AtChx17* nejlépe odpovídá proteinu *Khal* (27,7 % identity v celé délce proteinů, 37,3 % v hydrofobní části proteinu, tedy transmembránových doménách propojených krátkými hydrofilními smyčkami). Deleční mutant *khal* ovšem nemá změněnou citlivost k Na^+ a K^+ v médiu (kap. 5.1.1 a 5.1.5.1), proto je pochopitelné, že autoři práce nepozorovali žádný fenotypový projev proteinu

AtChx17 v mutantních kvasinkách. Je vhodné připomenout, že autoři tyto výsledky neznali a pro mutaci *khal* hledali fenotypové projevy popsané v Ramírez *et al.* (1998). Proto bylo rozhodnuto testovat, zda rostlinný gen *AtCHX17* bude schopen komplementovat fenotypové projevy mutace *khal* popsané v této disertační práci.

5.11.1 Komplementace citlivosti ke zvýšenému pH média

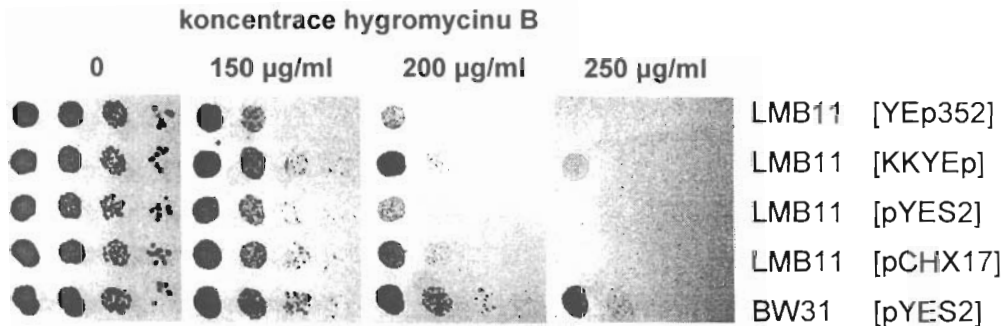
Od F. Celliera z Laboratoře biochemie a molekulární fyziologie rostlin INRA v Montpellier ve Francii byl získán expresní vektor pYES obsahující cDNA genu *AtCHX17* za promotorem *GALI*, používaný v práci (Cellier *et al.*, 2004). Plasmid je v této práci dále nazýván pCHX17. Tímto plasmidem (a zároveň prázdným plasmidem pYES2) byl transformován kmen LMB11. Na obr. 5.43 je vidět, že kmen LMB11 transformovaný plasmidem pCHX17 roste při pH 7 na misce s galaktosou stejně dobře jako kmen BW31 (exprimující *Khalp* z chromosomu) nebo jako kmen LMB11 transformovaný plasmidem KKYE_p (gen *KHA1* s vlastním promotorem v plasmidu YE_p352). Naproti tomu na misce s glukosou, kde je promotor *GALI* reprimován, roste kmen transformovaný pCHX17 jako by byl transformován prázdným plasmidem. Je tedy zřejmé, že gen *AtCHX17* je schopen udělit buňkám toleranci ke zvýšenému pH a exprese genu *AtCHX17* je schopna fenotypově komplementovat delecí genu *KHA1*.



Obr. 5.43 Komplementace fenotypu delecí *khal* rostlinným přenašečem *AtCHX17* exprimovaným pod regulací promotoru *GALI*. Kmeny pěstovány na médiu YNB-NH₄, zdroj uhlíku uveden v obrázku (glc – glukosa, gal – galaktosa).

5.11.2 Komplementace citlivosti k hygromycinu

Dále bylo ověřeno, že i citlivost mutantního kmene *kha1Δ* k hygromycinu B je komplementována rostlinným proteinem *AtChx17* exprimovaným z plasmidu (obr. 5.44).



Obr. 5.44 Komplementace fenotypu delecce *kha1* rostlinným přenašečem *AtCHX17* exprimovaným pod regulací promotoru *GALI*. Kmeny pěstovány na médiu YNB-NH₄ s galaktosou jako jediným zdrojem uhlíku, koncentrace hygromycinu B uvedena v obrázku.

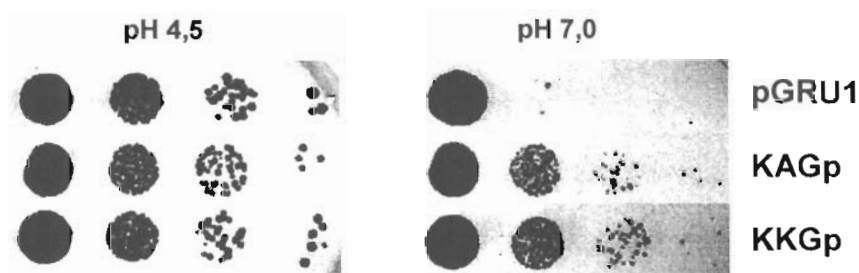
Oba známé fenotypy delecce *kha1* je tedy možné komplementovat rostlinným K⁺/H⁺ antiporterem *AtChx17*. Proto bylo dále rozhodnuto stanovit lokalizaci tohoto heterologně exprimovaného proteinu v kvasinkových buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie.

5.11.3 Označení proteinu *AtChx17* GFP

5.11.3.1 Vložení genu *AtCHX17* do plasmidu pGRU1

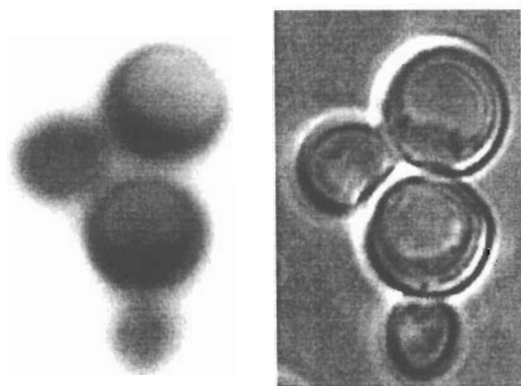
Gen *AtCHX17* byl homologní rekombinací (kap. 4.2.1.7) překlonován z plasmidu pCHX17 do vektoru pGRU1 za promotor *KHA1* za účelem označení *AtChx17* zeleným fluorescenčním proteinem na C-konci. Gen byl namnožen PCR z plasmidu pCHX17 s primery *AtCHX GFP F* a *AtCHX GFP R* pomocí polymerasy PPP MasterMix. Produktem PCR byl potom transformován kmen LMB 11. Zároveň byl přidán plasmid KKGp naštěpený enzymem *Bgl*III. Plasmid KKGp nese gen *KHA1* za vlastním promotorem a na 3'-konci je připojena sekvence kódující GFP. Enzym *Bgl*III štěpí tento plasmid uvnitř ORFu *KHA1*. Primery *AtCHX GFP F* a *AtCHX GFP R* byly navrženy tak, aby při homologní rekombinaci došlo k vyštěpení zbytků ORFu *KHA1*, gen *AtCHX17* aby byl na 5'-konci připojen k promotoru *KHA1* a na 3'-konci k sekvenci

kódující GFP bez přerušení čtecího rámce. Plasmidová DNA byla z kvasinek izolována podle protokolu uvedeného v kap. 4.2.1.8 a po namnožení v *E. coli* ověřena restričním štěpením. Napojení GFP bez přerušení čtecího rámce bylo ověřeno sekvenováním. Plasmid byl pojmenován KAGp (promotor *KHAI* – gen *AtCHX17* – GFP). Dále bylo ověřeno, že tento konstrukt je schopen komplementovat citlivost kmene LMB 11 ke zvýšenému pH (obr. 5.45).



Obr. 5.45 Komplementace fenotypu delecce *khal* plasmidem KAGp (kontrola – plasmid KKGp) na médiu YNB-NH₄ se zvýšeným pH (pH 7,0 je pufováno 20 mM MOPS).

Ve fluorescenčním mikroskopu buňkám transformovaným KAGp ovšem svítí cytosol (obr. 5.46).



Obr. 5.46 Fluorescence buněk LMB 11 transformovaných plasmidem KAGp. Snímané obrázky fluorescenčního signálu převedeny do černobílého módu a konvertovány na negativ.

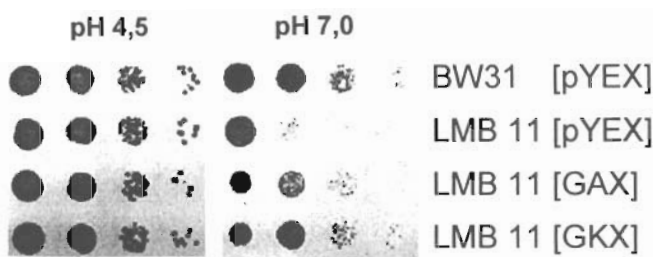
Protože je prakticky nemožné, aby membránový protein *AtChx17* byl rozpuštěný v cytosolu, nabízí se mnohem pravděpodobnější vysvětlení, že označení *AtChx17*-GFP na C-konci není stabilní a dochází proto k odštěpení zeleného fluorescenčního proteinu, který je sám o sobě rozpustný (viz obr. 5.41b, str. 119).

5.11.3.2 Vložení genu *AtCHX17* do plasmidu pYEX

Konstrukt KAGp se tedy ukázal jako nepoužitelný pro stanovení vnitrobuněčné lokalizace rostlinného přenašeče *AtChx17* v buňkách *S. cerevisiae*. Proto bylo rozhodnuto pokusit se označit *AtChx17* proteinem GFP na N-konci. Pro tento účel byl využit plasmid pGFPmKIR2.1 (tab. 4.3), naštěpený uvnitř ORFu *mKIR2.1* enzymem *SphI*. Gen *AtCHX17* byl namnožen PCR z plasmidu pCHX17 s primery GFP AtCHX F a GFP AtCHX R pomocí polymerasy Pfx. Naštěpeným plasmidem společně s produktem PCR byl transformován kmen LMB 11. Po proběhnutí homologní rekombinace došlo k výměně ORFu *mKIR2.1* za *AtCHX17* a k uzavření plasmidu do kruhové podoby. Plasmid byl z kvasinek izolován metodou popsanou v kap. 4.2.1.8, namnožen v *E. coli*, ověřen restričním štěpením a sekvenováním. Plasmid byl pojmenován pGAX (GFP-*AtCHX17* v pYEX).

Pro kontrolu a možnost přesnějšího porovnání byl stejným způsobem do pYEX překlonován i gen *KHAI*. Gen byl namnožen z plasmidu NKYE_p (tab. 5.1) pomocí polymerasy Pfx a společně se *SphI* štěpeným plasmidem pGFPmKIR2.1 vnesen elektroporací do kmene LMB11. Plasmid byl z kvasinek izolován metodou popsanou v kap. 4.2.1.8, namnožen v *E. coli*, ověřen restričním štěpením a sekvenováním. Plasmid byl pojmenován pGKX (GFP-*KHAI* v pYEX).

Bylo ověřeno, že konstrukty vzniklé homologní rekombinací po této transformaci jsou schopny komplementovat citlivost kmene LMB11 ke zvýšenému pH. Jak je vidět na obr. 5.47, protein *AtChx17* komplementoval zhoršený růst kmene LMB 11 na pH 7 pouze částečně, zatímco *Khai*p exprimovaný z téhož plasmidu obnovil schopnost růstu až na úroveň rodičovského kmene, exprimujícího gen *KHAI* z chromosomu.

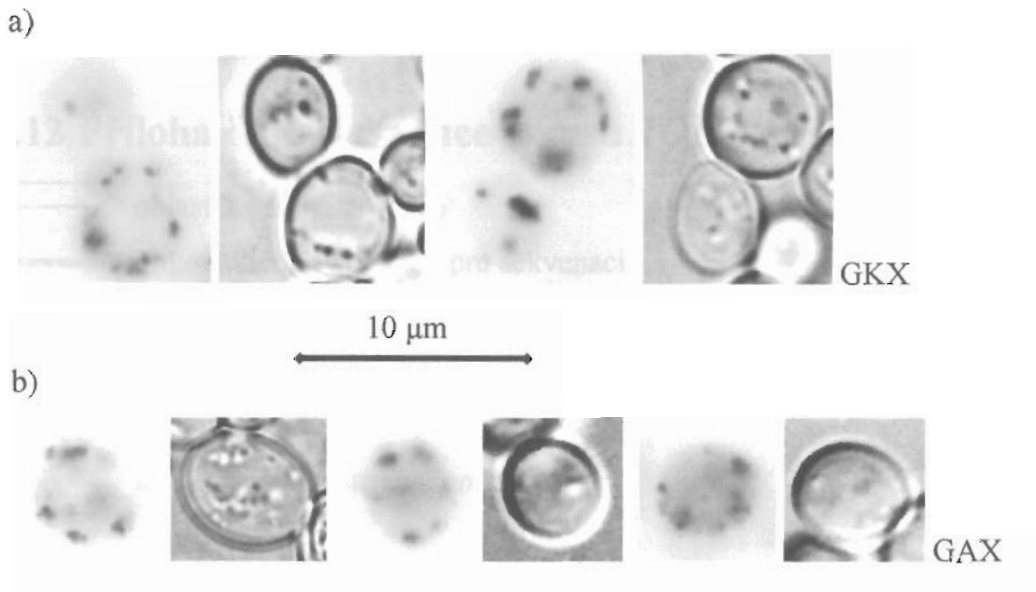


Obr. 5.47 Komplementace fenotypu delece *kha1* konstrukty GAX a GKX na médiu YNB-NH₄ se zvýšeným pH (pH 7,0 je pufováno 20 mM MOPS). Do média bylo přidáno 10 μM CuSO₄ pro indukci promotoru *CUP1*.

Schopnost proteinu *AtChx17* komplementovat fenotyp *kha1Δ* na pH 7 přitom byla srovnatelná s proteinem *Kha1*, pokud byl *AtChx17* exprimován z plasmidu pYES2 nebo pGRU (obr. 5.43, obr. 5.45). Je tedy možné, že připojení GFP na N-konec proteinu částečně omezí funkčnost *AtChx17p*. Funkce *Kha1p* připojením GFP na N-konec zřejmě omezena není.

5.11.4 Lokalizace *AtChx17p* v *S. cerevisiae*







Fluorescenční mikroskopie buněk transformovaných konstrukty GKX (*Kha1* značený GFP na N-konci) a GAX (*AtChx17* značený GFP na N-konci) ukázala, že oba tyto proteiny jsou v *S. cerevisiae* lokalizovány intracelulárně (obr. 5.48). V případě konstruktu GKX se jedná o potvrzení, že N-koncová fúze proteinu *Kha1* s GFP nemění jeho lokalizaci v buňkách (srov. obr. 5.48 a 5.23). V případě rostlinného přenašeče *AtChx17* jde o nový výsledek, že lokalizace tohoto proteinu v *S. cerevisiae* pravděpodobně odpovídá lokalizaci vlastního kvasničného proteinu *Kha1*.



Obr. 5.48 Lokalizace proteinů Kha1 (a) a AtChx17 (b) značených GFP na N-konci. Snímané obrázky fluorescenčního signálu převedeny do černobílého módu a konvertovány na negativ.

Závěrem lze tedy říci, že rostlinný K^+/H^+ antiporter *AtChx17* je schopen komplementovat známé fenotypy delece *kha1* v *S. cerevisiae* a i jeho lokalizace v buňkách je obdobná. Znamená to, že (1) oba proteiny by ve svých rodičovských organismech mohly mít podobnou funkci a (2) mutální kmeny s delecemi genů kódujících vnitrobuněčné transportní proteiny jsou potenciálně využitelné pro heterologní expresi a studium vlastností rostlinných přenašečů.

5.12 Příloha č. 1 – sekvence lokusu *TOK1 - KHA1*

-  oblasti kódující proteiny
-  oligonukleotidy použité pro sekvenaci
-  oligonukleotidy použité pro zavedení restrikčních míst
-  oligonukleotidy použité pro homologní rekombinaci
-  bodové mutace
-  místo štěpení restrikční endonukleasy

GACA TCTA TTTCTTCTCA TCAA TAA TTCTCCAGCTTTCTGTAGA TCCACCAA GTGGCCAAA TCTA TAAA GTA TTTTCAGGCCAAA TACTA TGAAAA GTA 100
Thr Ser Ile Ser Phe Ser Ser Ile Ile Leu Gln Ser Phe Cys Arg Ser Thr Lys Trp Pro Asn Leu • Ser Ile Phe Arg Gln Ile Leu • Lys Val

SacI

CCAA TTAAGA GCTCCGAAA TATTCACGCCTGCCCGCGTAA CA TTTCTTGCAAA CGCTCTTTCA TTTTCGTAGCAGCTTTGTAGTGAAGTAGTCACTA 200
Pro Ile Lys Ser Ser Glu Ile Phe Thr Pro Ala Pro Arg Asn Ile Ser Cys Lys Arg Ser Phe Ile Ser Leu Ala Ala Leu Leu Val Lys Val Val Thr

PstI

TAATA TCGCGGGG TGAA TA TGGTGGTGCA GAA TAA GA TACGCTACTCTTGAA GTTAAAA CCTTAGCTTCCCTGTGCGGGG ACCGGCAA TGA CCTGCA G 300
Ile Ile Ser Arg Gly • Ile Trp Trp Cys Arg Ile Arg Tyr Ala Thr Leu Glu Val Lys Thr Leu Val Phe Pro Val Pro Gly Pro Ala Met Thr Cys Ser

CCCTCTAGTGTA TCAAA GAGGGCCGCTGCTCTCTGTTGAGTA TTTAA CTGGGTA CTAAA TGCAA CCAAA GA TCA TTGTTGACGACA TTTGCTA TCCC 400
Pro Leu Val • Ser Lys Arg Ala Ala Ala Leu Cys • Val Phe Asn Trp Asp Thr Lys Cys Asn Gln Arg Ser Leu Phe Asp Asp Ile Cys Tyr Pro

TAAGTACCGGTAGAA GAAA GA TCAAA TTGGAA TGA TACTCAA GTGCA GAGTACAA TTA TGGATGGCAAAA GAAA CTA GAGGGGACAGGAA GCTGCTCAA 500
• Val Pro Val Glu Glu Arg Ser Asn Trp Asn Asp Thr Gln Ser Ala Glu Tyr Asn Tyr Gly Trp Gln Lys Lys Leu Glu Gly Gln Glu Ala Val •

AGCTGTAGAGAAA TATTTCTA TCTTCCGCA CTGCAAA TTTA TCGAGA CTC TGGGAA GGTAGCTTAA GCA GTAGTA TCA GGA TACTGGAGGTAA CTCTAA 600
Lys Leu • Arg Asn Ile Leu Ile Leu Pro Thr Ala Asn Leu Ser Arg Leu Cys Glu Gly Ser Leu Ser Ser Ser Ile Arg Ile Ala Gly Gly Asn Ser Lys

ACTCGCTCCTA TTTCTTCA GCA TCGTTCTAA TTGTTGTCACTTTTGTGTTTTGGTTTTTTTTGGGAGTTTTTCGCA TTCGCGTCTCGTTACCCCTAGC 700
Leu Ala Pro Ile Leu Leu Gln His Arg Ser Asn Cys Cys His Phe Cys Leu Phe Trp Phe Phe Trp Glu Phe Phe Ala Phe Ala Ser Arg Tyr Pro Ser

ATGTTTTAA GCGCGCTA TCA TTA TGGTTGAA GAGAAA GTTGTAGTTTA TCAA CAGTTAGTACTTGA TATA CAA TACGAA GCA GTGGTTGTGTATACAA 800
Met Phe • Ala Ala Leu Ser Leu Trp Leu Lys Arg Lys Leu • Phe Ile Asn Ser • Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Glu Ala Val Val Val Tyr Thr

GTGAAGTACTCAA TGAA TATA CAA TTA CCTGAGTACTCA GTACCA CTTGGTTA TTCAA TATGGCAAAA TGCTGACCCCTA TGTA TCTTTTCCAA TCAA 900
Ser Glu Val Leu Asn Val Ile Tyr Ile Thr • Val Leu Ser Thr Ile Leu Val Ile Gln Tyr Gly Lys Asn Ala • Pro Tyr Val Ser Phe Ser Ile Lys

AAATAGCCGCA TCTCGTGA TCGTGA GCA GATGCTTCACTCCTTTCTAGCA GTA TAA CAAAGCA TATTTCTGTATTTA TTTTACCGA TTTCTATATA T 1000
Asn Ser Arg Ile Ser • Ile Val Ser Arg Cys Leu His Ser Phe Leu Ala Val • Gln Ser Ile Phe Leu Val Phe Ile Leu Pro Ile Ser Ile Tyr



SacI

ATGACAA GGTTCATGAA CAGCTTTGCCAAA CAAA CGCTGGGA TAGGGCAA TAGGGCA CAGTGGAGCAA GAGACTCAGCTCAGGCTGTTGATTTCTCA TT 1100



TOK1

Met Thr Arg Phe Met Asn Ser Phe Ala Lys Gln Thr Leu Gly Tyr Gly Asn Met Ala Thr Val Glu Gln Glu Ser Ser Ala Gln Ala Val Asp Ser His

CAACAA CACACCGAA GCAA GCTAA GGGTGTCTTGCA GAGGAA CTAAGGA TGCA TTGCGGTTCCGGGACGAAA GAGTTAGTA TTA TTAAGCA GAGCC 1200

TOK1

Ser Asn Asn Thr Pro Lys Gln Ala Lys Gly Val Leu Ala Glu Glu Leu Lys Asp Ala Leu Arg Phe Arg Asp Glu Arg Val Ser Ile Ile Asn Ala Glu Pro

TTCTTCAAACACTGTTGCTCTTTTGGTTTGTGGTTTCA TGCTATTTCCCTGTGATTA CTGCTGCTTGGGTCCCGTAGCTAACTACTCTCGATAGCCTGT

1300

TOK1

Ser Ser Thr Leu Phe Val Phe Trp Phe Val Val Ser Cys Tyr Phe Pro Val Ile Thr Ala Cys Leu Gly Pro Val Ala Asn Thr Ile Ser Ile Ala Cys

GTAGTTGAAAAA TGGAGA TCCTTAAAGAA CAACTCCGTGGTGA CAAA TCCACGAA GCAA TGACACCGA TGTTTTGA TGAA TCAA GTAAAGA CAGTTTTTG

1400

TOK1

Val Val Glu Lys Trp Arg Ser Leu Lys Asn Asn Ser Val Val Thr Asn Pro Arg Ser Asn Asp Thr Asp Val Leu Met Asn Gln Val Lys Thr Val Phe

ATCCTCCTGGTA TTTTGGCGTTAA TA TCA TCTCTTTGGTACTGGGTTTTACGTCAAA TA TTA TACTAA TGCTACATTTCA GTAA GAA GTTGACGTATCT

1500

TOK1

Asp Pro Pro Gly Ile Phe Ala Val Asn Ile Ile Ser Leu Val Leu Gly Phe Thr Ser Asn Ile Ile Leu Met Leu His Phe Ser Lys Lys Leu Thr Tyr Leu

TAAATCTCAGTTAA TAAA TA TAA CAGGA TGGACAA TAGCTGGAGGGA TGC TTTTGGTGGACGTGATTGTA TGCTCCTTGAA TGA CATGCCCA GCA TCTAC

1600

TOK1

Lys Ser Gln Leu Ile Asn Ile Thr Gly Trp Thr Ile Ala Gly Gly Met Leu Leu Val Asp Val Ile Val Cys Ser Leu Asn Asp Met Pro Ser Ile Tyr

AGTAA GACTA TCGGA TTTTGGTTTGCCTGTA TCA GTTCTGGTCTA TATTTGGTA TGCA CCA TTA TTTTAA CAA TA CA TTTTA TTGGA TA TAAA TTAGAA

1700

TOK1

Ser Lys Thr Ile Gly Phe Trp Phe Ala Cys Ile Ser Ser Gly Leu Tyr Leu Val Cys Thr Ile Ile Leu Thr Ile His Phe Ile Gly Tyr Lys Leu Gly

AAATACCTCCAA CGTTCAA CCTTTTGCCTAA TGAAA GAA GTA TCA TGGCA TACA CTGTACTA TTGCTTTTA TGGTTGA TTTGGGGTGGGGTA TGTTTAG

1800

TOK1

Lys Tyr Pro Pro Thr Phe Asn Leu Leu Pro Asn Glu Arg Ser Ile Met Ala Tyr Thr Val Leu Leu Ser Leu Trp Leu Ile Trp Gly Ala Gly Met Phe Ser

CGGTTTATTGCA CACTTACGGAAA TGCA TTA TATTTCTGCA CGGTA TCA TTA TTAACCGTGGGACTAGGTGACA TCCTGCCCAA GTCGGTTGGCGCC

1900

TOK1

Gly Leu Leu His Ile Thr Tyr Gly Asn Ala Leu Tyr Phe Cys Thr Val Ser Leu Leu Thr Val Gly Leu Gly Asp Ile Leu Pro Lys Ser Val Gly Ala

AAAA TCA TGGTTTTAA TCTTTTGCCTA TCTGGTGTGCTTGA TGGGTTTAA TAGTGTTA TGA CAA GA TCCA TCA TTCAAAA GTCCCTCGGCCAA TTT

2000

TOK1

Lys Ile Met Val Leu Ile Phe Ser Leu Ser Gly Val Val Leu Met Gly Leu Ile Val Phe Met Thr Arg Ser Ile Ile Gln Lys Ser Ser Gly Pro Ile

TCTTTTCCACAGAGTTGAAAAA GGCA GGTCCAAA TCGTGGAAA CATA TA TGGATAGTA GTAAAAA TTTA TCTGAAA GGGAA GCGTTTCACTTAA TGAA

2100

TOK1

Phe Phe Phe His Arg Val Glu Lys Gly Arg Ser Lys Ser Trp Lys His Tyr Met Asp Ser Ser Lys Asn Leu Ser Glu Arg Glu Ala Phe Asp Leu Met Lys

Saol

GTGTA TCCGACAAA CCGCC TCAA GGAA GCA GCA TTGGTTTTCTTTGTCGGTGA CTA TTGCAA TTTTCA TGCTTTTTGGTTA TTGGGAGCTCTTGTA TTC

2200

TOK1

Cys Ile Arg Gln Thr Ala Ser Arg Lys Gln His Trp Phe Ser Leu Ser Val Thr Ile Ala Ile Phe Met Ala Phe Trp Leu Leu Gly Ala Leu Val Phe

AAA TTCGCA GAAAA TTGGTCGTA CTTCAA TTGTA TTTACTTTTGTCTTGTGCTTA TTAACCA TTGGA TACGGAGA CTA TGC TCCAA GGA CTGGTGCA G

2300

TOK1

Lys Phe Ala Glu Asn Trp Ser Tyr Phe Asn Cys Ile Tyr Phe Cys Phe Leu Cys Leu Leu Thr Ile Gly Tyr Gly Asp Tyr Ala Pro Arg Thr Gly Ala

GCCGTGC TTTT TTTGTGA TTTGGGCGTTGGGA GCCGTGCCA TTAA TGGGGGCTA TCCTA TCTACA GTCCGTGA TCTGTTGTTGACA TTTCCA CTTCTCT 2400

TOK1

Gly Arg Ala Phe Phe Val Ile Trp Ala Leu Gly Ala Val Pro Leu Met Gly Ala Ile Leu Ser Thr Val Gly Asp Leu Leu Phe Asp Ile Ser Thr Ser Leu

GGATA TTAAGA TCGGTGAA TCA TTCAA TAA TAAA GTCAA GTCCA TCGTTTTTAA TGGGCGTCAAAA GACACTTTCC TTTA TGGTGAACA CTGGAGAAA TT 2600

TOK1

Asp Ile Lys Ile Gly Glu Ser Phe Asn Asn Lys Val Lys Ser Ile Val Phe Asn Gly Arg Gln Arg Ala Leu Ser Phe Met Val Asn Thr Gly Glu Ile

TTCGAA GAA TCTGACACAGCTGATGGTGA TCTGGAA GAAAA TACAA CGAGCTCA CAA TCCAGTCAAA TTTCTGAA TTCAA CGA TAA TAA TTCA GAA GAGA 2600

TOK1

Phe Glu Glu Ser Asp Thr Ala Asp Gly Asp Leu Glu Glu Asn Thr Thr Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ile Ser Glu Phe Asn Asp Asn Asn Ser Glu Glu

ATGATTC TGGAGTGA CATCCCTCCTGCAA GCCTGCAA GAA TCA TTTTCTTCA TTA TCAAAA GCA TCTAGCCCA GAGGGAA TACTTCCTCTAGAA TAGT 2700

TOK1

Asn Asp Ser Gly Val Thr Ser Pro Pro Ala Ser Leu Gln Glu Ser Phe Ser Ser Leu Ser Lys Ala Ser Ser Pro Glu Gly Ile Leu Pro Leu Glu Tyr Val

TTCTTC TGTGAA TAGCACTACAGGACTCGGGGACTGTAA TTTAAGGAACTTGCAA GAGCTACTTAAA GCCGTCAAAAAA CTACA TCGGATA TGTCTG 2800

TOK1

Ser Ser Ala Glu Tyr Ala Leu Gln Asp Ser Gly Thr Cys Asn Leu Arg Asn Leu Gln Glu Leu Leu Lys Ala Val Lys Lys Leu His Arg Ile Cys Leu

GCGGATAAA GATTA CACACTTAGTTTTTCCGACTGGTCGTACA TTCA TAAACTACA TTTGAGGAA CATTACAGA TATTGAGGAGTACACACGCGGACCCG 2900

TOK1

Ala Asp Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Phe Ser Asp Trp Ser Tyr Ile His Lys Leu His Leu Arg Asn Ile Thr Asp Ile Glu Glu Tyr Thr Arg Gly Pro

AA TTTTGGATA TCACCTGATACGCCCTCAA GTTCCGTTAAA TGAACTCA TTTTGC TTTTA TGA TGC TTTTCAA GAA CATA GAA GAA TTAGTTGGTAA 3000

TOK1

Glu Phe Trp Ile Ser Pro Asp Thr Pro Leu Lys Phe Pro Leu Asn Glu Pro His Phe Ala Phe Met Met Leu Phe Lys Asn Ile Glu Glu Leu Val Gly Asn

TCTAGTAGAA GACGAA GAGCTTTA TAAA GTTA TAA GCAAAA GAAAA TTTTGGGTGAGCA TAGAAA GACACTTTGATA TACA AAA CACCCGAA GCA TTGAT 3100

TOK1

Leu Val Glu Asp Glu Glu Leu Tyr Lys Val Ile Ser Lys Arg Lys Phe Leu Gly Glu His Arg Lys Thr Leu Tyr Thr Asn Thr Arg Ser Ile Asp

TTATA TCTTACTGTAGACTACTACGGATGTA TTTCTCTAAA TATTTA TTCA GCA TCTCAAAA TAAA TACTGAAA GCA TTTTCTGCTGTAAA TGCGCTT 3200

Leu Tyr Leu Thr Val Asp Tyr Tyr Gly Cys Ile Leu Ile Phe Ile Phe Ser Ile Ser Lys Ile Leu Lys Ala Phe Phe Cys Cys Lys Cys Ala



ATTA TTCTTTCTAGTGCAGAA GGGAGCCCTGTCAA TACCGTTTA TATTCTGCTTA TCA CGTTTGCA TGGTTTTTGA TTTA TTTCTTTCCCTAAAA TACC 4100

KHA1

Ile Ile Leu Ser Ser Ala Glu Gly Ser Pro Val Asn Thr Val Tyr Ile Leu Leu Ile Thr Phe Ala Trp Phe Leu Ile Tyr Phe Phe Pro Leu Lys Tyr

TA TTAAGA TGGGTGCTCA TAA GGA CCGA TGAA TTGGACA GAA GCAA GCC TTCA CCGTTGGCAA CGA TGTGCA TTCTA TTCA TCA TGTTCATTTCTGCTTA 4200

SKHA03

KHA1

Leu Leu Arg Trp Val Leu Ile Arg Thr His Glu Leu Asp Arg Ser Lys Pro Ser Pro Leu Ala Thr Met Cys Ile Leu Phe Ile Met Phe Ile Ser Ala Tyr

TTTTACGGA TATTA TTGGAGTTCA TCCTA TTTTGGCGCCTTCA TTGCTGGCTTAGTAGTTCC TAGAGA TGA TCACTACGTTGTTAA TTAACA GAAA GG 4300

SKHA0

KHA1

Phe Thr Asp Ile Ile Gly Val His Pro Ile Phe Gly Ala Phe Ile Ala Gly Leu Val Val Pro Arg Asp Asp His Tyr Val Val Lys Leu Thr Glu Arg

ATGGAA GATA TTCCTAA CA TTGTTTTCA TTCCAA TCTACTTTGCTGTTGCA GGA TTA AA TGTCGA TTTGACTCTA TTA AA TGA GGGAA GAGA TTGGGGCT 4400

KHA1

Met Glu Asp Ile Pro Asn Ile Val Phe Ile Pro Ile Tyr Phe Ala Val Ala Gly Leu Asn Val Asp Leu Thr Leu Leu Asn Glu Gly Arg Asp Trp Gly

PstI

ATGTTTTGCGCCA CAA TCGGCA TCGCCA TTTTCA CCAAAA TTA TTTCA GGTACTCTTACAGCTAAACTTA CTGGCTTA TTTTGGAGA GAA GCCA CTGCA GC 4500

KHA1

Tyr Val Phe Ala Thr Ile Gly Ile Ala Ile Phe Thr Lys Ile Ile Ser Gly Thr Leu Thr Ala Lys Leu Thr Gly Leu Phe Trp Arg Glu Ala Thr Ala Ala

CGGTGTTTTGA TGTCA TGCAAA GGTA TCGTTGAAA TCGTTGCTTAA CTGTTGGTTTGAA TCGGGGCA TTA TCA GTA GAAAAA TA TTTGGTA TGTTTGTG 4600

KHA1

Gly Val Leu Met Ser Cys Lys Gly Ile Val Glu Ile Val Val Leu Thr Val Gly Leu Asn Ala Gly Ile Ile Ser Arg Lys Ile Phe Gly Met Phe Val

TTGATGGCA TTAGTTTCTACTTTTGTCACTACTCCTGACTCA GCTTGTTCACCCA GATTCA TACCGGGA TGGTGTTCGCAAA TCCTTA TCTACA CCTG 4700

SKHA04

KHA1

Leu Met Ala Leu Val Ser Thr Phe Val Thr Thr Pro Leu Thr Gln Leu Val Tyr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Gly Val Arg Lys Ser Leu Ser Thr Pro

PstI

CAGAA GATGA TGGTGCA GCAGA TGGTCTCGATTCTGA GGGTGTGGA CAAGA CTGAAA TTAACA CTCAA CTAA TTCA TTGGCAGA TGTTAGCAAA TATA G 4800

KHA1

Ala Glu Asp Asp Gly Ala Ala Asp Gly Leu Asp Ser Glu Gly Val Asp Lys Thr Glu Ile Asn Thr Gln Leu Asn Ser Leu Ala Asp Val Ser Lys Tyr Arg

AA TTGGTGA ACTGACCA CGGTGA TAAACA CTACAGAA GCGA TCTCTCCA TCTCTAAA GCTGC TAAA TTA CCTGCTTTA GGGGTA TCTCCCAA GCC TAA G 4900

KHA1

Ile Gly Glu Leu Thr Thr Val Ile Asn Thr Thr Glu Ala Ile Ser Pro Ser Leu Lys Leu Leu Asn Tyr Leu Ser Leu Gly Val Ser Pro Lys Pro Lys

AA TAA TAAACA TAA GAA CGAAA CCTCCTTGA GCA GAA TGA CAA CAGCTACTGA TTCCA CATTA GAAA TCTAA CACA TTCAAAA TAAAAA GA TGGTTCA TA 5000

SKHAZp04 R

KHA1

Asn Asn Lys His Lys Asn Glu Thr Ser Leu Ser Arg Met Thr Thr Ala Thr Asp Ser Thr Leu Lys Ser Asn Thr Phe Lys Ile Lys Lys Met Val His

TCTGGCTAAAA GCGTTGACGA TGTGGA TACCAA TTTAA GTGTTA TAGA TGAAAAA TTGACCCCGTTTGA GGGAGTCGGTGCA TTGA GGGCCA TTCA TTT 5100

KHA1

Ile Trp Ser Lys Ser Val Asp Asp Val Asp Thr Asn Leu Ser Val Ile Asp Glu Lys Leu Thr Pro Phe Glu Gly Val Gly Ala Leu Arg Ala Ile His Leu

ACGATTGCTCACTGAA CGGACAA CTGA TCTGCTGCAA TCA TCTTCTCTA TATAA TGA TGA TCCCACTTTACCGCAAA TACA GATTCACTA TTACAAA TT 5200

SKHA05 →

KHA1

Arg Leu Leu Thr Glu Arg Thr Thr Asp Leu Leu Gln Ser Ser Ser Leu Tyr Asn Asp Asp Pro His Phe Thr Ala Asn Thr Asp Ser Leu Leu Gln Ile

TTTGA TATA TTTTCAA CCTGAGCAAAA TACCA TTTTCAA GTGAA GTCA TATTTCTACAA TGCCTGAAAA GGCAGCTAA TATA GCGACGATGAAAA TGG 5300

KHA1

Phe Asp Ile Phe Ser Asn Leu Ser Lys Ile Pro Phe Ser Ser Glu Val Ile Phe Ser Thr Met Arg Glu Lys Ala Ala Asn Ile Ala Thr Met Lys Met

BglII

ATTCCA CAGA TCTGA TCTTA TTGCCA TTA AAA GGGCCCTCGTA TGA GTA TAGA GGGAGCCCA GTC TTCA TTGA TGAAAAA TACGCAAACTTTGATCA CAT 5400

← SKHAZ p05 R →

KHA1

Asp Ser Thr Asp Leu Ile Leu Leu Pro Leu Lys Gly Ala Ser Tyr Glu Tyr Arg Gly Ser Pro Val Phe Ile Asp Glu Lys Tyr Ala Asn Phe Asp His Ile

TTA TTC TCA TCTCCTA GGTCTGAA TGA ACTA TCA TCTA CTTTCTTCAA GTCTA TTTTCCAGTCACTCAA GGC AAA TTTTGCCGTTCAAA TTTCAA TACC 5600

KHA1

Tyr Ser His Leu Leu Gly Leu Asn Glu Leu Ser Ser Thr Phe Phe Lys Ser Ile Phe Gln Ser Leu Lys Ala Asn Phe Ala Val Gln Ile Ser Asn Thr

TATGGCAGA TTA AA TGCTGATCGCTTTAA GAGGAAA CGGTTCAA TTTA TTA CTTCCAAAA CCA TACTGACACAA TCCGATTA TCTTGGA CTA TACTTC 5600

SKHA06 →

C

KHA1

Tyr Gly Arg Leu Asn Ala Asp Arg Phe Lys Arg Lys Arg Phe Asn Leu Leu Leu Pro Lys Pro Tyr Leu Thr Gln Ser Asp Tyr Leu Gly Leu Tyr Leu

TCTTA TTGA TAGCTA TAGAGA TGGCTA TAA TAA TGA TAA TGCA TCCGTGTA GTA TTTA TTAA CAGCAA GAA TTTGA TTTGCAAAA GA TTTGTCAA C 5700

KHA1

Leu Leu Leu Ile Cys Tyr Arg Asp Gly Tyr Asn Asn Asp Asn Ala Ser Cys Ser Ile Phe Ile Asn Ser Lys Asn Ile Asp Phe Ala Lys Asp Leu Ser Thr

EcoRV

TGCA TTTGCTGAGCA TGA CTGGCTAAA CGAA TCTACCA TTA AAA TTGTGGA TAGCCCTTTGAAA CGAAA GTTCCA GAA GAA GCAA TTGAAAA GCCGTCC 5800

KHA1

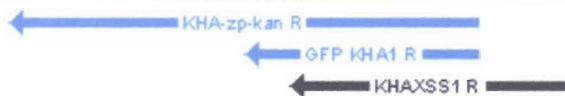
Ala Phe Ala Glu His Asp Trp Leu Asn Glu Ser Thr Ile Lys Ile Val Asp Ile Pro Phe Glu Thr Lys Val Pro Glu Glu Ala Ile Glu Lys Pro Ser

TTTA TAGAGA CTGTGCTTGA TGTGGTTTA TCA GA TACTGCTTTAGCTGA TAGAGA GACTA CCTTTA TTA TTGGA GAGGA CCTTCC TGA TGA AA GTG 5900

KHA1

Phe Ile Glu Thr Val Leu Asp Val Gly Leu Ser Asp Thr Ala Leu Ala Asp Ile Glu Glu Thr Thr Phe Ile Ile Gly Glu Asp Leu Pro Asp Glu Ser

AGCCCTTCA GCGAA GAGGTGA GGA CTGTAA TA TTTGAA GGGTCGAA TCGTCGTTTGA CACCCTTA TTGTGCA CCA TTTTTCGTCTGAA TAA GTA TCA GC 6000



Glu Pro Phe Ser Glu Glu Val Arg Thr Val Ile Phe Glu Gly Ser Asn Arg Arg Phe Asp Thr Leu Ile Val His His Phe Ser Ser Glu • Val Ser Ala

AGAAA TTTTAA TTTTCTTTGTTCTTAA TTTTCAGTCA TTCCTGCA TTCCTGCA TCTA TGTTTA TTGTTC TA TTA TTA CGTA TGCA TAAA TA TCTTA 6100

Glu Ile Phe • Phe Ser Leu Phe Leu Ile Phe Ser His Ser Val Ile Pro Ser Ser Met Phe Ile Val Leu Tyr Tyr Tyr Val Cys Ile Asn Ile Leu

AGTA TAGA TCGA TCC TAA TA GCTA TTCA GTTTTA TTC TCC TGA GAGGTTA TCC TTA TTTTGA A GATTTAA CTTA TCA TTTGA CTTTA TAAA CTTCCGG 6200

Ser Ile Asp Arg Ser • • Leu Phe Ser Phe Ile Leu Leu Arg Gly Tyr Pro • Phe • Arg Val • Leu Ile Ile • Leu Tyr Lys Leu Arg

AGTCGGTAGA TTTGAAA TTGAA TGTTTCA TTTA CTTCA C TAAAA GGA TGA GAAA GAA GC TCGTTA GCGGTTGGCC TTTTCTCTGGA TTTA TCTCGAA GC 6300

Glu Ser Gly Arg Phe Glu Ile Glu Cys Phe Ile Tyr Phe Thr Lys Arg Met Arg Lys Lys Leu Val Ser Gly Trp Pro Phe Leu Trp Ile Tyr Leu Glu Ala

SphI EcoRV

ATGCGTCCA GAAAA TTTTCGTCCGA TTTGCGA TA TCAA TGGTAAA GTGTCC TCA GAA TTGGTGGTGCCGA TTTTGA CTTTCAA TTTTGA ACA TGGCTGC 6400

Cys Val Gln Lys Ile Ser Ser Asp Leu Arg Tyr Gln Trp • Ser Val Leu Arg Asn Trp Trp Cys Arg Phe • Leu Ser Asn Phe Glu His Gly Cys

GACGACTTCTAA GTTGGACCA CGGGCGCTTACA GCAAA CATTTCAGAA CGA TGCA TCCCA GAGCCA TA TA TCAA CTTTTCGACTGTA GCCTTGCTTT 6500

Asp Asp Phe • Val Gly Pro Arg Ala Leu Thr Ser Lys His Phe Gln Asn Asp Ala Ser Gln Arg Pro Tyr Ile Asn Phe Cys Thr Val Ala Leu Leu



GTA TCAACCA TTTCA GGA GCCA TCCA GAA GACTGTTCTCGCA TGGTCA TA TCCGAA TTAGA GTA TA TGTCCTTTGA TTTTCTTGAAA TTTCCGAA GTCA C 6600

Cys Ile Asn His Phe Arg Ser His Pro Glu Asp Cys Ser Ser His Gly His Ile Arg Ile Arg Val Tyr Val Leu • Phe Ser • Asn Ser Glu Val Thr

TGA TTTTGCAGATA CCA TCTTGA TCCAAAA GTAA GTTGTCTGCTTCA TA TCCCTGTGGA GAA TACC TTTTCA GTGTA GGTATGCCAA TCC TTTTAA TAC 6700

Asp Phe Ala Asp Thr Ile Leu Ile Gln Lys • Val Val Cys Leu His Ile Pro Val Glu Asn Thr Phe Arg Val • Val Cys Gln Ser Phe • Tyr

BamHI

TTGTGTTGTTAAA TGTTTGA TCAA CGGTTCA TCGAA TCTTCCA TA CA TTC TAA TCAA GGA TCCCA CGGA GCCA CCA GCAA CA TA TTC TAAAA CAAA CTG 6800

Leu Cys Cys • Met Phe Asp Gln Arg Phe Ile Glu Ser Ser Ile His Ser Asn Gln Gly Ser His Gly Ala Thr Ser Asn Ile Phe • Lys Gln Thr

BglII

TAAA TA TTGTTTTA TTTTCAAAA CCTAA GTA TTGAA CAA TA TTAAGA TGA TCTAAA TCTTTTAA CGTGGACACTTCA GATCTTAA TGCTTCCA CGGTAC 6900

Val Asn Ile Val Phe Ile Leu Lys Thr • Val Leu Asn Asn Ile Lys Met Ile • Ile Phe • Arg Gly His Phe Arg Ser • Cys Phe His Gly Thr

5.13 Příloha č. 2 – publikace (Marešová a Sychrová, 2005)

5.14 Příloha č. 3 – rukopis (Marešová *et al.*, 2006)

5.15 Příloha č. 4 – rukopis (Marešová a Sychrová, 2006)

6 Diskuse

V této práci byly studovány především vlastnosti proteinu Kha1, domnělého K^+/H^+ antiporteru v *S. cerevisiae*. V další části pak byly zkoumány jeho interakce a souvislosti s činností dalších transportních proteinů v *S. cerevisiae*, například Ena1-4, Nha1, Nhx1, Gef1p a Tok1p. Při stanovení vlivu na membránový potenciál buněk byla věnována zvláštní pozornost proteinu Tok1, protože byla nečekaně objevena jeho významná role právě v udržování $\Delta\Psi$ (potenciálu plasmatické membrány) kvasinek. Na závěr pak byly také sledovány vlastnosti rostlinného homologu Kha1p z *Arabidopsis thaliana* – AtChx17p – heterologně exprimovaného v *S. cerevisiae*.

6.1 Role proteinu Kha1 v buňkách

6.1.1 Vysvětlení nesrovnalostí mezi dříve publikovanými výsledky a současnými znalostmi o proteinu Kha1

Výsledky této disertační práce ukázaly, že původní navržená funkce proteinu Kha1 (antiport K^+ proti H^+ přes plasmatickou membránu (Ramírez *et al.*, 1998)) byla založena na nesprávné interpretaci porovnání vlastností disruptčního kmene *kha1::URA3* s rodičovským kmenem W303. Většina pozorovaných fenotypových projevů mutantního kmene byla pravděpodobně spojena spíše s rozdílným metabolismem uracilu, než se samotnou absencí proteinu Kha1. Jedině tak se dá vysvětlit například skutečnost, že autoři původní práce o Kha1p pozorovali tvorbu větších kolonií mutantního kmene na médiu se zvýšeným pH (Ramírez *et al.*, 1998), zatímco v rámci této práce bylo jednoznačně prokázáno, že kmeny s delecí *kha1* rostou při zvýšeném pH podstatně hůře než kmeny kontrolní (kap. 5.1.5.3, 5.2). Zhoršený růst při pH 7 byl pozorován už v roce 1994 pro mutantní kmen J0909, v kterém byl deletován fragment chromosomu X o délce 0,71 kb, zahrnující 166 bp 3'-konce ORFu *TOK1*, mezigenovou oblast mezi ORFy *TOK1* a *KHA1* a 250 bp na 5'-konci ORFu *KHA1* (Miosga *et al.*, 1994). Je více než pravděpodobné, že růstový defekt těchto mutantů byl způsoben právě absencí proteinu Kha1 v buňkách.

Další vlastností popsanou v Ramírez *et al.* (1998) pro kmen *khal::URA3*, která se nepotvrdila pro kmen *khal::kanMX* používaný v této práci, je zvýšený vnitrobuněčný obsah K^+ (kap. 5.5.1 – mutantní kmen *khal::kanMX* má stejný vnitrobuněčný obsah K^+ jako kontrolní kmen). Zvýšený obsah K^+ v mutantech byl přitom uveden jako nejdůležitější důkaz pro funkci proteinu Khal v exportu K^+ z buněk (Ramírez *et al.*, 1998), přestože přímá souvislost mezi obsahem K^+ a transportní činností Khalp nebyla prokázána. Již dříve bylo pozorováno, že antiport K^+ proti H^+ přes plasmatickou membránu zprostředkovává protein Nha1 (Bañuelos *et al.*, 1998) a že nadprodukce Khalp nemůže nahradit funkci Nha1p (Simon *et al.*, 2001). Teoreticky se sice nedá vyloučit možnost, že se v plasmatické membráně *S. cerevisiae* nacházejí dva transportní systémy se stejným mechanismem transportu a podobnou substrátovou specifitou (tedy například Nha1 a Khal), transportní pokusy (kap. 5.5.2) však prokázaly, že draselné kationty z buněk přes Khalp nevystupují (na rozdíl od Nha1p).

Posledním důkazem, že Khalp neplní funkci exportu K^+ přes plasmatickou membránu, je jeho vnitrobuněčná lokalizace stanovená pomocí fluorescenční mikroskopie (kap. 5.7). Bylo ukázáno, že Khalp se nachází v membráně vnitrobuněčných organel, a polská skupina dr. A. Kurlandzké stanovila tuto organelu jako Golgiho aparát kolokalizací Khalp s Mnt1p (Flis *et al.*, 2005).

6.1.2 Potvrzené fenotypy mutantů *khalΔ*

Z dříve publikovaných fenotypových projevů mutace *khal* (Entian *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 1998; Steinmetz *et al.*, 2002) se v rámci této práce potvrdil pouze zhoršený růst na octanu draselném jako jediném zdroji uhlíku (Entian *et al.*, 1999, kap. 5.1.5.2). Bylo však prokázáno, že se nejedná o poruchu respirace mutantních kmenů *khalΔ* (na glycerolu rostly stejně dobře jako kontrolní kmeny), nýbrž o citlivost ke zvýšenému pH média – médium s KAc jako zdrojem C má totiž pH asi 7,0, zatímco médium s glukosou asi 4,7. Zhoršený růst mutantních kmenů *khalΔ* při zvýšeném pH byl pak potvrzen v sérii dalších testů (kap. 5.1.5.3, 5.4, 5.9 a 5.11.1). Jako vůbec první z fenotypových projevů delece *khal* byla citlivost ke zvýšenému pH komplementována genem *KHAI* v plasmidu (kap. 5.2).

Dalším nově zjištěným fenotypem delece *kha1* byla snížená tolerance k hygromycinu B. V této vlastnosti se mutace *kha1* podobá mutacím *trk1*, *trk2* (Madrid *et al.*, 1998), *gef1* a *nhx1* (Gaxiola *et al.*, 1998). Již dříve bylo popsáno, že zvýšená citlivost delečních mutantů *trk1 trk2* k hygromycinu B je dána zvýšením jejich membránového potenciálu v důsledku neschopnosti aktivně importovat draselné kationty (Madrid *et al.*, 1998). Protože hygromycin B je kladně nabitý, vstupuje do buněk v závislosti na jejich membránovém potenciálu. Čím vyšší je tedy rozdíl mezi kladným nábojem na vnější straně membrány a záporným nábojem „pod“ membránou uvnitř buňky, tím více toxického kationtu vstupuje do buněk. Mechanismus působení vnitrobuněčných přenašečů Nhx1 a Gef1 v rezistenci/sensitivitě k hygromycinu B byl zatím prozkoumán pouze částečně. Teprve nedávno bylo prokázáno, že delece *nhx1* hyperpolarizaci membrány nepůsobí (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005a), a citlivost mutantů *nhx1Δ* k hygromycinu B není tedy možné vysvětlit zvýšeným vstupem toxických kationtů do buněk. Lze spíše předpokládat, že intracelulární antiporter Nhx1 by se na rezistenci k hygromycinu mohl podílet regulací pH a/nebo membránového potenciálu endosomálních váček a následně sekvestrací této toxické látky ve vakuole, jak bylo již dříve navrženo (Brett *et al.*, 2005b; Gaxiola *et al.*, 1999). Vliv chloridového kanálu Gef1 na membránový potenciál buněk dosud studován nebyl. Vzhledem k tomu, že i zde se jedná o vnitrobuněčný transportní systém, je pravděpodobné, že také ovlivňuje spíše vnitrobuněčnou sekvestraci toxických kationtů než potenciál plasmatické membrány buněk.

Z výsledků této práce vyplývá, že protein Kha1 je pravděpodobně vnitrobuněčným K^+/H^+ antiporterem. Na základě fluorescenční mikroskopie byla odhadnuta jeho lokalizace v membráně Golgiho aparátu, což potvrdily výsledky polské skupiny dr. A. Kurlandzké (Flis *et al.*, 2005). Jednou z jeho hlavních rolí je zřejmě udržování optimálního pH v Golgiho aparátu a tzv. „post-Golgi“ endocytických váček, nepřímoby se mohl podílet i na regulaci pH dalších organel, případně cytosolu. Podobně jako Nhx1p se Kha1p účastní na vnitrobuněčné sekvestraci hygromycinu B, pravděpodobně však reguluje pH v jiné části dráhy sekvestrace, protože přidané kopie genu *KHAI* v plasmidu nemohou nahradit funkci chybějícího genu *NHX1* (kap. 5.6.2). Dalším nepřímým důkazem role Kha1p v udržování homeostáze iontů v Golgiho aparátu je

pozorování polské skupiny dr. A. Kurlandzké, že nadprodukce *Kha1p* z mnoho-kopiového plasmidu umožní živočišnému chloridovému kanálu *Clc2* fungovat v *S. cerevisiae* a nahradit tak funkci vlastního kvasničného kanálu *Gef1* (Flis a Kurlandzka, 2003; Flis *et al.*, 2005).

Skupina vnitrobuněčných $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporterů podílejících se na regulaci pH Golgiho aparátu a endosomálních váček byla identifikována i v živočišných buňkách (Nakamura *et al.*, 2005). Bylo prokázáno, že overexprese některých z těchto přenašečů působí zvýšení pH uvnitř Golgiho komplexu. Také bakteriální homolog *Kha1p* (*KefC*) se kromě transportu K^+ podílí na regulaci vnitrobuněčného pH (Booth, 1999).

Substrátová specifita přenašeče *Kha1* nebyla stanovena. Skutečnost, že se jedná o K^+/H^+ antiporter, zůstává tedy hypotézou založenou na podobnosti primární struktury *Kha1* s dalšími K^+/H^+ antiportery (*LeNhx2*, *AtChx17*). Určitá role v transportu K^+ se dá odvodit i ze skutečnosti, že fenotyp delece *kha1* (citlivost ke zvýšenému pH) je možné potlačit přidáním KCl do růstového média (obr. 5.14). Je možné, že právě antiport K^+/H^+ je důležitý pro homeostázi K^+ a pH v Golgiho aparátu a protein *Kha1* se na udržení této homeostáze významně podílí. Není však definitivně vyloučeno, že by *Kha1p* mohl za určitých okolností transportovat i další kationty alkalických kovů.

Zajímavá je rovněž skutečnost, že nebyla nalezena žádná genetická interakce mezi přenašečem *Kha1* a ostatními transportními systémy pro draselné kationty. Ačkoliv byla studována poměrně široká série mutantních kmenů s delecí *kha1* v různých kombinacích s dalšími delecemi (*ena1-4*, *gef1*, *nha1*, *nhx1*, *tok1*, *trk1* a *trk2*), nebyl pozorován žádný fenotyp specifický pro kombinaci delece *kha1* s delecí jiného genu. Ve všech testovaných kombinacích se delece *kha1* projevovala pouze zvýšením citlivosti k vysokému pH média a k hygromycinu B. Protein *Kha1* je tedy zřejmě schopen plnit svou funkci poměrně nezávisle na ostatních transportních systémech pro draselné kationty, a podobně ostatní transportní systémy nejsou závislé na funkci *Kha1p*.

Tato práce zároveň ukazuje, jak důležitým kontrolním krokem při stanovení funkce proteinu na základě fenotypu delečních mutantů je zpětné vnesení genu do buněk a obnovení fenotypu rodičovského kmene. Chybné výsledky publikované o proteinu *Kha1* (Ramírez *et al.*, 1998) byly sice způsobeny především srovnáváním kmene s disrupcí *kha1::URA3* a rodičovského kmene auxotrofního na uracil, ale vnesení genu

KHAI v plasmidu do mutantního kmene by bývalo mohlo omyl snadno odhalit. V rámci této disertační práce byla věnována velká pozornost tomu, aby (1) fenotypové projevy delece *khal* byly ověřeny expresí genu *KHAI* z plasmidu a (2) kmeny porovnávané v rámci jednoho pokusu měly pokud možno stejné auxotrofní mutace a byly pěstovány za stejných podmínek. Delece genů byla prováděna pomocí deleční kazety *loxP-kanMX-loxP*, která uděluje buňkám rezistanci ke geneticinu, ale nemění metabolismus biogenních látek. Přesto bylo ještě navíc provedeno ověření, že vyštěpení deleční kazety rekombinací Cre (kap. 5.3.2) nezmění pozorované fenotypy delečních mutantů (obr. 5.13). Proto se dá s jistotou tvrdit, že fenotypy delečních kmenů popsané v této práci jsou skutečně způsobeny absencí proteinu Khal.

6.2 Vliv transportních proteinů pro K^+ na membránový potenciál buněk

6.2.1 Hyperpolarizace kmene *trk1Δ trk2Δ* při hladovění na draslík

Pomocí měření emisního spektra fluorescenční redistribuční sondy diS-C₃(3) byl studován vliv několika transportních systémů pro draselné kationty na tvorbu a udržení membránového potenciálu. V první řadě byla ověřena vhodnost metody pro srovnávání kmenů kvasinek lišících se přítomností/absencí genů kódujících transportní systémy pro K^+ . Podařilo se zopakovat dříve publikovaný výsledek (získaný jinou metodou), že hladovění na draslík má za následek hyperpolarizaci membrány (Madrid *et al.*, [1998]). Tento jev byl původně pozorován pro kmeny s delecí *trk1 trk2* ve srovnání s divokým kmenem pomocí fluorescenční sondy DiOC₆(3) a průtokové cytometrie (Madrid *et al.*, 1998). V této disertační práci byly vzájemně srovnávány dva kmeny postrádající sodné ATPasy *Ena1-4* a antiporter *Nha1*, z nichž jeden navíc postrádal i transportní systémy pro import K^+ , *Trk1* a *Trk2*. Hyperpolarizace kmene s delecí *trk1 trk2* byla pozorována při pěstování v médiu YPG s limitující koncentrací K^+ (do 10 mM, viz. kap. 5.10.1, obr. 5.36), což odpovídá podmínkám, za kterých byla hyperpolarizace kmene s delecí *trk1 trk2* pozorována v Madrid *et al.* (1998). Při pěstování v médiu s nadbytkem K^+ (100 mM KCl) kmen s delecí *trk1 trk2* hyperpolarizován nebyl (obr. 5.35). Tento nový výsledek svědčí o tom, že důvodem hyperpolarizace je skutečně hladovění na draslík. Jak je zmíněno již v kap. 2.4.4.1, předpokládá se, že právě membránový potenciál je

zdrojem energie pro transport draselných kationtů do buněk proti koncentračnímu spádu (Rodríguez-Navarro, 2000). Zvýšení membránového potenciálu v případě extrémně nízké koncentrace draselných iontů v okolním prostředí by tedy mohlo buňkám sloužit k účinnějšímu importu K^+ . Těto hypotéze by odpovídalo také další pozorování R. Madrida, že i v kmenech exprimujících geny *TRK1* a *TRK2* dojde k hyperpolarizaci, jsou-li přeneseny na 3 hodiny do minimálního média bez K^+ (Madrid *et al.*, 1998).

Metoda porovnávání membránového potenciálu pomocí měření změn v emisním spektru fluorescenční sondy diS-C₃(3) se tedy ukázala jako dobře použitelná pro srovnání vlastností isogenních kmenů *S. cerevisiae* lišících se pouze přítomností/absencí určitého transportního systému pro draselné kationty. Z výsledků uvedených v kap. 5.10.4.2 a diskutovaných níže vyplývá, že metoda je použitelná nejen pro srovnání kmenů s jednou či více delecemi v genomové DNA, ale i pro testy komplementace, čili porovnání kmene transformovaného prázdným vektorem s kmenem exprimujícím určitý gen z tohoto vektoru. Jak je již diskutováno v kap. 6.1.2, ověření fenotypových projevů delecí pomocí komplementačního testu je velmi důležitým kontrolním krokem při stanovení funkce proteinu.

6.2.2 Ostatní transportní systémy pro K^+

Kromě systémů *Trk1* a *Trk2*, důležitých pro import K^+ do buněk, byly v souvislosti s membránovým potenciálem buněk testovány čtyři další transportní systémy draselných kationtů. Jednalo se o systémy lišící se transportním mechanismem: jednak primární aktivní transportéry (ATPasy), dále dva sekundární aktivní transportéry (antiportery) a jeden systém přenášející K^+ mechanismem usnadněné difuze (kanál).

Prvním z testovaných transportních systémů jsou $Na^+(K^+)$ -ATPasy, kódované geny *ENA1-4*, vylučující kationty alkalických kovů z buněk na úkor energie štěpeného ATP. Druhým je $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter *Nha1*, o kterém se původně předpokládalo, že zprostředkovává elektroneutrální transport (1 sodný kationt proti 1 protonu), nedávno však bylo publikováno, že se jedná o transport elektrogenní (několik H^+ proti jednomu Na^+ iontu (Ohgaki *et al.*, 2005)). Třetím testovaným proteinem byl vnitrobuněčný přenašeč *Kha1*, kterému je věnována podstatná část této disertační práce. Posledním proteinem zařazeným do série byl napětově řízený draselný kanál *Tok1*.

Ačkoliv důvodem pro zahájení experimentů s měřením membránového potenciálu byla zvýšená citlivost k hygromycinu B u kmenů s delecí *kha1*, ukázalo se, že absence tohoto vnitrobuněčného přenašeče membránový potenciál neovlivňuje (kap. 5.10.2). Znamená to, že není důvod, aby do buněk s delecí *kha1* vstupovalo větší množství toxických kationtů, jako je tomu v případě buněk s delecí *trk1 trk2*. Zvýšený membránový potenciál je tedy dalším fenotypem popsáným v původní práci o proteinu Khal (Ramírez *et al.*, 1998), který se nepotvrdil pro kmen s delecí *kha1Δ::loxP-kanMX-loxP*. Role proteinu Khal v rezistenci k hygromycinu B je spíše v regulaci jeho vnitrobuněčné sekvestrace, podobně jako je tomu v případě proteinu Nhx1 (Brett *et al.*, 2005b), jak už je diskutováno výše.

Poměrně překvapivým zjištěním bylo, že mezi třemi zbývajících transportními systémy (Ena1-4, Nha1 a Tok1) nejvýrazněji ovlivňoval membránový potenciál kanál Tok. Jeho role v transportu K^+ se přitom (narozdíl od Ena1-4 a Nha1) neprojevuje žádným vlivem na toleranci ke zvýšené extracelulární koncentraci draselných kationtů (obr. 5.39). Ani transportními pokusy založenými na měření vnitrobuněčného obsahu draslíku se nepodařilo funkci kanálu Tok1 v exportu K^+ zaznamenat (kap. 5.5.2). Také při růstu kmenů při extrémně nízkých koncentracích K^+ nebyl pozorován žádný rozdíl mezi kmeny s genotypem *trk1Δ trk2Δ TOK1* a *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* (Bertl *et al.*, 2003). To znamená, že kanál Tok1 neslouží buňkám pro import draslíku, přestože bylo prokázáno elektrofyziologickým měřením metodou terčíkového zámku, že za určitých podmínek je Tok1p schopen transportovat K^+ opačným směrem (Fairman *et al.*, 1999).

Naproti tomu proteiny Ena1-4 a Nha1, jejichž role v exportu K^+ je zcela zřejmá (viz kap. 2.4.4.2), neovlivňovaly membránový potenciál tak výrazně, jak by se dalo očekávat od elektrogenních transportních systémů. Je pravda, že za standardních kultivačních podmínek (nízké pH média, žádný osmotický stres) použitých v této práci jsou systémy Ena1-4 a Nha1 poměrně málo exprimovány. Zvýšení membránového potenciálu overexpresí antiporteru Nha1 bylo popsáno nedávno (Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2005a), overexprese ATPas Ena1-4 dosud z hlediska vlivu na membránový potenciál studována nebyla.

Nejvýraznější depolarizace byla pozorována v kmeni s delecí genů všech exportních systémů pro K^+ (tj. v kmeni TOB *ena1-4Δ nha1Δ tok1Δ*). Tento výsledek

dokazuje, že pro tvorbu a udržení membránového potenciálu jsou důležité nejen proteiny importující K^+ (Trk1 a Trk2), ale i exportní systémy Enal-4, Nhal a Tok1.

6.2.3 Depolarizace způsobená delecí *tok1*

Jak je již zmíněno výše, výrazná depolarizace kmenů s delecí genu *TOK1* byla poměrně překvapivým výsledkem vzhledem k tomu, že nebyl dosud nalezen žádný růstový fenotyp mutantů *tok1Δ* spojený s koncentrací K^+ v médiu. Jediným důkazem o tom, že Tok1 skutečně transportuje draselné kationty, jsou experimenty prováděné metodou terčíkového zámku (Bertl *et al.*, 1993; Bertl *et al.*, 1998). Bylo prokázáno, že přes membránu buněk s delecí *tok1* neprobíhají proudy charakteristické pro draselný kanál Tok1. Po vnesení genu *TOK1* v plasmidu zpět do buněk se proudy obnovily (Bertl *et al.*, 1998). Dále bylo popsáno, že kanál Tok1 je aktivován depolarizací plasmatické membrány (Bertl *et al.*, 1993) a na jeho funkci má vliv i intracelulární a extracelulární koncentrace K^+ a extracelulární koncentrace Ca^{2+} (Bertl *et al.*, 1992). Výsledky uvedené v této práci (kap. 5.10.4) dobře doplňují pozorování, že depolarizace plasmatické membrány aktivuje kanál Tok1 (Bertl *et al.*, 1993). Depolarizace zjištěná pomocí měření fluorescenčního spektra redistribuční sondy diS-C₃(3) u delečních mutantů *tok1* pravděpodobně není způsobena přímo delecí genu *TOK1*. Když však dojde k depolarizaci plasmatické membrány (například importem draselných kationtů, což je normální fyziologický proces), buňky s delecí *tok1* nemohou reagovat aktivací draselného kanálu, a proto zůstávají depolarizovány (obr. 5.40).

Je tedy pravděpodobné, že jednou z fyziologických funkcí proteinu Tok1 je obnovení membránového potenciálu v případě depolarizace plasmatické membrány buněk.

6.3 Heterologní exprese rostlinného K^+/H^+ antiporteru v *S. cerevisiae*

V kvasinkových buňkách byl heterologně exprimován rostlinný homolog proteinu Khal, K^+/H^+ antiporter Chx17 z *A. thaliana*. Ukázalo se, že tento protein je schopen komplementovat oba fenotypy delece *khal1*: zhoršený růst na médiu s vysokým pH i citlivost k hygromycinu B. Rovněž lokalizace rostlinného antiporteru sledovaná pomocí fluorescenční mikroskopie v *S. cerevisiae* je velmi podobná lokalizaci vlastního kvasničného proteinu Khal a jedná se tedy s největší pravděpodobností o Golgiho aparát.

Intracelulární lokalizace proteinu *AtChx17* v buňkách rodičovského organismu nebyla stanovena. Protein Chx17 je jeden z 28 antiporterů rodiny CPA2 v *A. thaliana*. Většina z těchto proteinů je přednostně exprimována v buňkách samčího gametofytu, pravděpodobně se podílejí na regulaci homeostáze kationtů, pH a osmotického tlaku během vysychání zralého pylového zrna a jeho rehydratace během klíčení a růstu pylové láčky (Sze *et al.*, 2004). Protein Chx17 je však jedním ze šesti proteinů Chx, které jsou v *A. thaliana* exprimovány přednostně v buňkách sporofytu. Jeho exprese byla pomocí reportérového genu β -glukuronidasy a *in situ* RT-PCR zjištěna v epidermálních a korových buňkách kořenů (Cellier *et al.*, 2004). Role proteinu *AtChx17* v získání a udržení potřebného množství draselných kationtů byla stanovena na základě pozorování, že exprese genu je silně indukována hladověním rostliny na draslík nebo stresem NaCl. Mutantní rostliny *chx17* akumulovaly méně draslíku v buňkách kořene než rostliny kontrolní, zatímco obsah Na^+ a Mg^{2+} zůstal nezměněn (Cellier *et al.*, 2004).

Rostlinné antiportery kationtů alkalických kovů jsou v poslední době intenzivně studovány, protože se významně podílejí na toleranci rostlin k solím v půdě vylučováním kationtů z buněk nebo jejich sekvestrací ve vakuolách (Blumwald *et al.*, 2000; Serrano a Rodriguez-Navarro, 2001). Kromě toho hrají důležitou úlohu v regulaci pH cytosolu a vakuoly, jak je velmi esteticky zdokumentováno např. pro *InNhxl* z japonského svlačce (*Ipomoea nil*), kde činnost vakuolárního Na^+/H^+ antiporteru signifikantně ovlivňuje pH vakuol a následně barvu květů (Yamaguchi *et al.*, 2001). Heterologní exprese rostlinných přenašečů v kvasinkových buňkách je jednou z osvědčených metod pro charakterizaci jejich funkce. V buňkách *S. cerevisiae* tak už

bylo funkčně exprimováno několik rostlinných $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporterů plasmatické membrány, např. protein *Sos1* z *A. thaliana* (Shi *et al.*, 2002) nebo protein *Pmp3* z jednoděložné rostliny *Aneurolepidium chinense* (Inada *et al.*, 2005). Dále bylo studováno několik rostlinných homologů kvasničného vnitrobuněčného přenašeče *Nhx1*. Ukázalo se, že podobně jako *Nhx1* v kvasinkách se tyto proteiny podílejí na sekvestraci kationtů alkalických kovů ve vakuolách rostlinných buněk (Apse *et al.*, 1999). Komplementace fenotypu delece *nhx1* v *S. cerevisiae* byla prokázána např. pro *AtNhx1* z *A. thaliana* (Gaxiola *et al.*, 1999), *OsNhx1* z rýže (Fukuda *et al.*, 2004; Kinclová-Zimmermannová *et al.*, 2004), nebo *TaNhx1* z pšenice (Brini *et al.*, 2005).

Komplementace fenotypů delece *kha1* antiporterem *AtChx17* naznačuje, že i deleční mutanty *kha1* by se potenciálně daly využít pro heterologní expresi a studium vlastností intracelulárních rostlinných přenašečů kationtů alkalických kovů. Tato varianta by byla obzvláště vhodná, pokud by se podařilo prokázat, že *Kha1* transportuje přednostně K^+ , podobně jako *AtChx17*, *LeNhx2* a ostatní K^+/H^+ antiportery z vyšších eukaryot. Podobná funkce *AtChx17p* a *Kha1p* a komplementace fenotypu *kha1* expresí *AtCHX17* také naznačuje, že funkce tohoto typu přenašeče je konzervována napříč taxonomickými skupinami organismů a zřejmě je tedy pro fyziologii buňky velmi důležitá.

Teoreticky není vyloučena ani heterologní exprese a studium homologů proteinu *Kha1* z dalších druhů (např. živočišných, kap. 2.5.5.4) v kvasinkách, je ovšem třeba mít na paměti, že funkční exprese živočišných transportních systémů jako takových je v kvasinkách o něco obtížnější než transportních systémů z rostlin (viz např. (Flegelová a Sychrová, 2005; Montero-Lomeli a Okorokova-Facanha, 1999)), což může být způsobeno například výrazně odlišným složením lipidů v buněčných membránách (Opekarová a Tanner, 2003).

Pro heterologní expresi transportérů z vyšších eukaryot v kvasinkách je ovšem především zásadně důležitá znalost funkcí a fenotypy delecí vlastních kvasničných transportních systémů. Z tohoto důvodu je oprava chybných publikovaných výsledků, správné určení lokalizace a rozšíření znalostí o proteinu *Kha1* významným přínosem pro základní výzkum transportních systémů kationtů alkalických kovů a systémů ovlivňujících adaptaci na změny extracelulárního pH v *S. cerevisiae*.

7 Souhrn

V rámci této disertační práce se podařilo objasnit některé dříve publikované nesrovnalosti (Ramírez *et al.*, 1998) v souvislosti s domnělým K^+/H^+ antiporterem plasmatické membrány kvasinky *S. cerevisiae*. Bylo prokázáno, že Kha1p nezprostředkovává transport draselných kationtů z buněk přes plasmatickou membránu a že mutanty s delecí *kha1* nemají změněný vnitrobuněčný obsah K^+ ani zvýšený membránový potenciál. Byly nalezeny a ověřeny nové fenotypy delece *kha1* (citlivost k zvýšenému pH růstového média a k hygromycinu B) což (1) napovídá o funkci proteinu Kha1 v regulaci vnitrobuněčného a vnitroorganelového pH a následně v regulaci homeostáze kationtů alkalických kovů v cytosolu a uvnitř buněčných organel; a (2) umožňuje heterologní expresi a charakterizaci příbuzných proteinů z vyšších eukaryot v *S. cerevisiae*. První z nich, protein Chx17 z *A. thaliana*, byl v delečních mutantech exprimován a ukázalo se, že je schopen komplementovat fenotypové projevy delece *kha1*, takže jeho role v buňkách *A. thaliana* by mohla být podobná funkci proteinu Kha1 v *S. cerevisiae*.

Jeden z vytyčených cílů disertační práce se nepodařilo splnit docela: Bylo sice správně určeno, že protein Kha1 není lokalizován v plasmatické membráně kvasinky, a jeho lokalizace byla odhadnuta do membrány Golgiho aparátu, než se však podařilo nalézt vhodný markerový protein pro kolokalizaci, podobný výsledek (lokalizace Kha1p v Golgiho aparátu prokázáný kolokalizací s Mnt1p) byl publikován jinou skupinou (Flis *et al.*, 2005).

Nečekaně byla v rámci této práce objevena důležitá role proteinu Tok1 v udržování membránového potenciálu *S. cerevisiae*. Ukázalo se, že nejen proteiny importující draselné kationty do buněk (Madrid *et al.*, 1998), ale i exportní systémy pro K^+ mají zásadní vliv na udržení elektrochemického potenciálu přes plasmatickou membránu kvasinek. Zároveň bylo prokázáno, že membránový potenciál není jediným faktorem ovlivňujícím citlivost kvasinkových buněk k toxickému kationtu hygromycinu B, ale že na rezistenci k tomuto antibiotiku se významně podílejí i vnitrobuněčné transportní systémy (včetně Kha1p), které membránový potenciál neovlivňují.

Summary of thesis

In this work, we present the characteristics of *kha1* Δ strains in the background of various multiple mutations in genes encoding alkali-metal-cation transporters. Two main phenotype manifestations of the *kha1* deletion were growth defect on high external pH and hygromycin sensitivity. The correlation between these phenotypes and the *kha1* deletion was confirmed by plasmid complementation. Fluorescence microscopy of GFP-tagged Kha1p showed that this antiporter is localized preferentially intracellularly (in contrast to the plasma-membrane Na^+/H^+ antiporter Nha1p). Based on these findings, Kha1p is probably not localized in plasma membrane and does not mediate efflux of alkali metal cations from cells (as published before in Rammírez *et al.*, 1998), but is important for the regulation of intracellular cation homeostasis and optimal pH control, similarly as the Nhx1p. The *kha1* deletion phenotypes were complemented by heterologous expression of a plant antiporter *AtChx17*, showing that the proteins *AtChx17* and *ScKha1* could have similar function and that *S. cerevisiae kha1* deletion mutants could serve for heterologous expression and characterization of some plant transporters in yeast, especially those localized intracellularly.

We also showed that the presence of the Tok1 channel strongly influences membrane potential: Deletion of the *TOK1* gene results in significant plasma membrane depolarization, whereas strains overexpressing the *TOK1* gene are hyperpolarized. A decrease in membrane potential is now the second known phenotype (besides the changes in Cs^+ tolerance) of the *tok1* deletion in *S. cerevisiae* cells. We proved that plasma membrane potential is not the only parameter determining the hygromycin B sensitivity of yeast cells and that the role of intracellular transporters in protecting against its toxic effects must also be considered.

8 Seznam použitých symbolů a zkratek

aa	aminokyselina, aminokyselinový zbytek
ADP	adenosin monofosfát
Amp ^R	resistence k ampicilinu
ATP	adenosin trifosfát
a _w	aktivita vody
BKP	bromkresolový purpur (indikátor pH)
bp	páry basí
CCCP	carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
diS-C ₃ (3)	3,3'-dipropylthiacarbocyanine jodid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
EtBr	etidumbromid
EtOH	ethanol
GA	Golgiho aparát
gal	D-galaktosa
gDNA	genomová DNA
GFP	zelený fluorescenční protein
glc	D-glukosa
kb	kilobase (tisíc párů basí)
kDa	kilodalton
KAc	octan draselný
K _m	Michaelisova konstanta
[K ⁺] _{in}	vnitrobuněčný obsah K ⁺
λ _{max}	vlnová délka maxima emise
λ _{max} ^{eq}	vlnová délka rovnovážného maxima emise
MES	2-[N-morpholino] ethansulfonová kyselina
MOPS	3-[N-morpholino] propansulfonová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NaAc	octan sodný
nt	nukleotid
OD ₆₀₀	optická hustota (optical density) při vlnové délce 600 nm

ORF	otevřený čtecí rámeček (open reading frame)
PCR	polymerasová řetězcová reakce
pDNA	plasmidová DNA
P _i	fosforečnanový anion
PVC	prevakuolární kompartmenty (prevacuolar compartments)
RFP	červený fluorescenční protein
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírany sodný
TMD	transmembránová doména
UV	ultrafialový
WT	wild type (divoký kmen)
X-gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
Δ	delece

Pro označení genů a proteinů jsou v celé práci dodržována pravidla zavedená pro *S. cerevisiae*: funkční alela genu je značena velkými písmeny a kurzívou (např. *KHA1*), nefunkční alela malými písmeny a kurzívou (např. *kha1*), protein bez kurzívy, první písmeno velké, další malá (např. protein Kha1, resp. Kha1p). V případě, že se jedná o gen nebo protein z jiného organismu, než *S. cerevisiae*, je uvedena zkratka názvu organismu (např. *AtChx17p* = protein Chx17 z *A. thaliana*).

9 Seznam literatury

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T.M., Sturley, S.L., Goldstein, S.A. (1999) A molecular target for viral killer toxin: *TOK1* potassium channels. *Cell* 99: 283-291.
- Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C., Schekman, R. (1988): *SEC7* encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J Biol Chem* 263: 11711-11717.
- Akada, R., Murakane, T., Nishizawa, Y. (2000): DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. *Biotechniques* 28: 668-670, 672, 674.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. (2001): Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 498: 98-103.
- Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V.V., Slayman, C.W. (2000): Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H^+ -ATPase. *J Exp Biol* 203: 155-160.
- Antebi, A., Fink, G.R. (1992): The yeast Ca^{2+} -ATPase homologue, *PMR1*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* 3: 633-654.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E. (1999): Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y., Harashima, S. (2003): Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 843-850.
- Aylon, Y., Kupiec, M. (2004): New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* 566: 231-248.
- Bañuelos, M.A., Rodríguez-Navarro, A. (1998): P-type ATPases mediate sodium and potassium effluxes in *Schwanniomyces occidentalis*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 1640-1646.

- Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., Potier, S. (1998): The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144 (Pt 10): 2749-2758.
- Beggs, J.D. (1978): Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* 275: 104-109.
- Benito, B., Moreno, E., Lagunas, R. (1991): Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1063: 265-268.
- Benito, B., Quintero, F.J., Rodriguez-Navarro, A. (1997): Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. *Biochim Biophys Acta* 1328: 214-226.
- Bertl, A., Gradmann, D., Slayman, C.L. (1992): Calcium- and voltage-dependent ion channels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 338: 63-72.
- Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D. (1993): Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* 132: 183-199.
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C., 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., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P.O. (2003): Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* 47: 767-780.
- Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A. (1998): NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 432: 59-64.
- Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A. (2002): Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* 1558: 109-118.

- Bloch, J.C., Sychrova, H., Souciet, J.L., Jund, R., Chevallier, M.R. (1992): Determination of a specific region of the purine-cytosine permease involved in the recognition of its substrates. *Mol Microbiol* 6: 2989-2997.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P. (2000): Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* 1465: 140-151.
- Bonhivers, M., Carbrey, J.M., Gould, S.J., Agre, P. (1998): Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. *J Biol Chem* 273: 27565-27572.
- Booth, I.R. (1999): The regulation of intracellular pH in bacteria. *Novartis Found Symp* 221: 19-28; discussions 28-37.
- Breinig, F., Tipper, D.J., Schmitt, M.J. (2002): Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* 108: 395-405.
- Brenespomales, A., Drysdale, R.B., Hughes, J.P., Lindegren, C.C., Lindegren, G. (1956): Genetical analysis of the clones from a single tetrad of *Saccharomyces* showing non-Mendelian segregation. *Genetica* 28: 1-24.
- Brett, C.L., Donowitz, M., Rao, R. (2005a): Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C223-239.
- Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., Rao, R. (2005b): The yeast endosomal Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* 16: 1396-1405.
- Brini, F., Gaxiola, R.A., Berkowitz, G.A., Masmoudi, K. (2005): Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol Biochem* 43: 347-354.
- Cabanas, M.J., Vazquez, D., Modolell, J. (1978): Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur J Biochem* 87: 21-27.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D.T., Lepetit, M., Gosti, F., Casse, F. (2004): Characterization of *AtCHX17*, member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *Plant J* 39: 834-846.

- Cid, A., Perona, R., Serrano, R. (1987): Replacement of the promoter of the yeast plasma membrane ATPase gene by a galactose-dependent promoter and its physiological consequences. *Curr Genet* 12: 105-110.
- Coker, J.A., Sheridan, P.P., Loveland-Curtze, J., Gutshall, K.R., Auman, A.J., Brenchley, J.E. (2003): Biochemical characterization of a beta-galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic arthrobacter isolate. *J Bacteriol* 185: 5473-5482.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., Deleage, G. (2000): NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25: 147-150.
- Čadek, R., Chládková, K., Sigler, K. a Gášková, D. (2004): Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. *Biochim Biophys Acta* 1665: 111-117.
- Delorme, E. (1989): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl Environ Microbiol* 55: 2242-2246.
- Denksteinová, B., Gášková, D., Heřman, P., Večeř, J., Malínský, J., Plášek, J. a Sigler, K. (1997): Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C₃(3) fluorescence. *Folia Microbiol* 42: 221-224.
- Dichtl, B., Stevens, A. a Tollervey, D. (1997): Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *EMBO Journal* 16: 7184-7195.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. a Westermann, B. (2002): Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13: 847-853.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confaniolero, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F.,

- Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. a Souciet, J.L. (2004): Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
- Ebel, W. (1985): Carrier facilitated diffusion. *J Math Biol* 21: 243-271.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Götz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Röhmer, A., Römer, A., Hinnen, A. *et al.* (1999): Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262: 683-702.
- Erez, O. a Kahana, C. (2002): Deletions of *SKY1* or *PTK2* in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Δtrk2Δ* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 1142-1149.
- Fairman, C., Zhou, X. a Kung, C. (1999): Potassium uptake through the Tok1 K⁺ channel in the budding yeast. *J Membr Biol* 168: 149-157.
- Ferguson, G.P., McLaggan, D. a Booth, I.R. (1995): Potassium channel activation by glutathione-S-conjugates in *Escherichia coli*: protection against methylglyoxal is mediated by cytoplasmic acidification. *Mol Microbiol* 17: 1025-1033.
- Flegelová, H. a Sychrová, H. (2005): Mammalian NHE2 Na⁺/H⁺ exchanger mediates efflux of potassium upon heterologous expression in yeast. *FEBS Lett* 579: 4733-4738.
- Flis, K., Bednarczyk, P., Hordejuk, R., Szewczyk, A., Berest, V., Dolowy, K., Edelman, A. a Kurlandzka, A. (2002): The Gef1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with chloride channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1144-1150.
- Flis, K. a Kurlandzka, A. (2003): The functioning of rat CLC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of the Kha1 protein. In *XXIst International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology* Gothenburg, Sweden: *Yeast* 20, pp. S233.

- Flis, K., Hinzpeter, A., Edelman, A. a Kurlandzka, A. (2005): The functioning of mammalian ClC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of K⁺. *Biochem J* 390: 655-664.
- Franzusoff, A. a Schekman, R. (1989): Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the sec7 mutation. *Embo J* 8: 2695-2702.
- Froschauer, E., Nowikovsky, K. a Schweyen, R.J. (2005): Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1711: 41-48.
- Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Yamaguchi, T., Saito, N. a Iida, S. (2000): Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407: 581.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. a Tanaka, Y. (2004): Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol* 45: 146-159.
- Futai, M., Oka, T., Sun-Wada, G., Moriyama, Y., Kanazawa, H. a Wada, Y. (2000): Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J Exp Biol* 203: 107-116.
- 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: 2848-2859.
- Garciadeblás, 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.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. a Brown, P.O. (2000): Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257.
- Gášková, D., Brodská, B., Heřman, P., Večeř, J., Malínský, J., Sigler, K., Benada, O. a Plášek, J. (1998): Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1189-1197.

- Gášková, D., Brodská, B., Holoubek, A. a Sigler, K. (1999): Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C₃(3) assay. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 575-584.
- Gášková, D. (2000): Fluorescenční metoda sledování vlivu stresorů na plasmatickou membránu kvasinek. *Habilitační práce*.
- Gášková, D., Čadek, R., Chaloupka, R., Vacata, V., Gebel, J. a Sigler, K. (2002): Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C₃(3) fluorescence. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 931-937.
- Gaxiola, R.A., Yuan, D.S., Klausner, R.D. a Fink, G.R. (1998): The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4046-4050.
- 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: 1480-1485.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. a Weissman, J.S. (2003): Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-741.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. a Johnston, M. (2002): Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.

- Gietz, R.D. a Sugino, A. (1988): New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74: 527-534.
- Gietz, R.D. a Woods, R.A. (2002): Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96.
- Goffeau, A. a Slayman, C.W. (1981): The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 639: 197-223.
- 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, 563-547.
- Gomez, M.J., Luyten, K. a Ramos, J. (1996): The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 135: 157-160.
- 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: 7654-7661.
- Greene, J.R., Brown, N.H., DiDomenico, B.J., Kaplan, J. a Eide, D.J. (1993): The *GEF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet* 241: 542-553.
- Grinna, L.S. a Tschopp, J.F. (1989): Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* 5: 107-115.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. a Hegemann, J.H. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24: 2519-2524.
- Habeler, G., Natter, K., Thallinger, G.G., Crawford, M.E., Kohlwein, S.D. a Trajanoski, Z. (2002): YPL.Db: The yeast protein localization database. *Nucleic Acids Research* 30: 80-83.

- Haro, R., Garciadeblás, B. a Rodríguez-Navarro, A. (1991): A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291: 189-191.
- Haro, R., Rodríguez-Navarro, A. (2002): Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1564: 114-122.
- Hasenbrink, G., Schwarzer, S., Kolacna, L., Ludwig, J., Sychrova, H., Lichtenberg-Frate, H. (2005): Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. *FEBS Lett* 579: 1723-1731.
- Hashimoto, H., Abe, M., Hirata, A., Noda, Y., Adachi, H., Yoda, K. (2002): Progression of the stacked Golgi compartments in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by overproduction of GDP-mannose transporter. *Yeast* 19: 1413-1424.
- Hill, D.E. (1989): Integrative transformation of yeast using electroporation. *Nucleic Acids Res* 17: 8011.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., Tzagoloff, A. (1986): Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2: 163-167.
- Hoffman, C.S., Winston, F. (1987): A 10-Minute DNA Preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Holmes, D.S., Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
- Holoubek, A., Večeř, J., Opekarová, M., Sigler, K. (2003): Ratiometric fluorescence measurements of membrane potential generated by yeast plasma membrane H⁺-ATPase reconstituted into vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1609: 71-79.
- Hong, F., Yan, J., Baran, J.T., Allendorf, D.J., Hansen, R.D., Ostroff, G.R., Xing, P.X., Cheung, N.K., Ross, G.D. (2004): Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* 173: 797-806.
- Horák, J., Kotyk, A., Sigler, K. (1984): Biochemie transportních pochodů. Praha: Academia.

- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K. (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
- Hunter, K.W., Jr., Gault, R.A., Berner, M.D. (2002): Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett Appl Microbiol* 35: 267-271.
- Chang, A.B., Lin, R., Keith Studley, W., Tran, C.V., Saier, M.H., Jr. (2004): Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol Membr Biol* 21: 171-181.
- Inada, M., Ueda, A., Shi, W., Takabe, T. (2005): A stress-inducible plasma membrane protein 3 (AcPMP3) in a monocotyledonous halophyte, *Aneurolepidium chinense*, regulates cellular Na⁺ and K⁺ accumulation under salt stress. *Planta* 220: 395-402.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. (2001): A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4569-4574.
- Jentsch, T.J., Gunther, W., Pusch, M., Schwappach, B. (1995): Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol* 482: 19S-25S.
- Jentsch, T.J., Gunther, W. (1997): Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bioessays* 19: 117-126.
- Jentsch, T.J., Hubner, C.A., Fuhrmann, J.C. (2004): Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nat Cell Biol* 6: 1039-1047.
- Kals, M., Natter, K., Thallinger, G.G., Trajanoski, Z., Kohlwein, S.D. (2005): YPL.db2: the Yeast Protein Localization database, version 2.0. *Yeast* 22: 213-218.
- Kassir, Y., Simchen, G. (1976): Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region. *Genetics* 82: 187-206.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., Lander, E.S. (2003): Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423: 241-254.
- Kelly, R.M., Chen, J., Yauch, L.E., Levitz, S.M. (2005): Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 73: 592-598.

- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A. (1995): A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376: 690-695.
- Kinclová, O., Ramos, J., Potier, S., Sychrová, H. (2001): Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* 40: 656-668.
- Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H. (2002): Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters into two subfamilies. *Microbiology* 148: 1225-1232.
- Kinclová-Zimmermannová, O., Flegelová, H., Sychrová, H. (2004): Rice Na⁺/H⁺-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters. *Folia Microbiologica* 49: 519-525.
- Kinclová-Zimmermannová, O., Gášková, D., Sychrová, H. (2005a): Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter Nha1 influences plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*: v tisku.
- Kinclová-Zimmermannová, O., Zavřel, M., Sychrová, H. (2005b): Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *J Biol Chem* 280: 30638-30647.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., Gaber, R.F. (1990): *TRK2* is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305-312.
- Ko, C.H., Gaber, R.F. (1991): *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 4266-4273.
- Kundig, W., Ghosh, S., Roseman, S. (1964): Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci USA* 52: 1067-1074.
- Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C.L., Rivetta, A. (2004): Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J Membr Biol* 198: 177-192.
- Lagunas, R. (1993): Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 10: 229-242.

- Liang, H., Ko, C.H., Herman, T., Gaber, R.F. (1998): Trinucleotide insertions, deletions, point mutations in glucose transporters confer K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18: 926-935.
- Loukin, S.H., Lin, J., Athar, U., Palmer, C., Saimi, Y. (2002): The carboxyl tail forms a discrete functional domain that blocks closure of the yeast K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1926-1930.
- Loukin, S.H., Saimi, Y. (2002): Carboxyl tail prevents yeast K⁺ channel closure: proposal of an integrated model of *TOK1* gating. *Biophys J* 82: 781-792.
- Luyten, K., Alvertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., 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: 1360-1371.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J., Botstein, D. (1987): Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58: 201-216.
- Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., Rodriguez-Navarro, A. (1998): Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* 273: 14838-14844.
- Maláč, J., Urbánková, E., Sigler, K., Gášková, D. (2005): Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C₃(3) fluorescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2536-2543.
- Manivasakam, P., Weber, S.C., McElver, J., Schiestl, R.H. (1995): Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23: 2799-2800.
- Maranda, B., Brown, D., Bourgoin, S., Casanova, J.E., Vinay, P., Ausiello, D.A., Marshansky, V. (2001): Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem* 276: 18540-18550.
- Marešová, L., Sychrová, H. (2005): Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* 55: 588-600.
- Marešová L., Sychrová H. (2006): *AtCHX17* complements the *kha1* deletion phenotypes in *S. cerevisiae*. *FEBS letters*: odesláno do tisku.

- Marešová, L., Urbánková, E., Gášková, D., Sychrová, H. (2006): Measurements of plasma membrane potential changes in *S. cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *Biochim Biophys Acta*: odesláno do tisku.
- Márquez, J.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., Persson, B.L. (1998): Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258: 628-638.
- Matsue, S., Miyawaki, O. (2000): Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, beta-galactosidase. *Enzyme Microb Technol* 26: 342-347.
- McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J., Hilleman, M.R. (1984): Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180.
- McCusker, J.H., Perlin, D.S., Haber, J.E. (1987): Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 4082-4088.
- Meadow, N.D., Roseman, S. (1982): Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Isolation and characterization of a glucose-specific phosphocarrier protein (IIIGlc) from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 257: 14526-14537.
- Mellman, I. (1992): The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol* 172: 39-45.
- Miller, S., Ness, L.S., Wood, C.M., Fox, B.C., Booth, I.R. (2000): Identification of an ancillary protein, YabF, required for activity of the KefC glutathione-gated potassium efflux system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182: 6536-6540.
- Mináriková, L., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., Palková, Z. (2001): Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp Cell Res* 271: 296-304.
- Miosga, T., Witzel, A., Zimmermann, F.K. (1994): Sequence and function analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Yeast* 10: 965-973.

- Montero-Lomeli, M., Okorokova-Facanha, A.L. (1999): Expression of a mammalian Na^+/H^+ antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Cell Biol* 77: 25-31.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R. (1999): A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* 19: 3328-3337.
- Munro, A.W., Ritchie, G.Y., Lamb, A.J., Douglas, R.M., Booth, I.R. (1991): The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium-efflux system KefC of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5: 607-616.
- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M., Lusty, C.J. (1986): Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* 45: 299-310.
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., Kanazawa, H. (2005): Four Na^+/H^+ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* 280: 1561-1572.
- Nakano, A. (2004): Yeast Golgi apparatus - dynamics and sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 186-191.
- Nass, R., Cunningham, K.W., 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., 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.
- Nowikovsky, K., Froschauer, E.M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G., Schweyen, R.J. (2004): The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K^+ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* 279: 30307-30315.
- Numata, M., Orlowski, J. (2001): Molecular cloning and characterization of a novel $(\text{Na}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 276: 17387-17394.

- Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., and Orlowski, J. (1998): Identification of a mitochondrial Na^+/H^+ exchanger. *J Biol Chem* 273: 6951-6959.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., Kanazawa, H. (2005): Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na^+/H^+ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1712: 185-196.
- Opekarová, M., Tanner, W. (2003): Specific lipid requirements of membrane proteins - a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* 1610: 11-22.
- Orlowski, J., Grinstein, S. (2004): Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 447: 549-565.
- Ortega, M.D., Rodríguez-Navarro, A. (1985): Potassium and rubidium effluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Z Naturforsch* 40: 721-725.
- Ozkanca, R. (2002): beta-Galactosidase activity of Escherichia coli under long-term starvation, alterations in temperature, different nutrient conditions in lake water. *Int Microbiol* 5: 127-132.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390: 532-536.
- Perlin, D.S., Brown, C.L., Haber, J.E. (1988): Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263: 18118-18122.
- Perlin, D.S., Harris, S.L., Seto-Young, D., Haber, J.E. (1989): Defective H^+ -ATPase of hygromycin B-resistant *pma1* mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264: 21857-21864.
- Persson, B.L., Berhe, A., Fristedt, U., Martinez, P., Pattison, J., Petersson, J., Weinander, R. (1998): Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1365: 23-30.
- Peyroche, A., Paris, S., Jackson, C.L. (1996): Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* 384: 479-481.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2004): Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1: 11-23.

- Plášek, J., Dale, R.E., Sigler, K., Laskay, G. (1994): Transmembrane potentials in cells: a diS-C₃(3) assay for relative potentials as an indicator of real changes. *Biochim Biophys Acta* 1196: 181-190.
- Portillo, F. (2000): Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469: 31-42.
- Portillo, F., Mulet, J.M., Serrano, R. (2005): A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett* 579: 512-516.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrová, H. (1996): Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387: 89-93.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R. (1997): A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Lett* 415: 206-211.
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldana, C., Coria, R., Peña, A. (1998): A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J Bacteriol* 180: 5860-5865.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., Rodríguez-Navarro, A. (1994): *TRK2* is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176: 249-252.
- Rao, R., Slayman, C. (1996): The fungal P-ATPases: a functionally diverse family of cation pumps. *The Mycota* 4: 29-56.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H., Jr. (1992): The putative Na⁺/H⁺ antiporter (NapA) of *Enterococcus hirae* is homologous to the putative K⁺/H⁺ antiporter (KefC) of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 94: 161-163.
- Rivetta, A., Slayman, C., Kuroda, T. (2005): Quantitative modeling of chloride conductance in yeast Trk potassium transporters. *Biophys J* 89: 2412-2426.
- Rodríguez-Navarro, A., Ramos, J. (1984): Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159: 940-945.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000): Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469: 1-30.
- Saier, M.H., Jr. (2000): A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 354-411.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Serrano, R. (1978): Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 22: 51-63.
- 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., Márquez J.A., Ríos G. (1997): Crucial factors in salt stress tolerance. In: *Yeast Stress Responses*, pp.147-169. New York: Landes Company.
- Serrano, R., 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., Goldstein, S.A. (2001): Immunity to K1 killer toxin: internal *TOK1* blockade. *Cell* 105: 637-644.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Zhu, J.K. (2002): The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter *Sos1* controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell* 14: 465-477.
- Shortle, D., Haber, J.E., Botstein, D. (1982): Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science* 217: 371-373.
- Schoondermark-Stolk, S.A., Jansen, M., Veurink, J.H., Verkleij, A.J., Verrips, C.T., Euverink, G.J., Boonstra, J., Dijkhuizen, L. (2005): Rapid identification of target genes for 3-methyl-1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*: v tisku.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K., Jentsch, T.J. (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH_2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel *Gef1p*. *J Biol Chem* 273: 15110-15118.
- Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., 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.
- Stadler, N., Hofer, M., Sigler, K. (2001): Mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* *Pma1* H^+ -ATPase inactivation by Fe^{2+} , H_2O_2 and Fenton reagents. *Free Radic Res* 35: 643-653.

- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., Davis, R.W. (2002): Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* 31: 400-404.
- Sychrová, H., Ramírez, J., Peña, A. (1999): Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 171: 167-172.
- Sychrová, H. (2004): Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S91-98.
- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.H., Bock, K.W., Conejero, G., Li, X., Twell, D., Ward, J.M., Hirschi, K.D. (2004): Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K^+ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol* 136: 2532-2547.
- Tenu, J.P., Viratelle, O.M., Garnier, J., Yon, J. (1971): pH dependence of the activity of beta-galactosidase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 20: 363-370.
- Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M., Jentsch, T.J. (1992): A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356: 57-60.
- Thim, L., Hansen, M.T., Sorensen, A.R. (1987): Secretion of human insulin by a transformed yeast cell. *FEBS Lett* 212: 307-312.
- Tokunaga, T., Iwai, S., Gomi, H., Kodama, K., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Chisaka, O., Matsubara, K. (1985): Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast. *Gene* 39: 117-120.
- Tucker, C.L. (2002): High-throughput cell-based assays in yeast. *Drug Discov Today* 7: S125-130.
- Van Belle, D., André, B. (2001): A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr Opin Cell Biol* 13: 389-398.
- Venema, K., Belver, A., Marin-Manzano, M.C., Rodriguez-Rosales, M.P., Donaire, J.P. (2003): A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *J Biol Chem* 278: 22453-22459.
- Vidal, M., Buckley, A.M., Yohn, C., Hoepfner, D.J., Gaber, R.F. (1995): Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of *TRK2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2370-2374.

- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., Ariño, J. (2004): Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 43614-43624.
- Wach, A., Ahlers, J., Graber, P. (1990): The H⁺-ATPase of the plasma membrane from yeast. Kinetics of ATP hydrolysis in native membranes, isolated and reconstituted enzymes. *Eur J Biochem* 189: 675-682.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., Philippsen, P. (1994): New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808.
- Wall, M.A., Socolich, M., Ranganathan, R. (2000): The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol* 7: 1133-1138.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. (1989): A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409-419.
- Waser, M., Hess-Bienz, D., Davies, K., Solioz, M. (1992): Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* 267: 5396-5400.
- Werner, A., Kinne, R.K. (2001): Evolution of the Na-P_i cotransport systems. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R301-312.
- Werten, M.W., van den Bosch, T.J., Wind, R.D., Mooibroek, H., de Wolf, F.A. (1999): High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15: 1087-1096.
- Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., 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: 3870-3882.
- Will, E., Gallwitz, D. (2001): Biochemical characterization of Gyp6p, a Ypt/Rab-specific GTPase-activating protein from yeast. *J Biol Chem* 276: 12135-12139.
- Wooding, S., Pelham, H.R. (1998): The dynamics of golgi protein traffic visualized in living yeast cells. *Mol Biol Cell* 9: 2667-2680.
- Woods, R.A. (1969): Response of *ad-2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to carbon dioxide. *Mol Gen Genet* 105: 314-316.

- Wright, M.B., Ramos, J., Gomez, M.J., Moulder, K., Scherrer, M., Munson, G., Gaber, R.F. (1997): Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272: 13647-13652.
- Yamaguchi, T., Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Saito, N., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Kusumi, T., Iida, S. (2001): Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol* 42: 451-461.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., and Serrano, R. (2005): pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* 25: 8683-8692.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Ariño, J., Serrano, R. (2002): The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *Embo J* 21: 920-929.
- Yoshioka, S., Aso, Y., Izutsu, K., Terao, T. (1993): The effect of salts on the stability of beta-galactosidase in aqueous solution, as related to the water mobility. *Pharm Res* 10: 1484-1487.
- Zhang, H.X., Blumwald, E. (2001): Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 765-768.
- Zimmermann, F.K., Schmiedt, I., ten Berge, A.M. (1969): Dominance and recessiveness at the protein level in mutant x wildtype crosses in *Sacchaomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 104: 321-330.
- Zollino, M., Lecce, R., Fischetto, R., Mardolo, M., Faravelli, F., Selicorni, A., Butte, C., Memo, L., Capovilla, G., Neri, G. (2003): Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet* 72: 590-597.