

TRANSPORT LÁTKOČEZ MEMBRÁNU U ARCHAEA: MEMBRÁNOVÉ TRANSPORTNÉ PROTEÍNY

STANISLAV ŠURÍN a PETER ŠMIGÁŇ

*Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
Stanislav.Surin@savba.sk*

Došlo 14.3.05, prijaté 2.5.05.

Kľúčové slová: archaea, transportné proteíny, kanály, sekundárny transportér, transportér TRAP, primárny transportér, transportér ABC

Obsah

1. Úvod
2. Transportné systémy u archaea
3. Kanály
 - 3.1. Rodina VIC napätovo-závislých kanálových proteínov
 - 3.2. Rodina MIP transmembránových kanálových proteínov
 - 3.3. Rodina Msc mechanosenzitívnych kanálových proteínov
4. Sekundárne transportéry
 - 4.1. Transportéry TRAP
5. Primárne aktívne transportéry
6. Záver

1. Úvod

Biologická membrána umožňuje organizmom udržiavať homeostázu prostredníctvom selektívnej kontroly pohybu molekúl, ktoré môžu do buniek alebo bunkových organel vstúpiť, a ktoré ich môžu opustiť. Za tento fenomén je zodpovedný celý rad špecifických transportných mechanizmov zabezpečujúcich vstup vitálne dôležitých molekúl resp. vylučovanie sploďín metabolizmu do vonkajšieho prostredia.

Napriek existencii veľkého množstva vedeckej literatúry o transporte látok cez biologické membrány, o štrukturálnych rysoch transportérov a kanálov lokalizovaných v membránach buniek a bunkových organel, existuje relatívne málo experimentálnych údajov o transporte látok cez membrány u archaea. Archaea sa považujú za veľmi skoré formy života, ktoré sa vyvinuli v extrémnych podmienkach. Je potrebné zdôrazniť, že archaea vykazujú celý rad unikátnych charakteristických funkčných a štrukturálnych znakov. Jedným z najmarkantnejších takýchto znakov je lipidické zloženie archaeálnej membrány, ktorá obsahuje viacero komponentov nemajúcich obdobu u baktérií

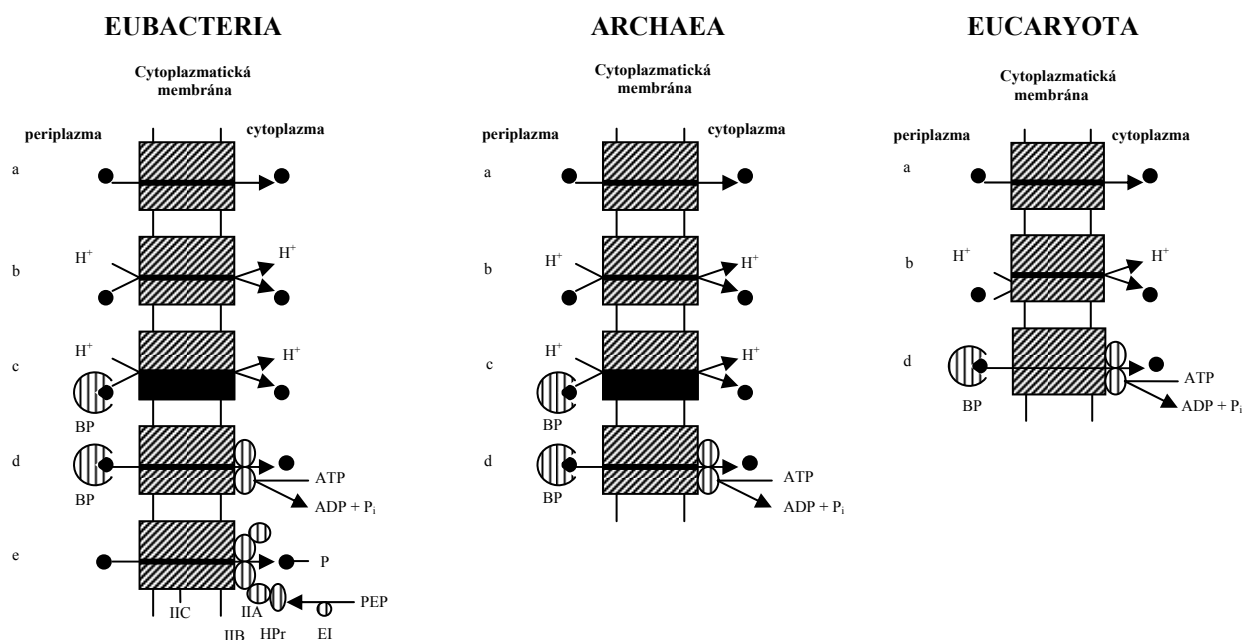
a eukaryotov. Navyše unikátne lipidické komponenty vytvárajú špecifickú architektúru archaea membrán¹. Táto je v mnohých prípadoch zložená z monovrstvy, poprípade kombinácie monovrstvy s dvojvrstvou lipidických molekúl vytvárajúc významne zmenenú (v porovnaní s prokaryontami a eukaryontami) matrix pre rôzne membránovo viazané transportné proteíny.

Existencia membrány s inou štruktúrou u archaea predznamenáva, že aj transportné systémy, ktoré sa v takejto membráne nachádzajú, by mohli vykazovať unikátne vlastnosti. Štúdium transportných systémov u archaea môže na jednej strane poskytnúť celý rad nových významných základných poznatkov dotýkajúcich sa transportných mechanizmov vo všeobecnosti, a zároveň môže prispieť k pochopeniu molekulových mechanizmov stratégie rôznych druhov transportu a niektorých aspektov regulácie týchto procesov. Evolučné hľadisko pri štúdiu vlastností membrán u archaea a s nimi spojených transportných mechanizmov vytvára významný princíp zameraný na pochopenie divergencie transportných funkcií v priebehu evolúcie. Na druhej strane nám výsledky štúdií takýchto systémov ponúkajú veľkú škálu možností využitia týchto poznatkov v biotechnológiách a nanotechnológiách, pretože mnohé mikroorganizmy patriace medzi archaea majú vytvorené unikátne štruktúry, ktoré im udeľujú schopnosť rásť za mimoriadne extrémnych podmienok ako sú teploty (80–113 °C), pri obrovských koncentráciách solí (extrémne halofily až pri 5M koncentrácii NaCl), extrémnych pH blízke 0 a v alkalickéj oblasti pH blízke 13, ako aj pri extrémnej anaerobióze. Súčasná znalosť sekvencie celých genómov viacerých archaea patriacich do rôznych podskupín významne podporujú tieto štúdiá a bezpochyby prispieje k ďalšiemu rozšíreniu našich poznatkov v tomto smere. Navyše, je zrejmé, že poznávanie transportných mechanizmov archaea poskytuje okrem výsledkov zaujímavých z hľadiska základného výskumu významný komerčný potenciál, ktorý sa určite v krátkej budúcnosti bude môcť využívať.

2. Transportné systémy archaea

Viac ako 60 % membrán prokaryotických organizmov tvoria membránové transportné proteíny². V závislosti na architektúre molekúl a poháňajúcej sile transportu boli transportné systémy archaea a baktérií klasifikované do 5 tried:

1. kanály (obr. 1a) – jednoduchý kanálový proteín umožňujúci pasívnu difúziu látok z jednej strany cytoplazmatickej membrány na druhú stranu bez stereospecifického prenášača alebo využitia energie^{3,4},
2. sekundárne transportéry, ktoré pomocou elektrochemického gradientu protónov alebo sodíkových



Obr. 1. Modely znázorňujúce triedy transportérov; (a) kanál, (b) sekundárny transportér, (c) transportér TRAP, (d) typ ABC transportéra, (e) fosfotransferázový systém. BP (proteín naväzujúci prenášaný substrát); pln krúžky (transportovaná látka, alebo substrát)^{3,4}

iónov poháňajú transport substrátu cez membránu (obr. 1b)²⁻⁴,

- transportéry TRAP (Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter), ktoré sa skladajú z periplazmového väzbového proteínu a membránového translokátora. Tieto systémy využívajú protónmotívnu a sodíkmotívnu silu ako hybnú silu transportu látok²⁻⁴ (obr. 1c).
- primárne transportéry, ktoré využívajú chemickú energiu ATP alebo iných zlúčenín na prenos substrátu. Sú to ión-transdukujúce respiračné reťazce, bakteriorodopsín a ABC transportéry (ATP binding cassette)²⁻⁴ (obr. 1d).
- fosfoenolpyruvát (PEP) – závislý fosfotransferázový systém (PTS), ktorý spája transport cukrov s fosforyláciou²⁻⁴ (obr. 1e).

Vo všeobecnosti sa u archaea vyskytujú všetky triedy transportérov, s výnimkou systému PTS. V žiadnom z archeálnych genómov doposiaľ tento systém nebol identifikovaný. Predpokladá sa, že systém PTS je vyhradený mezofilným baktériám, čo by mohlo naznačovať, že sa vyvinul relatívne neskôr².

3. Ionové kanály

Iónové kanály boli objavené v membránach všetkých troch domén života – baktérii, archaea a eukaryota³. Kanály zvyčajne katalyzujú difúziu anorganických iónov v smere ich chemického iónového gradientu medzi vonkaj-

ším prostredím a bunkovou cytoplazmou, alebo v eukaryotických bunkách aj transport iónov medzi vnútornými kompartmentmi bunky bez závislosti na bunkovej energii^{1,5}. Na základe ich špecificity voči iónom môžu byť rozdelené na Ca^{2+} kanály, K^+ kanály, Na^+ kanály, apod. Všetky známe iónové kanály sú začlenené do jednotlivých proteínových rodín, ktoré sa od seba navzájom odlišujú predovšetkým rôznym mechanizmom otvárania a zatvárania kanála.

O archeálnych transmembránových kanáloch dosiaľ existuje oveľa menej poznatkov v porovnaní s baktériami a eukaryotami. Zaujímavý je fakt, že funkčno-fylogenetický klasifikačný systém transmembránových látkových transportérov vytvorený na základe mechanizmu transportu a energetických požiadaviek, štruktúry, funkcie, substrátovej špecificity a polaritu transportu, z celkového množstva približne 157 rodín transportných kanálov identifikovaných v prírode^{6,7} u archaea sa popisuje zatiaľ iba 6 rodín (rodina VIC (voltage-gated channel) – napäťovo-závislých iónových kanálov; rodina MIP (major intrinsic protein) – aquaporínov resp. aquaglyceroporínov; rodina CIC (chloride channel) – chloridových kanálov; rodina Msc – mechanosenzitivných kanálových proteínov, rodina MIT (metal ion transporter)⁷⁻⁹ a rodina Hsp-70 (katiónový kanál formujúci heat-shock proteín)⁷. Je potrebné zdôrazniť, že veľké časti sekvenovaných genómov archeálnych druhov kódujú proteíny neznámej funkcie, takže takmer s istotou môžeme predpokladať existenciu vyššieho počtu archeálnych iónových kanálov.

3.1. VIC rodina napäťovo-závislých kanálových proteínov

Proteíny rodiny VIC sú selektívne iónové kanály (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), ktoré umožňujú tok iónov v závislosti na zmene elektrického napätia membrány bunky¹⁰. Iba donedávna boli napäťovo-závislé K^+ , Na^+ , Ca^{2+} kanály považované ako unikátne nástroje eukaryotických buniek, prispôsobené na tvorbu a šírenie špecializovaného elektrického signálu v neurónoch¹¹. Neskôr boli tieto kanály objavené aj u baktérií a archaea, kde sa zúčastňujú regulácie koncentrácie iónov v cytosole, regulácie cytosolického pH, regulácie bunkového obsahu¹². Ako tieto kanály zachytávajú zmeny elektrického potenciálu membrány a premieňajú ho na mechanickú prácu kanála, bolo niekoľko desaťročí záhadou. Až pri štúdiu termofilného archeálneho druhu *Aeropyrum pernix* sa podarilo po niekoľkoročnom úsilí Jianga Y. a spol. kryštalizovať napäťovo-závislý K^+ kanál KvAP, a odhaliť neočakávaný a prekvapujúco jednoduchý mechanizmus napäťového senzora a princípu otvárania a zatvárania kanála VIC (cit.¹³). Zaujímavé je, že hoci archaea majú prokaryotickú štruktúru bunky podobne ako baktérie, archeálny napäťovo-závislý K^+ kanál KvAP *Aeropyrum pernix* má veľmi podobnú štruktúru a funkciu ako klasický nervový K^+ kanál živočíchov¹⁰. Predpokladá sa, že mechanizmus otvárania kanála je rovnaký ako u eukaryotických Kv kanálov, pretože bol rovnako inhibovaný prostredníctvom špecifického jedu hanatoxínu HaTX čílskeho pavúka tarantuly *Grammostola spatulata*, ktorý je schopný špecificky sa viazať na napäťový senzor eukaryotického napäťovo-závislého K^+ kanála. Ďalší dôkaz, že KvAP je štrukturálne veľmi podobný eukaryotickým K^+ kanálom bol založený na konzervácii aminokyselín v póre a molekulovom rozpoznaní väzbového miesta póru charybdotoxínom CTX. Charybdotoxín je jed škorpióna *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, ktorý špecificky blokuje póry eukaryotických K^+ kanálov (ako kľúč do zámky)¹¹. Zaujímavosťou na tomto kanáli KvAP je to, prečo je tento kanál inhibovaný HaTX, resp. CTX. Nepredpokladá sa totiž, žeby bol nejaký evolučný tlak na tarantulu žijúcu v suchých oblastiach Chile, alebo škorpióna z púští Stredného Východu, aby rozpoznávali receptorové miesta kanála KvAP archeálneho druhu *Aeropyrum pernix* žijúceho v blízkosti podmorských termálnych komínov pobrežia Japonska. Uvedené skutočnosti naznačujú veľmi blízky evolučný vzťah medzi archeálnym kanálom KvAP a eukaryotickými kanálmi Kv a zároveň poukazujú na existenciu vysoko konzervovaných molekulárnych štruktúr, ktoré tvoria základ iónovej selektivity a napäťovo-závislého mechanizmu K^+ kanálov v celej prírode.

3.2. Rodina MIP transmembránových kanálových proteínov

Rodina MIP transportných proteínov (aquaporíny, aquaglyceroporíny) má viac ako 100 zástupcov, kde všetky vytvárajú transmembránové kanály¹⁴. Kanály MIP majú podobne ako proteíny rodiny VIC homotetramérickú štruktúru. Každá podjednotka kanála prechádza membránu 6× v podobe α -helixov, ktoré vznikli intragénym dupli-

kujúcim procesom z trojhelixového genetického elementu. Dve polovice proteínov sú preto opačnej orientácie v membráne¹⁴. Rozlišujú sa dve hlavné subfamílie: vodné kanály (aquaporíny) a glycerol-transportéry (aquaglyceroporíny). U *E.coli* aquaporínový proteín AqpZ selektívne transportuje vodu (nie glycerol), dokonca odpudzuje H_3O^+ ióny, kým aquaglyceroporíny GlpF môžu transportovať okrem vody aj glycerol, dihydroxyacetón, propándiol, močovinu a iné malé neutrálne molekuly (ako napr. NH_3 , CO_2) vo fyziologicky dôležitých procesoch¹⁴. Fyziologické funkcie mnohých proteínov rodiny MIP však dodnes ešte nie sú celkom známe.

U methanoarchaea *Methanobacterium marburgensis* bol identifikovaný aquaporín AqpM. Zistilo sa, že tento kanálový proteín je zaujímavý niektorými odlišnosťami od typického aquaporínu AqpZ *E.coli*, ako aj aquaglyceroporínu GlpF *E.coli*: i) AqpM proteín funguje nielen ako vodný kanál, ale aj ako veľmi slabý glycerolový transportér; ii) Je schopný udržať svoju terciárnu štruktúru v dodecylsulfáte sodnom; iii) Má vyššiu termostabilitu než AQP4 cicavcov aj ako AqpZ *E.coli*; iv) Na základe sekvencie analýzy zvyškov v oblasti P2–P5, ktorými sa v sekvencii odlišujú vodné kanály a aquaglyceroporíny a zvyškov, ktoré vytvárajú najužšie miesto kanála, u AqpM *Methanobacterium marburgensis* sa nedá jednoznačne určiť, či ide o vodný kanál, alebo o glycerolový transportér¹⁵; v) V genóme *M. marburgensis* bola objavená len jedna homologická sekvencia, kým u *E.coli* bola potvrdená existencia oboch typov kanálov rodiny MIP, aquaporíny aj aquaglyceroporíny^{15,16}.

3.3. Rodina Msc mechanosenzitívnych kanálových proteínov

Kanály Msc baktérií a archaea zabezpečujú dôležitú úlohu pasívneho transportu pri osmoregulácii osmotického tlaku buniek znížením membránovej tenzie vznikajúcej vo vnútri lipidovej dvojvrstvy¹⁷, ktorý je potrebný pre rast a rozmnožovanie. U húb a rastlín kanály Msc zabezpečujú ochranu cytoplazmatickej membrány pred nadmerným rozťahnutím a prasknutím, ktoré by mohla nastať za určitých osmotických pomerov vonkajšieho prostredia. U živočíchov kanály Msc vytvárajú molekulárny základ premeny mechanických signálov, ako sú dotyk, vnímanie zvuku, teploty, polohy, rovnováhy. Zachytávanie mechanických signálov z vonkajšieho prostredia zahŕňa širokú škálu fyziologických procesov, pri ktorých deformácia bunkových membrán je premenená na elektrický alebo biochemický signál. Nedávne objavenie kanálov Msc u archaea nielenže pomohlo vysvetliť a pochopiť evolučný vzťah medzi baktériami a archaea, ale zároveň to naznačilo, že kanály Msc sa pravdepodobne objavili už v prvých foriem života na Zemi¹⁸. V cytoplazmatickej membráne *E.coli* boli objavené 3 typy kanálov Msc, ktoré boli na základe ich konduktancie pomenované ako MscM (M ako mini), MscS (S ako small) a MscL (L ako large)¹⁹. Kanál MscL *E.coli* sa stal prototypom kanálov Msc na štúdium štruktúrno-funkčných vzťahov tejto rodiny iónových kanálov. Ako genetická próba pomohol pri hľadaní príbuzných

homológov v databáze DNA iných baktérii, archaea, húb a rastlín. V bunkovej membráne archaeálneho druhu *Thermoplasma acidophilum* bol charakterizovaný iba jeden typ kanála Msc (MscTA)¹⁸, v bunkových membránach iných archaea *Haloferax volcanii* a *Metanococcus janashchii* boli objavené dva druhy kanálov Msc (MscA₁ a MscA₂, resp. MscMJ a MscMJLR)^{18,20}. Ukázalo sa, že kanály Msc archaea majú niektoré vlastnosti podobné s MscL a MscS *E.coli* (aktiváciu dvojvrstvovým mechanizmom; závislosť od tlaku a napätia; inhibíciu gadolinom a aktiváciu amfipatínmi)¹⁸. Zaujímavé je aj to, že archaeálne kanály Msc by mohli byť najlepšie popísané ako určité hybridy štrukturálnych a funkčných vlastností kanálov MscL, MscS alebo MscM *E.coli*, ako aj niektorých eukaryotických kanálov Msc. Keď sa sledovala závislosť aktivity kanálov Msc *E.coli* od napätia (zmenami napätia 15mV), zistilo sa, že aktivita kanálov MscL a MscM nie je závislá na napätí, ale aktivita MscS sa zvyšovala s membránovou depolarizáciou. Okrem toho kanál MscS dosiahol konduktanciu približne 0,97 nS pri kladných napätiach a 0,65 nS pri záporných napätiach²¹. Kanály Msc archaea majú v tomto ohľade určitú variabilitu, ktorá by mohla byť určitou výhodou pre prežitie v extrémnych podmienkach. Kanál MscA₁ *Haloferax volcanii* má vyššiu vodivosť pri kladných napätiach (0,85 nS) a nižšiu vodivosť pri záporných napätiach (0,49 nS) podobne ako u MscS kanála *E.coli*. Kanál MscA₂ má ale opačnú vodivosť – nižšiu pri kladných napätiach (0,38 nS), a vyššiu pri záporných napätiach (0,68 nS). Kanály Msc MscMJ aj MscMJLR *M.janashchii* majú permeabilný pomer iónov K⁺ vs Cl⁻ ($P_K/P_{Cl} \sim 5-6$), čím sa v tomto ohľade podobajú kationovým kanálom v eukaryotických bunkách kostrových svalov a srdca. Pre porovnanie kanál MscS *E.coli* uprednostňuje anióny pred kationmi ($P_K/P_{Cl} \sim 3$), MscL je iónovo nešpecifický a MscM mierne uprednostňuje kationy pred aniónmi. Analýza sekundárnej štruktúry MscMJ však preukazuje istú štruktúrnu podobnosť s kanálmi Msc u *E.coli* (38,5% identita aminokyselinovej sekvencie proteínu)²¹.

4. Sekundárne transportéry

Základnou charakteristikou sekundárnych transportérov je, že sú poháňané elektrochemickým gradientom (zvyčajne $\Delta\mu_{H^+}$ alebo $\Delta\mu_{Na^+}$)^{22,23}. Z celkového počtu 80 rodín sekundárnych transportérov bolo u archaea na základe funkčnej anotácie genómov objavených zatiaľ iba 34 rodín⁷. Všeobecne sa rozlišujú 3 typy sekundárneho transportu:

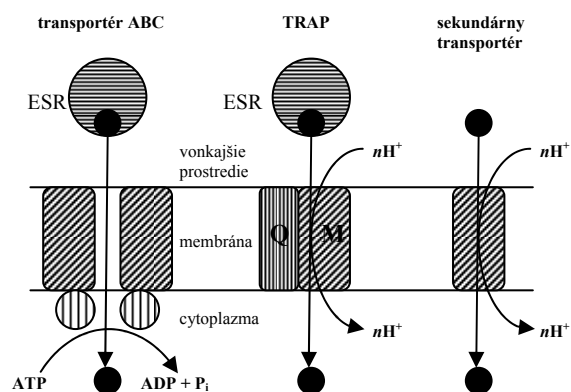
1. uniport – je transmembránový transport iba jednej látky,
2. symport – je kotransport látky s kationom,
3. antiport – je: a) látka sa vymieňa za kation (solute – ion antiport),
b) látka sa vymieňa s inou látkou (solute – solute antiport).

Veľa sekundárnych transportérov všeobecne vytvára transmembránovú topológiu 6 + 6 = 12 transmembráno-

vých α -helixov (TMSs)⁴. Sekundárne transportéry sú zodpovedné za transport väčšiny organických látok cez biologické membrány¹. Takmer všetky mono-, di-, trivalentné kationy, ako aj biologicky dôležité anorganické anióny sú transportované týmito transportérmi. Ďalej všetky triedy organických molekúl (mono-, di- a trisacharidy; aminokyseliny, amíny, amidy a polyamíny; nukleozidy; vitamíny a ich prekursori; kofaktory) sú transportované sekundárnymi transportérmi. Predpokladá sa však, že iba málo sekundárnych transportérov je zapojené do exportu makromolekúl (komplexov polysacharidov, lipidov a proteínov)⁶. Metanogénne archaea využívajú špecifické sekundárne transportéry aj na vyrovnávanie vnútrobunkového osmotického tlaku s extracelulárnym osmotickým tlakom akumuláciou anorganických iónov (predovšetkým K⁺ iónov) a akumuláciou kompatibilných organických zlúčenín (napr. glycin, betain, aminokyseliny), aby minimalizovali stratu vody²⁴. Betain je jednou z mnohých kompatibilných zlúčenín vyrovnávajúcich osmotický stres mnohých organizmov u všetkých troch domén života. Betain môže byť syntetizovaný jednak v bunke, ale aj prijímaný z vonkajšieho prostredia špecifickým glycin betainovým transportérom, ktorý je pravdepodobne poháňaný H⁺ alebo Na⁺ gradientom, pretože transport betainu bol inhibovaný niekoľkými typmi protonofórov a Na⁺ ionofórov²⁴.

4.1. Transportéry TRAP

Veľmi neobvyklý typ sekundárnych transportérov objavených u archaea a baktérii iba nedávno, predstavujú TRAP transportéry. Kľúčovou charakteristikou TRAP transportérov je, že majú analóg ESR (Extracytoplasmic Solute-binding Receptor) podobne ako transportéry ABC



Obr. 2. Porovnanie stavby transportéra TRAP, transportéra ABC a klasického sekundárneho transportéra; ESR (extracytoplasmic solute binding protein) protein; malé čierne kruhy – prenášaný substrát; obdĺžniky – transmembránové domény; krúžky so zvislým pruhovaním – ATP väzbové domény; obdĺžnik s M – DctM homológ; obdĺžnik s Q – DctQ homológ; nH^+ – transmembránový elektrochemický gradient iónov, kde n je stehiometrický koeficient prenosu protonov, pričom spriahajúcimi kationmi môžu byť aj iné ióny²⁵

(cit.²⁵). Vzťah medzi organizáciami podjednotky TRAP-T a iných typov látkových transportérov je na obr. 2. Najlepšie charakterizovaný transportér TRAP je u baktérie *Rhodobacter capsulatus*, ktorý je špecifický pre C₄-dikarboxyláty. Skladá sa z troch proteínov: DctP – periplasmatic C₄-dicarboxylate-binding receptor (analog ESR u transportérov ABC), a dvoch integrálnych membránových proteínov (DctM a DctQ), ktoré prechádzajú membránu 12 resp. 4krát. Homológy týchto troch proteínov boli identifikované vo všetkých hlavných bakteriálnych pododdeleniach, ale aj u archaea⁴. Doposiaľ neboli identifikované u eukarya²⁵. Okrem rodiny DctP boli s transportérmi TRAP spájané aj iné typy ESR, ktoré obsahujú hydrofilné proteíny obsahujúce okolo 300–400 aminokyselinových zvyškov. Rodina imunogénnych proteínov ESR označovaných ako TAXI proteíny (TRAP associated extracytoplasmatic immunogenic protein) sa konštantne ukazuje s TRAP systémami, ktoré obsahujú veľký DctQM fúzaný proteín. V súčasnosti všetky známe archeálne systémy sú tohto typu²⁵. DctQ je malý integrálny proteín (26 kDa), ktorý u *R. capsulatus* je nevyhnutný pre C₄ dikarboxylátový transport. Má veľkú periplazmatickú slučku medzi 1 a 2 TMS, a významný C-koniec lokalizovaný v cytoplazme. Funkcia DctQ v transportnom procese nie je úplne známa. Predpokladá sa, že sprostredkuje interakcie medzi DctP a DctM, keď funguje ako kotva pre DctP, stabilizuje DctM v membráne, a zúčastňuje sa na transporte látok s využitím energie²⁵. DctM homológy sa pokladajú za proteíny potrebné na translokáciu substrátu cez cytoplazmatickú membránu. Tieto proteíny majú mnohopočetné TMS (10–13), s hydrofilnou slučkou často rozdeľujúcou proteín na dve polovice. Táto topológia je podobná typickým sekundárnym membránovým transportným proteínom u iných rodín, ktoré často majú 12 TMS (cit.²⁵).

5. Primárne aktívne transportéry

Tieto transportéry využívajú primárny zdroj energie ako hnaciu silu pre transport látok proti koncentračnému gradientu. Na základe využívania primárnych zdrojov energie (chemická, elektrická a solárna energia) sa tieto primárne transportéry delia na:

- transportéry ABC, ktoré získavajú energiu hydrolýzou difosfátovej väzby anorganického pyrofosfátu, ATP alebo iných nukleozidtrifosfátov. Tieto transportéry sa vyskytujú u všetkých organizmov^{3,6},
- transportéry, ktoré získavajú energiu dekarboxyláciou cytoplazmatického substrátu (NaT-DC – Na⁺-transporting carboxylic acid decarboxylase). Tieto sa vyskytujú výhradne u prokaryotov^{3,6},
- transportéry energizované Na⁺ transportujúcim metyltetrahydrometanopterin koenzým M-metyltransferázou NaT-MMM. Tento transportérový komplex sa vyskytuje výhradne u methanoarchaea^{3,6},
- transportéry energizované tokom elektrónov z redukovaného substrátu na oxidovaný substrát^{3,6} (H₂-heterodisulfid oxidoreduktáza, Na⁺, H⁺ pumpujúca

formylmethanofuran dehydrogenáza, H⁺ translokujúca F₄₂₀H₂ dehydrogenáza),

- transportéry, ktoré využívajú svetelnú energiu na poháňanie transportu látok³ (napr. bakteriorodopsín, halorodopsín u halofilných archaea a fotosyntetické reakčné centrá u baktérií)⁶.

Primárne transportéry (pumpy) fungujú buď kanálovým alebo prenášačovým mechanizmom. Transport látok je však vždy energizovaný primárnym zdrojom energie. Tieto pumpy sú v biologických systémoch obzvlášť dôležité, pretože sú zodpovedné za vytvorenie iónového gradientu, membránových potenciálov, ktoré sa využívajú na poháňanie sekundárnych transportérov. Primárne transportéry sú oveľa komplexnejšie transportné systémy než kanály alebo sekundárne transportéry, pretože ich transportná aktivita závisí na katalytických aktivitách, ktoré rozkladajú chemické väzby, prenášajú elektróny z donorových molekúl na akceptory, alebo absorbujú svetelnú energiu. Väčšina primárnych transportérov uskutočňuje transport anorganických iónov alebo sekréciu makromolekúl³. Protóny a ióny Na⁺ sú transportované primárnymi pumpami výlučne v smere von²⁶. Svetlom poháňaný transport iónov prostredníctvom bakterio- alebo halorodopsínu, a Na⁺ eflux prostredníctvom metyltetrahydrometanopterin koenzým M-metyltransferázového mechanizmu bol doposiaľ identifikovaný len v doméne archaea. Dekarboxyláciou poháňaný Na⁺ eflux bol doteraz charakterizovaný výlučne u baktérií, ale homológy niektorých dekarboxylázových podjednotiek, vrátane integrálnych membránových β-podjednotiek týchto dekarboxyláz transportujúcich Na⁺ boli objavené aj u archeálneho druhu *Archaeoglobus fulgidus*³.

Všetky sekvenované genómy archaea a termofilných baktérií *Thermotoga maritima* a *Aquifex aeolicus* obsahujú veľké množstvo génov, ktoré kódujú transportné proteíny²⁷ patriace do skupiny di/oligopeptidových transportérov². Vo všetkých týchto organizmoch bolo objavené veľké množstvo transportérov ABC. Transportné a sekvenčné štúdie ukázali, že tieto transportéry vykonávajú špecifický a aktívny prenos molekúl cez bunkové membrány²⁷, a sú zapojené hlavne do príjmu organických látok¹, osmosenzitivity a osmoregulácie, multidrogovej rezistencie a anti-génnych procesov²⁸. Transportéry ABC dokážu rozlíšiť takmer každý typ substrátu, ktorý môže byť biologicky zaujímavý, bez ohľadu, či je organický alebo anorganický, malý, stredný alebo veľký³. Transportéry ABC majú v súčasnosti okolo 1100 zástupcov u organizmov počnúc od archaea až po človeka. Všetky majú spoločnú základnú štruktúru skladajúcu sa zo 4 domén: dve hydrofóbne integrálne transmembránové domény (TMS) a dve ATP viažuce domény (obr. 2). Transportéry ABC prokaryota a archaea môžeme odlišiť od iných transportérov ABC okrem TMS a ATP-viažucej kazety aj prítomnosťou ESP (extracytoplasmatic solute-binding protein). Kým u Gram-negatívnych baktérií je ESP lokalizovaný voľne v periplazme, u Gram-pozitívnych baktérií a archaea je ukotvený na bunkovú membránu^{2,27}. Veľa ABC transportérov majú ESP špecifické pre jednotlivé aminokyseliny, alebo príbuzné skupiny aminokyselín. Avšak niektoré aminoky-

selinové ABC permeázy sú aj také, ktoré dokážu transportovať širokú škálu L-aminokyselín. Jeden z najstriktnejších rozdielov medzi úzkou a širokou látkovou špecifickosťou transportérov sa ukázala vo veľkosti integrálnych membránových proteínov. Permeázy so širokou látkovou špecifickosťou majú integrálne membránové proteíny s 8–9 TMS, kým integrálne membránové proteíny úzko špecifických transportérov sú typicky zložené z 5 TMS (cit.²⁷).

Všetky charakteristické proteíny ESP archaea majú veľmi vysokú afinitu pre ich substráty, ktoré môžu byť v nanomolárnych množstvách. Prítomnosť transportérov typov ABC u hypertermofilov sa ukazuje ako veľmi dôležitá pre ich prežitie v extrémnych podmienkach chudobných na živiny. Transportéry ABC majú výhodu, že dokážu zachytiť látky pri veľmi nízkych koncentráciách vďaka vysokej väzbovej afinite ($K_d < 1 \mu\text{M}$) ich väzbových proteínov. Transportéry ABC dokážu katalyzovať transport látok veľkou rýchlosťou až na vysokú vnútornú koncentračnému gradientu (viac ako $10\,000\times$). Je potrebné zdôrazniť, že sekundárne aktívne transportéry majú väzbové afinity v mikro alebo milimolárnych množstvách, čo robí tieto systémy menej vhodné pre rast v extrémnych podmienkach².

6. Záver

Hlavným zámerom tohto prehľadného článku je zhrnúť niektoré aspekty transportu látok u archaea. Život archaea sa často spája s extrémnymi vonkajšími fyzikálno-chemickými podmienkami, preto ich vnútorné prostredie musí vykazovať parametre zlučiteľné so životom. Z uvedených dôvodov je vnútro buniek archaea ohraničené membránami, ktorých architektúra je výrazne odlišná a nemá obdobu u baktérií a eukaryotov. Táto skutočnosť je bezprostredne spojená s otázkami ako závažná zmena membránového matrix ovplyvňuje chovanie membránovo viazaných proteínov vrátane proteínov podieľajúcich sa na transporte látok cez membránu. Nové experimentálne údaje o transportných mechanizmoch u archaea spolu s rozvíjajúcou sa genomikou otvárajú predpoklady na získanie nových pohľadov o funkcii membrán v udržiavaní homeostázy u archaea. Poskytujú tiež mimoriadne cenné poznatky pre molekulovú a bunkovú biológiu v spojení s evolúciou transportných systémov. Zároveň tvoria ekonomický potenciál pre priame využitie transportérov archaea v nových technológiach. V neposlednej rade štúdium týchto systémov kumuluje nové idey o možnostiach modifikácie už známych transportérov vytvárajúc tak novú poznatkovú základňu pre moderné biotechnológie.

Autori práce ďakujú za finančnú podporu Agentúre na podporu vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory č. APVT – 51024904 a VEGA finančným grantom č.2/3047/23.

LITERATÚRA

- Čuboňová L., Šmigáň P.: Chem. Listy 98, 75 (2004).
- Albers S. V., Van de Vossenberg J. L., Driessen A. J., Konings W. N.: *Extremophiles* 5, 285 (2001).
- Saier M. H. Jr.: *J. Bacteriol.* 182, 5029 (2000).
- Rabus R., Jack D. L., Kelly D. J., Saier M. H. Jr.: *Microbiology* 145, 3431 (1999).
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B. T., MacKinnon R.: *Nature* 417, 515 (2003).
- Saier M. H. Jr.: *Mol. Biol. Rev.* 64, 354 (2000).
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>, stiahnuté 31.1.2005.
- Smith R. L., Gottlieb E., Kucharski L. M., Maguire M. E.: *J. Bacteriol.* 180, 2788 (1998).
- Warren M. A., Kucharski L. M., Veenstra A., Shi L., Grulich P. F., Maguire M. E.: *J. Bacteriol.* 186, 4605 (2004).
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B. T., MacKinnon R.: *Nature* 423, 33 (2003).
- Ruta V., Jiang Y., Lee A., Chen J., MacKinnon R.: *Nature* 422, 180 (2003).
- Gregerson K. A.: *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 251 (2003).
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R.: *Nature* 423, 42 (2003).
- Kozono D., Yasui M., King L. S., Agre P.: *J. Clin. Invest.* 109, 1395 (2002).
- Kozono D., Ding X., Iwasaki I., Meng X., Kamagata Y., Agre P., Kitagawa Y.: *J. Biol. Chem.* 278, 10649 (2003).
- Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H.-M., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicare R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson, R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrovski S., Church G. M., Daniels C. J., Mao J.-i., Rice P., Nolling J. and Reeve J. N.: *J. Bacteriol.* 179, 7135 (1997).
- Kloda M., Martinac B.: *EMBO J.* 20, 1888 (2001).
- Martinac B., Kloda A.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 82, 11 (2003).
- Berrier C., Besnard M., Ajouz B., Coulombe A., Ghazi A.: *J. Membr. Biol.* 151, 175 (1996).
- Kloda A., Martinac B.: *Archaea* 1, 35 (2002).
- Martinac B., Buechner M., Delcour A. H., Adler J., Kung C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2297 (1987).
- Bloch E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H. W., Stetter K. O.: *Extremophiles* 1, 14 (1997).
- Schleper C., Pühler G., Kühlmorgen B., Zillig W.: *Nature* 375, 741 (1995).
- Proctor L. M., Lai R., Gunsalus R. P.: *Appl. Environ. Mikrobiol.* 63, 2252 (1997).
- Kelly D. J., Thomas G. H.: *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 405 (2001).

26. Schäfer G., Engelhard M., Müller V.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 570 (1999).
27. Hosie A. H., Allaway D., Jones M. A., Walshaw D. L., Johnston A. W., Poole P. S.: *Mol. Microbiol.* **40**, 1449 (2001).
28. Verdon G., Albers S. V., Dijkstra B. W., Driessen A. J. M., Thunnissen A. M. W. H.: *J. Mol. Biol.* **330**, 343 (2003).
29. Konings W. N., Albers S. V., Koning S., Driessen A. J.: *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**, 61 (2002).

S. Šurín and P. Šmigáň (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Transport Across Archaeal Cytoplasmic Membrane: Membrane Transport Proteins**

This review discusses recent observations regarding the mechanism of archaea transport and their relevance to studies of membrane structure. The review primarily deals with some aspects of several mechanisms by which substances are assumed to cross cell membrane in archaea. Since a number of these observations are interesting from the evolutionary point of view, they will provide guides for future studies of evolutionary aspects of the transporting mechanisms. Hopefully, the genetic and molecular biology approach, combined with biochemical and new physical techniques will extend the study of membrane transport of archaea to the molecular level.