

## Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ANTIPOORT U BAKTÉRIÍ A ARCHAEBAKTÉRIÍ

ALAN MAJERNÍK a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, 900 18 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika

Došlo dňa 14.XI. 1996

### Obsah

1. Obeh Na<sup>+</sup> a H<sup>+</sup> cez membránu a úloha Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera
2. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport u *E. coli* ako model pre bunky so sekundárnym Na<sup>+</sup> cyklom
  - 2.1. Dva Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery u *E. coli*
  - 2.2. „Snímač sodných iónov“ a „pH snímač“  
Regulácia exprese a aktivity NhaA
  - 2.3. Fyziologický rámec dvoch Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterov u *E. coli*
3. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u extrémofilov
  - 3.1. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter umožňuje alkalofilným baktériám prežívať pri pH 11
  - 3.2. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u extrémnych halofilov
4. Baktérie s primárnym cyklom sodných iónov na membráne
  - 4.1. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u morských a halofilných baktérií
  - 4.2. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u fermentatívnych anaeróbných baktérií
  - 4.3. Reverzibilné primárne pumpy sodných iónov sa u metanogénov prelínajú s reverzibilným Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportom
5. Čo napovedajú sekvencie génov pre Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery
6. Dogmy a skutočná „mechanika“ bakteriálnej energetiky

### 1. Obeh Na<sup>+</sup> a H<sup>+</sup> cez membránu a úloha Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera

Obeh protónov a sodných iónov cez biologické mem-

brány patrí k základným vlastnostiam živých buniek<sup>1</sup>, ktorých snahou je udržať si konštantné vnútrobunkové pH a nižšiu vnútrobunkovú koncentráciu Na<sup>+</sup> ako je mimobunková<sup>2</sup>. Dnes sa všeobecne prijíma, že protóny fungujú ako spriahajúce (coupling) ióny, ktoré spriahajú exergonické membránové procesy s procesmi endergonickými<sup>3</sup>. Výsledky experimentov v osemdesiatych a začiatkom deväťdesiatych rokov potvrdili, že u baktérií je popri H<sup>+</sup> aj Na<sup>+</sup> hlavným spriahajúcim iónom v bioenergetických membránových procesoch<sup>3-5</sup>.

Univerzálnym bunkovým zariadením, ktoré spája obeh protónov a sodných iónov je Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter je umiestnený ako integrálny membránový proteín, ktorý katalyzuje výmenu protónov z jednej strany membrány za sodné ióny (v mnohých prípadoch aj za ióny Li<sup>+</sup>) nachádzajúce sa na opačnej strane, pričom funguje ako sekundárna pumpa. Energiu na osmotickú prácu (prenos jedného z iónov proti koncentračnému gradientu) získava transportom druhého z iónov v smere koncentračného gradientu. Ak sa stechiometria Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmeny rovná 1 (antiporter vymieňa 1 mol Na<sup>+</sup> za 1 mol H<sup>+</sup>), antiporter je elektroneutrálny. Ak je však pomer Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> väčší, prípadne menší než 1, cez membránu sa prenáša elektrický náboj. V takomto prípade ide o elektrogénny chod výmeny. To znamená, že membránový potenciál ( $\Delta\psi$ ) môže brzdiť alebo zosilňovať elektrogénnu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmenu.

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter má schopnosť udržiavať sekundárny Na<sup>+</sup> cyklus alebo sekundárny H<sup>+</sup> cyklus, v prvom prípade prenáša Na<sup>+</sup> von z bunky a recykluje protóny späť do cytoplazmy, v druhom prípade prenáša H<sup>+</sup> a recykluje Na<sup>+</sup> ióny<sup>6</sup>.

U väčšiny baktérií sa Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter zúčastňuje pH homeostázy a transportu Na<sup>+</sup> von z bunky, pričom vytvára elektrochemický gradient Na<sup>+</sup>, ktorý slúži ako hnacia sila pre mnohé transportné systémy<sup>2</sup>. U baktérií, ktoré tvoria na membránach primárny protónový cyklus zároveň s primárnym cyklom sodných iónov, môže Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter zohrávať mimoriadne dôležitú úlohu ako energetický prepojenie medzi procesmi závislými na obehu Na<sup>+</sup> a procesmi závislými na obehu H<sup>+</sup> (ref. 7).

Prvýkrát postuloval existenciu a navrhol možnú kľúčovú bioenergetickú funkciu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportu u baktérií

v roku 1968 Mitchell<sup>8</sup>. Uvažoval o tom, že Na<sup>+</sup> ióny by využitím ApH mohli byť prostredníctvom Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru pumpované z bakteriálnej bunky na tvorbu rozdielnej koncentrácie Na<sup>+</sup> (ApNa). Pri poklese aktivity generátorov ApH by antiporter mohol vytvárať ApH cez membránu vstupom Na<sup>+</sup> do bunky prostredníctvom Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru (pracujúcom v opačnom smere). Bunky by tak boli schopné pomocou ΔpNa pufrovať protónový potenciál.

Z hľadiska obehu Na<sup>+</sup> a H<sup>+</sup> môžeme bunky rozdeliť do troch skupín: na bunky, ktoré i) energizujú membrány primárnym cyklom H<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup> cyklus je sekundárny) ii) energizujú membrány primárnym cyklom Na<sup>+</sup> (H<sup>+</sup> cyklus je sekundárny) iii) vytvárajú na membránach primárny cyklus H<sup>+</sup> spolu s primárnym cyklom Na<sup>+</sup>.

Po prvýkrát bol bakteriálny Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter popísaný u *Streptococcus faecalis* Haroldom a Papineauom<sup>43</sup> v roku 1972 a o dva roky neskôr u *E. coli* Westom a Mitchellom<sup>44</sup>. Dodnes bol Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter nájdený a charakterizovaný u neutrofilov<sup>1</sup>, alkafilov<sup>22</sup>, halofilov<sup>30</sup> ako aj u archaebaktérií<sup>24,38</sup>. Dosiaľ je známy iba jediný druh baktérie, *Clostridium fervidus*, u ktorého sa nepodarilo dokázať Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter<sup>9</sup>.

## 2. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport u *E. coli* ako model pre bunky so sekundárnym Na<sup>+</sup> cyklom

*E. coli* je neutrofilná baktéria, ktoré za optimálnych podmienok tvorí na membráne primárny protonový cyklus. Na prenos niektorých zdrojov uhlíka do bunky (glutamátu, prolinu, serínu a melibiózy) používa transportné systémy poháňané gradientom Na<sup>+</sup> iónov<sup>10</sup>. Vhodný medzičlánok oboch spomínaných procesov je Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, ktorý premieňa primárny protónový gradient na sekundárny gradient Na<sup>+</sup>. Prítomnosť Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru tak môže spíňať dve hlavné potreby bunky: zbavuje bunku nadbytočného Na<sup>+</sup> a zároveň generuje hnaciu silu na transport spomenutých substrátov.

Napriek tomu, že Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter bol u *E. coli* popísaný a čiastočne charakterizovaný už v sedemdesiatych rokoch, pokusy priamo biochemicky charakterizovať izolovaný proteín v osemdesiatych rokoch neboli úspešné<sup>6</sup>. Dôvod bol prostý; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u *E. coli* tvorí menej než 0,2 % membránových proteínov, čo je ekvivalent asi 500 kópií na bunku<sup>1</sup>. Z týchto dôvodov sa začalo uvažovať o využití genetického prístupu. Tsuchiyaovi, Wilsonovi a spolupracovníkom sa podarilo vyizolovať mutanta, ktorý zniesol koncentrácie Li<sup>+</sup> toxické pre divý kmeň (Li<sup>+</sup> ióny

inhibujú melibiózový transportér a zároveň inhibujú aktivitu pyruvát kinázy)<sup>6</sup>. Tento mutant niesol najmenej dve mutácie, z ktorých jedna modifikovala melibiózový transportér, takže mohol kotransportovať melibiózu s Li<sup>+</sup> aj s Na<sup>+</sup>. Druhá mutácia zvýšila aktivitu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru a umožňovala mu vo zvýšenej miere transportovať toxické Li<sup>+</sup> ióny von z bunky. Využitím tohto mutantu sa podarilo naklonovať gén pre Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter - *nhaA*, ktorý bol zodpovedný za rezistenciu voči toxickým koncentráciám Li<sup>+</sup> (ref. <sup>6</sup>). Rastové pokusy ukázali, že mutant Δ*nhaA* rastie v takom istom pH rozmedzí ako divý typ, ak rastové médium obsahuje iba nízku koncentráciu Na<sup>+</sup>. Na druhej strane, Δ*nhaA* je výrazne citlivý na vyššie koncentrácie Li<sup>+</sup> a Na<sup>+</sup>, pričom citlivosť na sodné ióny sa so vzrastajúcim pH zvyšuje<sup>1</sup>. Pokusy s membránovými vezikulami z tohto mutantu odhalili druhý systém na Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmenu u *E. coli*, ktorý bol označený ako NhaB. Neskôr pripravené mutanty Δ*nhaB* a Δ*nhaA*Δ*nhaB* ukázali, že *E. coli* nemá žiaden ďalší špecifický Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter<sup>1</sup>.

### 2.1. Dva Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery u *E. coli*

Oba spomínané antiportery sa dajú geneticky a kineticky odlíšiť. Bolo určené poradie nukleotidov pre oba gény *nhaA* a *nhaB*, ktoré kódujú membránové proteíny s M<sub>r</sub> 41.316 a 55.543 kDa<sup>6</sup>. Hydropatický profil aminokyselinového zloženia oboch proteínov ukazuje, že oba antiportery obsahujú rozsiahle helixové štruktúry tvoriace pravdepodobne 11–12 transmembránových častí navzájom spojených hydrofilnými úsekmi rozličnej dĺžky<sup>2,6</sup>. Bolo taktiež zmapované umiestnenie oboch génov na chromozóme *E. coli*; *nhaA* sa nachádza na 0,35 min a *nhaB* na 25,5 min. Zaujímavé je, že sekvencie týchto dvoch antiporterov ukazujú iba veľmi malú podobnosť.

Proteíny oboch prenášačov boli nadprodukované a po solubilizácii a purifikácii funkčne rekonštituované do proteolipozómov. V tomto systéme bola potvrdená ich aktivita a popísané kinetické parametre oboch antiporterov.

Dôležitou črtou oboch prenášačov je závislosť ich aktivity od pH. Rýchlosť Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmeny NhaA sa zvýši skoro o tri poriadky, ak pH stúpne z 6,5 na 8,5. Tento antiporter ukazuje zároveň väčšiu afinitu k iónom Li<sup>+</sup> ako ku Na<sup>+</sup> (ref. <sup>11</sup>). Naproti tomu, maximálna rýchlosť Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmeny NhaB zostáva v rozmedzí pH medzi 7,2–8,5 prakticky rovnaká, ale K<sub>m</sub> pre Na<sup>+</sup> klesne desaťnásobne z 16,6 mM pri pH 7,2 na 1,55 pri pH 8,5 (ref. <sup>11</sup>).

Oba prenášače, NhaA aj NhaB, sú elektrogénne. Počas reakčného cyklu prenášajú viac H<sup>+</sup> než Na<sup>+</sup>, pričom ste-

chiometria výmeny je  $2\text{H}^+/\text{Na}^+$  pre NhaA a  $3\text{H}^+/2\text{Na}^+$  pre NhaB<sup>11,12</sup>.

Experimenty s inhibítormi potvrdili, že NhaA nie je inhibovateľný amiloridom (diuretikom známym svojou schopnosťou inhibovať  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  antiportery najmä v živočíšnych bunkách) ani jeho derivátmi. Z mnohých testovaných látok iba diethylpyrokarbonát (DEPC) inaktivoval purifikovaný NhaA<sup>1</sup>. Naproti tomu, amilorid a jeho derivát harmalín inhibovali aktivitu NhaB<sup>12</sup>.

## 2.2. „Snímač sodných iónov“ a „pH snímač“ Regulácia expresie a aktivity NhaA

Ako sme už spomenuli,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter patrí k proteínom, ktoré sa v bunkách nachádzajú iba v nízkej hladine. Na druhej strane, expresia *nhaA* je ovplyvňovaná extracelulárnou koncentráciou  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$ . Samotné pH síce neovplyvňovalo expresiu, ale značne zvyšovalo jej citlivosť voči prítomnosti sodných iónov<sup>13</sup>. Kým 7 mM  $\text{Na}^+$  nemal na expresiu pri pH 7,5 žiaden vplyv, pri pH 8,5 táto koncentrácia zvyšovala expresiu sedemnásobne<sup>2</sup>. Následne sa ukázalo, že v regulácii expresie *nhaA* je zahrnutý produkt génu *nhaR* – NhaR, ktorý má schopnosť špecificky saviazať na DNA v úseku promotóra *nhaA*<sup>6</sup>. Autori týchto pozorovaní predpokladajú, že NhaR ako pozitívny regulátor *nhaA*, je časťou systému, ktorý prenáša signál z pH a  $\text{Na}^+$  stresu na úroveň expresie génu<sup>2</sup>. Čiastočne objasniť mechanizmus tohto procesu pomohla analýza jednej z mutácií v géne *nhaR*, ktorá zvyšuje afinitu NhaR sprotredkovej expresie *nhaA* ku  $\text{Na}^+$ . Ukázalo sa, že na C-konci NhaR proteinu bol Glu-124 nahradený alanínom. Preto je možné uvažovať o Glu-134 ako o časti „snímača sodných iónov“ regulačného proteinu NhaR<sup>2</sup>.

Popísanie a objasnenie mechanizmu výrazného zvýšenia aktivity purifikovaného NhaA so vzrastajúcim pH bolo ďalším bádateľským prínosom izraelskej skupiny Paddanovej a Schuldinera. Podľa ich hypotézy by mal protein obsahovať miesto modifikovateľné zmenou pH, akýsi „snímač pH“<sup>13</sup>. Ako vhodný kandidát na túto úlohu sa javil histidín ( $\text{pK}_a$  okolo 6). NhaA má vo svojej molekule 8 histidínov, ktoré boli cieľenou mutagenézou vymenené za arginíny. Ukázalo sa, že iba výmena histidínu 226 významne pozmenila fenotyp. Expresia a ani maximálna aktivita Arg-226 nebola mutáciou ovplyvnená, ale výrazný efekt sa ukázal v citlivosti na pH. Jeho pH profil bol posunutý o pol jednotky pH smerom do kyslej oblasti<sup>13</sup>. Podobný posun pH profilu, ale k alkalickému oblasti, bol docielený výmenou His-226 aspartátom. Obe substitúcie

potvrdili, že pH profil aktivity NhaA ovplyvňuje náboj v pozícii 226 (ref. <sup>14</sup>). Ďalšie aminokyseliny, cystein a serín, dokázali úspešne nahradiť His-226 a mutované proteíny (podobne ako prenášač z divého kmeňa) boli aktivované v pH rozmedzí 7–8. Z týchto výsledkov autori predpokladajú, že polarita alebo vodíkové väzby budú pre pH reguláciu NhaA v polohe 226 nevyhnutné<sup>14</sup>. Tieto pokusy napokon potvrdili predstavu, že ten istý proteín by mohol slúžiť ako bunkový „snímač“ a zároveň aj ako „dávkoč“ protónov<sup>13</sup>.

Ukázalo sa, že v polohe His-217 sa nachádza konzervatívny histidínový zvyšok aj u NhaA *V. parahaemolyticus*<sup>16</sup>, ktorý má podobné pH optimum ako NhaA u *E. coli*<sup>15</sup>.

## 2.3. Fyziologický rámec dvoch $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporterov u *E. coli*

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport u *E. coli* je dnes slušne kineticky aj geneticky ocharakterizovaný. Je zrejme, že bunka vlastní dva špecifické  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery označované ako NhaA a NhaB, ktoré sú zodpovedné za transport sodných iónov z bunky, energizovaný vstupom protónov do cytoplazmy. V súčasnosti sa predpokladá, že skôr ako regulácia vnútrobunkového pH je úlohou antiporterov adaptácia na vysokú koncentráciu  $\text{Na}^+$ . NhaA je pre uvedenie adaptáciu nevyhnutný najmä v alkalickom prostredí a zároveň umožňuje bunke brániť sa pred toxickými  $\text{Li}^+$  iónmi<sup>14</sup>. NhaB pravdepodobne plní životné funkcie pre bunky rastúce na substrátoch kotransportovaných spolu s  $\text{Na}^+$  (napr. glutamát alebo prolín) v médiách nízkym obsahom  $\text{Na}^+$  a v kyslej oblasti pH, to znamená za podmienok, v ktorých sa neexprimuje NhaA<sup>11</sup>. Zároveň je nevyhnutný v prípadoch, ak strata NhaA limituje rast buniek<sup>14</sup>. Z rastových pokusov s mutantami  $\Delta nhaA$  a  $\Delta nhaA\Delta nhaB$  vyplýva, že v regulácii vnútrobunkového pH, ako aj v transporte  $\text{Na}^+$  von sú zahrnuté pravdepodobne iné mechanizmy než  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport, pretože pri nízkych koncentráciách  $\text{Na}^+$  rastú oba mutanty v rovnakom rozsahu pH ako divý kmeň<sup>6,17</sup>. Napriek pokusom s  $\Delta nhaA$ , predpokladaná funkcia NhaB neberie do úvahy jeho  $K_m$ , ktoré je za neutrálnych podmienok príliš vysoké na to, aby efektívne umožnilo transport  $\text{Na}^+$  von z bunky, ak je jeho koncentrácia v rastovom médiu nízka.

Všetky navrhované úlohy  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  prenášačov vychádzajú z fyziologických podmienok, za ktorých je na membránach primárny protónový gradient. Výsledky z laboratória profesora Skulačeva za posledných pár rokov dokazujú, že bunky *E. coli* sú schopné rásť v prostredí

znemožňujúcom tvorbu  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ . Navyše, podľa najnovších zistení je cytochróm *d* indukovaný protonofórmami a zvyšujúcou sa koncentráciou  $\text{Na}^+$  v médiu. Tieto pozorovania súhlasia s domnienkou, že cytochróm *d* je súčasťou  $\text{Na}^+$ -závislej energetiky, ktorá nahrádza  $\text{H}^+$ -závislú energetiku v podmienkach, v ktorých je táto nedostačujúca<sup>18</sup>. Existenciu primárnej pumpy sodných iónov, ktorú poháňa respirácia, predpokladá u spontánneho mutanta MHI vo svojej poslednej práci aj izraelská skupina<sup>17</sup>. Prítomnosť primárneho gradientu  $\text{Na}^+$  na membránach *E. coli* by tak mohla podstatne ovplyvniť pohľad na fyziológiu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera.

### 3. $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter u extrémofilov

#### 3.1. $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter umožňuje alkalofilným baktériám prežívať pri pH 11

Alkalofilné baktérie sú schopné prežívať v prostredí s extrémne nízkou koncentráciou  $\text{H}^+$ , v rozmedzí pH medzi 9 až 11 (ref. <sup>19</sup>). Podobne ako aeróbne neutrofilné baktérie, aj alkalofily respiračne transportujú protóny z cytoplazmy<sup>20</sup> a udržiavajú si tak na membránach primárny protónový cyklus<sup>6</sup>. Rast pri pH nad 8,5 (ref. <sup>21</sup>), symport niektorých substrátov<sup>20</sup> ako aj pohyb alkalofilov si vyžadujú prítomnosť  $\text{Na}^+$  iónov<sup>6,20</sup>. Aj v silne alkalickom prostredí si zachovávajú vnútrobunkové pH okolo 8,5 (ref. <sup>6</sup>) a táto ich schopnosť je závislá na prítomnosti  $\text{Na}^+$  (ref. <sup>22</sup>). Na základe mnohých experimentálnych údajov bola postulovaná a neskôr aj potvrdená centrálna úloha  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera pri pH homeostáze alkalofilných buniek<sup>23,22</sup>. Naozaj, ukázalo sa, že mutanty v géne pre  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter mali ne-alkalofilný fenotyp<sup>20</sup> alebo sa stávali citlivými na pH (ref. <sup>21</sup>). Keďže u alkalofilov sa dosiaľ nepodarilo identifikovať primárne pumpy  $\text{Na}^+$ , zdá sa, že pozorovaný transport  $\text{Na}^+$  von z buniek je spriahnutý so zachytávaním extracelulárnych protónov a ich transportom do buniek prostredníctvom najmenej dvoch elektrogénnych  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterov<sup>20</sup>. Takýmto spôsobom si bunky udržiavajú sekundárny cyklus sodných iónov uzatváraný kontransportom substrátov s  $\text{Na}^+$  do bunky<sup>19</sup> a s flagelárnym motorom<sup>20</sup> využívajúcim ApNa.

Experimentálne údaje potvrdili, že  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport je u alkalofilov elektrogénny so stechiometriou  $\text{Na}^+/\text{H}^+ > 1$ . Elektrogenicita je v tomto prípade nevyhnutná črta pre-

nášača, pretože mu umožňuje využívať membránový potenciál, a tak fungovať v podmienkach, pri ktorých sú zložky protónmotívnej sily  $\Delta\text{pH}$  (vnútri kyslé) a  $\Delta\psi$  (vnútri negatívny) opačne orientované. Zároveň je inhibovateľný látkami schopnými disipovať  $\Delta\psi$ , je úplne inhibovateľný  $\text{Li}^+$  a tiež vysokou cytoplazmatickou koncentráciou  $\text{H}^+$ , napr.  $\text{pH}_{\text{in}} 7$  (ref. <sup>19</sup>). V súlade s pozorovaním najmenej dvoch rozdielnych  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  prenášačov u alkalofilov je aj nájdenie odlišných sekvencií génov pre dva  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery *B. firmus* OF4, získané komplementáciou  $\Delta\text{nha}$  mutanta *E. coli*. Analýza sekvencie jedného z nich, označovaného ako NhaC, predpokladá štruktúru s desiatimi transmembránovými  $\alpha$ -helixami<sup>6</sup>. Druhý z génov, ukazuje podobnosť v aminokyselinovom zložení s možnými väzbovými miestami transportných systémov pre rozličné ióny ako napríklad *cadC*, kadmium rezistentného plazmidu zo *Staphylococcus aureus*<sup>6</sup>. O dvoch rozdielnych systémoch pre  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport svedčia aj biochemické porovnania alkali-citlivého mutanta a transformanta s navrátenou alkalofilitou u *Bacillus sp* kmeň C-125 (ref. <sup>21</sup>).

#### 3.2. $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter u extrémnych halofilov

Extrémne halofily, patriace medzi archaebaktérie, obývajú prostredie s vysokými koncentraciami solí<sup>24</sup>, čo predurčuje ich toleranciu k cytoplazmatickým koncentraciám  $\text{Na}^+$  až do 1 M (ref. <sup>6</sup>). Bunky *Halobacterium halobium* vlastnia jedinečnú, svetlom poháňanú primárnu protónovú pumpu - bakteriorodopsín<sup>24</sup>. Svetlom indukovaný výtok  $\text{Na}^+$  iónov, citlivý na prítomnosť odpojovačov, podporil predstavu o prítomnosti  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera na membránach *H. halobium*. Nález symportérov kotransportujúcich niektoré aminokyseliny spolu s  $\text{Na}^+$ , dal pevný rámec pre sekundárny sodný cyklus u *H. halobium*.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, ako sekundárna pumpa udržiava oproti okoliu nízku vnútrobunkovú koncentráciu  $\text{Na}^+$  a zároveň vytvára ApNa (ref. <sup>6</sup>), ktorý slúži ako hnacia sila pre aktívny transport potrebných substrátov<sup>25</sup>. Na rozdiel od väčšiny iných, reverzibilných prenášačov,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter u *H. halobium* pracuje jednosmerne v smere transportu  $\text{Na}^+$  iónov von z bunky výmenou za extracelulárne protóny<sup>26</sup>. Na svoju fyziologickú činnosť vyžaduje kombináciu ApH a  $\Delta\psi$ , ktoré ho aktivizujú<sup>25</sup>. Spätnému toku sodných iónov do buniek bráni tzv. brániaci (gating) alebo prahový membránový potenciál, približne -100 mV, ktorý vyžaduje aktívny prenášač<sup>6</sup> a zároveň umožňuje antiporteru odpovedať na ApH (ref. <sup>25</sup>). Na druhej strane, ApH zase moduluje aktivitu

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmeny tak, že mení afinitu predpokladaného regulačného miesta voči H<sup>+</sup>. Zdá sa, že práve toto miesto je zodpovedné za vysokú citlivosť Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera na pH. Stechiometria Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmeny zatiaľ nie je jasná, ale posledné výsledky ukazujú na elektroneutralitu výmeny so stochiometriou 1 (ref. 6).

Halobakteriálny prenášač je zatiaľ jediným známym u prokaryotov, ktorý je inhibovateľný s DCCD<sup>24</sup>. Zároveň je inhibovateľný halocinom H6, bakteriocínom produkovaným *H. mediterranei* a *H. gibbonsii*<sup>26</sup>.

#### 4. Baktérie S primárnym cyklom sodných iónov na membráne

V rozmanitosti bakteriálnych druhov z bioenergetického hľadiska odlišujeme významnú skupinu organizmov, ktoré využívajú na membránovo viazané procesy primárne vytvorený gradient H<sup>+</sup>. Nahradenie protónov v úlohe spriahajúcich iónov sodnými iónmi môže predstavovať aj jeden zo spôsobov adaptácie na nepriaznivé podmienky<sup>20</sup>. Koncentračný a potenciálový rozdiel Na<sup>+</sup> ( $\Delta\bar{\mu}_{Na^+}$ ) iónov umožňuje týmto organizmom vykonávať chemickú, osmotickú a mechanickú prácu<sup>7</sup>. Ide predovšetkým o morské, halofilné, anaeróbne baktérie a archaeobaktérie, u ktorých sa dokázala prítomnosť primárneho cyklu Na<sup>+</sup> (ref. 6). Vzhľadom na odlišné prírodné prostredia, ktoré obývajú, sa u nich vytvorili rozdielne spôsoby primárneho pumpovania Na<sup>+</sup> iónov.

##### 4. 1. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u morských a halofilných baktérií

Baktérie obývajúce prostredie s vyššími koncentraciami solí nielenže tolerujú sodné ióny vo väčšom nadbytku, ale Na<sup>+</sup> ióny pre svoj rast vyžadujú. Potvrdilo sa to u morských<sup>27</sup> a halofilných baktérií<sup>27</sup>. Ďalšie experimenty ukázali, že aktívny transport aminokyselín a sacharózy je úplne závislý od prítomnosti Na<sup>+</sup> (ref. 27). Tieto organizmy sú vybavené neobvyklým typom respiračného reťazca, ktorý obsahuje primárnu H<sup>+</sup> a aj Na<sup>+</sup> pumpu. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, popísaný aj u morských baktérií *Vibrio alginolyticus*<sup>28</sup>, *Vibrio parahaemolyticus*<sup>15</sup> ako aj u halofilných baktérií *Vibrio costicola*<sup>3</sup> vymieňa Na<sup>+</sup> a H<sup>+</sup> cez membrány, ktoré sú za alkalických podmienok energizované primárnym gradientom protónov ako aj sodných iónov. Z charakterizácie Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportu u *V. parahaemolyticus* na obrátených membránových vezikulách sa zdá, že bunky obsahujú dva Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery podobne ako *E. coli*<sup>15</sup>. Aktivita jedného

z nich je silne závislá na pH, pričom sa v rozmedzí pH 7-9 výrazne zvyšuje V<sub>max</sub>. K<sub>m</sub> tohto antiportera nie je ovplyvnené s pH<sup>15</sup>. Zároveň je tento antiporter silne inhibovateľný amiloridom. Amilorid tiež inhiboval transport Na<sup>+</sup> iónov von z buniek halofilnej baktérie *V. costicola*, ktoré využívali ako substrát laktát<sup>30</sup>. Aktivita druhého popísaného systému na Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výmenu u *V. parahaemolyticus* sa zdá byť nezávislá od pH<sup>15</sup>. Čiastočne charakterizovaný bol aj Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u *V. alginolyticus*, ktorý je aktívny minimálne v rozmedzí pH do 7 do 9 a umožňuje oxýfiovanie vnútra buniek spojené s výtokom Na<sup>+</sup> prostredníctvom elektrogénneho Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportu<sup>31</sup>. Pohľady na možnú fyziologickú úlohu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportu morských baktérií sú kontraverzné. Skupina okolo profesora Unemota, ktorá pracuje s *V. alginolyticus*, zastáva názor, že funkcia Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera poháňaného protónmotívnu silou, sa stáva pre bunky dôležitou na acidifikáciu cytoplazmy za alkalických podmienok<sup>28</sup>, kedy je aktivita K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> obmedzená<sup>31</sup>. Títo bádatelia predpokladajú, že regulácia vnútrobunkového pH u *V. alginolyticus* v rozmedzí pH 6-9 je zabezpečená práve prostredníctvom K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera<sup>31,42</sup>. Naproti tomu, autori výsledkov získaných u *V. parahaemolyticus* predpokladajú, že aktivita Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportera môže byť mimoriadne dôležitá pre zachovanie obehu Na<sup>+</sup> za neutrálneho pH, kedy nefunguje respiračná sodná pumpa<sup>15</sup>. Na membránových vezikulách týchto buniek sa K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport nepodarilo detegovať<sup>15</sup>.

V poslednej dobe bolo zistené poradie nukleotidov génov kódujúcich Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u oboch spomenutých morských baktérií<sup>28,16</sup>. Gén nazvaný *nhaAv* kóduje proteín pravdepodobne zložený z 383 aminokyselín s M<sub>r</sub> 40 400. Predpokladané aminokyselinové zloženie je na 58 % identické s NhaA, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterom *E. coli*<sup>28</sup>. Podobne ako u *V. alginolyticus*, aj gén pre Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u *V. parahaemolyticus* sa našiel pomocou komplementácie (dvojnásobného mutanta *E. coli*  $\Delta nhaA \Delta nhaB$ ). Proteín kódovaný týmto génom, označený tiež ako NhaA je zložený z 383 aminokyselín o M<sub>r</sub> 40 433 Da a vytvára v membráne pravdepodobne 12 transmembránových helixov. Poradie aminokyselín vykazuje 59 % homológiu s NhaA u *E. coli*<sup>16</sup> a až 97 % homológiu s NhaAv<sup>16</sup>.

##### 4. 2. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru fermentatívnych anaeróbnych baktérií

Syntéza ATP u anaeróbnej baktérie *Propionigenium modestum*, ktorá získava energiu fermentáciou sukcinátu, je úplne závislá od elektrochemického gradientu Na<sup>+</sup> ió-



nov<sup>5</sup>. Transport Na<sup>+</sup> von z bunky zabezpečuje metylmalonyl-CoA dekarboxyláza, ktorá na prenos využíva voľnú energiu neoxidatívnej dekarboxylácie. Zároveň bol u tohto organizmu nájdený jedinečný typ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP-syntázy/ATPázy, ktorý má tvorbu ATP využíva ako spriahajúci ión práve Na<sup>+</sup> (ref. <sup>5</sup>). Popri týchto dvoch enzýmových systémoch, z ktorých dekarboxyláza tvorí generátor a ATP-syntáza utlizujúci článok sodného cyklu, bola na membráne *P. modestum* potvrdená aj existencia Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru<sup>6</sup>. Ten by využitím primárneho gradientu Na<sup>+</sup> mohol vytvárať sekundárny protónový cyklus. A práve protóny sa zdajú byť spriahajúcimi iónmi pre sekundárny transport sukcinátu prenášaného do bunky zároveň s odstraňovaním katabolického propionátu prostredníctvom spoločného prenášачa<sup>5,6</sup>. Navyše Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by mohol hrať podstatnú úlohu pri pH homeostáze *P. modestum*, ktoré zvyčajne rastie v neutrálnom alebo kyslom prostredí. Zatiaľ však nie sú žiadne informácie o charaktere a vlastnostiach Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru u *P. modestum* alebo podobných baktérií.

ATP sa u fermentatívnej anaeróbnej baktérie *Streptococcus faecalis* (novým názvom *Enterococcus hirae*) tvorí substrátovou fosforyláciou. V zmysle druhého zákona bunkovej energetiky<sup>7</sup>, využíva tento organizmus svoj primárny zdroj energie ATP na energizovanie membrány. U *S. faecalis* bola nájdená a popísaná H<sup>+</sup>-translokujúca ATPáza typu F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>, ktorej úlohou je tvoriť na membráne  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  a zároveň regulovať vnútrobunkové pH<sup>6</sup>. Jedným zo systémov, ktoré využívajú ApH vytvorené na membráne touto ATPázou, a výmenou za cytoplazmický Na<sup>+</sup> energizujú membránu sekundárnym  $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ , je Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Umožňuje bunke udržiavať nízku vnútrobunkovú koncentráciu Na<sup>+</sup> v kyslom a neutrálnom prostredí. V alkalickom prostredí, kde je už  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  nedostačujúce, využíva *S. faecalis* indukovateľnú Na<sup>+</sup>-translokujúcu ATPázu, ktorá je typu V<sup>6</sup>. Tento enzým plní v alkalickom prostredí časť úlohy Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru, udržiava nízky cytoplazmatický Na<sup>+</sup> a vytvára  $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$  na membráne. Gén pre Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *S. faecalis* bol klonovaný komplementáciou dvojitého mutanta v Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru ako aj v ATP-závislom transporte Na<sup>+</sup>. Gén nazvaný *napA*, kóduje hydrofóbny proteín zložený z 383 aminokyselín, pravdepodobne tvoriaci 12 transmembránových helixov. Len veľmi malá homológia bola nájdená medzi NapA a NhaA alebo NhaB. Na druhej strane, NapA ukazuje významnú homológiu ku KefC, možnému K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru z *E. coli*. Pokusy, pri ktorých disrupcia *napA* viedla ku strate aktivity Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru<sup>6</sup> a komplementácia  $\Delta nhaA\Delta nhaB$  mutanta *E. coli* potvrdili<sup>32</sup>, že NapA funguje ako Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter.

#### 4. 3. Reverzibilné primárne pumpy sodných iónov sa u metanogénov prelinajú s reverzibilným Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportom

Metanogénne archaebaktérie sú striktne anaeróbne organizmy, ktoré získavajú svoju metabolickú energiu premenou obmedzeného počtu substrátov (H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>, metanol, mravčan, acetát, prípadne metylamíny<sup>33</sup>) na metán<sup>34</sup>. Rast ako aj tvorba metánu je u týchto organizmov závislá na Na<sup>+</sup>. Niektoré kroky metanogenézy sú spriahnuté s tvorbou primárnych gradientov protónov a sodných iónov<sup>34</sup>. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter bol čiastočne charakterizovaný na celých bunkách mezofilov *Ms. barkeri*<sup>35,36</sup> a *Mspfungatei*<sup>37</sup> ako aj termofilov *Mb. thermoautotrophicum* kmeň Marburg<sup>38</sup>. Keďže u všetkých spomínaných druhov bol prenos inhibovaný amiloridom<sup>38,35,37</sup>, harmalínom<sup>38</sup> alebo EIPou<sup>36</sup>, predpokladá sa, že aj u metanogénov sa nachádza Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter<sup>39</sup>.

Jednou zo zaujímavých vlastností energetiky metanogénov je reverzibilita primárnych Na<sup>+</sup> pŕpmp. Vďaka rozdielnej stechiometrii translokovaných Na<sup>+</sup> iónov počas metanogenézy z H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> (metyltransferáza prenáša viac Na<sup>+</sup> ako sa spotrebuje pri vzniku formyl metanofuránu), sa môže metanogenézou vytvorené  $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$  pomocou Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru premieňať na  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ <sup>36</sup>. Experimentálne bolo potvrdené, že v prítomnosti inhibítora Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteru sa metanogenéza stala necitlivá voči odpojovačom<sup>36</sup>. Ak však tá istá baktéria rastie na metanole, dochádza pri oxidácii časti metanolu na CO<sub>2</sub> (opačný smer reakcií ako pri premene H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> na CH<sub>4</sub>) k situácii, že gradient Na<sup>+</sup> vytvorený formyl-MF dehydrogenázou nepostačuje ako hnacia sila na metyltransferázovú reakciu. Chýbajúce sodné ióny by v tomto prípade mohli poskytnúť Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter poháňaný  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ <sup>35,36</sup>. V spomenutých prácach sa ukázalo, že Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter katalyzuje tvorbu  $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$  poháňanú  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ , ako aj proces opačný, tvorbu  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  poháňanú  $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ . Otázka, či je na Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u metanogénov zodpovedný za pH homeostázu zatiaľ ostáva nerozriešená. Ukázalo sa, že Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter u *Ms. barkeri* hrá úlohu pri pH regulácii za alkalických podmienok, kedy recykluje protóny späť do cytoplazmy výmenou za Na<sup>+</sup> (ref. <sup>39</sup>). Na druhej strane, bola postulovaná úloha Na<sup>+</sup> pri tvorbe ApH pri pH 5 u *Mb. thermoautotrophicum*<sup>38</sup>. Najnovšie experimenty na stredne halofilných metanogénoch, predovšetkým *Methanobolus taylorii*, však ako článok pH homeostázy favorizujú K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport<sup>40</sup>.

Existencia primárnych protónových a sodných pŕpmp a tiež systémov na pH homeostázu nezávislých od Na<sup>+</sup> u me-

tanogénov priam ponúkajú úvahu o centrálnom spojovacom a prepínacom článku medzi energetickými procesmi závislými na protónoch a systémami závislými na sodných iónoch, ktorým môže byť práve  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter.

## 5. Čo napovedajú sekvencie génov pre $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiportery

Z poradia aminokyselín pre mnohé bakteriálne prenášače sa dá predpokladať prítomnosť 10 až 12 transmembránových  $\alpha$ -helixov (akási minimálna aktívna jednotka prenášačov), často usporiadaných tak, že domény s N-koncom sú oddelené od C-koncovej domény cytoplazmatickou slučkou<sup>41</sup>. Z ôsmich doposiaľ sekvenovaných prokaryotických  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterov, ktoré zdieľajú iba malú sekvencnú homológiu, sa o piatich predpokladá, že vytvárajú 12 helixov. Z analýzy topologického modelu u NhaA *V. parahaemolyticus* a NhaAv *V. alginolyticus* sa ukázalo, že šesť zo siedmich cytoplazmatických slučiek u NhaA a všetkých sedem u NhaAv je nabitých kladne alebo neutrálne a päť zo šiestich periplazmatických slučiek u oboch prenášačov nesie celkový záporný alebo neutrálny náboj<sup>16,42</sup>, čo odpovedá tzv. van Heineho pravidlu „kladne nabitého vnútra“ (positive-inside rule), ktoré popisuje asymetrické rozloženie nabitých úsekov v membráne<sup>16</sup>.

Keďže všetky  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery prenášajú kladne nabité ióny cez hydrofóbnu hrádzu membrány, je pravdepodobné, že záporne nabité úseky aminokyselín, ktoré sú umiestnené v transmembránových častiach proteínov, hrajú dôležitú úlohu pre väzbu alebo prenos katiónov ako  $\text{Na}^+$  alebo  $\text{H}^+$ . Štyri takéto záporne nabité aminokyselinové zvyšky aspartátu sa našli v transmembránových doménach NhaAv<sup>42</sup>. Pomocou cielenej mutagenézy sa podarilo dokázať, že Asp-125, Asp-155 a Asp-156 ovplyvňujú aktivitu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportu NhaAv. Ani jeden z mutantov v týchto pozíciách nebol schopný rásť v alkalickom prostredí, transportovať  $\text{Na}^+$  von z bunky, a tak ako nemutovaný NhaAv komplementovať  $\Delta nhaA$  mutáciu *E. coli*<sup>42</sup>. Tieto úseky sú konzervované v NhaA u *E. coli*, *Salmonella enteritidis* a *V. parahaemolyticus* a môžeme ich považovať za kandidátov na väzobné miesto(a) pre katióny<sup>42</sup>. Napriek malej homológii medzi bakteriálnymi  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterami, podobné rozloženie záporných nábojov bolo pozorované v transmembránových helixoch niektorých ďalších prenášačov. NapA,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter u *E. hirae*, má v predpokladanom helixe VI Asp-153 a Asp-154, kým v ďalšom helixe VII sa nachádza Glu-184. Podobne možno nájsť

u NhaB Glu-85 v helixe III a v tom istom helixe z NhaC, antiportera u *B. firmus* RAB, sa nachádza Asp-86 (ref. 42). Zdá sa, že opísané konzervatívne úseky môžu súvisieť s aktivitou daných antiporterov<sup>42</sup>.

U eukaryotických prenášačov sa už dávnejšie určilo aminokyselinové poradie v predpokladaných doménach, ktoré viažu amilorid. U NhaA *V. parahaemolyticus* bola nájdená veľmi podobná sekvencia k amilorid viažúcej doméne ľudského  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera NHA. Keďže sa zdá, že vosvojomúčinku amiloridkompetuje  $\text{Na}^+$ , tento úsek na predpokladanom helixe II môže byť zahrnutý vo väzbe  $\text{Na}^+$  (ref. 16). Podobné motívy sa našli u  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera NapA z *E. hirae* a tiež u NhaA a NhaB z *E. coli*.

## 6. Dogma skutočná „mechanika“ bakteriálnej energetiky

Jednou z dosiaľ nevelmi diskutovanou vlastnosťou  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera je reverzibilita výmeny protónov a sodných iónov, ktorá umožňuje prenášať katióny oboma smermi v závislosti od  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$  alebo  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ . Centrálna dogma o funkcii  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera ako zariadenia na pH homeostázu a detoxikáciu cytoplazmy od  $\text{Na}^+$  už v súčasnosti nepostačuje na pochopenie úlohy  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera vo fyziológii a energetike prokaryotov. Objavy primárnych sodných púmp u mnohých bakteriálnych druhov ako aj iných systémov na pH homeostázu nezávislých od sodných iónov (napr.  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiport) vytvárajú z  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera bioenergetický fenomén.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter nachádza svoje miesto vo všetkých membránach, kde existujú súčasne obeh protónov a aj sodných iónov, teda pravdepodobne v drvivej väčšine bakteriálnych druhov. U neutrofilov, extrémnych alkalofilov a morských baktérií dochádza k duplicite systémov pre  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport. Dva rozdielne prenášače pravdepodobne umožňujú bunkám nielen adaptáciu na prostredie, ktorého koncentrácia  $\text{Na}^+$  a  $\text{H}^+$  sa pre mnohé druhy môže pohybovať v rozmedzí viac než dva poriadky, ale zároveň sú jazýčkami váh, ktoré umožňujú využiť čo najlepšie energetickú kapacitu transmembránových gradientov protónov a sodných iónov. A práve v prepojení, prípadne prepínaní medzi  $\text{Na}^+$ -závislou a  $\text{H}^+$ -závislou energetikou bude treba nájsť a osvetliť veľmi dôležité postavenie  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera v bioenergetických procesoch bakteriálnej bunky.

Autori článku ďakujú za finančnú podporu GAV SR vedeckým grantom č. 2/1052/95.

## LITERATÚRA

1. Padan E., Schuldiner S.: J. Bioenerg. Biomembr. 25, 647 (1993).
2. Padan E., Schuldiner S.: J. Exp. Biol. 196, 443 (1994).
3. Skulachev V. P.: Trends Biochem. Sci. 9, 483 (1984).
4. Lolkema J. S., Speelmans G., Konings W. N.: Biochim. Biophys. Acta 1187, 211 (1994).
5. Dimroth P.: A. van Leeuwenhoek 65, 381 (1994).
6. Padan E., Schuldiner S.: Biochim. Biophys. Acta 1185, 129 (1994).
7. Skulachev V. P.: Eur. J. Biochem. 208, 203 (1992).
8. Mitchell P.: *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research, Bodmin 1968.
9. Speelmans G., Poolman B., Abee T., Konings W. N.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7975 (1993).
10. Ohyama T., Imaizumi R., Igarashi K., Kobayashi H.: J. Bacteriol. 774, 7743 (1992).
11. Pinner E., Padan E., Schuldiner S.: J. Biol. Chem. 269, 26 274 (1994).
12. Pinner E., Padan E., Schuldiner S.: FEBS Lett. 365, 18 (1995).
13. Padan E., Schuldiner S.: Biochem. Biophys. Acta 1187, 206 (1994).
14. Rimon A., Gerchaman Y., Olami Y., Schuldiner S., Padan E.: J. Biol. Chem. 270, 26 813 (1995).
15. Kuroda T., Shimamoto T., Inaba K., Kayahara T., Tsuda M., Tsuchia T.: J. Biochem. (Tokyo) 115, 1162 (1995).
16. Kuroda T., Shimamoto T., Inaba K., Kayahara T., Tsuda M., Tsuchia T.: J. Biochem. (Tokyo) 116, 1030 (1995).
17. Harel-Bronstein M., Dibrov P., Olami Y., Pinner E., Schuldiner S., Padan E.: J. Biol. Chem. 270, 3816 (1995).
18. Bogachev A. V., Murtazina R. A., Shestopavlov A. I., Skulachev V. P.: Eur. J. Biochem. 232, 304 (1995).
19. Krulwich T. A., Guffanti A. A.: J. Bioenerg. Biomemb. 24, 587 (1992).
20. Krulwich T. A.: Mol. Microbiol. 75, 403 (1995).
21. Kitada M., Hashimoto M., Kudo T., Horikoshi K.: J. Bacteriol. 776, 6464 (1994).
22. Krulwich T. A.: Biochim. Biophys. Acta 726, 245 (1983).
23. Sturr M. G., Guffanti A. A., Krulwich T. A. J. Bacteriol. 176, 3111 (1994).
24. Murakami N., Konishi T.: J. Biochem. (Tokyo) 98, 897 (1985).
25. Murakami N., Konishi T.: Arch. Biochem. Biophys. 271, 515 (1989).
26. Meseguer I., Torreblanca M., Konishi T.: J. Biol. Chem. 270, 6450 (1995).
27. Unemoto T., Hayashi M.: J. Bioenerg. Biomembr. 25, 385 (1993).
28. Nakamura T., Kumano Y., Itaya E., Tsukamoto K., Tsuchia T., Unemoto T.: Biochem. Biophys. Acta 1190, 465 (1994).
29. Skulachev V. P.: A. van Leeuwenhoek 65, 271 (1994).
30. Udagava T., Unemoto T., Tokuda H.: J. Biol. Chem. 261, 2616 (1986).
31. Nakamura T., Kawasaki S., Unemoto T.: J. Gen. Microbiol. 138, 1271 (1992).
32. Strausak D., Waser M., Solioz M.: J. Biol. Chem. 268, 26 334 (1993).
33. Blaut M., Müller V., Gottschalk G.: J. Bioenerg. Biomemb. 24, 529 (1992).
34. Deppenmeier U., Müller V., Gottschalk G.: Arch. Microbiol. 165, 149 (1996).
35. Müller V., Blaut M., Gottschalk G.: Eur. J. Biochem. 162, 461 (1987).
36. Kaesler B., Schönheit P.: Eur. J. Biochem. 186, 309 (1989).
37. Rusňák P., Šmigáň P., Greksák M.: Folia Microbiol. 37, 12 (1992).
38. Schönheit P., Beimborn D. P.: Arch. Microbiol. 142, 354 (1985).
39. Müller V., Blaut M., Gottschalk G.: *Methanogenesis* (Ferry J. G. ed. str. 361. Chapman & Hall, New York, 1993).
40. Shuisong N., Boone J. E., Boone D. R.: J. Bacteriol. 176, 7274 (1994).
41. Maloney P. C.: Curr Opin Cell Biol. 6, 571 (1994).
42. Nakamura T., Kumano Y., Unemoto T.: Biochim. Biophys. Acta 1230, 170 (1995).
43. Harold F. M., Papineau D.: J. Membr. Biol. 8, 45 (1972).
44. West I., Mitchell P.: Biochem. J. 144, 87 (1974).

**A. Majerník and P. Šmigáň** (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka proDuna Slovak Republic*): **Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in Bacteria and Archaeobacteria**

Cycling of protons and Na<sup>+</sup> across bacterial membranes is connected with such vital bacterial functions as are ATP synthesis, pH and Na<sup>+</sup> homeostasis, motility, and solute transport. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter is the universal device that couples these H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> movements across bacterial membranes. The review is concerned with the new aspects of molecular biology and physiology, regulation of activity as well as expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in *E. coli*, alkalophilis, halophilis, anaerobic bacteria, and archaebacteria. The possible role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in bioenergetic processes in these microorganisms is also discussed.