

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Karolína Černá**

Biogeneze  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány eukaryotních buněk

Biogenesis of plasma-membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters of eukaryotic cells

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Olga Zimmermannová, Ph.D.

Praha, 2022

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především své školitelce, Ing. Olze Zimmermannové, Ph.D., za její nekonečnou trpělivost a pomoc při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu při studiu.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2022

Podpis:

## Abstrakt

Sekreční dráha je proces, který slouží k maturaci asi jedné třetiny proteinů vznikajících během proteosyntézy. Správné fungování každého membránového proteinu závisí na jeho efektivním přenosu do cílové membrány. Důležitou skupinou proteinů, které interagují s matujícími proteiny a zajišťují jejich průchod sekreční dráhou, jsou cargo receptory. Pomáhají vznikajícím proteinům se zainkorporovat do COPII váčků, pomocí nichž se exportují z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu. Mezi charakterizované cargo receptory patří kvasinkový Erv14. Na základě podobnosti s tímto cargo receptorem bylo identifikováno několik homologních cargo receptorů také u vyšších eukaryot, včetně člověka. Mezi membránové proteiny, které procházejí sekreční dráhou a jejichž biogeneze vyžaduje přítomnost cargo receptoru, patří  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery. Cílem této bakalářské práce je popsat mechanismus biogeneze proteinů v eukaryotních buňkách a shrnout současné poznatky o úloze cargo receptoru Erv14 a jeho lidských homologů CNIH1-4 v biogenezi transportérů monovalentních kationtů, včetně  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů.

**Klíčová slova:**  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery, Erv14, CNIH, cargo receptor, sekreční dráha

## **Abstract**

A secretory pathway is a process which serves for maturation of approximately one third of nascent polypeptides during proteosynthesis. Correct function of each membrane protein depends on their effective transport into its target membrane. An important group of proteins interacting with maturing proteins and ensuring their pass through the secretory pathway are cargo receptors. Cargo receptors help to insert nascent proteins into COPII vesicles via which they are exported from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. Erv14 belongs to characterized cargo receptors in yeast. Based on similarity with this cargo receptor several homologous cargo receptors were also identified in higher eukaryotes, including human. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters are among membrane proteins passing the secretory pathway and requiring a cargo receptor for their biogenesis. The aim of this work is to summarize knowledge of the role of Erv14 cargo receptor and its human homologs CNIH1-4 in biogenesis of monovalent cation transporters, including Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters.

**Key words:** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, Erv14, CNIH, cargo receptors, secretory pathway

## Seznam zkratek

CANX/CRT	kalnexin/kalretikulin
Cargo receptor	receptor pro náklad
CDs	cytoplasmatické domény
CNIH	protein cornichon homolog
COPI	coat proteins I
COPII	coat proteins II
Da	dalton
ER	endoplasmatické retikulum
ERAD dráha	ER-associated degradation (degradace asociovaná s ER)
ERES	ER "exit sites"
GA	Golgiho aparát
GAP	GTPase-activating protein (protein aktivující GTPázy)
GEF	guanin nucleotide exchange factor (faktor měnící nukleotid guanin)
GFP	zelený fluorescenční protein
Hsp	heat shock protein (protein tepelného šoku)
kDa	kilodalton
MP	membránový protein
PAT	Protein asociovaný s ER translokonem
PM	plasmatická membrána
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SP	signální peptid
SPC	signální peptidázový komplex
SR	receptor pro SRP
SRP	částice rozpoznávající signální sekvenci
SS můstky	disulfidické můstky
TA proteiny	Tail-Anchored proteiny
TMD	transmembránová doména
TRAPPI	Transport Protein Particle I
WT	wild-type
UPS	Ubiquitin proteasome system (ubiquitinový proteasomový systém)

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Sekreční dráha.....	2
2.1	Biogeneze proteinů v sekreční dráze .....	3
2.1.1	Ko-translační translokace .....	5
2.1.2	Post-translační translokace .....	8
2.1.3	GET-řízená translokace .....	9
2.1.4	Translokace pomocí EMC komplexu.....	10
2.2	Maturace proteinů sekreční dráhy .....	10
2.2.1	Štěpení signální sekvence.....	10
2.2.2	Glykosylace proteinů.....	11
2.2.3	Disulfidické můstky .....	12
2.3	Skládání proteinů .....	12
2.3.1	Skládání solubilních proteinů.....	12
2.3.2	Skládání membránových proteinů.....	12
2.4	Transport pomocí COPII váčků.....	13
2.4.1	Kompozice COPII váčků .....	14
2.4.2	Cesta COPII váčků ke Golgiho aparátu .....	15
3	Cargo receptory.....	18
3.1	Analýza cargo receptorů .....	18
4	Protein Erv14 .....	22
4.1	Funkce proteinu Erv14 .....	24
4.1.1	Zachování homeostáze monovalentních kationtů pomocí proteinu Erv14 .....	25
4.1.2	Vliv proteinu Erv14 na biogenezi Nha1 antiporteru .....	26
4.2	Lidské cargo receptory CNIH.....	28
4.2.1	Úloha cornichonů CNIH v buňkách.....	29
5	Závěr .....	31
	Seznam použité literatury .....	32

# 1 Úvod

K zajištění správného fungování buňky je zapotřebí nejen udržování její homeostáze, ale také kontrola správných konformací proteinů a jejich následné dopravení do určitých membránových organel (např. vakuoly) či jejich sekrece do extracelulárního prostředí. Proteiny, které cílí do dané membrány, se nazývají membránové. Buňky si vyvinuly speciální mechanismus, který se nazývá sekreční dráha (C. Barlowe et al., 2013; Sicari et al., 2019). Tomuto procesu podléhají pouze membránové proteiny nebo takové proteiny, které cílí do extracelulárního prostoru. V roce 2013 byla Randymu Schekmanovi, Thomasovi Südhofovi a Jamesovi Rothmanovi udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu právě za popis tohoto procesu (Mellman et al., 2013). Díky objevení principů mechanismu biogeneze proteinů se také poukázalo na důležitou roli endoplasmatického retikula (ER) a Golgiho aparátu (GA) v posttranslačních modifikacích a ve sbalování nově vznikajících proteinů (Sicari et al., 2019).

Transportéry jsou jedním z mnoha typů proteinů, které procházejí sekreční dráhou. Tyto membránové proteiny jsou jakýmsi komunikačním prostředkem buňky s okolím, především na úrovni toku hmoty, energie a informací. Majoritní význam pro zajištění správné funkce transportérů má jejich umístění v cílové membráně, ať už se jedná o plasmatickou membránu (PM) či membránu endosomu, vakuoly, ER nebo GA (C. Barlowe et al., 2013). Velkou rodinu transportních proteinů tvoří transportéry kationtů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) a protonů ( $\text{H}^+$ ) (Dutta et al., 2018). Správná konformace a následné dopravení proteinů transportujících monovalentní kationty do cílových membrán jsou důležité pro jejich transportní aktivitu, bez níž by nebylo možné udržovat uvnitř buněk optimální pH a koncentrace monovalentních kationtů. Při dodržení těchto podmínek je buňka schopná růst, komunikovat a množit se (Zimmermannova et al., 2019).

Nedílnou součástí sekreční dráhy jsou také proteiny, které se nazývají cargo receptory. Bylo zjištěno, že tyto proteiny hrají důležitou roli při vedení, nejen, transportních proteinů skrze sekreční dráhu (Herzig et al., 2012), ale také se podílejí na jejich správném zasazení do PM (Papouskova et al., 2021).

Tato práce shrnuje obecné znalosti o biogenezi proteinů v ER a jejich transportu do GA pomocí specializovaných transportních váčků. Konkrétněji se zabývá biogenezí  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů. Dále se věnuje úloze a významu jednoho z cargo receptorů kvasinek, Erv14, a funkci a struktuře jeho lidských homologů, cargo receptorů CNIH.

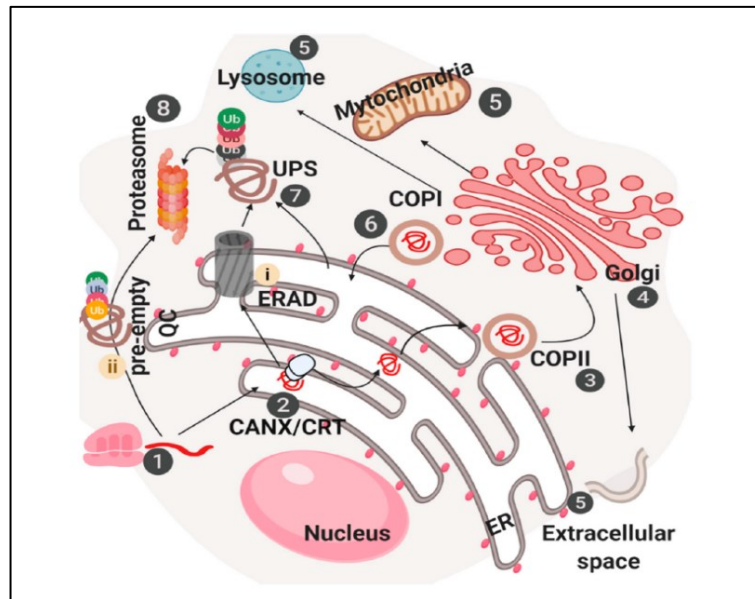
## 2 Sekreční dráha

Nové polypeptidy vznikají na ribozomech mechanismem zvaným translace. Jedná se o překlad transkripce mRNA do primární struktury nově vznikajícího proteinu. Velké množství ribozomů se volně pohybuje v cytosolu, některé ale sedí na povrchu tzv. drsného endoplasmatického retikula (Alberts, 2019). Zde, na povrchu membrány endoplasmatického retikula (ER), začíná další důležitá cesta nascentních polypeptidů. Sekreční dráha je proces, při kterém dochází ke správnému složení asi jedné třetiny buněčných proteinů (Aviram et al., 2017) a k jejich následnému dopravení do jejich cílových míst, ať už se jedná o extracelulární prostor nebo lipidové membrány organel. Maturace proteinů, které podléhají sekreční dráze, začíná v endoplasmatickém retikulu, první organelle tohoto procesu. Zde dochází ke skládání proteinů (foldingu) a post-translačním modifikacím. Maturující protein se poté přesouvá do Golgiho aparátu (GA), kde dochází k finálním úpravám a dalším post-translačním modifikacím (C. Barlowe et al., 2013; Klausner, 1989). Proteiny, jež jsou čerstvě syntetizovány v ER, a které je za potřebí poslat dál, jsou exportovány pomocí COPII váčků (**Obr. 1**). Transport proteinů z GA do ER a v rámci GA zprostředkovávají COPI váčky (**Obr. 1**) (Adolf et al., 2019).

Cílem této dráhy je, kromě přenosu proteinů do jejich konečných míst, také udržení jakési proteinové homeostáze (proteostáze), která spočívá především v kontrole kvality proteinů, které tímto procesem procházejí (Anelli et al., 2008).

Základním modelovým organismem, pomocí něhož probíhají studie nejen co se týče sekreční dráhy, ale také například již zmíněných transportních proteinů, jsou kvasinky. Nejvyužívanější kvasinkou je bezpochyby *Saccharomyces cerevisiae*. Jedná se o jednobuněčný eukaryotní organismus, jehož genom byl také první mezi eukaryoty kompletně osekvenován. Bylo charakterizováno více než 6000 genů uspořádaných v 16 chromozomech uložených v jádře (Goffeau et al., 1996). Důvodem, proč jsou kvasinky tak výborným modelovým organismem je nejen vysoká podobnost buňkám vyšších eukaryot, ale také jejich krátká generační doba a snadná manipulace (Botstein et al., 1997).



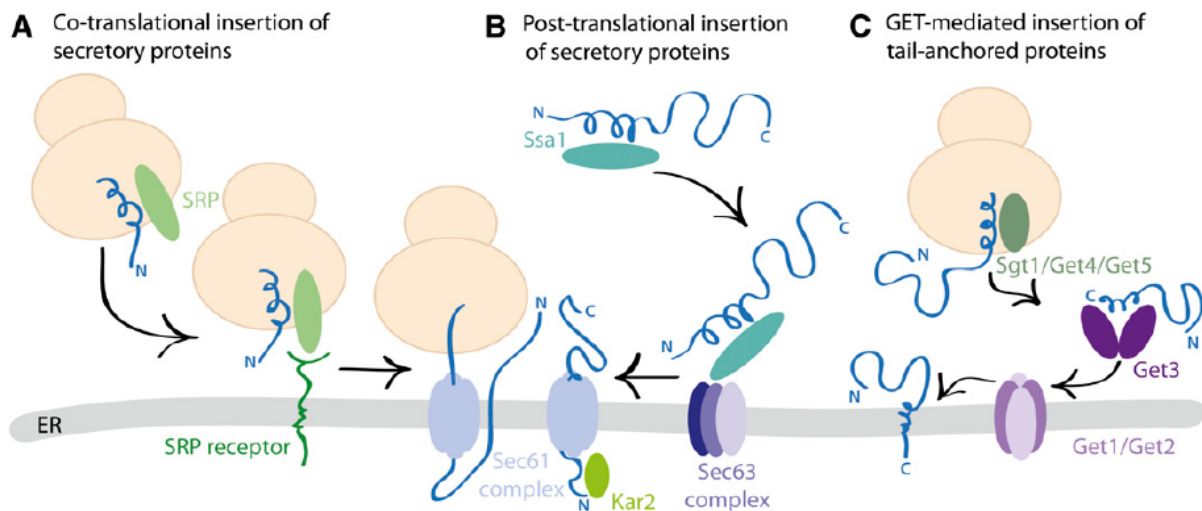


**Obr. 1: Schéma sekreční dráhy včetně mechanismů kontrolujících proteinovou homeostázu.** (1) Polypeptidové řetězce, které dokončí ribozomální translaci, jsou přemístěny do lumen ER (2), kde se nachází několik kontrolních mechanismů (CANX/CRT), které zajistí maturaci a správné složení. Maturované řetězce ústí do COPII váčků (3), které zajistí přesun polypeptidů do GA (4). Zde se podobně jako v lumen ER nacházejí kontrolní mechanismy, které dokončí maturaci peptidů. Ty se poté mohou translokovat do různých cílových míst (5). Retrográdním transportem se zpět do ER vrací pomocí COPI váčků nematurované či špatně složené proteiny (6). Tyto proteiny, které neprošly kontrolními body v ER a GA, se přesouvají pomocí ERAD dráhy zpět do cytosolu (i). Tam jsou dále označeny ubiquitinem v UPS systému (7) a degradovány v proteasomu (8). Proteiny je možné degradovat přímo v lumen ER. Procházejí tzv. pre-empty quality control, která kontroluje maturující proteiny před opuštěním ER (ii) (převzato ze (Sicari et al., 2019)).

## 2.1 Biogeneze proteinů v sekreční dráze

Translokace polypeptidového řetězce syntetizovaného na ribozomech je první krok, kterým začíná biogeneze proteinů podléhajících sekreční dráze. Je řízená hydrofobní signální sekvencí, která může být například transmembránová nebo lokalizovaná na N-konci polypeptidu. Do sekreční dráhy vstupují dva druhy proteinů. Prvním jsou proteiny rozpustné ve vodě, které jsou po transportu skrze membránu ER uvolněny do jeho lumen. Druhým typem jsou transmembránové proteiny, které lze dále rozdělit na membránové proteiny s jednou transmembránovou doménou a s více transmembránovými doménami. Tyto proteiny se následně začleňují přímo do membrány ER, membrány jiné organely nebo do plasmatické membrány (Alberts, 2019). Podle toho, o jaký typ proteinu se jedná (solubilní, membránový),

jsou polypeptidy naváděny k membráně ER rozličnými způsoby a dále také translokovány do ER lumen odlišnými mechanismy (**Obr. 2**).



**Obr. 2: Typy translokací proteinů.** (A) Dráha závislá na SRP (signal recognition particle) a SR (receptor pro SRP). Je zde SRP, která je schopná rozeznat a vázat hydrofobní signální sekvenci nascentního proteinu. Po navázání dochází k cílení na SR, který sedí v membráně ER, a na níž dochází ke ko-translační translokaci proteinu do lumen ER. (B) Post-translační translokace je, podobně jako ko-translační translokace, založena na funkci Sec61 komplexu, který vytváří pór pro inserci sekrečních proteinů. Rozdíl spočívá v dopravení nově vznikajících proteinů. To je zprostředkováno pomocí Hsp70 ATPázy Ssa1 (viz kapitola 2.1.2), která udržuje proteiny v nesbaleném stavu. Protein Kar2, připojený na polypeptid, translokující se skrze Sec61 komplex, pak dále kontroluje správné sbalení polypeptidu a jeho posun do nitra ER. (C) Třetí typ translokace je zcela nezávislý na Sec61 a Sec63 komplexech a SRP částici. Touto drahou procházejí proteiny, které jsou v membráně ukotvené svým C-koncem. Translokace tohoto typu nascentních polypeptidů je závislá na komplexu Get1/Get2. Proteiny jsou naváděny k tomuto komplexu pomocí proteinu Get3 a komplexu Sgt1/Get4/Get5 (převzato z (C. Barlowe et al., 2013)).

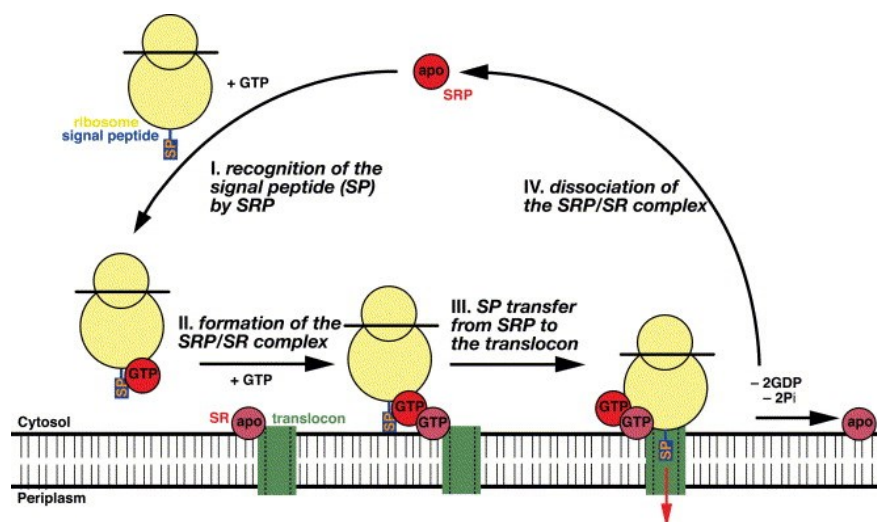
Ko-translační translokace (**Obr. 2A**) začíná právě po translaci signální sekvence pomocí ribozomu. Dochází k rozeznání signálního úseku komplexem SRP (signal recognition particle), který po vazbě na toto místo cílí na SRP receptor (SR) nacházející se v membráně ER (Ogg et al., 1998). Jedná-li se o post-translační translokaci (**Obr. 2B**), přispívají k dopravě proteinu na membránu ER pomocné proteiny (chaperony), které se podílejí na udržení proteinu ve volné, translokační formě, dokud není přítomen na membráně, odkud je pak translokován skrze lipidovou dvojvrstvu do lumen ER nebo do jeho membrány (Chirico et al., 1988). Dalším typem translokace je poté tzv. GET řízená translokace (**Obr. 2C**), pomocí níž

dochází k inzerci proteinů ukotvených C-koncem do membrány ER (Yabal et al., 2003). Existuje také translokace závislá na EMC komplexu, který zajišťuje inzerci transmembránových domén u membránových proteinů do lipidové dvojvrstvy ER (Guna et al., 2018). Řada proteinů může být rozpoznávána faktory z více než jedné translokační dráhy. Naopak pro mnoho proteinů není zatím známo, kterou translokační cestou vstupují do ER (Aviram et al., 2017).

Právě kvasinky pomohly charakterizovat tři základní komponenty, které se účastní translokací proteinů. Jedná se o geny *SEC61*, *SEC62* a *SEC63*, které kódují integrální membránové proteiny Sec61, Sec62 a Sec63. Jejich role byla objasněna pomocí selekce mutantů, kteří nesli částečné defekty v translokaci fúzního proteinu kódovaného genem *HIS4*, ke kterému byla připojena signální sekvence. U nalezených mutantů s defekty v sekreci fúzního proteinu v kmeni s histidinovou auxotrofií došlo k obnovení histidinové prototrofie, což umožnilo identifikovat odpovídající mutace v genech *SEC61-63* (Deshaies et al., 1987). Protein Sec61, který se skládá z 10 transmembránových domén, je velký 53 kDa. Jeho funkce byla identifikována také na základě podobnosti sekvence s bakteriálním translokačním proteinem SecY. Ten je součástí bakteriální sekreční dráhy typu II (Görlich et al., 1992).

### 2.1.1 Ko-translační translokace

Komplex Sec61 je součástí procesu tzv. ko-translační translokace a stejně jako u post-translační translokace (viz kapitola 2.1.2) zastává funkci translokonu, skrze který se sekreční proteiny dostávají do lumen ER nebo jsou skrze něj inzerovány do jeho membrány. Ko-translační translokace využívá jiný mechanismus navádění proteinů k membráně ER zobrazený schematicky na **obr. 3**. N-terminální hydrofobní signální sekvence nebo TMD nascentních proteinů jsou rozpoznány pomocí signal recognition particles neboli SRP (**Obr. 3-I**) (Krieg et al., 1986). Systém skládající se ze signální sekvence/TMD proteinu, SRP a receptoru pro SRP (SR) je znám ve všech třech doménách života (Archea, Bakterie, Eukaryota) (Bult et al., 1996).



**Obr. 3: Jednoduché schéma koloběhu SRP ve 4 základních krocích. (I.)** Signální peptid (SP) je navázaný na ribozomu. Jako první je translatována signální sekvence. Dochází k jejímu rozpoznání pomocí SRP. **(II.)** Vytvoří se komplex ribozom-nascentní polypeptid-SRP. Tento komplex je připraven se navázat za spotřeby GTP na SR. Je nutné, aby GTP bylo přítomno jak na SRP, tak na SR. **(III.)** Signální peptid se po vazbě SRP na SR translokují skrze translokační kanál (Sec61 – značen zeleně). **(IV.)** Hydrolýza GTP na obou složkách (SRP a SR) zajistí disociaci receptoru a rozpoznávací partikule a ribozom je uvolněn zpět do cytoplasmy (převzato z (Luirink et al., 2004)).

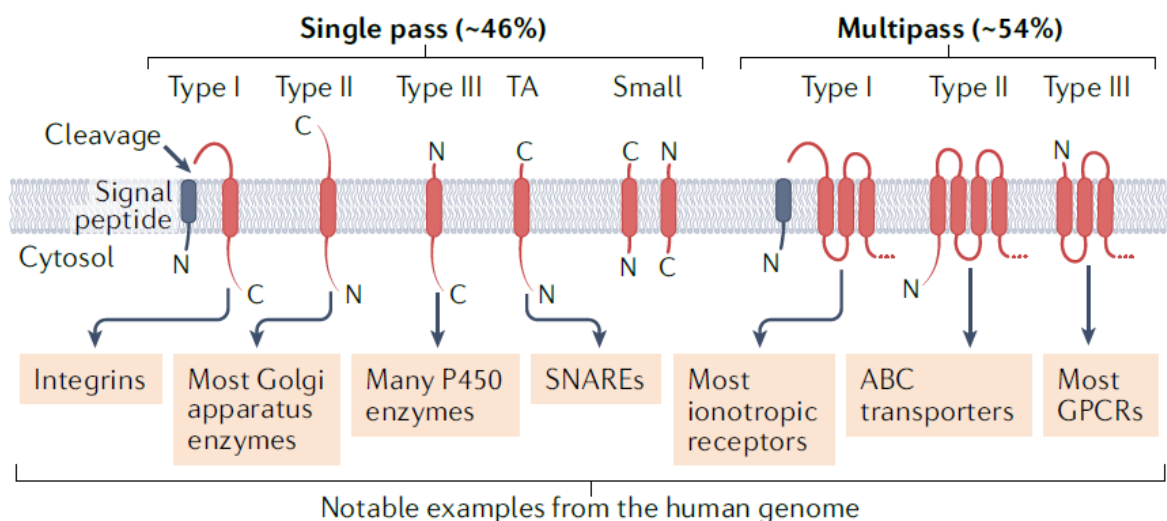
Interakce mezi SRP a jejím receptorem (**Obr. 3-II.**), který se nachází v membráně ER, je důležitým krokem při navádění komplexu ribozom-nascentní peptid k ER (Gilmore, Blobel, et al., 1982; Gilmore, Walter, et al., 1982). Mechanismus této translokace závislé na SRP je konzervovaný. Co se týče eukaryotních organismů, jsou SRP i SR složeny z několika podjednotek, jedná se tedy o multimerní proteiny. Pro snadnější analýzu jednotlivých podjednotek byly jako modelové organismy využity kvasinky (Ogg et al., 1998). SRP částice je ribonukleoprotein skládající se ze 6 podjednotek (Lutcke, 1995). Lze ji také disociovat na dvě velké domény, které se nazývají *Alu* doména a *S* doména (Gundelfinger et al., 1983). Obsahuje tzv. 7S RNA, která interaguje s jednou ze 6 podjednotek, se SRP54. Společně utvářejí komplex, který je v signální partikulí odpovědný za interakci s receptorem. Receptor je závislý na GTP a je zodpovědný za vazbu nově vznikajícího polypeptidu (Krieg et al., 1986).

Receptor pro SRP je heterodimerní protein, který se skládá ze dvou podjednotek, jež se nazývají  $SR\alpha$  a  $SR\beta$  (Tajima et al., 1986). Obě podjednotky tvoří membránové proteiny, které navzájem spolupracují a nesou GTPázovou aktivitu, díky které dochází k interakci i disociaci

komplexu ribozom-nascentní peptid-SRP s membránou ER (**Obr. 3-III., 3-IV.**) (Römisch et al., 1989).

Velice zajímavým faktem je, že u kvasinek (konkrétně *S. cerevisiae*) není dráha závislá na SRP esenciální. Může dojít k delecí některých podjednotek SRP, a i přesto jsou buňky stále životaschopné, dochází u nich pouze k pomalejšímu růstu (C. Barlowe et al., 2013). To značí, že kvasinky jsou do jisté míry schopné tolerovat úplnou ztrátu SRP nebo její většinu. Dráha SRP tedy není pro fungování buňky nezbytná a sekreční proteiny mohou v případě defektů v dráze SRP volit post-translační transport (Hann et al., 1992; Stirling et al., 1992).

U transmembránových proteinů dochází, na rozdíl od solubilních proteinů, k inzerci TMD do membrány ER, ve které následně dochází k jejich další maturaci. TMD se skládá z hydrofobních aminokyselin a při procesu jejího zanoření do membrány je uvolňována energie (White et al., 1999; Wimley et al., 1996). Jak již bylo řečeno, membránové proteiny se rozlišují na dvě skupiny podle počtu TMD, což znázorňuje **obr. 4**.



**Obr. 4: Rozdělení membránových proteinů v závislosti na počtu jejich TMD.** Na obrázku jsou znázorněné dvě skupiny membránových proteinů. První jsou tzv. "single-pass" membránové proteiny s jednou TMD. Tato skupina se dá dále rozčlenit na několik typů polypeptidů dle jejich orientace v membráně. Druhou skupinou jsou "multi-pass" membránové proteiny složené z více TMD procházejících membránou. Podobně jako "single-pass" MP se také člení na několik podskupin. V červených rámečcích jsou uvedeny příklady skupin lidských membránových proteinů (převzato z (Hegde et al., 2022)).

První skupinou jsou proteiny mající pouze jednu TMD, která prochází membránou ER (**Obr. 4**). V rámci této skupiny je pak dále možné proteiny rozdělit dle jejich orientace

v lipidové dvojvrstvě. Hydrofobní TMD může být do membrány zanořena několika způsoby. Jeden způsob se týká skupiny membránových proteinů, které dostaly souhrnné označení membránové proteiny I. typu (MP I. typu). Dochází nejprve k protažení signálního peptidu skrze pór Sec61 před tím, než je TMD odhalena z ribozomu. Poté je TMD přesunuta do póru Sec61 translokou (Hessa et al., 2005). Tyto proteiny jsou po odštěpení signální sekvence orientovány svým N-koncem do lumen ER a někdy jsou označovány jako  $N_{\text{exo}}$ .

Druhá skupina membránových proteinů s jednou TMD nese označení membránové proteiny II. typu. U těchto membránových proteinů naopak dochází nejprve k inzerci TMD skrze Sec61. Jsou proto také nazývané  $N_{\text{cyt}}$ , jelikož jejich N-konec směřuje do cytosolu (Spiess et al., 1986). Existují také membránové proteiny III. typu. Jsou typické tím, že obsahují krátký N-konec skládající se z méně než 50 aminokyselin. Jejich orientace v membráně je ale stejná, jako MP I. typu, N-konec směřuje do lumen ER (shrnuto v (Hegde et al., 2022)). Dále pak do proteinů s jednou TMD patří také proteiny ukotvené v membráně svým C-koncem ("tail-anchored" proteiny) (viz kapitoly 2.1.3 a 2.1.4) (Yabal et al., 2003).

Membránové proteiny, u nichž se nachází v membráně více TMD, se dají také rozdělit na několik podskupin (**Obr. 4**). Podskupiny těchto "multi-pass" membránových proteinů můžeme nazvat podobně jako "single-pass" MP. Na základě orientace N- a C- konců se rozdělují na tři typy: typ I, II a III (**Obr. 4**). Jediný rozdíl je pochopitelně v počtu TMD procházejících membránou. K translokaci těchto "multi-pass" membránových proteinů do lipidové dvojvrstvy ER dochází obdobně pomocí translokou Sec61 (McGilvray et al., 2020). Do této velké skupiny membránových proteinů patří také  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery (Landau et al., 2007).

### 2.1.2 Post-translační translokace

Jak již bylo řečeno, v post-translační translokaci se uplatňují v dopravě nově vznikajících proteinů na membránu ER chaperony. Jedním z hlavních chaperonů, který plní svou funkci nejen v sekreční dráze, ale také v udržování proteostáze, je tzv. heat shock protein 70 (Hsp70) neboli protein tepelného šoku 70. Má klíčovou roli ve správném složení proteinů, dále v kontrole a inhibici agregace špatně sbalených proteinů a v jejich následné degradaci (Chiang et al., 1989). Do této skupiny proteinů také patří například Hsp90 nebo Hsp40. Protein Hsp40 působí jako tzv. ko-chaperon a vazbou na Hsp70 napomáhá regulovat aktivitu Hsp90 (Kampinga et al., 2019). Protein Hsp70 má ATPázovou aktivitu a v kvasinkách je kódován geny *SSA1-SSA4*. Úloha cytosolické ATPázy Hsp70 byla odhalena díky kvasinkovému kmenu *ssa1*, který měl deletované geny *SSA1-4*. V tomto kmeni nastala

akumulace nesbalených sekrečních proteinů, čímž se prokázala klíčová role proteinu Hsp70 (Deshaies et al., 1988).

Již zmíněný ko-chaperon Hsp40, kromě regulace aktivity Hsp90, stimuluje ATPázovou aktivitu právě proteinu Hsp70. V kvasinkách je Hsp40 kódovaný genem *YDJ1* a ve spolupráci s již zmíněnou ATPázou Hsp70 se účastní translokace proteinů do ER (Caplan et al., 1992). *Ydj1* obsahuje hydrofobní kapsu, která tvoří ideální místo pro vazbu nesbalených proteinů. Do této hydrofobní kapsy velmi dobře zapadají leucinové zbytky proteinů, které poté prezentuje proteinům Hsp70 (Li et al., 2003). Proteiny Hsp70 a Hsp40 hrají bezpochyby klíčovou roli při přepravě proteinů k membráně ER v post-translační translokaci. Hlavním proteinem, který zajišťuje inzerci proteinů skrze membránu ER je protein Sec61, který je dále asociovaný s komplexem Sec63. Ten se skládá ze 4 podjednotek Sec62, Sec63, Sec71 a Sec72 (Deshaies et al., 1991). Savčí SEC61 obsahuje tři podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , kde podjednotky  $\alpha$  a  $\gamma$  tvoří esenciální složku komplexu SEC61 (Van den Berg et al., 2004). Pomocí proteolipozomů sloužících pro analýzu membránových proteinů, bylo charakterizováno 7 polypeptidů, jejichž vzájemná interakce stačí pro zprostředkování post-translační translokace (Lajoie et al., 2012; Panzner et al., 1995).

### 2.1.3 GET-řízená translokace

GET dráha (Guide Entry of Tail-anchored proteins) je SRP a Sec61 nezávislý proces, který se týká proteinů, jejichž jsou svým C-koncem ukotveny v membráně (**Obr. 2C**) (Yabal et al., 2003). Kvůli tomuto typu ukotvení dostaly název tail-anchored proteiny ("ocasem ukotvené" proteiny; TA) (**Obr. 4**). Tato dráha je nejlépe prostudovaná a charakterizovaná, co se týče proteinů a mechanismů, které v ní probíhají, na kvasinkách (Mateja et al., 2018). Homologie této dráhy v savčích buňkách se nazývá TRC dráha (Transmembrane Recognition Complex) (Akahane et al., 2013).

Proteiny, které jsou translokované GET dráhou do lumen ER, mají důležitou esenciální roli v mnoha buněčných procesech. Patří mezi ně například SNARE proteiny (uplatňují se ve fúzi váčků) (viz kapitola 2.4.2), proteiny navozující apoptózu (členové Bcl-2 rodiny) (Funk et al., 2020), anebo již zmíněné translokony (Sec61 $\beta\gamma$ ) (Kalbfleisch et al., 2007).

V tomto třetím typu inserce sekrečních proteinů bylo u kvasinek charakterizováno šest proteinů, Get1-5 a protein Stg2 (Jonikas et al., 2009; Schuldiner et al., 2005). Nejdůležitějším proteinem je protein Get3, který je hlavní transportní složkou pro nově vzniklý polypeptid. Jeho savčím homologem je ATPáza TRC40. Get3/TRC40 umožňují vazbu proteinu a jeho následné uvolnění pomocí konformačních změn (Bozkurt et al., 2009; Mateja et al., 2009). Na

tento páteřní protein Get3 je nový polypeptid naložen pomocí subkomplexu Sgt2/Get4/Get5. Komplex nového proteinu a Get3 pak interaguje za přítomnosti ATP s tzv. cytoplasmatickými doménami (CDs) membránového komplexu Get1/Get2 (u savců komplex WRB/CAML) (**Obr. 2C**), který sedí v membráně ER (Yamamoto et al., 2012). Nejprve dochází k asociaci CD (úsek cca 100 aminokyselin) proteinu Get2 s komplexem Get3/TA a k jeho vychycení z cytoplasmy. Dále přichází do hry CD proteinu Get1. Vazba této CD způsobí hydrolýzu ATP, dojde tím k narušení vazebného místa a umožní se uvolnění TA z Get3 (Wereszczynski et al., 2012). Prozatím je kvůli neobjasněné struktuře komplexu Get1/Get2 (WRB/CAML) neznámý mechanismus, jak Get1/Get2 funguje jakožto membránová inzertáza. Tento komplex je ale minimální potřebnou složkou, která zprostředkovává inserci TA proteinu do membrány ER (Vilardi et al., 2014; Zalisko et al., 2017).

#### **2.1.4 Translokace pomocí EMC komplexu**

V post-translační translokaci zajišťuje inserci řady MP také tzv. ER membránový komplex (EMC), který je konzervovaný od kvasinek až po člověka. Je to obrovský komplex tvořený z 8-9 podjednotek (v závislosti na organismu) (Chitwood et al., 2019). Přes EMC a ve spolupráci s translokonem Sec61 jsou do membrány vloženy také některé TA proteiny (Chitwood et al., 2020), které nevyužívají GET dráhu (kapitola 2.1.3) kvůli své nízké hydrofobicitě (Guna et al., 2018). Někdy jsou tyto TA proteiny souhrnně označovány jako membránové proteiny IV. typu (**Obr. 4**). TMD nesoucí informaci ohledně integrace do cílové membrány je odhalena už v cytoplasmě a pomocí post-translačních rozpoznávacích mechanismů je poté protein cílen k membráně ER (shrnutí v (Borgese et al., 2019)). Pomocí EMC mohou být do membrány ER také vkládány proteiny s více TMD, které mají hydrofilní N-konec kratší než 50 aminokyselin (“multi-pass“ membránové proteiny III. typu) (**Obr. 4**).

## **2.2 Maturace proteinů sekreční dráhy**

K maturaci proteinů sekreční dráhy dochází před tím, než jsou transportovány pomocí COPII váčků skrze ER do GA. Jedná se o sled několika dějů, které na sebe navazují a navzájem se doplňují. V následujících kapitolách se podíváme na tři nejdůležitější.

### **2.2.1 Štěpení signální sekvence**

N-terminální signální sekvence nově vznikajících sekrečních proteinů slouží jako rozpoznávací znamení, díky kterému jsou tyto proteiny cíleny do membrány ER (Krieg et al., 1986). Tuto signální sekvenci nesou bezpochyby všechny rozpustné proteiny podléhající



sekreční dráze. Ne u všech membránových proteinů musí být tato hydrofobní rozpoznávací sekvence součástí řetězce. Mezi typické membránové proteiny obsahující signální sekvenci patří například integriny nebo většina ionotropních receptorů (**Obr.4**). Během translokace dochází k odstraňování této signální sekvence pomocí tzv. signálního peptidázového komplexu (SPC). Ten štěpí endoproteolyticky (uvnitř) nascentní peptid ve specifickém místě, když dochází k jeho soukání skrze Sec61 translokon (C. Barlowe et al., 2013). SPC je složitý komplex skládající se z několika subjednotek. Je tvořen 4 na sebe navazujícími polypeptidy, které jsou kódovány (v případě kvasinek) geny *SPC1-3* a *SEC11* (YaDeau et al., 1991). Důležité pro štěpení signální sekvence jsou subjednotky Spc3 a Sec11. Sec11 nese hlavní proteolytickou aktivitu a společně se Spc3 sedí v membráně ER. Tyto dva polypeptidy se nacházejí v blízkosti translokonu Sec61 (Bohni et al., 1988; Meyer et al., 1997). Za přímý kontakt SPC s translokonem Sec61, konkrétně s jeho subjednotkou Sbh1, ale zodpovídá podjednotka SPC Spc2 (Antonin et al., 2000).

### 2.2.2 Glykosylace proteinů

Po odštěpení signální sekvence podléhají proteiny sekreční dráhy procesu glykosylace. Jedná se tedy o další krok v maturaci proteinů sekreční dráhy a dělí se na N-vázanou glykosylaci nebo O-vázanou glykosylaci. Dochází k přidávání základních oligosacharidů (glukóza, manóza, galaktóza, ...) na translokovaný protein, který má již odštěpenou signální sekvenci. K vazbě těchto oligosacharidů dochází ve specifických konsenzuálních motivech Asn-X-Ser/Thr prostřednictvím enzymu oligosacharyltransferázy (OST). OST je hetero-oligomerní komplex skládající se z 8 integrálních proteinů (Ost1, Ost2, Ost3/Ost6, Ost4, Ost5, Stt3, Wbp1 a Swp1 u kvasinek; riboforin I, DAD1, N33/IAP, OST4, STT3A/STT3B, Ost48, a riboforin II u savčích buněk) (Karaoglu et al., 1997). Některé z proteinů procházejících sekreční dráhou podléhají také O-vázané glykosylaci. Při O-glykosylaci dochází k připojování mannózových zbytků na sekvence obsahující aminokyseliny Ser/Thr. Sacharidové zbytky jsou kovalentně připojovány pomocí speciálního enzymu dolichol-fosfát mannosyltransferázy (v *S. cerevisiae* Pmt1-7), který slouží jako donor těchto zbytků (Orlean, 1990).

Endoplasmatické retikulum však není jedinou organelou, kde dochází ke glykosylaci proteinů. Hlavním místem glykosylace je bezpochyby Golgiho aparát (Welch et al., 2019). Existuje dokonce i pár typů O-glykosylace, které začínají například v buněčném jádře (Cejas et al., 2019).

### 2.2.3 Disulfidické můstky

Tvorba disulfidických můstků (SS můstky) mezi SH skupinami cysteinových zbytků u nově vznikajících proteinů je jedním z důležitých kroků, které zajišťují proteinovou stabilitu, tvar a funkci (Creighton, 1986). Za jejich tvorbu jsou odpovědné enzymy, které se nazývají disulfidové izomerázy. Tyto enzymy v sobě nesou doménu, která katalyzuje tvorbu, redukci a izomerizaci disulfidických vazeb, čímž velmi usnadní skládání proteinů v lumen ER (L. Wang et al., 2021). Esenciálním proteinem v kvasinkách, který uskutečňuje tvorbu disulfidických vazeb v sekrečních i membránových proteinech, je protein Pdi1 (protein disulfide isomerase I) (Laboissiere et al., 1995). Pdi1 spolupracuje s proteinem Ero1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin I), předává si s ním a s nově vznikajícím polypeptidem elektrony a tvoří tak hlavní dráhu pro vznik nových SS můstků (Tu et al., 2002).

## 2.3 Skládání proteinů

Skládání proteinů (tzv. folding) je dalším důležitým krokem v jejich biogenezi. Je nutné opět připomenout, že folding nově vznikajících polypeptidů se liší pro rozpustné a membránové proteiny.

### 2.3.1 Skládání solubilních proteinů

Ke skládání nově vznikajících proteinů dochází v lumen ER. Folding polypeptidů, které jsou rozpustné, má na svědomí především systém Hsp70 ATPáz (viz kapitola 2.1.2). Tyto ATPázy volně hydrolyzují ATP při vazbě na hydrofobní úseky nesbalených proteinů a usnadňují tím tak jejich skládání. Hsp70 váže hydrofobní oblasti nesbaleného proteinu do té doby, dokud se neuvolní ADP (Bukau et al., 1998). Dalším významným proteinem podílejícím se na proteinovém foldingu je člen rodiny Hsp70, který byl již zmíněný v souvislosti s post-translační translokací (**Obr. 2B**). Jedná se o protein Kar2 (Kohno et al., 1993). Jeho jedinou funkcí ale není jen pomoc při hledání správné konformace proteinu, ale hraje také roli v ER-asociovaných degradačních drahách (ERAD dráhy). V tomto degradačním procesu se likvidují špatně sbalené proteiny, které by jinak narušovali homeostázi uvnitř buňky (Nishikawa et al., 2001).

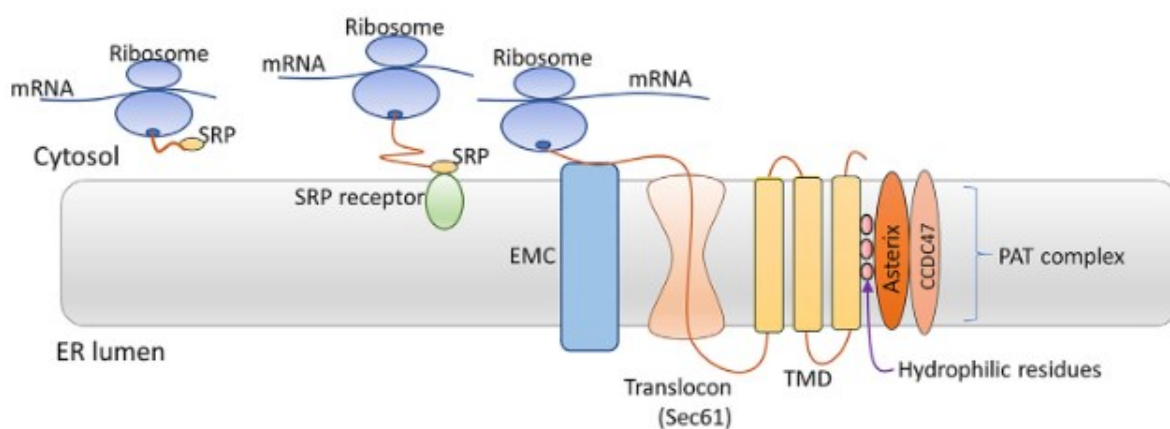
### 2.3.2 Skládání membránových proteinů

Skládání membránových proteinů je oproti solubilním poněkud složitější. Membránové proteiny se dále také dělí podle toho, kolik jejich TMD prochází membránou ER či jiné organely. Jsou to tedy proteiny zakotvené v lipidické dvojvrstvě jednou TMD nebo více než jednou TMD (**Obr. 4**). Proteiny mající v membráně pouze jednu TMD jsou obecně více hydrofobní než proteiny, u kterých membránou prochází více TMD (Hessa et al., 2007). Mezi

transmembránové proteiny, které obsahují více TMD v membráně, patří řada transportérů, jež obsahují uvnitř TMD i katalytická místa složená z polárních nebo nabitých aminokyselin.

V souvislosti s foldingem MP byl nedávno v lidských buňkách objeven chaperonový komplex, jehož prvotní název zněl "PAT10" (Protein Associated with ER Translokation of 10 kDa) kvůli jeho interakci se Sec61 translokonem. Později bylo zjištěno, že se tento chaperon skládá ze dvou jednotek, které úzce spolupracují, proteinů Asterix a CCDC47 (**Obr. 5**) (Chitwood et al., 2020).

Z experimentů prováděných ohledně zjištění funkce PAT komplexu je patrné, že TMD proteinů, které podléhají foldingu, nesou velké množství hydrofilních aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou pravděpodobně nezbytné pro připojení PAT komplexu k substrátu (**Obr. 5**) (Chitwood et al., 2020). Tento fakt je vlastně analogií pro chaperony, které se nenacházejí v membránách, ale pohybují se volně v cytosolu. Tyto chaperony (např. Hsp70) preferují naopak hydrofobní rezidua, která jsou substráty vystavena do vodného prostředí (Doring et al., 2017). PAT, jakožto intramembránový chaperon, má v organismu důležitou roli. Jakmile dojde k poruše či ke ztrátě jedné z jednotek (CCDC47 nebo Asterix), buňka je vystavena stresu, který je způsoben hromaděním špatně sbalených MP (Morimoto et al., 2018).



**Obr. 5: PAT komplex a biogeneze membránového proteinu.** Schéma znázorňuje translokaci MP pomocí SRP dráhy. Po navázání komplexu ribozom-nascentní peptid-SRP na SR, dochází k translokaci peptidu skrze translokon Sec61 ve spolupráci s EMC insertázou (viz kapitola 2.1.4). Část PAT komplexu, CCDC47, stabilizuje komplex, zatímco Asterix kontroluje skládání proteinových TMD a kryje hydrofilní zbytky v ER membráně. PAT komplex zůstává připojený k peptidu a kontroluje jeho sbalení i po odvázání ribozomu (převzato z (Pathinayake et al., 2020)).

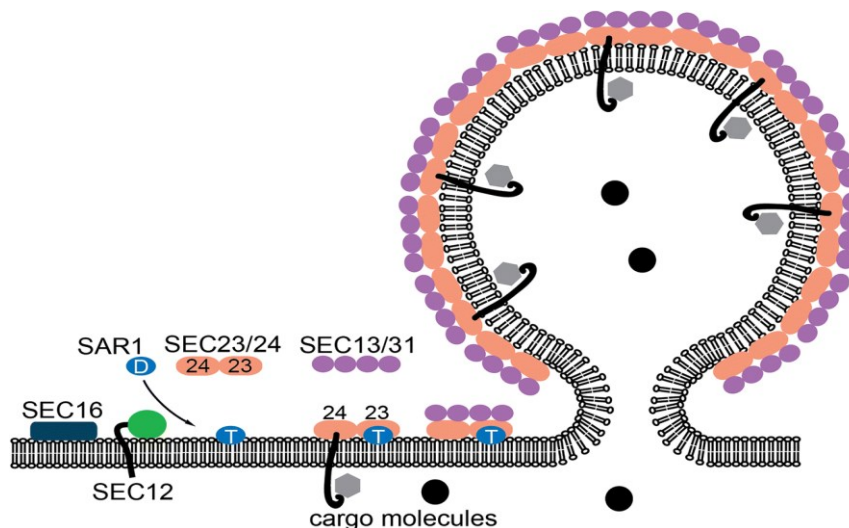
## 2.4 Transport pomocí COPII váčků

Vezikulární transport je dalším velmi důležitým krokem celého procesu sekreční dráhy. Tento transport zajišťuje putování proteinu z ER přes GA do cílové destinace, kterou je např.

plasmatická membrána. Tato doprava ER-to-Golgi je umožněna díky speciálním váčkům, tvořených lipidovou dvojvrstvou a proteiny, které dostaly název COPII (coat proteins II) (Alberts, 2019). COPII váčky poprvé charakterizoval roku 1994 tým Randyho Schekmana na modelové kvasince *S. cerevisiae* pomocí genetických a biochemických metod (C. Barlowe, 2020).

#### 2.4.1 Kompozice COPII váčků

Struktura a složení transportních váčků je v kvasinkách esenciální a také je konzervovaná u všech eukaryotních organismů (Kaiser et al., 1990). COPII váček je, co se týče proteinů, složitý komplex skládající se z několika komponent (**Obr. 6**). Jeho hlavní součástí je malá cytosolická GTPáza Sar1 a dále pak dva heterodimerické komplexy Sec23/Sec24 a Sec13/Sec31 (Russell et al., 2010). Pučení COPII váčku je aktivováno výměnou GTP místo GDP na Sar1 pomocí ER membránového proteinu Sec12 (guanin nucleotide exchange factor, GEF) (**Obr. 6**) (Yoshihisa et al., 1993).



**Obr. 6: Kompozice COPII váčku.** Sar1-GDP (D) je přeměněno na Sar1-GTP (T) pomocí proteinu Sec12. Sar1-GTP postupně navazuje komplexy Sec23/Sec24 a Sec13/Sec31 k výstupním místům ER. Dochází k polymerizaci komplexu Sec13/31, čímž se usnadňuje odškrcení COPII váčku (převzato z (Lu et al., 2020)).

Sar1 s GTP (**Obr. 6-T**) je pevně ukotvený v membráně a zprostředkovává vazbu komplexů Sec23/Sec24 a Sec13/Sec31 (C. Barlowe et al., 1993). Komplex Sec13/Sec31 je poté schopen ohnout membránu a polymerovat jednotky pláště do tvaru váčku. Protein Sec23 je tzv. protein aktivující GTPázu (GTPase-activating protein, GAP) pro protein Sar1, s nímž

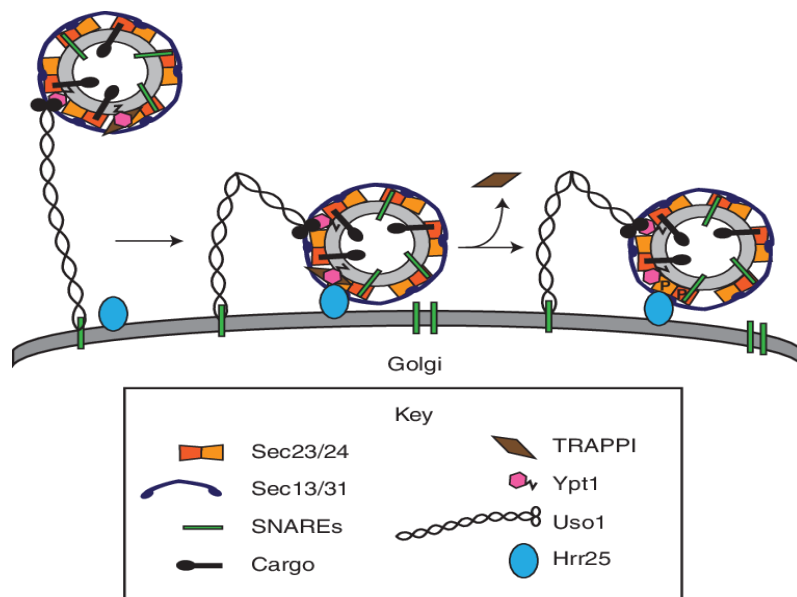
interaguje skrze své argininové zbytky (Yoshihisa et al., 1993). Druhý člen komplexu Sec23/Sec24, Sec24, se naopak stará o vázání nákladu (transportovaného proteinu) (Mossessova et al., 2003). Tímto způsobem vzniká jakýsi systém proteinů Sar1/Sec23/Sec24, který formuje prvotně pučící váček. Na Sar1/Sec23/Sec24 se dále napojí komplex proteinů Sec13/Sec31 (Townley et al., 2008). Obal váčku by se tedy dal rozdělit na dvě jakési vrstvy. "Vnitřní" vrstva skládající se ze systému Sar1/Sec23/Sec24, která váže náklad a je v těsném kontaktu s hlavními lipidy membrány ER. A dále pak "vnější" vrstva tvořená komplexem Sec13/Sec31 (Antonny et al., 2001).

#### 2.4.2 Cesta COPII váčků ke Golgiho aparátu

Naprosto fenomenální vlastností COPII váčků je také jejich schopnost vázat nepřeborné množství různých druhů nákladů. Tento jev je zprostředkován pomocí již zmíněné podjednotky komplexu Sec23/Sec24, Sec24. Tento protein je zodpovědný za vazbu nákladu a nachází se v buňkách v několika isoformách (McCaughey et al., 2018). Jen v lidských buňkách jsou známy 4 isoformy (Wendeler et al., 2007). Díky tomu Sec24 interaguje s několika různými cargo receptory pro několik různých nákladů (Pagant et al., 2015). Třídění nákladu závisí tedy na tom, jaký typ cargo receptoru se nachází na proteinu Sec24 (Miller et al., 2002). U membránových proteinů jsou rozpoznávány především jejich TMD. O složitosti rozpoznání TMD cargo receptorem svědčí nedávné studie o biogenezi antiporteru Nha1 kvasinky *S. cerevisiae*. Bylo zjištěno, že pro jeho rozpoznání cargo receptorem Erv14 jsou důležité nejen jeho TMD (Herzig et al., 2012; Rosas-Santiago et al., 2016), ale také jeho cytosolická část (viz kapitola 4.1.2) (Papouskova et al., 2021).

Samotná tvorba váčku není náhodná, co se týče jeho pučení z membrány ER. Membrána ER obsahuje specifická místa, ve kterých dochází k formaci váčků. Tato místa se nazývají ER "exit sites" (ERES) (**Obr. 6**). ERES jsou označeny speciálním proteinem, který se nazývá Sec16 a v jeho blízkosti vždy začíná pučení COPII váčků (Hughes et al., 2009). GEF Sec12 se váže na Sec16 ohraničující ERES a zprostředkovává již výše zmíněnou výměnu GTP místo GDP na proteinu Sar1. Tímto mechanismem se tak zvyšuje koncentrace proteinu Sar1-GTP v okolí ERES a dochází k vazbě komplexů Sec23/Sec24 a Sec13/Sec31 (Montegna et al., 2012). K finálnímu uvolnění váčku dochází pomocí hydrolýzy GTP na proteinu Sar1 a následnému odškrcení COPII váčku od membrány ER (Sato et al., 2005).

Uvolněné váčky musí absolvovat cestu k cisternám GA. Jakmile se odpoutají od membrány ER, jsou vyvázány speciálními proteiny, které je cílí k membránám GA cisteren a kde následně dochází k jejich fúzi s lipidovou dvojvrstvou (**Obr. 7**) (C. Barlowe, 1997). V rámci tohoto cílení byla u kvasinek popsána GTPáza Ypt1 patřící do rodiny Rab (v savčích buňkách označována jako Rab1) (Jones et al., 2000). Tato GTPáza je aktivována pomocí GEF komplexu TRAPPI (Transport Protein Particle I), který je přímo navázán na protein Sec23 (Lord et al., 2011). Dojde tedy výměně k GDP za GTP a k aktivaci proteinu Ypt1. V tomto okamžiku GTPáza Ypt1 interaguje se specifickým proteinem Uso1 ukotveným v membráně GA. Ten je významný především díky své struktuře obsahující coiled-coil doménu, která z něj vytváří jakési dlouhé vyvazovací lano (Seog et al., 1994).



**Obr. 7: Navázání, cílení a fúze COPII váček s membránou GA.** Protein Sec23 váže TRAPPI komplex na povrch COPII váček. Dochází k aktivaci Ypt1, a tím i k jeho zpřístupnění pro efektor Uso1. Díky Uso1 jsou váčky COPII přitahovány k GA. Jakmile dojde k interakci váčku s membránou, TRAPPI komplex je fosforylován pomocí Hrr25 a dochází k jeho odpoutání od váčku. Pomocí Hrr25 se také fosforyluje komplex Sec23/Sec24 a začíná se uvolňovat plášť. V souvislosti s uvolňováním pláště nastává fúze váčku s membránou pomocí proteinů SNARE (převzato z (Lord et al., 2013)).

Po navázání celé mašinérie na protein Uso1 dochází na membráně GA k aktivaci serin/threoninové kinázy Hrr25 (což je kvasinkový homolog savčí kinázy CK1δ). Dojde k oddělení TRAPPI komplexu a dále se pomocí Hrr25 fosforyluje komplex Sec23/Sec24 (konkrétně protein Sec23) a začíná se pomalu uvolňovat plášť (Lord et al., 2011). Nastává fúze COPII váčku s membránou GA. Zde hrají úlohu proteiny z rodiny SNARE (**Obr. 7**).

Jedná se o vysoce konzervované proteiny, které obsahují stejnojmenný motiv skládající se z desítek opakujících se aminokyselin. Tento motiv se běžně objevuje v C-konci ukotveném v membráně (Fasshauer et al., 1998). Těmito C-konci ukotvenými v membráně GA utvářejí vždy vedle sebe čtyři sedící helixy, jež se také, podobně jako Uso1, formují do coiled-coil domén (Sutton et al., 1998). Co se týče SNARE proteinů, mohou plnit nejrůznější funkce v buňce, kde hraje roli nějaká membránová fúze. V případě COPII váčků a jejich fúze s membránou GA, byly identifikovány v kvasince *S. cerevisiae* 4 SNARE proteiny. Jedná se o proteiny Sed5, Bos1, Bet1 a Sec22 (Cao et al., 2000). Po ukončení fúze membrán díky SNARE proteinům dochází k oddělení komplexu Sed5-Bos1-Bet1-Sec22 pomocí dvou proteinů Sec17 a Sec18 (Bonifacino et al., 2004). Sec17 slouží k povolání proteinu Sec18. Sec18 je APTáza využívající energii uvolněnou z ATP hydrolyzy k rozložení Sed5-Bos1-Bet1-Sec22 komplexu (Bonifacino et al., 2004).

Nyní se cargo (náklad) nachází uvnitř GA, kde se rozhodne o jeho dalším osudu. V případě membránových proteinů a proteinů určených do extracelulárního prostředí dochází k dalšímu cílení do jejich závěrečných destinací. Retrográdím transportem jsou pomocí COPI váčků transportovány proteiny, které jsou určené do ER. Posledním typem proteinů jsou ty, jejichž funkce se uplatňuje v GA (C. Barlowe et al., 2013).

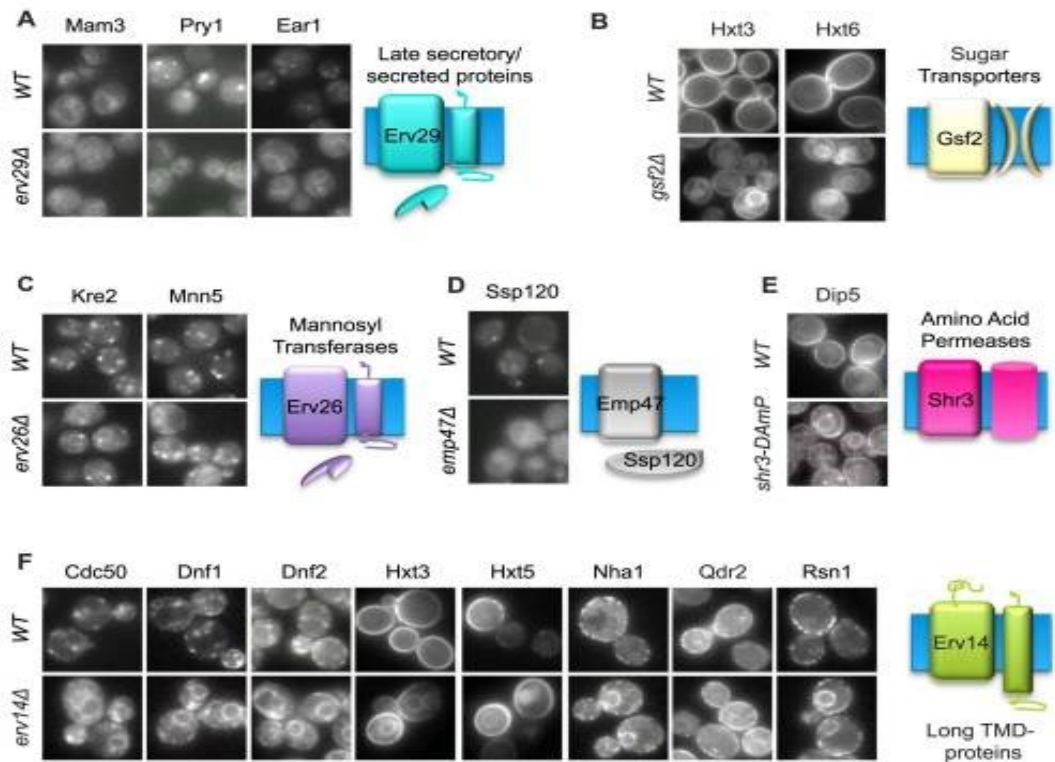
### 3 Cargo receptory

Protein transportovaný z ER do GA je v COPII váčku navázán pomocí již zmíněného proteinu Sec24 (**Obr. 7**), který je součástí proteinového dimeru Sec23/Sec24 (Chatterjee et al., 2021). Tato vazba může být přímá. Nicméně existují také proteiny, které mohou být na dimer Sec23/24 navázány nepřímo nebo prostřednictvím více interakcí, pomocí tzv. cargo receptorů. Cargo receptory jsou speciální adaptorové proteiny, které váží náklad (transportovaný protein) na dimer Sec23/Sec24 a stanou se tak součástí COPII váčku (Pagant et al., 2015; Powers et al., 2002).

#### 3.1 Analýza cargo receptorů

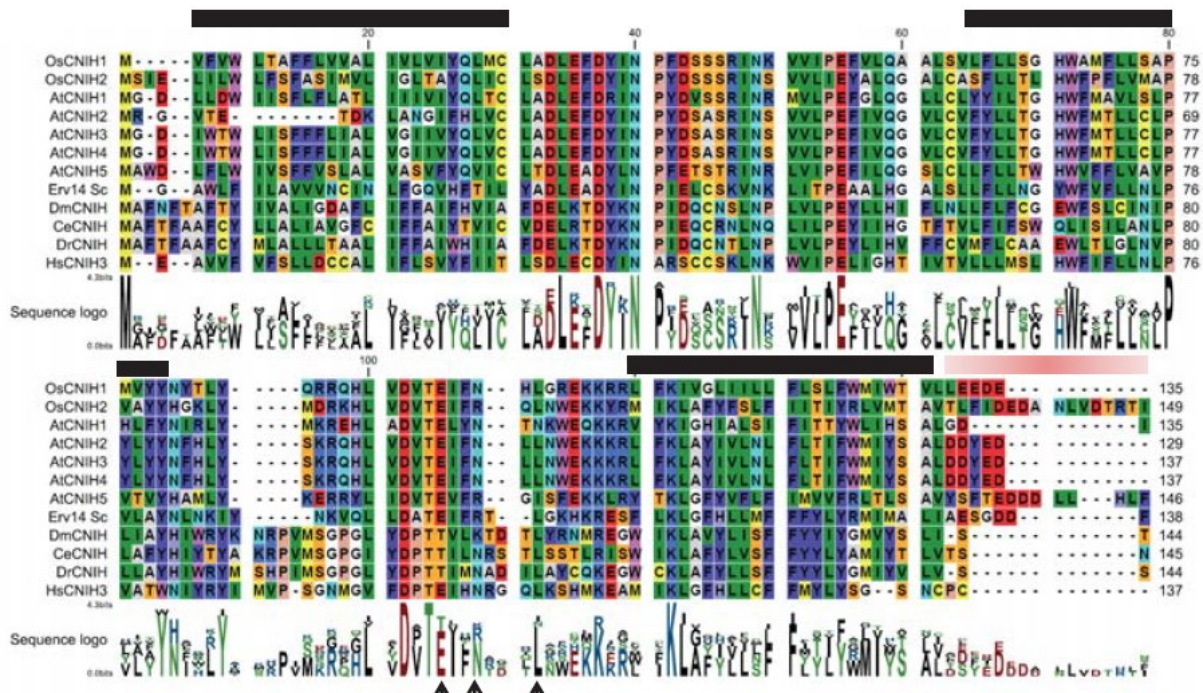
V roce 2012 přišel tým Yonatana Herziga s pozoruhodnou metodou, jak analyzovat cargo receptory a jejich příslušné náklady. Metoda dostala název "PAIRS" (pairing analysis of cargo receptors) (Herzig et al., 2012). PAIRS využívá geneticky upravené knihovny (konkrétně od kvasinky *S. cerevisiae*), kde je náklad (syntetizovaný protein) značen zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) (Cohen et al., 2011). Pomocí PAIRS je možné charakterizovat cargo a jeho příslušný cargo receptor ze dvou úhlů pohledu. Prvním způsobem je možné hledat a charakterizovat kolik různých nákladů je schopný vázat a přenášet jeden cargo receptor (**Obr. 8**). Druhý způsob naopak odhalí, jaké z proteinů podílejících se na biogenezi membránových proteinů (např. Sec24 nebo Sec31) jsou důležité pro sekreci konkrétního nákladu značeného GFP. V obou případech je možné sledovat, zda se náklad dostal úspěšně do membrány svého působení nebo zůstal zadržený v ER, pomocí fluorescenčního mikroskopu (Herzig et al., 2012).





**Obr. 8: Identifikace repertoáru proteinů (nákladů) pro dané cargo receptory pomocí PAIRS metody.** Obrázek znázorňuje lokalizaci membránových proteinů v kmenech kvasinky *S. cerevisiae* s deletovaným genem pro jeden ze šesti cargo receptorů. Jedná se o (A)  $\Delta erv29$ , (B)  $\Delta gsf2$ , (C)  $\Delta erv26$ , (D)  $\Delta emp47$ , (E) *shr3-DAmP* a (F)  $\Delta erv14$ . Lokalizace jednotlivých přepravovaných proteinů (značených GFP) v kmenech s mutacemi byla porovnávána s jejich lokalizací v kontrolním kmeni (wild-type, WT). Bylo možné sledovat, jestli nepřítomnost konkrétního cargo receptoru způsobila hromadění nákladu v ER. Z toho poté vyplynulo, jaké náklady patří k daným cargo receptorům (převzato z (Herzig et al., 2012)).

Cargo receptory patří mezi velmi konzervované proteiny. Nacházejí se nejen u kvasinek, ale také u vyšších eukaryot (rostliny, obratlovci a členovci) (**Obr. 9**) (Rosas-Santiago et al., 2015). Dosud bylo charakterizováno pouze několik cargo receptorů. Mezi nejprozkoumanější patří rodina Erv14/cornichon (viz kapitola 4). **Obr. 9** ukazuje srovnání sekvencí zástupců této rodiny cargo receptorů od kvasinek až po člověka (Rosas-Santiago et al., 2015).



**Obr. 9: Analýza sekvencí rodiny cargo receptorů Erv14/cornichon.** Porovnání sekvencí rostlinných cornichonů (*Oryza sativa* – OsCNIH1, OsCNIH2; *Arabidopsis thaliana* – AtCNIH1, AtCNIH2, AtCNIH3, AtCNIH4, AtCNIH5), kvasinkového cargo receptoru (*S. cerevisiae* – ScErv14) a cornichon homologů od členovců (*Drosophila melanogaster* – DmCNIH; *Caenorhabditis elegans* – CeCNIH), obratlovců (*Danio rerio* – DrCNIH) a savců (*Homo sapiens* – HsCNIH3). Černý panel značí transmembránové domény, červený znázorňuje kyselé domény a šipky označují konzervované zbytky, které se podílejí na vazbě na COPII v kvasinkách (převzato z (Rosas-Santiago et al., 2015)).

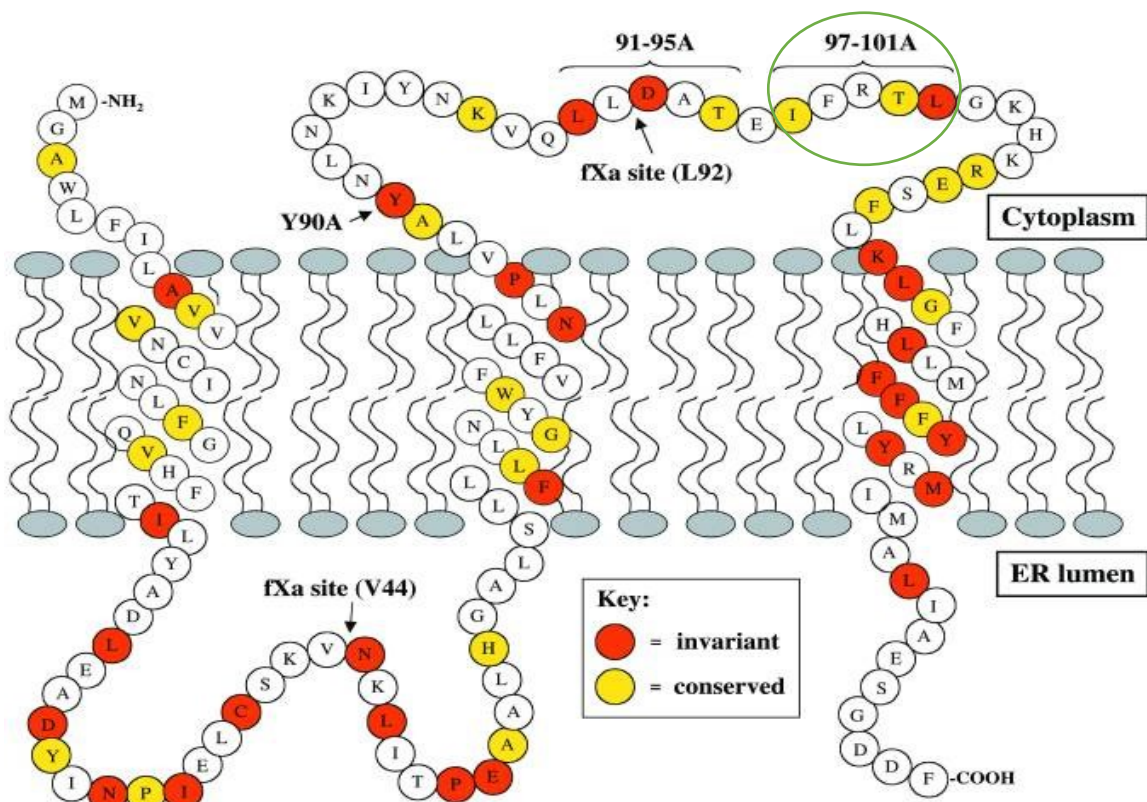
Erv14 není jediným cargo receptorem kvasinky *S. cerevisiae*. Nachází se zde například tzv. komplex p24 (Emp24-Erv25-Erp1-Erp2), který transportuje skrze sekreční dráhu GPI-proteiny (Castillon et al., 2009; Schimmöller et al., 1995). Permeázy aminokyselin jsou v kvasince *S. cerevisiae* závislé na transportu pomocí proteinu Shr3 (Herzig et al., 2012; Kuehn et al., 1996). Cargo receptor Gsf2 naopak pomáhá transportérům cukrů při jejich přepravě do cílové destinace (Sherwood et al., 2000). Další cargo receptory, které byly identifikované v této kvasince jsou uvedeny na **obr. 8**. Současné poznatky o struktuře a úloze cargo receptoru Erv14 kvasinky *S. cerevisiae* a jeho lidských homologů (proteinů CNIH) jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

Mezi další známé savčí cargo receptory patří například LMAN1 a MCFD2, které společně vytvářejí komplex. Slouží jako receptory pro koagulační faktory V a VIII či jaterní protein  $\alpha$ 1-antitrypsin (Y. Zhang et al., 2022; Zheng et al., 2010). Dalším savčím cargo

receptorem je také SURF4, který rekrutuje do COPII váčků enzymy APOB a APOA1 (apolipoprotein B, apolipoprotein A1) (X. Wang et al., 2021). V rostlinách (konkrétně *Oryza sativa*) byl charakteritován transportér  $\text{Na}^+$  *OsHKT1;3* (Jabnoune et al., 2009; Rosas-Santiago et al., 2015). Pomocí protein-protein interakcí bylo identifikováno 19 potenciálních kandidátů, které mohly ovlivňovat aktivitu *OsHKT1;3* (Rosas-Santiago et al., 2015). Jeden z nich prokazoval značnou homologii s lidským cornichonem (CNIH) (Schwenk et al., 2009) a v souladu s tím také s kvasinkovým Erv14 (Powers et al., 1998, 2002). Na základě této podobnosti byl identifikován jako *OsCNIH1* podílející se na přenosu transportéru  $\text{Na}^+$  *OsHKT1;3* z ER do endomembrány GA (Rosas-Santiago et al., 2015).

## 4 Protein Erv14

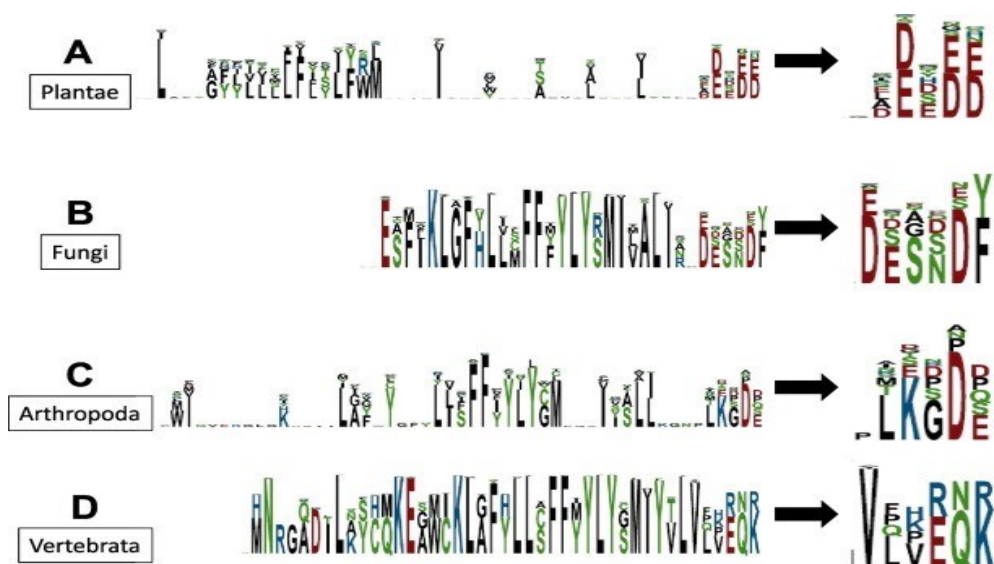
Protein Erv14 (Endoplasmatic reticulum vesicles protein 14) je cargo receptor, který tvoří součást COPII váčků, membrány ER a membrány GA. Jedná se o kvasinkový cargo receptor řadící se do rodiny Erv14 /cornichon, který byl poprvé identifikován v *S. cerevisiae* v roce 1998 (Powers et al., 1998). Gen, který kóduje protein Erv14, nese systematický název *YGL054c* a je umístěn na VII chromozomu. Jeho velikost je 14 kDa (odtud také Erv14). Erv14 je lokalizovaný v membránách, což z něj činí integrální membránový protein (Powers et al., 2002). Prvotní předpoklady ukazovaly, že obsahuje 3 TMD (Obr. 10) (Powers et al., 2002) a na základě "positive inside" pravidla (Virkki et al., 2014) bylo předpovězeno, že N-konec proteinu směřuje do cytosolu, zatímco C-konec do lumen organely (Powers et al., 1998). Tyto predikce byly později potvrzeny v několika experimentech (Powers et al., 2002).



**Obr. 10: Předpokládaná topologie proteinu Erv14.** Protein se skládá ze 3 transmembránových domén s N-koncem orientovaným do cytosolu a C-koncem do lumen organel (zde konkrétně do lumen ER). Červeně jsou pak vyznačena invariantní rezidua a žlutě zvýrazněné aminokyseliny představují konzervovaná rezidua z porovnaných sekvencí od *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *Drosophila virilis* a *Mus musculus*. V zeleném kruhu je znázorněn motiv IFRTL důležitý pro vazbu Erv14 na plášť COPII váčků (převzato z (Powers et al., 2002)).

To, jakým způsobem dochází k interakci mezi cargo receptorem Erv14 a COPII váčkem, není doposud plně objasněno (Pagant et al., 2015). Bylo však identifikováno několik aminokyselinových reziduí v molekule Erv14, které mají pro jeho funkci velmi významnou roli. Jedním z nich jsou aminokyseliny IFRTL (97-101) (**Obr. 10**), které leží v cytoplasmatické smyčce mezi druhou a třetí TMD proteinu Erv14. Jakmile byla provedená mutace v nějaké z těchto pěti aminokyselin, byl pozorován výrazný pokles ve sbalování Erv14 do pučících COPII váčků (Powers et al., 2002). Z toho vyplývá, že tento motiv je nezbytný pro interakci cargo receptoru Erv14 s COPII váčkem. Dalším důležitým motivem, zastávajícím podobnou funkci jako IFRTL, je motiv DYPE (aminokyseliny D<sub>33</sub>, Y<sub>34</sub>, P<sub>50</sub>, E<sub>51</sub>) (Pagant et al., 2015). V druhé TMD se také nacházejí aminokyseliny F<sub>62</sub>, L<sub>63</sub>, N<sub>74</sub>, které utvářejí vazebné místo pro několik nákladů proteinu Erv14 (Pagant et al., 2015).

Na C-konci rostlinných a kvasinkových homologů Erv14/cornichonů byl charakterizován specifický kyselý motiv (u rostlin aminokyseliny EDDE, u kvasinek aminokyseliny EDD) (**Obr. 11A, 11B**), který se podílí na správném cílení membránových proteinů do PM (Rosas-Santiago et al., 2017). Mutace či delece v tomto kyselém motivu rostlinného cornichonu *OsCNIH1* nebo kvasinkového cargo receptoru *ScErv14* neměla žádný vliv na jejich lokalizaci v rámci ER/GA. Nicméně delece/mutace kyselých motivů u těchto dvou cargo receptorů, exprimovaných v buňkách *S. cerevisiae*, negativně ovlivnila transport kvasinkových membránových proteinů do PM (Rosas-Santiago et al., 2017). Mezi těmito MP se nacházel také Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *Nha1*. Interakce mezi cargo receptory (*OsCNIH1*, *ScErv14*) s mutacemi/delecemi kyselého motivu a MP byly mnohem slabší než s nativními formami těchto cargo receptorů. Z toho vyplývá, že kyselý motiv, přítomný v tomto typu cargo receptoru u rostlin či kvasinek, ovlivňuje sílu interakce mezi cargo receptorem a transportovaným proteinem (Rosas-Santiago et al., 2017).



**Obr. 11: Kyselé motivy na C-koncích cornichonů.** Na obrázku je zobrazeno WebLogo posledních 60 aminokyselin C-konců homologních proteinů Erv14/cornichonů z (A) rostlin, (B) hub, (C) členovců a (D) obratlovců. Vpravo je poté zvětšeno posledních šest aminokyselin, kde jsou u rostlin a hub jasně viditelné specifické konzervované kyselé motivy. Výška písmene odpovídá míře konzervovanosti dané aminokyseliny (převzato z (Rosas-Santiago et al., 2017).

#### 4.1 Funkce proteinu Erv14

Protein Erv14 je důležitý pro sekreci membránových proteinů do membrán a ovlivňuje tak celou řadu dalších fyziologických funkcí.

Jednou z nich je například jeho vliv na axiální pučení kvasinkových buněk. V tomto typu pučení slouží jako kortikální značky proteiny Ax11 (Fujita et al., 1994), Ax12 (Roemer et al., 1996), Bud3 a Bud4 (Chant et al., 1991). Pokud byl deletován gen *ERV14* v buňkách kvasinky *S. cerevisiae*, buňky nerostly axiálním způsobem (Powers et al., 1998). Jakmile se ale do kmene vložil plasmid nesoucí funkční gen kódující Erv14, došlo opět k axiálnímu typu pučení. Vzhledem k lokalizaci proteinu Erv14 v membránách organel (ER, GA) se předpokládalo, že jeho delece tedy ovlivňuje biogenezi některého z proteinů, které jsou důležité pro axiální pučení (Powers et al., 1998). Hlubší analýzy potvrdily, že se jednalo o protein Ax12 (Powers et al., 1998).

Erv14 má také vliv na sporulaci buněk, konkrétně na tvorbu prosoporové membrány (Powers et al., 1998). Sma2 je protein, který hraje roli ve formaci a správném tvaru prosoporové membrány (Rabitsch et al., 2001). Při nadprodukci Sma2 v buňkách *S. cerevisiae*, které postrádali gen *ERV14*, došlo jen částečně ke zlepšení sporulace buněk. V opačném případě (nadprodukce Erv14 v buňkách bez Sma2) nebylo viditelné žádné zlepšení.

V buňkách bez *Erv14* byl protein *Sma2*, značený GFP, zadržován v ER. Všechny tyto výsledky značí, že protein *Erv14* má vliv na biogenezi proteinu *Sma2* (Nakanishi et al., 2007). V mechanismu sporulace byly sledovány i jiné proteiny, na jejichž lokalizaci by mohl mít *Erv14* vliv. Jednalo se o t-SNARE protein *Sso1* (Aalto et al., 1993),  $H^+$ -ATPázu *Pma1* (Serrano et al., 1986) a dityrosinový transportér *Dtr1* (Felder et al., 2002). I v případě těchto proteinů byl potvrzen vliv *Erv14* na jejich transport skrze sekreční dráhu při sporulaci (Nakanishi et al., 2007). Později bylo však zjištěno, že v exponenciální fázi růstu buněk *S. cerevisiae*, není biogeneze  $H^+$ -ATPázy *Pma1* závislá na přítomnosti *Erv14* (Zimmermannova et al., 2019).

Přítomnost cargo receptoru *Erv14* ovlivňuje také udržování homeostáze monovalentních kationtů. S tím souvisí jeho význam v regulaci vnitrobuněčného pH, udržování membránového potenciálu či tolerance k solím (Zimmermannova et al., 2019). Tyto fyziologické úlohy *Erv14* vyplývají z jeho vlivu na biogenezi několika transportérů kationtů, mezi něž patří i antiportery  $Na^+/H^+$  (Zimmermannova et al., 2019).

#### **4.1.1 Zachování homeostáze monovalentních kationtů pomocí proteinu *Erv14***

Pro zajištění správného fungování buněk je nezbytné neustálé udržování stálé hladiny monovalentních kationtů ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ). Udržování této koncentrace je v buňkách kvasinky *S. cerevisiae* zachováváno pomocí transportních systémů ležících v PM a v membránových vnitrobuněčných organelách (shrnuto v (Arino, 2010)). Pro zajištění správného fungování těchto specifických transportérů je nezbytné, aby byly správně umístěny do cílové membrány. Dosud bylo zjištěno, že je protein *Erv14* nezbytný pro cílení okolo 40 membránových proteinů skrze sekreční dráhu do jejich cílových míst (Herzig et al., 2012; Pagant et al., 2015). Několik těchto proteinů patří právě do skupin transportérů monovalentních kationtů, které zajišťují udržování optimální kationtové homeostáze (Rosas-Santiago et al., 2016; Zimmermannova et al., 2019).

Jakmile mají buňky deletovaný *Erv14*, dochází v nich k mnoha fyziologickým změnám (Nakanishi et al., 2007; Powers et al., 2002), mezi které patří také zvýšená citlivost k solím  $NaCl$  a  $KCl$  (Rosas-Santiago et al., 2016). Jedním z prvních transportérů monovalentních kationtů, na jehož biogenezi se podílí *Erv14*, byl identifikován  $Na^+/H^+$  antiporter *Nha1* v *S. cerevisiae* (Herzig et al., 2012). Nicméně, i buňky postrádající gen *ERV14* společně s *NHA1* byly více citlivé k  $NaCl$  a  $KCl$  (Rosas-Santiago et al., 2016), měly nižší vnitrobuněčné pH a vyšší membránový potenciál (Zimmermannova et al., 2019), což naznačilo, že existují i jiné transportéry monovalentních kationtů, které pro svou biogenezi potřebují právě *Erv14* (Rosas-

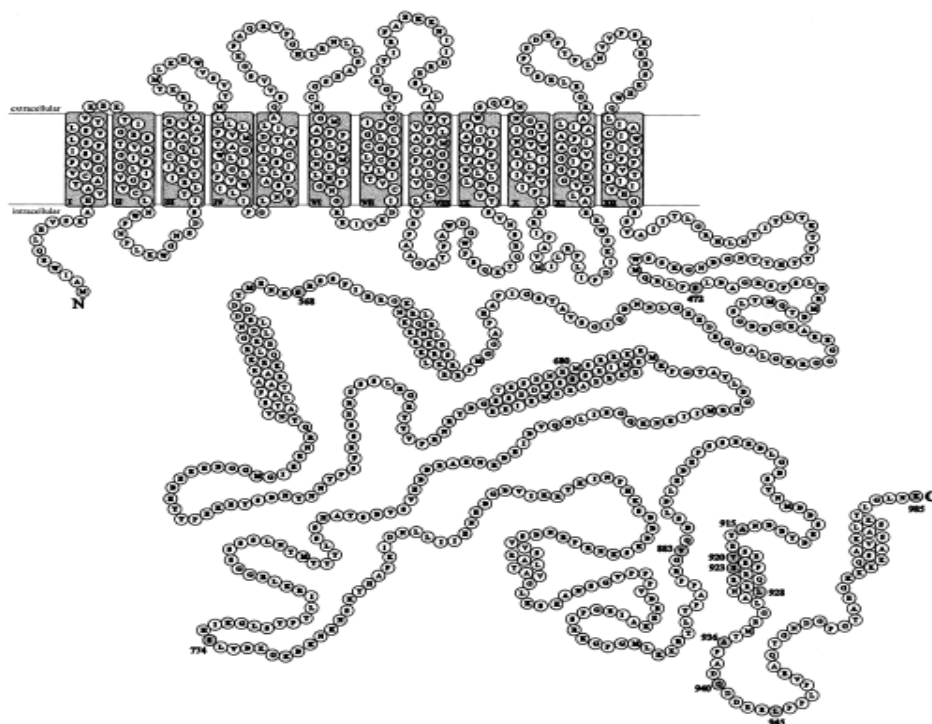
Santiago et al., 2016). Na toleranci k solím, udržování intracelulárního pH a membránového potenciálu se v kvasince *S. cerevisiae* kromě Nha1 podílí alespoň 9 dalších transportérů monovalentních kationtů. Šest z nich se nachází v PM, jsou to Trk1 a Trk2 (transportéry  $K^+$ ), Tok1 (draselný kanál), Ena ( $Na^+$ ,  $K^+/H^+$ -ATPáza), Pho89 ( $Pi-Na^+$  symportér) a Pma1 ( $H^+$ -ATPáza) (shrnut v (Arino, 2010)).

Pro zjištění nových proteinů, jejichž biogeneze závisí na Erv14, byla porovnána lokalizace šesti transportérů monovalentních kationtů (značených GFP) v kmeni s deletovaným *ERV14*, vždy vzhledem k příslušnému kontrolnímu kmeni (WT), který cargo receptor exprimoval (Zimmermannova et al., 2019). Bylo zjištěno, že kromě Nha1, také transportéry  $K^+$ , Trk1 a Tok1, patří mezi proteiny rozpoznávané cargo receptorem Erv14 (Zimmermannova et al., 2019). Pomocí imunoprecipitace a mating-based split ubiquitinačního systému (mbSUS) byla potvrzena i přímá interakce mezi Erv14 a Trk1 nebo Tok1 (Zimmermannova et al., 2019), a mezi Erv14 a Nha1 (Rosas-Santiago et al., 2016). Trk1 je hlavní importér  $K^+$  do buněk (Ko et al., 1991) a Tok1 je kanál pro  $K^+$  řízený membránovým potenciálem (Gray et al., 1998). Delece *ERV14*, ovlivňující biogenezi Trk1 a Tok1, vedla mimo jiné k ovlivnění růstu buněk na nízkých koncentracích  $K^+$ . Důvodem byl nedostatek efektivního importu  $K^+$  kationtů, což způsobilo výkyvy elektrochemického potenciálu PM a intracelulárního pH, jejichž správné hodnoty jsou důležité pro zdravý buněčný růst (Zimmermannova et al., 2019). S hyperpolarizací PM u kmene *erv14Δ* také souvisela vyšší citlivost buněk k cytotoxickým látkám (např. Hygromycin B, Tetramethylamonium) (Zimmermannova et al., 2019), jejichž vstup do buněk je řízen právě hladinou elektrochemického potenciálu PM (Madrid et al., 1998).

#### 4.1.2 Vliv proteinu Erv14 na biogenezi Nha1 antiporteru

Protein Nha1 kvasinky *S. cerevisiae* je “multi-pass“ membránový protein skládající se z nejméně 12 TMD (**Obr. 12**) (Kinclova-Zimmermannova et al., 2015; Kinclova et al., 2001). Je dlouhý 985 aminokyselin a řadí se do specifické skupiny transportérů alkalických kovů, které exportují  $Na^+$  nebo  $K^+$  na úkor gradientu  $H^+$  (Banuelos et al., 1998). Protein je charakteristický svým velmi dlouhým hydrofilním C-koncem (56.2% celkové délky proteinu) (**Obr. 12**). Dlouhý C-konec je důležitý pro regulaci jeho transportní aktivity (Kinclova et al., 2001). Aktivita Nha1 má vliv nejen na toleranci buněk k solím, ale ovlivňuje také okamžitou odpověď buněk na hyperosmotický šok (Kinclova-Zimmermannova et al., 2006), správný průběh buněčného cyklu (Simon et al., 2003; Simon et al., 2001) a růst za nedostatku extracelulárního draslíku (Smidova et al., 2019).





**Obr. 12: Topologie  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporteru Nha1.** Obrázek ukazuje přibližnou strukturu proteinu Nha1 s oběma jeho konci směřujícími do cytosolu buňky. Více než polovinu z 985 aminokyselin tvoří výrazně dlouhý hydrofilní C-konec (převzato z (Kinclova et al., 2001)).

Pomocí metody PAIRS (viz kapitola 3.1) bylo zjištěno, že antiporter Nha1 je jedním z mnoha nákladů, které jsou pomocí cargo receptoru Erv14 cíleny do membrán, v případě Nha1 do PM (Herzig et al., 2012). Detailnější studie se zabývaly rolí hydrofilního C-konce (**Obr. 12**) tohoto antiporteru při jeho transportu pomocí Erv14 do plasmatické membrány (Rosas-Santiago et al., 2016). Porovnávaly se dvě verze antiporteru Nha1 značeného pomocí GFP v buňkách s *ERV14* a v buňkách postrádající *ERV14*. Byla sledována lokalizace nezkráceného Nha1 a zkrácená verze Nha1 bez jeho C-konce (Nha1 o délce 472 aminokyselin). V buňkách, které nesly gen *ERV14* byly obě verze (Nha1 i Nha1 bez C-konce) detekované v PM, zatímco v buňkách bez *ERV14* byla v PM lokalizovaná pouze verze bez C-konce a nezkrácená verze byla částečně zadržována v ER (Rosas-Santiago et al., 2016). Na základě mbSUS analýzy byla prokázána interakce mezi Erv14 a zkráceným i celým Nha1 antiporterem. Fakt, že zkrácená varianta Nha1 byla v buňkách aktivní a správně lokalizována v PM, byl potvrzen na základě měření výstupu  $\text{Na}^+$  a testů analyzujících toleranci k solím (Rosas-Santiago et al., 2016). Z těchto výsledků vyplývá, že pro interakci Nha1 s Erv14 je důležitá především N-koncová část antiporteru a jeho TMD, a že Erv14 je důležitý zejména

pro efektivní biogenezi celého Nha1 s dlouhým C-koncem koncem (Rosas-Santiago et al., 2016).

C-konec proteinu Nha1 se skládá z 6 hlavních (C1-C6) a několika dalších meších konzervovaných částí, jejichž funkce není příliš známá (Kamauchi et al., 2002; Papouskova et al., 2021). V nedávné studii byla sledována lokalizace a funkce několika verzí proteinu ScNha1 zkrácených na C-konci nebo s delecemi v C-konci. Tyto varianty byly exprimovány v buňkách s *ERV14* a *erv14Δ* (Papouskova et al., 2021). Výsledky ukázaly, že pouze varianty Nha1, které obsahovaly konzervovanou část C5 v jeho hydrofilním C-konci, vyžadovaly cargo receptor Erv14 pro efektivní transport do PM. Z toho vyplývá, že i relativně malé hydrofilní části membránových proteinů jsou důležité pro interakci s Erv14 cargo receptorem (Papouskova et al., 2021).

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následné imunoblotové analýzy byl antiporter Nha1 identifikován jako dimer (Mitsui et al., 2005). Tato konformace je významná pro zprostředkování kationtové výměny mezi  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+$ ) a  $\text{H}^+$ . Schopnost tvorby dimerů proteinu Nha1 byla porovnávána v kmenech nesoucích *ERV14* s buňkami, které tento gen neobsahovaly, pomocí Western blotu. V buňkách s Erv14 cargo receptorem Nha1 dimerizoval efektivněji než v buňkách *erv14Δ*. Protein Erv14 je tedy důležitý také pro dimerizaci antiporteru Nha1 (Rosas-Santiago et al., 2016).

V živočišných buňkách je známo 13 isoformů  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů (NHE1-10, NHEDC1-2), které se liší svou lokalizací (PM vs. membrána vnitrobuněčných organel), substrátovou specifitou a funkcí (shrnutí v (Pedersen et al., 2019)). Doposud ale nebyl identifikován žádný cargo receptor, který by byl důležitý pro jejich biogenezi a správnou funkci v jejich cílových destinacích.

## 4.2 Lidské cargo receptory CNIH

V rámci rodiny cargo receptorů Erv14/cornichon byly identifikovány také lidské cargo receptory CNIH, které se v lidských buňkách nacházejí ve 4 isoformách (CNIH1-4) (Castro et al., 2007; Herring et al., 2013; Mishra et al., 2019). Při porovnání aminokyselinových sekvencí cargo receptoru Erv14, cornichonu Cni *D. melanogaster* a lidských CNIH bylo predikováno, že lidské cornichony obsahují, podobně jako Erv14 a Cni, 3 TMD (**Obr. 13**) (Castro et al., 2007; Powers et al., 2002).

**A**

```

CNIH1 MAFTFAAFCYMLALLLTAALIFFFAIWHIIAFDELKTDYKNPIDQCNTLNF-----
CNIH2 MAFTFAAFCYMLTLVLCASLIFFV IWHIIAFDELRTDFKNPIDQGNP PARARERLKNIERI
CNIH3 MAFTFAAFCYMLSLVLCALIFFFAIWHIIAFDELRTDFKSPIDQCNEV HARERLRNIERI
CNIH4 -----ME AVVVFVSLDCCALIFLSVYFII T LSDL ECDYINARSCCSK-----

--L NPLVLP EYL IHAFFCV MFLCAA EWL T LGLNMP L LAYHIWRYMSR PVMMSGPGLYDPT
CCL RRLVVPEYS IHGLFCLMFLCAA EWL T LGLNI PLLFYHLWRYFHR PADGSEVMYDAV
CFL RRLVLP EYS IHSLFCIMFLCAQEWL T LGLNV PLLFYHFWRYFHC PADSSSELAYDPP
--L NKV IPEL IGH T I V T V L L L M S L H W F I F L L N L P V A T W N I Y R Y I M V F S - G N M G V F D P T

TIMNADILAYCQKEGWCKLAFYLLAFFYLYGMIYVLVSS
SIMNADILNAYCQKESWCKLAFYLLSFFYLYSMVYTLVSS
VMNADTLSYQKEAWCKLAFYLLSFFYLYCMIYTLVSS
EIHNRGQLKSHMKRAMIKLGFHLLCFFMYLYSMILALIND

```

**B**

CNIH	MAFTFAAFCY	MLALLLTAAL	IFFAIWHIIA	FDELKTDYKN	PIDQCNTLNF	LVLPEYLIHA	60
dCni	MAFNPTAFTY	IVALIGDAFL	IFFAIFHVIA	FDELKTDYKN	PIDQCNSLNF	LVLPEYLLHI	60
Erv14	MGAWLF	ILAVVNCIN	LFGQVHFTIL	YADLEADYIN	PIELCSKVNK	LITPEAALHG	56

**TM1**

CNIH	FFCV MFLCAA	EWL T LGLNMP	LLAYHIWRYM	SRPVMMSGPGL	YDPTTIMNAD	ILAYCQKEGW	120
dCni	FLNLLFLFCG	EWFSLCINIP	L IAYHIWRYK	NRPVMMSGPGL	YDPTTVLKT D	TLYRNMRREGW	120
Erv14	ALSLLFLLNG	YWFVLLNLP	VLAYNENKIX	NK-VQ----	L DATEIFR--	TLGKHKRESF	109

**TM2**

CNIH	CKLAFYLLAF	FYLYGMIYV	LVS-S*	144
dCni	IKLAVYLISF	FYIYGMVYS	LIS-T*	144
Erv14	LKLGPHLLMF	FFLYRMIMA	LIAES GDDF*	138

**TM3**

### Obr. 13: Srovnání sekvencí aminokyselin cargo receptorů nižších a vyšších eukaryot. (A)

Porovnání sekvencí lidských cornichonů CNIH (odpovídající CNIH1), CNIH2, CNIH3, CNIH4. Je zde patrné, že CNIH2 a 3 jsou si na základě aminokyselinové sekvence velmi podobné, zatímco sekvence CNIH4 se nejvíce liší. (B) Srovnání sekvencí kvasinkového cargo receptoru Erv14, cornichonu z *D. melanogaster* Cni a lidského cornichonu CNIH. Černými čarami jsou znázorněné potenciální TMD. V černých rámcích jsou patrné konzervované "Cni domény". Červeně jsou zvýrazněné shodné aminokyseliny u všech zástupců (převzato z (Castro et al., 2007)).

#### 4.2.1 Úloha cornichonů CNIH v buňkách

Jaké všechny úlohy zastávají lidské cornichony v organismu není prozatím plně objasněno. Pravděpodobně se pohybují, stejně jako Erv14 a Cni, z ER do GA (a zpět) (Castro et al., 2007). Doposud byla charakterizována jejich úloha v biogenezi pouze několika proteinů.

CNIH1 byl identifikován jako cargo receptor pro TGF $\alpha$  (transforming growing factor  $\alpha$ ), který zadržuje nematurovaný protein v ER, dokud nedojde ke správnému sbalení a plnohodnotné maturaci (Castro et al., 2007; P. Zhang et al., 2016). U pacientů trpících schizofrenií byla detekována zvýšená exprese CNIH2 a CNIH3 spolu s CNIH1 v dorsolaterálním prefrontálním kortexu v mozku (Drummond et al., 2012), což přivádí k myšlence, že by CNIH1 mohl zastávat doposud však neznámou funkci v lidských mozkových buňkách.

Cornichony CNIH2 a CNIH3 (i CNIH1) se uplatňují v dopravě a regulaci otevírání ionotropního glutamátového AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina) receptoru (AMPA) (Brockie et al., 2013; Shanks et al., 2014; Schwenk et al., 2009). AMPARs jsou homo- či heterotetramerní proteinové komplexy, jejichž podjednotky (GluA1-4) utvářejí pór pro přenos kationtů Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> v nervových buňkách (Perkinton et al., 1999). Právě interakce cornichonů (CNIH2, 3) s podjednotkami těchto receptorů zajišťuje

export AMPAR z ER pomocí COPII váčků do GA (Harmel et al., 2012; Shanks et al., 2014). Při interakci CNIH2 nebo CNIH3 s podjednotkami GluA dochází k transportu cornichonů z GA (nikoli zpět do ER) a k jejich společnému zakotvení v PM. Zde se z nich stanou pomocné podjednotky těchto ionotropních glutamátových receptorů, čímž napomáhají modifikovat jejich otevírání a zavírání (Harmel et al., 2012; Shanks et al., 2014).

Úloha cornichonu CNIH4 byla charakterizována v souvislosti s receptory spřaženými s G-proteiny (GPCRs) (Sauvageau et al., 2014). GPCRs tvoří velkou skupinu receptorů sedících na povrchu membrán, skrze jejichž signalizaci je regulováno mnoho buněčných procesů a fyziologických funkcí (Dong et al., 2008). Pomocí BRET-based screening (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) analýzy proteinů účastnících se ER-to-Golgi transportu bylo prokázáno, že se cornichon CNIH4 podílí na aktivním exportu GPCRs pomocí COPII váčků z ER (Sauvageau et al., 2014). Jakmile došlo k overexpresi CNIH4, došlo k poklesu bioluminiscence mezi  $\beta$ 2AR-A7 ( $\beta$ 2-adrenoreceptor s mutací na pozici A7) a kalnexinem. Kalnexin je molekulární chaperon zprostředkovávající folding N-glykosylovaných proteinů opouštějících ER (Hammond et al., 1994). Mezi takové proteiny patří také  $\beta$ 2-adrenoreceptory, které se řadí do GPCRs (Ghanouni et al., 2001). Tento pokles bioluminiscence naznačil, že CNIH4 oslabuje interakci mezi kalnexinem a správně složeným  $\beta$ 2-adrenoreceptorem a napomáhá tak jeho uvolnění z ER (Sauvageau et al., 2014). Při overexpresi CNIH4 byla také zjištěna větší míra degradace špatně sbalených  $\beta$ 2-adrenoreceptorů pomocí proteasomu. CNIH4 by tak mohl hrát také roli při degradaci proteinů zadržovaných v ER (Sauvageau et al., 2014).

Další význam CNIH4 byl také nalezen při studii antagonistického vztahu p24 sekrečních proteinů TMED3 a TMED9 (Mishra et al., 2019; Seno et al., 2016). V rámci testování rakovinových buněk tlustého střeva byl CNIH4 charakterizován jako možný exportér TGF $\alpha$  z ER a patřil mezi faktory podporující vznik metastází (Mishra et al., 2019).

O dalších funkcích lidských cornichonů CNIH spojených s AMPAR nebo GPCRs nebo s dalšími transportéry monovalentních kationtů či s jinými membránovými proteiny není prozatím více známo.

## 5 Závěr

Biogeneze proteinů pomocí sekreční dráhy je velmi složitý proces, kterého se účastní mnoho proteinů. Je zároveň velmi důležité, aby proteiny, které do dráhy vstupují, prošly správnou maturací a byly efektivně transportovány až do extracelulárního prostoru či do membrán organel. Všechny tyto procesy spolu úzce spolupracují a jsou nezbytné pro správné fungování buněk. Objevením významu cargo receptoru Erv14 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v biogenezi proteinů se podařilo lépe analyzovat mechanismy cílení membránových proteinů na jejich místa určení. Odhalení úlohy Erv14 v biogenezi  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů a dalších transportérů monovalentních kationtů pomohlo objasnit další z principů zachování iontové homeostáze u nižších eukaryot. Biogeneze živočišných  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů či jiných transportérů monovalentních iontů nebyla doposud objasněna. Díky vysoké konzervovanosti cargo receptorů od kvasinek až po člověka mohou být poznatky získané v buňkách kvasinek prospěšné i pro odhalení nových mechanismů biogeneze transportérů iontů ve vyšších eukaryotech, včetně člověka. Je zřejmé, že podobně jako Erv14 v *S. cerevisiae*, jeho lidské homology, cornichony, mohou zastávat v lidském organismu řadu funkcí. Z mé bakalářské práce vyplývá, že lidské cornichony patří stále mezi velmi málo charakterizovanou skupinou cargo receptorů, a proto doufám, že o úloze lidských cornichonů zjistím více v rámci své diplomové práce.

## Seznam použité literatury

- Aalto, M. K., Ronne, H., & Keränen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J*, 12(11), 4095-4104.
- Adolf, F., Rhiel, M., Hessling, B., Gao, Q., Hellwig, A., Bethune, J., et al. (2019). Proteomic Profiling of Mammalian COPII and COPI Vesicles. *Cell Rep*, 26(1), 250-265 e255.
- Akahane, T., Sahara, K., Yashiroda, H., Tanaka, K., & Murata, S. (2013). Involvement of Bag6 and the TRC pathway in proteasome assembly. *Nat Commun*, 4, 2234.
- Alberts, B. (2019). *Essential cell biology*.
- Anelli, T., & Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J*, 27(2), 315-327.
- Antonin, W., Meyer, H. A., & Hartmann, E. (2000). Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *S. cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275(44), 34068-34072.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol*, 3(6), 531-537.
- Arino, J. (2010). Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *OMICS*, 14(5), 517-523.
- Aviram, N., & Schuldiner, M. (2017). Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *J Cell Sci*, 130(24), 4079-4085.
- Banuelos, M. A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L., & Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *S. cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology (Reading)*, 144 ( Pt 10), 2749-2758.
- Barlowe, C. (1997). Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *J Cell Biol*, 139(5), 1097-1108.
- Barlowe, C. (2020). Twenty-five years after coat protein complex II. *Mol Biol Cell*, 31(1), 3-6.
- Barlowe, C., d'Enfert, C., & Schekman, R. (1993). Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 268(2), 873-879.
- Barlowe, C., & Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2), 383-410.
- Bohni, P. C., Deshaies, R. J., & Schekman, R. W. (1988). *SEC11* is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J Cell Biol*, 106(4), 1035-1042.
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153-166.
- Borgese, N., Coy-Vergara, J., Colombo, S. F., & Schwappach, B. (2019). The Ways of Tails: the GET Pathway and more. *Protein J*, 38(3), 289-305.
- Botstein, D., Chervitz, S. A., & Cherry, J. M. (1997). Yeast as a model organism. *Science*, 277(5330), 1259-1260.
- Bozkurt, G., Stjepanovic, G., Vilardi, F., Amlacher, S., Wild, K., Bange, G., et al. (2009). Structural insights into tail-anchored protein binding and membrane insertion by Get3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(50), 21131-21136.
- Brockie, P. J., Jensen, M., Mellem, J. E., Jensen, E., Yamasaki, T., Wang, R., et al. (2013). Cornichons control ER export of AMPA receptors to regulate synaptic excitability. *Neuron*, 80(1), 129-142.
- Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., et al. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273(5278), 1058-1073.
- Cao, X., & Barlowe, C. (2000). Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J Cell Biol*, 149(1), 55-66.

- Caplan, A. J., Cyr, D. M., & Douglas, M. G. (1992). Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell*, *71*(7), 1143-1155.
- Castillon, G. A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T. M., & Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic*, *10*(2), 186-200.
- Castro, C. P., Piscopo, D., Nakagawa, T., & Derynck, R. (2007). Cornichon regulates transport and secretion of TGF $\alpha$ -related proteins in metazoan cells. *J Cell Sci*, *120*(Pt 14), 2454-2466.
- Cejas, R. B., Lorenz, V., Garay, Y. C., & Irazoqui, F. J. (2019). Biosynthesis of O-N-acetylgalactosamine glycans in the human cell nucleus. *J Biol Chem*, *294*(9), 2997-3011.
- Cohen, Y., & Schuldiner, M. (2011). Advanced methods for high-throughput microscopy screening of genetically modified yeast libraries. *Methods Mol Biol*, *781*, 127-159.
- Creighton, T. E. (1986). Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. *Methods Enzymol*, *131*, 83-106.
- Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A., & Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, *332*(6167), 800-805.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A., & Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, *349*(6312), 806-808.
- Deshaies, R. J., & Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, *105*(2), 633-645.
- Dong, C., Zhou, F., Fugetta, E. K., Filipeanu, C. M., & Wu, G. (2008). Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cell Signal*, *20*(6), 1035-1043.
- Doring, K., Ahmed, N., Riemer, T., Suresh, H. G., Vainshtein, Y., Habich, M., et al. (2017). Profiling Ssb-Nascent Chain Interactions Reveals Principles of Hsp70-Assisted Folding. *Cell*, *170*(2), 298-311 e220.
- Drummond, J. B., Simmons, M., Haroutunian, V., & Meador-Woodruff, J. H. (2012). Upregulation of cornichon transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuroreport*, *23*(17), 1031-1034.
- Dutta, D., & Fliegel, L. (2018). Structure and function of yeast and fungal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *IUBMB Life*, *70*(1), 23-31.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(26), 15781-15786.
- Felder, T., Bogengruber, E., Tenreiro, S., Ellinger, A., Sa-Correia, I., & Briza, P. (2002). Dtrlp, a multidrug resistance transporter of the major facilitator superfamily, plays an essential role in spore wall maturation in *S. cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, *1*(5), 799-810.
- Fujita, A., Oka, C., Arikawa, Y., Katagai, T., Tonouchi, A., Kuhara, S., et al. (1994). A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes. *Nature*, *372*(6506), 567-570.
- Funk, K., Czauderna, C., Klesse, R., Becker, D., Hajduk, J., Oelgeklaus, A., et al. (2020). BAX Redistribution Induces Apoptosis Resistance and Selective Stress Sensitivity in Human HCC. *Cancers (Basel)*, *12*(6).
- Ghanouni, P., Steenhuis, J. J., Farrens, D. L., & Kobilka, B. K. (2001). Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(11), 5997-6002.
- Gilmore, R., Blobel, G., & Walter, P. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol*, *95*(2 Pt 1), 463-469.

- Gilmore, R., Walter, P., & Blobel, G. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol*, *95*(2 Pt 2), 470-477.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(5287), 546, 563-547.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U., & Rapoport, T. A. (1992). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, *71*(3), 489-503.
- Gray, A. T., Winegar, B. D., Leonoudakis, D. J., Forsayeth, J. R., & Yost, C. S. (1998). TOK1 is a volatile anesthetic stimulated K<sup>+</sup> channel. *Anesthesiology*, *88*(4), 1076-1084.
- Guna, A., Volkmar, N., Christianson, J. C., & Hegde, R. S. (2018). The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase. *Science*, *359*(6374), 470-473.
- Gundelfinger, E. D., Krause, E., Melli, M., & Dobberstein, B. (1983). The organization of the 7SL RNA in the signal recognition particle. *Nucleic Acids Res*, *11*(21), 7363-7374.
- Hammond, C., Braakman, I., & Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(3), 913-917.
- Hann, B. C., Stirling, C. J., & Walter, P. (1992). SEC65 gene product is a subunit of the yeast signal recognition particle required for its integrity. *Nature*, *356*(6369), 532-533.
- Harmel, N., Cokic, B., Zolles, G., Berkefeld, H., Mauric, V., Fakler, B., et al. (2012). AMPA receptors commandeer an ancient cargo exporter for use as an auxiliary subunit for signaling. *PLoS One*, *7*(1), e30681.
- Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2022). The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *23*(2), 107-124.
- Herring, B. E., Shi, Y., Suh, Y. H., Zheng, C. Y., Blankenship, S. M., Roche, K. W., et al. (2013). Cornichon proteins determine the subunit composition of synaptic AMPA receptors. *Neuron*, *77*(6), 1083-1096.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S., & Schuldiner, M. (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by erv14. *PLoS Biol*, *10*(5), e1001329.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., et al. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, *433*(7024), 377-381.
- Hessa, T., Meindl-Beinker, N. M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., et al. (2007). Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, *450*(7172), 1026-1030.
- Hughes, H., Budnik, A., Schmidt, K., Palmer, K. J., Mantell, J., Noakes, C., et al. (2009). Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J Cell Sci*, *122*(Pt 16), 2924-2934.
- Chant, J., & Herskowitz, I. (1991). Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell*, *65*(7), 1203-1212.
- Chatterjee, S., Choi, A. J., & Frankel, G. (2021). A systematic review of Sec24 cargo interactome. *Traffic*, *22*(12), 412-424.
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, *246*(4928), 382-385.
- Chirico, W. J., Waters, M. G., & Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, *332*(6167), 805-810.
- Chitwood, P. J., & Hegde, R. S. (2019). The Role of EMC during Membrane Protein Biogenesis. *Trends Cell Biol*, *29*(5), 371-384.
- Chitwood, P. J., & Hegde, R. S. (2020). An intramembrane chaperone complex facilitates membrane protein biogenesis. *Nature*, *584*(7822), 630-634.



- Jabnourne, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J. L., Conejero, G., et al. (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol*, 150(4), 1955-1971.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F., & Segev, N. (2000). The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol Biol Cell*, 11(12), 4403-4411.
- Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., et al. (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 323(5922), 1693-1697.
- Kaiser, C. A., & Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*, 61(4), 723-733.
- Kalbfleisch, T., Cambon, A., & Wattenberg, B. W. (2007). A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic*, 8(12), 1687-1694.
- Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujike, S., Haga, M., Nakamura, N., Inoue, H., et al. (2002). Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (nha1p). *J Biochem (Tokyo)*, 131(6), 821-831.
- Kampinga, H. H., Andreasson, C., Barducci, A., Cheetham, M. E., Cyr, D., Emanuelsson, C., et al. (2019). Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress Chaperones*, 24(1), 7-15.
- Karaoglu, D., Kelleher, D. J., & Gilmore, R. (1997). The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J Biol Chem*, 272(51), 32513-32520.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Falson, P., Cmunt, D., & Sychrova, H. (2015). A hydrophobic filter confers the cation selectivity of *Zygosaccharomyces rouxii* plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J Mol Biol*, 427(8), 1681-1694.
- Kinclova-Zimmermannova, O., & Sychrova, H. (2006). Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet*, 49(4), 229-236.
- Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S., & Sychrova, H. (2001). Functional study of the *S. cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol*, 40(3), 656-668.
- Klausner, R. D. (1989). Architectural editing: determining the fate of newly synthesized membrane proteins. *New Biol*, 1(1), 3-8.
- Ko, C. H., & Gaber, R. F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11(8), 4266-4273.
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M. J., & Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*, 13(2), 877-890.
- Krieg, U. C., Walter, P., & Johnson, A. E. (1986). Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(22), 8604-8608.
- Kuehn, M. J., Schekman, R., & Ljungdahl, P. O. (1996). Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J Cell Biol*, 135(3), 585-595.
- Laboissiere, M. C., Chivers, P. T., & Raines, R. T. (1995). Production of rat protein disulfide isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*, 6(5), 700-706.
- Lajoie, P., Moir, R. D., Willis, I. M., & Snapp, E. L. (2012). Kar2p availability defines distinct forms of endoplasmic reticulum stress in living cells. *Mol Biol Cell*, 23(5), 955-964.
- Landau, M., Herz, K., Padan, E., & Ben-Tal, N. (2007). Model structure of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications. *J Biol Chem*, 282(52), 37854-37863.
- Li, J., Qian, X., & Sha, B. (2003). The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. *Structure*, 11(12), 1475-1483.

- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., et al. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*, 473(7346), 181-186.
- Lord, C., Ferro-Novick, S., & Miller, E. A. (2013). The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2).
- Lu, C. L., & Kim, J. (2020). Consequences of mutations in the genes of the ER export machinery COPII in vertebrates. *Cell Stress Chaperones*, 25(2), 199-209.
- Luirink, J., & Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 17-35.
- Lutcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur J Biochem*, 228(3), 531-550.
- Madrid, R., Gomez, M. J., Ramos, J., & Rodrigueznavarro, A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *S. cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14838-14844.
- Mateja, A., & Keenan, R. J. (2018). A structural perspective on tail-anchored protein biogenesis by the GET pathway. *Curr Opin Struct Biol*, 51, 195-202.
- Mateja, A., Szlachcic, A., Downing, M. E., Dobosz, M., Mariappan, M., Hegde, R. S., et al. (2009). The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature*, 461(7262), 361-366.
- McCaughey, J., & Stephens, D. J. (2018). COPII-dependent ER export in animal cells: adaptation and control for diverse cargo. *Histochem Cell Biol*, 150(2), 119-131.
- McGilvray, P. T., Anghel, S. A., Sundaram, A., Zhong, F., Trnka, M. J., Fuller, J. R., et al. (2020). An ER translocon for multi-pass membrane protein biogenesis. *Elife*, 9.
- Mellman, I., & Emr, S. D. (2013). A Nobel Prize for membrane traffic: vesicles find their journey's end. *J Cell Biol*, 203(4), 559-561.
- Meyer, H. A., & Hartmann, E. (1997). The yeast *SPC22/23* homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J Biol Chem*, 272(20), 13159-13164.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., & Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J*, 21(22), 6105-6113.
- Mishra, S., Bernal, C., Silvano, M., Anand, S., & Ruiz, I. A. A. (2019). The protein secretion modulator TMED9 drives CNIH4/TGF $\alpha$ /GLI signaling opposing TMED3-WNT-TCF to promote colon cancer metastases. *Oncogene*.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the *S. cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta*, 1720(1-2), 125-136.
- Montegna, E. A., Bhave, M., Liu, Y., Bhattacharyya, D., & Glick, B. S. (2012). Sec12 binds to Sec16 at transitional ER sites. *PLoS One*, 7(2), e31156.
- Morimoto, M., Waller-Evans, H., Ammous, Z., Song, X., Strauss, K. A., Pehlivan, D., et al. (2018). Bi-allelic CCDC47 Variants Cause a Disorder Characterized by Woolly Hair, Liver Dysfunction, Dysmorphic Features, and Global Developmental Delay. *Am J Hum Genet*, 103(5), 794-807.
- Mossessova, E., Bickford, L. C., & Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 114(4), 483-495.
- Nakanishi, H., Suda, Y., & Neiman, A. M. (2007). Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 120(Pt 5), 908-916.
- Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L., & Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol*, 153(5), 1061-1070.
- Ogg, S. C., Barz, W. P., & Walter, P. (1998). A functional GTPase domain, but not its transmembrane domain, is required for function of the SRP receptor beta-subunit. *J Cell Biol*, 142(2), 341-354.

- Orlean, P. (1990). Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O-mannosylation, and N-glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10(11), 5796-5805.
- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., & Miller, E. A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr Biol*, 25(4), 403-412.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., & Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 60, 31-40.
- Papouskova, K., Moravcova, M., Masrati, G., Ben-Tal, N., Sychrova, H., & Zimmermannova, O. (2021). C5 conserved region of hydrophilic C-terminal part of *S. cerevisiae* Nha1 antiporter determines its requirement of Erv14 COPII cargo receptor for plasma-membrane targeting. *Mol Microbiol*, 115(1), 41-57.
- Pathinayake, P. S., Hsu, A. C., & Wark, P. A. B. (2020). PAT in the ER for Transmembrane Protein Folding. *Trends Biochem Sci*, 45(12), 1007-1008.
- Pedersen, S. F., & Counillon, L. (2019). The SLC9A-C Mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Family: Molecules, Mechanisms, and Physiology. *Physiol Rev*, 99(4), 2015-2113.
- Perkinton, M. S., Sihra, T. S., & Williams, R. J. (1999). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci*, 19(14), 5861-5874.
- Powers, J., & Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J Cell Biol*, 142(5), 1209-1222.
- Powers, J., & Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell*, 13(3), 880-891.
- Rabitsch, K. P., Tóth, A., Gálová, M., Schleiffer, A., Schaffner, G., Aigner, E., et al. (2001). A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression. *Curr Biol*, 11(13), 1001-1009.
- Roemer, T., Madden, K., Chang, J., & Snyder, M. (1996). Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev*, 10(7), 777-793.
- Römisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M., et al. (1989). Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains. *Nature*, 340(6233), 478-482.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., et al. (2015). Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *J Exp Bot*, 66(9), 2733-2748.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Yanez-Dominguez, C., Vera-Estrella, R., Zimmermannova, O., Sychrova, H., et al. (2017). Plant and yeast cornichon possess a conserved acidic motif required for correct targeting of plasma membrane cargos. *Biochim Biophys Acta*, 1864(10), 1809-1818.
- Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrova, H., & Pantoja, O. (2016). Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta*, 1858(1), 67-74.
- Russell, C., & Stagg, S. M. (2010). New insights into the structural mechanisms of the COPII coat. *Traffic*, 11(3), 303-310.
- Sato, K., & Nakano, A. (2005). Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol*, 12(2), 167-174.
- Sauvageau, E., Rochdi, M. D., Oueslati, M., Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Simpson, J. C., et al. (2014). CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and controls their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 15(4), 383-400.
- Seno, A., Kasai, T., Ikeda, M., Vaidyanath, A., Masuda, J., Mizutani, A., et al. (2016). Characterization of Gene Expression Patterns among Artificially Developed Cancer Stem Cells Using Spherical Self-Organizing Map. *Cancer Inform*, 15, 163-178.

- Seog, D. H., Kito, M., Igarashi, K., Yoda, K., & Yamasaki, M. (1994). Molecular characterization of the *USO1* gene product which is essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 200(1), 647-653.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C., & Fink, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature*, 319(6055), 689-693.
- Shanks, N. F., Cais, O., Maruo, T., Savas, J. N., Zaika, E. I., Azumaya, C. M., et al. (2014). Molecular dissection of the interaction between the AMPA receptor and cornichon homolog-3. *J Neurosci*, 34(36), 12104-12120.
- Sherwood, P. W., Katic, I., Sanz, P., & Carlson, M. (2000). A glucose transporter chimera confers a dominant negative glucose starvation phenotype in *S. cerevisiae*. *Genetics*, 155(2), 989-992.
- Schimmöller, F., Singer-Krüger, B., Schröder, S., Krüger, U., Barlowe, C., & Riezman, H. (1995). The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J*, 14(7), 1329-1339.
- Schuldiner, M., Collins, S. R., Thompson, N. J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., et al. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell*, 123(3), 507-519.
- Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., et al. (2009). Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science*, 323(5919), 1313-1319.
- Sicari, D., Igbaria, A., & Chevet, E. (2019). Control of Protein Homeostasis in the Early Secretory Pathway: Current Status and Challenges. *Cells*, 8(11).
- Simon, E., Barcelo, A., & Arino, J. (2003). Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett*, 545(2-3), 239-245.
- Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., & Arino, 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(32), 29740-29747.
- Smidova, A., Stankova, K., Petrvalska, O., Lazar, J., Sychrova, H., Obsil, T., et al. (2019). The activity of *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1 is negatively regulated by 14-3-3 protein binding at serine 481. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(12), 118534.
- Spiess, M., & Lodish, H. F. (1986). An internal signal sequence: the asialoglycoprotein receptor membrane anchor. *Cell*, 44(1), 177-185.
- Stirling, C. J., & Hewitt, E. W. (1992). The *S. cerevisiae* *SEC65* gene encodes a component of yeast signal recognition particle with homology to human SRP19. *Nature*, 356(6369), 534-537.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347-353.
- Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V. L., & Walter, P. (1986). The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol*, 103(4), 1167-1178.
- Townley, A. K., Feng, Y., Schmidt, K., Carter, D. A., Porter, R., Verkade, P., et al. (2008). Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COPII-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *J Cell Sci*, 121(Pt 18), 3025-3034.
- Tu, B. P., & Weissman, J. S. (2002). The FAD- and O<sub>2</sub>-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, 10(5), 983-994.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., et al. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427(6969), 36-44.
- Vilardi, F., Stephan, M., Clancy, A., Janshoff, A., & Schwappach, B. (2014). WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane. *PLoS One*, 9(1), e85033.

- Virkki, M. T., Peters, C., Nilsson, D., Sorensen, T., Cristobal, S., Wallner, B., et al. (2014). The positive inside rule is stronger when followed by a transmembrane helix. *J Mol Biol*, *426*(16), 2982-2991.
- Wang, L., Yu, J., & Wang, C. C. (2021). Protein disulfide isomerase is regulated in multiple ways: Consequences for conformation, activities, and pathophysiological functions. *Bioessays*, *43*(3), e2000147.
- Wang, X., Wang, H., Xu, B., Huang, D., Nie, C., Pu, L., et al. (2021). Receptor-Mediated ER Export of Lipoproteins Controls Lipid Homeostasis in Mice and Humans. *Cell Metab*, *33*(2), 350-366 e357.
- Welch, L. G., & Munro, S. (2019). A tale of short tails, through thick and thin: investigating the sorting mechanisms of Golgi enzymes. *FEBS Lett*, *593*(17), 2452-2465.
- Wendeler, M. W., Paccaud, J. P., & Hauri, H. P. (2007). Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, *8*(3), 258-264.
- Wereszczynski, J., & McCammon, J. A. (2012). Nucleotide-dependent mechanism of Get3 as elucidated from free energy calculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(20), 7759-7764.
- White, S. H., & Wimley, W. C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *28*, 319-365.
- Wimley, W. C., & White, S. H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol*, *3*(10), 842-848.
- Yabal, M., Brambillasca, S., Soffientini, P., Pedrazzini, E., Borgese, N., & Makarow, M. (2003). Translocation of the C-terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. *J Biol Chem*, *278*(5), 3489-3496.
- YaDeau, J. T., Klein, C., & Blobel, G. (1991). Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the *SEC11* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(2), 517-521.
- Yamamoto, Y., & Sakisaka, T. (2012). Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Mol Cell*, *48*(3), 387-397.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., & Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*, *259*(5100), 1466-1468.
- Zalisko, B. E., Chan, C., Denic, V., Rock, R. S., & Keenan, R. J. (2017). Tail-Anchored Protein Insertion by a Single Get1/2 Heterodimer. *Cell Rep*, *20*(10), 2287-2293.
- Zhang, P., & Schekman, R. (2016). Distinct stages in the recognition, sorting, and packaging of proTGF $\alpha$  into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell*, *27*(12), 1938-1947.
- Zhang, Y., Zhu, M., Zheng, C., Wei, W., Emmer, B. T., & Zhang, B. (2022). LMAN1-MCFD2 complex is a cargo receptor for the ER-Golgi transport of  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Biochem J*, *479*(7), 839-855.
- Zheng, C., Liu, H. H., Yuan, S., Zhou, J., & Zhang, B. (2010). Molecular basis of LMAN1 in coordinating LMAN1-MCFD2 cargo receptor formation and ER-to-Golgi transport of FV/FVIII. *Blood*, *116*(25), 5698-5706.
- Zimmermannova, O., Felcmanova, K., Rosas-Santiago, P., Papouskova, K., Pantoja, O., & Sychrova, H. (2019). Erv14 cargo receptor participates in regulation of plasma-membrane potential, intracellular pH and potassium homeostasis via its interaction with K<sup>+</sup>-specific transporters Trk1 and Tok1. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, *1866*(9), 1376-1388.