

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



**Fyziologické úlohy  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů v kvasinkách**

**Jaromír Zahrádka**

Školitelka: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha, 2013

# Obsah

<b>Abstrakt</b>	<b>3</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>4</b>
<b>2 Cíle práce</b>	<b>6</b>
<b>3 Materiál a metodika</b>	<b>7</b>
3.1 Materiál	7
3.2 Metodika	7
<b>4 Výsledky a diskuse</b>	<b>8</b>
4.1 Publikace č. 1	8
4.2 Publikace č. 2	9
4.3 Publikace č. 3	10
4.4 Publikace č. 4	11
4.5 Rukopis č. 5	12
4.6 Publikace č. 6	13
4.7 Nepublikované výsledky, metodika měření vnitrobuňčného pH	13
<b>5 Závěry</b>	<b>14</b>
<b>6 Použitá literatura</b>	<b>15</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>18</b>
<b>Seznam publikací</b>	<b>19</b>
<b>Seznam abstraktů z konferencí</b>	<b>20</b>

Práce vznikla na Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i.  
a prošla interní obhajobou ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i., dne 16. 5. 2013

## Abstrakt

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří k důležitým modelům při studiu homeostase iontů alkalických kovů. Stejně jako v jiných buňkách je pro *S. cerevisiae* nezbytné udržení určité koncentrace  $K^+$  uvnitř buněk, na druhou stranu  $Na^+$  a další ionty alkalických kovů jsou pro buňky toxické.  $K^+$  je akumulován pomocí uniporterů Trk1 a Trk2, zatímco export toxických iontů alkalických kovů, a také nadbytečného  $K^+$ , je zajištěn ATPasami Ena,  $Na^+(K^+)/H^+$  antiporterem Nha1 a  $K^+$  selektivním kanálem Tok1. Ačkoli jsou jednotlivé transportery poměrně dobře prozkoumány, není dosud mnoho známo o celkové regulaci homeostase iontů alkalických kovů ani o vzájemné interakci a regulaci mezi jednotlivými transportery. V rámci této práce byl studován antiporter Nha1 a jeho fyziologické úlohy v kontextu ostatních transporterů iontů alkalických kovů. Ukázalo se, že nejen Nha1p, ale také další exportery, ATPasy Ena a kanál Tok1, jsou, přes jejich výraznou odlišnost v mechanismu transportu i způsobu regulace, regulovány společně změnou aktivity importerů  $K^+$  a to prostřednictvím membránového potenciálu. Vzájemná regulace a funkční propojení importerů a exporterů  $K^+$ , ale také další výsledky poprvé ukázaly, jak velice důležitá je neustálá cirkulace  $K^+$ , tedy současný vstup a výstup  $K^+$ , pro udržování homeostase iontů alkalických kovů. Ačkoli bylo prokázáno, že homeostáze iontů alkalických kovů a související fyziologické parametry (např. membránový potenciál, velikost buněk či tolerance k solím) mohou být výrazně ovlivněny volbou konkrétního kmene *S. cerevisiae*, byla potvrzena nezastupitelná úloha Nha1p pro přežití buněk v přirozeném prostředí, kde může koncentrace solí výrazně kolísat. V této práci byly znalosti o regulaci Nha1p ještě dále rozšířeny o dva nově nalezené pozitivní regulátory aktivity Nha1p a to 1) proteiny 14-3-3 fyzicky interagující s Nha1p na více místech a 2) kinasu Cka1, která byla dosud známa pouze jako regulátor exprese *ENA1*. Znalosti získané studiem Nha1p byly využity ke studiu lidského  $Na^+/H^+$  antiporteru NHAoc/NHA2 v buňkách *S. cerevisiae* postrádajících vlastní transportery a byly identifikovány aminokyselinové zbytky, jejichž mutací dochází k disfunkci transporteru vedoucí často k závažné chorobě tvorby kostí, osteopetrose. Práce tedy přispěla mnoha novými poznatky k lepšímu pochopení úlohy Nha1p a dalších transporterů v udržování homeostase iontů alkalických kovů a během práce došlo také k přínosu v oblasti metodiky (především měření vnitrobuněčného pH), který v budoucnu umožní další posun v řešené problematice.

# 1 Úvod

Kvasinky patří mezi nejdéle studované organismy. Jedním z důvodů je to, že jsou lidmi využívány již tisíce let např. při výrobě chleba a fermentovaných nápojů. Nejznámějším zástupcem jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou v současné době jedním z nejdůležitějších modelových organismů eukaryotních buněk pro základní i aplikovaný výzkum. Genom této kvasinky byl kompletně sekvenován jako první genom eukaryotního organismu [1] a existuje mnoho nástrojů molekulární biologie a genetiky umožňujících vnášení mutací, delece nebo vkládání genů nejen vlastních, ale i genů z jiných organismů [2, 3]. Jednou z oblastí, kde jsou kvasinky *S. cerevisiae* dlouhodobě využívány je studium udržování homeostase iontů alkalických kovů. Stejně jako pro jiné organismy, také pro *S. cerevisiae* platí, že  $K^+$  je důležitým vnitrobuněčným kationtem, který se podílí např. na udržování osmolarity, iontové síly nebo na udržování membránového potenciálu ( $\Delta\Psi$ ). Na druhou stranu,  $Na^+$  a další ionty alkalických kovů působí uvnitř buněk toxicky i v relativně nízkých koncentracích [4-6].

Pro udržení dostatečného množství  $K^+$  uvnitř buněk (cca 200 mM  $K^+$ ; [6]) je nutné zajistit aktivní přísun  $K^+$  pomocí uniporterů Trk1 a Trk2 [7, 8]. Dominantní úlohu hraje Trk1p [6] a v případě delece *trk1* nebo dvojité delece *trk1 trk2* nejsou buňky schopné růst při nízké koncentraci  $K^+$  [9-11]. Mezi fyziologické úlohy importerů Trk1 a Trk2 patří udržování homeostase  $K^+$ , pH [12, 13], turgoru [14] a  $\Delta\Psi$  [12, 15]. Přestože je regulace Trk1p a Trk2p již dlouho studována, není dosud mechanismus regulace plně objasněn. Mezi známé regulátory aktivity Trk1p a Trk2p patří kinasy Hal4, Hal5 a Sky1, fosfatasy kalcineurin a Ppz1 nebo protein Hal3. Nedávno bylo zjištěno, že se regulace importu  $K^+$  účastní také proteiny důležité pro vesikulární transport a kinasy fosforylující inositol [6, 16-18]. Regulace na úrovni exprese genů dosud není známa [19-21].

Kanál Tok1, ATPasy kódované geny *ENA* a antiporter *Nha1* [6] zajišťují vypuzování toxických kationtů ( $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Rb^+$ ) nebo přebytečných iontů  $K^+$  z buněk. Důležitost těchto exporterů v *S. cerevisiae* potvrzuje to, že se zde vyskytují tři systémy s rozdílným mechanismem transportu a regulace. Napětově řízený kanál Tok1 umožňuje výstup  $K^+$  tak, že k otevření kanálu dochází při depolarisaci plasmatické membrány (PM) [11, 22]. Delece *tok1* vede k poklesu  $\Delta\Psi$ ,

zatímco zvýšená exprese způsobí hyperpolarisaci PM [23]. Jediným dosud známým regulačním prvkem je fosforylace Tok1p kinasou Hog1 [24].

Geny ATPas *ENA* jsou v organismu přítomné zpravidla ve 2 až 4 kopiích a nejdůležitější úlohu hraje *Ena1p* [6, 25]. *Ena1p* je považován za transporter determinující citlivost buněk k vnějším vysokým koncentracím  $\text{Na}^+$  a  $\text{Li}^+$  a jeho role je klíčová v prostředí s vysokým pH, kde je omezena funkce antiporteru *Nha1* (viz dále). Exprese *ENA1* je na rozdíl od ostatních transporterů iontů alkalických kovů silně indukována (např. v přítomnosti  $\text{Na}^+$  a za osmotického stresu) a regulace exprese se účastní řada faktorů a signálních drah. Mezi aktivátory exprese *Ena1p* patří např. kinasy Hog1, kalcineurin, Snf1 a Cka1 nebo transkripční faktor Rim101, mezi inhibitory patří např. fosfatasa Ppz1, proteinkinasa A nebo transkripční faktory Ngr1 a Sko1 [6, 25-29].

Důležitou úlohu v udržování homeostase iontů alkalických kovů hraje také  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  antiporter *Nha1* [30], jenž využívá protonový gradient přes plasmatickou membránu (vytvořený ATPasou *Pma1*; [31]) k aktivnímu exportu iontů alkalických kovů. Na rozdíl od *Ena1p*, probíhá export iontů alkalických kovů pomocí *Nha1p* hlavně v prostředí kyselého vnějšího pH. Konstitutivně exprimovaný *Nha1p* je považován za tzv. house-keeping protein, který transportem iontů pomáhá udržování membránového potenciálu a vnitřního pH, účastní se regulace buněčného objemu a hraje určitou roli také v cyklu buněčného dělení [23, 32-35]. *Nha1p* se skládá ze dvou částí, hydrofobní transmembránové části (cca 440 aminokyselin) složené do 12 transmembránových segmentů, která je odpovědná za samotný transport iontů, a C-koncové hydrofilní části (zbylých 545 aminokyselin), která je považována za regulační oblast [32]. Jediným lépe prozkoumaným regulátorem *Nha1p* je kinasa Hog1, která fosforyluje C-koncovou část *Nha1p* v rámci časné odpovědi na osmotický stres a tím umožňuje buňkám přežít akutní fázi hyperosmotického šoku [24]. Aktivitu *Nha1p* mohou dále ovlivnit proteiny Cos3, Ppz1, a Hsp30 [36, 37], jejichž úloha však dosud není zřejmá.

Přestože jsou základní úlohy jednotlivých transporterů iontů alkalických kovů známé, vzájemné interakce mezi transportery a celý systém regulace homeostase iontů alkalických kovů dosud objasněn není.

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo studium fyziologických úloh  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů v kvasinkách. Práce vznikla v prostředí intenzivní mezinárodní spolupráce při výzkumu homeostase iontů alkalických kovů v kvasinkách v rámci projektu ERA SysMo Translucent I a II.

Pro zjištění fyziologických úloh  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů v buňkách kvasinek bylo třeba připravit celou sérii mutantních kmenů postrádajících v různých kombinacích geny kódující jednotlivé transportery iontů alkalických kovů, studovat základní vlastnosti a fyziologické parametry těchto kmenů, a nakonec tyto kmene cíleně využít pro studium úloh  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporterů plasmatické membrány.

K hlavním cílům této disertační práce patří:

- 1) Zjistit, zda existují rozdíly v obsahu iontů alkalických kovů mezi různými kmeny *S. cerevisiae* a od nich odvozenými mutanty.
- 2) Objasnit vzájemné interakce mezi vstupními a výstupními transportery iontů alkalických kovů a zjistit, jakým způsobem je zajištěno přežívání buněk v prostředí s extrémně nízkými nebo vysokými koncentracemi  $\text{K}^+$ .
- 3) Najít dosud neznámé regulátory exporterů iontů alkalických kovů a studovat, jakým způsobem regulace probíhá.
- 4) Využít získané znalosti při studiu heterologně exprimovaných transporterů iontů alkalických kovů z vyšších eukaryot a při vývoji nových metod.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Materiál

#### Kmeny a plasmidy

V práci byly použity kmeny *S. cerevisiae* W303-1A, BY4741 a odvozené mutanty postrádající jeden nebo více genů. Dále byl využit kmen *E. coli* XL Blue a plasmidy *E. coli* a/nebo *S. cerevisiae* YEp352, YCplac33, YEplac195, pGRU1, pUG6, pUG34, pUG35, pU72, pUG73 a plasmidy odvozené, nesoucí různé geny nebo jejich fragmenty. Celkem bylo v rámci práce připraveno 20 nových mutantních kmenů *S. cerevisiae* a více než 10 nových plasmidů.

#### Další materiál a přístroje

K práci byl použit materiál a přístrojové vybavení Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. a partnerských pracovišť (Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. a University of Leiden, Nizozemí). Kromě běžných chemikálií, kulturačních medií a běžně dostupných sad na izolaci a manipulaci s DNA, bylo pro tuto práci v rámci evropských projektů Translucent I a II (SysMo) navrženo medium s minimálním obsahem K<sup>+</sup>. K práci bylo využito běžné přístrojové vybavení mikrobiologické, biochemické a molekulárně biologické laboratoře, dále fluorescenční a konfokální mikroskop, fluorescenční a UV/vis spektrofotometr, čtečka 96 jamkových destiček, AAS spektrometr, přístroj na měření velikosti buněk CASY TT a mikrokapilární systém pro imobilizaci živých buněk CellASIC.

### 3.2 Metodika

#### Mikrobiologické metody:

Kultivace, manipulace a uchovávání buněk *S. cerevisiae* a *E. coli*.

#### Metody genového inženýrství:

Izolace a manipulace s DNA, elektroforetické separace, PCR, transformace buněk *S. cerevisiae* a *E. coli*, příprava delečních mutantů, konstrukce plasmidů, cílená mutagenese, sekvenace DNA apod.

#### Metody charakterisace fenotypu:

Stanovení citlivosti buněk k solím a chemikáliím, růstové křivky, stanovení suché váhy a velikosti buněk, fluorescenční mikroskopie, stanovení obsahu iontů, měření  $\Delta\Psi$ , měření vnitrobuněčného pH, detekce interakce proteinů (BiFC).

Detailní popis materiálu a metodiky se nachází u jednotlivých publikací.

## 4 Výsledky a diskuse

Výsledky této disertační práce jsou shrnuty celkem v pěti publikovaných pracích (kapitola 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 a 4.6), v jednom rukopise (kapitola 4.5) a v jedné další kapitole obsahující stručný popis výsledků projektu aplikovaného výzkumu, o jejichž publikaci se zatím neuvažuje (kapitola 4.7).

### 4.1 Publikace č. 1

#### **Saccharomyces cerevisiae BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance**

Petrezselyová, S., Zahrádka, J., Sychrová, H. *Fungal Biol* **114**, 144-150 (2010)

V oblasti základního výzkumu je celosvětově standardně používáno pouze několik tzv. laboratorních kmenů *S. cerevisiae*. Také v oblasti výzkumu homeostase iontů alkalických kovů je skupina standardně používaných laboratorních kmenů poměrně ustálená, přesto jsou v rámci jednotlivých laboratoří používány ke stejným pokusům různé kmeny. V naší laboratoři byl po dlouhá léta k výzkumu homeostase iontů alkalických kovů využívám kmen W303-1A (viz např. [32]) a od něj odvozené mutanty. Na základě vývoje ve vědecké komunitě, výběru kmenů, u kterých byla v relevantní dobu již známa sekvence genomu, a také na základě nově vznikajících projektů a spoluprací se objevila potřeba vyměnit dosud používaný kmen W303-1A za kmen BY4741. Pro zachování kontinuity a možnosti využití dřívějších výsledků laboratoře bylo v rámci této práce provedeno intenzivní porovnání základních fyziologických parametrů obou kmenů a ukázalo se, že buňky obou kmenů se vzájemně liší např. ve velikosti, objemu, váze sušiny, obsahu  $K^+$ , toleranci k iontům alkalických kovů, amonným a organickým kationtům (např. hygromycin B).

Práce ukázala značné rozdíly v absolutních hodnotách výsledků, které je možné nalézt u dvou běžně používaných kmenů *S. cerevisiae*, poukázala na fakt, že variabilita v rámci jednoho druhu může být významná, a přispěla do diskuse o tom, jestli je při dalším výzkumu důležité pozorované fenotypy ověřovat ve více kmenech s různým genetickým pozadím. Na základě této filosofie musí být pozorovaný fenotyp nezávislý na určitém kmeni *S. cerevisiae* a výsledky jsou považovány za relevantní až po ověření ve více kmenech (viz např. [38]). Jelikož



se v oblasti homeostase iontů alkalických kovů této otázce dříve nikdo systematicky nevěnoval, jsou získané výsledky pro dotčenou vědeckou komunitu velice důležité.

## 4.2 Publikace č. 2

### **Lack of main $K^+$ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions**

Navarrete, C., Petrezselyová, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahrádka, J., Arino, J., Sychrová, H., Ramos, J. *FEMS Yeast Res* **10**, 508-517 (2010)

Při studiu homeostase iontů alkalických kovů byla nejprve věnována pozornost importerům  $K^+$  Trk1 a Trk2. Mezi fenotypy delece *trk1 trk2* patří neschopnost růstu při snížené koncentraci  $K^+$ , zvýšení relativního  $\Delta\Psi$  a vyšší citlivost k organickým kationtům (např. spermin),  $Li^+$  a  $Na^+$  [7, 11, 12]. V rámci dříve publikovaných studií však dosud nebyl podrobně studován přechod buněk z prostředí s nelimitní koncentrací  $K^+$  do prostředí s nízkým obsahem  $K^+$ . V první části byly potvrzeny výsledky předchozích studií. Kmeny postrádající *TRK1* (platí stejně pro kmen postrádající současně *TRK1* a *TRK2*) jsou hyperpolarisované, citlivé ke kationtům ( $Na^+$ ,  $Li^+$  a organickým kationtům) a také ke snížené koncentraci  $K^+$ . Dále byl pozorován pokles vnitrobuněčného pH a snížená schopnost okyselování prostředí jako důsledek delece *trk1*. Vliv delece *trk1* byl pozorován také v prostředí s nelimitujícím (cca 50 – 100 mM) množstvím  $K^+$ , bylo např. pozorováno snížení vnitrobuněčného pH, okyselování okolí buněk a rozdíl v  $\Delta\Psi$ .

V druhé části byla studována časová závislost dějů, které probíhají po přenesení buněk do prostředí bez  $K^+$ , kde byl pozorován intenzivní pokles vnitrobuněčného obsahu  $K^+$  u buněk BY4741 v čase, zatímco u buněk bez *TRK1* a *TRK2* byl pokles mnohem pomalejší. Současně se ztrátou  $K^+$  docházelo k poklesu velikosti buněk BY4741 a tento pokles byl opět mnohem slabší u kmenů postrádajících *TRK1* a *TRK2*. Rozdíl  $\Delta\Psi$  mezi oběma kmeny (hyperpolarisace kmene bez importerů  $K^+$ ), který je značný i při dostatku  $K^+$ , se v prostředí bez  $K^+$  zvětšil. Překvapivě, nebyla pozorována zásadní změna vnitrobuněčného pH v čase u obou kmenů. V práci byly také stanoveny kinetické parametry vstupu kationtů do buněk ( $K_T$  a  $V_{max}$ ; měřením vstupu  $Rb^+$  jako analoga  $K^+$ ) u obou kmenů v závislosti na obsahu  $K^+$  v prostředí. Kinetické parametry se v závislosti na koncentraci  $K^+$  měnily pouze u kmene BY4741, zatímco u kmene postrádajícího *TRK1* a *TRK2* byly konstantní, což potvrzuje, že po delecii importerů

nedochází ke specifickému importu  $K^+$  a vstup nezbytného množství  $K^+$  je zajištěno nespecifickými nízkoafinitními transportery.

Výsledky z této práce, a to především pozorované omezení výstupu  $K^+$  během hladovění buněk na  $K^+$  u kmene bez *TRK1* a *TRK2*, se staly východiskem pro další práci (kapitola 4.3, str. 10), ve které bylo zastavení exportu vlivem delece importerů podrobněji studováno.

### 4.3 Publikace č. 3

#### **Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium limiting conditions**

Zahrádka, J., Sychrová, H. *FEMS Yeast Res* 12, 439-446 (2012)

Z předchozí kapitoly vyplývá, že výstup  $K^+$  z buněk po jejich přenesení do media s nízkým obsahem  $K^+$  probíhá u rodičovského kmene BY4741, ale po deleci genů *TRK1* a *TRK2*, transporterů odpovědných za import  $K^+$ , se tento výstup velmi zpomaluje (kapitola 4.2, str. 9). Bylo zjištěno, že pozorovaný výstup  $K^+$  probíhá přes všechny exportní systémy a že všechny tyto exportery (Ena, Tok1 a Nha1) mají po deleci *trk1* a *trk2* výrazně nižší aktivitu.

Současná inhibice aktivity všech tří exporterů majících odlišný mechanismus transportu (kanál, antiporter, ATPasa) a také rozdílnou regulaci (regulace exprese či post-translační modifikace) naznačovala, že se jedná o obecný regulační jev a ukázalo se, že tímto regulačním prvkem je zvýšený  $\Delta\Psi$ . Pomocí delece *tok1* v kmeni postrádajícím *TRK1* a *TRK2* byla tato skutečnost prokázána. Delece *tok1* má za následek pokles  $\Delta\Psi$ , jenž vede k odblokování exportu  $K^+$  a zmenšování buněk při hladovění na  $K^+$  obdobně jako v kmeni rodičovském se všemi transportery.

Zásadním objev této práce je vzájemné regulace vstupních a výstupních transporterů iontů alkalických kovů a udržování cirkulace  $K^+$ . Již delší dobu se předpokládalo, že neustálá cirkulace  $K^+$  přes plasmatickou membránu je u kvasinek důležitá pro udržování optimálního membránového potenciálu a pro mnoho fyziologických dějů. Až na základě této práce (kapitoly 4.2 a 4.3) bylo překvapivě prokázáno, že k neustálému výstupu  $K^+$  dochází také v prostředí s nedostatkem  $K^+$ , kdy je zjevně energeticky náročné zajistit dostatek  $K^+$  v buňce vysokoafinitním importem. Výstup  $K^+$  navíc neprobíhá pouze jedním exportním systémem, ale je jistě tak, že v případě poruchy (delece) jednoho exporteru zastoupí jeho úlohu exporter další a rychlost celkového výstupu  $K^+$  není ovlivněna. V této práci bylo také poprvé

ukázáno, že ATPasy Ena jsou přítomné a funkční také za standardních podmínek, kdy nebyla předpokládána účelnost jejich exprese.

Bylo prokázáno, že aktivita importerů a exporterů je synchronizována, že se navzájem ovlivňují a že jedním ze spojujících prvků je regulace membránového potenciálu. Výsledky uvedené v této práci umožnily důležitý posun v chápání komplexnosti systému regulace homeostase iontů alkalických kovů, bez těchto výsledků bylo pravděpodobně nemohl vzniknout ani nedávno publikovaný komplexní model homeostase  $K^+$  v kvasinkových buňkách [39].

#### 4.4 Publikace č. 4

##### **Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter**

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 849-858 (2012)

Dalším úkolem této disertační práce bylo identifikovat nové regulátory transporterů iontů alkalických kovů. Na základě nedávno publikovaných dat [38, 40-42] byly proteiny 14-3-3 (kódované v *S. cerevisiae* geny *BMH1* a *BMH2*) identifikovány jako potenciální regulátory homeostase iontů alkalických kovů. Systematickou přípravou a testováním kmenů s různými kombinacemi delecí transporterů iontů alkalických kovů v kombinaci s delecí genu *BMH1* či *BMH2* bylo zjištěno, že ze sledovaných transporterů iontů alkalických kovů je jediným interakčním partnerem proteinů 14-3-3 antiporter Nha1. Nepřítomnost *BMH1* vedla ke snížení tolerance k iontům alkalických kovů pouze u buněk nesoucích gen *NHA1*. Dále bylo zjištěno, že vlivem samotné delece *bmh1* je zvýšena citlivost k organickým kationtům (např. ke sperminu), ale nedochází ke změnám membránového potenciálu. V tomto případě jde pravděpodobně o regulaci intracelulární detoxifikace organických kationtů (např. sekvestrace do vakuol). Při absenci *BMH1*, může být role Bmh1p zastoupena umělým zvýšením exprese *BHM2*, oba geny tedy hrají v homeostasi iontů alkalických kovů stejnou úlohu, ale liší se úrovní exprese. V druhé části práce byla prokázána přímá interakce proteinů 14-3-3 s antiporterem Nha1. Při hledání místa interakce v sekvenci Nha1p bylo zjištěno, že interakce probíhá na více místech, nejméně jedno leží v C-koncové cytosolické části Nha1p a alespoň jedno v části transmembránové (pravděpodobně v cytosolicky orientovaných smyčkách; [43]). Na základě průzkumu specializovaných databází bylo v sekvenci Nha1p

(kromě zbytků fosforylovaných Hog1p; [24]) nalezeno dvanáct dalších míst potenciální fosforylace a tudíž potenciálních míst vazby proteinů 14-3-3.

V rámci této práce byl identifikován nový regulátor homeostase iontů alkalických kovů v kvasinkách, proteiny 14-3-3, které se účastní regulace prostřednictvím více přímých interakcí s Nha1p. Proteiny 14-3-3 působí jako pozitivní regulátory Nha1p odpovědné za plnou aktivaci antiporteru.

## 4.5 Rukopis č. 5

### **Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis**

Zahrádka, J., Sychrová, H. rukopis (2013)

Stejně jako předchozí publikace se také tato zabývá identifikací nových interakčních partnerů a proteinů schopných regulovat transportery iontů alkalických kovů. V rámci této práce byly hledány charakteristické sekvenční motivy kvasinkových kinas pro identifikovaná místa fosforylace a po odborné konzultaci (Dr. O. Schmidt, Freiburg, Německo) byla navržena pravděpodobná fosforylace zbytků S669 a S683 v sekvenci Nha1p kaseinkinasou 2 (CK2). Jedna z katalytických podjednotek CK2, Cka1p byla již dříve identifikována jako pozitivní regulátor exprese *ENA1* [44]. V první části práce bylo ověřeno, že Cka1p hraje důležitou roli v regulaci homeostase iontů alkalických kovů prostřednictvím regulace exprese *ENA1* a nikoli regulace aktivity Ena1p. Dále byly studovány další možné role Cka1p v regulaci homeostase iontů alkalických kovů.

Ukázalo sem že, Cka1p se účastní také regulace aktivity Nha1p a na regulaci homeostase iontů alkalických kovů se podílí ještě alespoň jedním mechanismem nezávislým na exporterech Ena a Nha1, který je pravděpodobně spojen s regulací  $\Delta\Psi$ . V druhé části bylo hledáno místo interakce (pravděpodobně fosforylace některého zbytku Nha1p) mezi Nha1p a Cka1p. Po charakterisaci fenotypů bylo zřejmé, že žádný z testovaných zbytků (S669 a S683) nebyl odpovědným za regulaci Nha1p pomocí Cka1p. Překvapivě bylo zjištěno, že zbytek (nebo více zbytků) odpovědný za interakci Nha1p s Cka1p se pravděpodobně nachází v některé z intracelulárních smyček v rámci prvních 472 zbytků v sekvenci Nha1p a že k této interakci není nutný hydrofilní C-konec. Bylo predikováno celkem 13 předpokládaných míst fosforylace Nha1p kinasou Cka1p, které je nutno v budoucnu otestovat. V rámci této práce

byly identifikovány dosud neznámé cesty, kterými je podjednotka CK2, kinasa Cka1 schopna regulovat homeostasi iontů alkalických kovů.

Tato publikace byla zařazena ve formě rukopisu, který je připravován k zaslání do časopisu Microbiology (SGM).

#### **4.6 Publikace č. 6**

##### **Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae***

Huang, X., Morse, L.R., Xu, Y., Zahrádka, J., Sychrová, H., Stashenko, P., Fan, F., Battaglini, R.A. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1241-1247 (2010)

V rámci této práce byl studován jeden z lidských homologů antiporteru Nha1p, NHAoc/NHA2, který je exprimovaného selektivně pouze v osteoklastech. Tento transporter byl studován v kvasinkách tak, že jeho cDNA byla exprimována v kvasinkových buňkách postrádajících přirozené exportery iontů alkalických kovů, tedy geny *ENA* a *NHA1*. Aktivita antiporteru byla následně testována. Byly identifikovány tři zbytky v sekvenci NHAoc/NHA2 (I159, V161 a F357), k jejichž záměně může v lidských buňkách docházet vlivem jednonukleotidových polymorfismů (SNP; single nucleotide polymorphism). Tyto zbytky byly společně s dalšími evolučně konservovanými zbytky cíleně mutovány a bylo pozorováno, že se jedná o důležité zbytky pro aktivitu proteinu.

Na základě získaných dat bylo zřejmé, že mutace v evolučně konservovaných zbytcích a ve zbytcích, které mohou být mutovány díky SNP, zásadně ovlivňují aktivitu lidského antiporteru NHAoc/NHA2 a tím mohou pravděpodobně ovlivňovat správnou diferenciaci kostních buněk a stát v pozadí rozvoje poruch tvorby kostí, osteopetrose. Místa SNP vedoucí v lidském organismu k mutacím ve sledovaných zbytcích tak pravděpodobně jsou důležitým faktorem určujícím predispozici k tomuto onemocnění.

#### **4.7 Nepublikované výsledky, metodika měření vnitrobuňčného pH**

Součástí této disertační práce jsou také nepublikované výsledky projektu aplikovaného výzkumu. V rámci získaného grantu probíhala spolupráce s firmou DEL, a.s. zaměřenou na vývoj software pro průmyslové podniky. Výsledkem spolupráce byl vznik nové metody a funkční aplikace Ocellaris ([www.ocellaris.cz](http://www.ocellaris.cz)) pro automatickou analýzu mikroskopických snímků, která umožňuje měření pH v mikroskopu v jednotlivých buňkách kvasinek

exprimujících pH senzitivní verzi zeleného fluorescenčního proteinu (pHluorin). Při této metodě bylo také využito nového mikrokapilárního systému CellASIC umožňujícího imobilizaci živých buněk v zorném poli mikroskopu.

Pomocí nově vytvořené metody měření pH byly nejdříve ověřeny výsledky dříve publikované, ale následně byla prověřena schopnost metody identifikovat více subpopulací z hlediska pH a dalších parametrů. Jednou z výhod této metody bylo také to, že z měření bylo možné odstranit buňky s nedostatečnou expresí pHluorinu, nebo např. takové, jejichž kalibrační křivka byla nestandardní (to bylo pozorováno často u starých a zjevně narušených buněk s vysokou autofluorescencí) tak, aby nedocházelo k zvyšování nepřesnosti měření. Pomocí této metody je možné získávat unikátní soubory dat o vnitrobuněčném pH buněk, v reálném čase *in vivo*, a jeho závislosti na mnoha faktorech.

## 5 Závěry

Výsledky uvedené v této disertační práci byly publikovány v 5 článcích a 1 další rukopis je připraven pro odeslání k recenzi. Pro experimentální práci bylo připraveno a použito více než 20 nových mutantních kmenů *S. cerevisiae* a více než 10 nových plasmidů a byla využita celá řada pokročilých metod z oblasti molekulární biologie, biochemie, buněčné fyziologie a fyzikální chemie. Na základě krátké zahraniční stáže byla převzata a v naší laboratoři zavedena metoda pro měření interakcí proteinů *in vivo*. V neposlední řadě byla v rámci spolupráce s komerční firmou navržena a vytvořena softwarová aplikace umožňující unikátní sledování změn vnitrobuněčného pH *in vivo* v reálném čase v jednotlivých buňkách v různém prostředí.

V rámci této práce:

- 1) Bylo zjištěno, že mezi dvěma laboratorními kmeny *S. cerevisiae* a jejich mutanty existují značné rozdíly nejen v obsahu iontů alkalických kovů, ale také např. ve velikosti buněk a citlivosti k solím. Práce upozornila na fakt, že rozdíly mezi kmeny v rámci jednoho druhu mohou být významné a proto lze předpokládat pouze omezenou možnost ztotožňování výsledků z různých kmenů *S. cerevisiae*.
- 2) Vznikly výsledky, které pomohly lépe pochopit problematiku vzájemných interakcí vstupních a výstupních transporterů  $K^+$ , přinesly nové světlo do regulace transporterů

odpovědných za export iontů alkalických kovů, antiporteru Nha1 a ATPas Ena, a jejich zapojení do funkčního celku společně s importery K<sup>+</sup>.

3) Byly nalezeny dva dosud neznámé regulátory antiporteru Nha1, proteiny 14-3-3 a kinasa Cka1. V obou případech se jedná o pozitivní regulátory aktivity Nha1p a jejich přítomnost je nezbytná pro plnou aktivaci Nha1p v prostředí solného stresu.

4) Získané znalosti byly využity při studiu lidského antiporteru NHAoc/NHA2 heterologně exprimovaného v kvasinkách. Byla studována závislost aktivity transporteru na mutacích specificky zavedených do jeho cDNA a bylo nalezeno několik zbytků, jejichž mutace mohou pravděpodobně ovlivnit vznik a rozvoj závažné choroby u lidí.

Výsledky práce byly publikovány v renomovaných mezinárodních časopisech a prezentovány na zahraničních kongresech a konferencích. Vytýčené cíle této disertační práce tak byly v plné šíři splněny.

## 6 Použitá literatura

1. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G.: Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547 (1996).
2. Botstein, D., Chervitz, S., Cherry, M.: Yeast as a Model Organism. *Science* **277**, 1259-1260 (1997).
3. Mager, W.H., Winderickx, J.: Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 265-273 (2005).
4. Armstrong, W.M., Rothstein, A.: Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J Gen Physiol* **48**, 61-71 (1964).
5. Rodriguez-Navarro, A.: Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 1-30 (2000).
6. Arino, J., Ramos, J., Sychrova, H.: Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 95-120 (2010).
7. Gaber, R.F., Styles, C.A., Fink, G.R.: *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2848-2859 (1988).
8. Ko, C.H., Buckley, A.M., Gaber, R.F.: *TRK2* is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**, 305-312 (1990).
9. Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A.: NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **432**, 59-64 (1998).
10. Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A.: Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**, 109-118 (2002).
11. Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P.O.: Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* **47**, 767-780 (2003).
12. Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., Rodriguez-Navarro, A.: Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**, 14838-14844 (1998).

13. Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., Serrano, R.: The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**, 920-929 (2002).
14. Merchan, S., Bernal, D., Serrano, R., Yenush, L.: Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot Cell* **3**, 100-107 (2004).
15. Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R.: A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* **19**, 3328-3337 (1999).
16. Forment, J., Mulet, J.M., Vicente, O., Serrano, R.: The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 36-40 (2002).
17. Fell, G.L., Munson, A.M., Croston, M.A., Rosenwald, A.G.: Identification of yeast genes involved in K<sup>+</sup> homeostasis: loss of membrane traffic genes affects k uptake. *G3 (Bethesda)* **1**, 43-56 (2011).
18. Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., Serrano, R.: pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* **25**, 8683-8692 (2005).
19. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O.: Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241-4257 (2000).
20. Michel, B., Lozano, C., Rodriguez, M., Coria, R., Ramirez, J., Pena, A.: The yeast potassium transporter *TRK2* is able to substitute for *TRK1* in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* **23**, 581-589 (2006).
21. Vidal, M., Buckley, A.M., Yohn, C., Hoepfner, D.J., Gaber, R.F.: Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of *TRK2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2370-2374 (1995).
22. Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D.: Gating and conductance in an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* **132**, 183-199 (1993).
23. Maresova, L., Urbankova, E., Gaskova, D., Sychrova, H.: Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* **6**, 1039-1046 (2006).
24. Proft, M., Struhl, K.: MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**, 351-361 (2004).
25. Haro, R., Garciadeblas, B., Rodriguez-Navarro, A.: A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**, 189-191 (1991).
26. Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., Arino, J.: The transcriptional response of the yeast Na<sup>+</sup>-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* **281**, 36632-36642 (2006).
27. Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., Arino, J.: The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**, 17249-17255 (2000).
28. Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H.K.: The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**, 3870-3882 (1995).
29. Marquez, J.A., Serrano, R.: Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* **382**, 89-92 (1996).
30. Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrova, H.: Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**, 89-93 (1996).
31. Seto-Young, D., Perlin, D.S.: Effect of membrane voltage on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 1383-1389 (1991).
32. Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., Potier, S.: The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144** 2749-2758 (1998).
33. Kinclova-Zimmermannova, O., Gaskova, D., Sychrova, H.: The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**, 792-800 (2006).
34. Sychrova, H.: Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S91-98 (2004).
35. Sychrova, H., Ramirez, J., Pena, A.: Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**, 167-172 (1999).



36. Mitsui, K., Ochi, F., Nakamura, N., Doi, Y., Inoue, H., Kanazawa, H.: A novel membrane protein capable of binding the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 12438-12447 (2004).
37. Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., Michnick, S.W.: An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465-1470 (2008).
38. Barreto, L., Canadell, D., Petrezselyova, S., Navarrete, C., Maresova, L., Perez-Valle, J., Herrera, R., Olier, I., Giraldo, J., Sychrova, H., Yenush, L., Ramos, J., Arino, J.: A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **10**, 1241-1250 (2011).
39. Ke, R., Ingram, P.J., Haynes, K.: An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol* **9**, e1002879 (2013).
40. Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Shimizu, H.: Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**, 32-44 (2009).
41. Lehoux, S., Abe, J., Florian, J.A., Berk, B.C.: 14-3-3 Binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Biol Chem* **276**, 15794-15800 (2001).
42. Latz, A., Becker, D., Hekman, M., Muller, T., Beyhl, D., Marten, I., Eing, C., Fischer, A., Dunkel, M., Bertl, A., Rapp, U.R., Hedrich, R.: TPK1, a Ca<sup>2+</sup>-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K<sup>+</sup> channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* **52**, 449-459 (2007).
43. Mitsui, K., Kamauchi, S., Nakamura, N., Inoue, H., Kanazawa, H.: A conserved domain in the tail region of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) plays important roles in localization and salinity-resistant cell-growth. *J Biochem* **135**, 139-148 (2004).
44. Berkey, C.D., Carlson, M.: A specific catalytic subunit isoform of protein kinase CK2 is required for phosphorylation of the repressor Nrg1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **50**, 1-10 (2006).

## Curriculum vitae

### Osobní údaje:

Jméno: **Jaromír Zahradka**  
Adresa: Čílova 1803/2  
162 20  
Praha 6  
Kontakt: Tel: 724 733 084 e-mail: [zahradka@iocb-tto.cz](mailto:zahradka@iocb-tto.cz)  
Narozen: 11. 5. 1984 v Ústi nad Orlicí

### Zaměstnání:

od 11/2012 *pozice: specialista transferu technologií*  
IOCB TTO s.r.o., Flemingovo nam. 2, Praha 6, 166 10

09/2008 – 10/2012 *pozice: Vědecký pracovník/PhD. student,*  
Oddělení membránového transportu, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.  
Václavská 1083, Praha 4 - Krč, 142 20

### Vzdělání:

od 09/2008 *Postgraduální studium: Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta,*  
Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie

Disertační práce: "Fyziologické úlohy kvasinkových Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů"  
*Školitelka:* RNDr. Hana Sychrová, DrSc., Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

09/2006 – 06/2008 *Magisterské studium: Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta,*  
Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie

Diplomová práce: "Příprava a charakterizace plasmidu YEX-GFP-Nha1 a jeho využití pro studium proteinu Nha1 ze *Saccharomyces cerevisiae*"  
*Školitelka:* RNDr. Hana Sychrová, DrSc., Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

09/2003 – 06/2006 *Bakalářské studium: Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta,*  
Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie

Bakalářská práce: "Oxidasová aktivita diaforasy a lipoamiddehydrogenasy"  
*Školitel:* Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PŘF UK

09/1995 – 09/2003 *Středoškolské vzdělání: Všeobecné gymnázium Žamberk*

**Jazyky:** Angličtina: plynule slovem i písmem, FCE Certificate (12/2010)  
Němčina: základy

v Praze 12. 6. 2013

## Seznam publikací

Petrezselyová, S., Zahrádka, J., Sychrová, H.: *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* **114**, 144-150 (2010). IF = 1,43

Navarrete, C., Petrezselyová, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahrádka, J., Arino, J., Sychrová, H., Ramos, J.: Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **10**, 508-517 (2010). IF = 2,40

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **12**, 439-446 (2012). IF = 2,40

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 849-858 (2012). IF = 4,66

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis. *rukopis* (2013).

Huang, X., Morse, L.R., Xu, Y., Zahrádka, J., Sychrová, H., Stashenko, P., Fan, F., Battaglino, R.A.: Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1241-1247 (2010). IF = 4,66

Tyto publikace a disertační práce vznikly v rámci projektů:

GA AV ČR IAA500110801 (2008-2012) Úloha přenašečů Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> v buněčné fyziologii - souhra transportérů v optimalizaci vnitrobuněčné homeostáze K<sup>+</sup> a pH

GA ČR 204/08/0354 (2008-2010) Homeostáze kationů alkalických kovů v biologii *Saccharomyces cerevisiae*

MŠMT LC531 (2005-2011) Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek

MŠMT COST OC10012 (2010-2012) Transport kationů a protonů přes buněčné membrány - molekulární struktura a mechanismus aktivity Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporterů nižších eukaryot

MŠMT specifický vysokoškolský výzkum, projekt 33779266 (2010-2012)

TA 01011467 (2011-2012) SW analýza změn v mikroskopických obrazech buněčných struktur s využitím fluorescenčních indikátorů

výzkumný záměr AV0Z50110509 (2005-2011) Výzkum molekulárních a buněčných základů fyziologických a patofyziologických procesů s cílem objasnit mechanismy vzniku závažných onemocnění člověka

a s využitím zdrojů na dlouhodobý koncepční Rozvoj Výzkumné Organizace, RVO:67985823

## Seznam abstraktů z konferencí

Zahrádka, J., Flegelová-Kučerová, H., Sychrová, H.: The biogenesis and activity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter tagged by GFP. *5th Meeting of Biomedical Doctoral Schools ULP Strasbourg and UK Prague*, Strasbourg, Prague, **O** (2008).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Asparagine 67 of the first internal loop is important for the substrate specificity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress - Young Scientists Program*, Shanghai, China, **P**, p. 19 (2009).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: substrate specificity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter is influenced by internal-loop residue Asn67. *FEBS – EMBO Advanced Lecture Course: Molecular and Cellular Membrane Biology*, Cargese, France, **P** (2009).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: internal-loop residue N67 is involved in the substrate specificity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *37th Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, **P**, p. 80 (2009).

Petrezselyova, S., Zahrádka J., Sychrova, H.: Role of uptake and efflux systems in potassium starvation of *S. cerevisiae* cells. *the 27<sup>th</sup> ISSY*, Paris, France, **P**, p.149 (2009).

Zahrádka J., Sychrová, H.: 14-3-3 Proteins are involved in regulation of alkali-metal-cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting Vancouver*, Canada, **P**, p. 274 (2010).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Role of 14-3-3 proteins in alkali-metal-cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *38th Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, **O**, p. 42 (2010).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1 interacts with the 14-3-3 protein. *25<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*, Olsztyn, Poland, **P**, p. S67 (2011).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 Proteins Interact with Plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *The 5<sup>th</sup> International Course in Yeast Systems Biology*, Göteborg, Sweden, **O** (2011).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 Proteins Regulate the Activity of Plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *39<sup>th</sup> Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, **P**, p. 114, (2011)

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter is Regulated by 14-3-3 Proteins. *Meeting of TRANSLUCENT II – SysMO project*, London, UK, **O**, (2011)

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter is Regulated by 14-3-3 Proteins. *Proceedings of PhD Student Workshop, Třešť, CR, Physiol Res* **60**, **O**, p. 23 (2011)

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of alkali-metal-cation homeostasis via physical interaction with Nha1 antiporter. *The 2012 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting*, Princeton, NJ, USA, **P**, (2012)

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H. Role of 14-3-3 proteins in yeast cation homeostasis. *Abstracts of the 30th SMYTE*, Salamanca, Spain, **O**, p. 25 (2012).

---

O ústní prezentace

P plakátové sdělení

(prezentující autor je podtržen)

**Charles University in Prague, Faculty of Science**

**Department of Biochemistry**

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



**Physiological role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in yeast cells**

**Jaromír Zahrádka**

Supervisor: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Prague, 2013

# Content

<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>4</b>
<b>2 Aims of the study</b>	<b>6</b>
<b>3 Materials and methods</b>	<b>7</b>
3.1 Materials	7
3.2 Methods	7
<b>4 Results and discussion</b>	<b>8</b>
4.1 Publication No. 1	8
4.2 Publication No. 2	8
4.3 Publication No. 3	9
4.4 Publication No. 4	10
4.5 Manuscript No. 5	11
4.6 Publication No. 6	12
4.7 Unpublished results, internal pH measurement method	12
<b>5 Conclusions</b>	<b>14</b>
<b>6 References</b>	<b>15</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>17</b>
<b>Selected publications</b>	<b>18</b>
<b>Selected abstracts</b>	<b>19</b>

The thesis originated in the Department of Membrane Transport, Institute of Physiology AS CR, v.v.i. and internal defense of this thesis took place at the Institute of Physiology AS CR, v.v.i. on May 16, 2013.

## Abstract

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* belongs to important models for alkali-metal-cation homeostasis research. As other cells, certain intracellular content of  $K^+$  is necessary for *S. cerevisiae*, but  $Na^+$  or other alkali metal cations ( $Li^+$ ,  $Rb^+$ ) are toxic for yeast cells. Uniporters Trk1 and Trk2 are responsible for  $K^+$  accumulation, while efflux of  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Rb^+$  and  $K^+$  is ensured by Ena ATPases,  $Na^+(K^+)/H^+$  antiporter Nha1 and  $K^+$  specific channel Tok1. Several regulators of  $K^+$  ( $Na^+$ ) transporters are already known, but reciprocal regulation between transporters and overall picture of the maintenance of alkali-metal-cation homeostasis is still unclear. In this work,  $K^+$  circulation (simultaneous uptake and export of  $K^+$ ) was shown to be important in alkali-metal-cation homeostasis maintenance.  $K^+$  circulation is maintained using reciprocal regulation and interactions between  $K^+$  exporters and importers. Though obtained results showed that the alkali-metal-cation homeostasis and associated physiological parameters (e.g. membrane potential, cell size, salt sensitivity) are strain specific, Nha1p was verified to be important for cell survival in ever-changing natural environment. Furthermore, two novel positive regulators of Nha1p activity were found, 14-3-3 proteins and Cka1 kinase. 14-3-3 proteins interact physically with multiple parts of Nha1p. Cka1 kinase was previously known as *ENA1* expression regulator, moreover, regulation of Nha1p activity by Cka1p was observed in this work. Using knowledge and skills obtained during this work, *S. cerevisiae* strain lacking its own alkali-metal-cation exporters was used for characterization of human Nha1p homologue,  $Na^+/H^+$  antiporter NHAoc/NHA2. Residues, whose mutation could be one of crucial points in the development of serious bone disease (osteopetrosis) in human, were identified in the NHAoc/NHA2 sequence. Altogether, results obtained in this work helped for better understanding the role of Nha1p and other transporters in maintenance of alkali-metal-cation homeostasis and its regulation, furthermore, an important progress has been made in methodology (especially in intracellular pH measurement) which will help in future studies.

# 1 Introduction

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been widely used for bread and fermented beverages production for thousands of years and it is one of the longest studied organisms. *S. cerevisiae* is also an important model organism for basic and applied research as its genome was the first eukaryotic genome sequenced [1] or because a vast number of molecular biology and genetic tools were developed for easy DNA manipulations such as mutations, deletions and insertions of yeast genes or genes from other organisms [2, 3]. Alkali-metal-cation homeostasis is one of important research fields where yeast *S. cerevisiae* has been used for decades. Similarly to other organisms,  $K^+$  is the major intracellular cation in *S. cerevisiae* and it plays important role in cell physiology such as maintenance of suitable conditions for protein synthesis and enzymatic reactions, maintenance of membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), regulation of cell volume, osmotic pressure and internal pH. On the other hand,  $Na^+$  and other alkali-metal-cations are toxic even in slightly increased intracellular concentrations [4-6].

Active  $K^+$  uptake via  $K^+$  specific uniporters Trk1 and Trk2 is necessary for accumulation of required intracellular concentration of  $K^+$  (circa 200 mM  $K^+$ ; [6]) in environment with limited concentration of  $K^+$  [7, 8]. Trk1p plays major role compared to Trk2p [6]. In absence of *TRK1* or both *TRK1* and *TRK2*, cells are not able to grow without significantly increased concentration of  $K^+$  in the media [9-11]. Among physiological roles of  $K^+$  importers belong maintenance of  $K^+$  homeostasis and pH [12, 13], turgor [14] and  $\Delta\Psi$  [12, 15]. Regulation of Trk1p and Trk2p is not fully elucidated yet. Hal4, Hal5 and Sky1 kinases, calcineurin and Ppz1 phosphatases or Hal3 protein were identified among known regulators of Trk1p and Trk2p activity. Recently, proteins responsible for vesicular transport or inositol kinases were identified among  $K^+$  uptake regulators [6, 16-18]. To our knowledge, expression of *TRK1* and *TRK2* is constitutive [19-21].

Efflux of toxic cations ( $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Rb^+$ ) and surplus of  $K^+$  is mediated by three exporters with different transport mechanism and regulation, channel Tok1, ATPases Ena and antiporter Nha1 [6]. Voltage-gated channel Tok1 opens with plasma membrane (PM) depolarization and mediates specific efflux of  $K^+$  [11, 22]. Deletion of *TOK1* results in PM depolarization, while hyperpolarization occurs after *TOK1* overexpression [23]. Phosphorylation by Hog1 kinase is the only regulation which is so far known for Tok1p [24].



*ENA* ATPase genes are usually present in 2 to 4 copies in *S. cerevisiae* genome, but Ena1p plays the major role in alkali-metal-cation homeostasis [6, 25]. Ena1p is thought to determine cell sensitivity to increased concentrations of Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup>. Its role, export of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, is crucial in alkaline pH where alkali-metal-cation export via Nha1 antiporter is inhibited (see below). *ENA1* expression is strongly regulated, contrary to all other alkali-metal-cation transporters. It is upregulated in the presence of Na<sup>+</sup>, upon osmotic stress or at high pH and many transcription factors and signaling pathways participate on *ENA1* expression regulation. Hog1, Snf1 and Cka1 kinases, calcineurin phosphates or Rim101 transcription factor activate *ENA1* expression, while Ppz1 phosphatase, protein kinase A or Ngr1 and Sko1 transcription factors belong to *ENA1* repressors [6, 25-29].

Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter Nha1 is an important player in alkali-metal-cation homeostasis maintenance [30]. Inward proton gradient generated by Pma1 ATPase across the PM [31] energizes active efflux of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> [32]. Nha1p consists of two parts, hydrophobic transmembrane part (first circa 440 residues), folded in 12 transmembrane segments, which is responsible for alkali-metal-cation transport, and C-terminal hydrophilic part (remaining 545 residues) which is thought to have a regulatory role [32]. Contrary to Ena1p, efflux of cations via Nha1p is important in acidic external pH, while in alkaline pH Nha1p is almost inactive. Constitutively expressed housekeeping Nha1p plays important role in maintenance of  $\Delta\Psi$  and intracellular pH; it participates in regulation of cell volume and cell cycle [23, 32-35]. Activity of Nha1p is regulated by Hog1 kinase via phosphorylation of Nha1p C-terminus which allows cells to survive acute phase of hyperosmotic shock [24]. Additionally, Nha1p activity is influenced by Cos3, Ppz1, and Hsp30 proteins [36, 37].

While roles of individual alkali-metal-cation transporters are thought to be elucidated, reciprocal interactions of transporters and overall picture of alkali-metal-cation homeostasis regulation remain unclear.

## 2 Aims of the study

The main goal of this study was to characterize physiological roles of yeast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters. The thesis was originated in an environment of intense international research collaboration in the ERA SysMo Translucent I and II projects aiming to study homeostasis of alkali metal cations in yeast.

To study physiological roles of yeast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters, series of mutant strains lacking various combinations of alkali-metal-cation transporter genes were prepared. Growth and physiological parameters of all strains were characterized and these strains were used for studies of plasma-membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter roles.

Aims of this thesis were to:

- 1) Elucidate differences in alkali-metal-cation homeostasis in two widely used *S. cerevisiae* strains and their mutants.
- 2) Analyze reciprocal interactions between importers and exporters of alkali metal cations and study mechanisms of cell survival upon  $\text{K}^+$ -limiting conditions or upon significantly increased  $\text{K}^+$  concentrations.
- 3) Search for novel regulators of alkali-metal-cation exporters and study mechanisms of regulation.
- 4) Use yeast for study of heterologously expressed alkali-metal-cation transporter from higher eukaryotes and for novel methods development.

## 3 Materials and methods

### 3.1 Materials

#### Strains and plasmids

*S. cerevisiae* strains W303-1A, BY4741 and their derivatives lacking one or various combinations of genes were used in this thesis simultaneously with *E. coli* XL Blue strain. Yeast and/or *E. coli* plasmids were used: YEp352, YCpla33, YEplac195, pGRU1, pUG6, pUG34, pUG35, pU72, pUG73 and their derivatives bearing various genes or gene fragments.

#### Materials and Instruments

Materials and instruments of Institute of Physiology AS CR, v.v.i. were used in this work, furthermore, materials and instruments of collaborative partners (Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Prague and Leiden University, Nederland) were used in specific cases. Beside common chemicals, growth media and common DNA isolation and manipulation kits, a novel media with very limited K<sup>+</sup> was designed for Translucent I and II projects and used in this study. Common instruments of microbiology, biochemistry and molecular biology laboratory were used in this work, moreover, fluorescence and confocal microscopes, fluorescence and UV/vis spectrophotometers, 96-well plate reader, AAS spectrometer, cell counter CASY TT and microfluidic system for cell imaging CellASIC were used.

### 3.2 Methods

#### Microbiology methods:

Cell cultivation, manipulation and storage of *S. cerevisiae* and *E. coli* cells.

#### Genetic engineering methods:

DNA isolation, electrophoretic separation, PCR, gene deletion, plasmid construction and site-directed mutagenesis, DNA sequencing, transformation of *S. cerevisiae* and *E. coli*.

#### Phenotype characterization methods:

Tests of tolerance to salts and drugs, growth curves, cell size and dry weight estimation, fluorescence microscopy, cation content measurement, relative membrane potential measurement, internal pH assay, Bimolecular fluorescence complementation (BiFC).

Materials and methods are described in detail in each publication.

## 4 Results and discussion

Results of this thesis were published in five publications (chapters 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 and 4.6), in one manuscript (chapter 4.5) and in one chapter describing unpublished results of an applied research project (chapter 4.7).

### 4.1 Publication No. 1

#### ***Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance**

Petrezselyová, S., Zahrádka, J., Sychrová, H. *Fungal Biol* **114**, 144-150 (2010)

Only limited number of *S. cerevisiae* strains is widely used in yeast research and some of them were labeled as standard laboratory strains. Similar situation is in the field of alkali-metal-cation homeostasis research, different strains are used in different laboratories which complicate transfer of results between the laboratories. *S. cerevisiae* W303-1A strain and its derivatives have been used in our laboratory to study alkali-metal-cation homeostasis for years (e.g. [32]), but because of novel collaborative projects and recent development in the field, it was decided to start to work with BY4741 strain instead of W303-1A. To ensure continuity in results in our laboratory, a number of physiological parameters of both strains was established and compared in this work. Many differences were found in cell size and volume, dry weight, tolerance to alkali metal cations and drugs (e.g. hygromycin B) and in  $\Delta\Psi$ . Results suggested that though the two strains do not differ in the total potassium content, the regulation of intracellular potassium homeostasis is probably not the same in BY4741 and W303-1A cells and resulting variability within common laboratory *S. cerevisiae* strains could be significant. This work contributed to the discussion how important could be a validation of obtained results in more strains with different genetic backgrounds (see [38]).

### 4.2 Publication No. 2

#### **Lack of main $K^+$ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions**

Navarrete, C., Petrezselyová, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahrádka, J., Arino, J., Sychrová, H., Ramos, J. *FEMS Yeast Res* **10**, 508-517 (2010)

Interactions of  $K^+$  importers (Trk1 and Trk2) with alkali-metal-cation exporters were studied in the second publication. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain and the corresponding mutant lacking the main potassium uptake systems (*trk1 trk2*) under  $K^+$  nonlimiting and limiting concentrations was performed, and novel important differences between both strains were found. First, previously published results [7, 11, 12] were verified. *TRK1* lacking cells (similarly to cells lacking both *TRK1* and *TRK2*) were hyperpolarized and sensitive to cations ( $Na^+$ ,  $Li^+$  and cationic drugs) or to limitation of  $K^+$ . Furthermore, a comparable cell size and potassium content with BY4741, but decreased intracellular pH and decreased acidification of media were observed in *trk1* (or *trk1 trk2*) strain.

Upon transfer to  $K^+$ -limiting conditions, cells of both, BY4741 and *trk1 trk2* strains became hyperpolarized and their cell volume and  $K^+$  content diminished; however, the decrease was more relevant in BY4741.  $K^+$  limitation triggered a high-affinity  $K^+/Rb^+$  uptake process only in BY4741, but intake of required amount of  $K^+$  was ensured only by nonspecific low-affinity transporters in *trk1 trk2* strain.

By establishing basic cellular parameters under standard growth conditions, this work established a basis for the investigation of  $K^+$  homeostasis at the system level,  $K^+$  efflux in *trk1 trk2* strain was studied in detail upon transfer to  $K^+$ -limiting conditions in following chapter.

### 4.3 Publication No. 3

#### **Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium limiting conditions**

Zahrádka, J., Sychrová, H. *FEMS Yeast Res* **12**, 439-446 (2012)

As described in previous chapter, *S. cerevisiae* extrudes  $K^+$  cations even when  $K^+$  is only present in scarce amounts in the environment. Lost  $K^+$  is taken up by the Trk1 and Trk2 uptake systems, but if the Trk transporters are absent or nonfunctional, the efflux of  $K^+$  is significantly diminished (see above). A series of experiments with strains lacking various combinations of alkali-metal-cation efflux and uptake systems revealed that all three exporters, the Nha1 antiporter, Ena ATPase and Tok1 channel contribute to  $K^+$  homeostasis and are active upon  $K^+$  limitation in wild-type cells. In *trk1 trk2* strain, the  $K^+$  efflux via

exporters Nha1 and Ena1 was diminished and could be restored either by the expression of *TRK1* or deletion of *TOK1*, which resulted in depolarization of hyperpolarized *trk1 trk2* strain. Thus, it was the plasma-membrane potential which served as the common mechanism regulating the activity of K<sup>+</sup> exporting systems. A continuous uptake and efflux of K<sup>+</sup> (K<sup>+</sup> circulation) were observed in yeast cells to regulate their membrane potential and thereby other physiological parameters, e.g. cells were able to quickly and efficiently compensate for a malfunction of K<sup>+</sup> transport in one direction by diminishing the transport in the other direction.

The continuous uptake and efflux of K<sup>+</sup> was studied for the first time in this thesis, furthermore, observed expression and activity of Ena transporters in standard conditions (without induction of expression) was not presumed previously. Results in this and previous chapter contributed significantly to better understanding of alkali-metal-cation homeostasis at the system level which enabled recent publication of complex model of K<sup>+</sup> homeostasis [39].

#### **4.4 Publication No. 4**

##### **Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter**

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 849-858 (2012)

Novel regulators of alkali-metal-cation transporters were searched in this publication and 14-3-3 proteins were identified as putative regulators of alkali-metal-cation homeostasis recently [38, 40-42]. Deletion of *BMH1*, encoding the major 14-3-3 isoform, resulted in an increased sensitivity to Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> and to cationic drugs but did not affect the membrane potential. This *bmh1* phenotype was complemented by overexpression of *BMH2*. Testing the genetic interaction between *BMH* genes and genes encoding alkali-metal-cation transporters revealed, that 14-3-3 proteins neither interact with the potassium uptake systems (Trk1p or Trk2p), nor with the Tok1 channel nor with Ena ATPases. Instead, a genetic interaction was identified between *BMH1* and *NHA1*. In addition, a physical interaction between 14-3-3 proteins and the Nha1 antiporter was shown. This interaction does not depend on the phosphorylation of the Nha1 antiporter by Hog1 kinase [24]. Furthermore, at least one interaction site was found to be in cytosolic C-terminal part of Nha1p and at least one site in

the transmembrane part (e.g. in internal loops; [43]). In summary, more than one interaction site for binding 14-3-3 proteins is present in Nha1p.

Our results uncovered previously unknown interaction partners of Nha1p, yeast 14-3-3 proteins, which are positive regulators of Nha1p activity.

## 4.5 Manuscript No. 5

### **Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis**

Zahrádka, J., Sychrová, H. *manuscript* (2013)

Since Nha1p is very probably regulated by some more, yet unknown, regulators, possible posttranslational modifications were searched in Nha1p sequence using databases and *in silico* methods. Beside two previously known Hog1p phosphorylation sites, several sequence motifs of yeast kinases were found in Nha1p sequence. Two phosphorylation sites (residues S669 and S683) were predicted (with the help of an expert in the field; Dr. O. Schmidt, Freiburg, Germany) as putative targets of casein kinase 2 (CK2). Casein kinase (CK2) is constitutively active and highly conserved kinase in eukaryotes with pleiotropic roles in many different cellular processes. Tetrameric structure of CK2 is composed of two catalytic and two regulatory subunits; catalytic subunits isoforms are encoded by *CKA1* and *CKA2*, whereas regulatory subunits isoforms are encoded by *CKB1* and *CKB2* in *Saccharomyces cerevisiae*. Recently, Cka1p was found to be able to influence alkali-metal-cation homeostasis, because Cka1p was identified as a positive regulator of *ENA1* expression [44]. In this work, Ena1p regulation by Cka1p was verified only on the level of expression and it was shown for the first time, that presence of Cka1p is necessary for proper transport activity of the Nha1 antiporter. Cka1p was identified as a positive regulator of Nha1p. Surprisingly, residues responsible for Cka1p and Nha1p interaction were not localized in soluble cytosolic C-terminal part of Nha1p, but there are most probably in one of internal loops within transmembrane part (first 472 residues) of Nha1p. Using *in silico* analysis, thirteen residues were predicted as possible Cka1p targets which need to be tested in the future.

Besides that, Cka1p participates in alkali-metal-cation homeostasis regulation also by a third mechanism, most probably by regulation of plasma membrane potential. In total, a

pleiotropic role of Cka1p was uncovered in regulation of salt tolerance and cation homeostasis. This manuscript was prepared for submission to Microbiology (SGM) journal.

#### **4.6 Publication No. 6**

##### **Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae***

Huang, X., Morse, L.R., Xu, Y., Zahrádka, J., Sychrová, H., Stashenko, P., Fan, F., Battaglino, R.A. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1241-1247 (2010)

Using knowledge and skills obtained in our laboratory, *S. cerevisiae* strain lacking its own alkali-metal-cation exporters was used for characterization of human Nha1p homologue, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NHAoc/NHA2. This antiporter is selectively expressed only in osteoclasts and it is important for normal osteoclast differentiation and apoptosis. In this study, coresponding cDNA was expressed in the yeast strain, membrane expression of NHAoc/NHA2 was confirmed by confocal microscopy. The growth phenotypes of cells expressing NHAoc/NHA2 mutants were studied and activity of heterologously expressed antiporter was tested. Among others, three residues were found in NHAoc/NHA2 sequence (I159, V161 and F357) which mutations could be more frequent in humans due to single nucleotide polymorphism, SNP. Site-directed mutagenesis was used to study the role of these residues, simultaneously with a role of some highly conserved residues.

Altogether, selected residues and other evolutionary conserved amino acids are required for full antiporter function. Mutations in these residues may affect NHAoc activity and therefore osteoclast differentiation and apoptosis, which is important risk factor for osteopetrosis development. Human NHAoc/NHA2 antiporter was characterized and important residues were identified in this work for the first time.

#### **4.7 Unpublished results, internal pH measurement method**

Unpublished data were obtained in this work and during participation on applied research project. The project, funded by Technology Agency of the Czech Republic, was in collaboration with software company DEL, a.s., and Institute of Microbiology AS CR, v.v.i. A novel method for internal pH measurement was designed which is able to measure pH *in vivo* in individual cells expressing pH sensitive green fluorescent protein (pHluorine) in microscope equipped with CellASIC microfluidic system. In addition, software application



Ocellaris ([www.ocellaris.cz](http://www.ocellaris.cz)) was developed to perform the necessary image processing and calculations using obtained microscopic pictures.

The developed method was used for validation of previously published results. Furthermore, the method was found to be suitable to identify subpopulations of individual cells within one strain which could be determined by different pH, shape, size or other parameters. One of significant benefits of the method is the possibility to exclude cells with insufficient expression of pHluorine, damaged or old cells which calibration curve is not standard and values obtained using these cells would affect results accuracy. Using this method, unique internal pH data sets could be obtained of individual cells *in vivo* and its changes in time simultaneously with some other physical parameters of cells.

## 5 Conclusions

Results presented in this thesis were published in five articles and one manuscript was prepared for publication. During experimental work, more than twenty mutant *S. cerevisiae* strains and more than ten plasmids were prepared and tested using a set of advanced molecular biology, biochemistry and cell physiology methods. BiFC method for detection of protein-protein interaction *in vivo* was introduced to our laboratory after short internship abroad. Furthermore, the unique method for single cell measurement of internal pH *in vivo* was designed and software application for related data analysis was developed with a commercial partner.

In this work:

- 1) Significant differences in several physiological parameters, e.g. cell size, salt tolerance and  $\Delta\Psi$ , were found between two widely used laboratory strains of *S. cerevisiae*. The work showed evidences that results obtained using two standard strains with different genetic backgrounds should not be easily merged.
- 2) Results uncovering previously unknown reciprocal interactions and regulations of  $K^+$  uptake and efflux transporters were obtained. Gathered information helped for better understanding of alkali-metal-cation homeostasis regulation, and the importance of  $K^+$  circulation was shown for the first time.
- 3) Two novel Nha1 antiporter regulators, 14-3-3 proteins and Cka1 kinase, were identified. In both cases, they regulate in a positive way both of them are important for full antiporter function.
- 4) Human NHAoc/NHA2 antiporter was characterized after heterologous expression of its cDNA in yeast. Activity of the antiporter was studied using site-directed mutagenesis and several residues were identified to be important for proper function of the antiporter. These mutations could play role in human bone disease, osteopetrosis, development.

Results of this thesis were published in prestigious journals and presented on international conferences and meetings. Proposed goals of the thesis were fulfilled.

## 6 References

1. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G.: Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547 (1996).
2. Botstein, D., Chervitz, S., Cherry, M.: Yeast as a Model Organism. *Science* **277**, 1259-1260 (1997).
3. Mager, W.H., Winderickx, J.: Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 265-273 (2005).
4. Armstrong, W.M., Rothstein, A.: Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J Gen Physiol* **48**, 61-71 (1964).
5. Rodriguez-Navarro, A.: Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 1-30 (2000).
6. Arino, J., Ramos, J., Sychrova, H.: Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 95-120 (2010).
7. Gaber, R.F., Styles, C.A., Fink, G.R.: *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2848-2859 (1988).
8. Ko, C.H., Buckley, A.M., Gaber, R.F.: *TRK2* is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**, 305-312 (1990).
9. Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A.: NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **432**, 59-64 (1998).
10. Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A.: Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**, 109-118 (2002).
11. Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P.O.: Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* **47**, 767-780 (2003).
12. Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., Rodriguez-Navarro, A.: Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**, 14838-14844 (1998).
13. Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., Serrano, R.: The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**, 920-929 (2002).
14. Merchan, S., Bernal, D., Serrano, R., Yenush, L.: Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot Cell* **3**, 100-107 (2004).
15. Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R.: A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* **19**, 3328-3337 (1999).
16. Forment, J., Mulet, J.M., Vicente, O., Serrano, R.: The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 36-40 (2002).
17. Fell, G.L., Munson, A.M., Croston, M.A., Rosenwald, A.G.: Identification of yeast genes involved in k homeostasis: loss of membrane traffic genes affects k uptake. *G3 (Bethesda)* **1**, 43-56 (2011).
18. Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., Serrano, R.: pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* **25**, 8683-8692 (2005).
19. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O.: Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241-4257 (2000).
20. Michel, B., Lozano, C., Rodriguez, M., Coria, R., Ramirez, J., Pena, A.: The yeast potassium transporter *TRK2* is able to substitute for *TRK1* in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* **23**, 581-589 (2006).
21. Vidal, M., Buckley, A.M., Yohn, C., Hoepfner, D.J., Gaber, R.F.: Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of *TRK2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2370-2374 (1995).
22. Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D.: Gating and conductance in an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* **132**, 183-199 (1993).

23. Maresova, L., Urbankova, E., Gaskova, D., Sychrova, H.: Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* **6**, 1039-1046 (2006).
24. Proft, M., Struhl, K.: MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**, 351-361 (2004).
25. Haro, R., Garciadeblas, B., Rodriguez-Navarro, A.: A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**, 189-191 (1991).
26. Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., Arino, J.: The transcriptional response of the yeast Na<sup>+</sup>-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* **281**, 36632-36642 (2006).
27. Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., Arino, J.: The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**, 17249-17255 (2000).
28. Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H.K.: The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**, 3870-3882 (1995).
29. Marquez, J.A., Serrano, R.: Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* **382**, 89-92 (1996).
30. Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrova, H.: Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**, 89-93 (1996).
31. Seto-Young, D., Perlin, D.S.: Effect of membrane voltage on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 1383-1389 (1991).
32. Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., Potier, S.: The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144** 2749-2758 (1998).
33. Kinclova-Zimmermannova, O., Gaskova, D., Sychrova, H.: The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**, 792-800 (2006).
34. Sychrova, H.: Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S91-98 (2004).
35. Sychrova, H., Ramirez, J., Pena, A.: Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**, 167-172 (1999).
36. Mitsui, K., Ochi, F., Nakamura, N., Doi, Y., Inoue, H., Kanazawa, H.: A novel membrane protein capable of binding the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 12438-12447 (2004).
37. Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., Michnick, S.W.: An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465-1470 (2008).
38. Barreto, L., Canadell, D., Petrezselyova, S., Navarrete, C., Maresova, L., Perez-Valle, J., Herrera, R., Olier, I., Giraldo, J., Sychrova, H., Yenush, L., Ramos, J., Arino, J.: A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **10**, 1241-1250 (2011).
39. Ke, R., Ingram, P.J., Haynes, K.: An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol* **9**, e1002879 (2013).
40. Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Shimizu, H.: Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**, 32-44 (2009).
41. Lehoux, S., Abe, J., Florian, J.A., Berk, B.C.: 14-3-3 Binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Biol Chem* **276**, 15794-15800 (2001).
42. Latz, A., Becker, D., Hekman, M., Muller, T., Beyhl, D., Marten, I., Eing, C., Fischer, A., Dunkel, M., Bertl, A., Rapp, U.R., Hedrich, R.: TPK1, a Ca<sup>2+</sup>-regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K<sup>+</sup> channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* **52**, 449-459 (2007).
43. Mitsui, K., Kamauchi, S., Nakamura, N., Inoue, H., Kanazawa, H.: A conserved domain in the tail region of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) plays important roles in localization and salinity-resistant cell-growth. *J Biochem* **135**, 139-148 (2004).
44. Berkey, C.D., Carlson, M.: A specific catalytic subunit isoform of protein kinase CK2 is required for phosphorylation of the repressor Nrg1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **50**, 1-10 (2006).

## Curriculum vitae

### Personal details:

Name: **Jaromír Zahradka**  
Address: Cilova 1803/2  
162 20 Prague 6  
Czech Republic  
Contact: Phone: 724 733 084 e-mail: [zahradka@iocb-tto.cz](mailto:zahradka@iocb-tto.cz)  
Born: May 11, 1984 in Usti nad Orlici

### Employment:

since 11/2012 *job position: **Technology transfer specialist**, IOCB TTO s.r.o., Flemingovo nam. 2 , 166 10, Prague 6, Czech Republic*

09/2008 – 10/2012 *job position: **Junior scientist**/PhD. student, Department of Membrane Transport, Institute of Physiology AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

### Education:

since 09/2008 *PhD. study: Charles University in Prague, Faculty of Science, Dep. of Biochemistry, Study program: Biochemistry*

Thesis topic: "Physiological role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in yeast cells"

*Supervisor:* RNDr. Hana Sychrová, DrSc., Institute of Physiology AS CR, v.v.i.

09/2006 – 06/2008 *Master deg.: Charles University in Prague, Faculty of Science, Dep. of Biochemistry, Study program: Biochemistry*

Diploma thesis: "Preparation and characterization of YEX-GFP-Nha1 plasmid, use for *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter studies."

*Supervisor:* RNDr. Hana Sychrová, DrSc., Institute of Physiology AS CR, v.v.i.

09/2003 – 06/2006 *Bachelor deg.: Charles University in Prague, Faculty of Science, Dep. of Biochemistry, Study program: Biochemistry*

Bachelor thesis: "Oxidase activity of Diaphorase and Lipoamide-dehydrogenase."

*Supervisor:* Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

**Languages:** English: fluent, FCE Certificate (12/2010)  
German: basic

Prague

July 12, 2013

## Publications

Petrezselyová, S., Zahrádka, J., Sychrová, H.: *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* **114**, 144-150 (2010). IF = 1.43

Navarrete, C., Petrezselyová, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahrádka, J., Arino, J., Sychrová, H., Ramos, J.: Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **10**, 508-517 (2010). IF = 2.40

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* **12**, 439-446 (2012). IF = 2.40

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 849-858 (2012). IF = 4.66

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Pleiotropic role of *CKA1* in salt tolerance and cation homeostasis. *rukopis* (2013).

Huang, X., Morse, L.R., Xu, Y., Zahrádka, J., Sychrová, H., Stashenko, P., Fan, F., Battaglino, R.A.: Mutational analysis of NHAoc/NHA2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1241-1247 (2010). IF = 4.66

Work on this thesis was supported by:

GA AV CR IAA500110801 (2008-2012) Role of Na/H antiporters in cell physiology - transporters teamwork in intracellular pH and K<sup>+</sup> homeostasis

GA CR 204/08/0354 (2008-2010) Alkali-metal-cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* biology

MSMT LC531 (2005-2011) Centre on molecular biology and physiology of yeast communities

MSMT COST OC10012 (2010-2012) Transport of cations and protons across biomembranes - molecular structure and activity mechanism of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from lower eukaryotes

MSMT Specific University Research Project No. 33779266 (2010-2012)

TA 01011467 (2011-2012) SW analysis of changes in microscopic images of cell structures using fluorescence indicators

The institutional research plan AV0Z50110509 (2005-2011) Investigation of molecular and cellular basis of physiological and pathophysiological processes in order to clarify the pathogenesis of important human diseases

With institutional support RVO:67985823

## Selected abstracts

Zahrádka, J., Flegelová-Kučerová, H., Sychrová, H.: The biogenesis and activity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter tagged by GFP. *5th Meeting of Biomedical Doctoral Schools ULP Strasbourg and UK Prague*, Strasbourg, Prague, **O** (2008).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Asparagine 67 of the first internal loop is important for the substrate specificity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress - Young Scientists Program*, Shanghai, China, **P**, p. 19 (2009).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: substrate specificity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter is influenced by internal-loop residue Asn67. *FEBS – EMBO Advanced Lecture Course: Molecular and Cellular Membrane Biology*, Cargese, France, **P** (2009).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: internal-loop residue N67 is involved in the substrate specificity of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *37th Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, **P**, p. 80 (2009).

Petrezselyova, S., Zahrádka J., Sychrova, H.: Role of uptake and efflux systems in potassium starvation of *S. cerevisiae* cells. *the 27<sup>th</sup> ISSY*, Paris, France, **P**, p.149 (2009).

Zahrádka J., Sychrová, H.: 14-3-3 Proteins are involved in regulation of alkali-metal-cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting* Vancouver, Canada, **P**, p. 274 (2010).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Role of 14-3-3 proteins in alkali-metal-cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *38th Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, **O**, p. 42 (2010).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1 interacts with the 14-3-3 protein. *25<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*, Olsztyn, Poland, **P**, p. S67 (2011).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 Proteins Interact with Plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *The 5<sup>th</sup> International Course in Yeast Systems Biology*, Göteborg, Sweden, **O** (2011).

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 Proteins Regulate the Activity of Plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *39<sup>th</sup> Annual Conference on Yeasts*, Smolenice, Slovakia, **P**, p. 114, (2011)

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter is Regulated by 14-3-3 Proteins. *Meeting of TRANSLUCENT II – SysMO project*, London, UK, **O**, (2011)

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter is Regulated by 14-3-3 Proteins. *Proceedings of PhD Student Workshop, Třešť, CR, Physiol Res* **60**, **O**, p. 23 (2011)

Zahrádka, J., Sychrová, H.: Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of alkali-metal-cation homeostasis via physical interaction with Nha1 antiporter. *The 2012 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting*, Princeton, NJ, USA, **P**, (2012)

Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H. Role of 14-3-3 proteins in yeast cation homeostasis. *Abstracts of the 30th SMYTE*, Salamanca, Spain, **O**, p. 25 (2012).

---

**O** oral presentation  
**P** poster

(presenting author underlined)