

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

20

**INTERCAMBIADORES CATION/PROTON  
EN LA LEVADURA, LA REGULACION DEL  
PH INTRACELULAR Y LA FISILOGIA DE  
LA CELULA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**P R E S E N T A:**

**JORGE RAMIREZ SALCEDO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ANTONIO PEÑA DIAZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA D.F. 2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y dió lugar a tres publicaciones que aparecieron en las siguientes revistas: *Journal of Bacteriology*, *FEMS Microbiology Letters* y *Journal of Biological Chemistry*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Peña Díaz por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por sus valiosas enseñanzas y por soportarme durante tantos años.

A los miembros del Jurado: Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Dr. Edmundo Chávez Cossio, Dra. Alejandra Covarrubias Robles, Dr. Edgardo Escamilla Marván, Dr. Federico Martínez Montes, Dr. Mario Soberón Chávez y Dr. Luis Vaca Domínguez, por su revisión crítica y sus comentarios al trabajo de tesis.

A todos aquellos de quienes he aprendido lo que sé: Dr. Rubén Salcedo, Dr. Heliodoro Celis, Dr. Georges Dreyfus, Dr. Armando Gómez-Puyou, Dra. Marieta Tuena, Dr. Edmundo Chávez, Dra. Marina Gavilanes, Dr. Ruy Pérez-Montfort, Dr. Carlos Gómez-Lojero, Dr. Juan Pablo Pardo.

En especial al Dr. Diego González-Halphen, tanto por ser mi maestro, como mi amigo y en muchas ocasiones mi conciencia.

A mi amiga Adela Cuéllar por todo el trabajo que realizamos juntos.

A Soledad Guevara por su amistad, por su ayuda en la conservación de las cepas, la preparación de medios.. .....

A mis amigos. Federico, Irma, Silvia, Lupita, Orlando, Horacio, Roberto, Valentin, Pedro, Mónica, Nora, Georgina, Guillermo, Elena, Edgar, Bertha, Isabel, Alejandro, Ernesto, José, Santiago, Marielena, Ariane, Robert, Soledad, Carlos, Jessica ..... ..

A mis compañeros de laboratorio

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS .....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
I.1. Potencial electroquímico y flujos de iones.....	7
I.2. Intercambiadores catión/protón ( $M^+/H^+$ ).....	8
I.3. Sistemas intercambiadores $M^+/H^+$ descritos en levaduras.....	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
II.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleadas en este trabajo.....	15
II.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> construidas para este trabajo.....	15
II.3. Medios de cultivo.....	15
II.4. Cultivo de las células.....	16
II.5. Transformación de las levaduras.....	17
II.6. Análisis tipo Southern y Northern.....	18
II.7. Cruza de cepas y análisis de esporas.....	19
II.8. Crecimiento, composición celular y metabolismo de la glucosa.....	19
II.9. Transporte de [ $^{86}Rb$ ] y transporte de potasio.....	20
II.10. Determinación del pH intracelular y extracelular.....	21
II.11. Estimación del potencial de membrana.....	22
II.12. Sincronización celular y citometría de flujo.....	23
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
III.1. Análisis del marco de lectura abierto YJL094c (KHA1).....	24
III.2. Interrupción del marco de lectura abierto YJL094c (KHA1).....	24
III.3. Identificación de las transformantes.....	25
III.4. Crecimiento y metabolismo de la glucosa.....	28
III.5. Parámetros cinéticos del transporte de [ $^{86}Rb$ ] y características del transporte de potasio.....	32
III.6. Determinación del bombeo de protones y el pH intracelular.....	33
III.7. Determinación del potencial de membrana.....	34
ARTICULO.....	35
Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R. Peña, A. 1998. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutant lacking a $K^+/H^+$ exchanger. J. Bacteriol. 180:5860-5865.	
III.8. Caracterización de la mutante con ablación del gen NHA1.....	36
III.9. Doble interrupción de los genes NHA1 y KHA1.....	37
ARTICULO.....	42
Sychrova, H., Ramírez, J. Peña, A. 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . FEMS Microbiol Lett. 171:167-172.	
III.10. Doble interrupción de los genes TOK1 y KHA1.....	43
III.11. Doble interrupción de los genes TRK1 y KHA1.....	47
III.12. Regulación de los intercambiadores Nha1 y Kha1.....	51
III.13. SIT4 fosfatasa de proteínas (Ser/Thr).....	51

ARTICULO .....	54
Masuda C.A., Ramírez, J., Peña, A., Montero-Lomeli, M. 2000. Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the SER-THR protein phosphatase SIT4 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . J Biol Chem. 275.30957-30961	
III 14. HAL4 cinasa de proteínas (Ser/Thr) .....	55
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	58
V. CONCLUSIONES.....	60
VI. PERSPECTIVAS.....	62
ANEXO.....	63
REFERENCIAS.....	64

## RESUMEN

En los seres vivos, los procesos metabólicos esenciales requieren de potasio. Para capturar este catión activamente, las células utilizan la energía almacenada en forma de un gradiente electroquímico. En la levadura, la acumulación de potasio se inicia con la generación del potencial electroquímico ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ), por la salida de protones a través de la  $\text{H}^+$ -ATPasa. Este potencial impulsa la entrada de potasio por los transportadores específicos, utilizando el componente eléctrico del  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Acoplados, los flujos de estos iones producen cambios en el pH intracelular y en la concentración de potasio. Esto plantea la pregunta: ¿cómo y quién regula el pH intracelular y la concentración de potasio? Por otra parte, también se consideró importante definir los efectos en el transporte de iones sobre la fisiología de la levadura, principalmente en relación con las principales vías de transformación de energía, el crecimiento y la reproducción celular.

Para contestar a esta pregunta, se construyeron mutantes de levadura, mediante la ablación de genes que codifican para posibles proteínas involucradas en los flujos de iones, esperando que la pérdida de alguna de estas funciones afectara el pH intracelular y/o la concentración interna de potasio. En las mutantes obtenidas se determinó el pH intracelular, el contenido de potasio, el potencial de membrana, el transporte de potasio y el bombeo de protones, así como algunos parámetros metabólicos. En las cepas estudiadas, la mutante con ablación en el gen *YJL094c*, mostró un aumento en el pH intracelular, un incremento en el contenido de potasio y un potencial de membrana mayor.

Con estos resultados concluimos que:

1. El producto del gen *YJL094c* codifica para un posible intercambiador potasio/protón que denominamos antiportador de potasio/protón uno (*KHAI*).
2. Esta proteína es la responsable de la regulación del pH intracelular así como del contenido de potasio.
3. El posible mecanismo para la regulación del pH es el reingreso que *Kha1* permite de parte de los protones en un intercambio por potasio. Esto mantiene el pH intracelular y la concentración de potasio óptimos para la célula, con una pérdida mínima del potencial electroquímico.

## ABSTRACT

In living organisms, the essential metabolic processes require potassium ions. Cells actively accumulate potassium using the energy stored in the form of an electrochemical gradient. In yeast, the uptake of potassium starts with the formation of an electrochemical potential ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) through the expulsion of protons by the  $H^+$ -ATPase. The uptake of the cation by its specific transporters is driven by the electrical component of the  $\Delta\mu_{H^+}$ . These ion fluxes cause changes in the intracellular pH and potassium content. Two important questions can be asked about this process: How, and by what means, are the intracellular pH and the intracellular ion content regulated? It was also considered important to define the possible changes that such alterations in the ion transport activities could produce on the physiology of the cell, mainly on the energy transduction pathways and functions, growth and reproduction.

In order to address this question we made mutant yeast strains by deleting several genes coding for peptides involved in these ion fluxes. The aim was to obtain a mutant in which the loss of one or several of these functions affects the intracellular pH and/or the internal potassium content. We determined the intracellular pH, potassium content, membrane potential, potassium transport and proton pumping, as well as several metabolic parameters in each mutant strain. Mutants with a deletion in the gene YJL094c showed an increase in the intracellular pH and potassium content and a higher membrane potential compared to the control yeast strain.

We concluded the following:

1. The peptide product of YJL094c is a putative potassium/proton exchanger, which we have named potassium proton antiporter one (*KHA1*).
2. This protein is responsible for the internal pH and potassium content regulation.
3. A possible mechanism for pH regulation is the reentry through *Kha1* of some of the protons in exchange for internal potassium. This would maintain the internal pH and potassium concentration within optimum and convenient values for the cell, with only a small loss in the electrochemical potential.



## ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CCCP	Cloruro de carbonil cianuro fenilhidrazona.
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil amonio.
DisC <sub>3</sub> (3)	3-3' ditiocarbocianina.
$\Delta$ pH	Diferencia de pH a ambos lados de la membrana.
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana.
$\Delta\mu$ H <sup>+</sup>	Potencial electroquímico de protones.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
GCG	Grupo de computo en genética.
H <sup>+</sup>	Protón.
K <sup>+</sup>	Potasio.
K <sub>M</sub>	Constante de afinidad.
M <sup>+</sup>	Cationes monovalentes.
MES	Acido morfolino etanosulfónico.
NAD	Dinucleótido de adenina.
NADP	Dinucleótido de adenina fosfato.
Na <sup>+</sup>	Sodio.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Pi	Fosfato inorganico.
<sup>32</sup> Pi	Fosfato radioactivo.
<sup>86</sup> Rb <sup>+</sup>	Rubidio radioactivo.
TEA	Trietanol amina.
Tris	Tris-hidroximetil amino metano

## I. INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo procesos metabólicos esenciales, prácticamente todos los seres vivos mantienen y requieren altas concentraciones de potasio (100 a 150 mM) en el interior celular. Para capturar este catión, las células utilizan la energía almacenada en forma de un gradiente químico o eléctrico.

En las bacterias, animales y plantas, el sistema transmembranal para el transporte de iones está constituido por dos componentes: uno crea el gradiente electroquímico para cualquiera de los iones, utilizando las bombas primarias como son  $H^+$ -ATPasa,  $Na^+/K^+$ -ATPasa,  $Na^+$ -ATPasa o las cadenas transportadoras de electrones. El otro componente completa el proceso, transportando los iones a través de los sistemas secundarios tales como uniportadores catiónicos, simportadores catión/sustrato, canales iónicos o intercambiadores (antiportadores  $M^+/H^+$ ). Este mecanismo universal de entrada y salida de iones a través de las membranas biológicas, mantiene los movimientos de diferentes cationes. Sin embargo, en las bacterias y los hongos, el principal catión que mueven los translocadores primarios es el  $H^+$ , cuyo bombeo tiende a producir un aumento del pH intracelular, que desde luego, debe mantenerse regulado, y también deben existir sistemas capaces de mantener la homeostasis de los otros iones, principalmente el  $K^+$ , ya que un aumento en la concentración de éstos pudiera ser tóxico para la célula

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los flujos de iones están constituidos principalmente por los movimientos de protón y potasio. El proceso membranal para el transporte celular de estos iones se inicia con la salida de protones proveniente de la hidrólisis del ATP y la generación del potencial electroquímico ( $\Delta\mu_{H^+}$ ), producido por la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática. El gradiente de protones producido por esta

enzima, puede llegar a ser mayor de 3 unidades de pH y constituye la mayor parte de la energía que impulsa el transporte de iones que la célula requiere. En contra parte, las células acumulan grandes cantidades de potasio (200 a 300 mM). Si consideramos que las levaduras acumulan concentraciones elevadas de potasio y valores del pH externo relativamente bajos, condiciones en las cuales el pH interno y la concentración de potasio pueden llegar a valores inconvenientes para la célula. Se plantean dos preguntas importantes: ¿cómo y quién regula el pH intracelular? y ¿cómo y quién regula la concentración intracelular de iones?

### **I.1. Potencial electroquímico y flujos de iones**

Peña y cols. (1972) propusieron la existencia de una  $H^+$ -ATPasa responsable de la generación del potencial electroquímico en la membrana plasmática de la levadura. Esta proteína fue primero reconstituida en liposomas por Malpartida y Serrano (1981). Luego, el gen responsable de esta actividad (*PMA1*) fue clonado y secuenciado por Serrano y cols. (1986). La  $H^+$ -ATPasa Pma1 bombea protones hacia el exterior celular hidrolizando ATP; el movimiento de estos protones produce la acidificación del medio extracelular, formándose un gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) y un potencial eléctrico ( $\Delta\psi$ ) a través de la membrana plasmática. Este gradiente electroquímico ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) es utilizado para el transporte de nutrientes al interior celular.

En contraparte al gradiente de protones, los movimientos de potasio forman parte de un sistema secundario constituido por los uniportadores de alta y baja afinidad Trk1 y Trk2, que acumulan potasio en el interior de la célula en contra de su gradiente electroquímico, utilizando el componente eléctrico del potencial electroquímico (Peña y cols., 1975).

Rodríguez-Navarro y cols. (1984) describieron la existencia de dos sistemas para el transporte de potasio; uno de alta ( $K_M=100 \mu\text{M}$ ) y otro de baja afinidad ( $K_M=50 \text{ mM}$ ). Un año después, este mismo grupo describió una mutante con un defecto en el sistema de alta afinidad (Ramos y cols., 1985). Con la obtención de esta mutante se pudo clonar el gen del sistema de transporte de potasio de alta afinidad (*TRK1*) (Gaber y cols., 1988). Con las mutantes obtenidas por los grupos de Ramos y Gaber, se caracterizó un sistema de salida de potasio dependiente de energía y se propusieron tres posibilidades para explicar la salida de potasio observada en estas mutantes: un cotransportador de potasio con aniones, un canal iónico, y un intercambiador de protones con potasio (Peña y cols., 1991). Con respecto al sistema cotransportador de potasio con aniones, no existen otros reportes en la levadura ni se ha reportado la existencia de un posible gen para un sistema como éste. Gustin y cols. (1988, 1994) demostraron la existencia de canales iónicos en la membrana plasmática de la levadura y Ketchum y cols. (1995) clonaron el gen del canal de potasio (*TOK1*). También Ramírez y cols. (1996) y Camarasa y cols. (1996) demostraron la existencia de un intercambiador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  en vesículas de membrana plasmática de la levadura.

## **1.2. Intercambiadores catión/protón ( $\text{M}^+/\text{H}^+$ )**

Las proteínas intercambiadoras catión/protón ( $\text{M}^+/\text{H}^+$ ) han sido descritas en los animales, plantas y bacterias. Estas proteínas intercambian cationes ( $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) por protón ( $\text{H}^+$ ) a través de las membranas, tanto la citoplásmica como las de los organelos, permitiendo que el pH intracelular, así como la homeostasis de los iones se mantengan regulados

La presencia de estos intercambiadores fue propuesta por Mitchell (1961), y Mitchell y Moyle (1967 y 1969) demostraron su existencia en las mitocondrias. Los estudios de estos

autores mostraron que parte de los protones expulsados durante la respiración o por la hidrólisis del ATP podían ser intercambiados por sodio del interior de las mitocondrias. En las bacterias, Harold y Papineau (1972) propusieron y demostraron una actividad similar en *Streptococcus faecalis*. Posteriormente, West y Mitchell (1974) también reportaron su presencia en *Escherichia coli*. Varios autores (Pitts, 1966, Whitlock y Wheeler, 1969 y Emilio y cols., 1975) sugirieron la existencia de intercambiadores ( $M^+/H^+$ ) en la membrana plasmática de las células de organismos superiores, y Mürer y cols. (1976) demostraron su actividad en vesículas de membrana plasmática de riñón y de intestino delgado.

El estudio de los intercambiadores ( $M^+/H^+$ ) en las bacterias y organismos superiores (animales y plantas) ha sido extenso. En la actualidad se conoce la mayoría de los genes que codifican para estas proteínas. Se han propuesto modelos para su estructura secundaria y para su regulación, y se conoce ampliamente su papel fisiológico como reguladores del pH y de la concentración intracelular de iones (Krulwich, 1983, Maathius y Sanders, 1992, Fliegel y Fröhlich, 1993, Dibrov y Fliegel, 1998, y Padan y cols., 1981, 1993, 1994).

La existencia de sistemas intercambiadores  $M^+/H^+$  en la membrana plasmática de la levadura fue propuesta por Rothstein (1974), y después por Rodríguez-Navarro y Sancho (1979).

### **1.3. Sistemas intercambiadores $M^+/H^+$ descritos en levaduras**

A principios de los años noventa, el estudio de la osmotolerancia y la resistencia a la salinidad en plantas llamó la atención de los grupos dedicados al estudio del transporte de iones en la levadura. Se trató de establecer un modelo en estos organismos, que permitiera explicar cómo algunas plantas se defienden del estrés osmótico y salino. Con este objetivo, varios grupos se dedicaron al estudio de los efectos de altas concentraciones de sodio y litio

sobre el crecimiento de diferentes cepas de levaduras, dichos estudios culminaron con la identificación de los intercambiadores  $M^+/H^+$ .

Utilizando levaduras transformadas con bibliotecas genómicas, Jia y cols. (1992) clonaron el gen *SOD2* de *Schizosaccharomyces pombe*. Estos autores encontraron que en las células donde se sobreexpresó este gen, aumentó la tolerancia al litio. La comparación de la secuencias de amino ácidos de Sod2 con las proteínas intercambiadoras de *E. coli* NhaA (Padan y cols., 1989) y NhaC (Ivery y cols., 1991) no mostró una alta similitud. Sin embargo, las células de *E. coli* y *S. pombe* en las que se hizo la ablación de los genes *NHAA* y *SOD2* respectivamente, mostraron un fenotipo muy similar, consistente en una intolerancia a concentraciones elevadas de  $Na^+$  o  $Li^+$ , acompañada de una mayor sensibilidad de las células a cambios en el pH extracelular durante el cultivo. Esto permitió concluir que *SOD2* debería de codificar para un intercambiador  $Na^+/H^+$ . Posteriormente, Prior y cols. (1996) clonaron el gen *NHA1* en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos autores encontraron que la sobreexpresión o la ablación de este gen, conferían fenotipos similares a los reportados para la sobreexpresión o la ablación de *SOD2* en *S. pombe*. Sin embargo, la ablación de *NHA1* en *S. cerevisiae* sólo produjo la intolerancia a  $Na^+$  y  $Li^+$ , sin la respuesta en el crecimiento de las células a cambios en el pH del medio de cultivo, como el observado para las mutantes de *E. coli* o *S. pombe*. El alineamiento de las secuencias de amino ácidos de Nha1 y Sod2 mostró similitud entre estas proteínas, lo cual sugería que *NHA1* podría codificar para un intercambiador  $Na^+/H^+$ . Otros autores han encontrado diversos genes en las levaduras, sin embargo, sólo los genes antes descritos tienen similitud con otros intercambiadores  $Na^+/H^+$ . Ello sugiere que los otros genes clonados por selección de resistencia a  $Li^+$  o  $Na^+$  pudieran estar involucrados en la regulación de los intercambiadores.

Otro método empleado en la identificación y caracterización de intercambiadores  $M^+/H^+$  en la levadura es la formación de vesículas de membrana plasmática descrita por Mürer y cols. (1976). Esta metodología consiste en aislar y reconstituir la membrana plasmática del organismo que se desea estudiar en vesículas de fosfolípidos. En estas vesículas se puede determinar la entrada o la salida de iones ( $Na^+$  o  $K^+$ ) impulsada por un gradiente artificial de protones o los cambios en el pH intravesicular producidos por la imposición de un gradiente de cationes ( $Na^+$  o  $K^+$ ). Utilizando esta técnica, Peña y cols. (1991) propusieron la existencia de un intercambiador  $K^+/H^+$ , determinando la acumulación de [ $^{86}Rb^+$ ] en vesículas de membrana plasmática de levadura, energizadas con la  $H^+$ -ATPasa. Más adelante, Ramírez y cols. (1996) y Camarasa y cols. (1996) determinaron la respuesta de indicadores de pH fluorescentes al generar un gradiente de potasio, y demostraron la existencia de un intercambiador  $K^+/H^+$  en la membrana plasmática de la levadura. En ambos trabajos se observó que el intercambiador es selectivo para potasio. También se mostró la sensibilidad de este intercambiador a la amilorida, un inhibidor del intercambiador  $Nhe$  de la membrana vasolateral del riñón (Kleyman y cols., 1987). Aunque ya existían reportes anteriores de intercambiadores  $K^+/H^+$ , como el *Kef* en *E. coli* reportado por Munro y cols. (1991) se demostró la presencia de un sistema de intercambio  $K^+/H^+$  en la membrana plasmática de células eucariotes, en los trabajos de Peña y Ramírez (1991); Ramírez y cols. (1996) y Camarasa y cols. (1996).

Con la liberación de la base de datos del genoma completo de la levadura (Suplemento de Nature 1997) y el análisis realizado por Bruno André (1995), se han identificado únicamente tres marcos de lectura abierta de genes que pudieran codificar para intercambiadores  $Na^+/H^+$ . De acuerdo con la nomenclatura empleada en el proyecto del genoma de la levadura, el primero de ellos es el reportado como YLR138w, que

corresponde al descrito por Prior y cols. (1996) como *NHA1*, mencionado arriba. El segundo, el marco de lectura abierta YDR456w, corresponde al gen *NHX1* descrito por Nass y cols. (1997). La ablación de este gen provoca una pérdida de la capacidad de las células para atrapar sodio en la vacuola. La localización y función del producto de este gen (*Nhx1*) no están claros. Basados en la pérdida de la actividad antes mencionada Nass y cols. (1997) propusieron que se localiza en la vacuola. Numata y cols. (1998), mediante técnicas de inmunolocalización, lo ubicaron en la mitocondria y lo renombraron *NHA2*. Finalmente, el mismo grupo de Nass y Rao (1998), por inmunolocalización y análisis de secuencias, propusieron que el producto de este gen podía estar localizado en diferentes organelos. Probablemente esta proteína sea la responsable de la actividad encontrada en las mitocondrias de levadura por Manon y cols. (1992), quienes solubilizaron y reconstituyeron esta proteína, proponiéndola como un intercambiador  $K^+/H^+$ . Es importante considerar que en un reporte previo en mitocondrias de hígado de rata (Kakar y cols., 1989) se demostró que el intercambiador localizado en estas mitocondrias no es específico y puede mover sodio o potasio en intercambio con protones. El tercer marco de lectura abierta, YJL094c, se describirá en este trabajo y fue nombrado *KHA1* (Ramírez y cols., 1998)

Mediante el análisis de homología, no parecen existir en el genoma completo de la levadura más genes que pudieran codificar para proteínas intercambiadoras  $M^+/H^+$  (Paulse y cols., 1998). Esto no significa que no puedan existir otras, sólo que ni las herramientas con la que contamos, ni los experimentos realizados hasta la fecha permiten predecirlos.

La levadura se suele cultivar en medios ricos (YPD, YPG, YPAD, etc); los cuales contienen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales. En estas condiciones, *S. cerevisiae* es capaz de acumular concentraciones de 200 a 300 mM de potasio y sólo de 5 a 10 mM de sodio, lo que hace difícil explicar la existencia de

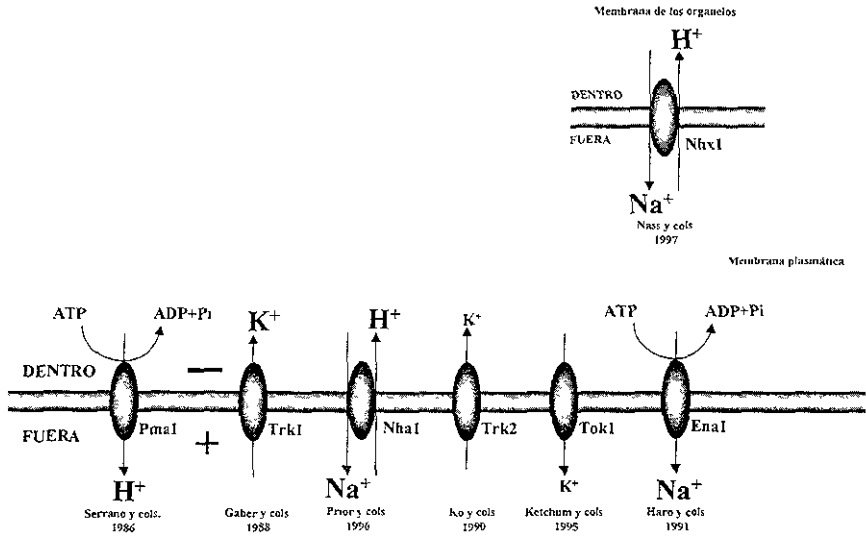


intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  como los descritos por Prior y cols. (1996) y Nass y cols. (1997). Estas interpretaciones parecen responder al reciente auge que han tomado los estudios de resistencia a la salinidad y la osmotolerancia en plantas. Sin embargo, dada la concentración de potasio y la magnitud del gradiente de pH alcanzados por la levadura, creemos que la existencia de un sistema de intercambio  $\text{K}^+/\text{H}^+$  es más probable y nos permite explicar parcialmente la regulación del pH intracelular y de la concentración de potasio en la levadura. Esto no quiere decir que en condiciones de estrés la levadura no sea capaz de expresar o utilizar un sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , aunque es más probable explicar la osmotolerancia mediante un sistema de  $\text{Na}^+$ -ATPasa (*ENAI*), como el descrito por Haro y cols. (1991), para protegerse de las condiciones ambientales.

En este trabajo se demuestra que el ORF YJL094c, nombrado *KHA1* (por potassium proton antiporter uno), codifica para un intercambiador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  y es responsable en gran parte de la regulación del pH intracelular, así como de la concentración de potasio en el interior de la célula.

También se estudió la relación que existe entre los intercambiadores *Nha1* y *Kha1*, los transportadores *Trk1*, *Trk2* y el intercambiador *Kha1*, y el canal de potasio *Tok1* y el intercambiador *Kha1*, con la finalidad de conocer su papel en la regulación del pH intracelular y los niveles de cationes.

Finalmente se propone un posible mecanismo para la regulación de la actividad de estos intercambiadores en la levadura.



En el esquema se resume el proceso de formación del gradiente electroquímico, del transporte de potasio y los sistemas propuestos para la salida de sodio en la levadura.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Características
W303-1A	mat a, <i>ade, his, leu, ura, trp.</i>	Cepa silvestre
W303-1B	mat $\alpha$ , <i>ade, his, leu, ura, trp.</i>	Cepa silvestre
W3031A- <i>nha1::LEU</i>	mat a, <i>ade, his, ura, trp.</i>	Ablación de <i>NHA1</i>
W3031A- <i>NHA1::URA</i>	mat a, <i>ade, his, leu, trp.</i>	Sobreexpresión de <i>NHA1</i>
W3031A- <i>tok1::LEU</i>	mat a, <i>ade, his, ura, trp.</i>	Interrupción de <i>TOK1</i>
W3031B- <i>hal4::URA</i>	mat $\alpha$ , <i>ade, his, leu, trp.</i>	Ablación de <i>HAL4</i>
R757	mat $\alpha$ , <i>his, lys, ura.</i>	Cepa silvestre
R757- $\Delta$ <i>trk1</i>	mat $\alpha$ , <i>his, lys, ura.</i>	Ablación de <i>TRK1</i>
R757- $\Delta$ <i>trk1, trk2</i>	mat $\alpha$ , <i>his, lys, ura.</i>	Ablación de <i>TRK1</i> y <i>TRK2</i>
FY833	mat a, <i>his, leu, ura, trp.</i>	Cepa silvestre

### II.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* construidas para este trabajo.

Cepa	Genotipo	Características
W303-1A- <i>kha1::URA</i>	mat a, <i>ade, his, leu, trp.</i>	Interrupción de <i>KHA1</i>
W3031A- <i>nha1::LEU-kha1::URA</i>	mat a, <i>ade, his, trp.</i>	Ablación de <i>NHA1</i> e interrupción de <i>KHA1</i>
W3031A- <i>tok1::LEU-kha1::URA</i>	mat a, <i>ade, his, trp</i>	Interrupción de <i>TOK1</i> e interrupción de <i>KHA1</i>
R757- <i>kha1::URA</i>	mat $\alpha$ , <i>his, lys.</i>	Interrupción de <i>KHA1</i>
R757- $\Delta$ <i>trk1-kha1::URA</i>	mat $\alpha$ , <i>his, lys.</i>	Ablación de <i>TRK1</i> e interrupción de <i>KHA1</i>
R757- $\Delta$ <i>trk1, trk2-kha1::URA</i>	mat $\alpha$ , <i>his, lys.</i>	Ablación de <i>TRK1</i> y <i>TRK2</i> e interrupción de <i>KHA1</i>
FY833- <i>SIT4::URA</i>	mat a, <i>his, leu, trp.</i>	Sobreexpresión de <i>SIT4</i>
FY833- $\Delta$ <i>sit4::HIS</i>	mat a, <i>leu, trp, ura.</i>	Ablación de <i>SIT4</i>

### II.3. Medios de cultivo

*YPD*: Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 1% y glucosa 2%. Medio sólido más 2% de agar.

*YPAD*: Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 1%, sulfato de adenina 50 mg/l y glucosa 2%. Medio sólido más 2% de agar

*SD*: Base nitrogenada (Yeast nitrogen Base, DIFCO) 0.67% y glucosa 2%, sin

aminoácidos. Medio sólido más 2% de agar.

*SD-LEU*. Base nitrogenada 0.67%, glucosa 2%, sulfato de adenina 50 mg/l, L-histidina 50 mg/l, L-licina 50 mg/l , L-triptofano 50 mg/l y uracilo 50 mg/l. Medio sólido más 2% de agar.

*SD-URA*: Base nitrogenada 0.67%, glucosa 2%, sulfato de adenina 50 mg/l, L-histidina 50 mg/l, L-leucina 50 mg/l, L-licina 50 mg/l y L-triptofano 50 mg/l. Medio sólido más 2% de agar.

*SD-LEU-URA*: Base nitrogenada 0.67%, glucosa 2%, sulfato de adenina 50 mg/l, L-histidina 50 mg/l, L-licina 50 mg/l y L-triptofano 50 mg/l. Medio sólido más 2% de agar.

*SD-URA-gal*: Base nitrogenada 0.67%, galactosa 2%, sulfato de adenina 50 mg/l, L-histidina 50 mg/l, L-leucina 50 mg/l, L-licina 50 mg/l y L-triptofano 50 mg/l. Medio sólido más 2% de agar.

*Medios para marcadores de auxotrofia*: Base nitrogenada 0.67 %, glucosa 2 %, agar 2 % y todos los aminoácidos 50 mg/l, excepto el que se desea probar.

*Medio de esporulación*. Acetato de potasio 1%, extracto de levadura 0 1%, glucosa 0.05% y agar 2%.

#### **II.4. Cultivo de las células**

A partir de los cultivos originales obtenidos de diversas fuentes se inocularon 20 ml de medio YPD o YPAD dependiendo del marcador de auxotrofia *ade<sup>-</sup>*, y se incubaron por 40 h a 30 °C con agitación constante (250 rpm). A partir de estos cultivos, se aislaron colonias individuales plaqueando las células en cajas con medio sólido YPD o YPAD. Se analizó un promedio de 10 colonias individuales de cada cepa en cajas de marcadores de auxotrofia, para verificar el genotipo de cada una, se prepararon soluciones madres con glicerol y se

almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para los experimentos bioquímicos y fisiológicos, de una placa fresca se inocularon 20 ml de medio y se incubaron por 24 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Después de la incubación se contaron las células en el cultivo con un hemocitómetro de Neubauer y se inocularon 200 ml de medio fresco con  $5 \times 10^4$  células/ml. Este cultivo se incubó por 20 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Las células obtenidas, se colectaron por centrifugación a  $1500 \times g$  por 10 min y se lavaron 2 veces con 50 ml de agua destilada. Las células lavadas, se pesaron y se resuspendieron en agua destilada, a razón de 0.1 g/ml y se incubaron por 12 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Después de esta incubación, se lavaron 2 veces con 50 ml de agua destilada y se resuspendieron a 0.5 g/ml en agua. Antes de utilizarlas se permitió que se estabilizaran por una hora en hielo; estas son las células que denominaremos como ayunadas. También se recuperaron las células inmediatamente después de lavarlas la primera vez y se resuspendieron a 0.5 g/ml en agua, estas son las células sin ayunar.

Para los experimentos con DNA y RNA la preparación de las células es básicamente la misma, excepto por el ayuno y por los tiempos de incubación.

## **II.5. Transformación de las levaduras**

Para la transformación se crecieron células a una densidad óptica de 0.5 a 0.6 unidades a 600 nm, 50 ml del cultivo se centrifugaron en un tubo estéril a  $1500 \times g$  por 10 min y se lavaron las células con 50 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril. se centrifugaron 10 seg en una microfuga y se resuspendieron en 1 ml de Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 1 mM y acetato de litio 100 mM. Se centrifugaron 10 seg en la microfuga y el paquete se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  del

mismo amortiguador. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril se agregó 1 µg del plásmido, 50 µg de DNA de esperma de salmón, 50 µl de las células y 300 µl de Tris-HCL 25 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, acetato de litio 100 mM y polietilenglicol 3350 al 50%, se mezcló bien y se incubó por 2 h a 30 °C con agitación constante. Posteriormente se agregaron 50 µl de dimetilsulfóxido, se mezcló bien y se incubó por 15 min a 42 °C. La mezcla se centrifugó 5 seg en la microfuga y el paquete se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril. Se sembraron 100 µl de estas células en cajas con medio selectivo de acuerdo con el marcador de auxotrofia y se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron las colonias ( 2 a 3 días).

Para las mutaciones dobles y triples se utilizaron fondos genéticos con mutaciones individuales y se siguió el procedimiento antes descrito para hacer la interrupción de *KHAI* en estos fondos genéticos.

## **II.6. Análisis tipo Southern y Northern**

Se aisló DNA genómico de la cepa silvestre y de las mutantes. Se recuperaron las células de un cultivo de 10 ml de YPD o YPAD y se rompieron agitando en un vortex por 4 min, con Tritón X 100 2 %, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM y un volumen de perlas de vidrio de 0.5 mm. El homogenado se centrifugó en una microfuga por 5 min y el sobrenadante se trató con RNasa (30 µg/ml) por 30 min a 37 °C. Se recuperó el DNA por precipitación con acetato de amonio (0.4 M) y etanol 100% El RNA se aisló a partir de un cultivo de 200 ml de YPD o YPAD con una densidad óptica de 0.6 unidades a 600 nm (González y cols., 1992). El DNA cortado con la enzima de restricción *EcoRI* se corrió en un gel de agarosa al 1%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Sambrook y cols , 1989) y se hibridizó contra un fragmento de 818 pb

amplificado por PCR del gen YJL094c marcado con [<sup>32</sup>P]. La marca en la membrana se detectó con una placa de autorradiografía después de exponer por 4 h. El RNA se corrió en un gel de agarosa al 1%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Sambrook y cols., 1989) y se hibridizó contra un fragmento de 818 pb amplificado por PCR del gen YJL094c marcado con [<sup>32</sup>P]. La marca en la membrana se detectó con una placa de autorradiografía después de exponer por 4 h.

## **II.7. Cruza de cepas y análisis de esporas**

Para la formación de diploides, se mezclaron dos cepas de levadura de sexos contrarios en medio YPD y se incubaron por 6 h a 30 °C con agitación constante. Se sembró una alícuota del cultivo en medio sólido SD y se incubó por 24 h a 30 °C. De las colonias que se obtuvieron se aisló una y se guardó en glicerol.

Para la obtención de esporas, se aisló una colonia de las células diploides y se creció en medio YPD durante la noche (12 h) a 30 °C con agitación constante. Al día siguiente, se transfirió una alícuota del cultivo a medio de esporulación y se incubó a 25 °C con agitación constante. La aparición de esporas se verificó por análisis al microscopio (de 2 a 10 días). Una vez que se obtuvieron las células esporulando, se colectó 1 ml por centrifugación, se resuspendieron en 0.2 ml de agua destilada estéril con 500 U de β-glucuronidasa y se incubó 1 h a 30 °C con agitación constante. Posteriormente, se agregaron 0.15 g de perlas de vidrio estériles y un mililitro más de agua estéril. Se agitó en el vortex durante 2 min y se verificó al microscopio que las ascas se rompieran. Las esporas obtenidas se sembraron en medio selectivo y se incubaron a 30 °C por 5 a 10 días.

## **II.8. Crecimiento, composición celular y metabolismo de la glucosa**

Se hicieron curvas de crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes. Las curvas se iniciaron inoculando 100 ml de medio YPD con  $5 \times 10^4$  células/ml. Los medios se incubaron a 30 °C con agitación constante y se tomaron alícuotas de 1 ml cada hora. En estas alícuotas se contó el número de células con el hemocitómetro de Neubauer. Se obtuvo el peso húmedo del paquete celular, pesando directamente en una balanza analítica. Se calculó la biomasa a partir de un extracto celular con ácido tricloroacético, pesando en una balanza analítica. Se determinó el consumo de glucosa, determinando la cantidad de glucosa restante en el medio después de centrifugar las células, siguiendo la reducción del  $\text{NADP}^+$  con ATP, hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Kunst y cols. 1984), en una celda de 1 ml con TEA-HCl 50 mM pH 7.5 (Trietanol amina llevada al pH con HCl) y se siguieron los cambios de absorbencia en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, a 340 nm. La producción de etanol se determinó en una alícuota del medio de cultivo después de centrifugar las células, determinando la reducción de  $\text{NAD}^+$  por la alcohol deshidrogenasa (Beutler, 1984) en una celda de 1 ml con  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  50 mM pH 8.8 y se siguieron los cambios de absorbencia en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 340 nm. También se determinó el contenido de potasio intracelular con un fotómetro de flama (Zeiss PF5). Se solubilizaron 100 mg de células con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y se determinó la concentración de potasio en el sobrenadante después de quitar los restos celulares por centrifugación.

### 11.9. Transporte de [ $^{86}\text{Rb}$ ] y transporte de potasio

Para determinar los parámetros cinéticos del transporte de rubidio, se incubaron 50 mg (100  $\mu\text{l}$ ) de células ayunadas en 900  $\mu\text{l}$  de MES-TEA 2 mM (ácido morfolino-etanosulfónico neutralizado con trietanolamina) pH 6.0 más glucosa 50 mM por 2 min a



temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregó [ $^{86}\text{Rb}$ ] (400 cpm/nmol) a diferentes concentraciones (de 0.1 a 5.0 mM) y se incubó por dos minutos más. Se filtraron 100  $\mu\text{l}$  de esta mezcla a través de un filtro de nitrocelulosa con una porosidad de 0.45  $\mu\text{m}$ , lavando el filtro con 10 ml de 100 mM KCl. Posteriormente los filtros se dejaron secar, se les añadieron 5 ml de líquido de centelleo y se determinó la marca incorporada a las células en un contador de centelleo (Beckman LC6000).

El transporte de potasio se determinó con un electrodo de valinomicina (selectivo para este catión) acoplado a un electrómetro (Beckman Select Ion 2000) y a una computadora. A 10 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0 se agregaron 50 mg de células ayunadas y se registraron los movimientos de potasio por 3 min. Posteriormente se agregó glucosa 50 mM y se continuó registrando por 5 min más. La concentración de potasio extracelular se calculó a partir de un modelo matemático, que nos permitió calibrar la respuesta del electrodo a diferentes concentraciones de potasio.

## **II.10. Determinación del pH intracelular y extracelular**

El bombeo de protones se determinó en un espectrofotómetro de doble longitud de onda (SLM Aminco DW2C, modificado por OLIS), siguiendo los cambios en absorbencia del púrpura de bromocresol (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 487-586 nm. La reacción se inició agregando 25 mg de células ayunadas en 2 ml de MES-TEA 2.0 mM pH 6.0 y glucosa 50 mM. Los cambios del pH se calibraron mediante adiciones consecutivas de HCl 100 mM.

El pH intracelular se determinó siguiendo los cambios en la fluorescencia de células ayunadas, cargadas con piranina. En una celda de electroporación se colocaron 700  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células más 20  $\mu\text{l}$  de piranina (100 mM) y se aplicó un pulso de 1500 V, 200  $\Omega$  y 25  $\mu\text{F}$ , con una duración de 4 msec, en un electroporador (BioRad Gene Pulser II). La

suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó, se lavó tres veces con agua destilada para quitar el colorante externo, y el paquete celular se resuspendió en el volumen original con agua destilada. En una celda para el espectrofluorómetro se colocaron 2 ml de MES-TEA 2 mM (pH 6.0) y 25 mg de células electroporadas. Se permitió que las células se adaptaran al medio por 2 min y se comenzó el registro de la fluorescencia en un espectrofluorómetro (SLM DMX 1000) acoplado a una computadora, a 460 nm de excitación y 520 nm de emisión. Dos min después de iniciado el registro se añadió glucosa 50 mM y se continuó registrando por 5 min. Posteriormente se agregó KCl 50 mM y se registró por 2 min más. Para calcular el valor del pH intracelular se agregó  $\text{NH}_4\text{OH}$  100 mM para obtener la fluorescencia máxima (piranina<sup>-</sup>) y 100 mM de ácido propiónico para obtener la fluorescencia mínima (piranina H). Con el pK 7.2 de la piranina y la ecuación de Henderson-Hasselbalch se convierten los valores de fluorescencia a valores de pH (Peña y cols., 1995).

## **II.11. Estimación del potencial de membrana**

El potencial de membrana se estimó midiendo los cambios en la fluorescencia de la ditiocarbocianina-3 ( $\text{DisC}_3$  3). En una celda para espectrofluorómetro se colocaron 2 ml de MES-TEA 2 mM (pH 6.0),  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ , CCCP 10  $\mu\text{M}$ , glucosa 50 mM y 25 mg de células ayunadas y se incubó por 3 min. Los cambios en la fluorescencia se midieron en un espectrofluorómetro (SLM DMX-1000) acoplado a una computadora, a 540 nm de excitación y 590 nm de emisión. La determinación se inició agregando 0.25  $\mu\text{M}$   $\text{DisC}_3$  3, registrando por 3 min. Posteriormente se agregó KCl 50 mM y se registró durante 3 min más. La estimación del potencial está determinada por la intensidad de la fluorescencia alcanzada y el apagamiento de esta fluorescencia después de agregar KCl. Esta

determinación no es cuantitativa.

## **II.12. Sincronización celular y citometría de flujo**

Para estimar los cambios en el ciclo celular, se determinó la fluorescencia del yoduro de propidio asociado al DNA con un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACScan) y los resultados se analizaron con el software (CELL-Quest). Las células se sincronizaron con el método de Heichman y Roberts (1996). Se incubaron células en fase logarítmica con 5  $\mu\text{g}$  de factor de apareamiento  $\alpha$  por 2 h a 25 °C, para detener el ciclo celular. Posteriormente, se agregó pronasa E (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para liberar a las células de la detención y se centrifugaron a 1500 X g por 10 min. El paquete se resuspendió en medio fresco y se incubó durante 6 h a 30 °C.

Las células se prepararon para el citómetro siguiendo el procedimiento descrito por Lew y cols. (1992). El cultivo se fijó en etanol al 70 % durante la noche a 4 °C, al día siguiente se incubó con RNasa A (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 4 h a 37 °C y después por una hora más con pepsina (10 mg/ml). Posteriormente las células se tiñeron con yoduro de propidio (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante la noche a 4 °C y antes de aplicarlas al citómetro, se diluyeron a una densidad de 6 X 10<sup>6</sup> células/ml y se sonicaron por 15 seg

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.1. Análisis del marco de lectura abierto YJL094c (*KHA1*)

En la figura 1 (en el artículo) se muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos para *Kha1* y la comparación con tres secuencias reportadas para otros intercambiadores. Este gen potencialmente codifica para una proteína de 873 residuos con una masa molecular de 97.1 kDa y un punto isoeléctrico de 6.0. El análisis hidropático, utilizando una ventana de 19 aminoácidos y el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) predice entre 10 y 12 cruces transmembranales y una estructura globular en el extremo carboxilo de la proteína. Por sus características, esta proteína membranal puede agruparse con los otros intercambiadores asociados a la membrana plasmática (Nass y Rao, 1998).

#### III.2. Interrupción del marco de lectura abierta YJL094c (*KHA1*)

La interrupción del gen *KHA1* se hizo por recombinación homóloga de un fragmento de 818 pb obtenido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con el programa *prime* del paquete para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos GCG, y utilizando como molde la secuencia del ORF YJL094c reportada en la base de datos del genoma de levadura, se diseñaron los desoxioligonucleótidos F1 y R1:

*Forward 1* 5'TTAGCCAGTCATGCTCAG3' en la posición 396

*Reverse 1* 5'CCTCCAAAGCAAGAATACAA3' en la posición 1214

Con estos desoxioligonucleótidos, se amplificó por PCR, a partir de DNA genómico de la cepa W303-1A, con un programa de un ciclo de desnaturalización (94 °C 10 min), 25 ciclos [desnaturalización (94 °C 30 seg), alineamiento (55 °C 45 seg) y elongación (72 °C 2 min)], más un ciclo de elongación (72 °C 10 min), a diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>.

Con estas condiciones se obtuvo un fragmento de 818 pb (figura 1).

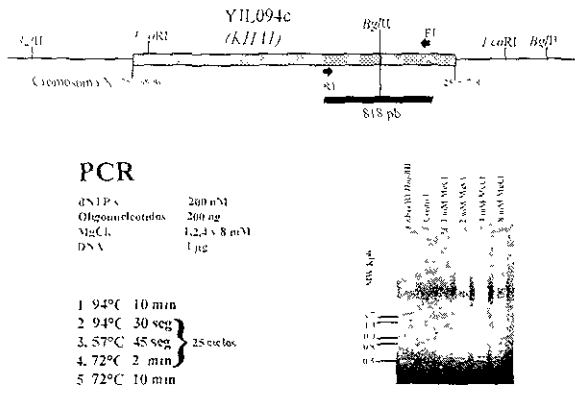
Este fragmento se ligó en el vector pCR<sup>TM</sup>II (Promega) para productos de PCR (figura 2) y se secuenció con sequenasa V.2 (BRL). La lectura de la secuencia confirmó que el producto obtenido corresponde a la región esperada del ORF YJL094c (no se muestran los resultados).

Un fragmento de *Eco*RI del pCR<sup>TM</sup>II<sub>KHA1-818pb</sub> se subclonó en el vector YIP352 (figura 3); este vector se caracteriza por carecer de origen de replicación y solo por recombinación puede permanecer en la célula. El DNA del vector YIP352<sub>KHA1-818pb</sub> se linealizó con la enzima *Bgl*II; este es un sitio que se encuentra naturalmente en el gen *KHA1* y se localiza a la mitad del fragmento de 818 pb. Con el DNA linealizado se transformaron células de la cepa W303-1A.

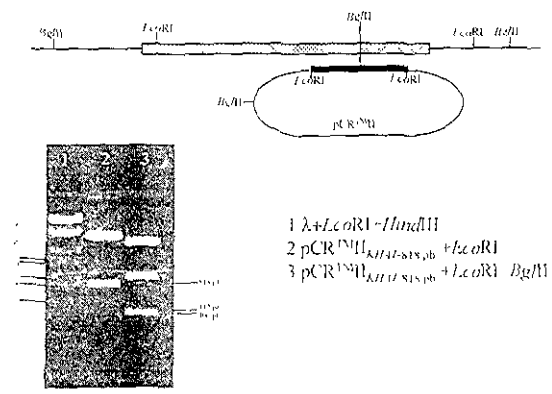
### III.3. Identificación de las transformantes

De la transformación se aislaron 50 colonias y se replicaron en cajas de YPAD ajustadas a diferentes valores de pH y diferentes cantidades de NaCl. Se seleccionaron 6 colonias que pudieron crecer en estos medios. De estas colonias se aisló el DNA genómico y se hizo un análisis tipo Southern (no se muestran los resultados).

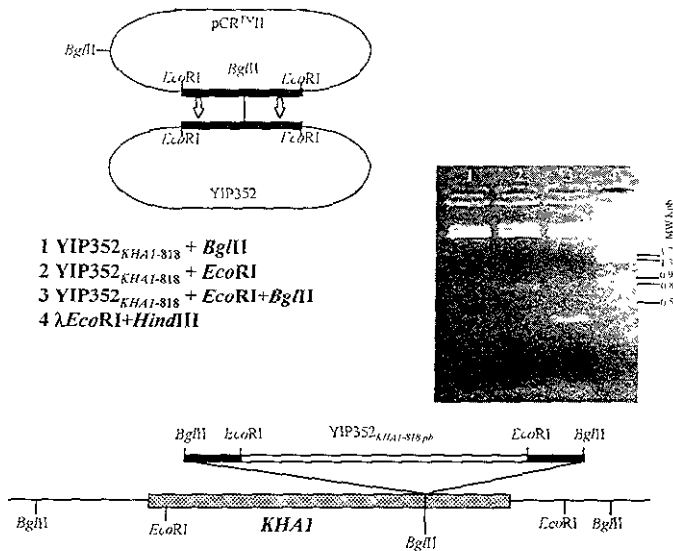
De las seis cionas se tomó una y se cruzó con la cepa R757. De la cruce de las cepas se aislaron esporas que pudieran crecer en medio SD-URA. Se probaron veinte esporas nuevamente en los medios con diferentes valores de pH y diferentes cantidades de NaCl, y a seis de ellas se les aisló el DNA genómico y se repitió el análisis tipo Southern (no se muestran los resultados)



**Figura 1. Amplificación del fragmento de 818pb de *KHA1* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** En la parte superior se representa una fracción del Cromosoma X. El rectángulo representa el ORF para *KHA1*, las flechas marcadas como R1 y F1 indican la posición y sentido de los deoxi oligonucleótidos empleados y el rectángulo negro el fragmento esperado. En la parte inferior se muestran las condiciones experimentales. De cada muestra se corrieron 10  $\mu$ l en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.



**Figura 2. Clonación del producto de PCR en el vector pCR<sup>IM</sup>H.** Del producto de PCR 1  $\mu$ g se incubó con 0.5  $\mu$ g del vector y 1 U de ligasa por 18 h a 16 °C. Con el producto de la ligación se transformaron células de *E. coli*. Se recuperó el vector de las transformantes obtenidas. Se hizo una digestión con las enzimas *Eco*R1 y *Bgl*II que liberan el producto de PCR del vector (línea 1) y lo corta por la mitad (línea 2)



**Figura 3. Clonación del producto de PCR en el vector integrativo YIP352.** Del vector pCR<sup>TM</sup>II<sub>KHA1-818</sub> 20 µg se cortaron con *Eco*RI por 12 h a 37 °C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% y se recuperó la banda correspondiente a 800 pb de la figura anterior (línea 2). Del DNA recuperado 5 µl se mezclaron con 1 µg del vector YIP352 y 1 U de ligasa y se incubaron por 18 h a 4 °C. Con el producto de la ligación se transformaron células de *E. coli*. Se recuperó el plásmido de las transformantes obtenidas y se hizo una digestión con las enzimas *Eco*RI y *Bgl*II que abren el plásmido (línea 1), liberan el producto de PCR del vector (línea 2) y lo cortan por la mitad (línea 3).

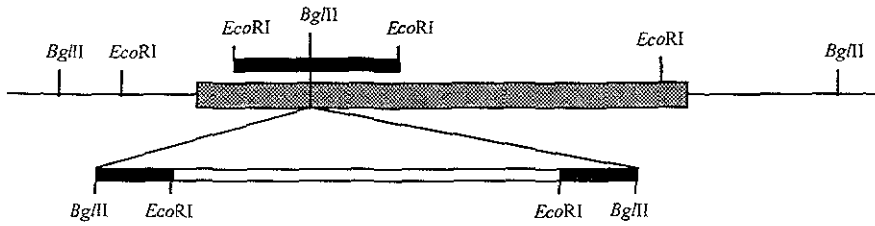
Finalmente, con esta metodología se seleccionó una clona denominada *kha1::URA*. De esta clona y de la cepa silvestre se aisló el DNA y el RNA, y se hicieron los análisis tipo Southern y Northern (figura 4 en la tesis y figura 2 en el artículo). En el análisis tipo Southern se observó un fragmento de la digestión con *Eco*RI del DNA genómico en la cepa silvestre, mientras que en la mutante se obtienen dos fragmentos para la misma digestión, lo que confirmó la interrupción de *KHA1*. En el análisis tipo Northern sólo se obtuvo una banda para la cepa silvestre y ninguna para la cepa transformante, lo que interpretamos como una expresión constitutiva del gen en la cepa silvestre y confirmación de la interrupción del mismo en la cepa mutante.

Para determinar el fenotipo en otras mutantes con fondos genéticos diferentes, se utilizó el transporte de potasio como criterio para la identificación de mutantes. Posteriormente se realizó el análisis tipo Southern y PCR para confirmar las interrupciones.

#### **III.4. Crecimiento y metabolismo de la glucosa**

En la gráfica de la figura 5 se muestran las curvas de crecimiento para la cepa silvestre y la mutante (*khal::URA*). En esta gráfica se observa claramente la mayor tasa de crecimiento de la cepa *khal::URA* con respecto a la cepa control. En el mismo experimento se determinó el peso húmedo de las células a diferentes tiempos durante el cultivo (figura 6). También se determinó el consumo de glucosa (figura 7) y la producción de etanol (figura 8). Estos resultados muestran claramente que las células en las que se hizo la interrupción de *KHAI* tienen un metabolismo acelerado ya que la cepa *khal::URA* consume más rápido la glucosa y produce más etanol con respecto a las células control. En la Tabla I (en el artículo) se muestra un resumen de diferentes parámetros que se determinaron en un cultivo de la cepa silvestre y de la mutante, después de 14 h.

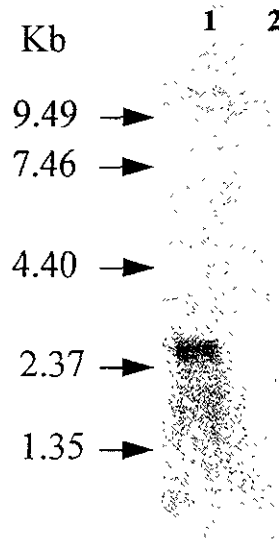




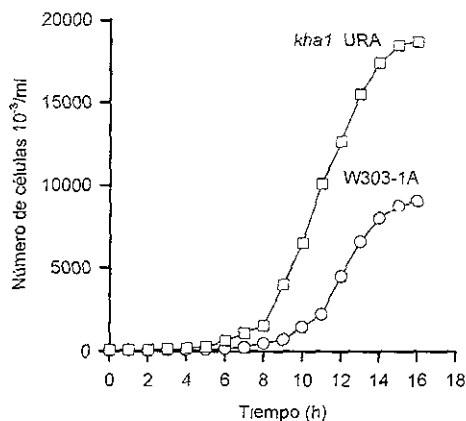
### Southern



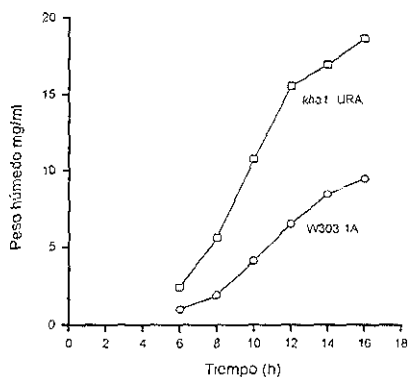
### Northern



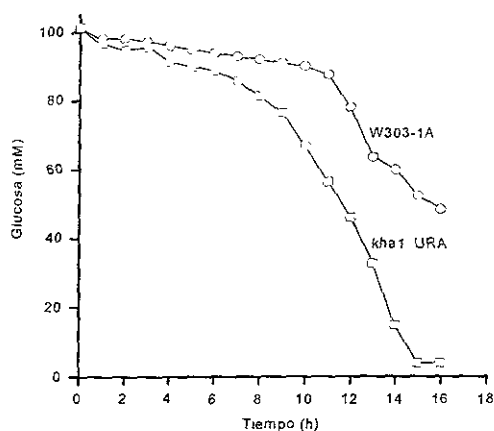
**Figura 4. Análisis tipo Southern y Northern.** En la parte superior se representa el evento de recombinación esperado. En la parte inferior se muestra el análisis tipo Southern para el DNA genómico cortado con *Eco*RI de la cepa silvestre (línea 1) y de la mutante (línea 2). También se muestra el análisis tipo Northern para el RNA total de la cepa silvestre (línea 1) y la mutante (línea 2).



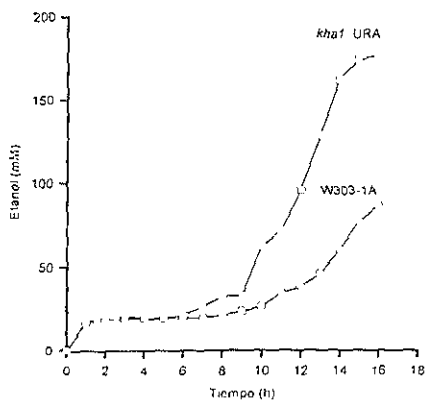
**Figura 5. Curvas de crecimiento.** Se inocularon matraces con 200 ml de medio YPAD con  $5 \times 10^4$  células/ml de cada cepa y se incubaron a 30 °C con agitación continua. Cada hora se tomó una alícuota de 1 ml y se contó el número de células con un hemocitómetro de Neubauer



**Figura 6. Determinación del peso húmedo.** Se inocularon matraces con 200 ml de medio YPAD con  $5 \times 10^4$  células/ml de cada cepa y se incubaron a 30 °C con agitación continua. Después de 6 h de incubación, se tomaron alícuotas de 1 ml cada dos horas. Las alícuotas se pusieron en tubos Eppendorf previamente tarados y se centrifugaron en una microfuga por 30 seg. El peso húmedo se obtuvo pesando directamente los paquetes celulares en una balanza analítica



**Figura 7. Determinación del consumo de glucosa.** Se inocularon matraces con 200 ml de medio YPAD con  $5 \times 10^4$  células/ml de cada cepa y se incubaron a 30 °C con agitación continua. Cada hora se tomaron alicuotas de 1 ml. Las alicuotas se pusieron en tubos Eppendorf y centrifugaron en una microfuga por 30 seg. En el sobrenadante se determinó la cantidad de glucosa como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura 8. Determinación de la producción de etanol.** Se inocularon matraces con 200 ml de medio YPAD con  $5 \times 10^4$  células/ml de cada cepa y se incubaron a 30 °C con agitación continua. Cada hora se tomaron alicuotas de 1 ml. Las alicuotas se pusieron en tubos Eppendorf y centrifugaron en una microfuga por 30 seg. En el sobrenadante se determinó la cantidad de etanol como se describe en Materiales y Métodos.

En estos resultados se destacan, el incremento en el número de células (1.26 veces con respecto a la cepa silvestre), la biomasa obtenida (1.5 veces), la producción de etanol (2.68 veces) y el contenido de potasio intracelular (1 96 veces). Una vez más, estos resultados, resaltan un incremento en el metabolismo de la cepa mutante así como un incremento en los niveles intracelulares de potasio.

Para ahondar en las alteraciones observadas en el crecimiento, se hizo una citometría de flujo (figura 9). En la figura se observa que las células de la cepa silvestre sincronizadas en la fase G1 con factor  $\alpha$ , luego de 6 h de ser liberadas de la detención con pronasa, oscilan entre las fases G1 y G2 del ciclo celular (1C y 2C), mientras que en las células de la cepa mutante después del mismo tratamiento, la población tiende a mantenerse en la fase G2 del ciclo celular (2C). Esto último se puede interpretar como que las células mutantes, tienen un ciclo celular más corto. El incremento en los niveles de potasio intracelular junto con una disminución de 20% en el tamaño de las células pueden explicar las alteraciones observadas en el metabolismo así como en el ciclo celular (Peña y Ramírez, 1986; Marshall, 1994; Degols y cols., 1996).

### **III.5. Parámetros cinéticos del transporte de [ $^{86}\text{Rb}$ ] y características del transporte de potasio**

Con el propósito de averiguar si la acumulación de potasio pudiera deberse a un aumento en la actividad de los sistemas de transporte, se obtuvieron las constantes cinéticas para el transporte de rubidio, un análogo del potasio para los sistemas de transporte de este catión. Para la cepa silvestre se encontró una constante de afinidad de 227  $\mu\text{M}$  y una constante catalítica de 471 nmol/min/mg; para la cepa mutante una constante de afinidad de

149 $\mu$ M y una constante catalítica de 434 nmol/min/mg (figura 3 en el artículo). Estos resultados no mostraron diferencias significativas para las constantes cinéticas. Esto se puede interpretar como que los sistemas de transporte de potasio no están afectados, y que la acumulación de potasio debe estar mediada por otro factor.

Los movimientos de potasio para ambas cepas, medidos con un electrodo selectivo, se muestran en la figura 4 (en el artículo). En esta figura se observa que cuando se agregan las células al medio, se produce una salida rápida de potasio que es mayor para la cepa silvestre. Posteriormente, cuando se agrega glucosa al medio, las células de la cepa mutante son capaces de recuperar la totalidad del potasio liberado inicialmente, mientras que las células de la cepa silvestre sólo recuperan parte de este potasio. Este resultado, junto con la salida de potasio reportada por Peña y Ramírez (1991) parece indicar que la acumulación de potasio observada se debe a la pérdida de la actividad de salida de potasio mediada por el intercambiador  $K^+/H^+$  propuesto por estos autores.

### **III.6. Determinación del bombeo de protones y el pH intracelular**

Para obtener la actividad del bombeo de protones, se determinó el pH del medio extracelular (figura 5 en el artículo). En esta figura se puede observar que la velocidad con la que se acidifica el medio y la acidificación total son mayores para la mutante, y que este cambio se acentúa con la adición de potasio al medio de reacción.

En cuanto al pH intracelular (figura 6A en el artículo), la cepa silvestre puede mantener el pH bien regulado en valores cercanos a 6.0 unidades aun después de agregar potasio al medio de reacción. En la cepa mutante, el pH intracelular tiende a aumentar y esta alcalinización se acentúa al agregar potasio al medio.

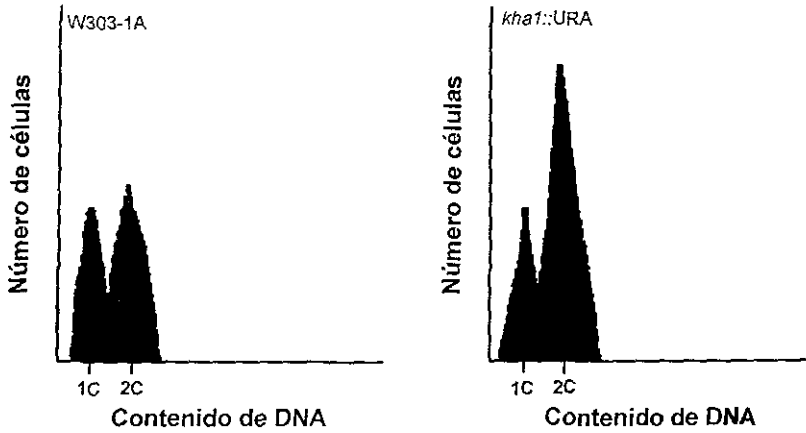
### III.7. Determinación del potencial de membrana

En la gráfica de la figura 6B (en el artículo) se muestran los resultados obtenidos al seguir los cambios en la fluorescencia de la cianina DiSC<sub>3</sub> 3. Aunque estos cambios no son cuantitativos, dan una idea aproximada de la magnitud del potencial de membrana. En la gráfica se observa que en la cepa mutante se obtiene una señal mayor que en la cepa silvestre. También se observa que la adición de potasio produce un cambio más grande en la señal para la mutante. El mayor potencial de membrana observado en la mutante se puede explicar por una salida de potasio por el canal iónico Tok1. Este incremento también nos permite explicar parcialmente la acumulación de potasio observada en la mutante.

Los cambios observados en el movimiento de protones, al igual que los observados en los movimientos y acumulación de potasio, se pueden explicar con la pérdida del intercambiador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Kha1 (figura 7 en el artículo). En esta figura se propone un esquema del funcionamiento de este sistema en la levadura. En un primer paso, la H<sup>+</sup>-ATPasa genera el gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu_{H^+}$ ); en un segundo paso, el gradiente eléctrico es utilizado para el transporte de potasio y el colapso parcial de este gradiente debe incrementar la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa, como se observó en los resultados; finalmente, en un tercer paso, el intercambiador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Kha1 puede recircular parte de los protones transportados por la H<sup>+</sup>-ATPasa manteniendo el pH intracelular y parte del potasio transportado por los sistemas Trk1 y Trk2, manteniendo los niveles intracelulares de este catión.

Con los resultados obtenidos, podemos decir que el marco de lectura abierta YJL094c *KHA1* codifica para una proteína que se expresa en la levadura y tiene características compartidas con intercambiadores catión/protón. La pérdida de su actividad se refleja en

una pérdida de la capacidad de las células para mantener el pH y los niveles de potasio intracelulares. El desequilibrio en el pH y la concentración intracelular de potasio provocan una activación del metabolismo y por consecuencia una aceleración del ciclo celular. Estos datos fueron reportados en Ramírez y cols. (1998).



**Figura 9. Determinación del contenido de DNA.** En la células de la W303-1A y de la *kha1::URA* se detuvo el ciclo celular en la fase G1 con factor  $\alpha$  como se describe en Materiales y Métodos. Después de ser liberadas de la detención se incubaron por 6 h y se fijaron con etanol al 70 %. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo. Las áreas representan la población de las células que se encuentran en G1 (1C) y G2 (2C)

## A *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Lacking a $K^+/H^+$ Exchanger

JORGE RAMIREZ,<sup>1</sup> OSCAR RAMIREZ,<sup>1</sup> CARLOS SALDAÑA,<sup>1</sup> ROBERTO CORIA,<sup>1</sup>  
AND ANTONIO PEÑA<sup>1,2\*</sup>

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,<sup>1</sup> and Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,<sup>2</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Received 12 March 1998 Accepted 31 August 1998

The *KHA1* gene corresponding to the open reading frame YJL094c (2.62 kb) encoding a putative  $K^+/H^+$  antiporter (873 amino acids) in *Saccharomyces cerevisiae* was disrupted by homologous recombination. The core protein is similar to the putative  $Na^+/H^+$  antiporters from *Emmerococcus hirae* (*NAPA* gene) and *Lactococcus lactis* (*LLUPP* gene) and the putative  $K^+/H^+$  exchanger from *Escherichia coli* (*KEFC* gene). Disruption of the *KHA1* gene resulted in an increased  $K^+$  accumulation and net influx without a significant difference in efflux, as well as an increased growth rate, smaller cells, and twice the cell yield per glucose used. Flow cytometry analysis showed an increase of the DNA duplication rate in the mutant. Kinetic studies of  $^{86}Rb^+$  uptake showed the same saturable system for wild-type and disruptant strains. Mutant cells also produced a greater acidification of the medium coincident with an internal pH alkalization and showed a higher oxygen consumption velocity. We speculate that higher  $K^+$  accumulation and increased osmotic pressure accelerate the cell cycle and metabolic activity.

Three distinct genes encoding putative  $Na^+/H^+$  antiporters have been identified by the yeast genome sequencing project (7). One of these, *NHA1*, was recently cloned from a multicopy genomic library by selection for increased sodium tolerance (24). Disruption of *NHA1* confers significant  $Na^+$  sensitivity in a strain lacking the *PMR2* locus. A protein (NHX1) with homology to amiloride-sensitive  $Na^+/H^+$  exchangers (NHE1 to NHE4) in animal cells (1) was encoded by the yeast gene *YDR456w*, is probably localized in the yeast vacuole, and is involved in sodium tolerance (20). A *PMR1* mutant strain with NHX1 disrupted lost the ability to sequester sodium in the vacuole. A third yeast gene, *YJL094c* (18), exhibited homology to genes encoding putative  $Na^+/H^+$  exchangers from *Enterococcus hirae* (28) and *Lactococcus lactis* (17) and a putative  $K^+/H^+$  exchanger from *Escherichia coli* (19).

It is known from experiments with yeast membrane vesicles that there is a  $K^+-Na^+/H^+$  exchange system in the plasma membrane of yeast (4, 25). In the present work, we characterize the *YJL094c* gene and show that it probably encodes the putative  $K^+/H^+$  antiporter; therefore, we have named it *KHA1* (potassium/hydrogen ion antiporter 1). The *KHA1* (*YJL094c*) gene may play a vital physiological role in the regulation of intracellular pH, in  $K^+$  accumulation, in cell volume control, and possibly in the activation of growth factors.

### MATERIALS AND METHODS

**Strains and mutational construction.** The wild-type strains used were W303-1A (*MA1a ade2-1 can1 100 his3-11,15 leu2-1,12 trp1-1 ura3-1*) and R757 (*MATa his4-15 his9 ura3-52*). An internal fragment of the *YJL094c* open reading frame (ORF) was obtained by PCR with two specific oligodeoxynucleotides. Oligodeoxynucleotide F (TTAGCCAGTCATGCTCAG) was derived from the 5' sequence at position 396 in the *KHA1* gene. Oligodeoxynucleotide R (CCTCCA AAGCAAGAAATACAA) was derived from the 3' sequence at position 1214 in the *KHA1* gene. Total DNA from *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A was used as a template for amplification by PCR, which was carried out in a Cofor TempCycler II with the following program: one denaturing cycle for 10 min at 94°C followed

by 25 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 45 s at 55°C, and extension for 2 min at 72°C. An 818-nucleotide (nt) PCR product was obtained, gel purified, and ligated into the pCRII vector (Amersham). This subclone was sequenced by primer extension with a Sequenase V.2 kit (United States Biochemicals). An *EcoRI* fragment carrying the original PCR product was obtained from the pCRII clone and subcloned into Yip352 (10) digested with the same enzyme. The resulting plasmid was digested with *Xba*I at the naturally occurring site in the *KHA1* gene at position 808 to produce a linearized plasmid that carries fragments of 412 and 406 nt as recombinant ends. The linearized plasmid was then used to transform strains W303-1A and R757. Potential mutant transformants were recognized by their altered growth on YPAD plates containing 1 M KCl or 1 M NaCl at different pH values (4.0, 6.0, and 8.0).

**Southern and Northern analysis.** The agarose gel containing *Bgl*II- and *Eco*RI-digested DNA from the wild-type strains and six independent *KHA1* *URA3* mutants was denatured and transferred to a nylon membrane as described previously (26). The DNA blot was probed with the 818-nt PCR fragment labeled with  $^{32}P$ dCTP. The same pattern was observed for the W303-1A and R757 mutants, clearly indicating that the construction had been inserted in the wild-type genomic sequence of *KHA1*.

Northern analysis was carried out as previously described by Gonzalez et al. (8). Total yeast RNA of the wild-type and *KHA1* *URA3* strains previously analyzed by Southern blotting was extracted from cells grown to the log phase (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>] 0.6 to 1.0) in 200 ml of medium as described by Struhl and Davis (27).

**Growth, cell composition, and glucose metabolism.** YPAD medium contained 2% glucose, 1% peptone, 1% yeast extract, and 50 mg of adenine sulfate per liter. Growth took place at 30°C on a gyrator shaker, and for most experiments the cells were collected near glucose exhaustion after 12 to 16 h. As specified, certain experiments were performed with starved cells (resuspension in water and 18 h of additional shaking). For cells in the exponential growth phase (see Table 1), a subculture was monitored from an initial OD<sub>600</sub> of 0.02 with hourly sampling of OD, cell counts, wet weight, biomass, glucose consumption, ethanol production, and internal  $K^+$  content.

The cells were counted in a Neubauer cytometer. For biomass determination, centrifuged cells were disrupted with 10 ml of 10% trichloroacetic acid for 10 min at room temperature, washed twice with distilled water, and weighed. Ethanol production was measured spectrophotometrically during growth by monitoring the reduction of NAD<sup>+</sup> by alcohol dehydrogenase (3), using the supernatant after centrifuging the cells (see below). The glucose remaining in the medium was measured by the reduction of NADP<sup>+</sup> with ATP, hexokinase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase (12).

To measure the internal  $K^+$  content, 100 mg of cells grown for 14 h was disrupted by incubation with 10 ml of 2 mM cerium(III)ammonium bromide (CTAB) for 10 min at room temperature. The suspension was centrifuged, and the cation concentration in the supernatant was determined with a Zeiss PF5 flame photometer.

The fermentation rate was measured by monitoring ethanol production. Cells (50 mg [wet weight] of starved cells) were incubated for 30 min in 2 mM morpholinethanesulfonic acid-tris(hydroxymethyl)aminopropane (MES-TEA) (pH 6.0–50 mM glucose [final volume: 2 ml]). After centrifugation and adequate dilution the supernatant was used to measure ethanol as described above.

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-242, 04510 México D.F., México. Phone (525) 622-5633. Fax (525) 622-5630. E-mail: apena@fisul.unam.mx.



MI MII  
**KHA1** MANTVGGILS GVNPHFYNS SPTLPLPQA CLLLVNCNI HIFPSSMRQF KVISEVIGSV ILGPTIFQOI 70  
**LLUPP** ..... MNDYLQI TIVLIASLIA TLASRRKLIK AVIQGMLVGI LIARSLVGLV  
**KEFC** ..... MDSHTLIQA LIYLGSAALI VPIAVRLGLG SVLGYLQAGC IIGPWGLRLV  
**NAPA** ..... MEVIGIL CLLVVATTIG SHISRRPGIF AVIQGLVGV LIGQAGLGV

MIII MIV  
**KHA1** PNYTNTIFPT SBPGQLNVA NLGILPMPF LGLVVDIAPL KKHLSKALNI GIVTLAVVFG TQCLIAIPLF 140  
**LLUPP** ..... HGHVLEVM S EIGVILLMPL AGLVSDLTVL KKNFKASMLV AIGGVIVELI VFGLVAFSFG  
**KEFC** ..... TDAESILHFA EIGVILLMPL IGLVLDPQRL WKLRAAVPGC GALQMVICGG LLGLFCMLG  
**NAPA** ..... HPNILVHDFS EIGVILLMPL AGLVSDLSLL KKYFKPMFV ALLGILFVFG TGVLTGEAFQ

MV MVI  
**KHA1** HTYANKTEGE RHIKFSVFMV FTAVSISVTA FVLCRILSRK LRLIKDRAGI VVLAAGIIND IMGWILLALS 210  
**LLUPP** ..... YGMSYS ..... F FYGIVFAATS VSIIVVQLQK YGLKSTRAGS VIGVAVVDD IIA.V.LIIS  
**KEFC** ..... LRWQVA ..... E LIGMTALSS TAIAMQAMRE RNLVYVQMR SAFVLLFQR IAA.IPWAM  
**NAPA** ..... VANNEA ..... I FFGIILAATS VSIIVVQLQK LNVVNTKRS TILGASVDD IIV.V.LVLS

MVII MVIII  
**KHA1** IILSSAEGSP VNTVYILLIT FAWFLYFPP LKYLRLVWLI RTHELDREK PSLATMCIIF IMFISAYFTD 280  
**LLUPP** ..... IPTSPKNGS HGHVLEVM ..ELLFAPL FVVHKL.I.FR FWRVQKLEI AKQGVVALL ICLSLSLAD  
**KEFC** ..... IPLLATSSAS TTMGAFALSA LKVGAGLVLV VLLGRYVTRP ALRFVARSGL REVFSAVLFI LVVFGGLLE  
**NAPA** ..... FSLSFLTKS TSNLPLPLLL LEQLFYFLVI FLLVKWIAPF LMSLAEKIYA NSAIIMSIV ICLGMSLAD

MIX MXI  
**KHA1** IIGVHPIFGA FIAGLVVPRD DHYVVKLTER MDIPNIVFI FIVFAVAGLN VDLTLNKR DMGVFATIG 350  
**LLUPP** ..... SVGMSAVIGS FFGALASQT E.VSHKIDRY TSAIGYVIF FVFFVLIH VQDFSLRH IIVILLFVLA  
**KEFC** ..... EVGLSMANGA FVAGVLIASS E.YRHALESQ IEPF.KGLLL GLFFVGVMS IDPFTLLE.N PLRIVILL.  
**NAPA** ..... LIGLSSVIGA FFGIIVSQT K.VRHEVYNN VRLGYAVFI FVFFVSVLE VDFSKFSV.Q ILFILLITL.

MX MXI MXII  
**KHA1** IALPDKIISG TITAKLTGLE WRWTAAGVW MSCKGIVEIV VLVVGLNAGI ISRKIFGMVF LMAVSTVFT 420  
**LLUPP** ..... LAZLTKFIPA YFVGSNKLS TGRSMLIGTG MISRGENALI VAOIGLTSAI ITDDEVYSEL IIVILLFVLA  
**KEFC** ..... GFLIKTKIAML WLILARPLQVP NKQRWFVAVL LGQSGEFAFV VFGAAQMANV LEPEWAKSLT LAVALSMAT  
**NAPA** ..... VAILTKLIGG YIGAKFSSES SNGALMVQAG MISRGENALI ILIQIQQSNL IENHYYSPLV IIVLLSTLS

MXIII MXIV  
**KHA1** TPLTQLVYPO SYRQVGRKSL STPAEDDGAA DGLDSEGVDK TEINTQLNBL ADVSKYRIGE LTTVINTTEA 490  
**LLUPP** ..... PFLIKLVLLK .YCN.....  
**KEFC** ..... PILLVILNRL EQSSTREARE ADEIDEEQPR VIIAGVRFQG QITGRLLLSS GVKMVLVDHD PDHETLRFK  
**NAPA** ..... PLILKYFTKK VYAN.....

MXV MXVI  
**KHA1** ISPSLKLLNY LSLGVSPKPK NKKHKNETSL SRMTTADST LKSNFTKIKK MVHINWSVDV DVTNLSVID 560  
**LLUPP** .....  
**KEFC** ..... GMKVYGDAT RMDLLESAGA AKAEVLINAI DDPQTNLQLT EMVKEHFPHL QLILARADVH HYILRQAGV  
**NAPA** .....

MXVII MXVIII  
**KHA1** EKLPFEGVG ALRAIHLRLL TERTDQLQS SSLVNDDPHF TANTDSSLQI FOIFSNLSKI FFSSEVIFST 630  
**LLUPP** .....  
**KEFC** ..... EKPERETFEG ALKTCRLALE SLGLGPEYAR ERADVFRFN IQMVEEMAMV ENDTKARAIV YKRTSAMLSE  
**NAPA** .....

MXIX MXXX  
**KHA1** VREKAANIAT MKMESTDLIL LPLKGSAYEY RGSVFIIDEK YANFOHIYSH LGLNELSST FFKSIFQSLK 700  
**LLUPP** .....  
**KEFC** ..... IITEDREHLS LIQRHGWOQT EEGKHTGNMA DEPETKPS- .....  
**NAPA** .....

MXXXI MXXXII  
**KHA1** NFAVQISNT YGRLNADRFK RKRFNLLPK PYLTQSDYLG LYLLLLICYR DGYNNDNASC SIFINSKNID 770  
**KHA1** FAKDLSTAPA EHDWLNSTI KIVDIPFETK VPBEAIEKPS FIETVLDVGL SDTALADISE TPIIGEDLIP 840  
**KHA1** DESEPFSEEV RTVIFPGSNR RPDVLIYVHF SSE 873

	<b>KHA1</b>	<b>LLUPP</b>	<b>KEFC</b>	<b>NAPA</b>
<b>KHA1</b>	100	39.47	20.00	40.83
<b>LLUPP</b>	<b>25.00</b>	100	35.71	58.57
<b>KEFC</b>	<b>20.00</b>	<b>21.69</b>	100	34.81
<b>NAPA</b>	<b>25.91</b>	<b>48.02</b>	<b>22.51</b>	100
Percent Similarity				
Percent Identities				

FIG. 1. Alignment of the protein sequences, percent similarity, and percent identity for *S. cerevisiae* K<sup>+</sup>H<sup>+</sup> KHA1 family Na<sup>+</sup> U<sup>+</sup> LLUPP, *S. cerevisiae* K<sup>+</sup>H<sup>+</sup> KEFC, and *S. cerevisiae* Na<sup>+</sup> U<sup>+</sup> NAPA. Amino acid residues identical in all four proteins are indicated by asterisks; amino acid residues identical in two or three proteins are indicated in bold; and putative transmembrane domains are indicated by an overline. Solid boxes indicate percent identity, and shaded boxes indicate percent similarity.

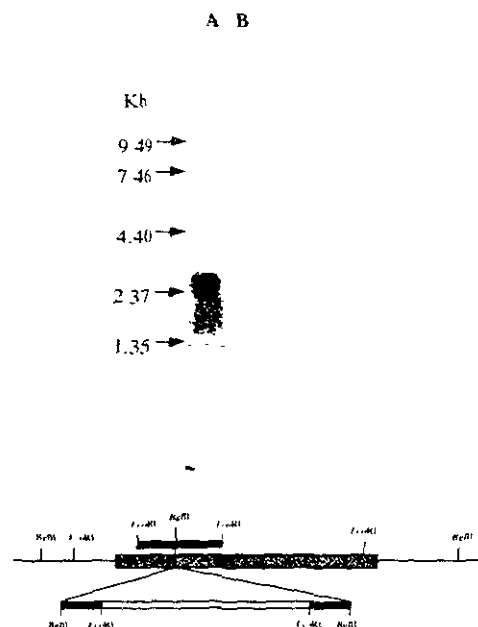


FIG. 2. Northern blot of total RNA obtained from the wild-type (lane A) and *kha1 URA3* (lane B) strains, and schematic representation of the 2.62-kb fragment carrying the *KHA1* ORF. Arrows correspond to a 9.4- to 9.4-kb RNA ladder from GIBCO BRL. The solid box indicates the PCR fragment, the shaded box indicates the complete *KHA1* ORF, and the open box indicates the *Yip352* plasmid. The RNA filter was probed with the  $^{32}$ P-labeled PCR fragment.

$O_2$  consumption was measured by monitoring its concentration at 40°C with a Clark electrode in a closed thermostated chamber connected to an oxygen monitor and computer, by using a mixture containing 50 mg of starved cells in 3.0 ml of 2 mM tartrate-MES-TEA buffer (pH 6.0)-50 mM glucose.

**Cell synchrony and flow cytometry.** The cells were synchronized as described by Heichman and Roberts (9). Logarithmically growing cells were incubated in the presence of 5  $\mu$ g of  $\alpha$ -factor per ml for 2 h at 25°C. Promase E (10  $\mu$ g/ml) was added, and the cells were released from  $\alpha$ -factor arrest by being transferred to YPAD medium without additions and incubated for a further 6 h at 30°C.

Yeast cells were prepared for flow cytometry analysis by a modification of the procedure of Lew et al. (15). Cultures were fixed in 70% ethanol overnight at 4°C and digested with RNase A for 4 h at 37°C and then with pepsin for 1 h at 37°C. The cells were stained with 50  $\mu$ g of propidium iodide per ml overnight at 4°C. The samples were diluted and sonicated for 15 s. Fluorescence was measured with a Becton Dickinson FACScan and analyzed using CELLQuest software.

**$^{86}Rb^+$  transport and  $K^+$  uptake in the medium.**  $^{86}Rb^+$  transport was measured in whole cells by adding 50 mg of starved cells (100  $\mu$ l) to 900  $\mu$ l of 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0)-50 mM glucose, and incubating the mixture for 2 min. Then  $^{86}Rb^+$  was added to a concentration of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, or 5 mM, and incubation was carried out for a further 2 min. Aliquots of 100  $\mu$ l were taken, filtered through a cellulose nitrate filter (mean pore diameter, 0.45  $\mu$ m Millipore), and washed once with 10 ml of 100 mM KCl. The filters were dried and transferred to scintillation vials with 5 ml of a scintillation cocktail and the radioactivity was measured in a liquid scintillation counter.

Potassium uptake was measured by continuously recording the extracellular concentration with a potassium selective electrode connected to an ion analyzer (Beckman Selection 20003) and computer with a mixture containing 100 mg of cells in 10 ml of 2 mM tartrate-MES-TEA buffer (pH 6.0). The changes were calculated by additions of 30  $\mu$ M KCl.

**External and internal pH.** Proton pumping was measured by monitoring the absorbance change of bromocresol purple (4  $\mu$ g per ml) at 487 to 586 nm in a dual-wavelength spectrophotometer (DW2 Ohs conversion) with a mixture containing 25 mg of starved cells in 2.0 ml of 2 mM tartrate-MES-TEA buffer (pH 6.0) plus 50 mM glucose. The changes were calibrated by additions of 100 mM HCl.

The internal pH was measured by monitoring the fluorescence changes of the starved cell suspensions after loading them with pyranine. Electroporation was performed as previously reported (23) with a Bio-Rad Gene Pulser with a pulse controller attachment. The cell suspension (0.7 ml containing 350 mg [wet weight] of cells) plus 20  $\mu$ l of 100 mM pyranine was placed in a cell with a 0.4-mm gap and one pulse of 1.5 kV, 25  $\mu$ F, and 200  $\mu$ s was applied with a duration of about 3.0 ms. The cells were centrifuged and then washed three times with distilled water by centrifugation in a microcentrifuge for 10 s, resuspended in the original ratio (0.5 g of cells per ml of water), and used as described for the individual experiments. A modification to the usually reported procedure (23) was included (11): final alkalization of the cells was achieved by the addition of 100 mM  $NH_4OH$  instead of 300 mM Tris base.

**Membrane potential.** The membrane potential was estimated as described previously (22) by monitoring the fluorescence changes of 3,3'-dipropylthiobarbituric acid [DISC(3), Molecular Probes] at 540 to 590 nm. The cyanine was added after incubation of the starved cells in 2 mM tartrate-MES-TEA (pH 4.0 or 6.0) plus 10  $\mu$ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), 100  $\mu$ M  $CaCl_2$ , and 50 mM glucose.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Gene and disruption.** Figure 1 shows the deduced amino acid sequence for the YJL094c gene (18), here named *KHA1*, and comparison with three related genes. The *KHA1* product would contain 873 amino acid residues and have a molecular weight of 97.1 kDa and an isoelectric point of 6.0. Its hydrophathy profile, using a window of 19 amino acids and the algorithm of Kyte and Doolittle (13), showed 10 to 12 possible membrane-spanning domains.

As described in Materials and Methods, an internal fragment of *KHA1* was obtained by PCR and cloned into *Yip352* (*URA3*). After linearization at its *Bgl*II site the plasmid was transformed into wild-type strains W303-1A and R757 with selection for uracil prototrophy. The mutant phenotype was recognized by its fast growth and large colonies on plates of high pH and/or salt concentration. Chromosomal DNA was isolated from six nominal *kha1 URA3* mutants in each genetic background, and the disruption was confirmed by Southern

TABLE 1. Characteristics of wild-type and *kha1 URA3* strains<sup>a</sup>

Strain	Duplication time (h) <sup>b</sup>	Cell counts (10 <sup>6</sup> cells)	Wet wt (mg)	Biomass (mg)	Amt (mg/ml) of		Cell size ( $\mu$ m)	Internl [K <sup>+</sup> ] (mM)	Fermentation rate ( $\mu$ g of ethanol/min/mg)	Respiration rate (nag of O <sub>2</sub> /min/mg)
					Glucose consumed	Ethanol produced				
Wild type	1.58	1.7	1.83	0.65	4.41	2.78	7.8	150	9.02	0.6
<i>kha1 URA3</i>	1.38	2.15	2.1	0.98	4.54	7.47	6.47	295	11.31	1.6

<sup>a</sup> For the determination of cell counts, wet weight, biomass, and cell size, cells were grown near glucose exhaustion (14 h). Ethanol production and glucose consumption were measured in the supernatant after harvesting the cells. For measurement of the internal K<sup>+</sup> content, cells grown for 14 h were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water and the K<sup>+</sup> content was measured as described in Materials and Methods. For fermentation and respiration rates, cells grown for 14 h were starved and ethanol production and oxygen consumption were measured as described in Materials and Methods.

<sup>b</sup> Duplication time was obtained by linear regression analysis from the semilogarithmic OD growth curves.

<sup>c</sup> Per milligram of glucose used minus ethanol produced.

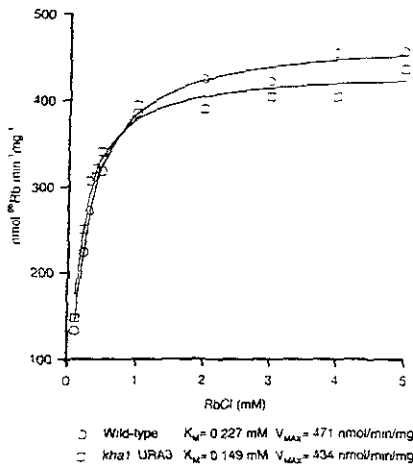


FIG. 3. Kinetics of  $^{86}\text{Rb}$  transport in disruptant and wild-type strains. The cells (50 mg [wet weight]) were preincubated for 2 min in 2 mM MES-TEA (pH 6) + 50 mM glucose. After preincubation, variable concentrations of  $^{86}\text{Rb}$  were added, to measure its transport with an incubation time of 2 min as described in Materials and Methods. The most probable lines and  $K_m$  and  $V_{max}$  values were obtained by the nonlinear regression method.

analysis (results not shown). The analyses which follow were done with one of the W303-1A mutants *KH1* mRNA was found in the parental strain, showing that the gene was expressed, and was not detected in the mutants (Fig. 2).

**Growth and metabolism.** As implied by obtaining the mutants in haploid strains on normal YNB medium with glucose,

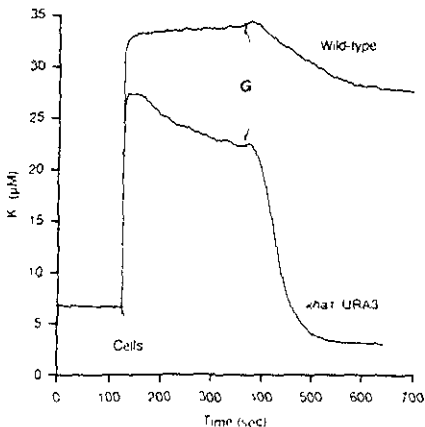


FIG. 4. Changes of the potassium concentration in the cell suspensions. K changes were monitored with a selective K<sup>+</sup> electrode in a mixture containing 50 mg of cells and 2 mM tartrate-MES-TEA buffer (pH 6.0) in a final volume of 100 μl at 30°C. The tracing started at 2 min with the addition of cells, and 50 mM glucose (G) was added at 6 min, as indicated. The changes were calibrated by additions of 10 μM KCl.

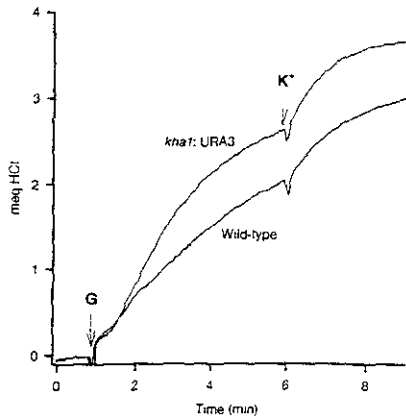


FIG. 5. Changes of the pH of cell suspensions. pH changes were monitored by the absorbance changes of 8 μg of bromoresol purple at 487 to 586 nm in a mixture containing 25 mg of cells and 2 mM tartrate-MES-TEA buffer (pH 6.0) in a final volume of 2.0 ml at 30°C. The tracing started at 1 min with the addition of 50 mM glucose (G), and 15 mM KCl (K<sup>+</sup>) was added at 6 min, as indicated. The changes were calibrated by additions of 100 mM HCl.

*kha1* disruption is not lethal. As shown in Table 1, the mutant strain is altered in several characteristics. The doubling time in normal YPAD medium was a little shorter in the mutant than the parental strain, and its yield of cells, expressed as cell number, wet weight, or biomass, appeared to be considerably higher during the whole growth curve. The cells in the exponential phase were a little smaller, ethanol production was 2.6 times higher, the fermentation rate was elevated by 25%, and the respiration rate was threefold higher. Most strikingly, considering the proposed role of YJL194c in K<sup>+</sup> metabolism, the mutant contained twice the concentration of K<sup>+</sup> as the wild type, and this difference was observed throughout the growth curve. The external pH changes over the growth period (pH 6.0 initially and pH 5.0 at ca. 12 h) were similar in the mutant and wild type.

Flow cytometry analysis was also performed. Cells synchronized in the G<sub>1</sub> phase with α-factor contained a uniform 1C DNA content (results not shown), 6 h after release with pro-nase, the wild type contained similar 1C and 2C populations while the mutant was largely 2C, an indication of more rapid DNA replication in the mutant.

**Potassium ion movements.** K<sup>+</sup> uptake (as assessed with  $^{86}\text{Rb}^+$ ) could be described as a single saturable system with similar  $V_{max}$  and  $K_m$  in the mutant and wild type (Fig. 3). External K<sup>+</sup> movement is shown in Fig. 4. Addition of cells to a K<sup>+</sup>-free medium resulted in a K<sup>+</sup> efflux which was slightly greater in the wild type than in the mutant, reuptake upon glucose addition was slow and partial in the wild type but rapid and complete in the mutant.

The external pH change is shown in Fig. 5. As previously determined (5), glucose metabolism and the activity of the H<sup>+</sup>-ATPase (21) cause external acidification in the wild type, and the effect was somewhat sharper in the mutant. Internal pH and membrane potential determinations are shown in Fig. 6. The internal pH was higher in the mutant than in the wild type. This difference was observed both before and after glucose addition, although the perturbations caused by glucose

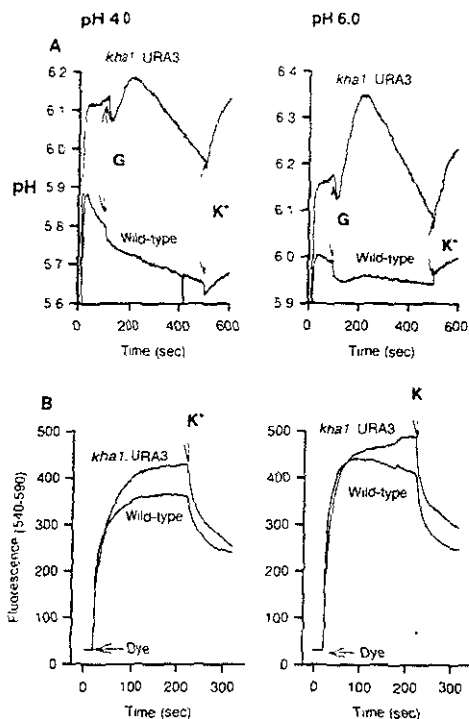


FIG. 6. Internal pH (A) and membrane potential (B). (A) Changes of the internal pH in intact cells as indicated by the fluorescence changes of electro-ported pyranine are shown. Incubation was performed in 2 mM tartrate-MES, TEA buffer (pH 4.0 and 6.0) as indicated. Pyranine was loaded into the cells by electroporation (1.5 kV, 200 nF, 25  $\mu$ F). The tracing was started by the addition of 25 mg of cells, 50 mM glucose (G) was added at 80 s, and 15 mM KCl ( $K^+$ ) was added at 500 s. To obtain a reference of maximum and minimum fluorescence, 30  $\mu$ l of 2 N  $NH_4OH$  or 10  $\mu$ l of 50% propionic acid were added respectively to the incubation mixture after the tracing and the values obtained were recorded and used to adjust the curve. Fluorescence was recorded at room temperature at 460 to 520 nm. (B) Membrane potential variations as indicated by the fluorescence changes of DiSC<sub>3</sub>(3) are shown. Incubation was performed in same buffer plus 100  $\mu$ M  $CaCl_2$  and 10  $\mu$ M CX CP. The tracing was started by the addition of 0.5  $\mu$ M of the cyanine after 20 s, followed by 15 mM KCl ( $K^+$ ) at 200 s, as indicated. Fluorescence was recorded at 540 to 590 nm.

addition were quite different in the two strains. Membrane potential, as measured by fluorescence of DiSC<sub>3</sub>(3), was higher in the mutant than in the wild type (inside negative) and was decreased by the addition of external potassium in both strains.

**Comments.** The *KHA1* gene resembles that of other known cation/proton antiporters, is expressed in yeast, and probably encodes a  $K^+/H^+$  exchanger. The sequence similarity is highest in the N-terminal part, and we speculate that the C-terminal portion may have a special function. The key indication for *KHA1* function is the approximate doubling of the  $K^+$  content in the mutant. According to the scheme in Fig. 7, the elevated  $K^+$  concentration is probably related to normal  $K^+$  entry but impairment of  $K^+$  exit by proton exchange and hence to the somewhat higher internal pH. Lower external pH and higher membrane potential would follow. A more detailed explanation

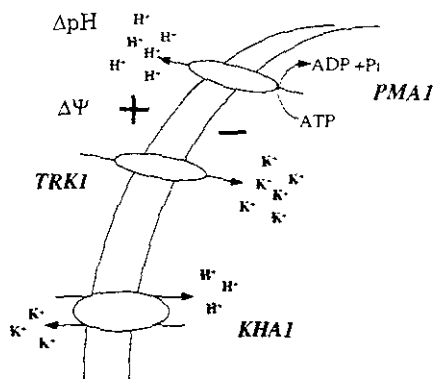


FIG. 7. Proposed role of *KHA1*. Active transport of  $K^+$  at the plasma membrane is driven by the  $H^+$ -ATPase PMA1 via the  $\Delta\Psi$ -coupled carrier TRK1. Changes expected as a result of disruption of the gene and absence of the *KHA1* protein are described in the text. Essentially, the *kha1* ( $URA3$ ) mutant should show (i) no changes in the initial rate or kinetic constants of the uptake system TRK1, (ii) a higher accumulation of  $K^+$  because of the absence of one of the efflux systems for the cation, (iii) a greater increase of the internal pH and a greater decrease of the external pH upon the addition of  $K^+$ , and (iv) a greater decrease of the membrane potential upon the addition of  $K^+$ .

tion of the various curves is not possible, in part because the scheme omits known elements such as outward-rectifying potassium channels (2) and in part because glucose causes an initial and transient acidification by various means, such as formation of the phosphorylated intermediates of glycolysis (11, 14, 23) and acidic products such as carbonic acid, as well as activation of the electrogenic  $H^+$ -ATPase; these processes occur simultaneously but with different time courses and directions, and some of them are more rapid in the mutant. To the degree that the primary impairment in the mutant is  $K^+/H^+$  exchange, it appears that this process may be a key determinant of basic phenomena such as rate of growth, fermentation, and cell cycle. The specific ways in which these various processes are affected by the  $K^+/H^+$  impairment remain to be shown. We favor the view that the higher  $K^+$  concentration itself, and thus the higher osmotic pressure, is the key determinant (as considered for the cell cycle [6, 16]) and that more rapid cell cycle results in more rapid metabolism.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diego Gonzalez-Halphen for critical comments on the manuscript, Alejandro Zentella Dehesa and Fernando Lopez Castilla for helpful discussions, and Jose Esparza Lopez for technical assistance with cell cytometry. We are grateful to Gerardo Coello and Ana Maria Escalante for their assistance in the computer analyses of the DNA sequences.

This work was partially supported by grants IN207696, from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of this University and 400346-5 3282PN, from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

#### REFERENCES

- André B. 1985. An overview of membrane transport protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 11:1578-1611.
- Berth, A., C. L. Stasman, and B. Gredmann. 1993. Cloning and conductance in an outward-rectifying  $K^+$  channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Membr. Biol. 132:183-196.
- Beutler, H. O. 1984. Ethanol, p. 598-606. In H. C. Bergmeyer (ed.) Methods

- of enzymatic analysis—1984, 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
4. Casarasa, C., S. Prieto, R. Ros, J. Salimon, and P. Barré. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K<sup>+</sup>H<sup>+</sup> exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301–1313.
  5. Conway, E. J., and E. O'Malley. 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem J* 40: 59–67.
  6. Degolis, G., K. Slobzaki, and P. Russel. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16:2870–2877.
  7. Goffeau, A., et al. 1997. The yeast genome directory. *Nature* 387(Special issue):5–105.
  8. González, A., J. Membrillo-Hernández, H. Olivera, C. Aranda, G. Macino, and P. Ballarín. 1992. Cloning of the yeast gene coding for the glutamate synthase small subunit (GUS2) by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* glutamate auxotrophs. *Mol Microbiol* 6:301–308.
  9. Heichman, K. A., and J. M. Roberts. 1996. The yeast CDC16 and CDC27 genes restrict DNA replication to once per cell cycle. *Cell* 85:39–48.
  10. Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tsagoloff. 1986. Yeast *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2:163–167.
  11. Häfer, M., M. Calahorra, and A. Peña. 1996. Assessment of ΔpH<sup>+</sup> in *Schizosaccharomyces pombe* intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiol* 41:98–100.
  12. Kunst, A., B. Dräger, and J. Ziegenhorn. 1984. D-Glucose p 163–171. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*—1984, 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
  13. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105–132.
  14. Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev* 104:229–242.
  15. Lew, D. J., N. J. Marui, and S. I. Reed. 1992. Different G1 cyclins control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 69:317–327.
  16. Marshall, C. J. 1994. MAP kinase kinase kinase. MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 4:82–89.
  17. Martinussen, J., and K. Hammer. 1994. Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol* 176:6457–6463.
  18. Miosga, T., A. Witzel, and F. K. Zimmermann. 1994. Sequence and function analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Yeast* 10:965–973.
  19. Munro, A. W., G. Y. Ritchie, A. J. Lamb, R. M. Douglas, and I. R. Booth. 1991. The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathion-regulated potassium-efflux system KefC of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:607–616.
  20. Nass, R., K. W. Cunningham, and R. Rao. 1997. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutation in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:26145–26152.
  21. Peña, A., G. Cincio, A. Gómez-Puyou, and M. Tuena. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:413–425.
  22. Peña, A., S. Uribe, J. P. Pardo, and M. Borbolla. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 231:217–225.
  23. Peña, A., J. Ramírez, G. Rosas, and M. Calahorra. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* 177:1017–1022.
  24. Prior, C., S. Potier, J.-L. Souciet, and H. Sychrova. 1996. Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387:89–93.
  25. Ramírez, J., A. Peña, and M. Montero-Lomel. 1996. K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1285: 175–182.
  26. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  27. Strübl, A., and R. W. Davis. 1981. Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 152:535–552.
  28. Waser, M., D. Hess-Bienz, K. Davies, and M. Soligo. 1992. Cloning and disruption of a putative Na-H antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 267:5396–5400.

### III.8. Caracterización de la mutante con ablación del gen *NHA1*

Como ya se mencionó, el gen *NHA1* fue clonado por selección de células transformadas con bibliotecas genómicas de sobreexpresión resistentes al  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$  (Prior y cols., 1996). En colaboración con la Dra. Hana Sychrová, del Instituto de Microbiología de la República Checa, se estudió la ablación del gen *NHA1* y su participación en la regulación del pH intracelular en levaduras. Los resultados fueron publicados en Sychrova y cols. (1999).

Las células de la cepa silvestre W303-1B y de la ablación de *Nha1* W303-1B-*nha1::LEU* se cargaron con piranina por electroporación. Después de permitir que las células se recuperaran, se determinó el pH intracelular (figura 1 en el artículo). En esta figura se observa que las células mutantes tienen un pH mayor (0.2 unidades) que las células de la cepa silvestre. También se observa que en las células preincubadas con altas concentraciones de potasio (1 M) los valores de pH se hacen menores para ambas cepas y la diferencia de pH inicial se hace más grande (0.4 U), aunque tiende a disminuir en el tiempo. Estos mismos resultados se observan si se incuban las células en presencia de sodio.

Originalmente *Nha1* fue descrito como un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Prior y cols., 1996); más adelante su selectividad no fue tan clara y se redefinió como  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  (Bañuelos y cols., 1998). Este intercambiador parece estar regulado por el pH del medio y su actividad aumenta a pH ácido. En la figura 2A (en el artículo) se muestra el efecto de diferentes valores de pH en el medio de incubación sobre el pH intracelular. Como se observa a valores de pH ácido (3.5), la diferencia en el pH intracelular es mayor entre la mutante y la silvestre, comparado con la diferencia obtenida a pH 5.5 ó a pH 7.5, donde ambas cepas se comportan igual. En las células preincubadas con KCl (figura 2B en el artículo) se observa que a los tres valores de pH la diferencia entre las cepas es similar aunque los valores

iniciales son más bajos que en las células sin potasio.

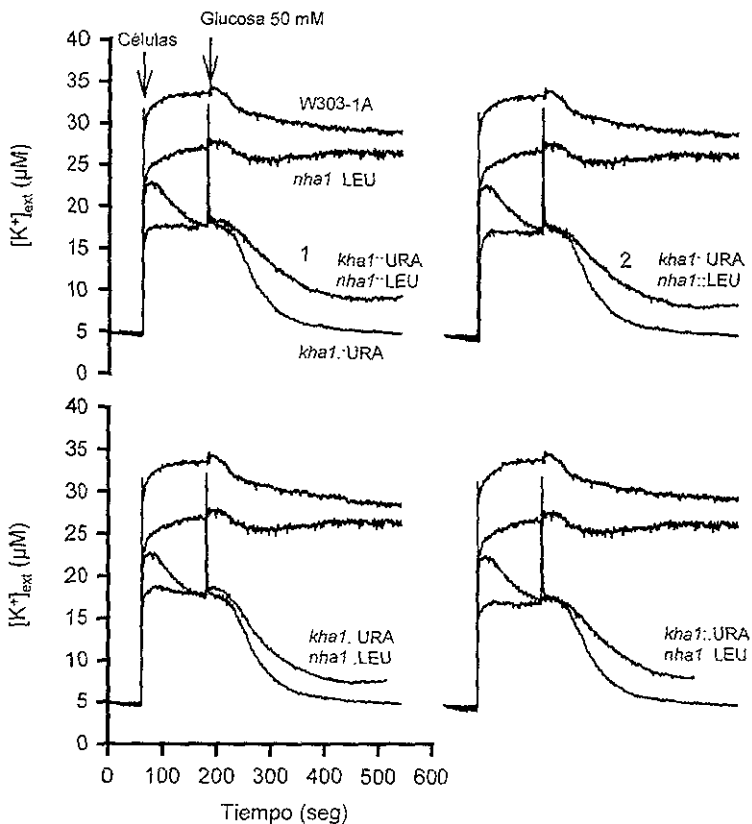
En la figura 3 (en el artículo) se muestra el efecto de la glucosa y el potasio sobre el pH intracelular en células ayunadas. En estas condiciones no se observó una diferencia en los valores de pH inicial posiblemente debido al ayuno. En todos los casos, la adición de glucosa produce una disminución del pH intracelular y la adición de potasio una alcalinización, que es mayor en la mutante.

También se determinó el cambio en el pH interno en vesículas de membrana plasmática cargadas con piramina (figura 4 en el artículo). En esta figura se puede observar que los cambios en el pH interno, producidos por la adición de sodio o potasio al medio de reacción, producen un cambio menor en la señal en las células con ablación de *NHA1*, comparados con los cambios observados en la cepa silvestre.

Los resultados previos (Prior y cols., 1996; Bañuelos y cols., 1998) y los obtenidos en este trabajo hacen suponer que *Nha1* debe estar involucrado en la regulación del pH intracelular y los niveles de cationes. Por esta razón decidimos estudiar la doble interrupción de *NHA1* y *KHA1*.

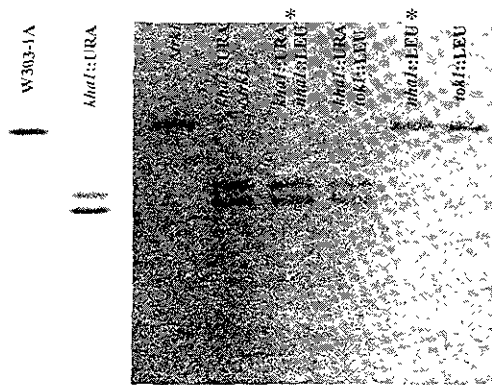
### **III.9. Doble interrupción de los genes *NHA1* y *KHA1*.**

Para la doble interrupción de estos genes se transformó a la cepa W303-1A-*nha1::LEU* con el plásmido YIP352<sub>*KHA1*-818pb</sub> con el método de acetato de litio y dimetil sulfoxido (véase Materiales y Métodos). El fenotipo de las transformantes se obtuvo determinando los movimientos de potasio con un electrodo selectivo (figura 10) y se comprobó la interrupción por Southern (figura 11).



**Figura 10. Identificación de fenotipo de las dobles mutantes *nha1-kha1*.** 50 mg de células ayunadas de las cepas W303-1A, *kha1::URA*, *nha1::LEU* y de las transformantes obtenidas se agregaron a 10 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0 y se registraron los cambios en la concentración de potasio en el medio con un electrodo selectivo. Dos minutos después se agregó glucosa 50 mM y se continuó registrando por 5 min más. En la gráfica se muestran solo cuatro de las transformantes analizadas.





**Figura 11. Análisis tipo Southern de las dobles mutantes *nhal-kha1*.** Se aisló DNA genómico de las cepas indicadas (\*) y se cortó con la enzima *EcoRI*. El DNA se corrió en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó contra el fragmento de PCR marcado con [<sup>32</sup>P] y se imprimió una placa de autorradiografía

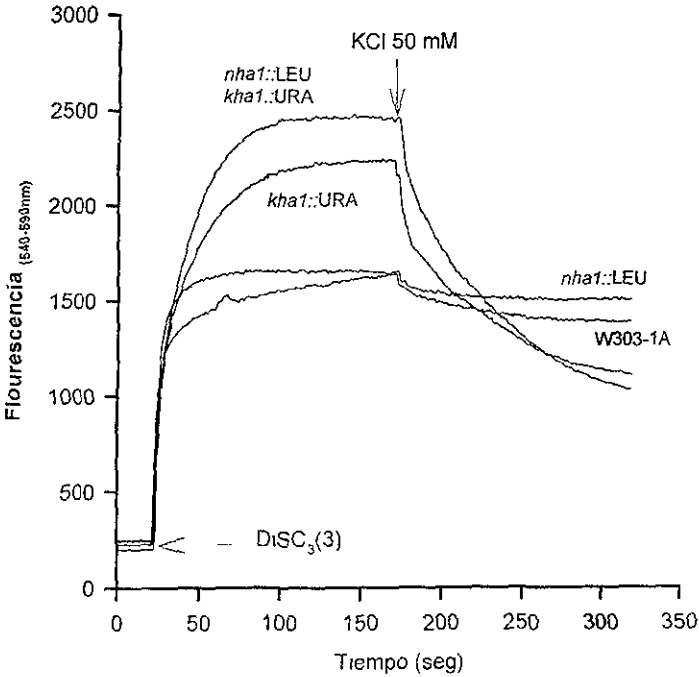
De las mutantes identificadas se seleccionaron dos y se realizaron los siguientes experimentos.

Las dobles mutantes *NHA1-KHA1* muestran un comportamiento similar al observado para la mutante sencilla de *KHA1* en lo referente a crecimiento y metabolismo de glucosa (no se muestran los resultados)

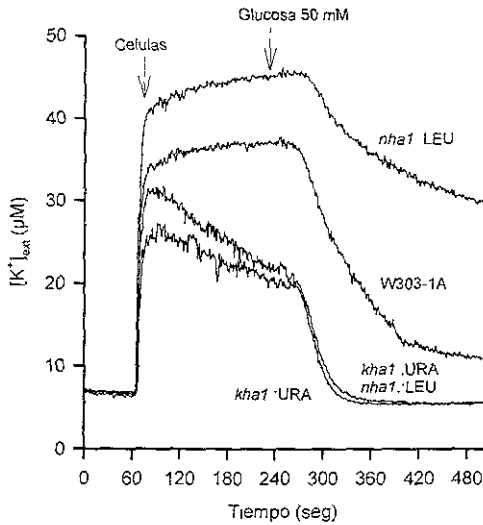
En los experimentos realizados para determinar el potencial de membrana (figura 12), transporte de potasio (figura 13), pH intracelular (figura 14) y bombeo de protones (figura 15), se observó que las dobles mutantes *NHA1-KHA1* muestran un comportamiento similar al observado para la mutante sencilla de *KHA1*, indicando que las mutaciones no son aditivas y que el fenotipo obtenido para *KHA1* es dominante.

Éstos resultados sugieren que la participación de *Nhal* en la regulación del pH intracelular, así como en los niveles de potasio, no es tan importante como la encontrada

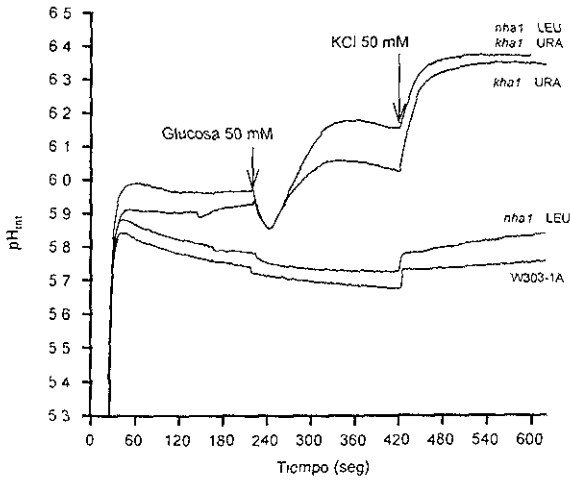
para Kha1. Al parecer Nha1 es un sistema de emergencia, que sólo cuando se aumenta su expresión tiene una función en la regulación del pH y el potasio intracelular (Prior y cols., 1996). Actualmente estamos tratando de determinar los niveles de expresión del mRNA para *NHA1* en condiciones normales (sin ningún tipo de estrés). También estamos haciendo construcciones para expresar este gen junto con la proteína fluorescente verde y poder obtener su localización en la célula así como la de Kha1.



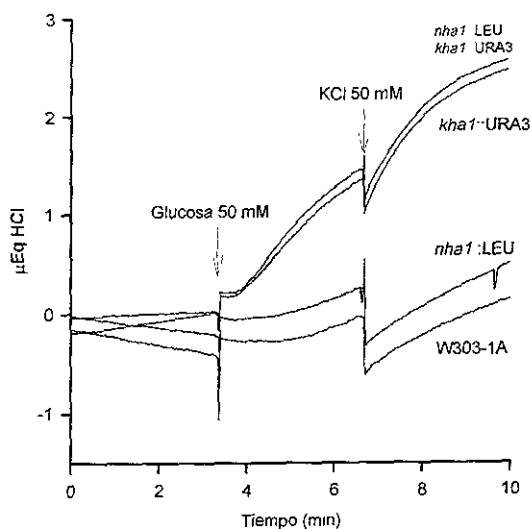
**Figura 12. Determinación del potencial de membrana en las dobles mutantes *nha1-kha1*.** Se incubaron 50 mg de células por 2 min en MES-TEA 2 mM pH 6.0, glucosa 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 100 μM y CCCP 10 μM. El trazo se inició con la adición de 0.25 μM de DiSC<sub>3</sub>(3) Tres minutos después se agregó KCl 50 mM y se continuó con el registro por tres minutos más.



**Figura 13. Movimientos de potasio extracelular.** Se incubaron 50 mg de células en 10 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0. Después de cuatro min se agregó glucosa 50 mM y se continuó con el registro por 5 min más



**Figura 14. Determinación del pH intracelular.** Se agregaron 50 mg de células a 2 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0. Se agregó glucosa 50 mM y KCl 50 mM a los 4 y 7 minutos, respectivamente. Después del registro se agregó  $\text{NH}_4\text{OH}$  50 mM para obtener la fluorescencia máxima y ácido propiónico 50 mM para obtener la fluorescencia mínima.



**Figura 15. Determinación del bombeo de protones.** Se incubaron células de las diferentes cepas (25 mg) en 2 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0, 4  $\mu$ g/ml de púrpura de bromocresol por 3 min. Se agregaron glucosa 50 mM y KCl 50 mM después de 3 y 7 min respectivamente. Los cambios de absorbencia del púrpura de bromocresol se siguieron con un espectrofotómetro de doble longitud de onda a 487-586 y los cambios en el pH se calibraron con adiciones de HCl 0.1 N.

## Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*

Hana Sychrová<sup>a,\*</sup>, Jorge Ramírez<sup>b</sup>, Antonio Peña<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Departamento de Genética Molecular, Institute for Cellular Physiology, UNAM, Apartado Postal 70-242, 04510 Mexico, Mexico

Received 27 October 1998; received in revised form 7 December 1998; accepted 7 December 1998

### Abstract

The Nha1 antiporter is involved in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. We report that deletion of the *NHA1* gene resulted in an increase of cytoplasmic pH in cells suspended in water or acidic buffers. Addition of KCl or NaCl to exponentially growing cells lowered the internal pH but the difference between cells with or without *NHA1* was maintained. Addition of KCl to starved cells resulted in much higher alkalinization of cytoplasmic pH in a strain lacking Nha1p compared to the wild-type or Nha1p-overexpressing strains. The H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>) exchange mechanism of Nha1p was confirmed in reconstituted plasma membrane vesicles. © 1999 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cation/proton antiporter; Intracellular pH; *NHA1*; *Saccharomyces cerevisiae*

### 1. Introduction

One of the crucial and fundamental tasks of a living cell is to maintain the homeostasis of intracellular pH and ion concentration. In *Saccharomyces cerevisiae*, the main system involved in changes of intracellular pH is a H<sup>+</sup>-ATPase encoded by the *PM1* gene and located in the plasma membrane [1-3]. The proton gradient created by this ATPase is necessary for many physiological reasons [4], but is also indispensable for nutrient uptake and regulation of intracellular concentration of different cations and anions [5,6]. Recently, the *NHA1* gene of *S.*

*cerevisiae* encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter was cloned [7]. Characterization of the gene product revealed its function in pH-dependent sodium and potassium efflux from cells [8]. Alkali-cation/H<sup>+</sup> antiporters are supposed to play an important role in the control of intracellular pH in many organisms. In *S. cerevisiae*, the participation of K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transport systems in regulation of the proton motive force and in the buffering of the cytoplasmic pH has been predicted in several reports [9-12], and partially confirmed by disruption of the *KHA1* gene [13], corresponding to the open reading frame YJL094c, suggested to encode a cation/proton antiporter [14,15].

To study the effects of Nha1p activity on intracellular pH, the cytoplasmic pH in cells lacking the *NHA1* gene was estimated under different conditions, and compared with pH<sub>i</sub> of wild-type cells

\* Corresponding author. Tel. +420 (2) 475 26 67, Fax +420 (2) 475 24 88, E-mail: sychrovaha@biomed.cas.cz

To confirm the alkali-cation/ $H^+$  antiport mechanism of Nha1p, plasma membrane vesicles were prepared and the  $H^+/K^+$  exchange measured. The results obtained strongly indicated that the *NHA1* gene product is an alkali-cation/proton antiporter which is involved in regulation of the intracellular pH.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains, plasmids, media and cultivation

The *S. cerevisiae* strains used in this study were W303 1B (*Mat $\alpha$  leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100*) [16], and its derivatives C25 (*nha1 $\Delta$ ::LEU2*) and B31 (*ena1 $\Delta$ ::HIS3::ena4 $\Delta$  nha1 $\Delta$ ::LEU2*) [8]. For overexpression of Nha1p, the pSCMCY plasmid [8] containing *NHA1* in the YEp352 multicopy vector [17] was used. All strains were cultivated aerobically at 30°C in either YPD or YNB standard liquid media supplemented with 2% glucose. For starvation, cells from the end of the exponential phase of growth were collected by centrifugation, washed once with distilled water, resuspended in water (half of the original culture volume), and the suspension was shaken for 18 h at 30°C. After starvation, the cells were washed again by centrifugation. In experiments in which buffers with different pH values were used, a 1:1 mixture of tartaric acid and MES was prepared, and adjusted to the desired pH with triethanolamine.

### 2.2. Electroporation and fluorescence measurements

Electroporation of the fluorescent dye pyranine into the cells was performed as previously reported [2]. For cells grown in YPD medium, the pulse voltage was set at 1500 V, and for YNB-grown cells at 2000 V. Fluorescence measurements were performed in a DMX-100 SLM spectrofluorometer and the pH values were calculated as described previously [2,3] using 100 mM  $NH_4OH$  and 100 mM propionic acid to achieve maximum and minimum fluorescence values, respectively [3]. Fluorescence measurements in plasma membrane vesicles were carried out in 10 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.0 according to [11]. All experiments were repeated at least three

times, maximum variations were less than 10%, representative results are shown.

### 2.3. Isolation of plasma membranes and reconstitution of vesicles

Plasma membranes from cells grown in YPD medium were isolated, and the plasma membrane vesicles prepared following a described protocol [11] with minor changes. To obtain similar amounts of pyranine in vesicles prepared from plasma membranes of different strains, first, vesicles of soybean lecithin (50 mg  $ml^{-1}$ ) containing 10 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.0, and 2 mM pyranine were prepared by sonication, and in the second step 400- $\mu l$  aliquots of these liposomes were sonicated under the same conditions with 600  $\mu l$  of 10 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.0, and 1 mg of plasma membrane proteins.

## 3. Results and discussion

The W303 wild-type strain and its derivative C25 lacking the *NHA1* gene were grown in YPD medium

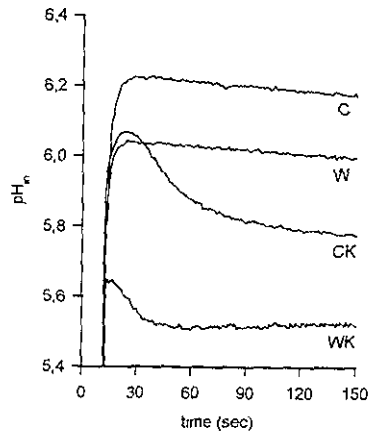


Fig. 1. Internal pH of cells grown in YPD medium. Cells loaded with pyranine were preincubated in either water or 1 M KCl for 10 min, suspended in water (approx. 5 mg  $ml^{-1}$ ) and the fluorescence was measured for 150 s. C, C25 (*nha1 $\Delta$* ); W, W303 (*NHA1*); CK, K<sup>+</sup>-loaded C25; WK, K<sup>+</sup>-loaded W303.

to the mid-exponential phase, loaded with pyranine by electroporation, and after a 10-min preincubation in water or 1 M KCl, the fluorescence was measured. Obtained values of the internal pH are shown in Fig. 1. The intracellular pH of the strain without *Nha1p* (C25) was about 0.2 higher compared to the wild-type. Preincubation of cells with  $K^+$  resulted in a decrease of internal pH in both strains, and the difference in  $pH_{in}$  between the strains with (W303) and without (C25) the *VHA1* gene increased to 0.3. Similar results were obtained when the cells were preincubated with 1 M NaCl instead of KCl (not shown). If cells were grown in a YNB minimal medium all the intracellular pH values were repeatedly lower by about 0.10–0.12 compared to the YPD-grown cells, but the internal pH differences between W303 and C25 were similar (not shown).

Since the *Nha1p* is presumed to be a  $Na^+(K^+)/H^+$  antiporter [7,8], its activity should be higher in the

cells with high proton motive force (gradient of protons across the plasma membrane), i.e. in the cells suspended in acidic media. Fig. 2A shows the internal pH values of W303 and C25 cells suspended in buffers with different pHs. At  $pH_{out}$  3.5, the difference of  $pH_{in}$  between the two strains was the highest, and it decreased with increasing  $pH_{out}$ . At external pH 7.5, the internal pH of both strains was almost identical (Fig. 2A). These observations support the hypothesis of dependence of the *Nha1p* activity on the external pH. If the same experiment was performed with cells preincubated with 1 M KCl (Fig. 2B), similar decreases of  $pH_{in}$  in buffers pH 3.5 and 5.5, respectively, as in water (Fig. 1) were observed. With or without KCl preincubation (Fig. 2), the difference of  $pH_{in}$  between strains with (W303) and without (C25, B31) the *NHA1* gene was highest at  $pH_{out}$  3.5. The internal pH of strains C25 (*nha1*) and B31 (*enal-4 nha1*) was almost identical at all  $pH_{out}$

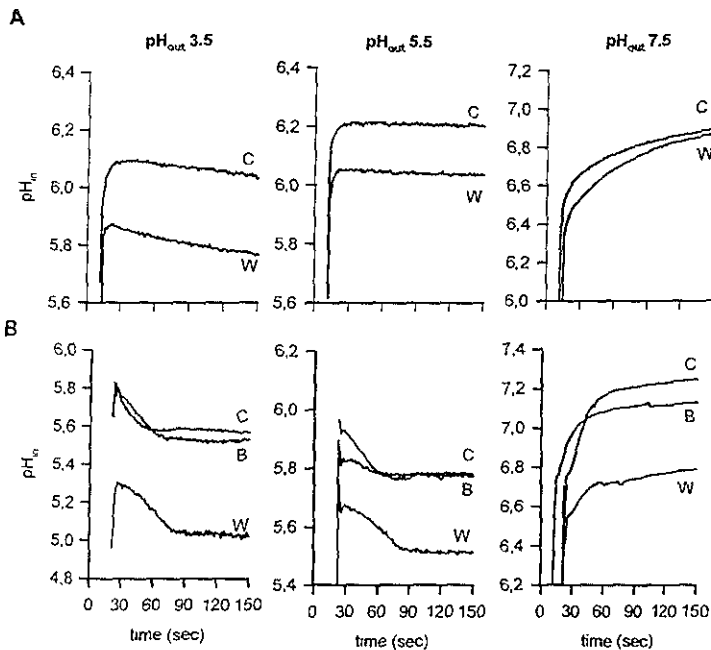


Fig. 2. Internal pH values of cells at different external pH values. Cells grown in YPD medium and loaded with pyranine were preincubated in either water (A) or 1 M KCl (B) for 10 min, suspended ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) in 20 mM MES-tartronic acid buffers adjusted with triethanolamine to pH 3.5, 5.5 or 7.5, and the fluorescence was measured for 150 s. C, C25 (*nha1*); W, W303 (*NHA1*); B, B31 (*enal-4 nha1*).

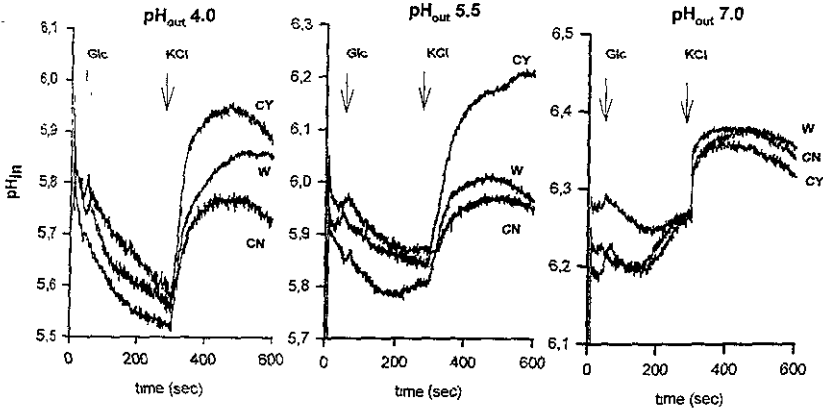


Fig. 3 Effects of glucose and KCl on internal pH of starved cells. Cells grown in YNB medium were starved by an overnight aeration, loaded with pyranine, suspended in 2 mM MES-tartaric acid buffers adjusted with triethanolamine to pH 4.0, 5.5 or 7.0, and fluorescence changes were measured. The addition of 25 mM glucose (after 30 s) and 15 mM KCl (after 300 s) is indicated. W, W303 (*NHA1*), CY, C25 (*nha1*) transformed with 'empty' vector YEp352. CN, C25 (*nha1*) transformed with pCSMCY-overexpressing *NHA1*.

values tested, suggesting that the function of  $\text{Na}^+$ -ATPases encoded by *ENA1-4* did not contribute significantly to the regulation of intracellular pH. The internal pH values obtained for KCl-preloaded cells at  $\text{pH}_{\text{int}}$  7.5 in C25 and B31 strains were much higher compared to the wild-type (Fig. 2B), whereas in the absence of KCl the  $\text{pH}_{\text{int}}$  values at  $\text{pH}_{\text{ext}}$  7.5 were similar (Fig. 2A). This difference in  $\text{pH}_{\text{int}}$  could be explained by the *Nha1p* activity in the W303 wild-type strain. At alkaline  $\text{pH}_{\text{ext}}$  values, the activity of Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase is stimulated [2], and the extrusion of protons is higher in all three strains tested. In K<sup>+</sup>-preloaded cells, the activation of *Nha1p*-mediated K<sup>+</sup> efflux as a response to high external pH and to alkalinization of the cell interior by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  is observed [8]. Also in these cells, as a consequence of the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport mechanism of *Nha1p*, such a massive efflux of potassium must result in the influx of protons lowering the internal pH. Since in K<sup>+</sup>-preloaded C25 and B31 cells *Nha1p* is absent, no exchange of K<sup>+</sup> for H<sup>+</sup> mediated by this system could prevent high alkalinization of cytosol of these strains at alkaline  $\text{pH}_{\text{ext}}$ . Similar effects of KCl (or NaCl) on the internal pH values of W303, C25 and B31 cells were observed when the cells instead of preloading with salts were directly added to buffers

containing 1 M KCl (NaCl) and the fluorescence was measured immediately (not shown).

From the results in Figs. 1 and 2, we could conclude that the presence of the *NHA1* gene influenced the intracellular pH of growing cells. At acidic  $\text{pH}_{\text{ext}}$  values,  $\text{pH}_{\text{int}}$  in the cells lacking *Nha1p* is always higher, compared to the wild-type, probably due to the fact that no protons entered cells via this antiporter. At alkaline  $\text{pH}_{\text{ext}}$  values, cells could use *Nha1p* to exchange some of their internal stocks of K<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup> ions for external protons in order to prevent too high alkalinization of cytosol.

To characterize in more detail the contribution of *Nha1p* to the level of internal pH, the effects of glucose and KCl additions on the  $\text{pH}_{\text{int}}$  of starved cells were studied. Besides the C25 (*nha1*) and W303 (chromosomal *NHA1*) strains, a strain harboring the *NHA1* gene in a multi-copy plasmid (C25[pCSMCY]) was used to see the effects of *Nha1p* overexpression. YNB-grown and overnight-starved cells (see Section 2) were loaded with pyranine, suspended in 2 mM buffers, and during measurement of fluorescence, glucose (25 mM) and KCl (10 mM) were added at 30 and 300 s, respectively. The results summarized in Fig. 3 confirmed the role of *Nha1p* activity in the internal pH regulation.



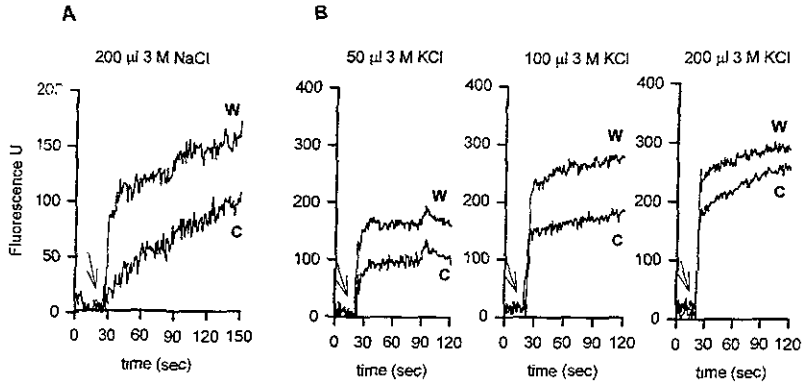


Fig. 4. Changes in fluorescence intensity of plasma membrane vesicles induced by  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . Vesicles (20  $\mu\text{l}$ ) were suspended in 2 ml of 10 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.0, and where indicated NaCl (A) or KCl (B) was added. W, vesicles prepared from plasma membranes of W303 (*NHA1*), C, vesicles prepared from plasma membranes of C25 (*nha1*).

Smaller differences in  $\text{pH}_{\text{in}}$  between W303 and C25 cells were observed in the beginning of the experiment, compared to the growing cells, but even after starvation, the internal pH of C25 was always slightly higher than that of W303. Addition of glucose (to energize the cells) had similar effects on  $\text{pH}_{\text{in}}$  of all three strains. Upon addition of KCl to the cells at acidic  $\text{pH}_{\text{in}}$  values, the internal pH of the strain lacking *Nha1p* showed a higher increase compared to the wild-type. Overexpression of *NHA1* resulted in a smaller alkalinization of  $\text{pH}_{\text{in}}$ , compared to the wild-type. The dependence of alkalinization degree of intracellular pH on the presence and copy number of *Nha1p* confirms its presumed role in buffering of cytosolic pH. At neutral  $\text{pH}_{\text{in}}$  7.0 (Fig. 3) or alkaline  $\text{pH}_{\text{in}}$  values (not shown), the alkalinization of internal pH upon the addition of KCl was the same in all three strains. This was not contradictory to the proposed function as starved cells contained small intracellular amounts of  $\text{K}^+$  ions, compared to growing cells, and the uptake of  $\text{K}^+$  upon addition of 10 mM KCl could not build an immediately sufficient  $\text{K}^+$  gradient across the membrane necessary for the *Nha1p*-mediated  $\text{K}^+/\text{H}^+$  exchange in the absence of proton gradient.

As all the results described above (together with the putative *Nha1p* function deduced from its primary structure) indicated the alkali cation/ $\text{H}^+$  antiport mechanism of its activity, we prepared plasma

membrane vesicles from strains W303 and C25 in order to measure proton movement across the membrane provoked by the addition of alkali cations. As described in Section 2 and illustrated in Fig. 4, changes in fluorescence of pyranine-loaded vesicles upon addition of alkali cations were measured. Because the fluorescence of pyranine decreases with protonation [2], the increase of fluorescence observed after addition of NaCl to the suspension of vesicles (whose  $\text{pH}_{\text{in}}$  was the same as  $\text{pH}_{\text{in}}$ ) corresponded to the alkalinization of vesicles, i.e. efflux of protons (Fig. 4A). Vesicles prepared from plasma membranes containing *Nha1p* (W303) showed higher changes in fluorescence compared to C25 vesicles indicating the contribution of *Nha1p* to proton movements across the membrane. Similar results were observed also upon addition of LiCl, RbCl and CsCl (not shown). Thus the *Nha1p* substrate specificity is broad and includes not only  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ , as was demonstrated by measurements of cation efflux from cells [8], or  $\text{Li}^+$ , as was shown in  $\text{Li}^+$  tolerance experiments [7] but also other alkali cations ( $\text{Rb}^+$  and  $\text{Cs}^+$ ). Nevertheless, the effects on vesicle fluorescence were the highest upon addition of KCl. Fig. 4B shows that the increase of fluorescence, and thus alkalinization of vesicle internal pH, depended on the concentration of KCl added. With increasing amounts of KCl, the fluorescence increased not only in vesicles containing *Nha1p* (W303) but also in vesicles without

Nha1p, suggesting the existence of another system with a lower affinity, perhaps Kha1 [13], contributing in plasma membranes to  $K^+$ -provoked opposite-direction oriented  $H^+$  fluxes.

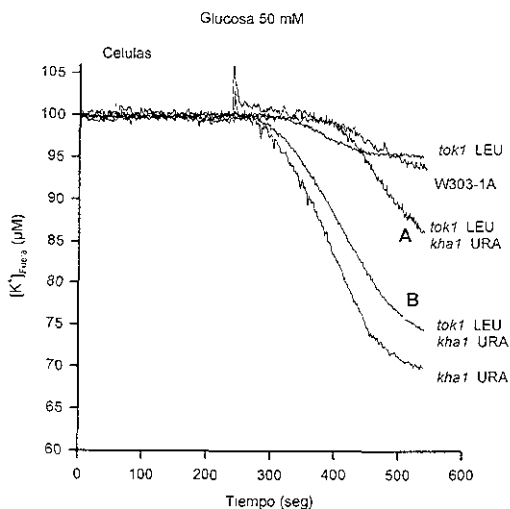
Our results are consistent with a previously partially confirmed hypothesis about the existence of a plasma membrane  $K^+/H^+$  antiporter required in *S. cerevisiae* for maintaining: (1) essential continuous  $K^+$  fluxes, and (2) optimum cytosolic pH [9–12]. In this work we demonstrated the dual functions of Nha1 which may be involved not only in regulation of the internal concentration of  $K^+$ , toxic  $Na^+$ ,  $Li^+$ , and other alkali cations, but also in the buffering of cytosolic pH.

### Acknowledgments

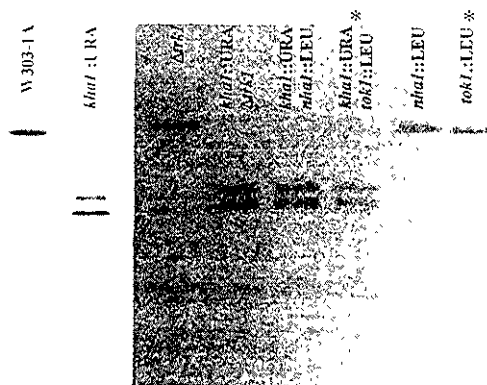
This work was supported by grants of the Grant Agency of the Czech Republic 204/98/0475 and No. IN-202193, and IN-207696 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, of the Universidad Nacional Autónoma de México, and No 3188N-N9307 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico. HS was a participant in the Scientific Cooperation Agreement between the Czech Academy of Sciences and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

### References

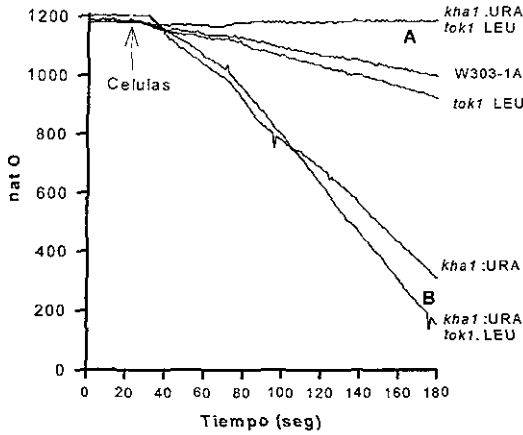
- [1] Serrano, R., Kjelland-Blank, M.C. and Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with  $(Na^+K^+)K^+$  and  $Ca^{2+}$ -ATPases. *Nature* 319, 689–693.
- [2] Peña, A., Ramirez, J., Rosas, G. and Calahorra, M. (1995) Proton pumping and the internal pH of yeast cells measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* 177, 1017–1022.
- [3] Calahorra, M., Martínez, G.A., Hernández-Cruz, A. and Peña, A. (1998) Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* 14, 501–515.
- [4] Imai, T. and Ohno, T. (1995) The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3604–3608.
- [5] Serrano, R., Marquez, J.A. and Rios, G. (1997) Crucial factors in salt stress tolerance. In: *Yeast Stress Responses* (Hohmann, S. and Mager, W.H., Eds.), pp. 147–170. Springer-Verlag, Heidelberg.
- [6] Horak, J. (1997) Yeast nutrient transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 41–79.
- [7] Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L. and Sychrová, H. (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a  $Na^+/H^+$ -antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387, 89–93.
- [8] Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.-L. and Potter, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144, 2749–2758.
- [9] Ortega, M.D. and Rodríguez-Navarro, A. (1985) Potassium and rubidium effluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* 40c, 721–725.
- [10] Peña, A. and Ramirez, J. (1991) An energy dependent efflux system for potassium ions in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 237–244.
- [11] Ramirez, J., Peña, A. and Montero-Lomeli, M. (1996)  $H^+/K^+$  exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1285, 175–82.
- [12] Camarasa, C., Prieto, S., Ros, R., Salmon, J.M. and Barre, P. (1996) Evidence for a selective and electroneutral  $K^+/H^+$  exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12, 1301–1313.
- [13] Ramirez, J., Ramirez, O., Saldana, C., Coria, R. and Peña, A. (1998) A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a  $K^+/H^+$  exchanger. *J. Bacteriol.* 180, 5860–5865.
- [14] Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelson, B., Goffeau, A. and Sauer, M.H., Jr. (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 430, 116–125.
- [15] Andre, B. (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1575–1611.
- [16] Wallis, J.W., Chretien, G., Brodsky, M., Rolfé, M. and Rothstein, R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58, 409–419.
- [17] Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tragoloff, A. (1986) Yeast *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163–167.



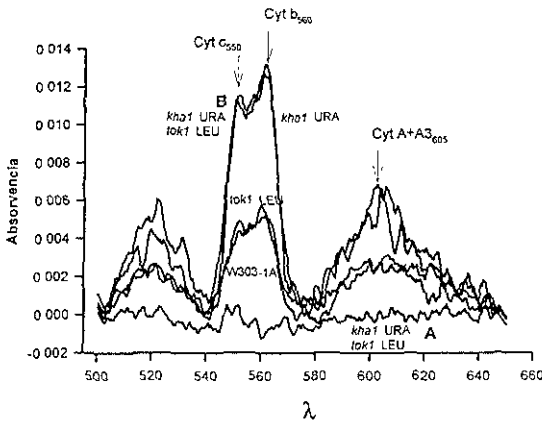
**Figura 16. Selección de dobles mutantes *kha1-tok1*** Se agregaron 50 mg de células ayunadas de las cepas W303-1A, *kha1::URA*, *tok1::LEU* y de los dos fenotipos encontrados (A y B) a 10 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0, 100 µM KCl y se registraron los cambios en la concentración de potasio en el medio, con un electrodo selectivo. Cinco minutos después se agregó glucosa 50 mM y se continuó registrando por 5 min más



**Figura 17. Análisis tipo Southern de las dobles mutantes *kha1-tok1*** Se aisló y cortó DNA genómico de las cepas indicadas (\*) con la enzima *hcoRI*. El DNA se corrió en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó contra el fragmento de PCR marcado con [<sup>32</sup>P] y se imprimió una placa de autoradiografía



**Figura 18. Consumo de oxígeno.** Se agregaron 50 mg de células a 3 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0, glucosa 50 mM. Los cambios en la concentración de oxígeno en el medio se siguieron con un electrodo de Clark acoplado a una computadora, en una cámara a 30 °C.



**Figura 19. Espectros de absorción de mitocondrias aisladas.** La línea base se hizo con 1.0 mg de proteína de mitocondrias en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. Posteriormente se agregó una pequeña cantidad de ditionita a la celda de medida y se corrieron los espectros en un espectrofotómetro SLM aminco DW2C acoplado a una computadora

Con estos resultados no pudimos definir si el defecto mitocondrial está asociado a la pérdida de *Kha1* y *Tok1* o sólo a la pérdida de *Tok1*, por lo que decidimos hacer una nueva construcción para interrumpir a *TOK1*. En las transformantes obtenidas con la nueva construcción, encontramos que el 50% de las transformantes presentan el defecto en las mitocondrias y el resto parecen normales. Este resultado no ha sido reportado por los grupos que han estudiado *TOK1* (Bertl y cols., 1993; Ketchum y cols., 1995; Fairman y cols., 1999). Tampoco se ha demostrado la localización de esta proteína, ni su función específica en la levadura.

Nuestros resultados sugieren que *Tok1* lleva a cabo una función esencial en la mitocondria y aunque es un tema diferente al que hemos venido estudiando, creemos que es importante conocer su localización y función para poder entender cómo se regula el contenido de potasio en la levadura. Por tal motivo, estamos haciendo construcciones para coexpresar *Tok1* con un epítotope de hemaglutinina para poder hacer inmunolocalización de esta proteína en la célula. También estamos haciendo las construcciones adecuadas para poder hacer una ablación completa del gen.

### III.11. Doble interrupción de los genes *TRK1* y *KHA1*

Otra de las proteínas involucradas en los movimientos de iones en la levadura, es el transportador de alta afinidad para potasio Trk1 descrito por Gaber y cols (1988). Las células con ablación de esta proteína muestran una pérdida en la capacidad para transportar potasio a bajas concentraciones (100  $\mu$ M). La ablación de *TRK1* fue hecha en la cepa R757, que es un fondo genético diferente al que hemos estado trabajando W303-1A. Para poder hacer la doble interrupción *TRK1* y *KHA1*, primero se hizo y caracterizó la interrupción de *KHA1* en la cepa R757. Los resultados obtenidos para este fondo genético R757-*kha1::URA* son idénticos a los obtenidos para W303-1A-*kha1::URA* y no se muestran.

Con los resultados obtenidos para R757, R757- $\Delta$ *trk1* y R757-*kha1::URA* se realizó la doble interrupción R757- $\Delta$ *trk1-kha1::URA*, y el fenotipo de las transformantes se obtuvo determinando los movimientos de potasio con un electrodo selectivo. Como se muestra en la figura 20, las transformantes dieron un fenotipo uniforme, por lo que se seleccionaron dos de ellas y se hizo un análisis tipo Southern (figura 21) para comprobar la interrupción.

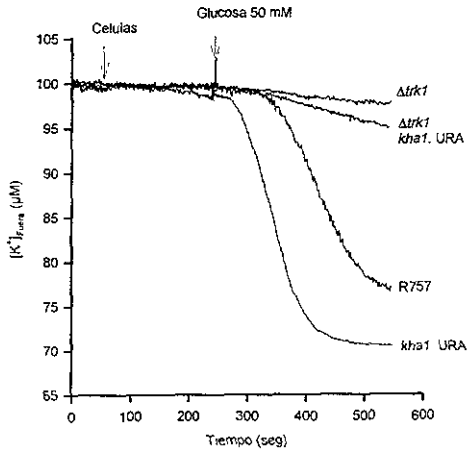
En estas mutantes se encontró un fenotipo similar al reportado para la mutante individual de *KHA1*: alcalinización intracelular, aumento en la concentración de potasio y aumento en el potencial de membrana. Con respecto al transporte de potasio, encontramos una actividad de transporte para este ion de alta afinidad y baja velocidad (figura 22). Este resultado sugiere que Trk1 no es el único sistema de alta afinidad como se propuso (Gaber y cols., 1988). Al parecer en la mutante donde se eliminaron los sistemas principales de entrada y salida de potasio Trk1 y Kha1 respectivamente, se expresa un nuevo sistema de transporte. Otra interpretación es que dadas las condiciones de los flujos de iones en esta mutante; ahora se puede detectar un sistema que normalmente se expresa pero que está oculto por la

actividad de los otros dos.

Ko y cols. (1991) reportaron el gen *TRK2* y lo identificaron como el sistema de transporte de potasio de baja afinidad, propuesto por Rodríguez-Navarro y Ramos (1984). Este último grupo cuestionó que *Trk2* fuera el sistema de transporte de baja afinidad (Ramos y cols., 1994) y actualmente no es clara la función de *Trk2*. Dados los resultados obtenidos con la doble mutación *TRK1-KHA1* y la existencia de una mutante *TRK1-TRK2*, intentamos obtener una triple mutante *TRK1-TRK2-KHA1*. Nuestros resultados indican que esta mutación es letal; sin embargo, no se han agotado todos los mecanismos posibles para lograrla. Actualmente estamos tratando de transformar diploides para confirmar si la triple mutación es letal.

Una posible interpretación para estos resultados, es que *Trk2* fuera el sistema de transporte de alta afinidad que observamos en la doble mutante *Trk1-Kha1*. Ya que *Trk2* por su baja actividad no se observa fácilmente, a menos que los movimientos de entrada y salida de potasio se reduzcan eliminando *Trk1* y *Kha1*. La inviabilidad de la triple mutante *Trk1-Trk2-Kha1*, también puede ser explicada en términos de la función de *Trk2*. En condiciones normales *Trk1* se encarga de la mayor parte de los requerimientos de potasio de la célula, y *Kha1* controla la concentración del catión y el pH intracelular. Cuando se suprime la función de *Kha1* el potasio intracelular aumenta, capturado por *Trk1*, que aprovecha el aumento en el potencial de membrana que presenta esta mutante. Si se suprime la función de *Trk1*, los niveles de potasio no se afectan significativamente y la célula puede vivir. Si se suprime la función de ambos *Trk1* y *Kha1*, el potasio necesario para la célula puede entrar por *Trk2* aprovechando el incremento en el potencial de membrana que se produce cuando se pierde *Kha1*, y aunque la velocidad de transporte de potasio es baja, se compensa con la disminución en la salida del catión en ausencia de

Kha1. Finalmente, si se elimina la actividad de los tres genes (*TRK1*, *TRK2* y *KHA1*), la célula es incapaz de sobrevivir, ya que no tiene ningún sistema por el cual pueda capturar potasio, aún cuando la pérdida de Kha1 incrementa el potencial de membrana y disminuye la salida de potasio.



**Figura 20. Identificación de dobles mutantes *kha1-trk1*.** Se agregaron 50 mg de células ayunadas de las cepas W303-1A, *kha1::URA*,  $\Delta trk1$  y las dobles mutantes obtenidas, a 10 ml de MES-TEA 2 mM pH 6.0, 100  $\mu M$  KCl y se registraron los cambios en la concentración de potasio en el medio, con un electrodo selectivo. Cinco minutos después se agregó glucosa 50 mM y se continuó registrando por 5 min más, sólo se muestra una de las mutantes



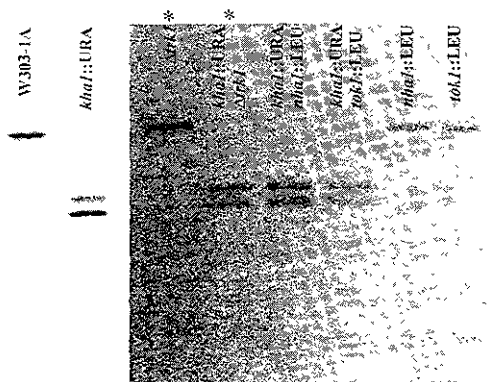


Figura 21. Análisis tipo Southern de las mutantes *kha1-trk1*. Se aisló y cortó DNA genómico de las cepas indicadas (\*) con la enzima *EcoRI*. El DNA se corrió en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó contra el fragmento de PCR marcado con [ $^{32}\text{P}$ ] y se imprimió una placa de autorradiografía.

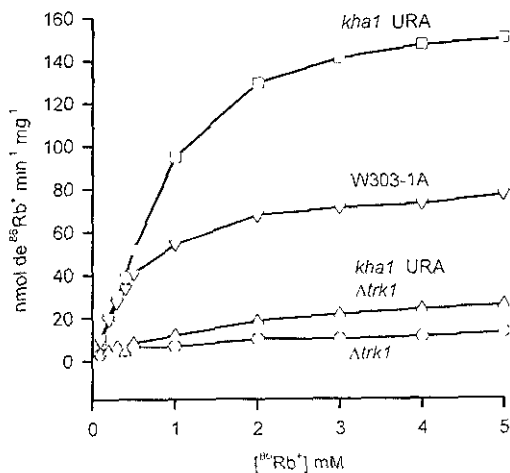


Figura 22. Cinética de transporte de rubidio en las dobles mutantes *kha1-trk1*. Se incubaron células de las diferentes cepas en MIES-PEA 2 mM pH 6.0 glucosa 50 mM por dos min. Se agregaron diferentes concentraciones de  $\text{RbCl}$  y se incubó durante dos min más. Posteriormente se filtraron 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y se lavaron dos veces con 5 ml  $\text{KCl}$  100 mM. Los filtros se secaron, se les agregó líquido de centelleo y se contaron en un contador de centelleo.

### III.12. Regulación de los intercambiadores Nha1 y Kha1

### III.13. *SIT4* fosfatasa de proteínas (Ser/Thr)

En colaboración con la Dra. Mónica Montero-Lomelí, de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, se encontró el gen *SIT4*, siguiendo la metodología de selección de células transformadas con bibliotecas genómicas de sobreexpresión, resistentes a  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ , utilizando galactosa como sustrato. En la figura 1 (en el artículo) se observa que cuando se utiliza galactosa como fuente de carbono, las células de la cepa FY833 son más sensibles a concentraciones crecientes de litio. Esto es importante, ya que en trabajos previos donde se ha utilizado este criterio de selección, siempre se utilizó glucosa como fuente de carbono.

Con las condiciones de selección de mutantes establecidas, se transformó a la cepa R757 con una biblioteca de cDNA de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el promotor de galactosa. Las transformantes obtenidas se seleccionaron en cajas de SD-Gal-URA y 100 mM de LiCl. De esta selección se obtuvieron 6 colonias, de las que se recuperó el inserto, se subclonó en el vector pRN93 bajo el promotor de galactosa y se transformó a la cepa FY833. Las seis transformantes obtenidas mostraron la resistencia a  $\text{Li}^+$ , por lo que se secuenció el plásmido; encontrando la secuencia del gen *SIT4* en las seis transformantes. El gen *SIT4* codifica para una posible fosfatasa de proteínas. Este gen fue clonado por primera vez por Sutton y cols. (1991) y está relacionado con el paso de la fase G1 a S en el ciclo celular de la levadura.

En el estudio de la sobreexpresión de esta proteína encontramos que Sit4 confiere resistencia al  $\text{Li}^+$  (figura 2A en el artículo). También encontramos que después de un periodo de retardo en el crecimiento de las células con una ablación de *SIT4*, éstas se recuperan (figura 2B en el artículo) Esto sugiere que Sit4 no se requiere para la adaptación de las células al litio, y que posiblemente haya más genes involucrados en este proceso. Es

importante mencionar que Sit4 sólo protege a las células del estrés por litio y no del estrés por sodio, potasio o sorbitol.

En el análisis de la secuencia del promotor de *SIT4* encontramos que contiene 6 elementos STRE, estos elementos están relacionados con los sistemas de respuesta a estrés (osmótico, por choque de calor, de pH, de falta de nitrógeno y por etanol). En este trabajo encontramos que Sit4 tiene un nivel de expresión bajo en condiciones normales (sin ningún tipo de estrés). Cuando las células son sometidas a estrés por sodio, litio, potasio o sorbitol, los niveles de expresión de Sit4 aumentan (figura 3A en el artículo) y el aumento es dependiente del tiempo (figura 3C en el artículo). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Sit4 es un evento normal de la levadura cuando enfrenta algún tipo de estrés.

Una posible explicación para la resistencia a litio encontrada en las células con sobreexpresión de Sit4 pudiera deberse a cambios en la expresión de ATPasas de tipo P como las *PMR2A/ENAI* involucradas en la regulación de los niveles de cationes (Haro y cols., 1991). La transcripción de estas proteínas está regulada por una serie de fosfatasa de proteínas (Proft y Serrano, 1999). En la figura 3C (en el artículo) se muestran los niveles de expresión para *ENAI* bajo diferentes tipos de estrés. El aumento en los niveles de expresión de Sit4 corresponde a los observados para *Ena1* bajo los diferentes tipos de estrés.

Para saber si los cambios en la expresión de *Ena1* dependen de los cambios en la expresión de Sit4, se cuantificó la transcripción relativa de *ENAI* al sobreexpresar *SIT4* (figura 4A y B en el artículo). Como se puede observar, los niveles de expresión de *ENAI* no se alteran con la sobreexpresión de Sit4, mientras que los niveles de expresión de *Ena1* sí responden al estrés por sodio o litio (figura 4C en el artículo). Estos resultados sugieren que la expresión de *PMR2A/ENAI* es independiente de los niveles de expresión de *SIT4*

La sobreexpresión de Sit4 modifica la acumulación y los niveles de cationes monovalentes en la levadura. En la figura 5 (en el artículo) se muestra los cambios en la concentración intracelular de sodio y potasio (izquierda) y litio, sodio y potasio (derecha), cuando las células se incuban a diferentes concentraciones de sodio o litio. Como se puede observar, en las células con sobreexpresión de Sit4, el aumento en la concentración de cationes es menor con respecto a los controles. Por otro lado, la acumulación de sodio y litio no se están afectando con la expresión de Sit4, mientras que la concentración de potasio disminuyó (figura 6 en el artículo). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Sit4 pudiera estar modificando los sistemas de salida de potasio. Para comprobar este punto se determinó la salida de rubidio [ $^{86}\text{Rb}$ ] (figura 7 en el artículo). En efecto, las células donde se sobreexpresa Sit4, muestran una salida mayor de rubidio cuando se exponen a concentraciones elevadas de sodio o litio, mientras que en las células control no se observan diferencias.

Finalmente se determinó si la sobreexpresión de Sit4 produce cambios en el potencial de membrana o en el pH intracelular. En la figura 8 (en el artículo) se muestra la estimación del potencial de membrana; la sobreexpresión de Sit4 no produjo cambios significativos. Sin embargo, en la determinación del pH intracelular se encontró una ligera alcalinización al sobreexpresar Sit4.

Estos resultados sugieren que los movimientos y la acumulación de cationes, así como el pH intracelular pudieran estar regulados por procesos de fosforilación y desfosforilación de los sistemas de transporte (Kha1, Nha1, Trk1, Trk2 y Tok1) o por cambios en sus niveles de expresión

Actualmente estamos realizando los experimentos para medir los niveles de expresión de *NHA1* y *KHA1* en condiciones de estrés (100 mM LiCl) y en presencia o ausencia de *SIT4*

También estamos haciendo las construcciones para sobreexpresar *SIT4* en las mutantes *NHA1*, *KHA1* y la doble mutante *NHA1-KHA1*, para tratar de integrar un mecanismo para la regulación de los sistemas encargados de mantener los niveles de cationes y el pH intracelular.

## Regulation of Monovalent Ion Homeostasis and pH by the Ser-Thr Protein Phosphatase *SIT4* in *Saccharomyces cerevisiae*\*

Received for publication, June 6, 2000, and in revised form, July 28, 2000  
Published, JBC Papers in Press, July 31, 2000, DOI 10.1074/jbc.M004869200

Claudio A. Masuda†§, Jorge Ramírez†, Antonio Peña†, and Mónica Montero-Lomeli†§‡

From the †Departamento de Bioquímica Médica, ICB-CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil and ‡Departamento de Genética Molecular, IFC, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

A gene, *SIT4*, was identified as corresponding to a serine/threonine protein phosphatase and when overexpressed confers lithium tolerance in galactose medium to the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This gene has been previously identified as a regulator of the cell cycle and involved in nitrogen sensing. It is shown that the transcription levels of *SIT4* are induced by low concentrations of  $Li^+$  in a time-dependent manner.  $Na^+$  and  $K^+$  at high concentrations, but not sorbitol, also induce transcription. As a response to  $Na^+$  or  $Li^+$  stress, yeast cells lower the intracellular  $K^+$  content. This effect is enhanced in cells overexpressing *SIT4*, which also increase  $^{86}Rb$  efflux after the addition of  $Na^+$  or  $Li^+$  to the extracellular medium. Another feature of *SIT4*-overexpressing cells is that they maintain a more alkaline pH of 6.64 compared with 6.17 in the wild type cells. It has been proposed that the main pathway of salt tolerance in yeast is mediated by a P-type ATPase, encoded by *PMR2A/ENA1*. However, our results show that in a *sit4* strain, expression of *ENA1* is still induced by monovalent cations, and overexpression of *SIT4* does not alter the amount of *ENA1* transcript. These results show that *SIT4* acts in a parallel pathway not involving induction of transcription of *ENA1* and suggest a novel function for *SIT4* in response to salt stress.

pump out  $Na^+$  that has entered the cell as follows: a cluster of up to five P-ATPases *PMR2A/ENA1-4* (6, 7) and a  $Na^+/H^+$  antiporter, encoded by *NHA1* (8, 9). From the cluster of P-ATPases, *Ena1p* is the most highly expressed (6, 7). These two transport systems are differently regulated. *ENA1* is induced by osmotic stress, starvation, or high extracellular pH (10). *NHA1* increases sodium and lithium tolerance at an acidic or neutral pH of the external medium (11). The expression of *PMR2A/ENA1* is regulated by several protein phosphatases and kinases. Deletion of the genes *PPZ1* and *PPZ2* coding for protein phosphatases increases expression of *ENA1* (12), whose expression, on the contrary, is reduced by the deletion of the protein phosphatase calcineurin, causing hypersensitivity to sodium and high accumulation of lithium (13). Overexpression of a protein encoded by *SIS2/HAL3* suppresses salt sensitivity in a calcineurin-deleted strain and stimulates transcription of the *PMR2A/ENA1* gene (14). *Hal3p* acts as an inhibitory subunit of *Ppz1p* regulating its function on salt tolerance (15). Deletion of two protein kinase homologs *YCR101c/SAT4/HAL4* (16) and *YJL165c/HAL5* causes salt and pH sensitivity apparently as a result of deficient *Trk1p* and *Trk2p* activation (5).

Other regulatory pathways of ion homeostasis, which do not regulate expression of *ENA1*, have recently been described. A mutant strain lacking the transcriptional activator *Imp2p* was described as being hypersensitive to a variety of oxidative agents and also to  $Na^+$  and  $Li^+$ . *Imp2p* does not increase *ENA1* expression (17).

In this work we have searched for proteins that when overexpressed confer lithium tolerance to *S. cerevisiae*. We have identified *SIT4*, a type 2A/type 2A-related protein phosphatase, involved in the cell cycle. *SIT4* is required for the late  $G_1$  expression of cyclins and transcription factors essential for the execution of START and is also required for bud emergence (18, 19). *SIT4* is also involved in the response to nitrogen starvation by controlling the ceramide-induced Tor-signaling pathways (20–22). In this work we have assigned a novel function to this protein. We demonstrate that its transcription is induced by monovalent cations and that it affects  $K^+$  homeostasis and cytoplasmic pH when overexpressed.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Strains.**—*Escherichia coli* strain *XL1 Blue* was used for plasmid construction. *S. cerevisiae* strains *R757* (*MATa*, *htr4* 15, *ura3* 52, *lys9*, *hal1*) and *FY833* (*MATa*, *htr4* 200, *ura3* 52, *lexA1*, *lys2* 202, *trp1* 263, *GAL2*<sup>+</sup>), kindly provided by Dr. M. Ghislan, were used.

**Cloning of Genes That Confer Lithium Resistance.**—Wild type strain *R757* was transformed with an expression cDNA library under control of a galactose-inducible promoter (23). Transformed cells were plated in minimal medium (YNB gal) containing YNB 6.7 g/liter, galactose 2%, His, Ura, Lys, and methionine 0.003% and 30 mM  $Li_2SO_4$ . Only six recombinant clones expressing a protein conferring lithium resistance were able to overcome the lithium stress. The plasmid from the selected

Lithium has been extensively used to treat manic bipolar disorder (1, 2). Its antimanic and antidepressant effects require days to weeks to appear, and several reports indicate that chronic administration of lithium affects gene expression (3). In this work we have used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to study new possible targets of lithium action. Homeostasis of  $Li^+$  in yeast is maintained by multiple transport pathways that also transport  $Na^+$ . The route of entry of both cations has not been clearly defined. It has been proposed to be through the  $K^+$  transporter *Trk1p* (4). When yeast cells are subjected to  $Na^+$  stress, its uptake is inhibited by increasing  $K^+$  import through *Trk1p*. However, this does not inhibit completely  $Na^+$  entry (4, 5). Two transport systems

\* This work was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho de Ciência e Tecnologia (CNPq), PADCT-Brasil (to M. M.-L.), and Grant 100346-5 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) México to Dr. Antonio Peña. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of a fellowship from CNPq.

§ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica Médica, ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, C.P. 65041, Rio de Janeiro RJ 21941-590, Brazil. Tel.: 55 021 590 1518. Fax: 55 021 270 86 47. E-mail: montero@servi.bioquim.ufrj.br

colonies was isolated, and the DNA insert was subcloned in pBlueScript SK<sup>+</sup> and sequenced using AutoRead Sequencing Kit and ALF DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech). The sequence was compared with the known open reading frames from the SGD data base.

**Characterization of Clones Resistant to Lithium.**—The DNA insert of the selected clone was subcloned in the expression vector pRN93 (kindly donated by Dr C W Slayman from Yale University), which contains a *GAL4* promoter. This plasmid was named pRN93-*SIT4*. Both pRN93 and pRN93-*SIT4* were used to transform strain FY833 by the lithium acetate method (24).

**Disruption of *SIT4*.**—Disruption of the entire coding region of *SIT4* in FY833 strain was carried out using the one-step gene replacement using the *HIS3MX6* module (25). Genomic DNA from selected *sit4* strain was examined for disruption by PCR<sup>1</sup> and Southern blot analysis.

**Quantitative RT-PCR.**—The relative quantity of mRNA was determined by quantitative RT-PCR. Quantitative PCR analyses have been used to study mRNA levels for different transcripts (26, 27). Yeast cells were grown in the indicated media to exponential phase and harvested 10  $\mu$ g of total RNA (28) were treated with 2.5 units of DNase I (Amersham Pharmacia Biotech) for 10 min at 37 °C and further incubated at 65 °C for 10 min. First strand cDNA was synthesized using the First Strand cDNA synthesis kit from Amersham Pharmacia Biotech, and oligonucleotide *NotI*-(dT)<sub>18</sub> was used as primer. The cDNA was diluted 40 times. PCRs were performed with 2.5  $\mu$ l of the diluted cDNA, 1.25 units of *Taq* polymerase, 0.2 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M of each primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, in a total volume of 25  $\mu$ l. cDNA was amplified using the PCR program: 95 °C, 1 min, 53 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, and a final step of 72 °C for 5 min. The primers used were as follows: *ACT1*, 5'-TAGCTTCCATCCAGCGGTT<sup>3</sup>, *ACT1r*, 5'-AACATACCGCCACAAAAGCAAG<sup>3</sup>, *SIT4f*, 5'-CGGATCCATGCGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGTATCTAGAGGCCCGCAGCA<sup>3</sup>, *SIT4r*, 5'-CGGAAATCTTATAAGAAATGACGGCGGCTCT<sup>3</sup>, *ENA1f*, 5'-AATTTTCGATGGCGAAGGA<sup>3</sup>, and *ENA1r*, 5'-ACCAGCCTT-CACCGACAAAAT<sup>3</sup>.

The amplification of *ACT1* mRNA was exponential between 17 and 22 cycles, *SIT4* between 23 and 29 cycles, and *ENA1* between 22 and 28 cycles. The optimal parameters used for the PCR in our conditions were 20 cycles for *ACT1*, 25 for *SIT4*, and 25 for *ENA1*. The amplified DNA samples were separated on a 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed. The DNA was quantified by scanning the photograph using the Quantiscan software from Biosoft. Relative quantities of *SIT4* and *ENA1* transcripts were calculated by using *ACT1* PCR product as an internal standard.

**Determination of Intracellular Concentration of Cations.**—Yeast cells were grown in minimal medium (YNB-gal) to exponential phase ( $A_{600nm}$  0.8–1.0) and harvested. Cells were washed once with water and resuspended to a concentration of 0.5 g of cells per ml of water. Yeast cells were incubated for 30 min at room temperature, 50 mg of cells (wet weight) were diluted in 1 ml of a medium containing 10 mM MES buffer (pH 6.0) and the indicated concentrations of NaCl or LiCl. After the indicated time cells were harvested immediately and resuspended at 4 °C in 1 ml of 20 mM MgCl<sub>2</sub> and sorbitol to the same osmolarity as the incubation medium. Cells were centrifuged at 3000  $\times$  g for 10 min two times in this medium. Yeast cells were broken with 2 mM cetyltrimethylammonium bromide for 10 min at room temperature and centrifuged at 3000  $\times$  g for 2 min. The supernatant was diluted 1:10 in distilled water and analyzed in a flame photometer.

**Determination of Intracellular pH.**—Intracellular pH was determined as described previously (29).

**Measurement of Rubidium Efflux.**—Yeast cells were grown in minimal medium with galactose (YNB gal) to the exponential phase ( $A_{600nm}$  1.0–1.4) and harvested. Cells were washed twice with water and incubated for 18 h at 1 °C with agitation in 50 mM <sup>86</sup>RbCl (270 cpm/nmol) at a concentration of 0.1 g of cells per ml. Afterward cells were washed twice with water and resuspended to a concentration of 0.5 g of cell/wet weight. <sup>86</sup>RbCl-loaded cells (100 mg) were incubated in 1 ml of a medium containing 10 mM MES-trisethanolamine buffer (pH 6.0) and 500 mM NaCl or 500 mM LiCl. At the indicated time a sample of 100  $\mu$ l was collected by vacuum filtration through a 0.15  $\mu$ m pore size nitrocellulose filter (Millipore HAWP) and washed with 10 ml of 100 mM KCl by filtration. Filters were dried and transferred to a scintillation mixture, and radioactivity was monitored in a scintillation counter.

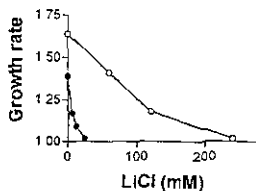


Fig 1. Growth inhibition of *S. cerevisiae* by LiCl. Liquid YNB-glu (○) or YNB-gal (●) medium with different concentrations of LiCl was inoculated with strain FY833. Growth was recorded by measurement of the absorbance at 600 nm, and the growth rate (growth/h) was calculated. This is a representative result of three different experiments.

**Measurement of Membrane Potential.**—Changes in membrane potential were estimated with the fluorescent dye diethiocarbocyanine (DiSC<sub>3(3)</sub>) (30, 31), obtained from Molecular Probes. The fluorescence of the molecule at a concentration of 0.25  $\mu$ M was recorded at room temperature at 540–600 nm in a spectrofluorometer with a magnetic stirrer in the sample compartment.

**ATPase Activity.**—Plasma membrane of *S. cerevisiae* and the vanadate-sensitive ATPase activity were measured as described (32).

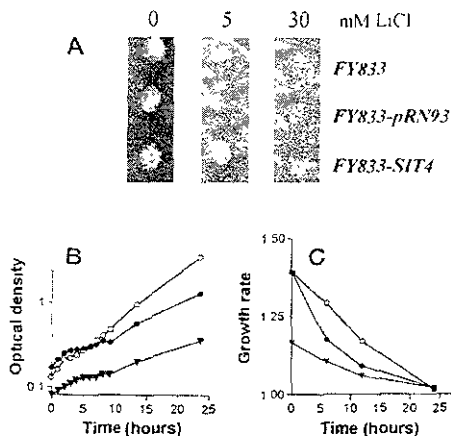
## RESULTS

**Screening for Recombinants with High Lithium Resistance.**—*S. cerevisiae* cells are able to adapt to a salt stress in a medium containing glucose as the carbon source. However, tolerance diminished when grown on galactose (Fig. 1). For strains R757 and FY833 the Li<sup>+</sup> lethal growth dosage was 250 mM in glucose, and in galactose medium it was 30 mM. We took advantage of this observation and screened an expression cDNA library under the control of a galactose-inducible promoter for clones that conferred lithium resistance in YNB galactose medium. Among six lithium-tolerant clones from R757 strain, we identified the gene *SIT4*. This gene is involved in progression of the cell cycle from G<sub>1</sub> into S phase (19). It encodes the catalytic subunit of a serine-threonine protein phosphatase (19) with homology to the Ser/Thr protein phosphatase PP6 from mammalian cells (33).

We isolated the open reading frame *SIT4* from the library plasmid and subcloned it into plasmid pRN93 under control of the galactose promoter that was used to transform another wild type strain named FY833. As shown in Fig. 2A, overexpressed *SIT4* also conferred resistance to lithium in this different strain. A characteristic effect of Li<sup>+</sup> is that at sublethal concentrations growth is arrested after the first duplication. After a period of adaptation of about 10 h cells recover growth. This growth arrest was not seen when *SIT4* was overexpressed (Fig. 2B).

The entire coding region of *SIT4* was deleted to abolish protein activity. Previous results showed that deletion causes a slow growth phenotype and larger cells (19). Our results showed that *sit4* strain was able to grow on galactose, provided that rich medium was used. The *sit4* strain did not grow in galactose nitrogen base minimal media. We tested if *sit4* strain was able to adapt to Li<sup>+</sup> stress. In contrast to overexpression, *sit4* strain (Fig. 2B) recovered growth after the arrest period induced by lithium. This result indicates that *SIT4* is not essential for Li<sup>+</sup> adaptation, and other genes might perform overlapping functions in response to lithium stress. In Fig. 2C we show the results of comparing the growth rate of the wild type, *sit4*-deleted cells, and *SIT4*-overexpressing cells in the presence of different LiCl concentrations, after the arrest period induced by Li<sup>+</sup>. We found that the latter is more resistant to Li<sup>+</sup>. It is interesting that resistance induced by overexpression of *SIT4* was specific for Li<sup>+</sup>, as overexpression did not increase tolerance to Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> stress, or sorbitol (data not shown).

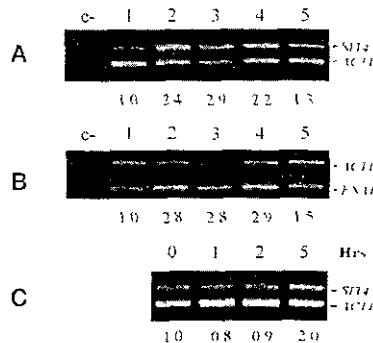
<sup>1</sup> The abbreviations used are: PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcription PCR; MES, 4-morpholinethanesulfonic acid; DiSC<sub>3(3)</sub>, diethiocarbocyanine.



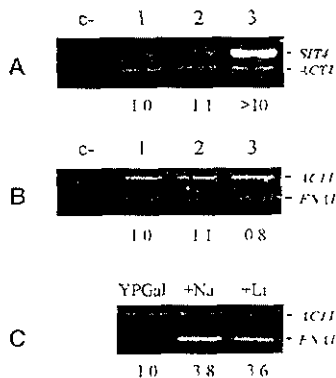
**Fig. 2. Overexpression of *SIT4* confers lithium resistance.** *A*, *S. cerevisiae* strains FY833, FY833-pRN93, and FY833-*SIT4* were grown in YNB-gal medium to mid-log phase. 5  $\mu$ l of a diluted culture ( $A_{600} \sim 0.03$ ) was plated onto YNB-gal medium containing different concentrations of LiCl. Growth was recorded after 4 days in plates without LiCl or with 5 mM LiCl and for 6 days with 30 mM LiCl. *B*, growth of FY833 ( $\bullet$ ), FY833-*SIT4* ( $\square$ ), and FY833-pRN93 ( $\blacktriangledown$ ) was recorded in YP-gal medium containing 12 mM LiCl. *C*, growth rate of the above strains on increasing concentrations of LiCl.

**Expression of *SIT4* Is Dependent on Monovalent Cations—***SIT4* is situated on chromosome IV. Its intergenic region contains 1558 base pairs, and a preliminary analysis of this region for putative consensus with the STRE sequence shows that it contains six STRE elements. This element mediates the activation of transcription in response to a wide type of stresses such as osmotic stress, heat shock, nitrogen starvation, oxidative stress, low external pH, and ethanol stress. Some of these responses are dependent on the high osmolarity glycerol pathway, but some are independent (34). We investigated whether *SIT4* expression was induced by different monovalent cations. *SIT4* was found to have a very low basal level of expression, and it was induced upon a stress by Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and to a lesser degree by sorbitol (Fig. 3A). In order to test the dependence on sublethal concentrations of LiCl, we measured *SIT4* induction in 15 mM LiCl. A 2-fold induction was observed after 5 h of Li<sup>+</sup> stress (Fig. 3C). This time period correlates with the arrest period of growth. These results suggest that overexpression of *SIT4* might be a physiological response to salt stress, and further work on the *SIT4* promoter is required to identify the motifs that are responsible for induction of expression by salt.

**Overexpression of *SIT4* Does Not Increase *PMR2A/ENAI* Expression—**One of the main proteins controlling Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup> resistance is the P-type ATPase encoded by *PMR2A/ENAI*. The level of *PMR2A/ENAI* transcription is modulated by a variety of phosphatases, and its promoter has been well studied (35). As shown in Fig. 3, A and B, the levels of *PMR2A/ENAI* transcript were induced by Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and to a lower extent by sorbitol. These results agree with published results (6, 7, 36). The comparison of A and B show that *SIT4* and *PMR2A/ENAI* are concomitantly induced. With the aim to investigate whether *SIT4* is a part of the mechanism by which *PMR2A/ENAI* is induced, we measured by RT-PCR the relative quantity of *PMR2A/ENAI* transcript on a strain where *SIT4* is overexpressed and upon a Li<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup> stress on a *sit4* strain (Fig. 4). The relative quantity of *PMR2A/ENAI* transcript was



**Fig. 3. Dependence of *SIT4* expression on Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and sorbitol.** FY833 was incubated for 2 h in YP-gal medium without (lane 1) or with the addition of 0.8 M Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, or sorbitol (lanes 2–5, respectively) *SIT4* (A) and *ENAI* (B) mRNA were quantified by RT-PCR. *SIT4* (C) mRNA was quantified after incubation for the time indicated in YP-gal medium with 15 mM LiCl. Lane c presents the results of RT-PCR with no addition of cDNA. The numbers below each panel represent the relative quantity of *SIT4* PCR product. *ACT1* was used as an internal standard, and *SIT4* and *ENAI* PCR products were normalized with respect to levels of the control condition (lane 1).

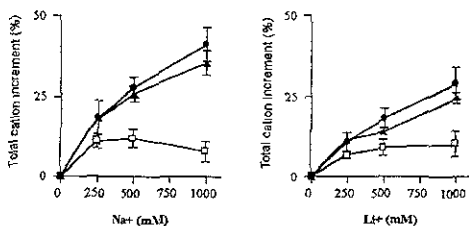


**Fig. 4. Expression of *ENAI* is independent of *SIT4*.** FY833 (lane 1), FY833-pRN93 (lane 2), and FY833-*SIT4* (lane 3) strains were grown in YNB-gal medium, and *SIT4* (A) and *ENAI* (B) mRNA were quantified by RT-PCR. FY833-*sit4* (C) was grown in YP-gal medium and stressed for 2 h with 0.8 M NaCl or 0.8 M LiCl, and *ENAI* mRNA was quantified by RT-PCR. *ACT1* was used as an internal standard, and *SIT4* and *ENAI* PCR products were normalized with respect to levels of the control condition (lane 1).

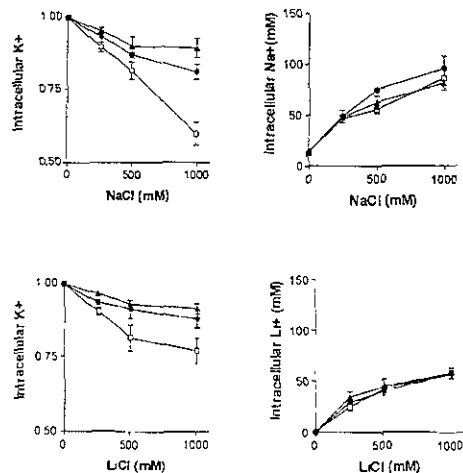
not altered by overexpression of *SIT4* (Fig. 4B). However, *PMR2A/ENAI* transcription level is still induced after a shock with 0.8 M NaCl or 0.8 M LiCl on a *sit4* strain (Fig. 4C). These results show that induction of *PMR2A/ENAI* expression by Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> is independent of *SIT4*.

***SIT4* Modulates K<sup>+</sup> Homeostasis and pH—**When yeast cells are subjected to a Na<sup>+</sup> stress they undergo accumulation of osmotically active solutes such as glycerol and trehalose (37, 38). To determine whether overexpression of *SIT4* changes the intracellular concentrations of the monovalent cations K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Li<sup>+</sup>, we determined their concentration after incubation for 30 min with increasing concentrations of NaCl or LiCl. In Fig. 5 we show the total monovalent cationic level; interestingly, overexpression of *SIT4* leads to a lower intracellular accumulation of monovalent cation. The level of Na<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup>





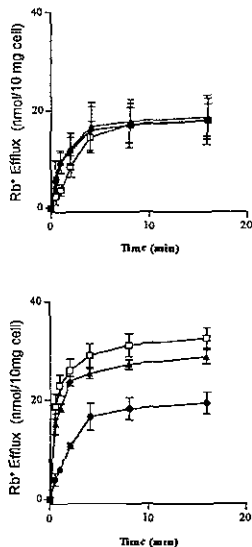
**FIG 5** Intracellular  $K^+$ ,  $Na^+$ , and  $Li^+$  under salt stress. The total amount of  $K^+$  and  $Na^+$  (left panel) or  $K^+$  and  $Na^+$  and  $Li^+$  (right panel) were estimated after incubating yeast strains FY833 (●), FY833-PRN93 (▲), and FY833-*SIT4* (□) with increasing concentrations of NaCl or LiCl for 30 min. The percent of total cation increment was calculated with respect to the value obtained in medium without added salt. Data represent mean values and S.D. of three independent experiments.



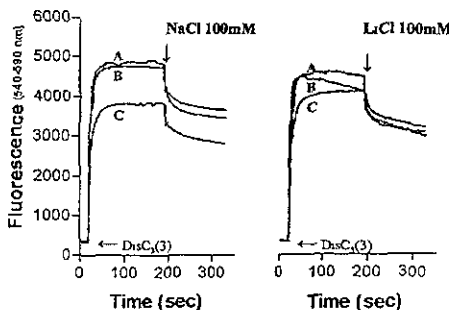
**FIG 6** Effect of overexpression of *SIT4* on  $K^+$ ,  $Na^+$ , and  $Li^+$  content under salt stress. FY833 (●), FY833-PRN93 (▲), and FY833-*SIT4* (□) were incubated with increasing concentrations of NaCl or LiCl for 30 min. The relative amount of  $K^+$  and the total amount of  $Na^+$  or  $Li^+$  entry were calculated by determination of internal cation concentrations. Data represent mean values and S.D. of three independent experiments.

uptake did not change under these conditions by overexpression of *SIT4* as shown in Fig. 6, however, the relative amount of  $K^+$  inside the cell was diminished in relation to control conditions. These results indicate that overexpression of *SIT4* causes a greater extrusion of  $K^+$  upon  $Na^+$  or  $Li^+$  stress and that a  $K^+$  transport system might be involved. In order to test this hypothesis we measured  $^{86}Rb^+$  efflux in cells that had been previously starved and preloaded with  $^{86}RbCl$ . The results showed that in *SIT4*-overexpressing cells  $^{86}Rb^+$  efflux in the presence of 500 mM NaCl or LiCl was highly increased (Fig. 7) *sit4* strain showed the same kinetics as the wild type strain (data not shown).

We explored if the change on  $K^+$  homeostasis induced by overexpression of *SIT4* could induce an alteration of the membrane potential or internal pH. We observed that overexpression of *SIT4* did not alter the changes in membrane potential produced by the addition of  $Na^+$  or  $Li^+$  (Fig. 8), but the intracellular pH changed from 6.17 ( $\pm 0.01$ ) in wild type cells to 6.51 ( $\pm 0.03$ ) in *SIT4*-overexpressing cells. The *sit4* strain did not



**FIG 7** Effect of overexpression of *SIT4* on  $^{86}Rb^+$  efflux under salt stress. FY833 (left panel) and FY833-*SIT4* (right panel) were preloaded with  $^{86}Rb^+$ , and efflux was measured in the presence of 500 mM NaCl (□), LiCl (▲), or without addition of cations (●). Data represent mean values and S.D. of three independent experiments.



**FIG 8** Fluorescence changes of DiSC<sub>3</sub>(3) induced by the addition of  $Na^+$  or  $Li^+$  to strains FY833 (A), FY833-PRN93 (B), and FY833-*SIT4* (C). Starved cells (25 mg) were preincubated for 2 min in 10 mM MES-triethanolamine buffer (pH 6.0), 100 mM glucose, 100  $\mu$ M  $CaCl_2$ , and 10  $\mu$ M carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazone. 0.25  $\mu$ M DiSC<sub>3</sub>(3) was added, and fluorescence was recorded at room temperature at 540–600 nm. Where indicated 100 mM NaCl or LiCl was added.

show any significant alteration in pH as compared with the wild type strain. The alkalization of the cytoplasm was not caused by an altered function of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase, since the specific activity of this enzyme in purified plasma membranes from *SIT4*-overexpressing cells and wild type cells was the same (0.338 and 0.373 nmol/min/mg of protein at pH 5.5, respectively).

#### DISCUSSION

Cellular processes are highly regulated by a wide variety of signal transduction pathways. Protein kinases and phosphatases mediate these events. *SIT4* encodes a protein with homology to the catalytic subunits of mammalian PP6 protein phosphatase.

phatases (33) and regulates the cell cycle (19). Our *sit4* strains are viable and show an increased abundance of unbudded cells (21). However, *sit4* is lethal in *ssd1* (a gene of unknown function) deletant, whereas temperature-conditional alleles of *SIT4* arrest in  $G_1$  when shifted to the nonpermissive temperature (19). It has been recently reported that *sit4* mutants of the yeast *Kluyveromyces lactis* regulate drug resistance (39). In this work we demonstrate for the first time that *SIT4* plays a role in monovalent cation homeostasis. Our results show that growth was arrested by sublethal  $Li^+$  concentrations, but after an adaptation period wild type cells were able to recover growth. Diverse regulatory mechanisms must be turned on during the period of adaptation to  $Li^+$  stress. Our results point out that induction of expression of *SIT4* is a regulatory mechanism, because on overexpression, lithium did not cause this growth arrest. This idea is reinforced by the fact that *SIT4* transcript is induced by low lithium concentrations and that its time-dependent expression correlates with the arrest period induced by lithium. The results obtained with overexpression of *SIT4* might represent physiological changes during adaptation to  $Li^+$  stress.

***ENA1* Is Induced by a *SIT4*-independent Pathway**—*ENA1* is a P-type ATPase that has been proved to be involved in the main pathway of  $Na^+/Li^+$  tolerance (6, 7). A link has been suggested between *SIT4* and *ENA1*, mediated by *SIS2/HAL3*. Ferrando *et al.* (14) reported that *SIS2/HAL3* suppressed salt sensitivity in a calcineurin-deleted background by stimulating transcription of the *PMR2A/ENA1* gene. On the other hand, *SIS2/HAL3* is also a suppressor of the lethal *sit4-ssd1* phenotype described above (19). These results led us to test if *SIT4* was essential for *PMR2A/ENA1* induction of transcription. We found that overexpression of *SIT4* did not mimic the effect of *SIS2/HAL3* as it does not increase *PMR2A/ENA1* expression. We have also shown that *PMR2A/ENA1* is still induced by  $Na^+$  and  $Li^+$  in a *sit4* strain. These data indicate clearly that transcription of *ENA1* is induced by salt in a pathway independent of *SIT4*.

**Overexpression of *SIT4* Stimulates  $Rb^+$  Efflux Induced by Salt and Alters the Intracellular  $pH$** —To date the role of internal monovalent cations in cellular physiology is not known.  $K^+$  and  $Na^+$  regulate the activity of many enzymes, but the effect of altered monovalent cation homeostasis has not been studied. On the other hand, it has been shown that high extracellular  $K^+$  concentrations alleviate  $Na^+/Li^+$  stress (5). Upon  $Na^+$  stress yeast cells undergo accumulation of solutes to overcome turgor pressure (37, 38) and also undergo an increase of intracellular  $Na^+$  and a decrease of intracellular  $K^+$  (40, 41). The fact that *SIT4* regulates total cation content upon a  $Na^+$  or  $Li^+$  stress by lowering the intracellular content of  $K^+$  indicates that the regulation of homeostasis by *SIT4* is mediated via a  $K^+$  efflux transporter. The increased  $K^+$  loss does not lead to a change of the electrical membrane potential, but it maintains the total monovalent cation content low after a  $Na^+$  or  $Li^+$  stress. One intriguing physiological response of overexpression of *SIT4* is the elevated cytoplasmic  $pH$ . Further work is necessary to test if this effect leads to altered  $K^+$  homeostasis or if it is involved in another function regulated by *SIT4*, as cell cycle control (19). However, it is possible that the efflux may proceed through one of the cation/ $H^+$  exchange systems reported before (8, 42, 43).

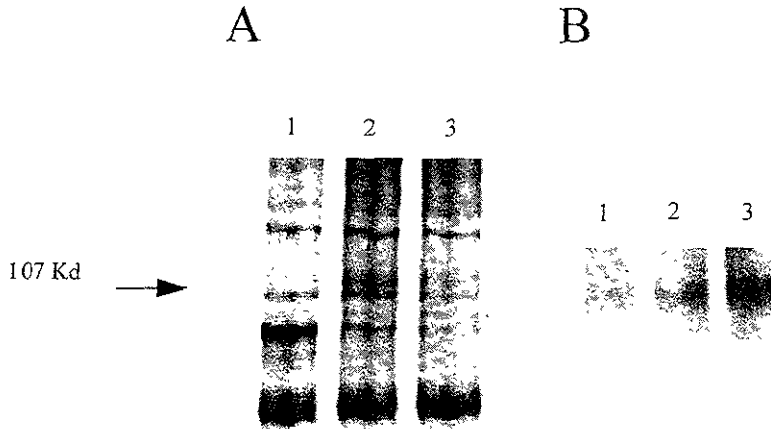
Two homologs of *SIT4* have been found in mammalian tis-

sues. PP6 expression was preferentially found in the human testis, heart, and skeletal muscles, whereas in the mouse PPV was found in the brain (33). Our work in yeast leads to the proposal that the involvement of these mammalian genes during lithium treatment should be studied.

**Acknowledgment**—We thank Dr Leopoldo de Meis from Universidade Federal do Rio de Janeiro who supported part of this work with grants from FINEP/Pronex and FAPERJ.

## REFERENCES

- Schou, M. (1997) *Arch. Gen. Psychiatry* 4, 9-13
- Joje, R. S. (1996) *Mol. Psychiatry* 2, 117-128
- Manji, H. K., Potter, W. Z., and Lenox, R. H. (1995) *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 531-543
- Gómez, M. J., Luyten, K., and Ramos, J. (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 157-160
- Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19, 3328-3337
- Haro, R., Garcadeblas, B., and Rodríguez-Navarro, A. (1991) *FEBS Lett.* 291, 89-191
- Wieland, J., Nitsche, A. M., Strayle, J., Steiner, H., and Rudolph, H. K. (1993) *EMBO J.* 14, 3670-3682
- Prar, C., Potier, S., Souciet, J. L., and Sychrová, H. (1996) *FEBS Lett.* 387, 83-92
- Sychrová, H., Ramirez, J., and Peña, A. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 167-172
- Garcadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F. J., Bañuelos, M. A., Haro, R., and Rodríguez-Navarro, A. (1993) *Mol. Genet. 236*, 363-368
- Bañuelos, M. A., Sychrová, H., Eleyksten-Grosshans, C., Souciet, J. L., and Potier, S. (1998) *Microbiology* 144, 2749-2758
- Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13036-13041
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., and Pardo, J. M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 8792-8796
- Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1995) *Mol. Cell Biol.* 15, 5470-5481
- de Nadal, E., Cloiet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Arino, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7357-7362
- Skala, J., Purnelle, B., Crouzet, M., Aigle, M., and Goffeau, A. (1991) *Yeast* 7, 651-655
- Mason, J. Y., and Rapraet, D. (1996) *Genetics* 149, 893-901
- Arndt, K. T., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1989) *Cell* 56, 527-537
- Sutton, A., Immanuel, D., and Arndt, K. T. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 2132-2143
- Di Como, C. J., and Arndt, K. T. N. (1996) *Genes Dev.* 10, 1904-1916
- Jiang, Y., and Branch, J. R. (1995) *EMBO J.* 18, 2782-2792
- Beck, T., and Hall, M. N. (1999) *Nature* 402, 689-692
- Liu, H., Krveck, J., and Brutscher, A. (1992) *Genetics* 132, 665-673
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 163-168
- Wach, A., Brachet, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* 10, 1793-1803
- Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., and Kahn, A. (1988) *Nature* 333, 856-860
- Wang, A. M., Doyle, M. V., and Mirk, D. P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9717-9721
- Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trampower, B. L. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 3091-3092
- Peña, A., Ramirez, J., Rovins, G., and Calahorra, M. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 1017-1022
- Peña, A., Urbe, S., Pardo, J. P., and Barballu, M. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 217-225
- Peña, A., Ramirez, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 237-244
- Masuda, C. A., and Montero-Lomeli, M. (2000) *Biochem. Cell Biol.* 78, 51-58
- Bastrans, H., and Penstungl, H. (1996) *J. Cell Sci.* 109, 2865-2874
- Varela, J. C. S., and Majer, W. H. (1996) *Microbiology* 142, 721-731
- Proß, M., and Serrano, R. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19, 537-546
- Manquez, J. A., and Serrano, R. (1996) *FEBS Lett.* 382, 89-92
- Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R., and Gold, G. M. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2119-2123
- Blumberg, A., and Adler, L. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 1087-1093
- Chen, X. J., Bauer, B. E., Kuehler, K., and Clark-Walker, G. D. (2000) *J. Mol. Biol.* 275, 14865-14872
- Norkkone, B., and Kivlin, A. (1994) *J. Bacteriol.* 169, 836-845
- Singh, S., Singh, A. J., Gill, S., and Singh, B. (1996) *Mol. Cell Biochem.* 158, 121-124
- Ramirez, J., Peña, A., and Monte-Lambert, M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1285, 175-182
- Ramirez, J., Ramirez, O., Saldana, C., Cruz, R., and Peña, A. (1999) *J. Bacteriol.* 180, 5860-5865



**Figura 23. Electroforesis y análisis tipo Western de las mutantes *hal4* y *kha1*.** En un gel de acrilamida al 10% se corrieron las membranas plasmáticas (100  $\mu$ g) (A) de las cepas W303-1A (línea 1), *kha1::URA3* (línea 2) y *hal4::URA* (línea 3). Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con un anticuerpo policlonal contra la ATPasa de levadura donado por la Dra C. Slayman de la Universidad de Yale. Un segundo anticuerpo se utilizó para hacer la detección (B).

Tabla I

Actividad de la  $H^+$ -ATPasa en células permeabilizadas con tolueno nmoles de ATP hidrolizados (min.mg)<sup>-1</sup>.

Cepa	-Glucosa <sup>a</sup>	+Glucosa <sup>b</sup>
W303-1A	8.3 $\pm$ 0.25	19.1 $\pm$ 2.4
<i>kha1::URA</i>	29.5 $\pm$ 2.8	29.1 $\pm$ 1.02
<i>hal4::URA</i>	32.4 $\pm$ 2.8	29.6 $\pm$ 1.85

<sup>a</sup>Células sin preincubación.

<sup>b</sup>Células preincubadas 30 min en presencia de glucosa 50 mM antes de la permeabilización. Resultados promedio de 3 experimentos diferentes.

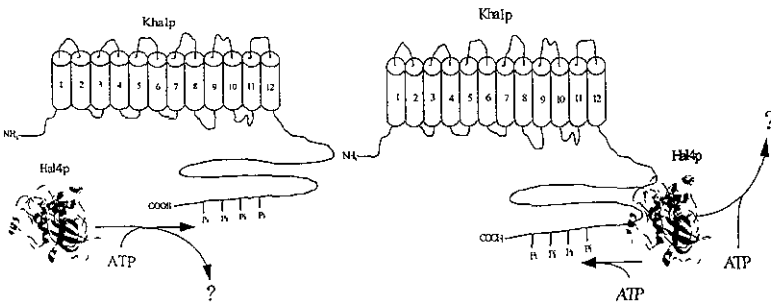
Tabla II

Actividad de ATPasa en la membrana plasmática aislada

Cepa	$\mu$ mol de ATP min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
W303-1A	3.42 $\pm$ 0.43
<i>kha1::URA</i>	6.37 $\pm$ 1.17
<i>hal4::URA</i>	5.33 $\pm$ 0.63

Promedio de 3 experimentos diferentes

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que Khal pudiera estar regulado por fosforilación o desfosforilación (figura 24). También sugieren que pudiera existir alguna interacción de Hal4 y Khal para poder explicar los resultados obtenidos con la  $H^+$ -ATPasa (figura 24). Actualmente estamos haciendo las construcciones para obtener la ablación de los genes *HAL4* y *KHAL1*, con el objeto de ver si las mutaciones son aditivas. También tenemos una construcción de Khal con un epítipo de hemaglutinina con la que esperamos poder hacer experimentos de inmunoprecipitación y así poder determinar si Khal se fosforila y si esta fosforilación se pierde cuando se elimina Hal4.



**Figura 24. Modelo para posibles mecanismos de fosforilación de Khal1.** Se plantean dos posibilidades: (*izquierda*) que la actividad de Khal y de otros sistemas de transporte, depende de un proceso de fosforilación mediado por Hal4. (*derecha*) que la actividad de Hal4 dependa de una interacción directa con Khal1.

#### IV. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que el papel fisiológico de Khal consiste en regular el pH intracelular, así como los niveles de potasio (Ramírez y cols., 1998), y que esta proteína puede estar regulada por fosforilación y desfosforilación (Masuda y cols., 2000; Calahorra y cols., en preparación). Aunque desconocemos su localización exacta, se infiere que se encuentra en la membrana plasmática por las modificaciones que produce en los flujos de iones. Tampoco sabemos si su función depende de fosforilación o desfosforilación. En cuanto a las modificaciones observadas en el ciclo celular para las mutantes carentes de este gen, creemos que se deben principalmente al aumento del pH intracelular, o a la concentración de  $K^+$ , o a ambos. Sin embargo, debemos considerar que de existir alguna interacción de Khal y Hal4 o Sit4, éstas últimas podrían ser las responsables de modificar el ciclo celular.

En el caso de Nha1, esta proteína pareciera pertenecer a un sistema de respuesta a estrés, ya que el pH y los niveles de iones intracelulares sólo se ven afectados cuando se sobreexpresa, mientras que en una célula carente de este gen sólo se observa una ligera modificación del pH intracelular (Sychrová y cols., 1999). Para este transportador sí se sabe que está localizado en la membrana plasmática (Kinclová y cols., 2000), pero se desconocen los niveles de expresión en condiciones normales de cultivo (libre de cualquier tipo de estrés para la célula), o bajo estrés. Dadas las características de la secuencia de residuos en el extremo carboxilo terminal de esta proteína, creemos que al igual que Khal, pudiera estar regulado por fosforilación y desfosforilación (Hal4 y/o Sit4), aunque no tenemos evidencia. Es posible también que este gen tenga un papel marginal, ya que hasta la fecha, sólo se le ha podido demostrar algún papel cuando se le sobreexpresa.

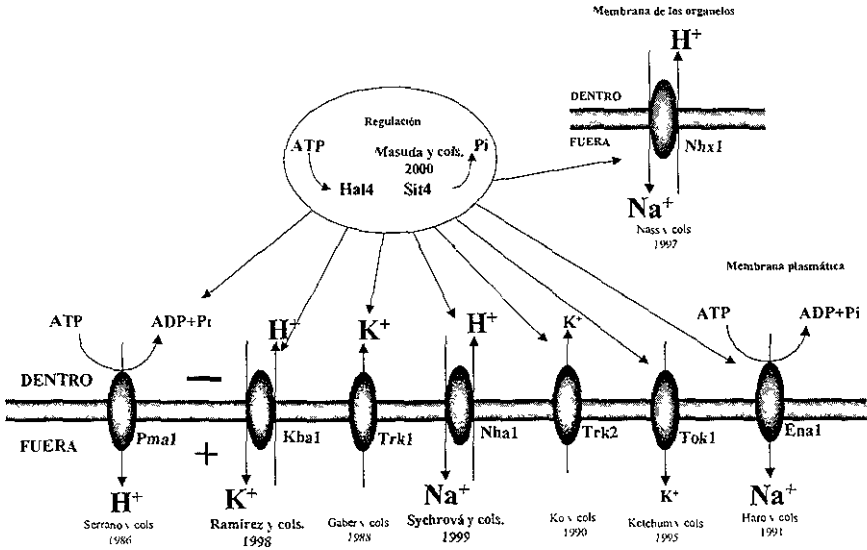
Para el gen *TOK1*, encontramos que pudiera ser esencial para el funcionamiento de la

mitocondria; sin embargo, los resultados con las dobles mutantes son preliminares, y no se ha medido la respiración en las mutantes simples del gen. Es necesario producir una ablación completa del gen para corroborar los resultados que tenemos y localizar la proteína en la célula. También, el hecho de que sea esencial en las mutantes *Trk1A-Trk2Δ*, podría implicar al menos dos cosas: una es que en ausencia de los dos transportadores normales, tomara su papel, y fuera capaz de transportar  $K^+$  hacia adentro. La otra es que, si como parece ser, las mutantes de los tres genes son letales, es posible que no exista otro transportador de  $K^+$  hacia dentro de la levadura, contrario a lo que han sugerido Mulet y cols. (1999), en cuyo caso podría ser Tok1 quien desempeñe esta función.

Finalmente, nuestros resultados nos permiten apoyar la propuesta de Ramos y cols. (1994), en el sentido de que Trk2 puede llegar a comportarse como un sistema de alta afinidad y baja velocidad. Tomando en cuenta los resultados propuestos para la regulación de Trk1 y Trk2 por Hal4 y Hal5, estamos considerando la posibilidad de interacción de Khal1 y Hal4 para explicar los resultados obtenidos con las mutantes de Trk1 y Trk2. Creemos que un experimento concluyente de estos resultados puede ser la interrupción de Trk1-Trk2 y Hal4, donde esperamos obtener un efecto letal por la pérdida de los tres genes, similar al que obtuvimos para Trk1-Trk2-Khal1.

## V. CONCLUSIONES

1. **Kha1** se expresa en la levadura y juega un papel central en la regulación del pH y la concentración de potasio intracelulares. La pérdida de esta función modifica el ciclo celular.
2. **Nha1** cuando se sobreexpresa, participa en la regulación del pH y la concentración de potasio intracelulares, pero no parece jugar un papel central en este fenómeno.
3. **Trk1** no es el único sistema de transporte de potasio de alta afinidad en la levadura; en las mutantes de este gen, **Trk2** en conjunto con Trk1 y Kha1 parecen ser esenciales para la levadura.
4. **Tok1** no tiene una función determinada en la levadura.
5. **Sit4** cuando se sobreexpresa modifica los niveles intracelulares de potasio, posiblemente por desfosforilación de los intercambiadores Kha1 y/o Nha1.
6. **Hal4** regula la actividad de Kha1p y debe formar parte de un sistema de regulación general para todos los sistemas de transporte en la levadura.



En el esquema se propone un modelo de los procesos de transporte de potasio, los sistemas para la salida de sodio y potasio y la regulación de éstos en la levadura, basado en los resultados obtenidos en este trabajo



## VI. PERSPECTIVAS

1. Es necesario definir la localización de Khal en la célula, haciendo proteínas de fusión con la proteína fluorescente verde.
2. Demostrar si Khal se fosforila, por inmunoprecipitación en una proteína de fusión con un epítoto de hemaglutinina.
3. Conocer la estequiometría y la selectividad de Khal, purificándola y recontituyéndola en liposomas.
4. Conocer los niveles de expresión de Khal, determinando el mRNA en condiciones de estrés.
5. Conocer los niveles de expresión de Nha1, determinando el mRNA en ausencia o presencia de estrés (cambios del pH o la salinidad, con KCl o NaCl, en presencia y ausencia de Khal).
6. Demostrar que existe otro sistema de transporte de potasio de alta afinidad y que este puede ser Trk2, haciendo mutaciones de Khal y Trk2.
7. Demostrar que el conjunto Trk1, Trk2, y Khal es esencial, para aclarar si hay o no otro sistema de transporte de cationes monovalentes.
8. Conocer la localización de Tok1 en la célula, haciendo proteínas de fusión con la proteína fluorescente verde.
9. Conocer los niveles de expresión de Khal y Nha1 en una ablación de *SIT4*.
10. Conocer el efecto de la pérdida de Khal y Nha1 en la sobreexpresión de *SIT4*.
11. Hacer la triple interrupción de Trk1, Trk2 y Hal4, que debería ser letal como la interrupción Trk1, Trk2 y Khal, si es que Khal es regulada por Hal4.

## ANEXO

Durante el tiempo en el que realice mis estudios para obtener el grado de doctor, fui invitado a participar en otros proyectos cuyos resultados fueron publicados.

1. Edmundo Chávez, Mertha Franco, Horacio Reyes-Vivas, Cecilia Zazueta, Jorge Ramírez, and Raymundo Carrillo. 1998. Hypothyroidism renders liver mitochondria resistant to the opening of membrane permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta*, **1407**:243-248.
2. Patricia Thomé-Ortiz, Antonio Peña and Jorge Ramírez. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* **14**:1355-1371.
3. Angélica Morales, Adela Cuéllar, Jorge Ramírez, Felipe Vilchis, and Vicente Díaz-Sánchez. 1999. Synthesis of steroids in pancreas: evidence of cytochrome P-450scc activity. *Pancreas*, **19**:39-44.
4. Ariane Atteia, Robert van Lis, Jorge Ramírez, and Diego González-Halphen. 2000. *Polytomella* spp. Growth on ethanol extracellular pH affects the accumulation of mitochondrial cytochrome c550. *Eur. J. Biochem.* **267**:2850-2858.
5. Edmundo Chávez, Antonio Peña, Cecilia Zazueta, Jorge Ramírez, Noemí García and Raymundo Carrillo. 2000. Inactivation of mitochondrial permeability transition pore by octylguanidine and octylamine. *J. Bionerg. Biomem.* **32**:193-198.

## REFERENCIAS

1. André, B. 1995. An overview of membrane transport protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**:1575-1611.
2. Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C. Souciet, J.L., Potier, S. 1998 The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**:2749-2758.
3. Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D. 1993. Gating and conductance in an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* **132**:183-199.
4. Beutler, H. O. 1984. Ethanol. In *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer, Editor. Third edition. Verlag Chemie, Weinheim. pp 598-606.
5. Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., Gustin, M.C. 1993. An osmosensig signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760-1763.
6. Brierley, G.P. 1976. The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* **10**:41-63.
7. Camarasa, C., Prieto, S., Ros, R., Salmon, J., Barré, P. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* **12**:1301-1313.
8. Conway, E.J., O'Malley, E. 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem.J.* **40**:59-67.
9. Degols, G., Shiozaki, K., Russel, P. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2870-2877.
10. Dibrov, P., Fliegel, L. 1998. Comparative molecular analysis of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers: a unified model for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport?. *FEBS Lett.* **424**:1-5.
11. Emilio M.G. Menano, H.P. 1975. The excretion of hydrogen ion by the isolated amphibian skin: effects of antidiuretic hormone and amiloride. *Biochim. Biophys. Acta* **382**:344-352.
12. Fairman, C., Zhou, X.-L., Kung, C.L. 1999. Potassium uptake through the TOK1 K<sup>+</sup> channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.* **168**:149-157.
13. Fliegel, L. Fröhlich, O. 1993. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem J* **296**:273-285.
14. Gaber, R.F., Styles, C.A. Fink G.R. 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol* **8**:2848-2859.
15. Gaxiola, R., Larrinoa, I.F., Villalba, J.M. Serrano, R. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**:3157-3164.
16. Glaser, H.U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdin-Kerjan, Y. Serrano, R. 1993. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a

- putative phosphatase gene. *EMBO J* **12**:3105-3110.
17. Goffeau, A. y cols. 1997. The Yeast Genome Directory. *Nature* **387**, Supplement to *Nature* issue No. 6632S.
  18. González, A., Membrillo-Hernández, J., Olivera, H., Aranda, C., Macino, G., Ballario, P. 1992. Cloning of the yeast gene coding for the glutamate synthase small subunit (GUS2) by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* glutamate auxotrophs. *Mol. Microbiol.* **6**:301-308.
  19. Haro, R., Garciadeblas, B. Rodríguez-Navarro, A. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**:189-191.
  20. Harold, F.M. Papineau, D. 1972. Cation transport and electrogenesis II proton and sodium extrusion. *J. Membrane Biol.* **8**:45-62.
  21. Heichman, K. A., Roberts J. M. 1996. The yeast CDC16 and CDC27 genes restrict DNA replication to once per cell cycle. *Cell.* **85**:39-48.
  22. Hill, J. E., Myers A. M., Koerner T. J., Tzagoloff A. 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**:163-167.
  23. Höfer, M., Calahorra, M. Peña, A. 1996. Assessment of  $\Delta\mu\text{H}^+$  in *Schizosaccharomyces pombe*; Intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiol.* **41**:98-100.
  24. <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
  25. Ivey, D.M., Guffanti, A A., Bossewitch, J.S., Padan, E. Krulwich, T.A. 1991. Molecular cloning and sequencing of a gene from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 that functionally complements an *Escherichia coli* strain carrying a deletion in the nhaA  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene. *J Biol Chem.* **266**:23483-23489.
  26. Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. Young, P.G 1992. Gene amplification at a locus encoding a putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J.* **11**:1631-1640.
  27. Kakar, S.S. , Mahdi, F., Li, X. Garlid, K.D. 1989 Reconstitution of the mitochondrial non-selective  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ( $\text{K}^+/\text{H}^+$  ) antiporter into proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **264**:5846-5851.
  28. Ketchum, K., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.N. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* **376**:690-695.
  29. Kinclová, O., Potier, S., Sychrová, H. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane antiporter Nha1. 18<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. Ouro Preto, Brasil. 14 al 17 de septiembre de 2000.
  30. Kleyman, T.R., Asher, C, Cragoc E.J. Jr, Garty, H. 1987. Effects of amiloride analogues on  $\text{Na}^+$  transport in toad bladder membrane vesicles Evidence for two electrogenic transporters with different affinities toward pyrazinecarboxamides. *J Biol Chem Jun* **262**:8566-73
  31. Ko, C.H. Gaber, R.F 1991 *TRK1* and *TRK2* encode structurally related  $\text{K}^+$  transporters

- in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **11**:4266-4273.
32. Krulwich T.A. 1983. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* **726**:254-264.
  33. Kunst, A., Draeger, B., Ziegenhorn, J. 1984. D-Glucose. In *Methods of enzymatic analysis*. H. U. Bergmeyer, Editor. Third edition. Verlag Chemie, Weinheim. pp 163-171.
  34. Kyte, J., Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
  35. Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Revs.* **104**:229-242.
  36. Lew, D. J., Marini, N. J., Reed, S. I. 1992. Different G1 cyclins control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell.* **69**:317-327.
  37. Maathuis F.J.M. Sanders, D. 1992. Plant membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:661-669.
  38. Malpartida, F. Serrano, R.1981. Proton translocation catalized by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomes. *FEBS Lett.* **131**:351-354.
  39. Manon, S. Guérin, M. 1992. K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in yeast mitochondria: sensitivity to inhibitors, solubilization and reconstitution of the activity in proteoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1108**:169-176.
  40. Marshall, C.J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Op. Gen. Dev.* **4**:82-89.
  41. Martinussen, J., Hammer, K. 1994. Cloning and characterization of upp, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **176**:6457-6463.
  42. Masuda C.A., Ramírez, J., Pena, A., Montero-Lomeli, M. 2000. Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the SER-THR protein phosphatase SIT4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* **275**:30957-30961.
  43. Miosga, T., Witzel, A, Zimmermann, F K 1994. Sequence and function analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Yeast* **10**:965-973.
  44. Mitchell, P 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144-148.
  45. Mitchell, P. Moyle, J. 1967. Acid-base titration across the membrane system of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **105**:1147-1162.
  46. Mitchell, P. Moyle, J. 1969. Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **9**:149-155.
  47. Mulet, J M., Leube, M. P., Kron, S J., Rios, G., Fink, G.R. Serrano, R. 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol* **19**:3328-3337.
  48. Munro, A W., Ritchi, G. Y., Lamb, A.J., Douglas, R.M., Booth, I.R. 1991. The cloning

- and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium-efflux system KefC of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:607-616.
49. Mürer, H., Hopfer, V. Kinne, R. 1976. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J.* **154**:597-604.
  50. Nass, R. Rao, R. 1998. Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *J. Biol. Chem.* **273**:21054-21060.
  51. Nass, R., Cunningham, K.W. Rao, R. 1997. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**:26145-26152.
  52. Navarre, C. Goffeau, A. 2000. Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of *PMP3*, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *EMBO J.* **19**:2515-2525.
  53. Numata, M., Petrecca, N.L. Orłowski, J. 1998. Identification of a mitochondrial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.* **273**:6951-6959.
  54. Orłowski, J. Grinstein, S. 1997. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**:22373-22376.
  55. Padan, E. Schuldiner, S. 1993. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, molecular devices that couple the Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> circulation in cells. *J. Bioener. Biomem.* **25**:647-669.
  56. Padan, E. Schuldiner, S. 1994. Molecular physiology of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli*. *J. Exp. Biol.* **196**:443-456.
  57. Padan, E. Schuldiner, S. 1994. Molecular physiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, key transporters in circulation of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> in cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**:129-151.
  58. Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpel, R. Schuldiner, S. 1989. Deletion of *ant* in *E. coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system(s). *J. Biol. Chem.* **264**:20297-30302.
  59. Padan, E., Zilberstein, D. Schuldiner, S. 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **650**:151-166.
  60. Paulsen, I T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A. Saier, M.H. 1998. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **430**:116-125.
  61. Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K<sup>+</sup> transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **167**:397-407.
  62. Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., Tucna, M. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem. Biophys.* **153**:413-425.
  63. Peña, A., Ramírez, J. 1986. Effects of monovalent cations on derepression of phosphate transport in yeast. *Biochim Biophys. Acta*, **855**:179-185
  64. Peña, A. Ramírez, J. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast *Biochim Biophys Acta* **1068**:237-244.

65. Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., Calahorra, M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol* **177**:1017-1022.
66. Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P., Borbolla, M. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem Biophys.* **231**:217-225.
67. Pitts RF. 1966. The renal metabolism of ammonia. *Physiologist*.**9**:97-109.
68. Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C. Saito, H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPDI-SSK1 "Two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.
69. Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L. Sychrova, H. 1996. Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **387**:89-93.
70. Proft, M. Serrano, R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:537-546.
71. Ramírez, J., Peña, A., Montero-Lomelí, M. 1996. H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchanger in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1285**:175-182.
72. Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R. Peña, A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Bacteriol.* **180**:5860-5865.
73. Ramos, J., Alijo, R., Haro, R., Rodríguez-Navarro, A. 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:249-252.
74. Rodríguez-Navarro, A. Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**:940-945.
75. Rodríguez-Navarro, A. Sancho, E.D. 1979. Cation exchanges of yeast in the absence of magnesium. *Biochim. Biophys. Acta* **552**:322-330.
76. Rothstein, A. 1974. Relationship of cation influxes and effluxes in yeast. *J. Gen. Physiol* **64**:608-621.
77. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
78. Serrano, R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense mechanisms. *Int. Rev. Cytol.* **165**:1-52.
79. Serrano, R. Plasma membrane ATPase. In. *The plant plasma membrane*, edited by Larson, C. and Moller, I.M. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag, 1990.p. 127-153.
80. Serrano, R., Kicland-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**.689-693.
81. Sutton, A., Immanuel, D., Arndt, K.T. 1991. The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol Cell Biol.* **11**:2133-2148.
82. Struhl, A. R. W. Davis. 1981. Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces*

*cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **152**:535-552.

83. Sychrova, H., Ramírez, J. Peña, A. 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**:167-172.
84. Waser, M., Hess-Bienz, D., Davies, K., and Solioz, M. 1992. Cloning and disruption of a putative Na-H antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **267**:5396-5400.
85. Welihinda, A.A., Trumbly, R.J. Garlid, K.D. Beavis, A.D. 1993. On the regulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  and  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiport in yeast mitochondria: evidence for the absence of an  $\text{Na}^+$ -selective  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**:367-373.
86. West, I.C. Mitchell, P. 1974. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **144**:87-90.
87. Whitlock, R.T. Wheeler, H.O. 1969. Hydrogen ion transport by isolated rabbit gallbladder. *Am. J. Physiol.* **217**:310-316.