

Intercambiadores catión/protón en levaduras

JORGE RAMÍREZ* Y ANTONIO PEÑA

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. CP 04510, AP 70242, México D. F. Tel. 5622-5633 FAX 5622-5630

*Autor para la correspondencia: E mail jramirez@ifisiol.unam.mx

ABSTRACT. Cation/proton antiporters are membrane proteins found throughout the eukaryotic and prokaryotic kingdoms. These proteins exchange cations (Na^+ or K^+) for protons (H^+) across cytoplasmic and organelle membranes. They therefore link the electrochemical potential of the cations ($D\mu_{\text{Na}^+}$ or $D\mu_{\text{K}^+}$) and the hydrogen ($D\mu_{\text{H}^+}$) ions, maintained across the biological membranes. The transmembrane ion cycle consists of two process, the formation of an electrochemical potential for a particular ion, followed by a reaction or reactions which recycle the ion back down its electrochemical gradient. These systems are central in the regulation of internal pH and prevent the excessive accumulation of monovalent cations in the cells. Here we review the various cation/proton antiporters that have been described in yeast cells and their properties.

Kew words. Cation/proton antiporters, yeasts.

RESUMEN. Los intercambiadores catión/protón son proteínas membranales que se encuentran en las células eucariotes y procariotes. Estas proteínas intercambian cationes (Na^+ o K^+) por protones (H^+) a través de las membranas, tanto citoplásmica como de los organelos, relacionando al potencial electroquímico de los protones ($D\mu_{\text{H}^+}$) con el de los cationes ($D\mu_{\text{Na}^+}$ o $D\mu_{\text{K}^+}$). Los ciclos para los iones a través de la membrana, están constituidos por, la formación del gradiente electroquímico para cualquiera de los cationes, seguido por la reacción o reacciones que transportan estos iones en sentido opuesto a dicho gradiente. Por esta razón, los sistemas intercambiadores desempeñan un papel fundamental en la regulación del pH y de la concentración de cationes monovalentes en el interior celular. En esta revisión se analizan los intercambiadores catión/protón y su función en la levadura.

Palabras clave. Antiportador Catión/protón, levaduras.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas intercambiadoras catión/protón (M^+/H^+) han sido descritas en los animales, plantas y bacterias. Estas proteínas intercambian cationes (Na^+ o K^+) por protones (H^+) a través de la membrana, tanto citoplásmica como de los organelos. La presencia de estos intercambiadores fue propuesta en los años sesenta por Mitchell.²⁷ Posteriormente Mitchell y Moyle,^{28,29} y Brierley y cols.⁴ demostraron su existencia en las mitocondrias. Estos autores demostraron 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 bacterias, Harold y Papineau¹³ propusieron y demostraron una actividad similar en *Streptococcus faecalis*; posteriormente, West y Mitchell⁵⁹ también reportaron su presencia en *Escherichia coli*. Varios autores^{7,46,60} sugirieron la existencia de intercambiadores (M^+/H^+), en la membrana plasmática de las células de los organismos superiores y Mürer y cols.³² demostraron su actividad en vesículas de membrana plasmática de riñón y de intestino delgado. Los trabajos realizados con vesículas de membrana plasmática han sido

definitivos para estudiar y entender estos sistemas.

El estudio de los intercambiadores (M^+/H^+) en bacterias y organismos superiores (animales y plantas) ha sido extenso. En la actualidad se conocen muchos de los genes que codifican para estas proteínas. Se tienen modelos de su estructura, se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre su regulación, y se tiene un panorama bastante amplio de su papel fisiológico.^{6,8,21,22,37,40-43} De hecho, la información generada para los intercambiadores (M^+/H^+), tanto de bacterias como de células animales, se utiliza como marco de referencia para la identificación de sistemas similares en cualquier organismo, haciendo análisis comparativos de la estructura primaria deducida de la secuencia de nucleótidos.

La existencia de sistemas intercambiadores (M^+/H^+) en la membrana plasmática de la levadura fue propuesta en los años setenta por Rothstein,⁵³ y después por Rodríguez-Navarro y Sancho.⁵¹ Sin embargo, la mayor parte de los estudios de estos sistemas en la levadura son recientes. En esta revisión haremos un análisis de los avances y perspectivas sobre el estudio de estos sistemas en la levadura.



Flujos de iones en la levadura.

En bacterias, animales y plantas, el ciclo transmembranal de iones está constituido por dos componentes. Uno crea el gradiente electroquímico para cualquiera de los iones, utilizando las bombas primarias (H^+ -ATPasa, Na^+/K^+ -ATPasa, Na^+ -ATPasa o las cadenas transportadoras de electrones). El otro componente completa el ciclo transportando los iones a través de los sistemas secundarios (uniportadores catiónicos, simportadores catión/sustrato o intercambiadores (antiportadores M^+/H^+). Este mecanismo universal de entrada y salida de iones a través de las membranas biológicas, mantiene los movimientos de sodio y protones, permitiendo que el pH intracelular se mantenga regulado, así como la homeostasis del sodio. Por esta razón, la mayor parte de los reportes de sistemas intercambiadores los han definido como Na^+/H^+ , dada la importancia de un sistema para eliminar al sodio, tóxico para la mayoría de las células.

En la levadura, los flujos de iones están constituidos principalmente por los movimientos de protones y potasio. El ciclo para estos iones en la membrana plasmática 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.^{24,44,54} 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 la célula requiere para impulsar el transporte de iones; además, la acidificación del medio impide el crecimiento de otros microorganismos.

En contraparte al gradiente de protones, los movimientos de potasio forman parte de un sistema secundario constituido por los uniportadores de alta (Trk1) y baja (Trk2) afinidad, que acumulan potasio en el interior de la célula en contra del gradiente químico, utilizando el componente eléctrico del potencial electroquímico.^{9,20,51} También se encuentran los intercambiadores catión/protón Nha1 y Kha1^{48,50} que permiten el reingreso de los protones para mantener el pH intracelular y la salida de sodio o potasio para mantener la homeostasis de estos iones (Fig. 1).

Bioenergética y estequiometría para los flujos de iones en la membrana plasmática de la levadura

Se sabe que la H^+ -ATPasa transloca un protón por cada molécula de ATP hidrolizado.²⁴ Aunque no existe ninguna preparación de esta proteína completamente pura, se ha estimado que su actividad específica debe ser del orden de los 100 μmol de ATP hidrolizado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. A su vez, el transporte de potasio es electroforético^{9,20,51} y permite la acumulación de grandes cantidades de potasio (200 a 300 mM), aun en medios con pequeñas cantidades de este ion. Se ha propuesto que los sistemas intercambiadores pudieran participar en la regulación del pH evitando la alcalinización del interior celular.^{48,50} También se les relaciona con el mantenimiento de los niveles intracelulares de

cationes monovalentes.^{48,50} Sin embargo, no se ha podido definir cuál es la estequiometría para el intercambio de protones por cationes, debido principalmente a que no se han obtenido proteínas puras y reconstituidas en sistemas modelo. Con el desarrollo de las técnicas para la sobreexpresión de proteínas es posible que pronto se pueda lograr este objetivo.

Sistemas intercambiadores M^+/H^+ descritos en Levaduras.

A principios de los años noventa, el estudio de osmotolerancia y 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 la levadura, que permitiera entender 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, que culminaron con la identificación de intercambiadores M^+/H^+ (Tabla 1).

Utilizando levaduras transformadas con bibliotecas genómicas, Jia y cols.¹⁶ clonaron el gene *sod2* de *Schizosaccharomyces pombe*. Estos autores encontraron que en las células donde se sobreexpresó este gene, se incrementó la tolerancia a litio. La comparación de la secuencia de residuos de aminoácidos de Sod2 con otras proteínas previamente encontradas (NhaA³⁹ y NhaC¹⁵) no mostró una similitud muy alta. 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 ser un intercambiador Na^+/H^+ . Posteriormente, Prior y cols.⁴⁸ clonaron el gene *nha1* en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos autores encontraron que la sobreexpresión y la ablación de este gene, conferían fenotipos similares a los reportados para *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 *E. coli* o *S. pombe*. El alineamiento de las secuencias de Nha1 y Sod2 mostró similitud entre los residuos de aminoácidos de estas proteínas, lo cual sugería que Nha1 podría ser 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^+ . Esto 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 levadura, es la formación de vesículas de membrana plasmática descrita por Mürer y cols.³² Esta metodología consiste en aislar y re-

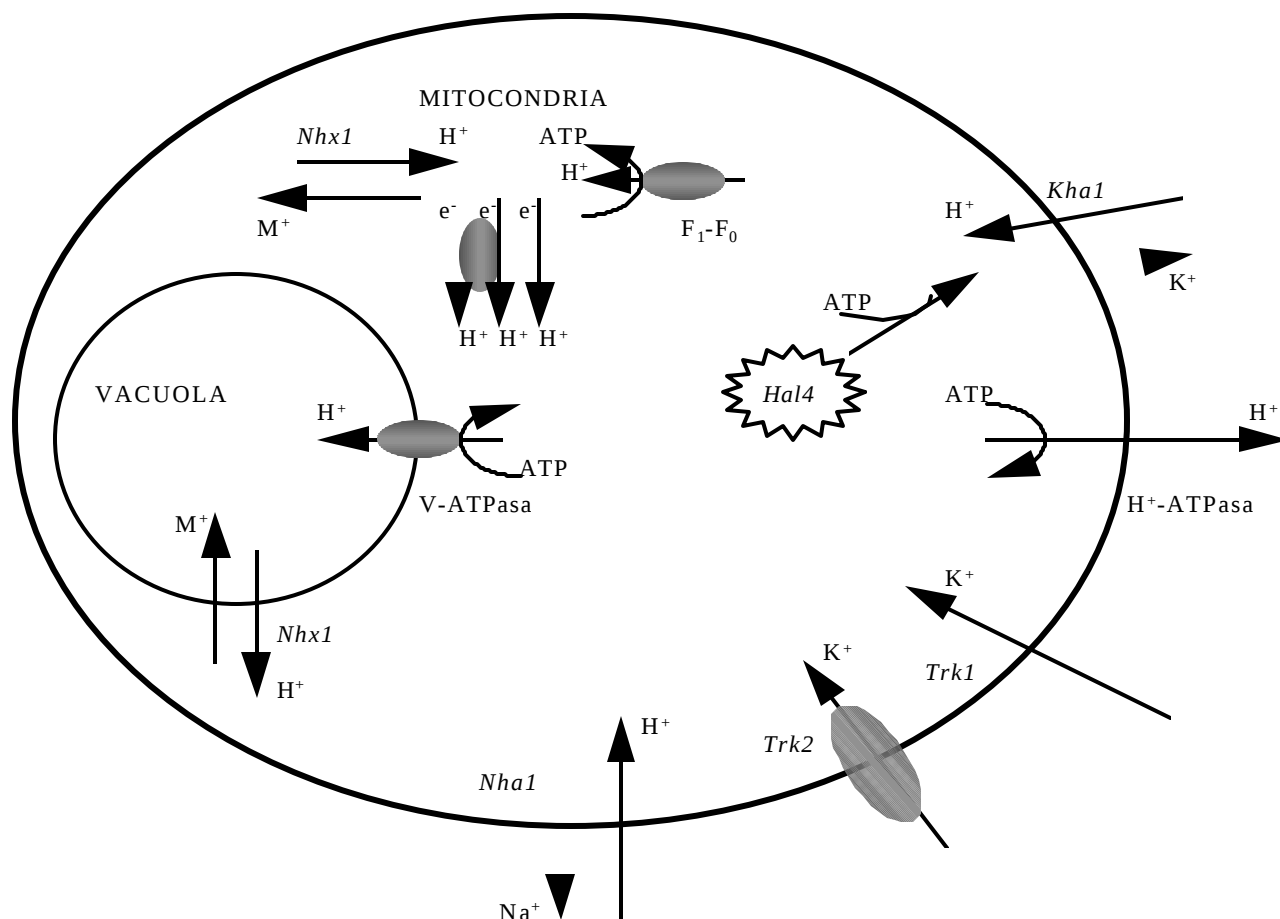


Figura 1 Representación esquemática de los principales flujos de protones (H⁺) y iones [M⁺ (K⁺, Na⁺)] y posible mecanismo de regulación del intercambiador *Kha1*.

constituir en vesículas, la membrana plasmática del organismo que se desea estudiar. En estas vesículas se puede medir 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.⁴⁵ propusieron la existencia de un intercambiador K⁺/H⁺, midiendo la acumulación de ⁸⁶Rb⁺ en vesículas de membrana plasmática de levadura, energizadas con la H⁺-ATPasa. Más adelante, Ramírez y cols.⁴⁹ y Camarasa y cols.⁵ midieron 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.¹⁹ Anteriormente se habían descrito intercambiadores K⁺/H⁺, como el Kef en *E. Coli*,³⁰ pero en

estos trabajos^{5,45,49} se demostró la presencia de un sistema de intercambio K⁺/H⁺ en la membrana plasmática de células eucariotes.

Con la liberación de la base de datos del genoma completo de la levadura⁵⁶ y el análisis realizado por Bruno André,¹ se han podido identificar únicamente tres marcos de lectura abierta de genes que pudieran codificar para intercambiadores Na⁺/H⁺ (Tabla 1). De acuerdo con la nomenclatura empleada en el proyecto del genoma de la levadura, el primero de ellos es el YLR138w, que corresponde al gene descrito por Prior y cols.⁴⁸ como *nha1*, que se menciona arriba. El segundo corresponde al marco de lectura abierta YJL094c, nombrado como *kha1*.⁵⁰ La interrupción de este último mostró un defecto en la regulación intracelular de pH, la cepa silvestre mantiene su pH cercano a 6.2, mientras que en las células con ablación de este gene el pH intracelular puede alcanzar valores hasta de 7.0. También se encontró un defecto en los niveles intracelulares de potasio, las células sin *Kha1* contienen el doble de potasio



Tabla 1. Relación de proteínas identificadas como intercambiadores catión/protón en levaduras.

Proteína	Método de identificación	Función propuesta	Referencia
Sod2	Sobreexpresión y selección de colonias resistentes a NaCl 0.5 M o LiCl 0.1 M	Na ⁺ /H ⁺	Jia y col. ¹⁶
Nha1	Sobreexpresión y selección de colonias resistentes a NaCl 0.5 M o LiCl 0.1 M	Na ⁺ /H ⁺	Prior y col. ⁴⁸
Nhx1	Homología con genes previamente descritos.	Na ⁺ /H ⁺	André, B. ¹ Nass y col. ³⁴
Kha1	Homología con genes previamente descritos.	K ⁺ /H ⁺	André, B. ¹ Ramírez y col. ⁵⁰

Nota. El gene *sod2* fue identificado en *Schizosaccharomyces pombe* y los genes *nha1*, *nhx1* y *kha1* fueron identificados en *Saccharomyces cerevisiae*. A la fecha no existen reportes de proteínas similares en otras levaduras.

que las células control. Finalmente, Kha1 tiene similitud con el intercambiador K⁺/H⁺ Kef de *E. coli*, por lo que fue clasificado como un intercambiador K⁺/H⁺.

El tercer marco de lectura abierta YDR456w corresponde al gene *nhx1*.³⁴ La interrupción de este gene provoca una pérdida de la capacidad de las células para atrapar sodio en la vacuola. La localización y función de Nhx1 no están claros. Nass y cols.³⁴ propusieron que se localiza en la vacuola, basados en la pérdida de la actividad antes mencionada. Numata y cols.³⁶ mediante inmunolocalización ubicaron la proteína en la mitocondria y la renombraron como Nha2. Finalmente, el mismo grupo de Nass y Rao,³⁵ haciendo inmunolocalización y análisis de secuencias de residuos de aminoácidos, proponen que el producto de *nhx1* pudiera estar localizado en diferentes organelos. Probablemente esta proteína (Nhx1) corresponda a la actividad encontrada por Manon y cols.²⁵ en las mitocondrias de levadura. Estos autores solubilizaron y reconstituyeron dicha actividad, proponiéndola como un intercambiador K⁺/H⁺. Es importante considerar que en un trabajo previo, se demostró en mitocondrias de hígado de rata,¹⁷ que el intercambiador localizado en estas mitocondrias no es específico y puede mover sodio o potasio con intercambio de protones.

Mediante el análisis por homología, no parecen existir en el genoma completo de la levadura más genes para proteínas intercambiadoras M⁺/H⁺.³⁸ Esto no significa que no puedan existir otros intercambiadores, sólo que ni las herramientas con las que se cuentan, ni los experimentos realizados hasta la actualidad son suficientes.

Estructura de los intercambiadores Nhx1, Nha1, y Kha1.

Utilizando los algoritmos tradicionales para la predicción de la estructura secundaria, se han elaborado modelos para las proteínas intercambiadoras en la levadura. Los modelos predicen que pueden tener al menos doce cruces

transmembranales y una estructura globular en el extremo carboxilo de la proteína.^{34,48,50} La región correspondiente a los 12 cruces transmembranales no parece ser muy diferente entre ellas; su diferencia más importante se encuentra en la longitud de la región carboxilo. Un dato interesante de estos análisis es que entre las tres proteínas existe una similitud menor al 5% en su estructura primaria, es decir, que menos del 5 % de los residuos de aminoácidos son los mismos y/o se encuentran en la misma posición. Sin embargo, de manera individual, estas proteínas muestran una similitud mayor al 25 % con proteínas intercambiadoras de otros organismos, eliminando la posibilidad de que estos genes estén duplicados y codifiquen para una misma función, como muchos otros que se han encontrado en la levadura. La diferencia en el extremo carboxilo de estas proteínas se utilizó para clasificarlas de acuerdo con su localización en la célula.³⁵ El intercambiador Nhx1 presenta un extremo carboxilo más corto y se puede agrupar con los intercambiadores asociados a organelos, que tienen un tamaño promedio de 540 a 666 residuos de aminoácidos. Los otros dos intercambiadores asociados a la membrana plasmática, Nha1 y Kha1 pertenecen a un grupo diferente, con un tamaño promedio de 717 a 832 residuos. Otros análisis,¹⁴ permiten proponer la existencia de sitios de fosforilación en el extremo carboxilo para los intercambiadores Nha1 y Kha1. Estos sitios de fosforilación permiten sugerir que la regulación tiene un papel importante en la función de estas proteínas. Desafortunadamente toda esta información se ha obtenido a partir de predicciones con algoritmos, por lo tanto, es necesario purificar estas proteínas en cantidades suficientes para hacer estudios de fosforilación, mutagénesis dirigida y cristalográficos, que permitan ratificar lo anteriormente descrito.

Función de los intercambiadores Nhx1, Nha1, y Kha1.

En cuanto a la función de estas proteínas en la fisiología de la levadura, podemos encontrar un papel indepen-

diente asociado a cada una de ellas. El intercambiador Nhx1, se describió como parte de un sistema para capturar sodio en la vacuola,³⁴ que permite a las células sobrevivir en medios con alto contenido de sodio. Sin embargo, no se menciona que la función de esta proteína esté asociada a la regulación del pH vacuolar, lo cual se esperaría para una proteína de este tipo. En cuanto a la localización de esta proteína en la célula,³⁴⁻³⁶ es posible que se encuentre también en la mitocondria, en donde se ha establecido que el pH, así como los niveles de cationes monovalentes intramitocondriales, son regulados por un intercambiador no específico^{36,58} (Fig. 1).

En el caso de Nha1, su papel fisiológico se ha definido como el de un sistema que permite a la levadura defenderse del estrés salino,^{2,48} intercambiando sodio del interior por protones del exterior, permitiendo a la célula eliminar el sodio y recircular protones para mantener el pH intracelular (Fig. 1). El producto del gene *nha1* se localizó en la membrana plasmática, por fluorescencia de un híbrido de Nha1 y la proteína fluorescente verde,¹⁸ y en condiciones normales de cultivo (libre de cualquier tipo de estrés para la célula) la expresión de *nha1* es muy baja.¹⁸ Esta proteína, al parecer pertenece a un sistema de respuesta al estrés, ya que el pH y los niveles de iones intracelulares se ven afectados sólo cuando se sobreexpresa.^{2,48} De hecho, en una célula carente de Nha1 sólo se observa una ligera modificación del pH intracelular.⁵⁷

La levadura se suele cultivar en medios ricos; estos medios contienen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales. En estas condiciones, *S. cerevisiae* es capaz de acumular potasio hasta una concentración de 200 a 300 mM y solamente de 5 a 15 mM de sodio. Esto se debe principalmente a la selectividad de los sistemas de transporte (Trk1 y Trk2), que es 5 veces mayor para potasio que para sodio.⁵¹ También se debe considerar que no se han descrito sistemas de transporte específicos para el sodio. Lo anterior hace difícil explicar o asignar una función a la existencia de intercambiadores Na^+/H^+ como los descritos por Prior y cols.⁴⁸ y Nass y cols.³⁴

En cuanto al intercambiador Kha1, se ha propuesto que participa de manera importante en la regulación del pH y los niveles de potasio intracelulares.⁵⁰ Aunque sólo se ha estudiado la interrupción del gene *kha1*, se encontró que con la pérdida de la proteína se duplica el nivel de potasio intracelular. También se encontró un aumento del pH intracelular de 0.5 a 0.8 unidades. No se sabe la localización exacta de la proteína; sólo se observó que se expresa en condiciones normales de cultivo. La interrupción de este gene también produjo cambios en el ciclo celular, así como un incremento generalizado del metabolismo, que pudieran responder a un estado de autoestrés provocado por el aumento en la concentración de potasio, así como el aumento en el pH intracelular. Se sabe que estos factores pueden modificar el ciclo celular, así como el metabolismo en general.^{3,23,47}

Dada la concentración de potasio y la magnitud del

gradiente de pH alcanzados por la levadura, la presencia de un sistema de intercambio K^+/H^+ como los descritos,^{5,45,49,50} permite explicar parcialmente la regulación del pH intracelular y la regulación de la concentración de potasio en la levadura. Sin embargo, en condiciones de estrés salino la levadura tal vez pueda expresar o utilizar un sistema de intercambio Na^+/H^+ , aunque es más factible explicar la osmotolerancia mediante el sistema de la Na^+ -ATPasa (Ena1), descrito por Haro y cols.¹²

Regulación de los intercambiadores Nhx1, Nha1, y Kha1.

Se han clonado otro tipo de genes^{10,11,55} denominados *hal* que se designan con números consecutivos del 1 al 5. Los productos de estos genes se han identificado como posibles cinasas de proteínas. Mulet y cols.³⁰ proponen que Hal4 y Hal5 regulan la actividad de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2. Masuda y cols.,²⁶ identificaron el gene *sit4* que fue descrito como una fosfatasa de proteínas. Estos autores encontraron que la sobreexpresión de Sit4 protege a las células del estrés por litio, modulando los niveles de potasio y el pH intracelular. Navarre y Goffeau,³³ publicaron que los flujos de iones en la levadura están regulados por un grupo de pequeñas proteínas hidrofóbicas (55 amino ácidos) denominadas Pmp, cuya función se desconoce. En nuestro laboratorio encontramos que una cepa carente de *hal4* presenta un fenotipo muy similar al encontrado en las cepas en donde se interrumpió *kha1* (no publicado). Esto, aunado a la propuesta de sitios de fosforilación en la extremo carboxilo de esta proteína, sugiere fuertemente que su función pudiera ser regulada por fosforilación o defosforilación (Fig. 1).

Conclusión

Aunque el estudio de los sistemas intercambiadores en la levadura es reciente, se han logrado establecer algunas de sus funciones: i) participan en la respuesta al estrés salino; ii) regulan el contenido de iones; iii) regulan el pH intracelular; y iv) posiblemente participan en la regulación del ciclo celular. Actualmente los principales esfuerzos están dirigidos a tratar de sobreexpresar estos sistemas en la levadura, lo que facilitará su purificación para hacer los estudios relacionados con la estequiometría, estructura y regulación. También se están haciendo estudios de inmunolocalización para ubicar a estas proteínas en la célula y para conocer cuales de ellas se expresan en la levadura. Nuestro grupo de investigación estudia, a través de mutaciones múltiples, la relación que pueda existir entre los diferentes sistemas involucrados en los flujos de iones en levaduras.

Referencias

1. André, B. 1995. An overview of membrane transport



- proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:1575-1611.
2. Bañuelos, M. A., H. Sychrova, C. Bleykasten-Grosshans, J. L. Souciet, and S. Potier. 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144:2749-2758.
 3. Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760-1763.
 4. Brierley, G. P. 1976. The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 10:41-63.
 5. Camarasa, C., S. Prieto, R. Ros, J. M. Salmon, and P. Barre. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K^+/H^+ -exchanger in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301-1313.
 6. Dibrov, P., and Fliegel, L. 1998. Comparative molecular analysis of Na^+/H^+ exchangers: a unified model for Na^+/H^+ antiport? *FEBS Lett.* 424:1-5.
 7. Emilio M.G., and H. P. Menano. 1975. The excretion of hydrogen ion by the isolated amphibian skin: effects of antidiuretic hormone and amiloride. *Biochim. Biophys. Acta* 382:344-352.
 8. Fliegel, L., and O. Fröhlich. 1993. The Na^+/H^+ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem. J.* 296:273-285.
 9. Gaber, R. F., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:2848-2859.
 10. Gaxiola, R., I. F. Larrinoa, J. M. Villalba, and R. Serrano. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11:3157-3164.
 11. Glaser, H. U., D. Thomas, R. Gaxiola, F. Montrichard, Y. Surdin-Kerjan, and R. Serrano. 1993. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12:3105-3110.
 12. Haro, R., B. Garciadeblas, and A. Rodríguez-Navarro. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291:189-191.
 13. Harold, F. M., and D. Papineau. 1972. Cation transport and electrogenesis II proton and sodium extrusion. *J. Membrane Biol.* 8:45-62.
 14. <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
 15. Ivey, D. M., A. A. Guffanti, J. S. Bossewitch, E. Padan, and T. A. Krulwich. 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 Na^+/H^+ antiporter gene. *J. Biol. Chem.* 266:23483-23489.
 16. Jia, Z. P., N. McCullough, R. Martel, S. Hemmingsen, and P. G. Young. 1992. Gene amplification at a locus encoding a putative Na^+/H^+ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J.* 11:1631-1640.
 17. Kakar, S. S., F. Mahdi, X. Li, and K. D. Garlid. 1989. Reconstitution of the mitochondrial non-selective Na^+/H^+ (K^+/H^+) antiporter into proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 264:5846-5851.
 18. Kinclová, O., S. Potier, and H. Sychrová. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane antiporter Nha1. 18th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. Ouro Preto, Brasil; 14 al 17 de septiembre de 2000.
 19. Kleyman, T. R., C. Asher, E. J. Jr. Cragoe, and H. Garty. 1987. Effects of amiloride analogues on Na^+ transport in toad bladder membrane vesicles. Evidence for two electrogenic transporters with different affinities toward pyrazinecarboxamides. *J. Biol. Chem.* Jun 262:8566-73.
 20. Ko, C. H., and R. F. Gaber. 1991. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K^+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11:4266-4273.
 21. Krulwich T. A. 1983. Na^+/H^+ antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* 726:254-264.
 22. Maathuis F. J. M., and D. Sanders. 1992. Plant membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:661-669.
 23. Marshall, C. J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4:82-89.
 24. Malpartida, F., and R. Serrano. 1981. Proton translocation catalyzed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomes. *FEBS Lett.* 131:351-354.
 25. Manon, S., and M. Guérin. 1992. K^+/H^+ exchange in yeast mitochondria: sensitivity to inhibitors, solubilization and reconstitution of the activity in proteoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1108:169-176.
 26. Masuda C. A., J. Ramírez, A. Peña, and M. Montero-Lomeli. 2000. Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the SER-THR protein phosphatase SIT4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275:30957-30961.
 27. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148.
 28. Mitchell, P., and J. Moyle. 1967. Acid-base titration across the membrane system of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 105:1147-1162.
 29. Mitchell, P., and J. Moyle. 1969. Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 9:149-155.
 30. Munro, A. W., G. Y. Ritchi, A. J. Lamb, R. M. Douglas, and I. R. Booth. 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.
 31. Mulet, J. M., M. P. Leube, S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano. 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.
32. Mürer, H., V. Hopfer, and R. Kinne. 1976. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles is isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J.* 154:597-604.
 33. Navarre, C., and A. Goffeau. 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.
 34. Nass, R., K. W. Cunningham, and R. Rao. 1997. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast enhanced by mutations in the plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:26145-26152.
 35. Nass, R., and R. Rao. 1998. Novel localization of a Na^+/H^+ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *J. Biol. Chem.* 273:21054-21060.
 36. Numata, M., N. L. Petrecca, and J. Orlowski. 1998. Identification of a mitochondrial Na^+/H^+ exchanger. *J. Biol. Chem.* 273:6951-6959.
 37. Orlowski, J., and S. Grinstein. 1997. Na^+/H^+ exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272:22373-22376.
 38. Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski, B. Nelissen, A. Goffeau, and M. H. Saier. 1998. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 430:116-125.
 39. Padan, E., N. Maisler, D. Taglicht, R. Karpel, and S. Schuldiner. 1989. Deletion of *ant* in *E. coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na^+/H^+ antiporter system(s). *J. Biol. Chem.* 264:20297-30302.
 40. Padan, E., and S. Schuldiner. 1993. Na^+/H^+ antiporters, molecular devices that couple the Na^+ and H^+ circulation in cells. *J. Bioener. Biomem.* 25:647-669.
 41. Padan, E., and S. Schuldiner. 1994. Molecular physiology of Na^+/H^+ antiporters, key transporters in circulation of Na^+ and H^+ in cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1185:129-151.
 42. Padan, E., and S. Schuldiner. 1994. Molecular physiology of the Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli*. *J. Exp. Biol.* 196:443-456.
 43. Padan, E., D. Zilberstein, and S. Schuldiner. 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 650:151-166.
 44. Peña, A., G. Cinco, 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.
 45. Peña, A., and J. Ramírez. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1068:237-244.
 46. Pitts R. F. 1966. The renal metabolism of ammonia. *Physiologist* 9:97-109.
 47. Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai, and H. Saito. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorylation mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "Two-component" osmosensor. *Cell* 86:865-875.
 48. Prior, C., S. Potier, J. L. Souciet, and H. Sychrova. 1996. Characterization of the NHA1 gene encoding a Na^+/H^+ antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387:89-93.
 49. Ramírez, J., A. Peña, and M. Montero-Lomelí. 1996. H^+/K^+ exchanger in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1285:175-182.
 50. Ramírez, J., O. Ramírez, C. Saldaña, R. Coria, and A. Peña. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K^+/H^+ exchanger. *J. Bacteriol.* 180:5860-5865.
 51. Rodríguez-Navarro, A., and J. Ramos. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159:940-945.
 52. Rodríguez-Navarro, A., and E. D. Sancho. 1979. Cation exchanges of yeast in the absence of magnesium. *Biochim. Biophys. Acta* 552:322-330.
 53. Rothstein, A. 1974. Relationship of cation influxes and effluxes in yeast. *J. Gen. Physiol.* 64:608-621.
 54. Serrano, R., M. C. Kielland-Brandt, and G. R. Fink. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na^+/K^+), K^+ - and Ca^{2+} -ATPases. *Nature* 319:689-693.
 55. Serrano, R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense mechanisms. *Int. Rev. Cytol.* 165:1-52.
 56. Supplement to Nature (1997) 387:issue No. 6632S.
 57. Sychrova, H., J. Ramírez, and A. Peña. 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 171:167-172.
 58. Welihinda, A. A., R. J. Trumbly, K. D. Garlid, and A. D. Beavis. 1993. On the regulation of Na^+/H^+ and K^+/H^+ antiport in yeast mitochondria: evidence for the absence of an Na^+ -selective Na^+/H^+ antiporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1144:367-373.
 59. West, I. C., and P. Mitchell. 1974. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 144:87-90.
 60. Whitlock, R.T., and H. O. Wheeler. 1969. Hydrogen ion transport by isolated rabbit gallbladder. *Am. J. Physiol.* 217:310-316.