

**Análisis de la función del
antiportador Nha1 en la progresión
del ciclo celular en *Saccharomyces
cerevisiae*.**

Tesis Doctoral presentada por Ernesto Simón Vecilla
en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de
la Universitat Autònoma de Barcelona.
Julio de 2003.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer su apoyo, esfuerzo y dedicación a las siguientes personas que han compartido conmigo generosamente su tiempo y conocimientos y a quienes debo todo lo que he aprendido en estos comienzos dedicados a la investigación:

Al Dr. Joaquín Ariño por haberme acogido en su grupo, por su eficiente labor de dirección, por las horas dedicadas y, sobre todo, por intentar enseñarme a ser un científico.

Al Dr. Josep Clotet por enseñarme a desenvolverme en el laboratorio, por sus ideas, su trabajo y sobre todo por haberme dado confianza en mi mismo.

A los compañeros del V0 181. A los que ya se fueron: Cesc, Laia, Néstor, Hajji, Susana y Mireia, a los que pasaron por aquí: Emili, Josep y Anna, a los que (quizá) vendrán: Esther, Martí y Asier, a las que acaban de llegar: María y Maribel y, sobre todo, a los que más han compartido conmigo las horas en el laboratorio, las penas y las alegrías: Raquel, Amparo e Ivan.

A las "niñas" del servicio de secuenciación: Anna y Laia

A los compañeros de los otros laboratorios de la unidad: las "Basolas", las "Quintanillas" y los "Fátimos".

A mi madre, por depositar en mi tanta confianza.

A Magda, por ayudarme a poner puntos de vez en cuando, por estar a mi lado cada día, por escuchar mis quejas, por alentarme cuando mi ánimo fallaba y por todo lo demás...

El presente trabajo se ha beneficiado, además, de la cooperación de diversos científicos. Por ello deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Ramos por las mediciones del transporte de sodio y potasio, a la Dra. Bañuelos por cedernos las cepas G19 y B31, así como la construcción pCSCY, al Dr. Piña por el plásmido pDB20LBgIII, al Dr. Rodríguez-Navarro por el *cassette* de interrupción de *NHAI* y al Dr. Querol por su colaboración en la evaluación de la posible localización celular de la proteína.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	6
1) Conceptos básicos sobre el ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	7
2) Papel de las fosfatasa de <i>S. cerevisiae</i> en la regulación del ciclo celular.	9
2.1) La fosfatasa Sit4 es un elemento positivo importante en la transición G1/S.	10
2.2) El tándem Ppz1-Hal3 constituye un elemento importante en la regulación del ciclo celular.	12
2.2.1. Las fosfatasas Ppz1 y Ppz2.	12
2.2.2. La proteína reguladora Hal3/Sis2.	15
3) Sistemas de transporte involucrados en la homeostasis salina.	17
3.1. Importancia de los sistemas de entrada y salida de iones.	17
3.2. Sistemas de entrada de cationes monovalentes al medio citoplasmático.	18
3.2.1. El principal sistema de entrada de potasio: las proteínas Trk1 y Trk2.	18
3.2.2. La entrada de sodio y litio al interior celular.	19
3.3. Sistemas de salida de cationes monovalentes al medio extracelular.	20
3.3.1. El sistema principal de salida de sodio y litio: la ATPasa Ena1.	20
3.3.2. Sistemas secundarios de salida de cationes monovalentes: Nha1 y otros antiportadores catión/protón.	22
3.3.3. El canal Tok1 constituye un tercer sistema de salida de cationes monovalentes.	25
4) Resumen de los objetivos y los avances de este trabajo.	26
<u>II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	27
1) Identificación de Nha1 como elemento positivo en la transición G1/S del ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i>.	28
1.1. Construcción de la cepa JC002 y análisis de su validez como modelo para un bloqueo condicional en la fase G1.	28
1.2. Realización del <i>screening</i> funcional para la identificación de genes de <i>S. cerevisiae</i> que intervienen positivamente en la transición G1/S.	29
1.3. Identificación de <i>NHA1</i> como un supresor del bloqueo en la fase G1 del doble mutante <i>sit4 hal3</i> .	31

2)	Análisis de la relación entre la actividad de Nha1 como transportador de cationes y como elemento regulador del ciclo celular.	32
2.1.	Otros transportadores involucrados en la detoxificación de sodio no pueden reemplazar a Nha1 como reguladores de la transición G1/S.	32
2.2.	La capacidad detoxificadora de sodio de Nha1 no es necesaria para su función en el ciclo celular.	34
2.3.	La región carboxi-terminal de Nha1 es imprescindible para su función en el ciclo celular.	35
2.4.	La región carboxi-terminal de Nha1 contiene elementos importantes para su actividad como transportador de potasio.	37
2.5.	Un antiportador activo en el transporte de potasio es incapaz de mimetizar el efecto de Nha1 en el ciclo celular.	39
3)	Caracterización y estudio de elementos carboxi-terminales de Nha1 imprescindibles para su actividad como regulador de ciclo.	41
3.1.	La mitad carboxi-terminal de Nha1 es necesaria pero no suficiente para su función en ciclo celular.	41
3.2.	Elementos de la mitad amino-terminal de Nha1 ausentes en Sod2 son necesarios para su funcionalidad en el ciclo celular y para su actividad como transportador de potasio.	42
3.3.	Dominios repartidos entre los residuos 800 y 954 de Nha1 son importantes para su efecto en ciclo celular y su actividad detoxificadora de cationes.	43
3.4.	Reflexiones sobre el papel regulador del extremo carboxi-terminal de Nha1.	47
	III. CONCLUSIONES	50
	<u>IV. BIBLIOGRAFÍA</u>	53
	<u>V. ARTÍCULOS PRESENTADOS</u>	65

Simón, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., and Ariño, J. (2001). A Screening for High Copy Suppressors of the *sit4 hal3* Synthetically Lethal Phenotype Reveals a Role for the Yeast Nha1 Antiporter in Cell Cycle Regulation. *J. Biol. Chem.* **276**:29740-29747.

Simón, E., Barceló, A., and Ariño, J. (2003). Mutagenesis analysis of the Nha1 carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Letters* **545**:239-245.

I - Introducción

1) Conceptos básicos sobre el ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*:

El ciclo celular eucariota se compone de dos fases principales en las que se duplica el contenido cromosómico (fase S) y se produce la división celular o mitosis (fase M), separadas por otras dos fases intermedias o *Gaps* (G1 y G2). Durante la fase G1 (previa a la fase S) se produce la síntesis de nuevas proteínas y se inicia un aumento del tamaño de la célula. La fase G2, tiene lugar después de la síntesis de ADN y, durante este periodo, la célula se prepara para la mitosis que cierra el ciclo G1-S-G2-M. La regulación de este ciclo es un proceso complejo que incluye dos puntos de control principales; uno en la transición G1/S, donde se determina si tendrá lugar replicación del ADN, y otro en la transición G2/M, donde se determina si habrá entrada en mitosis (Chen y col. 2000, para una revisión ver Tyson y col. 2002).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* regula la duración de su ciclo celular principalmente en el punto de control de la transición G1/S (llamado *Start*). Durante este período las células integran señales externas del medio y, en condiciones favorables, crecen hasta un determinado volumen e inician la formación de gemas, la replicación del ADN y la duplicación de los centríolos. Después, durante la fase S, la célula haploide duplica el ADN cromosómico, pasando de un contenido 1C a 2C, a la vez que se produce un aumento de tamaño de la gema. El ciclo celular prosigue hasta desencadenar los procesos de mitosis y citocinesis dando lugar a dos nuevas células, réplicas de la célula original y a una nueva ronda del ciclo celular (Nasmyth 1993, Mendenhall y Hodge 1998).

El elemento coordinador de los principales eventos del ciclo celular de *S. cerevisiae* es Cdc28, una proteína quinasa dependiente de ciclinas (CDK). La expresión de Cdc28 es estable a lo largo del ciclo, por lo que la regulación de su actividad depende del tipo de ciclinas con las que se encuentre asociada en cada fase. Estas ciclinas, de expresión variable durante el ciclo, pueden clasificarse en dos grupos: las ciclinas de fase G1 (Cln1-3), y las ciclinas de tipo B (Clb1-6) (Mendenhall y Hodge 1998). En asociación con Cdc28, las ciclinas Cln1 y Cln2 juegan un papel principal en la gemación y en la duplicación de los centríolos. Cln3 se encarga de determinar si la célula ha alcanzado el tamaño necesario para

que se ejecute *Start*. Clb5 y Clb6 son esenciales para la oportuna duplicación del ADN. Clb3 y Clb4 parecen ayudar en la replicación y en la formación de los centriolos, mientras que Clb1 y Clb2 son necesarias para una correcta finalización de la mitosis. Las funciones reguladoras de estas ciclinas se solapan, en cierto modo, las unas con las otras. De hecho, los mutantes simples son viables y, salvo en el caso del mutante *cln3*, presentan un crecimiento sin complicaciones (Chen y col. 2000).

La transición G1/S depende, además de la actividad quinasa de Cdc28 asociada a las ciclinas de fase G1, de la activación de los factores transcripcionales SBF (compuesto por Swi4 y Swi6) y MBF (compuesto por Swi6 y Mbp1). Estos factores transcripcionales son responsables de la inducción de la transcripción de genes de forma específica durante la fase G1, incluyendo elementos necesarios para emergencia de la gema y la síntesis de ADN, como ciclinas de fase G1 (*CLN1*, *CLN2*) (Nasmyth y Dirick 1991, Wittenberg y col. 1990) o ciclinas de tipo B (como *CLB5*, *CLB6*) (Kuhne y Linder 1993, Schwob y Nasmyth 1993).

Además de factores transcripcionales, existen otros elementos que regulan la expresión de genes durante G1. Aunque el modo en que realizan esta función no está bien definido, estos elementos modularían la actividad de SBF y MBF o actuarían en paralelo con estos factores de transcripción. Algunos de ellos, como Cln3 (Levine y col. 1996) o Bck2 (Di Como y col. 1995a, Epstein y Cross 1994) son capaces de inducir la expresión de *CLN1* y *CLN2*, acelerando el paso a través de *Start*. Cln3 requiere de Swi6 (y, por tanto, de SBF y MBF) para ejercer sus funciones. Además, se ha descrito que el complejo Cln3-Cdc28 actuaría activando de alguna manera indirecta los factores transcripcionales SBF y MBF (Wijnen y col. 2002). La función de Bck2 también depende parcialmente de SBF y MBF y, al contrario que Cln3, es capaz de inducir sus dianas transcripcionales aun en ausencia de Cdc28 (Wijnen y Futcher 1999). Como veremos más adelante, el producto del gen *HAL3/SIS2* (Di Como y col. 1995b), al igual que la fosfatasa Sit4 (Sutton y col. 1991, Fernandez-Sarabia y col. 1992), intervendrían también de forma positiva en esta progresión entre las fases G1 y S. Parte del efecto de Sit4 podría venir mediado por Bck2 (Di Como y col. 1995a).

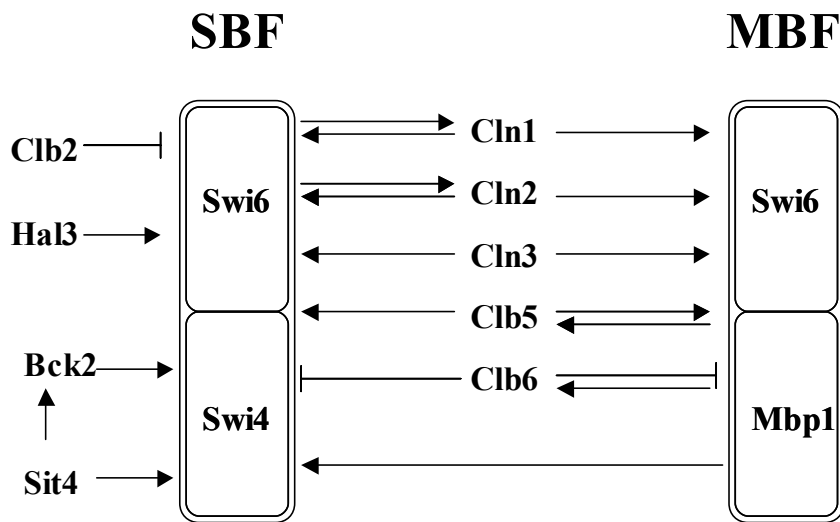


Fig. 1: Relaciones entre algunos genes transcritos en Start y sus reguladores. Adaptado de Mendenhall y Hodge 1998

2) Papel de las fosfatasa de *S. cerevisiae* en la regulación del ciclo celular.

La fosforilación reversible de proteínas es el principal mecanismo de regulación para la mayoría de funciones celulares, incluyendo la señalización celular, la regulación de la expresión génica y la mitosis (Stark 1996, Cohen 1997). El estado de fosforilación de las proteínas es un proceso dinámico controlado por las proteína quinasas y las proteína fosfatasa. Mientras que las primeras son las encargadas de añadir fosfatos en ciertos residuos fosforilables de las proteínas (normalmente serina, treonina o tirosina), las fosfatasa catalizan la reacción inversa: la desfosforilación.

En la levadura *S. cerevisiae* el número de fosfatasa (32) es más que triplicado por el número de quinasas (113) (Stark 1996, Hunter y Plowman 1997). Esta diferencia de número da idea de la multifuncionalidad y complejidad de las fosfatasa, que, históricamente, se han agrupado en familias y subfamilias según su estructura y función. Algunas de estas fosfatasa intervienen de manera importante en el control del ciclo celular.

Dentro de las fosfatasa que actúan sobre residuos fosforilados de serina o treonina, la subfamilia PP1 agrupa, entre otras, la proteína Glc7 y algunas proteínas relacionadas, como Ppz1 y Ppz2. Mientras que Glc7 interviene positivamente en la transición G2/M y en la meiosis (Andrews y Stark. 2000, Tu y col. 1996), las fosfatasa Ppz1 y Ppz2 intervienen negativamente en las primeras fases del ciclo (Clotet y col. 1996, De Nadal y col. 1998, Clotet y col. 1999). La PP2A es una subfamilia de fosfatasa, estructuralmente relacionadas con las PP1, donde se pueden incluir Sit4, Pph3 y las proteínas homólogas Pph21 y Pph22 (Stark 1996, para revisión ver Ariño 2002). La disrupción de *PPH21* o *PPH22* por separado no provoca ningún fenotipo observable, mientras que la delección conjunta de los dos genes conduce a un grave defecto de crecimiento por un bloqueo de las células en G2 y resulta letal en ausencia de Pph3 funcional (Evans y Stark 1997, Ronne y col. 1991). De hecho, se ha demostrado un papel importante de estas proteínas en el control de la morfogénesis y de la mitosis (Evans y Stark 1997, Janssens y Goris 2001). La fosfatasa Sit4, entre otras funciones, resulta imprescindible para el mantenimiento de unos niveles adecuados de las ciclinas necesarias en la transición G1/S (Fernandez-Sarabia y col. 1992). Las proteínas Ptc2 y Ptc3 pertenecen a una tercera subfamilia de serín/treonín fosfatasa, la PP2C, no relacionada estructuralmente con las anteriores y son las responsables principales de la inactivación de Cdc28 por desfosforilación (Cheng y col. 1999).

2.1) La fosfatasa Sit4 es un elemento positivo importante en la transición G1/S.

Uno de los factores que controlan el progreso del ciclo celular es la proteína codificada por el gen *SIT4*. Sit4 es una Ser/Thr proteína fosfatasa relacionada con la subfamilia PP2A que ha sido descrita como la homóloga, en *S. cerevisiae*, de la Ppe1 de *S. pombe*, la PPV de *Drosophila* y la PP6 humana (Shimanuki y col. 1993, Bastians y Ponstingl 1996, Mann y col. 1993).

La delección de *SIT4* puede resultar letal para la levadura dependiendo del alelo presente en el locus polimórfico *SSD1*. En ausencia de Ssd1 o en cepas con el alelo llamado *ssd1-d*, la delección de *SIT4* resulta fatal. Sin embargo, en cepas *SSD1-v* la eliminación de la fosfatasa

no causa la muerte de las células, pese a conferir un fenotipo de crecimiento lento debido a un alargamiento de la fase G1 (Sutton y col. 1991), que se agrava a altas temperaturas de cultivo.

La fosfatasa Sit4 es necesaria en el progreso desde la fase G1 hacia la fase S y para una síntesis eficiente de ADN (Sutton y col. 1991). Probablemente dicha actuación es ejercida mediante el control de la expresión de *SWI4* (uno de los dos componentes del factor transcripcional SBF) y, en parte, viene mediada por la actuación de Bck2, proteína necesaria para una correcta activación de los genes que codifican las ciclinas de fase G1 Cln1 y Cln2 (Fernandez-Sarabia y col. 1992; Di Como y col. 1995a). El incremento en la expresión de estas ciclinas atribuible a Sit4 viene producido por una vía aditiva a la de Cln3, que también juega un papel principal en la activación de la transcripción de *CLN1* y *CLN2* (Fernandez-Sarabia y col. 1992).

Como ya se ha comentado previamente, el mutante *sit4* presenta, dependiendo del fondo genético, un fenotipo de letalidad o de crecimiento lento. Este fenotipo de crecimiento lento se aprecia mejor tras una parada del ciclo celular con factor α , mediante la cual todas las células se sincronizan en la fase G1. Tras la retirada de la feromona, las células *sit4* salen muy lentamente del bloqueo, presentando unos bajos índices de gemación, y un retraso en la aparición de ciclinas, ambos fenómenos característicos de alteraciones en la fase G1 (Sutton y col. 1991, Fernández-Sarabia y col. 1992, Di Como y col. 1995b, Clotet y col. 1999).

Sit4, además de intervenir en la regulación del ciclo celular, ha sido relacionada con múltiples funciones, como el control del metabolismo del glucógeno, ya que el mutante *sit4* presenta una acumulación alterada de este polisacárido (Posas y col. 1991). La proteína Sit4 también está involucrada en la regulación de la homeostasis de iones monovalentes, como se desprende del hecho que la sobreexpresión de la fosfatasa provoca tolerancia a litio cuando se utiliza galactosa como fuente de carbono, incrementa la salida de potasio en respuesta a estrés por litio y sodio y alcaliniza el medio interno (Masuda y col. 2000). Finalmente, Sit4 también se ha relacionado con la regulación de las vías de integridad celular, modulando la vía Pkc1/MAPK (De la Torre-Ruiz y col. 2002). Estos autores indican también que parte de los efectos de Sit4 en el ciclo celular podrían venir a través de esta regulación negativa de la actividad de Pkc1, lo que relacionaría estos dos efectos de la fosfatasa.

La fosfatasa Sit4 se asocia de manera dependiente a la fase del ciclo celular con una serie de proteínas denominadas SAP (proteínas asociadas a Sit4), que ejercen un efecto positivo sobre la funcionalidad de la fosfatasa (Luke y col. 1996). De una manera independiente de las SAP, Sit4 se asocia con la proteína esencial Tap42, lo que relaciona a la fosfatasa con una vía que integra la sensibilidad a nutrientes y el crecimiento celular (Jiang y Broach 1999, Beck y Hall 1999). Recientemente se ha descrito que Sit4 interacciona con Rrd1 y Rrd2, proteínas involucradas en la regulación de las funciones tanto de Sit4 como de otras PP2A y cuya delección conjunta resulta en un fenotipo de letalidad (Mitchell y Sprague 2001, Van Hoof y col. 2000, Rempola y col. 2000).

2.2) El tándem Ppz1-Hal3 constituye un elemento importante en la regulación del ciclo celular.

2.2.1) Las fosfatasas Ppz1 y Ppz2.

Ppz1 y su homóloga Ppz2 son Ser/Thr fosfatasas con homólogos en *N. crassa*, y en *S. pombe* (Balcells y col. 1997; Szöör, y col. 1998). Estas proteínas se componen de dos mitades bien diferenciadas (ver fig. 2). Las mitades amino-terminales, de carácter básico, están poco conservadas, mientras que las mitades carboxi-terminales presentan una gran similitud entre sí (93% de identidad) y con la subunidad catalítica de Glc7, la PP1 de *S. cerevisiae* (alrededor de un 60%) (Clotet y col. 1996). Estos aproximadamente 300 residuos carboxi-terminales contienen los dominios catalíticos necesarios para la función fosfatasa de las proteínas (para una revisión ver Ariño 2002).

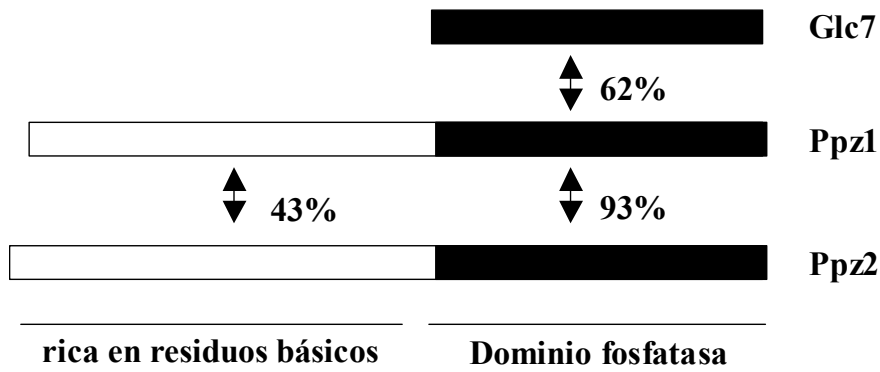


Fig. 2: Esquema comparativo de las fosfatasas Ppz1, Ppz2 y Glc7.

La sobreexpresión de *PPZI* conduce a un fenotipo de crecimiento lento con un mayor número de células sin gema, indicador de una fase G1 más larga (Clotet y col. 1996, Clotet y col. 1999). En cambio, la delección de este gen en un mutante *sit4* produce un incremento de los niveles de ciclinas y acelera la entrada en la transición G1/S, a la vez que mejora también la recuperación del crecimiento tras un bloqueo en ciclo inducido por feromonas (Clotet y col. 1999). De estos datos se deduce que Ppz1 juega un importante papel en la regulación del ciclo celular de *S. cerevisiae* y lo hace de forma negativa para el progreso del ciclo, de manera opuesta a Sit4 (Clotet y col. 1999). Recientemente se ha observado que la delección conjunta de *PPZI* y *PPZ2* en un fondo silvestre también provoca una aceleración de la salida del bloqueo producido por factor α , y que esta aceleración necesita la presencia de los genes *TRK1* y *TRK2* (Yenush y col. 2002).

Ppz1 parece tener un papel importante más allá de su efecto sobre la regulación del ciclo celular, ya que la sobreexpresión o la carencia de esta proteína presenta una gran variedad de efectos. Mientras que la delección de *PPZ2* en una cepa silvestre no produce un fenotipo apreciable, la delección de *PPZI* presenta un fenotipo lítico que se muestra aditivo al efecto de la delección del gen que codifica la proteína MAP quinasa Sit2/Mpk1, y este fenotipo es agravado por la delección de *PPZ2* (Posas y col. 1993, Lee y col. 1993). La proteína Mpk1 es fosforilada y activada en respuesta a estrés en la pared celular. De hecho, Sit4 y Ppz1 podrían estar actuando de manera opuesta en el mantenimiento de la pared celular, ya que, mientras la delección de *PPZI* produce un fenotipo lítico similar al del mutante *mpk1*, la delección de

SIT4 produce un incremento en la fosforilación y activación de la MAP quinasa (De la Torre-Ruiz y col. 2002).

Otro fenotipo interesante que provoca la delección de *PPZ1*, incrementado por la delección de *PPZ2*, es una hipertolerancia a Na^+ y Li^+ . Esta tolerancia vendría mediada, en parte, por un aumento en la expresión del gen *ENAI* (Posas y col. 1995), que codifica la principal bomba expulsora de sodio en *S. cerevisiae* (Haro y col. 1991; Haro y col. 1993; Márquez y Serrano 1996). *Ppz1* es un regulador negativo de la transcripción de *ENAI*. En condiciones normales, los niveles de RNAm de *ENAI* resultan prácticamente indetectables, mientras que aumentan considerablemente en condiciones de estrés salino, sobre todo en ausencia de *PPZ1* y *PPZ2* (Posas y col. 1995). Parte de la halotolerancia producida por la delección de las fosfatasas es independiente de la presencia de *Ena1* y podría venir mediada por un incremento en la actividad de los transportadores de potasio *Trk1* y *Trk2*, ya que *Ppz1* y *Ppz2* parecen actuar negativamente sobre este sistema (Yenush y col. 2002). El incremento de la actividad de los transportadores de potasio *Trk1* y *Trk2* conlleva un aumento en la concentración intracelular de este catión, lo que permite una mejor adaptación de la célula, independiente de *Ena1*, ante un exceso de sodio en el medio (Gómez y col. 1996, Yenush y col. 2002). Por otro lado, el aumento en la internalización de cationes K^+ produce una alteración en el potencial de membrana y esta alteración provoca a su vez, de manera compensatoria, una cierta alcalinización intracelular, que podría ser capaz de inducir la transcripción de la *ENAI*. Sin embargo, el efecto de la delección de las fosfatasas en el aumento de la tolerancia salina y de la expresión de *ENAI* no debe ser totalmente dependiente de los transportadores de potasio, ya que, en ausencia de éstos, todavía observamos un cierto fenotipo de halotolerancia (Yenush y col. 2002). Datos recientes de nuestro grupo investigador indican que la mayor expresión de *ENAI*, respecto a la cepa silvestre, del mutante *ppz1* es dependiente de la vía de señalización calcineurina-Crz1 e independiente de la alcalinización intracelular. Sin embargo, en el doble mutante *ppz1 ppz2*, el incremento de expresión de *ENAI* es mayor, y parte de este incremento sí es debido a un aumento del pH citoplasmático (Ruiz y col. 2003).

2.2.2) La proteína reguladora Hal3/Sis2.

El producto del gen *HAL3/SIS2* es una proteína de 562 residuos que presenta una región carboxi-terminal extremadamente ácida y que parece actuar de manera paralela a Sit4 en la regulación del ciclo celular. En los mutantes *sit4* la expresión de *SWI4*, *CLN1*, *CLN2* y *CLB5* se encuentra a niveles muy bajos, pero la sobreexpresión del gen *HAL3/SIS2* es capaz tanto de incrementar el nivel de expresión de estos genes como de acelerar el crecimiento lento característico de este mutante (Di Como y col. 1995b). De igual forma, la sobreexpresión de este gen en un mutante *sit4* también provoca una aceleración en la salida del bloqueo en fase G1 producido por la adición de factor α (Clotet y col. 1999). La capacidad de Hal3/Sis2 para acelerar la superación del bloqueo en G1 producido por esta feromona es dependiente de la presencia de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 (Yenush y col. 2002). Además, la delección de *HAL3/SIS2* en un fondo carente de *SIT4* resulta letal, lo que apunta un papel importante de este gen en la regulación de la transición G1/S.

En un estudio independiente, el gen *SIS2* fue identificado con el nombre de *HAL3* por su capacidad de conferir halotolerancia cuando se hallaba en sobreexpresión (Ferrando y col. 1995). Mientras que la delección de *HAL3* no causa ningún defecto de crecimiento en condiciones normales, origina problemas para crecer en presencia de sodio y litio porque, en respuesta a estrés salino, en estos mutantes no se expresa suficientemente el gen *ENAI* (Ferrando y col. 1995). Recientemente, se han descrito efectos de la sobreexpresión de *HAL3* en tolerancia a sodio y litio independientes de *ENAI* que, como en el caso de los mutantes *ppz*, necesitan de la presencia de Trk1 y Trk2 (Yenush y col. 2002).

La identificación del fenotipo salino conferido por la sobreexpresión de *HAL3*, similar al del mutante *ppz1*, fue un hecho determinante que permitió hallar una relación entre la fosfatasa Ppz1 y el producto del gen *HAL3/SIS2*. Además, la delección de *HAL3* produce un fenotipo de sensibilidad a LiCl que es dependiente de la presencia de *PPZ1* (De Nadal y col. 1998). Asimismo, la relación entre Hal3 y Ppz1 parece extenderse a otras funciones de la fosfatasa ya que la sobreexpresión de *HAL3* en un mutante *mpk1* agrava su fenotipo lítico, de manera similar al efecto producido por la delección de *PPZ1* en este mutante (De Nadal y col.

1998). De hecho, Hal3 actúa como una subunidad reguladora negativa, interaccionando con el dominio catalítico de Ppz1 y regulando así su actividad (De Nadal y col. 1998).

Analizando los papeles de Hal3 y Ppz1 como elementos reguladores del ciclo celular, también encontramos fenotipos opuestos al comparar la sobreexpresión, o las cepas mutantes, de ambos genes. El defecto de crecimiento inducido por la sobreexpresión de *PPZ1* es suprimido completamente con la sobreexpresión de *HAL3* (De Nadal y col. 1998), mientras que la delección del gen *PPZ1* suprime el fenotipo de letalidad sintética del doble mutante *hal3 sit4* (Clotet y col. 1999), lo que indica que las funciones de Hal3 necesarias para la viabilidad en ausencia de *SIT4* están mediadas por Ppz1. Otra evidencia de la interacción entre Hal3 y Ppz1 y el papel de éstas en ciclo celular, es el hecho, observado anteriormente, de que altos niveles de Hal3, al igual que la delección de *PPZ1*, son capaces de aumentar la expresión de algunas ciclinas de fase G1 de forma paralela a Sit4 y suprimir parcialmente el fenotipo de crecimiento lento producido por la carencia de esta fosfatasa (Di Como y col. 1995b, Clotet y col. 1999).

El conjunto de fenotipos presentados indica que la inhibición de la actividad Ppz1 por parte de Hal3 se manifiesta en la mayoría, si no todas, las funciones de la fosfatasa. Asimismo, observamos que los efectos de Hal3, tanto en la regulación del ciclo celular como en la tolerancia a Na^+ y Li^+ vienen mediados por la proteína Ppz1 y que los efectos de esta fosfatasa en la regulación del ciclo celular son opuestos a los de Sit4 (ver fig. 3).

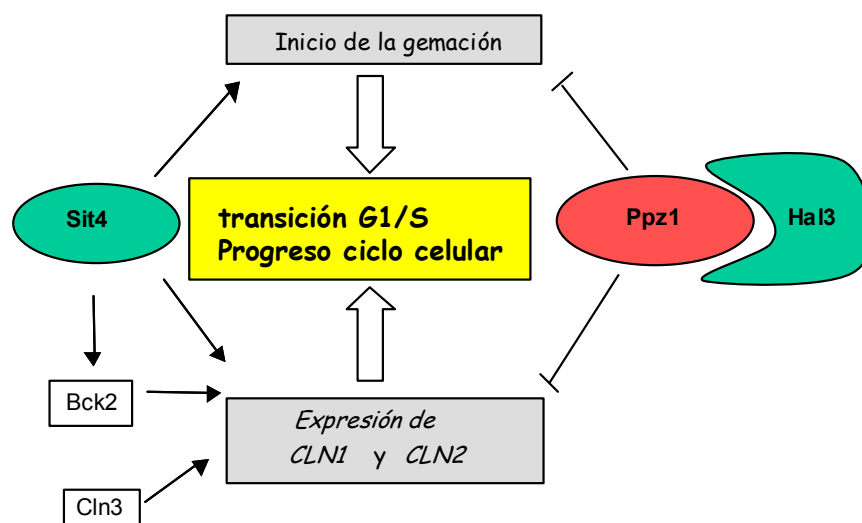


Fig. 3: Esquema donde se representa el papel de las fosfatasa Sit4 y Ppz1 y de la proteína Hal3 en la regulación de la transición G1/S. Adaptado de Clotet y col. 1999.

En otros organismos como *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado homólogos de Hal3 (aunque no de Ppz1), lo que indica una posible conservación funcional a lo largo de la evolución. En *S. cerevisiae* existen dos homólogos de Hal3, como son los productos de los genes *VHS3* e *YKL088w*. La posible relación de estas proteínas con una actividad reguladora de Ppz1 u otra fosfatasa no ha sido descrita y actualmente está siendo investigada por miembros de nuestro laboratorio.

3) **Sistemas de transporte involucrados en la homeostasis salina.**

3.1) **Importancia de los sistemas de entrada y salida de iones.**

El mantenimiento y control de la concentración intracelular de iones resultan fundamentales para cualquier tipo de célula. Parámetros importantes como el volumen celular, el pH interno, la turgencia, el potencial de membrana y la concentración interna de cationes monovalentes, dependen de los sistemas de entrada y salida de cationes como el sodio y el potasio. Estos sistemas de entrada y salida son los responsables de mantener una relativamente elevada concentración intracelular de potasio y a su vez mantener bajos los niveles del mucho más tóxico sodio (Serrano y Rodríguez-Navarro 2001).

La estrategia utilizada por los hongos en el control de la homeostasis salina depende en gran parte de una ATPasa de membrana exportadora de protones (ver fig. 4). El papel fundamental de esta proteína es el de bombear protones hacia el exterior de la célula, generando así un gradiente electroquímico y acidificando el medio externo (Serrano y col. 1986). El gradiente de protones generado permite acoplar el transporte de nutrientes e iones, pudiendo así regular las concentraciones intracelulares de K^+ y Na^+ de forma independiente. En *S. cerevisiae*, esta H^+ -ATPasa es el producto del gen *PMA1* y está regulada tanto por el pH como por la disponibilidad de fuentes de carbono (Eraso y Portillo 1994).

3.2) Sistemas de entrada de cationes monovalentes al medio citoplasmático.

3.2.1) El principal sistema de entrada de potasio: las proteínas Trk1 y Trk2.

El principal sistema de entrada de K^+ de *S. cerevisiae* depende de los genes *TRK1* y *TRK2*. Estos genes codifican un par de transportadores de membrana que presentan un alto grado de similitud entre sí (Ko y Gaber 1991). Las cepas que carecen del gen *TRK1* necesitan altas concentraciones de K^+ en el medio para poder crecer, como consecuencia de su muy reducida capacidad de transporte de este catión (Ko y col. 1990, Ramos y col. 1985). El efecto en la captación de potasio de la mutación de *TRK2* es únicamente observable en cepas carentes de su homólogo *TRK1*, lo que indica un papel secundario de la proteína Trk2 (Ramos y col. 1994).

En presencia de altas concentraciones de Na^+ en el medio y a fin de evitar su entrada, el sistema de baja afinidad Trk1,2 se convierte en un sistema de alta afinidad para el potasio, aumentando su capacidad de discriminación entre los dos cationes y su actividad como transportador de K^+ (Haro y col. 1993, Ramos y col. 1990). Esta activación depende, en parte, de una proteína fosfatasa activada por Ca^{2+} -calmodulina llamada calcineurina (Mendoza y col. 1994).

El buen funcionamiento del sistema de transporte de potasio resulta esencial para el mantenimiento de la relación K^+/Na^+ intracelular y, en consecuencia, los mutantes *trk1* resultan hipersensibles a altas concentraciones de Na^+ en el medio (Gómez y col. 1996). Los mutantes *trk1 trk2*, a pesar de no presentar un transporte activo de K^+ , muestran una entrada ectópica de baja afinidad de este catión debida a una hiperpolarización de la membrana, que también produce una mayor captación de otros cationes como Na^+ y Li^+ (Madrid y col. 1998, Forment y col. 2002). Trk1 y Trk2 podrían intervenir, por lo tanto, previniendo de una excesiva polarización de la membrana frente a cambios externos de pH (Madrid y col. 1998). La actividad de los transportadores Trk1,2 está regulada positivamente por las proteínas quinasas Hal4 y Hal5. El aumento de actividad transportadora de potasio producido por estas quinasas incrementa la entrada de potasio y reduce el potencial de membrana. La pérdida de

este potencial eléctrico reduce la captación de cationes tóxicos e incrementa la tolerancia salina (Mulet y col. 1999).

Ptk1 y Ptk2 son dos proteínas quinasas de la misma familia que Hal4 y Hal5. Al igual que sus compañeras de familia, Ptk1 y Ptk2 son capaces de incrementar la actividad de ciertos transportadores de membrana, como Pma1 (Goosens y col. 2000), de manera que producen un aumento del potencial electroquímico y estimulan la captación de poliaminas (Kakinuma y col. 1995, Nozaki y col. 1996). La quinasa Sky1 también ha sido recientemente relacionada con el transporte de espermina (Erez y Kahana 2001). La sobreexpresión de *SKY1*, *PTK1* o *PTK2* produce hipersensibilidad a LiCl de una forma dependiente de *PPZ1* pero independiente de *ENAI*, confirmando un efecto de Ppz1 en la tolerancia salina independiente de Ena1 (Erez y Kahana 2001). Parte de esta actividad podría venir mediada por un control de la actividad de los transportadores Trk1 y Trk2. De hecho, la delección del gen *SKY1* en células carentes de *ENAI* provoca una mayor captación de potasio por parte de los Trk y un fenotipo de hipertolerancia a Na⁺ dependiente de la funcionalidad de este sistema. La delección de *SKY1* también provoca tolerancia a litio pero, en este caso, de forma independiente de Trk1 y Trk2, sugiriendo que esta proteína, además de inhibir el sistema Trk, estaría modulando positivamente la actividad de otros transportadores de membrana por donde entrarían cationes Li⁺ (Forment y col. 2002). Recientemente se ha descrito que tanto la hipersensibilidad a litio, como la mejora del crecimiento en medios con bajas concentraciones de potasio, producidas por la delección de *SKY1* en células carentes de *TRK1* y *TRK2*, depende parcialmente de la presencia de los antiportadores Nha1 y Kha1 y del canal de potasio Tok1 (Erez y Kahana 2002).

3.2.2) La entrada de sodio y litio al interior celular.

Debido a la elevada toxicidad del sodio y el litio no se produce una captación activa de estos cationes, sino que los mecanismos de entrada al interior de la levadura parecen depender fundamentalmente de la gran diferencia de potencial eléctrico que presenta su membrana. Este potencial de membrana, generado por Pma1, favorece la entrada inespecífica de cationes como el sodio, el litio y el potasio gracias a su carga positiva. La entrada de estos cationes se

produciría a través de canales no selectivos (NSC) presentes en la membrana plasmática (Bihler y col. 1998, Serrano y Rodríguez-Navarro 2001, Bihler y col. 2002).

3.3) Sistemas de salida de cationes monovalentes al medio extracelular.

3.3.1) El sistema principal de salida de sodio y litio: la ATPasa Ena1.

El principal sistema de detoxificación del sodio intracelular de la levadura *S. cerevisiae* es el codificado por el gen *ENA1/PMR2*. Este gen codifica una ATPasa de membrana capaz de bombear cationes Na^+ y Li^+ , eliminándolos así del medio intracelular (Haro y col. 1991). La sobreexpresión de este gen confiere a la levadura un fenotipo de hipertolerancia a litio y sodio. Por contra, su delección supone una severa hipersensibilidad a estos cationes (Haro y col. 1991, Garcíadeblás y col. 1993, Wieland y col. 1995).

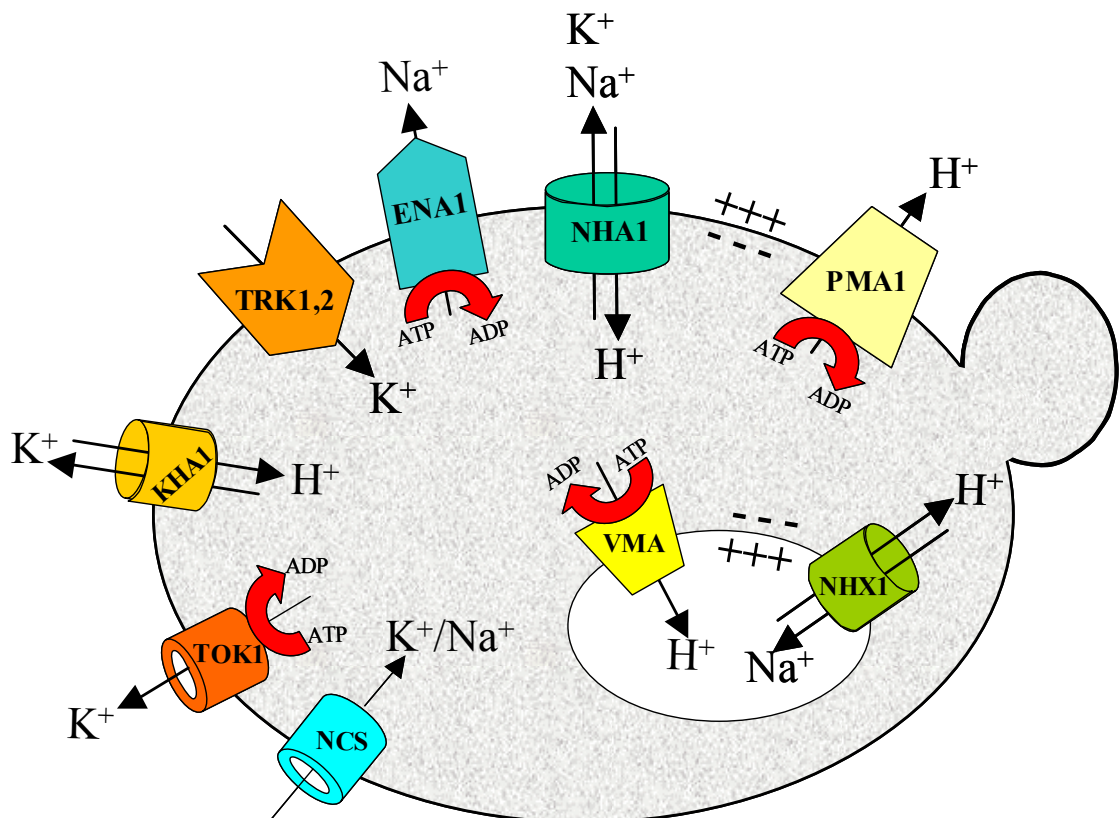


Fig. 4: Esquema donde se representan los transportadores de K^+ y Na^+ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y otros transportadores involucrados en la homeostasis de estos cationes.

En la mayoría de cepas de *S. cerevisiae*, *ENAI* es el primero de una serie de 5 ORFs, repetidos en tándem, que codifican proteínas prácticamente idénticas (Wieland y col. 1995, Catty y col. 1997, Paulsen y col. 1998). *ENAI* es el único de estos 5 genes que, pese a presentar unos niveles bajos de RNAm en condiciones de cultivo estándar, es capaz de aumentar enormemente su expresión en respuesta a factores externos como una alta concentración salina, una presión osmótica excesiva o un pH demasiado alcalino (Garcia-deblás y col. 1993, Márquez y col. 1998, Mendizábal y col. 2001). Esta respuesta transcripcional del gen *ENAI* está basada en la compleja regulación de su promotor (Márquez y Serrano 1996, Proft y Serrano 1999, Mendizábal y col. 2001, Serrano y col. 2002).

La expresión de *ENAI* es reprimida por la presencia de glucosa en el medio. En la represión por glucosa de este gen están involucradas al menos dos vías. En la primera la represión está mediada por el complejo Ssn6-Tup1-Mig1 (Alepuz y col. 1997) e intervendría también la quinasa Snf1, aliviando la represión cuando la glucosa del medio se agota (Treitel y col. 1998). En la segunda, otra quinasa, la PKA, sería la responsable de inhibir la expresión de *ENAI* en presencia de glucosa y niveles altos de AMPc (Márquez y Serrano 1996).

La respuesta de *ENAI* a una presión osmótica alta, así como parte de su respuesta a un estrés salino, viene mediada por la vía de Hog1, actuando a través del inhibidor transcripcional Sko1, que se une al elemento de respuesta a AMPc (CRE) presente en el promotor de *ENAI* (Proft y Serrano 1999). La vía de TOR (*Target of Rapamycin*) también ha sido relacionada con la regulación de la expresión de *ENAI* en condiciones de estrés salino, a través de los factores de transcripción Gln3 y Gat1 (Crespo y col. 2001). Otro elemento importante en la regulación de los niveles de la ATPasa en respuesta a altas concentraciones de sodio y litio es la calcineurina. Esta enzima regula la transcripción de *Ena1* mediante la desfosforilación y activación del factor transcripcional Crz1/Hal8 (Stathopoulos y Cyert 1997, Matheos y col. 1997, Mendizabal y col. 2001).

Como ya se ha comentado anteriormente, la expresión de *ENAI* se ve incrementada en un doble mutante *ppz1 ppz2*, lo que provoca un fenotipo de tolerancia a litio y sodio (Posas y col. 1995). Como ya hemos visto, parte del aumento en la expresión de *ENAI* puede explicarse, de forma indirecta, por un incremento del pH intracelular dependiente de una mayor

internalización de potasio por parte del sistema Trk. Sin embargo, el hecho que la delección de las fosfatasa en células carentes de *TRK1* y *TRK2* continúe produciendo un efecto de halotolerancia, confirma que existen otros mecanismos, no dependientes de estos transportadores, que relacionan a Ppz1 y Ppz2 con la tolerancia salina (Yenush y col. 2002). De hecho, existen recientes evidencias que demuestran que la regulación negativa de la expresión de *ENA1* por parte de Ppz1 es mediada por la calcineurina y no es el resultado de una alcalinización intracelular (Ruiz y col. 2003).

3.3.2) Sistemas secundarios de salida de cationes monovalentes: Nha1 y otros antiportadores catión/protón.

- Generalidades de los antiportadores catión/protón.

Los antiportadores catión/protón han sido descritos en animales, bacterias, levaduras e incluso en plantas. Existen multitud de ejemplos bien caracterizados, como la familia de transportadores NHE de mamíferos (Putney y col. 2002), NhaA de *Escherichia coli* (Ravna y col. 2001) y otras bacterias y SOS1 de *Arabidopsis thaliana* (Shi y col. 2000). Más adelante veremos varios ejemplos de antiportadores de levaduras. En las bacterias y en las levaduras, al contrario que en los eucariotas superiores, los antiportadores sodio/protón funcionan expulsando el Na⁺ tóxico del interior celular por intercambio con los H⁺ externos, gracias al potencial de membrana generado por la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Pma1 en *S. cerevisiae*) (Wiebe y col. 2001, Serrano y col. 1986). En levaduras, la principal función de estos antiportadores parece ser la de detoxificación del Na⁺ tóxico (Jia y col. 1992, Watanabe y col. 1995, Prior y col. 1996, Soong y col. 2000), aunque, en condiciones alcalinas de pH externo, también podrían contribuir al mantenimiento de la concentración intracelular de protones (Sychrová y col. 1999). Pese a que en *S. cerevisiae* el principal sistema de salida de sodio (y litio) es la ATPasa Ena1, en otras especies de levadura, como *Schizosaccharomyces pombe* o *Zygosaccharomyces rouxii*, la responsabilidad de la detoxificación de sodio recae principalmente en un antiportador Na⁺/H⁺ (denominados Sod2) y no en una Na⁺-ATPasa de membrana (Jia y col. 1992, Watanabe y col. 1995). Nha1 es el homólogo en *S. cerevisiae* de

estos antiportadores, aunque su papel en el transporte de sodio y litio parece menos importante que el de Ena1.

La mayoría de antiportadores Na^+/H^+ de levaduras (con la excepción de Sod2 de *S. pombe*) y eucariotas superiores poseen una cola carboxi-terminal más o menos larga (Kamauchi y col. 2002, Counillon y Pouyssegur 2000). En mamíferos, estas zonas carboxi-terminales contienen dominios estructuralmente conservados que parecen ser importantes en la modulación de la actividad de estos antiportadores (Counillon y Pouyssegur 2000). En el caso concreto del NHE1 humano la región amino-terminal contiene el dominio sensor de pH mientras que la región carboxi-terminal modula el valor de esta sensibilidad y hace de intermediaria de factores de crecimiento, interaccionando de forma fosforilación-dependiente con el dominio sensor de pH (Wakabayashi y col. 1992, Orłowski y Grinstein 1997).

- Nha1 es un antiportador catión/protón de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*.

El gen *NHA1* de *S. cerevisiae* codifica una proteína de membrana de 985 aminoácidos con función de antiportador $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ (Prior y col. 1996; Bañuelos y col. 1998). Esta proteína intercambia cationes de sodio o litio (y también potasio) por protones, eliminando el exceso de cationes del interior celular, a la vez que lo acidifica. No obstante, como ya se ha citado, su papel en expulsión del Na^+ intracelular es marginal en condiciones normales de cultivo, en las que el principal elemento detoxificador de este catión es la ATPasa Ena1 (Haro y col. 1991; Haro y col. 1993). En realidad, la delección de *NHA1* sobre un fondo silvestre no presenta ningún fenotipo detectable y sólo somos capaces apreciarla en ausencia de Ena1 y en condiciones de pH ácido, cuando Nha1 es más activo. En estas condiciones, la delección de *NHA1* agrava el fenotipo de hipersensibilidad a sal del mutante *ena1* (Bañuelos y col. 1998).

Los *loops* transmembrana característicos de este tipo de proteínas se encuentran en la mitad amino-terminal de Nha1. Esta zona presenta gran similitud con otros antiportadores de levaduras y hongos, como Cnh1 de *Candida albicans*, los Nha1 de *Pichia anomala*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus nidulans* y *Pichia sorbitophila*, o los antiportadores de *S. pombe* y *Z. rouxii* previamente citados (Kamauchi y col. 2002, Bañuelos y col. 2002a). Por otro lado, la

mitad carboxi-terminal de la proteína Nha1, que no parece contener estructuras transmembrana, presenta en su conjunto una escasa similitud con estas proteínas, aunque se evidencia la existencia de ciertos dominios conservados (Kamauchi y col. 2002). La presencia de estas estructuras carboxi-terminales no parece ser necesaria para su actividad como transportador de Na^+ , como se deduce del hecho que la sobreexpresión en *S. cerevisiae* del antiportador Sod2 de *S. pombe*, que carece de cola, se ha mostrado funcional como tal (Hahnenberger y col. 1996).

Además de la función de Nha1 como detoxificador de sodio y litio, esta proteína ha sido relacionada también con la regulación de la concentración de potasio intracelular, tanto encargándose directamente de su expulsión en respuesta a altas concentraciones extracelulares (Bañuelos y col. 1998), como mejorando la entrada de este catión mediante la regulación de la actividad de Trk1 en condiciones de bajo potasio (Bañuelos y col. 2002b). Recientemente, se ha postulado que, bajo ciertas condiciones, Nha1 podría actuar directamente introduciendo K^+ , ya que en un mutante *trk1 trk2 sky1* la delección de *NHA1* incrementa la tolerancia a Li^+ e inhibe el crecimiento en condiciones de bajo potasio, lo que encajaría con la posibilidad de que el antiportador estuviera importando estos cationes (Erez y Kahana 2002).

Debido a su naturaleza de antiportador, que le permite intercambiar cationes intracelulares por protones que pasan a acidificar el medio interno, se ha relacionado a Nha1 con la regulación del pH intracelular. De hecho, la delección de *NHA1* provoca un aumento del pH citoplasmático (Sychrová y col. 1999).

Además de las funciones mencionadas, en el presente trabajo se describe un nuevo papel de Nha1, al demostrar una relación del antiportador con la regulación del ciclo celular en la transición G1/S.

- Nhx1 y Kha1 son antiportadores catión/protón implicados en la homeostasis del sodio y el potasio en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* existen otros antiportadores que, aunque no mantienen ninguna relación estructural con Nha1, comparten su actividad como transportador de cationes monovalentes. Estos son las proteínas Nhx1 y Kha1 (para una revisión ver Ramírez y Peña 2000). El primero es un antiportador Na^+/H^+ , que se sitúa en la membrana vacuolar y su función como detoxificador de Na^+ radica en compartimentalizar este catión tóxico en el interior de la vacuola, disminuyendo así sus niveles citoplasmáticos (Nass y Rao 1998). El segundo es un posible antiportador K^+/H^+ de la membrana plasmática al que se ha asignado un papel en la regulación de los niveles de K^+ intracelular y también en la sensibilidad a NaCl, si bien el fenotipo de la cepa mutante es insignificante en este sentido (Ramírez y col. 1998).

3.3.3) El canal Tok1 constituye un tercer sistema de salida de cationes monovalentes.

El gen *TOK1* codifica un canal iónico, de estructura similar a los canales de procariotas, que se encargaría de la salida de potasio de una manera dependiente de ATP y del gradiente de K^+ entre el interior y el exterior de la membrana (Zhou y col. 1995, Bertl y col. 1998, Loukin y Saimi 2002). En condiciones normales de potencial de membrana y habiendo una concentración de K^+ mayor en el medio intracelular, el canal mantiene una conformación (R) que permite exportar rápidamente este catión e impide su entrada. En condiciones de potencial de membrana más negativo y alta concentración extracelular de K^+ , este catión tendería a atravesar la membrana en sentido contrario. Sin embargo, en estas condiciones, el canal adopta una conformación cerrada (C), que permite únicamente un reducido flujo de este catión hacia el interior celular (Lesage y col. 1996; Fairman y col. 1999). En esta regulación de la funcionalidad del canal, jugaría un papel importante la cola citoplasmática del mismo (Loukin y Saimi 2002). La función principal de este canal sería la de regular la turgencia y el balance de cargas durante la captación de pequeñas moléculas (Bertl y col. 1993).

4) Resumen de los objetivos y los avances de este trabajo.

El objetivo principal de la primera parte de este trabajo fue el de generar un modelo experimental que nos resultara útil para la identificación y el estudio de genes que intervinieran positivamente en la regulación de la transición G1/S del ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae*. Para ello aprovechamos el hecho que, conceptualmente, las fosfatasa Sit4 y Ppz1 forman un sistema dual de control del ciclo celular, donde actúan de forma opuesta (ver fig. 2 y Clotet y col. 1999). La identificación de Hal3 como regulador del elemento negativo Ppz1 (De Nadal y col. 1998) nos permitió diseñar un sistema de bloqueo condicional de la transición G1/S del ciclo celular. Nuestro modelo consistió en la sustitución, en un mutante *sit4*, del promotor propio de *HAL3* por un promotor regulable, lo que generó un mutante condicional *sit4 hal3*. Este mutante, en condiciones de bloqueo de la expresión de *HAL3*, presentó un fenotipo de letalidad reversible debido a una parada del ciclo celular en la fase G1. Utilizando este modelo experimental, se realizó un *screening* de supresores multicopia del bloqueo en G1/S provocado en el mutante *sit4 hal3*. Mediante este *screening* identificamos, entre otros, algunos genes previamente relacionados con la regulación de esta parte del ciclo celular, como *CLN3* o *BCK2*, lo que confirmó la validez de nuestra aproximación experimental.

La segunda parte del trabajo se centra en el análisis de uno de los genes identificados, *NHA1*. Este gen, que codifica un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática, llamó nuestra atención por su potencia en la supresión del fenotipo de letalidad de *sit4 hal3*. En este trabajo se realiza un estudio funcional y estructural para tratar de desvelar las claves de su actividad como elemento positivo en la progresión del ciclo celular y como antiportador de cationes monovalentes. El estudio mutacional de *NHA1* desvela una regulación de la actividad del transportador por parte de dominios localizados en su extremo carboxi-terminal y caracteriza la importancia de estos dominios en la funcionalidad del antiportador en tres procesos diferenciados: el transporte de sodio y litio, el transporte de potasio y la regulación de la progresión entre las fases G1 y S del ciclo celular de la levadura.

II - Resultados y Discusión

1) Identificación de Nha1 como elemento positivo en la transición G1/S del ciclo celular de *S. cerevisiae*.

Como se ha comentado en la introducción, la fosfatasa codificada por el gen *SIT4* es un elemento importante en la regulación del ciclo celular de *S. cerevisiae*, hasta el punto de que la delección de este gen resulta letal dependiendo del fondo genético. En cualquier caso, los mutantes viables presentan un fenotipo de crecimiento lento por problemas en la transición G1/S (Sutton y col. 1991). Los problemas en la regulación del ciclo que presentan las células *sit4* son debidos, en parte, a la baja expresión de *SWI4* y de otros genes que codifican algunas ciclinas necesarias en este punto del ciclo celular (Fernandez-Sarabia y col. 1992). *HAL3/SIS2* es otro elemento importante en este nivel de regulación que, al ser sobreexpresado en un mutante *sit4*, es capaz de incrementar los bajos niveles de expresión de los genes que codifican ciertas ciclinas y de mejorar el pobre crecimiento de este mutante (Di Como y col. 1995b). El efecto de Hal3 viene mediado por su actuación como elemento regulador negativo de Ppz1 (De Nadal y col. 1998), otra fosfatasa que interviene en la regulación del ciclo de forma opuesta a Sit4 (ver fig. 1 y Clotet y col. 1999). La sobreexpresión de *PPZ1* provoca un defecto de crecimiento parecido al que presentan los mutantes *sit4* (Clotet y col. 1996). El hecho de que la delección conjunta del elemento positivo en la progresión del ciclo celular (*SIT4*) y del regulador del elemento negativo Ppz1 (*HAL3*) resulta en un fenotipo de letalidad sintética (Di Como y col. 1995b), nos llevó a considerar la posibilidad de utilizar estos dos genes como herramientas para el diseño de un *screening* funcional con el fin de identificar genes involucrados en el control de la transición G1/S.

1.1) Construcción de la cepa JC002 y análisis de su validez como modelo para un bloqueo condicional en la fase G1.

Con el objetivo de obtener un mutante letal condicional por bloqueo del ciclo celular en la transición G1/S, se generó en una cepa haploide *SSD1-v* un mutante *sit4* al que se le sustituyó el promotor de la copia genómica del gen *HAL3* por un cassette que contenía el elemento promotor *tetO*. De esta manera, la expresión del gen *HAL3* queda bajo el control del promotor *tetO* (ver Fig. 5). Este promotor permite una eficaz regulación de la expresión del gen, ya que

puede ser fuertemente reprimido mediante la adición al medio de cultivo de doxiciclina, un antibiótico de la familia de las tetraciclinas que no afecta al crecimiento de las levaduras (Bellí y col. 1998). Esta cepa, llamada JC002, presentó una cierta lentitud en su crecimiento, característica de los mutantes *sit4*. Sin embargo, como es de esperar para el doble mutante *sit4 hal3*, fue incapaz presentar crecimiento macroscópico tras 96 horas de incubación en placas con 20 µg/ml de doxiciclina.

Con el fin de comprobar la idoneidad de nuestra cepa como modelo para el estudio de la transición G1/S, se monitorizó el porcentaje de células en gemación y, por citometría de flujo, el contenido de DNA de un cultivo de la cepa JC002 tras la adición de 20 µg/ml de doxiciclina al medio. En el momento de la adición del antibiótico, las células presentaron un contenido de DNA 1C/2C y un índice de gemación (74%) normales en un cultivo asincrónico de células *sit4*. Tras 12 horas de incubación, el cultivo control, al que no se había añadido doxiciclina, mostró un comportamiento similar al inicial. Sin embargo, en presencia del antibiótico, la mayoría de las células mostró un contenido de DNA 1C y el porcentaje de gemación del cultivo fue mucho más bajo (25%). Estos resultados son característicos de un bloqueo del ciclo celular en la fase G1. Consecuentemente, la adición de doxiciclina a un cultivo de células de la cepa JC002 es capaz de bloquear su crecimiento. Cabe resaltar que este bloqueo es reversible, ya que, al retirar el antibiótico del medio de cultivo, las células recuperan el crecimiento. En estas condiciones, la expresión de *HAL3* queda desbloqueada y puede retomarse la progresión del ciclo celular. En consecuencia, esta cepa constituye un excelente modelo para el estudio de la transición G1/S, ya que es capaz de reproducir el bloqueo en G1 provocado por la doble mutación de *SIT4* y *HAL3*. Utilizando este modelo experimental diseñamos un *screening* de sobreexpresión para la identificación de genes capaces de contribuir a la superación del bloqueo en G1 provocado en la cepa JC002.

1.2) Realización del *screening* funcional para la identificación de genes de *S. cerevisiae* que intervienen positivamente en la transición G1/S.

La cepa JC002 fue transformada con dos bibliotecas genómicas multicopia diferentes construidas sobre YEp13 y YEp24 y se seleccionó su crecimiento en placas medio sintético

(carente de leucina o uracilo, en cada caso, para la selección de los plásmidos) en presencia de 20 µg/ml de doxiciclina. De los aproximadamente 100.000 transformantes analizados, alrededor de 200 fueron capaces de producir colonias macroscópicas tras 96 horas de incubación. Estas colonias fueron consideradas positivas y recuperadas. Los clones resultantes fueron denominados "VHS" por conferir Viabilidad a una cepa carente de *Hal3* y *Sit4*. La verificación por PCR de la presencia los genes *SIT4* o *HAL3* en muchos de los clones, permitió descartarlos en este punto. El DNA plasmídico del resto de clones fue aislado, y sometido a análisis de restricción por la endonucleasa *EcoRI* para identificar insertos idénticos. Los que presentaron patrones de corte diferentes fueron identificados por secuenciación (ver esquema en fig. 5).

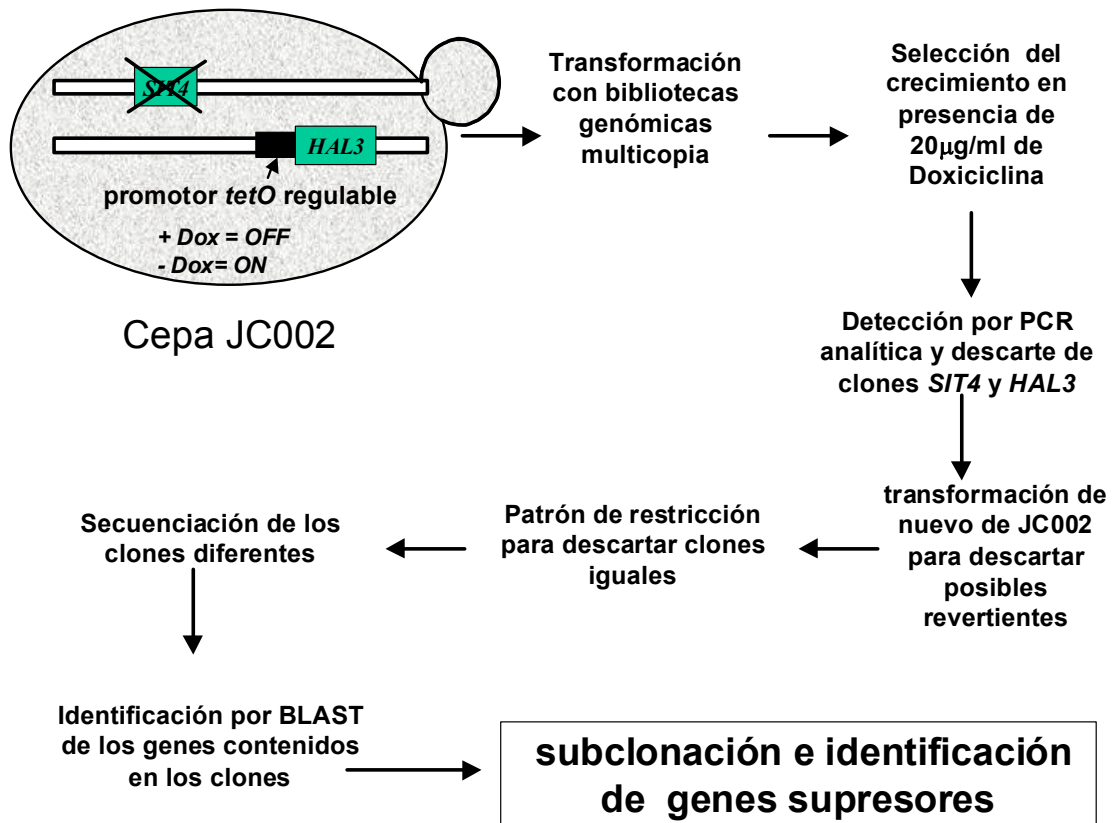


Fig. 5. Esquema de los pasos seguidos en la realización del screening para la identificación de genes involucrados en la transición G1/S.

En algunos casos, los insertos contenían genes previamente relacionados con la regulación del ciclo en la transición G1/S, como *CLN3*, *BCK2* o *SWI4* (Epstein y Cross 1994, Ogas y col. 1991, para una revisión ver Mendenhall y Hodge 1998). El hecho de encontrar estos genes, constituye una prueba significativa de la utilidad del *screening* como herramienta para el estudio del ciclo celular. El resto de genes identificados mediante este *screening* se describen y analizan detalladamente en Muñoz y col. 2003.

1.3) Identificación de *NHA1* como un supresor del bloqueo en la fase G1 del doble mutante *sit4 hal3*.

La presencia del gen *NHA1* en tres de los clones identificados nos llamó rápidamente la atención, tanto por la potencia con la que estos clones suprimían el bloqueo del crecimiento de la cepa JC002 como porque este gen jamás había sido relacionado con la regulación del ciclo celular. La subclonación de los insertos genómicos confirmó que era el gen *NHA1*, y no otro *Open Reading Frame* (ORF) presente en los tres clones, el responsable del efecto supresor de los mismos.

Puesto que *NHA1* codifica un antiportador de membrana plasmática, y a fin de descartar un posible efecto de esta proteína en el ciclo celular a través de una alteración en el transporte de la doxiciclina, el subclón que contenía el gen *NHA1* aislado fue introducido en una cepa diploide heterocigótica para las deleciones de *SIT4* y *HAL3*. El análisis de tétradas tras la esporulación de esta cepa reveló que mutantes haploides *sit4 hal3* eran viables cuando portaban el gen *NHA1* expresado en multicopia, confirmando así un efecto positivo del antiportador en la transición G1/S en un sistema independiente del uso de doxiciclina. Un hecho que reforzó la idea de que Nha1 jugaba un papel directo en la regulación de la transición G1/S fue la observación de que la sobreexpresión de esta proteína de membrana en una cepa *sit4* era capaz de acelerar tanto su crecimiento como la salida del bloqueo en G1 inducido por factor α .

Pese a que Nha1 juega un papel positivo en la transición G1/S, su papel no parece tener la misma importancia que el de Hal3, como se desprende del hecho de que, mientras que el

doble mutante *sit4 hal3* no es viable, las células haploides *sit4 nha1* sí lo son y, en condiciones normales, su crecimiento se asemeja al del mutante simple *sit4*.

2) Análisis de la relación entre la actividad de Nha1 como transportador de cationes y como elemento regulador del ciclo celular.

La proteína Nha1 había sido identificada inicialmente como un antiportador Na^+/H^+ que al ser producido en multicopia era capaz de conferir tolerancia a cationes Na^+ y Li^+ de manera pH dependiente (Prior y col. 1996). Localizado en la membrana plasmática (Kinclová y col. 2001), su importancia para el crecimiento celular se restringió, en un principio, a su papel como detoxificador de sodio, principalmente a pH ácido y en ausencia de la bomba de sodio Ena1 (Bañuelos y col. 1998), y como regulador del pH interno (Sychrová y col. 1999). Su identificación en este *screening* permite atribuirle también un papel en el control del ciclo celular en la transición G1/S.

A fin de estudiar si existía alguna relación funcional entre la acción de Nha1 sobre el control del ciclo celular y su capacidad como detoxificador del sodio, decidimos analizar si otros agentes importantes para el mantenimiento de los niveles intracelulares de este catión también tenían el mismo efecto sobre el crecimiento de la cepa JC002.

2.1) Otros transportadores involucrados en la detoxificación de sodio no pueden reemplazar a Nha1 como regulador de la transición G1/S.

Dado que el tándem Ppz1-Hal3 interviene en el control de los flujos de sodio de *S. cerevisiae* al modular la expresión de *ENAI* (Posas y col. 1995), el efecto de Nha1 sobre la cepa JC002 podría ser debido a un control indirecto del ciclo celular mediante la regulación de la homeostasis salina. Para analizar esta posibilidad, se transformó esta cepa con un plásmido multicopia que expresa el gen *ENAI* bajo control del potente promotor constitutivo *PGK1*. Como hemos visto, el producto del gen *ENAI* es una ATPasa de membrana plasmática que constituye el elemento principal para la salida de sodio y litio en *S. cerevisiae*. Se analizó

tanto la tolerancia a litio (catión altamente tóxico considerado análogo del sodio) como la capacidad para crecer en presencia de doxiciclina de los transformantes. La sobreexpresión de la ATPasa permitió el crecimiento de esta cepa en placas que contenían LiCl 200 mM, cosa que no pudo lograr la sobreexpresión de Nha1. Por el contrario, la sobreexpresión de *ENAI* fue totalmente incapaz de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en placas que contenían 20 µg/ml de doxiciclina.

En conclusión, la sobreproducción de la bomba de sodio Ena1 fue incapaz de anular el bloqueo en la transición G1/S que presenta la cepa JC002 en condiciones restrictivas pese a mostrarse más potente que Nha1 como detoxificador de litio, sugiriendo que la función de Nha1 en el control del ciclo celular va más allá de una simple regulación de los flujos de litio y sodio.

Con el fin de analizar un elemento involucrado en la tolerancia salina, estructural y funcionalmente más parecido a Nha1, decidimos introducir en multicopia el gen *sod2* de *Schizosaccharomyces pombe*. El gen *sod2* codifica un antiportador Na⁺/H⁺ que puede ser alineado con la mitad amino-terminal de Nha1 (35% de identidad y 58% de residuos conservados) y cuya funcionalidad como antiportador en *S. cerevisiae* ha sido descrita con anterioridad (Jia y col. 1992, Hahnenberger y col. 1996). En nuestro caso, el gen *sod2* fue fuertemente sobreexpresado de manera constitutiva (bajo control del promotor *ADHI*), tanto en una cepa (G19) que carecía de la ATPasa Ena1 y, por tanto, era hipersensible a sodio y litio, como en la cepa JC002. La sobreexpresión de *sod2* permitió el crecimiento de la cepa hipersensible G19 en medios de cultivo con NaCl 0,4 M incluso con mayor eficacia que el conferido por la expresión en multicopia de *NHA1*. Por el contrario, como ya ocurrió con *ENAI*, la sobreexpresión de *sod2* no fue capaz de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en presencia de doxiciclina.

Como ya se ha comentado, ni la bomba de Na⁺ Ena1, mucho más potente que Nha1 en cuanto a la capacidad de exclusión de sodio, ni el antiportador Na⁺/H⁺ Sod2, funcional como tal en *S. cerevisiae* y de estructura y función más parecida a Nha1, fueron capaces de mimetizar la función de éste en el crecimiento de la cepa JC002. Estas observaciones conducen a la idea de que la capacidad detoxificadora de Na⁺ de Nha1 no es la responsable

directa de su papel en la regulación del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Esta responsabilidad podría recaer en alguna otra función de este antiportador, que hasta el momento se había pasado por alto, y que estaría jugando un papel importante en el conjunto de acontecimientos que han de darse en la transición G1/S.

2.2) La capacidad detoxificadora de sodio de Nha1 no es necesaria para su función en el ciclo celular.

Los datos anteriores indican que la actividad detoxificadora de sodio de Nha1 no es suficiente para desempeñar su papel como regulador del ciclo celular. A fin de analizar si la función del antiportador como detoxificador de sodio constituye un elemento necesario para esta regulación, nos planteamos la posibilidad de eliminar esta capacidad tratando de conservar al máximo el resto de su estructura. Dado que no se encontraba publicado ningún análisis mutacional en Nha1 que permitiera identificar residuos relevantes en la mencionada función, decidimos generar mutaciones basándonos en cambios aminoacídicos realizados anteriormente sobre la secuencia del antiportador de *S. pombe* Sod2. En dicha proteína se habían identificado los aminoácidos Asp²⁴¹ y Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ como unos residuos importantes para el transporte de Na⁺ a través de la membrana plasmática de esta levadura. Al mutar estos residuos a Asn, Sod2 veía disminuida o suprimida su actividad como transportador. En este antiportador la mutación en el Asp²⁴¹ producía una incapacidad para la internalización de H⁺, mientras que la mutación de los Asp²⁶⁶ y Asp²⁶⁷ a Asn suprimía totalmente la capacidad de transporte de Sod2, tanto en la exclusión de Na⁺ como en la entrada de H⁺ (Dibrov y col. 1998a). En Nha1, estos residuos de ácido aspártico (D) se conservan y fueron mutados a asparagina (N) de forma análoga a los cambios realizados sobre Sod2, produciendo las versiones D241N y D266,267N. Estas versiones mutadas fueron expresadas en multicopia y se analizó tanto su capacidad de conferir mayor tolerancia a sodio a la cepa B31 (una cepa *ena1 nha1* derivada de G19), como su capacidad de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en condiciones restrictivas. La mutación en Asp²⁴¹ no afectó la capacidad de Nha1 para permitir el crecimiento de la cepa hipersensible B31 en presencia de NaCl 0,4 M, mientras que la mutación de los Asp²⁶⁶⁻²⁶⁷ provocó una pérdida total de esta capacidad. Cuando las mismas construcciones fueron introducidas en la cepa JC002, todas las versiones fueron

capaces de permitir el crecimiento de esta cepa en placas con doxiciclina, aunque las células que contenían el plásmido con la versión D241N crecieron más lentamente que las que sobreexpresaban la versión D266,267N o la versión nativa del antiportador.

Así pues, una versión mutante de Nha1 (D266,267N) que ha perdido por completo su capacidad de transporte de sodio continúa permitiendo el crecimiento de la cepa JC002 en condiciones restrictivas, lo que indica que esta capacidad no es necesaria para su actividad como elemento regulador de la transición G1/S.

2.3) La región carboxi-terminal de Nha1 es imprescindible para su función en el ciclo celular.

Un estudio adicional que permitió descartar totalmente la posible relación entre la función de Nha1 como transportador de sodio y su acción en el ciclo celular, se compuso de una serie de experimentos donde se utilizó de una versión truncada del antiportador a la que le faltaban sus 97 últimos aminoácidos (Prior y col. 1996, Bañuelos y col. 1998). Esta construcción (pCSCY), fue identificada por su capacidad de detoxificación de Na^+ , incluso algo mayor que la de la proteína Nha1 nativa (Prior y col. 1996). Para nuestra sorpresa, la sobreexpresión de esta versión del antiportador no fue capaz de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en placas con doxiciclina a pesar de provocar un rápido crecimiento de la cepa B31 en presencia de NaCl 0,4 M, demostrando así su gran capacidad como detoxificador de sodio.

Ante la observación de que una versión truncada del antiportador es incapaz de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en condiciones restrictivas y a fin de confirmar la importancia del extremo carboxi-terminal de Nha1 para el mantenimiento de su función en el ciclo celular, construimos por mutagénesis dirigida tres versiones del antiportador en las que se introdujeron codones stop entre el residuo 888, correspondiente a la construcción pCSCY, y el extremo de la proteína (residuo 985). Estos codones stop se introdujeron en las posiciones 923, 948, y 979, recortando progresivamente la secuencia aminoacídica de la cola carboxi-terminal de Nha1. La sobreexpresión de las versiones delecionadas a partir de 979 o de 948 permitió el crecimiento de la cepa JC002 en condiciones restrictivas, mientras que la versión

delecionada en 923 no fue capaz de ello, indicando que la región comprendida entre los residuos 923 y 948 de Nha1 contiene elementos imprescindibles para su función en ciclo.

Con el objetivo de establecer los límites de la región carboxi-terminal necesaria para la función de Nha1 en el ciclo celular, generamos una serie de delecciones internas a partir del residuo 642. Las versiones cuyas delecciones se extendían hasta los residuos 828 u 849 fueron incapaces de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en medios con doxiciclina, mientras que las versiones con delecciones más cortas, hasta los residuos 700 o 799, conservaron su función en el ciclo celular. Cabe remarcar que la versión con la delección $\Delta 642-799$ confirió un crecimiento a la cepa JC002 en placas con doxiciclina claramente peor que el presentado por la cepa que sobreexpresaba la versión $\Delta 642-700$ o la versión nativa de Nha1, lo que indica un cierto efecto negativo provocado por la eliminación de esta zona.

Todas las versiones mutadas del antiportador presentaron una capacidad equivalente, si no superior, a la del antiportador nativo en cuanto a su función como detoxificador de sodio, desligando una vez más esta función de la actividad reguladora del ciclo celular por parte de Nha1 y descartando problemas de degradación o falta de expresión de la proteína.

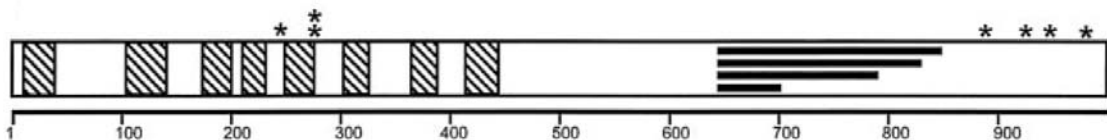


Fig. 6: Representación esquemática de las mutaciones realizadas sobre Nha1. Los dominios transmembrana predecidos por el programa TransMem (Aloy y col. 1997) están señalados como cuadros rayados. Los asteriscos señalan cambios Asp>Asn o señales de stop). Las líneas negras indican la extensión de las delecciones realizadas dentro de la zona carboxi-terminal del antiportador. Los números indican el número de residuo.

Como hemos observado anteriormente, Sod2, carente de cola carboxi-terminal, no puede imitar la función de Nha1 en la regulación del ciclo celular a pesar de su funcionalidad como transportador de sodio y de su gran similitud con la mitad transmembrana del antiportador de *S. cerevisiae*. Este hecho concuerda con los datos que acabamos de exponer sobre la existencia de una región entre los residuos 800-948 del extremo carboxi-terminal de Nha1

(ver fig. 6), la cual, pese a ser dispensable para su funcionalidad en el transporte de sodio, resulta imprescindible para la actividad del antiportador en la superación del bloqueo en G1 producido en nuestra cepa modelo. Nuestros resultados muestran claramente que la región carboxi-terminal de Nha1 contiene determinantes estructurales que modulan funciones específicas del antiportador.

2.4) La región carboxi-terminal de Nha1 contiene elementos importantes para su actividad como transportador de potasio.

Además de sodio, Nha1 ha sido descrito como un elemento capaz de eliminar cationes potasio del medio intracelular. La delección de *NHA1* en un mutante *enal* empeora el crecimiento en concentraciones altas de potasio, mientras que su sobreexpresión es capaz de mejorar el crecimiento de la cepa hipersensible B31 en estas condiciones (Bañuelos y col. 1998). Basándonos en estas observaciones, decidimos analizar la posibilidad de que la función expulsora de potasio de Nha1 tuviese alguna importancia en su actividad como regulador del ciclo celular.

Nuestros ensayos confirmaron la funcionalidad de la sobreexpresión del antiportador al permitir el crecimiento de la cepa B31 en condiciones de alto potasio (1 M). Sorprendentemente, tanto los experimentos de crecimiento relativo como de medidas directas del transporte de sodio y potasio, indican que la versión mutada de Nha1 no funcional para el transporte de sodio (D266,267N) conserva intacta su actividad como transportador de potasio, mientras que la versión D241N, que mantiene su capacidad para la detoxificación del sodio, tiene significativamente reducida su actividad como transportador de potasio. Mutaciones que afectan selectivamente a la captación de cationes habían sido descritas en el caso del transportador de potasio de plantas Hkt1 (Diatloff y col. 1998, Rubio y col. 1999), pero esta proteína pertenece a una familia de transportadores diferente, relacionada con los Trk de levaduras (para una revisión ver Rodríguez-Navarro 2000). Esta parece ser la primera vez que se describen mutaciones que permiten la discriminación entre cationes sodio y potasio en un antiportador catión/protón.

La observación de que ciertas mutaciones afectaban al transporte de sodio sin alterar el transporte de potasio y viceversa nos llevó a investigar cómo la sobreexpresión de las diferentes versiones de Nha1 mutadas en su región carboxi-terminal podían afectar al crecimiento de la cepa B31 en condiciones de alto potasio y al transporte de este catión. Curiosamente, las células de la cepa B31 que sobreexpresaban la versión de Nha1 con el stop en la posición 923, así como las que presentaban deleciones internas entre 642-799 y 642-828 mostraron un claro defecto en su crecimiento en placas con KCl 1,5 M (no mostrado). Esta disminución de la capacidad de transporte de potasio fue confirmada mediante experimentos en los que se midió la salida de este catión en los mismos cultivos, detectando un remanente de actividad transportadora en la versión Δ 642-799 que se perdió tanto en la versión delecionada entre 642-828 como en la Δ 923. La versión delecionada entre 642-700 así como las que presentaban señales de stop en 948 y 979 se mostraron totalmente funcionales como transportadoras de potasio. Las observaciones anteriores indican que residuos importantes para la función de Nha1 como transportador de potasio y dominios imprescindibles para su funcionalidad como elemento regulador del ciclo celular se localizan en zonas cercanas, en la mitad carboxi-terminal del antiportador, y que cambios en esta zona de la proteína afectan a ambas funciones.

Trabajos anteriores habían propuesto que, a pesar del bajo grado de conservación en las secuencias aminoacídicas de los antiportadores de bacterias y levaduras, debe existir un cierto grado de conservación estructural y funcional entre ellos. En estos trabajos se había postulado que los residuos conservados Asp²⁴¹ y Asp²⁶⁶⁻²⁶⁷ servirían para coordinar el transporte de cationes (Dibrov y col. 1998a, Dibrov y Fliegel 1998b). Nuestros resultados indican que, en el caso del antiportador de *S. cerevisiae* Nha1, este modelo de estructuras conservadas podría aplicarse al transporte de sodio, pero no de potasio, ya que la expulsión de este último catión requeriría elementos estructurales de unión alternativos. En estos resultados también se identifican elementos carboxi-terminales determinantes en la discriminación entre cationes Na⁺ y K⁺. Este es un hallazgo particularmente relevante, dado que, mientras que los sistemas de entrada de potasio se encuentran relativamente bien caracterizados en la levadura, los sistemas de salida de este catión aun no han sido clarificados suficientemente.

2.5) Un antiportador activo en el transporte de potasio es incapaz de mimetizar el efecto de Nha1 en el ciclo celular.

La observación anterior de que la región comprendida entre los residuos 800 y 948 del extremo carboxi-terminal de Nha1 era importante tanto para el transporte de potasio como para la regulación del ciclo celular nos llevó a considerar la posibilidad de que las dos funciones estuvieran relacionadas y a analizar si la capacidad de extrusión de cationes potasio era la razón por la cual Nha1 tiene una función reguladora del ciclo celular. Con este fin se expresó en *S. cerevisiae* el gen que codifica el antiportador de *C. albicans* Cnh1. Este antiportador, al contrario que Sod2 de *S. pombe*, posee una larga cola carboxi-terminal que presenta un apreciable porcentaje de identidad (superior al 30%) con la de Nha1 (Kinclová y col. 2002, Kamauchi y col. 2002). Cnh1 ya había sido probado con éxito en *S. cerevisiae* como transportador de sodio (Soong y col. 2000), sin embargo, su funcionalidad como transportador de potasio nunca había sido analizada. En nuestro sistema, la sobreexpresión del gen *CNHI*, de manera similar a la de *NHAI*, fue capaz de mejorar el crecimiento de la cepa hipersensible B31 en medios de cultivo con KCl 1 M. Este crecimiento correlaciona con la eficiente salida de potasio observada en los mismos cultivos. A pesar de haber demostrado que Cnh1 también es capaz de transportar potasio, comprobamos que la sobreexpresión de este antiportador es incapaz de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en presencia de doxiciclina, lo que indica que Cnh1 contiene los elementos estructurales suficientes para mimetizar la función de Nha1 en el transporte de potasio pero no en la regulación del ciclo celular.

El hecho de que la sobreexpresión de un antiportador como Cnh1, no permita la superación del bloqueo en G1 provocado en la cepa JC002, parece oponerse a una relación directa entre la salida de potasio y la función de Nha1 en la regulación de la transición G1/S. Un supuesto efecto positivo sobre el ciclo celular de la expulsión de potasio también entra en contradicción con evidencias experimentales previas que asocian un incremento en la entrada de potasio y una aceleración del ciclo celular. La identificación en nuestro *screening* de Hal4 y Hal5 como supresores de un bloqueo en G1/S (Muñoz y col. 2003) parecería estar de acuerdo con la ausencia de relación entre la salida de potasio y la función de Nha1 en el progreso del ciclo, ya que estas proteína quinasas activan los transportadores de potasio Trk1

y Trk2, aumentando la entrada de potasio hacia el interior celular (Mulet y col. 1999). Por otro lado, hemos visto que la sobreexpresión de Nha1 es capaz de acelerar el paso por G1 de un mutante *sit4* y, sin embargo, este mutante no presenta una mayor sensibilidad a potasio, lo que sugiere que el defecto en ciclo celular de estas células no es debido a una excesiva acumulación de este catión.

Otra aproximación que refuerza la idea de que la actividad del antiportador en el ciclo celular es independiente de su capacidad de transporte de cationes se basa en el hecho de que Nha1 es un antiportador catión/protón. La funcionalidad de este tipo de transportadores radica en la existencia de un gradiente electroquímico (de H^+) a través de la membrana plasmática que favorece el intercambio de los cationes en cuestión por los protones extracelulares. En condiciones donde se pierde este gradiente, la funcionalidad de Nha1 como transportador también se pierde, como demuestra el hecho que a pH 7 la sobreexpresión del antiportador es prácticamente incapaz de incrementar la tolerancia a cationes sodio o potasio de la cepa B31 (Bañuelos y col. 1998). Consecuentemente, si la función de Nha1 en el ciclo celular dependiera de su capacidad para expulsar cationes mediante el intercambio por protones extracelulares, esta funcionalidad también quedaría afectada por un pH externo cercano a la neutralidad. Sin embargo, la sobreexpresión de *NHA1* es capaz de permitir la superación del bloqueo del crecimiento producido por la falta de *SIT4* y *HAL3* cuando las células crecen a pH 7 o superior, lo que indica que esta proteína no necesita de su capacidad de intercambio catión/protón para mantener su función en la regulación del ciclo celular.

3) Caracterización y estudio de elementos carboxi-terminales de Nha1 imprescindibles para su actividad como regulador del ciclo celular.

3.1) La mitad carboxi-terminal de Nha1 es necesaria pero no suficiente para su función en el ciclo celular.

Una vez comprobado que la mitad carboxi-terminal de Nha1 contiene elementos imprescindibles para el efecto en ciclo celular, decidimos analizar si era suficiente la presencia de esta parte de la proteína o, por el contrario, existían otros elementos de la mitad amino-terminal del antiportador que también son necesarios en esta función. Para ello se generó una versión del antiportador a la cual se le añadió un *tag* antes del codón de stop, consistente en una triple repetición del epítipo de la hemoaglutinina, a fin de poder analizar su nivel de expresión mediante un ensayo de inmunoblot. La sobreexpresión de esta construcción conservó la capacidad de conferir a la cepa hipersensible B31 una mayor resistencia a altas concentraciones tanto de sodio como de potasio, aunque con menos potencia que el antiportador nativo en el caso de este último. Asimismo, esta sobreexpresión también se mostró funcional en la regulación del ciclo celular al permitir el crecimiento de la cepa JC002 en presencia de doxiciclina, aunque con algo menos de eficacia que la construcción original.

Partiendo de esta versión del antiportador con el *tag* se generaron dos nuevas construcciones que fueron sobreexpresadas en la cepa JC002. En la primera se practicó una amplia delección en la mitad amino terminal de la proteína que elimina gran parte de los elementos transmembrana. La cantidad de proteína de esta versión del antiportador detectada por inmunoblot fue similar a la de la versión íntegra con el *tag*. Sin embargo, la versión truncada fue detectada únicamente en la fracción soluble, lo que indica que esta proteína estaría localizada en el citoplasma y no permanece anclada a membrana. La sobreexpresión de esta construcción no fue capaz de permitir el crecimiento de células de la cepa JC002 en condiciones restrictivas. La segunda construcción pretendía anclar la mitad carboxi-terminal de Nha1 a la membrana plasmática y consistió en generar una proteína de fusión entre el receptor de feromonas Ste2 y la citada región del antiportador *de S. cerevisiae*. Esta proteína

de fusión y la versión completa de Nha1 fueron detectadas, a niveles similares, mayoritariamente en la fracción no soluble, lo que indicaría un anclaje a membrana. Este anclaje sería, presuntamente, a la membrana plasmática, como corresponde tanto a Nha1 como a la proteína Ste2 (Kinclová y col. 2001, Blumer y col. 1988). La construcción resultante de la fusión también se mostró incapaz de suprimir el bloqueo en G1 de la cepa JC002.

De estos datos puede concluirse que, pese a ser imprescindible para su función en ciclo celular, la expresión de la mitad carboxi-terminal de Nha1, tanto anclada a membrana como de manera soluble, resulta insuficiente para ejercer esta función reguladora. Esto indicaría que existen elementos de la mitad amino terminal del antiportador que resultan necesarios para su función como elemento positivo en la regulación de la transición G1/S.

3.2) Elementos de la mitad amino-terminal de Nha1 ausentes en Sod2 son necesarios para su funcionalidad en el ciclo celular y para su actividad como transportador de potasio.

Como ya hemos visto, la zona carboxi-terminal de Nha1 es importante tanto para su función en ciclo celular como para su capacidad como transportador de potasio. El antiportador Sod2 de *S. pombe* carece tanto de estas dos funciones como de extensión carboxi-terminal. Basándonos en esta coincidencia, decidimos investigar si la mencionada falta de funcionalidad de Sod2 es debida a que carece de esta extensión. Para ello se generó una proteína de fusión entre los elementos transmembrana de Sod2 y la zona carboxi-terminal de Nha1 ausente en el antiportador de *S. pombe*, la cual fue sobreexpresada en las cepas JC002 y B31. Debido a que la construcción que codifica la proteína de fusión se colocó bajo el control de un promotor fuerte (*ADHI*), su nivel de expresión fue bastante superior al de *NHAI*. Las proteínas resultantes fueron detectadas mayoritariamente en la fracción no soluble, lo que indicaría que en ambos casos existe un anclaje a membrana. La sobreexpresión de la proteína de fusión se mostró funcionalmente equivalente a la sobreexpresión del antiportador de *S. pombe* nativo; fue capaz de conferir a la cepa B31 tolerancia a sodio, pero no a potasio, y se mostró incapaz de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en condiciones restrictivas.

Estos resultados indicarían que los elementos imprescindibles para la funcionalidad en la regulación del ciclo celular y en el transporte de potasio presentes en la mitad amino-terminal de Nha1 son específicos de la secuencia de este antiportador y no se encuentran conservados en Sod2, a pesar de su considerable similitud con esta zona.

3.3) Dominios repartidos entre los residuos 800 y 954 de Nha1 son importantes para su efecto en el ciclo celular y su actividad detoxificadora de cationes.

Previamente hemos identificado una zona que se extiende entre los residuos 800 y 948 de la secuencia aminoacídica de Nha1 como necesaria para su función en el ciclo celular. Con el objetivo de investigar la distribución de los elementos estructurales involucrados en este efecto, realizamos una serie de deleciones de diferentes fragmentos a lo largo de esta zona de la proteína. Los fragmentos delecionados se extendieron entre los residuos 800-849, 900-925 y 926-954 respectivamente. Todas las construcciones resultantes mostraron una funcionalidad parecida al ser sobreexpresadas, siendo incapaces de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en presencia de doxiciclina y confiriendo una tolerancia a sodio en la cepa B31 equivalente a la producida por la construcción con el antiportador nativo. Sin embargo, cuando se analizó el crecimiento de estas células en presencia de KCl 1 M, las que sobreexpresaban las versiones delecionadas presentaron una menor tolerancia a este catión que las que sobreexpresaban *NHA1* nativo, como ya ocurrió anteriormente con las versiones delecionadas entre 642-799, 642-828 y a partir de 923.

La constatación de que elementos estructurales importantes para la funcionalidad en el ciclo celular se encuentran en diferentes segmentos a lo largo de la región comprendida entre los residuos 800-954 nos llevó a realizar un análisis detallado de esta región. En este análisis realizamos una serie de mutaciones al azar entre los residuos 775 y 980 mediante una aproximación por *Random Mutagenesis* PCR (Fromant y col. 1995). Para ello, introdujimos dianas artificiales *SpeI* y *SalI* en la posición +2298 e inmediatamente antes del codon stop del gen *NHA1* respectivamente. El fragmento correspondiente, que incluye ambas dianas, fue amplificado por PCR en condiciones que favorecían la introducción de mutaciones, sometido

a restricción por ambas enzimas y utilizado para sustituir el mismo fragmento *SpeI/SalI* en la construcción original. El resultado fue una biblioteca de clones de *NhaI* enriquecidos en mutaciones en la zona 775-980. Mediante esta técnica se generaron y analizaron unos 30.000 clones entre los que se identificaron 121 incapaces de permitir el crecimiento de la cepa JC002 en presencia de doxiciclina. De éstos, un gran número presentaba delecciones (45), inserciones (1) o mutaciones múltiples, que hacían difícil identificar cuáles de los elementos mutados eran responsables de la pérdida de fenotipo de *NhaI*. También encontramos cambios que definían codones de stop en las posiciones 788, 797, 811, 822, 827 y 890 (ver fig. 7). Se realizó un análisis de crecimiento en altas concentraciones de potasio, litio y sodio de la cepa hipersensible B31 al sobreexpresar estos plásmidos. Tras este análisis pudimos observar que la versión con el stop en la posición 890 era capaz de mejorar el crecimiento de estas células en condiciones de alto sodio (0,4 M) y, sobre todo, de alto litio (20 mM), en mayor medida que el antiportador nativo o el resto de versiones con señales de stop encontradas por mutagénesis al azar (no mostrado). El crecimiento en medios con KCl 1M no reveló diferencias entre la tolerancia conferida estas versiones truncadas y la versión completa del antiportador, con la excepción de la versión truncada en el residuo 788, que permitió un crecimiento de la cepa B31 en estas condiciones ligeramente menor que el producido por el resto de versiones (no mostrado). El mayor crecimiento en presencia de sodio o litio conferido por la versión con el stop en la posición 890 concuerda bien con los fenotipos en tolerancia a sodio observados tras la sobreexpresión de las versiones deleccionadas a partir del residuo 923 (este trabajo) o la construcción del plásmido pCSCY, una versión deleccionada a partir del residuo 888 (Prior y col. 1996, Bañuelos y col. 1998).

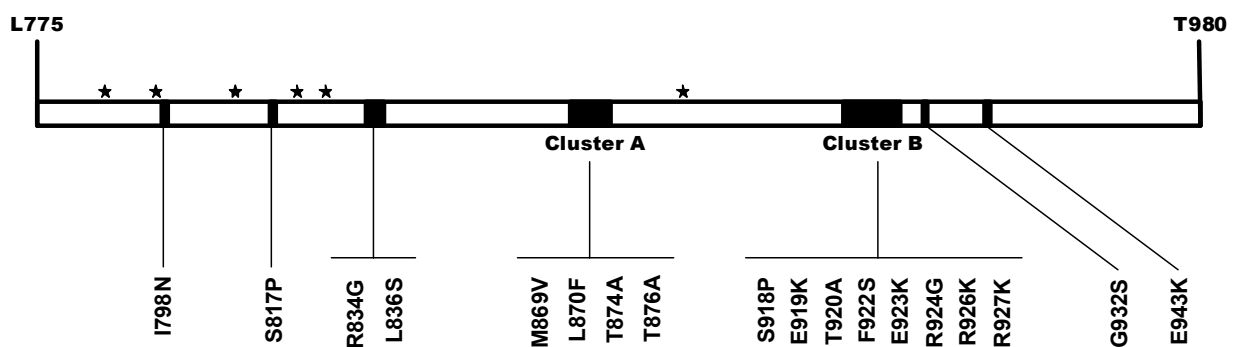


Fig. 7: Representación esquemática de la zona carboxi-terminal de *NhaI* donde se han introducido mutaciones al azar por *Random Mutagenesis* PCR. Los asteriscos indican cambios que provocan codones de stop. Los bloques negros indican mutaciones puntuales que provocan los cambios aminoacídicos especificados.

Este *screening* permitió también la identificación de 18 mutaciones puntuales que reducían o eliminaban la capacidad de Nha1 para permitir el crecimiento de la cepa JC002 en condiciones restrictivas (ver fig. 7). Estas mutaciones se encuentran distribuidas entre los residuos 798 y 943 y afectan a los tres bloques delecionados mencionados anteriormente, aunque se agrupan principalmente en dos regiones. La primera de ellas se extiende entre las posiciones 869 y 876 (cluster A), donde se han identificado mutaciones en 4 de sus 8 residuos. Los cambios L870F y T874A causan una pérdida parcial de la funcionalidad de Nha1 como regulador de ciclo, ya que permiten el crecimiento, aunque de manera muy débil, de la cepa JC002 en presencia de doxiciclina. Por el contrario, la mutación T876A provoca un bloqueo total del crecimiento de esta cepa incluso a los 7 días de incubación, cuando normalmente se puede observar un mínimo crecimiento por una cierta recuperación del efecto de la doxiciclina. El comportamiento de la versión con el cambio M869V es intermedio, equivalente al del plásmido vacío. La segunda región con una gran concentración de mutaciones detectadas (cluster B) se extiende entre los residuos 918 y 927 y sólo en dos de ellos (E921 y Q925) no se han identificado cambios aminoacídicos. La mayoría de estos cambios conducen a un bloqueo total del crecimiento de la cepa JC002, como lo hace el cambio T876A. Sin embargo, uno de ellos (T920A) permite el crecimiento, aunque muy lento, de esta cepa. El resto de mutaciones identificadas pueden clasificarse en una pareja de cambios próximos entre sí (R834G y L836S), dos mutaciones halladas *upstream* (I798N y S817P) y dos *downstream* (G932S y 943K) de los citados clusters. Todas estas versiones mutadas de *NHA1* de fueron analizadas en cuanto a su capacidad para conferir tolerancia a potasio, sodio y litio a la cepa B31. Las versiones con mutaciones en el cluster B fueron capaces de conferir una menor tolerancia a potasio que el antiportador nativo, tal como ocurría con algunas versiones con deleciones internas o carboxi-terminales analizadas anteriormente. En cambio, las mutaciones del cluster A no afectaron a la tolerancia a este catión conferida por Nha1 (datos no mostrados). Este hecho vendría a confirmar que, pese a encontrarse en zonas cercanas de la proteína, los elementos de Nha1 necesarios para sus funciones como regulador del ciclo celular y como transportador de potasio no son los mismos o, al menos, esta capacidad de transporte de potasio no es directamente responsable de la funcionalidad del antiportador como elemento regulador de la transición G1/S.

Al analizar el fenotipo de tolerancia a sodio conferido por estas versiones del antiportador observamos que, salvo el cambio M869V, todas las mutaciones del cluster A produjeron, en mayor o menor medida, una menor tolerancia a este catión que la conferida por la proteína nativa. La sobreexpresión de las versiones con mutaciones en el cluster B presentó un fenotipo variable, ya que, mientras los cambios T920A y R924G produjeron un incremento en la tolerancia a NaCl, el cambio R926K provocó un severo descenso en la capacidad de Nha1 para conferir tolerancia a esta sal a la cepa B31. En el ensayo de tolerancia a litio no se observaron diferencias significativas en el fenotipo producido por estas versiones de Nha1 cuando se crecían los cultivos en presencia de concentraciones bajas de este catión (10 mM). A concentraciones mayores (20 mM), la sobreexpresión de la proteína nativa, al igual que la de todas las versiones con cambios en el cluster A, fue incapaz de permitir el crecimiento de la cepa B31. Sin embargo, los cambios en las posiciones 798, 817, 932 y 943 y los incluidos en el cluster B incrementaron fuertemente la actividad del transportador, permitiendo el crecimiento de la cepa B31 en estas condiciones. La única excepción la observamos en el cambio R926K, que no fue capaz de mejorar el crecimiento de esta cepa en presencia de LiCl 20 mM. A concentraciones menores de LiCl (10 mM), el crecimiento conferido por esta versión fue incluso ligeramente inferior al producido por la sobreexpresión del antiportador en su estado original (no mostrado). Cabe remarcar que el mismo cambio aminoacídico producido en el residuo siguiente (R927K) no reduce la capacidad de Nha1 para conferir tolerancia a sodio y litio e incluso provoca una mayor capacidad de detoxificación de este último catión.

La identificación de mutaciones con un efecto relativamente débil sobre la funcionalidad en ciclo celular de Nha1 (como L870F, T874A o T920A) junto con la existencia de mutaciones que parecen comportarse como dominantes negativos, al agravar el defecto de crecimiento producido por la doxiciclina (como la mayoría de las mutaciones del cluster B), son hechos compatibles con la posibilidad de que la región comprendida entre los residuos 800-954 del antiportador tenga una función reguladora de la actividad de la proteína. Esta actividad reguladora no sería únicamente sobre su función en el ciclo celular, sino que se extendería también a su papel como detoxificador de cationes monovalentes. Con la única excepción del cambio R926K, todas las mutaciones encontradas desde el residuo 918 hasta el extremo carboxi-terminal de la proteína causan un incremento en la tolerancia a LiCl

producida por Nha1, lo que indica que esta zona contendría elementos negativos para el transporte de Li^+ . Estos datos confirman y amplían resultados previos que habían descrito que el truncamiento de la proteína en los residuos 920, 923 y 928 producía un aumento en la tolerancia a litio (Kinclová y col. 2001). La observación de que las versiones de Nha1 truncadas en los residuos 888 y 890 también provocan una mayor tolerancia a este catión (Bañuelos y col. 1998, este trabajo) sugeriría que este elemento negativo se extendería al menos 20 residuos hacia el extremo amino-terminal de la proteína.

3.4) Reflexiones sobre el papel regulador del extremo carboxi-terminal de Nha1.

Nuestros datos demuestran que la zona carboxi-terminal de Nha1 ejerce, de manera específica, un papel regulador sobre diferentes funciones del antiportador. En algunos antiportadores sodio/protón de mamíferos, se ha descrito un sistema similar de regulación de su actividad. De hecho, las colas carboxi-terminales de NHE3 y otros antiportadores similares han sido identificadas como dianas de regulación (para revisiones ver Counillon y Pouyssegur 2000 y Hayashi y col. 2002), incluyendo la fosforilación por diferentes proteína quinasa. Cinco de las mutaciones puntuales encontradas por mutagénesis al azar corresponden a residuos de Ser o Thr que se encuentran en contextos favorables (Blom y col. 1999) de fosforilación por la caseína quinasa-2 (S^{817} , S^{918} y T^{920}), la proteína quinasa dependiente de AMPc (T^{874}) o la calcio-calmodulina quinasa II (T^{876}). Otro sistema de regulación de la actividad de NHE3 lo constituyen una serie de proteínas llamadas NHERFs. Estas proteínas reguladoras son capaces de interactuar con la región carboxi-terminal de algunos antiportadores de mamíferos (para revisión ver Counillon y Pouyssegur 2000). Es significativo que mientras la cola carboxi-terminal de Nha1 no presenta similitud de secuencia con otras proteínas, sí podemos encontrar un elemento estructural bastante similar al cluster B en una de las variantes de uno de estos factores de regulación, NHERF2/E3KARP (Yun y col. 1997). Dado que el cluster B está conservado en muchas levaduras y hongos (Kamauchi y col. 2002, este trabajo) podemos imaginar que, mientras que en los antiportadores de mamíferos la función de antiportador (en este caso NHE3) y la función reguladora (en este caso E3KARP) radican en dos proteínas distintas, algunos antiportadores de eucariotas simples están ejerciendo ambas funciones. En esta hipótesis, la mitad amino-terminal de estos antiportadores tendría la función transportadora mientras que el extremo carboxi terminal (donde hallamos el cluster B) sería el encargado de la regulación de esta función.

En este trabajo se describe un papel bifuncional de la proteína Nha1. Una posibilidad que explicaría la independencia entre la funcionalidad en el ciclo celular y la capacidad detoxificadora de cationes del antiportador, sería un posible papel sensor de diferentes parámetros extracelulares por parte de Nha1. En esta hipótesis la zona amino-terminal del

antiportador, además de actuar como transportador de diferentes cationes, sería la encargada detectar ciertos cambios en el medio externo, mientras que la zona carboxi-terminal podría actuar como transductor de señales que intervendrían en la progresión del ciclo celular. No es raro encontrar ejemplos de casos similares en la bibliografía, como el caso de la permeasa Mep2. Esta proteína participa no sólo en el transporte de NH_4 sino también en la transmisión de señal que induce el crecimiento pseudohifal en condiciones de bajo amonio. Se ha demostrado mediante análisis por mutagénesis que esta señalización es independiente de la actividad de Mep2 como permeasa (Lorenz y Heitman 1998), lo que deja abierta la posibilidad de que suceda lo mismo en el caso de Nha1. Es interesante remarcar que las homólogas de Mep2, Mep1 y Mep3 son activas como transportadoras de amonio pero no son necesarias en el crecimiento filamentoso (Lorenz y Heitman 1998), por lo que suponemos que no tienen este papel sensor/transductor de señal. En el caso de los antiportadores de levadura podría estar sucediendo algo parecido; mientras que Nha1 podría tener una función transductora de señales positivas para la progresión de la transición G1/S, encontramos proteínas como Cnh1, activa como transportador pero incapaz de realizar una función reguladora del ciclo celular.

Si asumimos un papel transductor de señal de Nha1 o un control de su actividad por parte de proteínas reguladoras (similares a los NHERFs de mamíferos), es lógico suponer la existencia de proteínas que pueden interaccionar con Nha1. A fin de identificar estas proteínas, realizamos un ensayo de doble híbrido utilizando la cola carboxi-terminal del antiportador como cebo y enfrentándola a una biblioteca de levadura. Sin embargo, mediante este ensayo no fuimos capaces de detectar interacciones. No obstante, una aproximación, diferente basada en la identificación de complejos proteicos por espectrometría de masas, ha permitido identificar la interacción de Nha1 con la proteína codificada por el gen *YHL010c* (Ho y col. 2002). Este gen codifica una proteína de 585 residuos que presenta una considerable similitud con BRAP2, una proteína humana capaz de unirse a los motivos de señalización nuclear de BRCA1 (Li y col. 1998). BRCA1 es el producto de un gen relacionado con la susceptibilidad al cáncer de mama que interviene en la recombinación homóloga, la reparación del DNA y la regulación transcripcional (Welsh y col. 2000). El análisis de la secuencia aminoacídica de YHL010c revela dominios estructurales presentes en otras proteínas. La función de este tipo de dominios se ha relacionado, en algunos casos, con

la proliferación celular, la transducción de señales y la interacción proteína-proteína. Estos datos plantean la hipótesis de que residuos de Nha1 importantes para su funcionalidad se encuentren implicados en la unión a YHL010c o en la señalización a través de esta proteína. A fin de comprobar esta posibilidad, partiendo de JC002 y B31, generamos dos nuevas cepas en las que se deleccionó el gen *YHL010c*. En ellas, analizamos la funcionalidad de Nha1 como regulador de ciclo celular y como elemento detoxificador de cationes, respectivamente. El resultado de este análisis no reveló diferencias entre la funcionalidad del antiportador en las cepas originales (con *YHL010c* intacto) y en las que presentan *YHL010c* deleccionado (no mostrado). Este hecho cuestiona la hipotética relación entre YHL010c y Nha1.

III - Conclusiones

1. Hemos construido un mutante letal condicional *sit4 hal3* (cepa JC002) que reproduce el bloqueo en la transición G1/S del ciclo celular característico del doble mutante. En consecuencia, esta cepa constituye un buen modelo para el estudio de genes que intervienen en la regulación de este punto del ciclo celular de *S. cerevisiae*.
2. El empleo de la cepa JC002 ha permitido la identificación del antiportador Nha1 como un elemento regulador de la transición G1/S.
3. La capacidad de eliminación de sodio de Nha1 no es la responsable de la función del antiportador como regulador del ciclo celular, ya que:
 - La expresión de otras proteínas como Ena1 o Sod2, activas como transportadores de sodio, no es capaz de mimetizar el efecto de Nha1 en el ciclo celular.
 - Mutaciones en Nha1 que afectan la capacidad detoxificadora de sodio, no alteran su funcionalidad en el control del ciclo celular.
4. La mitad carboxi-terminal de Nha1 es necesaria, pero no suficiente, para su funcionalidad en el ciclo celular, ya que:
 - La región comprendida entre los residuos 800 y 948 de Nha1 contiene elementos estructurales imprescindibles para su papel en el control del ciclo celular. Estos elementos se hallan repartidos a lo largo de la mencionada región.
 - La expresión de la mitad carboxi-terminal de Nha1 es necesaria pero no suficiente para mantener la función reguladora del ciclo celular, puesto que la expresión de esta parte del antiportador, ya fuera de manera soluble como anclada a membrana a través de los elementos transmembrana de Ste2, no fue capaz de realizar esta función.
5. Residuos importantes para la actividad de Nha1 como transportador de potasio se localizan en la mitad carboxi-terminal de la proteína, en una zona que también resulta necesaria para su función reguladora del ciclo celular.

6. La actividad transportadora de potasio de Nha1 no es la responsable de su papel como regulador del ciclo celular, ya que:
 - Proteínas heterólogas transportadoras de potasio, como Cnh1, no son capaces de ejercer el papel de Nha1 en la transición G1/S.
 - Mutaciones que eliminan la capacidad de Nha1 como regulador del ciclo celular no afectan su capacidad transportadora de potasio.
 - En condiciones de pH extracelular en las que se pierde la actividad intercambiadora de cationes de Nha1 se mantiene su funcionalidad en la regulación de la progresión G1/S.

7. La mitad transmembrana de Nha1 contiene elementos estructurales, ausentes en Sod2, imprescindibles para la funcionalidad de Nha1 como regulador del ciclo celular y como transportador de potasio.

8. Hemos identificado por mutagénesis al azar un total de 18 cambios aminoacídicos y 6 codones de stop que afectan a la región carboxi-terminal de Nha1. Estas mutaciones definen una serie de elementos y residuos necesarios para su función reguladora de ciclo celular.

9. Algunos de los cambios identificados resultan también importantes para la actividad transportadora de sodio, litio o potasio de Nha1, lo que indica que estos elementos carboxi-terminales modulan el transporte de cationes a través de estructuras transmembrana de la proteína.

IV - Bibliografía

- Alepuz, P. M., K. W. Cunningham, and F. Estruch.** 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol. Microbiol.* **26**:91-98.
- Aloy, P., J. Cedano, B. Oliva, F. X. Aviles, and E. Querol.** 1997. 'TransMem': a neural network implemented in Excel spreadsheets for predicting transmembrane domains of proteins. *Comput. Appl. Biosci.* **13**:231-234.
- Andrews, P. D. and M. J. Stark.** 2000. Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 3)**:507-520.
- Ariño, J.** 2002. Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.* **269**:1072-1077.
- Balcells, L., N. Gomez, A. Casamayor, J. Clotet, and J. Ariño.** 1997. Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **250**:476-483.
- Bañuelos, M. A., H. Sychrová, C. Bleykasten-Grosshans, J. L. Souciet, and S. Potier.** 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144 (Pt 10)**:2749-2758.
- Bañuelos, M. A., J. Ramos, F. Calero, V. Braun, and S. Potier.** 2002a. Cation/H⁺ antiporters mediate potassium and sodium fluxes in *Pichia sorbitophila*. Cloning of the PsNHA1 and PsNHA2 genes and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**:1365-1372.
- Bañuelos, M. A., M. C. Ruiz, A. Jiménez, J. L. Souciet, S. Potier, and J. Ramos.** 2002b. Role of the Nha1 antiporter in regulating K⁽⁺⁾ influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**:9-15.
- Bastians, H. and H. Ponstingl.** 1996. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J. Cell Sci.* **109 (Pt 12)**:2865-2874.
- Beck, T. and M. N. Hall.** 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**:689-692.
- Bellí, G., E. Gari, M. Aldea, and E. Herrero.** 1998. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* **14**:1127-1138.
- Bertl, A., C. L. Slayman, and D. Gradmann.** 1993. Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* **132**:183-199.
- Bertl, A., H. Bihler, J. D. Reid, C. Kettner, and C. L. Slayman.** 1998. Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membr. Biol.* **162**:67-80.

- Bihler, H., C. L. Slayman, and A. Bertl.** 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **432**:59-64.
- Bihler, H., C. L. Slayman, and A. Bertl.** 2002. Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim. Biophys. Acta* **1558**:109-118.
- Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak.** 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**:1351-1362.
- Blumer, K. J., J. E. Reneke, and J. Thorner.** 1988. The STE2 gene product is the ligand-binding component of the alpha-factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**:10836-10842.
- Catty, P., d. A. de Kerchove, and A. Goffeau.** 1997. The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.* **409**:325-332.
- Chen, K. C., A. Csikasz-Nagy, B. Gyorffy, J. Val, B. Novak, and J. J. Tyson.** 2000. Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Mol. Biol. Cell* **11**:369-391.
- Cheng, A., K. E. Ross, P. Kaldis, and M. J. Solomon.** 1999. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev.* **13**:2946-2957.
- Clotet, J., F. Posas, E. de Nadal, and J. Ariño.** 1996. The NH₂-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J. Biol. Chem.* **271**:26349-26355.
- Clotet, J., E. Gari, M. Aldea, and J. Ariño.** 1999. The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **19**:2408-2415.
- Cohen, P. T.** 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* **22**:245-251.
- Counillon, L. and J. Pouyssegur.** 2000. The expanding family of eucaryotic Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *J. Biol. Chem.* **275**:1-4.
- Crespo, J. L., K. Daicho, T. Ushimaru, and M. N. Hall.** 2001. The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**:34441-34444.
- De la Torre-Ruiz, M. A., J. Torres, J. Ariño, and E. Herrero.** 2002. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**:33468-33476.
- De Nadal, E., J. Clotet, F. Posas, R. Serrano, N. Gomez, and J. Ariño.** 1998. The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:7357-7362.
- Di Como, C. J., H. Chang, and K. T. Arndt.** 1995a. Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. *Mol. Cell Biol.* **15**:1835-1846.

- Di Como, C. J., R. Bose, and K. T. Arndt.** 1995b. Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in *sit4* mutants. *Genetics* **139**:95-107.
- Diatloff, E., R. Kumar, and D. P. Schachtman.** 1998. Site directed mutagenesis reduces the Na⁺ affinity of HKT1, an Na⁺ energized high affinity K⁺ transporter. *FEBS Lett.* **432**:31-36.
- Dibrov, P., P. G. Young, and L. Fliegel.** 1998a. Functional analysis of amino acid residues essential for activity in the Na⁺/H⁺ exchanger of fission yeast. *Biochemistry* **37**:8282-8288.
- Dibrov, P. and L. Fliegel.** 1998b. Comparative molecular analysis of Na⁺/H⁺ exchangers: a unified model for Na⁺/H⁺ antiport? *FEBS Lett.* **424**:1-5.
- Epstein, C. B. and F. R. Cross.** 1994. Genes that can bypass the CLN requirement for *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle START. *Mol. Cell Biol.* **14**:2041-2047.
- Eraso, P. and F. Portillo.** 1994. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.* **269**:10393-10399.
- Erez, O. and C. Kahana.** 2001. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **21**:175-184.
- Erez, O. and C. Kahana.** 2002. Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Δ trk2Δ* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**:1142-1149.
- Evans, D. R. and M. J. Stark.** 1997. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity, actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics* **145**:227-241.
- Fairman, C., X. Zhou, and C. Kung.** 1999. Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.* **168**:149-157.
- Fernandez-Sarabia, M. J., A. Sutton, T. Zhong, and K. T. Arndt.** 1992. SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes Dev.* **6**:2417-2428.
- Ferrando, A., S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano.** 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell Biol.* **15**:5470-5481.
- Forment, J., J. M. Mulet, O. Vicente, and R. Serrano.** 2002. The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1565**:36-40.
- Fromant, M., S. Blanquet, and P. Plateau.** 1995. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **224**:347-353.

- Garciadeblás, B., F. Rubio, F. J. Quintero, M. A. Bañuelos, R. Haro, and A. Rodríguez-Navarro.** 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:363-368.
- Gómez, M. J., K. Luyten, and J. Ramos.** 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:157-160.
- Goossens, A., F. N. de La, J. Forment, R. Serrano, and F. Portillo.** 2000. Regulation of yeast H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.* **20**:7654-7661.
- Hahnenberger, K. M., Z. Jia, and P. G. Young.** 1996. Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na⁺/H⁺ antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:5031-5036.
- Haro, R., B. Garcíadeblás, and A. Rodríguez-Navarro.** 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**:189-191.
- Haro, R., M. A. Bañuelos, F. J. Quintero, F. Rubio, and A. Rodríguez-Navarro.** 1993. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plantarum.* **89**:868-874
- Hayashi, H., K. Szaszi, and S. Grinstein.** 2002. Multiple modes of regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **976**:248-258.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleason, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. Hogue, D. Figeys, and M. Tyers .** 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**:180-183.
- Hunter, T. and G. D. Plowman.** 1997. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**:18-22.
- Janssens, V. and J. Goris.** 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**:417-439.
- 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.
- Jiang, Y. and J. R. Broach.** 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* **18**:2782-2792.

- Kakinuma, Y., T. Maruyama, T. Nozaki, Y. Wada, Y. Ohsumi, and K. Igarashi.** 1995. Cloning of the gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**:985-992.
- Kamauchi, S., K. Mitsui, S. Ujike, M. Haga, N. Nakamura, H. Inoue, S. Sakajo, M. Ueda, A. Tanaka, and H. Kanazawa.** 2002. Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na⁺/H⁺ antiporters (Nha1p). *J. Biochem. (Tokyo)* **131**:821-831.
- Kinclová, O., J. Ramos, S. Potier, and H. Sychrová.** 2001. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* **40**:656-668.
- Kinclová, O., S. Potier, and H. Sychrová.** 2002. Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H(+) antiporters into two subfamilies. *Microbiology* **148**:1225-1232.
- Ko, C. H., A. M. Buckley, and R. F. Gaber.** 1990. TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**:305-312.
- 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.
- Kuhne, C. and P. Linder.** 1993. A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle. *EMBO J.* **12**:3437-3447.
- Lee, K. S., L. K. Hines, and D. E. Levin.** 1993. A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell Biol.* **13**:5843-5853.
- Lesage, F., E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, M. Lazdunski, G. Romey, and J. Barhanin.** 1996. A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J. Biol. Chem.* **271**:4183-4187.
- Levine, K., K. Huang, and F. R. Cross.** 1996. *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Mol. Cell Biol.* **16**:6794-6803.
- Li, S., C. Y. Ku, A. A. Farmer, Y. S. Cong, C. F. Chen, and W. H. Lee.** 1998. Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs. *J. Biol. Chem.* **273**:6183-6189.
- Lorenz, M. C. and J. Heitman.** 1998. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**:1236-1247.
- Loukin, S. H. and Y. Saimi.** 2002. Carboxyl tail prevents yeast K(+) channel closure: proposal of an integrated model of TOK1 gating. *Biophys. J.* **82**:781-792.
- Luke, M. M., S. F. Della, C. J. Di Como, H. Sugimoto, R. Kobayashi, and K. T. Arndt.** 1996. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell Biol.* **16**:2744-2755.

- Madrid, R., M. J. Gomez, J. Ramos, and A. Rodriguez-Navarro.** 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**:14838-14844.
- Mann, D. J., V. Dombradi, and P. T. Cohen.** 1993. *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *EMBO J.* **12**:4833-4842.
- Márquez, J. A. and R. Serrano.** 1996. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**:89-92.
- Márquez, J. A., A. Pascual-Ahuir, M. Proft, and R. Serrano.** 1998. The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J.* **17**:2543-2553.
- 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.
- Matheos, D. P., T. J. Kingsbury, U. S. Ahsan, and K. W. Cunningham.** 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**:3445-3458.
- Mendenhall, M. D. and A. E. Hodge.** 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1191-1243.
- Mendizábal, I., A. Pascual-Ahuir, R. Serrano, and I. F. de Larrinoa.** 2001. Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol. Genet. Genomics* **265**:801-811.
- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, and J. M. Pardo.** 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:8792-8796.
- Mitchell, D. A. and G. F. Sprague, Jr.** 2001. The phosphotyrosyl phosphatase activator, Ncs1p (Rrd1p), functions with Cla4p to regulate the G(2)/M transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **21**:488-500.
- 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.
- Muñoz, I., E. Simón, N. Casals, J. Clotet, and J. Ariño.** 2003. Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**:157-169.
- Nasmyth, K.** 1993. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:166-179.

- Nasmyth, K. and L. Dirick.** 1991. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**:995-1013.
- Nass, R. and R. Rao.** 1998. Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**:21054-21060.
- Nozaki, T., K. Nishimura, A. J. Michael, T. Maruyama, Y. Kakinuma, and K. Igarashi.** 1996. A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**:452-458.
- Ogas, J., B. J. Andrews, and I. Herskowitz.** 1991. Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* **66**:1015-1026.
- Orlowski, J. and S. Grinstein.** 1997. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**:22373-22376.
- Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski, B. Nelissen, A. Goffeau, and M. H. Saier, Jr.** 1998. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **430**:116-125.
- Posas, F., J. Clotet, and J. Ariño.** 1991. *Saccharomyces cerevisiae* gene SIT4 is involved in the control of glycogen metabolism. *FEBS Lett.* **279**:341-345.
- Posas, F., A. Casamayor, and J. Ariño.** 1993. The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.* **318**:282-286.
- Posas, F., M. Camps, and J. Ariño.** 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**:13036-13041.
- Prior, C., S. Potier, J. L. Souciet, and H. Sychrová.** 1996. Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **387**:89-93.
- Proft, M. and R. Serrano.** 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.
- Putney, L. K., S. P. Denker, and D. L. Barber.** 2002. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**:527-552.
- Ramírez, J. and A. Peña.** 2000. Intercambiadores catión/protón en levaduras. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**:181-187.
- 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.

- Ramos, J., P. Contreras, and A. Rodríguez-Navarro.** 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. **143**:88-93
- Ramos, J., R. Haro, and A. Rodríguez-Navarro.** 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta **1029**:211-217.
- Ramos, J., R. Alijo, R. Haro, and A. Rodríguez-Navarro.** 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **176**:249-252.
- Ravna, A. W., I. Sylte, and S. G. Dahl.** 2001. Molecular model of the Escherichia coli Na⁺/H⁺ antiporter NhaA. Receptors. Channels **7**:319-328.
- Rempola, B., A. Kaniak, A. Migdalski, J. Rytka, P. P. Slonimski, and J. P. di Rago.** 2000. Functional analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **262**:1081-1092.
- Rodríguez-Navarro, A.** 2000. Potassium transport in fungi and plants. Biochim. Biophys. Acta **1469**:1-30.
- Ronne, H., M. Carlberg, G. Z. Hu, and J. O. Nehlin.** 1991. Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. Mol. Cell Biol. **11**:4876-4884.
- Rubio, F., M. Schwarz, W. Gassmann, and J. I. Schroeder.** 1999. Genetic selection of mutations in the high affinity K⁺ transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na⁺ permeability and increased Na⁺ tolerance. J. Biol. Chem. **274**:6839-6847.
- Ruiz, A., L. Yenush, and J. Ariño.** 2003. Regulation of the expression of the *ENAI* Na⁺-ATPase gene by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. Eukaryot. Cell. En prensa.
- Schwob, E. and K. Nasmyth.** 1993. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. **7**:1160-1175.
- Serrano, R., A. Ruiz, D. Bernal, J. R. Chambers, and J. Arino.** 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. Mol. Microbiol. **46**:1319-1333.
- 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 Ca²⁺-ATPases. Nature **319**:689-693.
- Serrano, R. and A. Rodríguez-Navarro.** 2001. Ion homeostasis during salt stress in plants. Curr. Opin. Cell Biol. **13**:399-404.
- Shi, H., M. Ishitani, C. Kim, and J. K. Zhu.** 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **97**:6896-6901.

- Shimanuki, M., N. Kinoshita, H. Ohkura, T. Yoshida, T. Toda, and M. Yanagida.** 1993. Isolation and characterization of the fission yeast protein phosphatase gene *ppe1+* involved in cell shape control and mitosis. *Mol. Biol. Cell* **4**:303-313.
- Soong, T. W., T. F. Yong, N. Ramanan, and Y. Wang.** 2000. The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na⁺ and H⁺ transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiology* **146** (Pt 5):1035-1044.
- Stark, M. J.** 1996. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* **12**:1647-1675.
- Stathopoulos, A. M. and M. S. Cyert.** 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**:3432-3444.
- Sutton, A., D. Immanuel, and K. T. Arndt.** 1991. The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell Biol.* **11**:2133-2148.
- Sychrová, H., J. Ramirez, and A. Peña.** 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**:167-172.
- Szöör, B., Z. Feher, T. Zeke, P. Gergely, E. Yatzkan, O. Yarden, and V. Dombradi.** 1998. *pzl-1* encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **1388**:260-266.
- Treitel, M. A., S. Kuchin, and M. Carlson.** 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **18**:6273-6280.
- Tu, J., W. Song, and M. Carlson.** 1996. Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **16**:4199-4206.
- Tyson, J. J., A. Csikasz-Nagy, and B. Novak.** 2002. The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* **24**:1095-1109.
- Van Hoof, C., V. Janssens, B. De, I, J. H. de Winde, J. Winderickx, F. Dumortier, J. M. Thevelein, W. Merlevede, and J. Goris.** 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* homologue YPA1 of the mammalian phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A controls progression through the G1 phase of the yeast cell cycle. *J. Mol. Biol.* **302**:103-120.
- Wakabayashi, S., P. Fafournoux, C. Sardet, and J. Pouyssegur.** 1992. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:2424-2428.
- Watanabe, Y., S. Miwa, and Y. Tamai.** 1995. Characterization of Na⁺/H(+)-antiporter gene closely related to the salt-tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **11**:829-838.
- Welsh, P. L., K. N. Owens, and M. C. King.** 2000. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.* **16**:69-74.

- Wiebe, C. A., E. R. Dibattista, and L. Fliegel.** 2001. Functional role of polar amino acid residues in Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochem. J.* **357**:1-10.
- Wieland, J., A. M. Nitsche, J. Strayle, H. Steiner, and H. K. Rudolph.** 1995. The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**:3870-3882.
- Wijnen, H. and B. Futcher.** 1999. Genetic analysis of the shared role of CLN3 and BCK2 at the G(1)-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **153**:1131-1143.
- Wijnen, H., A. Landman, and B. Futcher.** 2002. The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6. *Mol. Cell Biol.* **22**:4402-4418.
- Wittenberg, C., K. Sugimoto, and S. I. Reed.** 1990. G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* **62**:225-237.
- Yenush, L., J. M. Mulet, J. Ariño, and R. Serrano.** 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**:920-929.
- Yun, C. H., S. Oh, M. Zizak, D. Steplock, S. Tsao, C. M. Tse, E. J. Weinman, and M. Donowitz.** 1997. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:3010-3015.
- Zhou, X. L., B. Vaillant, S. H. Loukin, C. Kung, and Y. Saimi.** 1995. YKC1 encodes the depolarization-activated K⁺ channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett.* **373**:170-176.

V - Artículos presentados

A Screening for High Copy Suppressors of the *sit4 hal3* Synthetically Lethal Phenotype Reveals a Role for the Yeast Nha1 Antiporter in Cell Cycle Regulation*

Received for publication, March 5, 2001, and in revised form, May 22, 2001
Published, JBC Papers in Press, May 29, 2001, DOI 10.1074/jbc.M101992200

Ernesto Simón^{‡§}, Josep Clotet^{‡¶}, Fernando Calero^{||}, José Ramos^{||}, and Joaquín Ariño^{‡**}

From the [‡]Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, the [¶]Departament de Bioquímica, Facultat de Ciències de la Salut, Universitat Internacional de Catalunya, S. Cugat del Vallès, 08190, Barcelona, and the ^{||}Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, 14080, Córdoba, Spain

A screening for multicopy suppressors of the G₁/S blockage of a conditional *sit4 hal3* mutant yielded the *NHA1* gene, encoding a Na⁺,K⁺/H⁺ antiporter, composed of a transmembrane domain and a large carboxyl-terminal tail, which has been related to cation detoxification processes. Expression of either the powerful *Saccharomyces cerevisiae* Ena1 Na⁺/H⁺-ATPase or the *Schizosaccharomyces pombe* Sod2 Na⁺/H⁺ antiporter, although increasing tolerance to sodium, was unable to mimic the Nha1 function in the cell cycle. Mutation of the conserved Asp residues Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ selectively abolished Na⁺ efflux without modifying K⁺ efflux and did not affect the capacity of Nha1 to relieve the G₁ blockage. Mutagenesis analysis revealed that the region near the carboxyl-terminal end of Nha1 comprising residues 800–948 is dispensable for sodium detoxification but necessary for transport of K⁺ cations. Therefore, this portion of the protein contains structural elements that selectively modulate Nha1 antiporter functions. This region is also required for Nha1 to function in the cell cycle. However, expression of the closely related Cnh1 antiporter from *Candida albicans*, which also contains a long carboxyl-terminal extension, although allowing efficient K⁺ transport does not relieve cell cycle blockage. This indicates that although the determinants for Nha1-mediated regulation of potassium transport and the cell cycle map very closely in the protein, most probably the function of Nha1 on cell cycle is independent of its ability to extrude potassium cations.

The *Saccharomyces cerevisiae* gene *SIT4* encodes a type 2A-related Ser/Thr protein phosphatase (1) that is a homologue to *Schizosaccharomyces pombe* Ppe1 (2), *Drosophila* PPV (3), and human PP6 phosphatases (4). This phosphatase plays an important role in cell cycle regulation because it is required in late G₁ for progression into S phase (5, 6) and controls expression of

SWI4, *CLN1*, and *CLN2* in a pathway that is additive to that of *CLN3*. *SIT4* is required for both efficient DNA synthesis and bud emergence (7). Consequently, cells lacking Sit4 are either inviable or exhibit a slow growth phenotype (5).

The cell growth defect of *sit4Δ* mutants is largely overcome by high copy expression of the *SIS2/HAL3* gene (8). *HAL3* encodes a protein with a very acidic carboxyl-terminal region that was also identified by its ability to confer tolerance to high levels of sodium and lithium to yeast cells (9) and that has close relatives in plants (10). Although deletion of *HAL3* causes no evident growth defect, the gene is essential in the absence of *SIT4* function presumably because cells become fully arrested at the G₁/S transition (8). Therefore, Sis2/Hal3 appears to be a component of the cell cycle regulatory machinery. Recent work in our laboratory has revealed that Hal3 is a negative regulatory subunit of another Ser/Thr protein phosphatase, Ppz1 (11) and that, in fact, the function of Hal3 in cell cycle regulation is mediated by the Ppz1 phosphatase (12), which plays an opposite role to that of Sit4 in regulating the cell cycle.

The observation that *sit4* and *hal3* mutations display synthetic lethality prompted us to design a screen to search for novel components of the cell cycle regulatory machinery. To this end we constructed a conditional *sit4 hal3* mutant strain and transformed these cells with multicopy genomic libraries to identify genes that allowed growth under restrictive conditions. We describe here the isolation of the *NHA1* gene, encoding a 985-residue Na⁺,K⁺/H⁺ antiporter (13). This protein has been previously shown to be involved in maintaining Na⁺ and K⁺ fluxes and buffering cytosolic pH (14, 15). We present evidence that the function of Nha1 in the cell cycle requires structural determinants present at its carboxyl-terminal region and that this region is able to modulate the diverse functions of the protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth of *Escherichia coli* and Yeast Strains—*E. coli* strains DH5α or DH5 were used as a host for DNA cloning. Bacterial cells were grown at 37 °C in LB medium containing 50 μg/ml ampicillin for plasmid selection. *S. cerevisiae* cells were grown at 28 °C in YPD (10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone, and 20 g/liter dextrose) medium or, when indicated, in complete minimal (CM)¹ synthetic medium (16). Yeast strains used in this work were derived from strains JA100 (*MATa ura3-52 leu2-3, 112 trp1-1 his4 can-1*) or W303-1B (*MATα ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1*), and their relevant genotypes can be found in Table I. Strain JC173 was constructed by crossing strains JA104 and JA111.

Recombinant DNA Techniques, Plasmids, and Gene Disruptions—*E.*

* This work was supported by Grants PB98-0565-C4-02 and PB98-1036 (to J. A. and J. R., respectively) from Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Spain and by "Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya" 1999SGR-00100 (to J. A.) from the Generalitat de Catalunya. 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.

§ A recipient of a fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.

** To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Ed. V, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-5812182; Fax: 34-93-5812006; E-mail: Joaquin.Ariño@uab.es.

¹ The abbreviations used are: CM, complete minimal; PCR, polymerase chain reaction; kbp, kilobase pair(s); VHS, viable *hal3 sit4*.

TABLE I
Yeast strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Ref.
JA100	<i>MATαleu2-3, 112 ura3-52 trp1-1 his4 can1</i>	11
JA104	JA100-derived, <i>MATα hal3::LEU2</i>	12
JA110	JA100-derived, <i>MATα sit4::TRP1</i>	12
JA111	JA100-derived, <i>MATα sit4::TRP1</i>	12
JA121	<i>MATα/α SIT4/sit4::TRP1 BEM2/bem2::kanMX PPZ1/ppz1::URA3</i>	12
JC173	<i>MATα/α HAL3/hal3::LEU2 SIT4/sit4::TRP1</i>	This work
JC074	<i>MATα/α SIT4/sit4::TRP1 BEM2/bem2::kanMX; PPZ1/ppz1::URA3 NHA1/nha1::LEU2</i>	This work
JC002	JA110-derived, <i>MATα sit4::TRP1_{prom}tetO: HAL3</i>	This work
JC094	<i>MATαnha1::LEU2 sit4::TRP1</i>	This work
G19	W303-1B-derived, <i>MATα ena1Δ::HIS3::ena4Δ</i>	23
B31	G19-derived, <i>MATα ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1::LEU2</i>	14

coli and *S. cerevisiae* cells were transformed using standard techniques as described previously (11). Standard recombinant DNA techniques were carried out as described previously (17).

Construction of plasmid pJQ10, which allows overexpression of *Ena1* from the *PGK1* promoter, can be found in Benito *et al.* (18). Plasmid pCSCY, carrying a truncated version of *NHA1*, was described by Bañuelos *et al.* (14). Expression of the *S. pombe* *Sod2* antiporter was accomplished as follows. The intronic region of *sod2*⁺ was removed by sequential PCR (19) so that artificial *Bam*HI sites were added at the ends of the open reading frame. The amplification fragment was digested with *Bam*HI and cloned into the *Bgl*II site of plasmid pDB20L*Bgl*II (20) to allow expression from the powerful *ADHI* promoter, yielding plasmid pDBSod2. Plasmid VHS5A/Ura consists of a YEplac195 vector (21) containing a *Xba*I-*Sph*I 4.3-kbp insert starting from a *Xba*I site located at position -672 from the ATG codon of the *NHA1* open reading frame and includes 187 nucleotides of the YEpl13 vector (from the *Bam*HI cloning site to the vector *Sph*I site). Plasmid VHS5A/Leu consists of a YEplac181 vector containing the same insert. Expression of the *Candida albicans* antiporter *Cnh1* in budding yeast was accomplished as follows. A 4-kbp genomic fragment cloned into plasmid pBK-CMV (Stratagene) and comprising the entire *CNH1* open reading frame plus about 0.5 and 0.95 kbp of 5'- and 3'-flanking sequences, respectively (22), was recovered by digestion with *Sac*I and *Xba*I and cloned into these sites of plasmid YEplac195. This construct was then introduced into strains JC002 and B31.

Disruption of the *NHA1* gene in strain JA121 to generate strain JC074 was carried out by replacing a 1.0-kbp *Sna*BI-*Hinc*II fragment with a blunt-ended *Bgl*II 3.1-kbp fragment from plasmid YEpl13 containing the *LEU2* marker. This disruption is identical to that introduced at the *NHA1* locus in strain B31 (14).

Construction of Strain JC002 and Screening for Suppressors—To produce strain JC002 the *HAL3* promoter was replaced in strain JA110 (*sit4 Δ*), following the short flanking homology gene replacement strategy, by a cassette containing the *tetO* promoter element, which can be strongly repressed by doxycycline. The substitution cassette was obtained by PCR from plasmid pCM224 (24) using oligonucleotides that included sequences -300 to -260 and +1 to +42 of the *HAL3* gene. Positive clones were selected by growth on geneticin (G418) plates, and the correct replacement was verified by PCR analysis. As expected, strain JC002 failed to produce macroscopic colonies upon plating on media containing 20 μ g/ml doxycycline.

For suppressor screening, strain JC002 was transformed with two different genomic libraries constructed in YEpl13 and YEpl24 and plated on CM synthetic medium (lacking uracil or leucine as needed) in the presence of 20 μ g/ml doxycycline. Macroscopic colonies observed after 96 h of incubation were considered as positives and recovered. Clones bearing genes *SIT4* or *HAL3* in the plasmid-borne genomic insert were discarded at this stage by analytical PCR with appropriate oligonucleotides. Plasmids were recovered from the rest of the clones and subjected to restriction mapping with *Eco*RI to identify identical inserts. The fragment of the yeast genome contained in each independent clone was identified by DNA sequencing using specific oligonucleotides priming to regions nearby the cloning site of the vector, and comparison of the sequence was obtained with the *Saccharomyces* Genome Database.

Mutagenesis of *NHA1*—Mutated versions of *NHA1* were generated

by sequential PCR (19) as follows. In all cases plasmid VHS5A/Ura was used as the template, and amplified fragments were verified by DNA sequencing. To introduce stop codons at positions Glu⁹²³ (GAA \rightarrow TAA), Leu⁹⁴⁸ (TTA \rightarrow TAA), and Lys⁹⁷⁹ (AAA \rightarrow TAA) of the protein, the 4.3-kbp *Xba*I/*Sph*I fragment was cloned into the same sites of pUC19. A 1.15-kbp *Apa*I/*Sph*I fragment containing the desired mutations was amplified and used to replace the original fragment. The entire *Xba*I/*Sph*I fragment was then cloned back into YEplac195. Internal deletions at the carboxyl terminus were made by removing the region from nucleotides 1770 to 2662 of the *NHA1* open reading frame by digestion with *Bgl*II and replacing this region with PCR-amplified DNA fragments containing the indicated deletions. The mutagenized fragment was reintroduced directly into plasmid VHS5A/Ura. Changes to Asn of residues Asp²⁴¹ (GAT \rightarrow AAT) and Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ (GAT \rightarrow AAC, GAC \rightarrow AAC) were introduced in a 0.53-kbp *Pst*I-*Pst*I fragment, and this fragment was used to directly replace the wild type fragment in VHS5A/Ura.

Other Techniques—The budding index was determined by microscopic counting, and the DNA content was monitored by flow cytometry essentially as described by Clotet *et al.* (12). Growth on plates (drop tests) was assessed as described by Posas *et al.* (25). Tolerance to cations was determined in liquid cultures or plates as described previously (26). Transport of sodium and potassium was measured as described by Bañuelos *et al.* (14) and De Nadal *et al.* (27).

RESULTS

High Copy Expression of the *NHA1* Gene Suppress the Lethal Phenotype of a *sit4 hal3* Mutant—Strain JC002 was designed to produce a model for conditional blockage in the cell cycle at the G₁/S transition and, therefore, to serve as a starting point for the screening depicted in Fig. 1. Consequently, we first tested the terminal phenotype of strain JC002 upon exposure to doxycycline by measuring both the DNA content and the budding index of the cultures. As shown in Fig. 1, after 12 h of growth in the presence of doxycycline, most cells have unbudded, rounded morphology and a haploid content of DNA, indicating that most of them were in G₁ phase. Therefore, strain JC002 was considered a suitable model for our studies.

The transformation of strain JC002 with multicopy genomic yeast libraries yielded about 200 clones able to develop macroscopic colonies within 2–4 days of incubation on synthetic medium in the presence of doxycycline. These clones were denominated VHS (for viable *hal3 sit4*). Characterization of the molecular nature of the inserts present in the different plasmids revealed a number of genes responsible for suppression that will be described in detail elsewhere. In several cases, inserts contained genes previously related to cell cycle regulation at the G₁/S transition, such as *CLN3* and *BCK2*. However, the presence of the *NHA1* gene in three of those VHS clones drew immediately our attention because, although previously related to cation detoxification, *Nha1* had never been directly related to cell cycle regulation. Subcloning of the genomic inserts revealed that the suppressor effect could be indeed attributed to the *NHA1* gene (Fig. 2).

Because the G₁/S blockage of strain JC002 is based on the effect of doxycycline and because *NHA1* encodes a permease, we considered the possibility that expression of the antiporter might affect doxycycline transport, giving rise to artifactual effects. To test this possibility, we transformed the diploid strain JC173 (heterozygous for the *sit4 hal3* mutations) with the VHS5A/Ura construct, a high copy plasmid bearing the *NHA1* gene, and induced sporulation. Tetrad analysis revealed that, when bearing the *NHA1* gene, viable *sit4 hal3* haploids could be recovered, thus confirming the notion that high levels of *Nha1* have a positive effect on cell cycle G₁/S transition. This idea was reinforced by the observation that the transformation of *sit4* cells with the same plasmid partially alleviated the slow growth phenotype of these cells (not shown) and accelerated the recovery from an α -factor G₁ arrest as deduced from monitoring the budding index and DNA content of the cultures (Fig.

FIG. 1. A, schematic depiction of the rationale for the screening. See main text for details. B, terminal phenotype of strain JC002 under nonpermissive conditions. JC002 cells were grown on YPD medium in the presence (+) or absence (-) of 20 μ M doxycycline (*dox*). Samples were taken at the indicated times, and DNA content was analyzed by flow cytometry. Inset percentages indicate the percentage of budding cells of the samples as determined by microscopic observation.

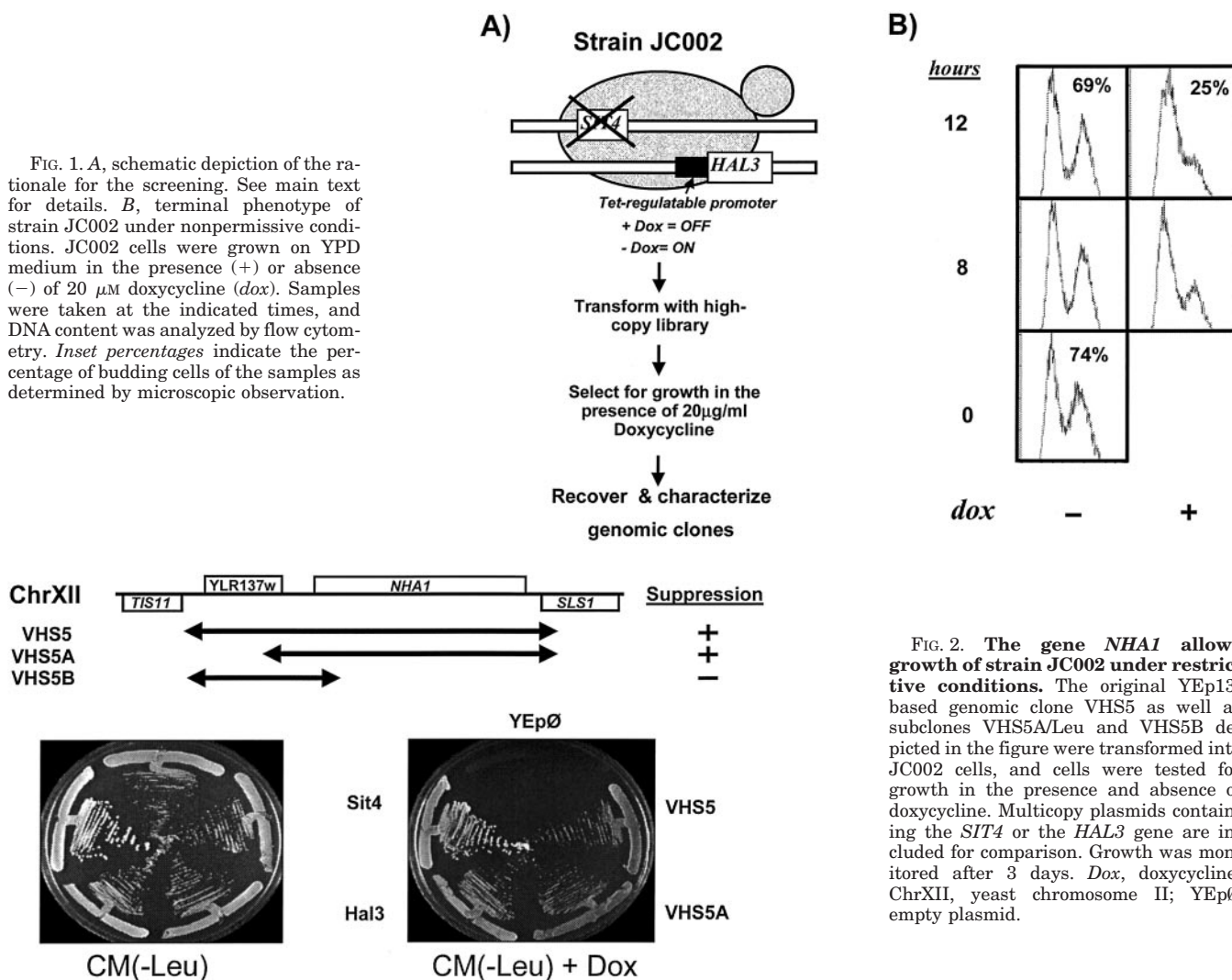


FIG. 2. The gene *NHA1* allows growth of strain JC002 under restrictive conditions. The original YE ρ 13-based genomic clone VHS5 as well as subclones VHS5A/Leu and VHS5B depicted in the figure were transformed into JC002 cells, and cells were tested for growth in the presence and absence of doxycycline. Multicopy plasmids containing the *SIT4* or the *HAL3* gene are included for comparison. Growth was monitored after 3 days. *Dox*, doxycycline; ChrXII, yeast chromosome II; YE ρ , empty plasmid.

3). However, in contrast with the *sit4 hal3* phenotype, a haploid *sit4 nha1* mutant (strain JC094) is viable as established by tetrad analysis of the heterozygous diploid strain JC074 (not shown).

Alternative Transporters Involved in Sodium Detoxification Cannot Replace *Nha1*—*NHA1* was initially identified as a gene able, when in high copy number, to increase tolerance to sodium and lithium cations. We decided to test whether overexpression of the Na⁺-ATPase *Ena1*, which represents the most important element for sodium and lithium efflux in budding yeast, could mimic the effect of expression of the *Nha1* on JC002 cells. Fig. 4A shows that a high level of *Ena1* results in a remarkable increase in lithium tolerance (lithium, a highly toxic analog of sodium, was used here to avoid osmotic effects derived from the use of high concentrations of NaCl). In contrast, no growth was observed when JC002 cells were incubated in the presence of doxycycline. Then we constructed a system to overexpress the Na⁺/H⁺ antiporter *Sod2* from the fission yeast *S. pombe*. This protein is quite similar to the NH₂-terminal half of *Nha1* (over 35% identity with about 58% conserved residues) and has been shown to function in budding yeast (28, 29). Fig. 4B shows that the ability of our *Sod2* expression system to increase sodium tolerance was even higher than that conferred by high copy *NHA1* expression. However, overexpression of *Sod2* was completely unable to suppress the conditional *sit4 hal3* phenotype of strain JC002, indicating that this alternative Na⁺/H⁺ antiporter cannot re-

place *Nha1*. High copy expression of the *S. cerevisiae* *KHA1* K⁺/H⁺ antiporter (30) in JC002 cells also failed to mimic the effect of *Nha1* on cell growth (data not shown).

The Carboxyl-terminal Region of *Nha1* Is Required for Function in the Cell Cycle—Despite the results described above, the possibility that the role of *Nha1* in sodium detoxification might be related to the observed phenotype in the cell cycle still remained. To evaluate this possibility we transformed strain JC002 with plasmid pCSCY, which carries in high copy a version of *NHA1* encoding a protein that lacks 97 residues of the carboxyl terminus (14). This gene product has been characterized as being even more active than the wild type protein in cation detoxification (Ref. 14 and this work). However, to our surprise, pCSCY was unable to allow growth of strain JC002 in the presence of doxycycline (Fig. 5B). To confirm this observation we introduced, by site-directed mutagenesis, stop codons at positions 923, 948, and 979 of the *NHA1* open reading frame and tested the effect of these constructs in strain JC002 for cell growth and in strain B31 (*ena1-4Δ nha1Δ*) for sodium tolerance. As shown in Fig. 5B, all constructs tested conferred a level of sodium tolerance comparable with that of the wild type gene (or even higher). Versions of the antiporter lacking from residues 948 or 979 to the end of the protein allowed growth of strain JC002 under nonpermissive conditions, but the version lacking from residue 923 to the end of the protein did not, indicating that the region between residues 923 and 947 contains elements essential for this function.

FIG. 3. Effect of high copy expression of *NHA1* on *sit4* cells. Wild type (●) or *sit4* cells (○) bearing an empty plasmid as well as *sit4* cells carrying the VHS5A/Ura plasmid (▼, *YEpNHA1*) were arrested in G₁ by incubation with α -factor. The pheromone was washed out, and entry into cell cycle was monitored by both measuring the budding index (right) and the DNA content (left).

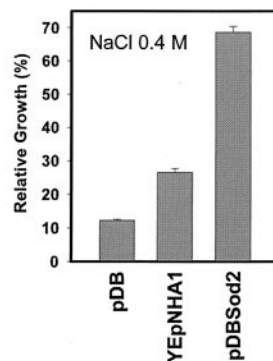
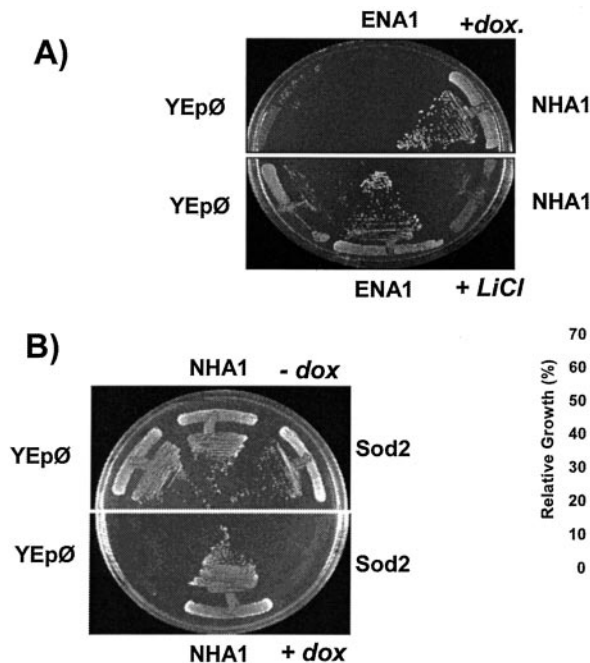
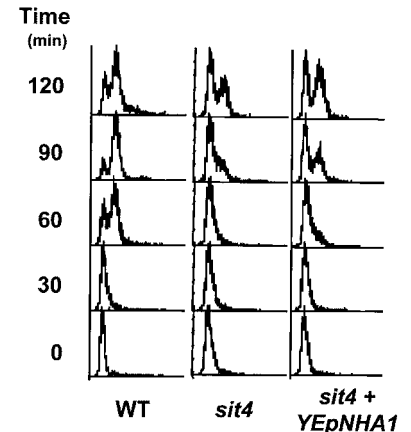
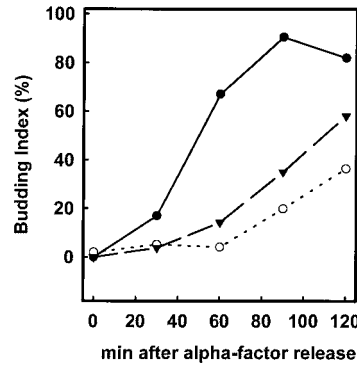


FIG. 4. Expression of *S. cerevisiae* Ena1 Na⁺-ATPase or *S. pombe* Sod2 Na⁺/H⁺ antiporter does not mimic the effect of Nha1 on cell cycle. **A**, YEp24 plasmid carrying no insert (*YEp \emptyset*), plasmid pJQ10 (*ENA1*) overexpressing the Na⁺-ATPase, or the NHA5A/Ura construct were introduced in JC002 cells. Positive clones were tested for growth on CM plates lacking uracil and containing doxycycline (20 μ g/ml) or 200 mM LiCl after 3 days. **B**, left, strain JC002 was transformed with an empty YEp181 plasmid (*YEp \emptyset*), the VHS5A/Leu construct (*NHA1*), or plasmid pDBSod2 (*Sod2*), and positive clones were streaked on CM plates lacking leucine in the absence (upper half) or the presence (lower half) of doxycycline (*dox*). Right, the above-mentioned constructs were introduced into G19 cells (*ena1-ena4 Δ*) and tested for growth in YPD medium adjusted to pH 5.5 in the presence of 0.4 M NaCl. Relative growth was calculated as the ratio between growth in the presence and growth in the absence of added salt and expressed as a percentage. Data are means \pm S.E. from five to seven independent clones.

To establish the limits of the carboxyl-terminal region required for the Nha1 antiporter to play a positive role in the cell cycle, several deletions starting from residue 642 were made. The results presented in Fig. 5C clearly show that forms of Nha1 lacking residues from 642 to 828 cannot produce viable JC002 cells in the presence of doxycycline. When residues 642–799 are deleted, the protein still retains its function, although in this case growth is clearly less vigorous than that observed for the full protein or for a version with deletions from residues 642 to 700. None of the deletions tested resulted in significant changes in the capacity of the antiporter to confer sodium tolerance.

We have also constructed a version of Nha1 carboxyl terminally tagged with a triple hemagglutinin epitope, and we observed that this construct was able to both increase sodium tolerance in B31 cells and allow growth of JC002 cells. However, a version carrying a large NH₂-terminal deletion (from residues 18 to 345) that removed the first six predicted transmembrane segments but entirely retained the carboxyl-terminal half was not functional at all (data not shown). This amino terminally deleted version was recovered only in the soluble cell fraction. Moreover, we fused the carboxyl-terminal half of Nha1 (from residue 441, right after the last predicted transmembrane domain, to the stop codon) to the end of the open reading frame of Ste2, a seven transmembrane domain phero-

none receptor. This hybrid protein, as the entire Nha1, was recovered in nonsoluble fractions but did not suppress the G₁/S blockage of JC002 cells. Immunoblot analysis indicated that all these constructs were expressed at similar levels.

The Capacity of Nha1 to Detoxify Sodium Ions Is Not Required for Its Role in the Cell Cycle—The data shown above clearly indicated that the capacity for sodium detoxification was not sufficient to ensure the role of Nha1 in the cell cycle. To further test whether sodium detoxification was a necessary event, we took advantage of previous knowledge on *S. pombe* Sod2 function. We constructed versions of Nha1 in which the conserved Asp residues Asp²⁴¹ and Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ were mutated to Asn. These mutations were known to reduce or suppress the transporter activity of Sod2 (31). As shown in Fig. 6B, mutation of the conserved Asp²⁴¹ did not affect the ability of Nha1 to confer Na⁺ tolerance to B31 cells, whereas the change of both Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ completely abolished this property. Remarkably, when the same constructs were tested for growth of JC002 in the presence of doxycycline, cells carrying the D241N version grew rather poorly, whereas the Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ construct grew similarly to those bearing the wild type antiporter (Fig. 6A). All these results clearly indicate that the ability of Nha1 to detoxify sodium cations is not required to fulfill its role in the cell cycle.

It has been recently reported that, in addition to sodium,

FIG. 5. Mutational analysis of the carboxyl-terminal region of *Nha1*. A, schematic depiction of the structure of *Nha1*. The transmembrane domains predicted by the TransMem software (39) are indicated by shaded boxes. Asterisks denote point mutations described in the main text. Black lines define the extent of deletions within the carboxyl terminus of the antiporter (see also Fig. 9A). Numbers at the bottom denote residue number. B and C, top, the indicated constructs were introduced into JC002 cells, and growth was scored in the absence or the presence of doxycycline (*dox*) after 3 days. Bottom, strain B31 was transformed with the same constructs, and its sensitivity to 0.4 M NaCl was tested in YPD medium at pH 5.5. Data are means \pm S.E. of 8–14 independent clones.

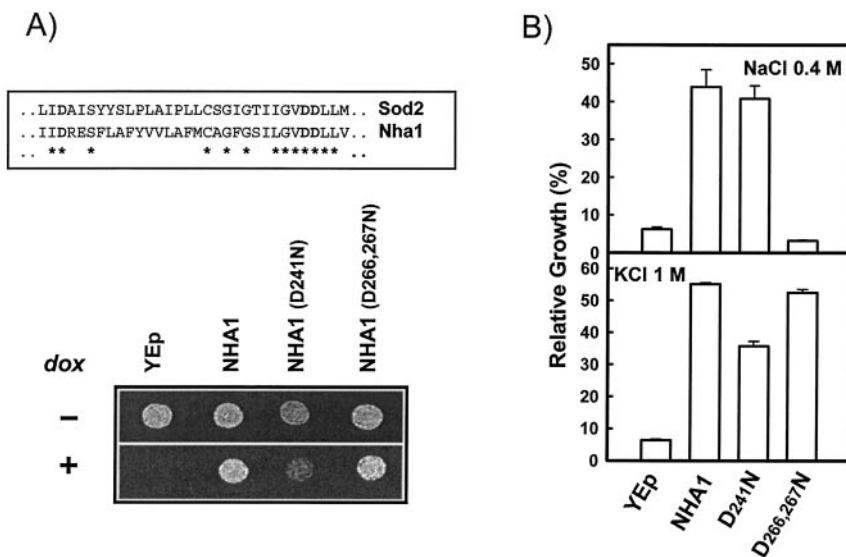
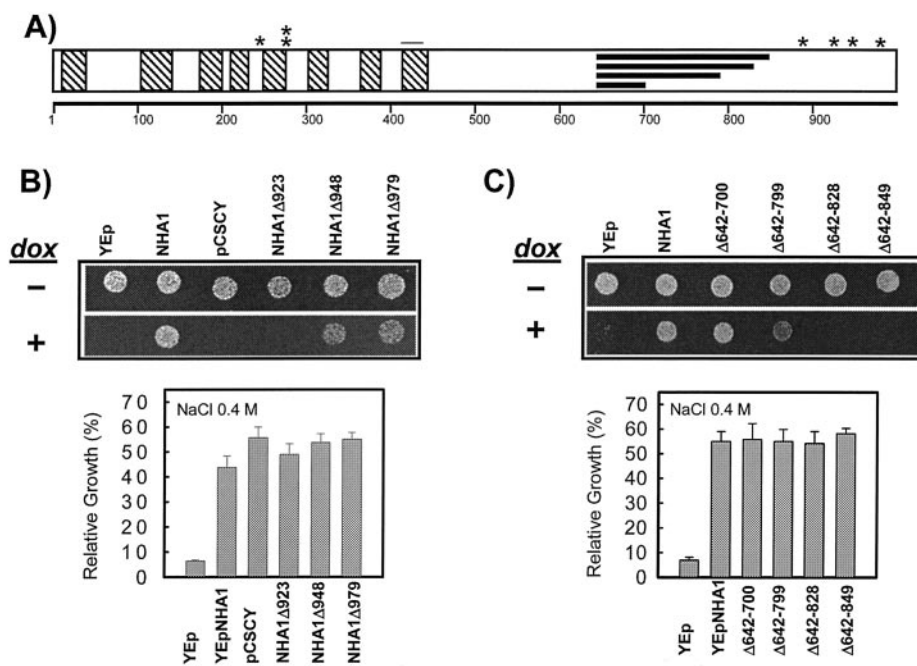


FIG. 6. Mutational analysis of *Nha1* conserved Asp residues. A, comparison of the partial amino acid sequences of *S. cerevisiae* *Nha1* and *S. pombe* *Sod2* antiporters showing the conserved Asp residues at positions 241 and positions 266 and 267 (**boldface**). The indicated constructs were introduced into strain JC002, and cells were tested for growth in the presence or absence of doxycycline (*dox*) (B), or the constructs were introduced into strain B31 and tested for tolerance to 0.4 M NaCl or 1 M KCl at pH 5.5. Data are means \pm S.E. of 8–14 (NaCl) or 3 (KCl) independent clones.

Nha1 can also extrude potassium cations and that the lack of functional *Nha1* results in cells unable to grow at high potassium levels (14). We tested the growth of B31 cells bearing these constructs in the presence of high concentrations of KCl (Fig. 6B). As expected, high copy number wild type *NHA1* improved growth under this condition. Mutation of Asp²⁴¹ significantly reduced this effect. In contrast, the Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ version behaved virtually as the wild type protein. This was surprising and pointed to the possibility that the Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ mutation might affect the ability of *Nha1* to extrude sodium without modifying potassium transport. To assess this possibility, we measured the transport of these cations in cells carrying the mentioned constructs. Fig. 7 shows that, as previously documented, strain B31 has virtually no sodium or potassium transport and that high copy expression of *Nha1* restores the ability of the cell to extrude these cations. Interestingly, expression of the Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ version of the antiporter does not restore extrusion of sodium, but these cells extrude potassium as efficiently as cells carrying wild type *Nha1*. In contrast, cells carrying the Asp²⁴¹ version display a sodium transport relatively close to that of wild type *Nha1*

(note the slopes at initial time points), but its ability to extrude potassium cations is rather poor.

The observation that a given mutation in *Nha1* might specifically affect sodium transport without altering potassium efflux prompted us to investigate how diverse carboxyl terminally altered versions of *Nha1* described in Fig. 5 might affect growth of strain B31 in high potassium. Strain B31 cannot grow on plates containing medium-high concentrations of potassium or rubidium cations. We observed that whereas these cells, which carried in high copy the wild type *NHA1* gene, displayed no growth defect at 1.5 M KCl or 1 M RbCl, versions containing a stop codon at position 923 as well as those lacking residues 642–799 and 642–828 grew very poorly under these conditions (data not shown). To more accurately monitor this phenomenon, potassium efflux was measured. As shown in Fig. 8, B31 cells expressing those *Nha1* versions unable to allow growth on high potassium displayed a virtually null ($\Delta 923$ and $\Delta 642-828$) or severely impaired ($\Delta 642-799$) potassium efflux. Remarkably, cells carrying *Nha1* versions with defects in potassium transport perfectly corresponded with those unable to allow growth of JC002 cells under nonpermissive conditions

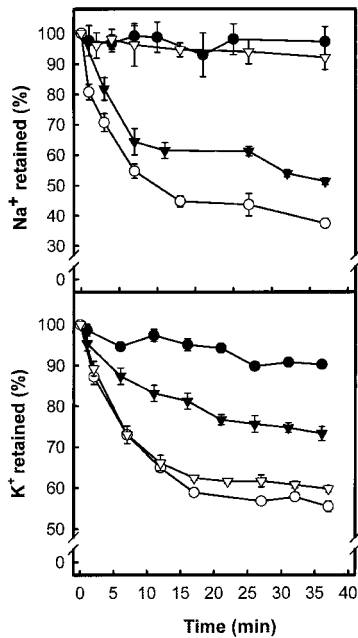


FIG. 7. Effects of mutation of conserved Asp²⁴¹ and Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ residues on sodium and potassium efflux. B31 cells transformed with the following plasmids (●, YEplac195; ○, YEpnHA1; ▼, YEpnHA1(D241N); ▽, YEpnHA1(D266N,D267N)) were grown in CM medium lacking uracil up to an absorbance of 0.5. For sodium efflux, NaCl was added to achieve a final concentration of 150 mM, and growth resumed for 1 h. Cells were processed for determination of sodium (*top*) as described by De Nadal *et al.* (27) or potassium efflux (*bottom*) as described by Calero *et al.* (26). The contents of sodium or potassium cations at time point 0 in the different strains was essentially identical and averaged 100 ± 9 and 390 ± 19 nmol/mg of dry weight, respectively. Data are means \pm S.E. from three to five independent experiments.

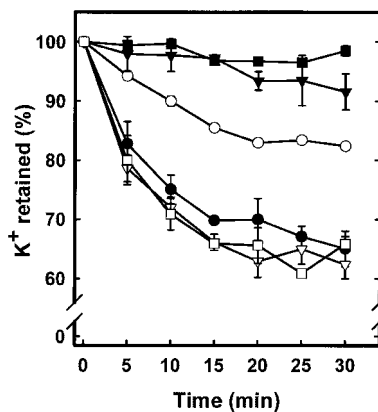


FIG. 8. Potassium efflux in cells expressing versions of the Nha1 antiporter mutated at the carboxyl terminus. B31 cells were transformed with the following plasmids (●, $\Delta 642$ -700; ○, $\Delta 642$ -799; ▼, $\Delta 642$ -828; ■, $\Delta 923$; ▽, $\Delta 948$; □, $\Delta 979$), and potassium efflux was measured as in Fig. 7. Data are means \pm S.E. from three independent experiments.

(compare Figs. 5 and 8). These observations indicate that the function of Nha1 on cell cycle maps very closely in the Nha1 protein to the ability of the antiporter to regulate transport of potassium ions and proves that changes at the carboxyl-terminal moiety of the protein affect these functions.

The C. albicans Cnh1 Antiporter Mimics Nha1 Function in Potassium Transport but Not in the Cell Cycle—The observation that a specific region of the carboxyl-terminal half of Nha1 was important for both potassium transport and cell cycle regulation prompted us to consider the possibility that both functions could be linked and specifically whether the ability to

extrude potassium cations was the reason for Nha1 to function in the cell cycle. To test this possibility we expressed in budding yeast the recently described Na⁺/H⁺ antiporter Cnh1 from *C. albicans* that, in contrast with *S. pombe* Sod2, also contains a long carboxyl-terminal tail that shows a significant level of identity to that of Nha1 (see Ref. 22 and Fig. 9A). It is worth noting that, although expression of the Cnh1 antiporter in budding yeast was shown to increase sodium tolerance (22), it was unknown whether Cnh1 could also transport potassium cations. As shown in Fig. 9B, high copy expression of the *C. albicans* antiporter allowed *S. cerevisiae* B31 cells to grow in the presence of 1 M KCl similarly to cells carrying the Nha1 antiporter, and this correlated with a highly efficient efflux of potassium (Fig. 9C) almost identical to that conferred by expression of budding yeast Nha1. Therefore, we show that Cnh1, in addition to Na⁺, can also extrude potassium cations. However, the heterologous antiporter failed in supporting growth of JC002 cells in the presence of doxycycline (Fig. 9D), indicating that *C. albicans* Cnh1 contains structural requirements sufficient for mimicking Nha1 function in potassium transport but not in cell cycle regulation.

DISCUSSION

We describe here the construction of the conditional *sit4 hal3* strain JC002, which reproduces a blockage in the G₁/S transition of the cell cycle, and the use of this strain to screen for genes able to overcome such blockage. In addition to *SIT4* and *HAL3*, this screening yielded several genes known to perform key roles in cell cycle regulation, such as *CLN3*, *BCK2*, or *SWI4*, thus proving its usefulness as a tool for cell cycle studies.

Among the different genes identified, *NHA1* showed a rather strong phenotype, allowing a relatively vigorous growth of strain JC002 under restrictive conditions. *NHA1* encodes an antiporter that was formerly identified in high copy number as able to increase sodium tolerance in yeast cells (13). More recently it has been documented that this gene product mediates sodium and potassium efflux (14) and that it may be involved in the regulation of intracellular pH (15). Our work demonstrates that Nha1 positively functions in the cell cycle and that this ability is not related to its capacity to extrude sodium cations. For instance, we show that neither the powerful *S. cerevisiae* Ena1 Na⁺-ATPase nor a functional fission yeast Sod2 antiporter, both able to actively detoxify sodium cations, can replace Nha1. Moreover, mutation in Nha1 of the conserved residues Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ fully abolished sodium efflux but did not affect the ability of the antiporter to relieve the cell cycle blockage. An equivalent mutation (Asp³¹⁰-Asp³¹¹) has been shown to abolish the ability of the recently reported Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter from *C. albicans* to increase sodium tolerance when overexpressed in *S. cerevisiae* (22). Interestingly, the Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ mutation generated a version of Nha1 fully able to transport potassium ions, whereas mutation of the conserved Asp²⁴¹ residue did not alter sodium tolerance and had little effect on sodium efflux but significantly reduced potassium efflux. As far as we know, this is the first report of mutations in a Na⁺/H⁺ antiporter that allow discrimination between sodium and potassium cations. It should be noted that although several mutations have been recently described to selectively affect cation uptake in the plant Hkt1 potassium transporter (32, 33), this protein belongs to a very different family, which is related to the Trk yeast transporters (for review, see Ref. 34). It has been proposed, on both theoretical and experimental grounds, that a conserved structure in bacterial and yeast antiporters involving the conserved Asp²⁴¹ and Asp²⁶⁶-Asp²⁶⁷ residues may serve to coordinate transported cations (31, 35). Our results demonstrate that, although this may be the case for sodium, the model does not apply to the

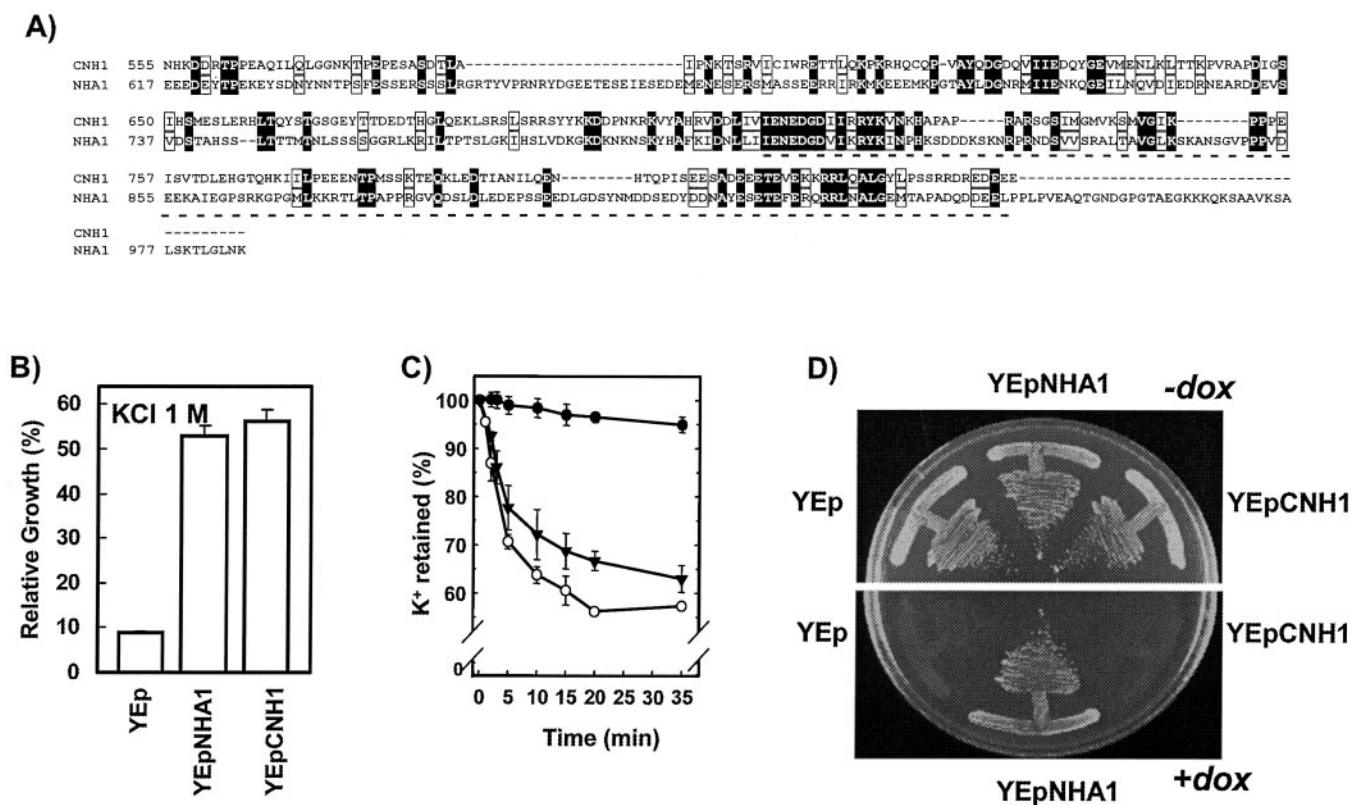


FIG. 9. Expression of the *C. albicans* Cnh1 antiporter functionally replaces Nha1 on potassium transport but not on suppression of G_1/S blockage. *A*, pairwise comparison using the Clustal W program of the carboxyl-terminal regions of the Nha1 and Cnh1 proteins. *Black boxes* indicate identical amino acids, and *open boxes* denote conserved changes. *Dashes* indicate gaps introduced to maximize identities. The region of Nha1 identified as necessary for potassium efflux and cell cycle function is highlighted by a *dotted line*. *B*, strain B31 was transformed with YEp_{lac195}, YEpNHA1, and YEpCNH1, and its sensitivity to 1 M KCl was tested in YPD medium at pH 5.5. Data are means \pm S.E. of six independent clones. *C*, potassium efflux in cells expressing the *C. albicans* Cnh1 antiporter. The above-mentioned strains were tested as described in the legend of Fig. 7. ●, YEp vector; ○, YEpNHA1; ▼, YEpCNH1. Data are means \pm S.E. from three independent experiments. *D*, the indicated constructs were introduced into JC002 cells, and growth was scored in the absence or the presence of doxycycline (*dox*) after 3 days.

transport of potassium, which might require alternative binding structural determinants. This finding is particularly relevant because, although influx of potassium has been relatively well characterized in fungi, the mechanisms for extrusion of this cation have yet to be clarified (34).

The observation that Sod2 cannot play the role of Nha1 in the cell cycle was intriguing because the fission yeast protein is almost 40% identical to the NH₂-terminal half of Nha1 and the two proteins have in common many structural features. However, Sod2 lacks the carboxyl-terminal extension found in the budding yeast antiporter, and our data clearly show that a region in the vicinity of the carboxyl-terminal end of Nha1 spanning from residues 800 to 948, although dispensable for sodium tolerance, is required for the antiporter to alleviate cell cycle blockage. These findings clearly show that the carboxyl terminus of Nha1 contains structural determinants that modulate specific functions of the antiporter.

On the basis that the mutated versions of Nha1 that cannot extrude potassium cations do not support growth of strain JC002 in the presence of doxycycline, it could be hypothesized that the role of Nha1 in the cell cycle relies on the ability of the antiporter to extrude potassium cations. However, this is most probably not the case as deduced from the following observations. First, a positive effect of potassium extrusion on the cell cycle would be difficult to reconcile with previous experimental evidence that associates increased entry of potassium with acceleration of the cell cycle (36). This scenario, in contrast, would fit with the identification of *HAL4/SAT4* and *HAL5* in our screening for suppressors of the G_1/S blockage in strain

JC002.² These genes encode partially redundant protein kinases that activate the Trk1-Trk2 potassium transporters and, therefore, increase influx of potassium (37). On the other hand, a *sit4* mutant does not show an enhanced sensitivity to high potassium (data not shown), suggesting that the cell cycle defect of these cells is not due to excessive accumulation of potassium.

The function of Nha1 as cation/proton antiporter is based in the existence of an electrochemical gradient of protons across the membrane. This is exemplified by the observation that at pH 7.0 high copy expression of Nha1 fails to increase tolerance of B31 cells to sodium or potassium cations (14). Consequently, if the function of Nha1 in the cell cycle would depend on its ability to extrude potassium (or any other cation) by electro-neutral exchange with protons, this function would also be largely abolished when pH approaches neutrality. However, we have observed that the ability of Nha1 to allow growth of a *sit4 hal3* strain is maintained even at pH 7.0 (data not shown), supporting the notion that the effect on the cell cycle does not depend on the function of Nha1 as cation/proton antiporter. Finally, if potassium efflux due to Nha1 would drive the release of the G_1/S blockage, expression of an equally efficient extrusion system should reproduce the effect of Nha1 on the cell cycle. In contrast, we illustrate here (Fig. 9) that the *C. albicans* antiporter, although fully able to restore potassium transport with similar potency to that of Nha1, could not suppress

² I. Muñoz, E. Simon, J. Ariño, and J. Clotet, manuscript in preparation.

the G₁/S blockage of strain JC002. In conclusion, most probably cell cycle and potassium extrusion regulation are independent functions of Nha1 that map closely within the carboxyl-terminal moiety of the protein.

From our data, the important role of the carboxyl terminus of Nha1 in modulating the functions of the protein is evident. Comparison of the Cnh1 and Nha1 carboxyl-terminal sequences (Fig. 9A) reveals that Cnh1 is about 39 residues shorter than Nha1. The absence of this tail, however, is not the reason that explains why Cnh1 fails to function in the cell cycle because a version of Nha1 lacking almost exactly this region (NHA1Δ948) is still functional. Within residues 800–948 of Nha1, the region from amino acids 815 to 912 present the highest degree of divergence with the corresponding region of Cnh1 (see Fig. 9A), and, therefore, it is a likely candidate to account for the observed differences. A carboxyl-terminal tail is also found in the related Zsod2 and Zsod22 Na⁺/H⁺ antiporters from *Zygosaccharomyces rouxii* (38, 39), although in these cases the carboxyl-terminal extension is even shorter than that of Cnh1 and, as a consequence, does not contain sequences that appear to be important in Nha1 for potassium efflux and cell cycle regulation.

Computational analysis indicates that, with high probability, the carboxyl-terminal region of Nha1 is cytosolic (40, 41). As it has been postulated and, in some cases, experimentally determined for mammalian Na⁺/H⁺ antiporters (42), the carboxyl-terminal region might serve as a regulatory region of the protein, for example modulating the function of the transmembrane domain through covalent modification or interaction with other proteins. This would explain the effect of mutations within the carboxyl-terminal moiety in the transport of potassium. In addition, a possibility worth consideration is that, besides the previously recognized antiporter function of Nha1, the carboxyl-terminal segment of the protein might receive inputs from the transmembrane domain and transmit signals to the inside of the cell that would influence cell cycle progression. We wish to stress that a number of related precedents can be found in the literature. For instance, the ammonium permease Mep2 (but not its homologs Mep1 or Mep3) has been shown to participate in the transmission of the signal that induces pseudohyphal growth in yeast under low ammonium conditions. Interestingly, mutagenesis analysis proved that signaling was independent of the ability of Mep2 to perform its previously recognized function as an ammonium permease (43).

Acknowledgments—We thank M. A. Bañuelos for plasmid pCSCY and for the B31 and G19 strains, B. Piña for plasmid pDB20LbgII, and N. Ramanan for the *CNH1* gene. The excellent technical assistance of Carlos Casanova, Anna Vilalta, and Yolanda Prado is acknowledged. Thanks are given to A. Rodríguez-Navarro, R. Serrano, E. Garí, and L. Fliegel for helpful discussion. The support of E. Querol in the computational analysis of the Nha1 structure is acknowledged.

REFERENCES

- Arndt, K. T., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1989) *Cell* **56**, 527–537
- Shimanuki, M., Kinoshita, N., Ohkura, H., Yoshida, T., Toda, T., and Yanagida, M. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 303–313
- Mann, D. J., Dombrádi, V., and Cohen, P. T. (1993) *EMBO J.* **12**, 4833–4842
- Bastians, H., and Ponstingl, H. (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 2865–2874
- Sutton, A., Immanuel, D., and Arndt, K. T. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2133–2148
- Sutton, A., Lin, F., and Arndt, K. T. (1991) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **56**, 75–81
- Fernández-Sarabia, M. J., Sutton, A., Zhong, T., and Arndt, K. T. (1992) *Genes Dev.* **6**, 2417–2428
- Di Como, C. J., Bose, R., and Arndt, K. T. (1995) *Genetics* **139**, 95–107
- Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5470–5481
- Espinosa-Ruiz, A., Bellés, J. M., Serrano, R., Culiánñez-Macià, F. A. (1999) *Plant J.* **20**, 529–539
- De Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gómez, N., and Ariño, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7357–7362
- Clotet, J., Garí, E., Aldea, M., and Ariño, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2408–2415
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J. L., and Sychrovà, H. (1996) *FEBS Lett.* **387**, 89–93
- Bañuelos, M. A., Sychrovà, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L., and Potier, S. (1998) *Microbiology (Read)* **144**, 2749–2758.
- Sychrovà, H., Ramírez, J., and Peña, A. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* **171**, 167–172
- Adams, A., Gottschlings, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 145–149, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Benito, B., Quintero, F. J., and Rodríguez-Navarro, A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1328**, 214–226
- Cormak, B. (1997) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds) pp. 8.5.7–8.5.10, John Wiley & Sons, New York
- Berger, S. L., Piña, B., Silverman, N., Marcus, G., Agapite, J., Regier, J., Triezenberg, S. J., and Guarente, L. (1992) *Cell* **70**, 251–266
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene* **74**, 527–534
- Soong, T. W., Yong, T. F., Ramanan, N., and Wang, Y. (2000) *Microbiology* **146**, 1035–1044
- Bañuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J., and Rodríguez-Navarro, A. (1995) *EMBO J.* **14**, 3021–3027
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Yeast* **14**, 1127–1138
- Posas, F., Camps, M., and Ariño, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13036–13041
- Calero, F., Gómez, N., Ariño, J., and Ramos, J. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 394–399
- De Nadal, E., Calero, F., Ramos, J., and Ariño, J. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 6456–6462
- Jia, Z. P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S., and Young, P. G. (1992) *EMBO J.* **11**, 1631–1640
- Hahnenberger, K. M., Jia, Z., and Young, P. G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5031–5036
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldana, C., Coria, R., and Peña, A. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 5860–5865
- Dibrov, P., Young, P. G., and Fliegel, L. (1998) *Biochemistry* **37**, 8282–8288
- Diatloff, E., Kumar, R., and Schachtman, D. P. (1998) *FEBS Lett.* **432**, 31–36
- Rubio, F., Schwarz, M., Gassmann, W., and Schroeder, J. I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6839–6847
- Rodríguez-Navarro, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 1–30
- Dibrov, P., and Fliegel, L. (1998) *FEBS Lett.* **424**, 1–5
- Gillies, R. J. (1982) in *Intracellular pH. Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Function* (Nuccitelli, R., and Deamer, D. W., eds) pp. 341–359, Alan R. Liss, New York
- Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3328–3337
- Watanabe, Y., Miwa, S., and Tamai, Y. (1995) *Yeast* **11**, 829–838
- Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y., and Watanabe, Y. (1998) *Yeast* **14**, 1167–1174
- Cedano, J., Aloy, P., Pérez-Pons, J. A., and Querol, E. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 594–600
- Aloy, P., Cedano, J., Oliva, B., Aviles, F. X., and Querol, E. (1997) *Comput. Appl. Biosci.* **13**, 231–234
- Counillon, L., and Pouyssegur, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1–4
- Lorenz, M. C., and Heitman, J. (1998) *EMBO J.* **17**, 1236–1247

Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na⁺/H⁺ antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle

Ernesto Simón, Anna Barceló, Joaquín Ariño*

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

Received 14 April 2003; revised 12 May 2003; accepted 13 May 2003

First published online 26 May 2003

Edited by Maurice Montal

Abstract The yeast Nha1 Na⁺,K⁺/H⁺ antiporter may play an important role in regulation of cell cycle, as high-copy expression of the *NHA1* gene is able to rescue the blockage at the G₁/S transition of cells lacking Sit4 protein phosphatase and Hal3 activities. Interestingly, this function was independent of the role of the antiporter in improving tolerance to sodium cations, it required the integrity of a relatively large region (from residues 800 to 948) of its carboxy-terminal moiety, and was not performed by the fission yeast homolog antiporter Sod2, which lacks a carboxy-terminal tail. Here we show that a hybrid protein composed of the Sod2 antiporter fused to the carboxy-terminal half of Nha1 strongly increased sodium tolerance, but did not allow growth at high potassium nor did rescue growth of the *sit4 hal3* conditional mutant strain. Deletion of Nha1 residues from 800 to 849, 900 to 925 or 926 to 954 abolished the function of Nha1 in cell cycle without affecting sodium tolerance. A screening for loss-of-function mutations at the 775–980 carboxy-terminal tail of Nha1 has revealed a number of residues required for function in cell cycle, most of them clustering in two regions, from residues 869 to 876 (cluster A) and 918 to 927 (cluster B). The later is rather conserved in other related antiporters, while the former is not.

© 2003 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: H⁺/Na⁺ antiporter; Cell cycle; Saline tolerance; Mutagenesis analysis; *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

Na⁺/H⁺ antiporters are an important family of proteins present in the membranes of most cell types, from human to bacteria, which play a key role in maintaining cation and pH homeostasis [1]. In yeast cells, the Na⁺/H⁺ antiporters serve to remove intracellular sodium cations utilizing the external H⁺ accumulation generated by the plasma membrane H⁺-ATPase (for a review, see [2]). A number of genes encoding plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters have been cloned within the last few years from different yeast species, such as *Schizosaccharomyces pombe* [3], *Zygosaccharomyces rouxii* [4,5], *Saccharomyces cerevisiae* [6] or *Candida albicans* [7], thus allowing a preliminary characterization of this type of pro-

teins. As their mammalian counterparts, they are composed in many cases by a hydrophobic, membrane-bound region, comprising 10–12 transmembrane domains, followed by a hydrophilic carboxy-terminal tail. One of the few exceptions is the *S. pombe* Sod2 antiporter, which contains only the transmembrane moiety. While the primary sequences corresponding to the transmembrane region are rather similar, the divergence at the carboxy-terminal tail is quite high, and only a few short regions are conserved [8].

Na⁺/H⁺ antiporters from different yeast species also differ in their substrate specificity for alkali cations: for instance, while Sod2 transports only Na⁺ and Li⁺, the antiporters from *S. cerevisiae* (Nha1) and *C. albicans* (Cnh1) are able to recognize also K⁺ and Rb⁺ as substrates. In the case of the budding yeast *S. cerevisiae*, Nha1 has only a modest role in mediating sodium tolerance, particularly at moderately acidic and neutral pH [6,9]. Nha1 has been proposed to regulate intracellular pH [9,10], to mediate sodium and potassium efflux [9], and to promote growth at low K⁺ concentrations, probably through regulation of Trk1-dependent K⁺ uptake [11].

The budding yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 are positive and negative effectors, respectively, of the G₁/S transition at the cell cycle [12–14]. *HAL3* encodes a negative regulator of Ppz1 [15] and, consequently, a *sit4 hal3* mutant cannot grow because of a severe blockage in G₁/S [16–18]. In a recent paper [18], we described the construction of a conditional *sit4 hal3* mutant strain (JC002) and its use to carry out a high-copy screening for suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype. This screening yielded, among other genes, the *NHA1* antiporter gene, pointing out to a possible role of Nha1 in cell cycle regulation. The positive effect of Nha1 was not dependent of its ability to improve tolerance to Na⁺ cations, and could not be mimicked by overexpression of the powerful Na⁺-ATPase *ENA1* (a major determinant of salt tolerance in *S. cerevisiae*) or the *S. pombe* Sod2 antiporter. Budding yeast Nha1 is a 985 amino acid protein in which approximately the first 450 residues correspond to the transmembrane domain, followed by a large carboxy-terminal tail. By deletion mapping, we were able to show [18] that a region near the carboxy-terminal end of Nha1, comprising from residue 800 to 948, was required for the antiporter to effectively overcome the cell cycle blockage, and contained residues important to modulate the transport of potassium. Here we extend these findings and present a detailed mutational analysis of this important region of Nha1 that reveals a number of residues necessary for Nha1 function in cell cycle.

*Corresponding author. Fax: (34)-93-5812006.
E-mail address: joaquin.arino@uab.es (J. Ariño).

2. Materials and methods

2.1. Growth of *Escherichia coli* and yeast strains

E. coli strains DH5 α or DH5 were used as a host for DNA cloning. Bacterial cells were grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) medium containing 50 μ g/ml ampicillin for plasmid selection. *S. cerevisiae* cells were grown at 28°C in YPD medium or, when indicated, in complete minimal (CM) synthetic medium lacking uracil [19]. Strain JC002 (*MATa sit4::TRP1 tetO:HAL3*) derives from JA100 [15] and the salt-hypersensitive strain B31 (*MAT α ena1 Δ ::HIS3::ena4 Δ nha1::LEU2*) derives from W303-1B [9].

2.2. Recombinant DNA techniques and plasmid constructions

E. coli cells were transformed by using standard calcium chloride treatment [20] or by electroporation [21] when high efficiency was needed. Yeast cells were transformed following a modification of described methods [22]. Restriction reactions, DNA ligations, and other standard recombinant DNA techniques were carried out as described elsewhere [20].

The construction of pES071, which allows high-copy number expression of a version of *NHA1* carrying a C-terminal 3 \times HA-tag, was as follows. The 4.3 kbp *XbaI/SphI* fragment of plasmid VHS5A/Ura [18], containing the *NHA1* gene was cloned into the same sites of pUC19, yielding pES018. An artificial *SallI* site right in front of the stop codon (which introduces the residues VD) was then created by sequential polymerase chain reaction (PCR) [23], and the amplification fragment used to replace the 1.1 kbp *ApaI/SphI* fragment of pES018, to yield pES070. A 3 \times HA-tag, with added *SallI* sites, was amplified by PCR from plasmid pCM113 [24], and cloned in the appropriate orientation in pES070. The resulting 3 \times HA-tagged version of *NHA1* (pES099) was then transferred to plasmid YEplac195 [25] for expression in yeast, producing plasmid pES071.

To generate plasmid pES149, which allows expression of the *S. pombe* *sod2*⁺ gene under the control of the strong *ADHI* promoter, the *BamHI* 3.4 kbp fragment from plasmid pDBSod2 [18] was cloned into the same site of plasmid YEplac195.

A version of Sod2 carrying the carboxy-terminal tail of *S. cerevisiae* *NHA1* was constructed as follows. The 1.4 kbp intronless *sod2*⁺ fragment described in [18] was cloned into the *BamHI* site of plasmid pGEM3Z+ (Promega) to produce pES035. A *XhoI* site was introduced between residues S⁴⁵¹ and D⁴⁵² of Sod2 by sequential PCR, and the resulting fragment used to replace the original 0.76 kbp *NheI/EcoRI* fragment present in pES035. The new construct (pES116) was digested with *BamHI* and the approximately 1.4 kbp fragment, containing the Sod2 open reading frame (ORF) plus the added *XhoI* site, cloned into the *BglII* site of plasmid pDB20BglII [26] to generate pES121. This construct was digested with *BamHI* to release a 3.4 kbp fragment containing the Sod2 ORF (with the added *XhoI* site) flanked by the *ADHI* promoter and terminator elements, which was cloned into the *BamHI* site of YEplac195, to yield pES134. The carboxy-terminal half of *NHA1* (from N⁴⁵⁸ to the stop codon, including the 3 \times HA-tag at its 3'-end), was amplified from pES071 by PCR, with added *XhoI* sites. The 1.7 kbp amplification fragment was cloned into pBS-SK (Stratagene), sequenced, released by *XhoI* digestion and cloned into the artificial *XhoI* site of plasmid pES134 in the appropriate orientation to produce plasmid pES136. Therefore, this construct bears a fusion of *S. pombe* Sod2 and the C-terminal half of *S. cerevisiae* *Nha1*, carrying a triple HA-tagging, under the control of the *ADHI* transcriptional promoter.

All PCR-produced fragments were fully sequenced using an ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the big dye 3.0 terminator kit, to detect unwanted changes in sequence and/or verify the desired mutations.

2.3. Mutagenesis of the carboxy-terminal half of *Nha1*

Internal deletions were generated by sequential PCR as follows. The VHS5A/Ura genomic clone [18] was used as template and the amplified fragments, once its sequence was verified, used to replace the equivalent ones in pES018. In the case of the deletion between residues 800 and 849 (inclusive), a 1.98 kbp *HpaI/SphI* fragment containing the desired deletion was amplified and used to replace the original fragment. Deletions between residues 900–925 and 926–954 were made by removing the 1.06 kbp *ApaI/SphI* region and replacing it with PCR-amplified DNA fragments containing the indicated deletions. In all cases, the entire *XbaI/SphI* fragment, containing the modi-

fied versions of the antiporter, was recovered from pES018 and cloned back into YEplac195 for high-copy expression in yeast.

To generate a library of clones containing the *NHA1* ORF enriched for mutations at the 775–980 region, we proceeded as follows. A 1.65 kbp fragment was amplified by sequential PCR so that a *SpeI* restriction site was introduced at position +2298 from the initiating ATG codon (the changes introduced did not modify the amino acid sequence). Then, a 1.26 *HpaI/ApaI* fragment, including the artificial *SpeI* site, was used to replace the equivalent fragment of plasmid pES070. The resulting construct (pES153) was digested with *XbaI/SphI* and the 4.3 kbp insert was cloned into the same sites of YEplac195 (pES154). pES153 was used as a template to amplify a 0.68 kbp fragment, spanning from the *SpeI* to the *SallI* artificial sites introduced in the *NHA1* ORF, in four independent reactions, as described in [27] with some modifications. The four reaction products were mixed, purified, digested with *SpeI* and *SallI*, and used to replace the equivalent 0.66 kbp fragment by ligation into the *SpeI/SallI* sites of pES154. The ligation products were then introduced into *E. coli* competent cells by electroporation. Plasmid DNA from at least 30 000 independent clones was recovered, amplified, and the library used for the *Nha1* loss-of-function screening.

2.4. Screening for loss of function of *Nha1* in cell cycle

Strain JC002 (*sit4::TRP1 tetO:HAL3*) was transformed with the above-mentioned library (approximately 30 000 clones) and plated in CM plates lacking uracil. After 48 h, colonies (200–1000/plate) were replicated on CM (lacking uracil) plates containing 20 μ g/ml doxycycline and these plates were incubated for 48–72 h. Clones unable to grow in the presence of doxycycline were picked out from the master plates, and the plasmids recovered in *E. coli* and tested for integrity of the insert by restriction mapping. The constructs were then reintroduced into strain JC002 (and tested again for loss of growth in the presence of doxycycline), as well as into strain B31 (and tested for growth in high sodium). Clones negative for growth in doxycycline were subjected to DNA sequencing, covering the entire *SpeI/SallI* 0.66 kbp fragment subjected to mutagenesis, to identify possible mutations responsible for the loss of function. In some cases, when two different mutations were encountered in this region and they were separated by the *ApaI* site (residues 866–867), it was possible to evaluate the effect of the mutation downstream this restriction site by rescuing the 1.06 kbp *ApaI/SphI* fragment of the mutated clone and using it to replace the equivalent region of pES153. Then, the 4.3 kbp *XbaI/SphI* insert was cloned into the same sites of YEplac195 and the existence of a single mutation confirmed by DNA sequencing.

2.5. Other techniques

Immunoelectrophoretic analysis was performed as follows. JC002 cells carrying the different constructs were grown up to an OD₆₆₀ of approximately 2, collected by centrifugation, and disrupted by vortexing with the aid of glass beads in the presence of a buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), plus an anti-protease mixture (0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 0.5 mM benzamide, 1 μ g/ml pepstatin). The mixture was centrifuged at 750 \times g for 10 min at 4°C to remove glass beads and cellular debris, and the supernatant recovered (total cell extract). 50 μ l of this extract was centrifuged at 16 100 \times g for 15 min at 4°C, the supernatant was recovered (16 K supernatant), and the pellet resuspended in the same volume of the disruption buffer described above (16 K pellet). Samples (40 μ g of protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) (8% acrylamide) and proteins were transferred to Immobilon-P membranes (Millipore), blocked, and incubated with a monoclonal anti-HA antibody (Roche). Immunoreactive proteins were identified with luminescence substrates (ECL, Amersham).

Growth on plates (drop tests) was assessed as described in [28]. Tolerance to cations was determined in liquid cultures as described [29].

3. Results

In a recent paper [18], we demonstrated that high levels of expression of the *S. cerevisiae* *Nha1* antiporter were able to

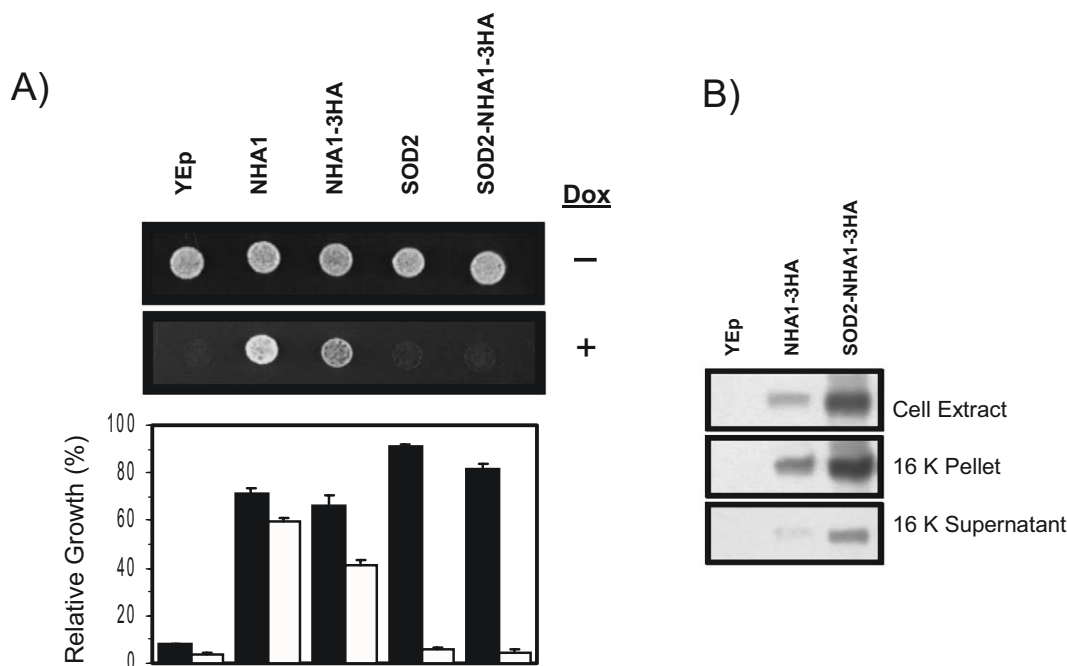


Fig. 1. Functional analysis of a chimerical Sod2/Nha1 protein. A: Upper panel: Strain JC002 was transformed with plasmids YEplac195 (YEplac195), VHS5A/Ura (NHA1), pES071 (NHA1-3HA), pES149 (SOD2) or pES136 (SOD2-NHA1-3HA). 3 μ l of a diluted suspension of cells (OD_{660} 0.03) were spotted on CM plates lacking uracil in the absence (-) or the presence (+) of 20 μ g/ml doxycycline (Dox). Growth was monitored after 3 days. Lower panel: The above-mentioned plasmids were introduced into strain B31 and diluted cell suspensions (OD_{660} 0.015) grown for 15 h on YPD (pH 5.5), in the presence of 0.4 M sodium chloride (closed bars) or 1 M potassium chloride (empty bars). Relative growth was calculated as the ratio between growth in the presence and growth in the absence of the added salt, and represented as percentage. Data are means \pm S.E.M. from three to six independent clones. B: Total cells extracts were obtained from strain JC002 bearing the indicated plasmids, and 16 K pellets and supernatants were prepared as indicated in Section 2. Samples (40 μ g of protein) were electrophoresed, transferred to membranes and probed with monoclonal anti-HA antibodies to detect the expressed tagged proteins.

relieve G₁/S cell cycle blockage, while overexpression of the *S. pombe* homolog Sod2, which lacks a carboxy-terminal tail, was not. As it was also found that Nha1 required its carboxy-terminal half to carry out this function, we considered the possibility that the failure observed for Sod2 could be due to the absence of the necessary carboxy-terminal tail. To test this possibility, we constructed a fusion protein comprising the first 451 residues of *S. pombe* Sod2 (transmembrane domain) followed by the last 528 residues of Nha1 (that is, starting shortly after the last transmembrane domain of Nha1, where the sequence similarity between both proteins is lost). This construct also contained a triple HA carboxy-terminal tag, to allow immunological detection of the expressed protein. As shown in Fig. 1A, the tagged version of Nha1 retained its ability to allow growth of the JC002 strain (although perhaps with somewhat less potency). This version of Nha1 was fully functional in terms of providing high-sodium tolerance to a B31 strain, but slightly less effective than the non-tagged protein in allowing growth in high potassium. As documented previously, overexpression of Sod2 did not recover growth of a *sit4 tetO::HAL3* strain (JC002) on non-permissive conditions (that is, in the presence of doxycycline), nor increased tolerance to high potassium. Interestingly, the Sod2 version carrying the carboxy-terminal tail of Nha1 also failed to promote growth when subjected to these tests. It is important to note that the hybrid protein was successfully expressed, as deduced from the observation that B31 cells containing this construct showed a very high tolerance to sodium ions. Furthermore, immunological analysis (Fig. 1B) showed that most of the expressed protein was recovered in

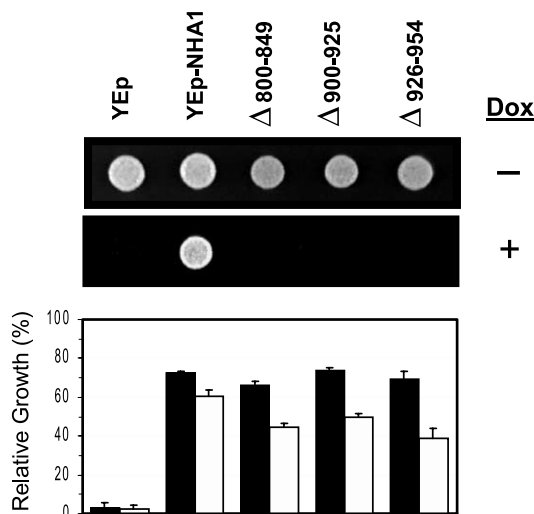


Fig. 2. Functional mapping of the Nha1 antiporter by selective deletions within its 800–954 carboxy-terminal region. Upper panel: Strain JC002 (*sit4::TRP1 tetO::HAL3*) was transformed with high-copy plasmid YEplac195 (YEplac195), as well as with the same plasmid bearing the native *NHA1* gene (VHS5A/Ura) or different *NHA1* versions in which the indicated regions had been deleted, and tested for growth as described in Fig. 1. Growth was monitored after 3 days. Lower panel: Strain B31 (*ena1 Δ ::HIS3::ena4 Δ nha1::LEU2*) was transformed with the indicated constructs and the cells tested for growth as indicated in Fig. 1. Data are means \pm S.E.M. from three independent clones.

particulate fractions, as expected from a protein associated to membranes.

Our previous work revealed that a region spanning from residues 800 to 948 of the presumably cytoplasmic carboxy-terminal half of Nha1 was necessary for function in cell cycle. To gain more insight on the structural elements involved in this effect, we prepared versions of Nha1 carrying different deletions within this region. As shown in Fig. 2, when these versions were tested on strain JC002 under non-permissive conditions, none of the versions was able to allow growth. In contrast, when introduced into the salt-hypersensitive strain B31 (*ena1-ena4Δ nha1*), all of them conferred a tolerance to high concentrations of sodium chloride similarly to that produced by a native version of the antiporter. Interestingly, all three mutated versions were less effective than the native *NHA1* clone in supporting growth in liquid cultures containing 1 M potassium chloride. This growth defect was not due to an osmotic effect, as growth in the presence of 2 M sorbitol was essentially identical in all cases (not shown).

The observation that structural elements important for cell cycle-related function were located in different segments of the region spanning from residues 800 to 954 of Nha1 prompted us to undertake a detailed mutagenesis analysis of this region

using a random mutagenesis PCR approach. Functional analysis of about 30 000 clones yielded 121 candidate clones, unable to allow growth of JC002 cells. However, in many cases failure to growth was due to deletions (45 clones) or insertions (one clone) that would change the reading frame. In addition, eight clones contained premature stop codons, defining six different stop positions at codons 788, 797, 811, 822, 827 and 890. All these versions were tested for growth in high potassium, sodium and lithium. It could be observed that the version carrying a stop codon at position 890 was the only one conferring a slightly improved tolerance to sodium and a very strong tolerance to lithium to B31 cells (data not shown).

The final output of this screening was the identification of 18 single point mutations that would block the ability of Nha1 to allow growth of JC002 cells in the presence of doxycycline. As it can be observed (Fig. 3, upper panel), most mutations cluster into two regions. The first region (cluster A) spans from S⁸⁶⁹ to T⁸⁷⁶ and contains four mutations. Two of the changes (L870F and T874A) resulted in partial loss of function, as they allowed growth of the JC002 strain, albeit rather slow. On the contrary, mutation T876A completely blocked growth of strain JC002, even after 7 days of incuba-

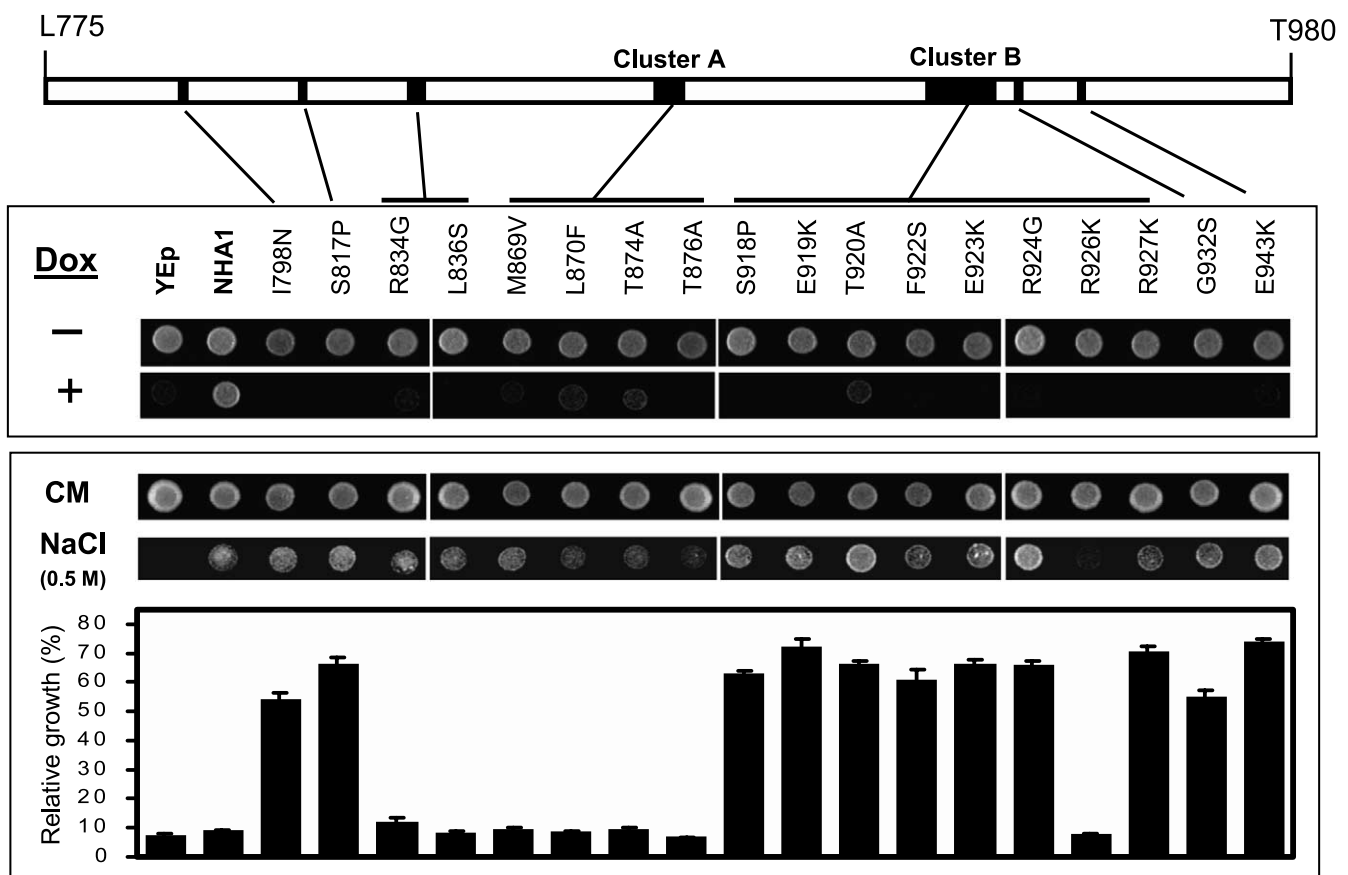


Fig. 3. Localization and phenotypic effects of point mutations impairing the function of Nha1 in cell cycle. Upper panel: Strain JC002 was transformed with YEplac195 (YEpl), plasmid VHSSA/Ura (NHA1) or the same high-copy plasmid bearing versions of the Nha1 antiporter carrying the indicated point mutations. Growth was monitored after 4 days. The approximate location of each mutation within the region 775–980 is depicted on the top, including location of clusters A and B (see main text). Lower panel: Strain B31 was transformed with the above-mentioned plasmids and tolerance to sodium tested on CM plates (lacking uracil) in the absence or the presence of 0.5 M NaCl. Growth was monitored after 4 days. In all cases strains were spotted in a single plate for each condition tested and are aligned in the figure for descriptive purposes. The same strains were grown in liquid YPD medium (pH 5.5) in the presence or absence of 20 mM LiCl. Relative growth was calculated as the ratio between growth in the presence and growth in the absence of the added salt, and represented as percentage. Data are means \pm S.E.M. from four experiments.

tion (when normally this strain recovers somewhat from the effect of doxycycline). The second region (cluster B) includes amino acids 918–927 and in this short segment, composed of 10 residues, mutations for all but two of them (E⁹²¹ and Q⁹²⁵) have been found. Several of these mutations had a very severe effect on growth, similarly to that of the T876A change, while one mutation (T920A) still allowed growth on doxycycline, although very slowly. In addition, a pair of close mutations, affecting residues R834 and L836, has been identified. Four additional changes resulting in loss of function were found upstream (I798N and S817P), or downstream (G932S and E943K) of the mentioned groups.

All mutated versions of Nha1 were also tested for the ability to confer tolerance to high potassium, sodium or lithium to strain B31. We observed that most mutations in cluster B slightly reduced cell growth in the presence of high concentrations of potassium chloride, similarly to that observed for the versions carrying deletions (data not shown). When tolerance to sodium cations was tested, we found (Fig. 3, lower panel) that with the exception of the L836S and M869V changes, mutations on the residues of cluster A produced a slight decrease in tolerance to sodium. Mutations in cluster B yielded a non-homogeneous phenotype: while some of them, such as T920A and R924G, conferred higher tolerance than native Nha1, a conserved change, R926K, resulted in a rather strong decrease in the ability of this Nha1 version to improve tolerance to sodium cations. The evaluation of lithium tolerance in strains overexpressing the mutated forms of Nha1 yielded rather interesting results. At low LiCl concentrations (10 mM), differences in tolerance were small (not shown). However, when higher concentrations were tested (20 mM), at which overexpression of wild-type Nha1 cannot significantly improve growth, we found that mutations at positions 798 and 817, and particularly all mutations in cluster B (but none in cluster A) were able to strongly improve growth. The only exception was the conserved change R926K, which did not improve tolerance and, in fact, when tested at lower LiCl concentrations, resulted in slightly lower tolerance than that conferred by wild-type Nha1.

4. Discussion

In contrast to what is known for certain fungi, such as *S. pombe* or *Z. rouxii*, in which Na⁺/H⁺ antiporters are major elements for sodium and lithium cation tolerance [3,30], in the budding yeast *S. cerevisiae* the Na⁺/H⁺ antiporter Nha1 represents a relatively minor component of the mechanisms involved in tolerance to sodium cations. Alternatively, other cellular roles, such as regulation of cell volume, K⁺ concentration or intracellular pH have been proposed for this protein [9–11].

Recently, we showed that Nha1 might be involved in the regulation of cell cycle progression, as high-copy expression of this gene (from its own promoter) was able to rescue the G₁/S cell cycle blockage of a conditional *sit4 hal3* mutant [18]. This ability was not related to the capacity of the antiporter to increase tolerance to sodium cations, but required the presence of the transmembrane antiporter region and the integrity of a relatively large region of its carboxy-terminal tail, comprising approximately from residue 800 to 948. The requirement for this carboxy-terminal element was indicative that it might be important for regulation of the Nha1 function in cell

cycle. Therefore, we undertake its functional characterization aiming to get further insight into the regulation and function of this protein.

We show here that expression of a chimera in which the transmembrane region of Nha1 has been replaced by the equivalent (43% of identity, 58% conserved residues) element of the *S. pombe* antiporter Sod2 is able to increase tolerance to sodium cations, even more efficiently than that native Nha1 does. While this might reflect the highest transport capacity of the Sod2 antiporter, as previously demonstrated [31], in our case it may just result from a different expression level, somewhat higher in the case of Sod2 (it should be noted that the promoter elements in both constructs were not equivalent). The hybrid protein was not able to allow growth at high potassium, suggesting that the inability of *S. pombe* Sod2 to transport potassium [31] is an intrinsic property of the transmembrane domain and not due to the lack of a carboxy-terminal moiety. In any case, this hybrid protein failed to sustain growth of strain JC002 under non-permissive conditions, indicating that while the 800–948 carboxy-terminal region of Nha1 is required for function in cell cycle, specific elements at the amino-terminal transmembrane region, not present in Sod2, must be also important.

A more detailed analysis of the carboxy-terminal region was initiated by generating several deletions within the region 800–954 (Fig. 2). All of them resulted in loss of the suppressor effect when these versions of Nha1 were tested in JC002 cells, indicating that residues important for this function are dispersed within this relatively large region. These deletions also resulted in a small, but significant reduction in the growth rate of the cells at high potassium, suggesting the alterations in this region of the protein may affect the capacity for potassium transport. This agrees with our previous findings [18], although it must be noted that other authors have reported that high-copy expression of versions of Nha1 carrying truncation of most of its carboxy-terminal tail still support growth on high potassium [32]. This apparent discrepancy may result from the fact that we determine the effect of high potassium in liquid culture, which allows a more sensitive monitoring of growth.

The possibility that residues important for cell cycle function could be dispersed within the 800–954 region prompted us to develop a strategy to identify point mutations within this segment of the protein that could abolish the ability of Nha1 to rescue growth of JC002-blocked cells. Among the mutations identified, six corresponded to premature stop codons, at positions 788, 797, 811, 822, 827 and 890, thus confirming our previous finding in that truncations prior residue 923 eliminate the function [18]. In addition, the version truncated at position 890 was able to increase tolerance of B31 cells, moderately to sodium and strongly to lithium cations. This is in agreement with the previous finding that the original genomic clone isolated, which was truncated at position 888, was more efficient in increasing the tolerance to these cations than the entire protein [6,9].

In addition, 18 single additional mutations resulting in change of amino acid were identified. These mutations were located between residues 798 and 943, and affected all three short segments deleted within the 800–954 region, thus explaining the phenotype previously observed (Fig. 2). However, it is remarkable that most mutations (12 out of 18) clustered into two very short regions (clusters A and B, Figs. 3 and 4),

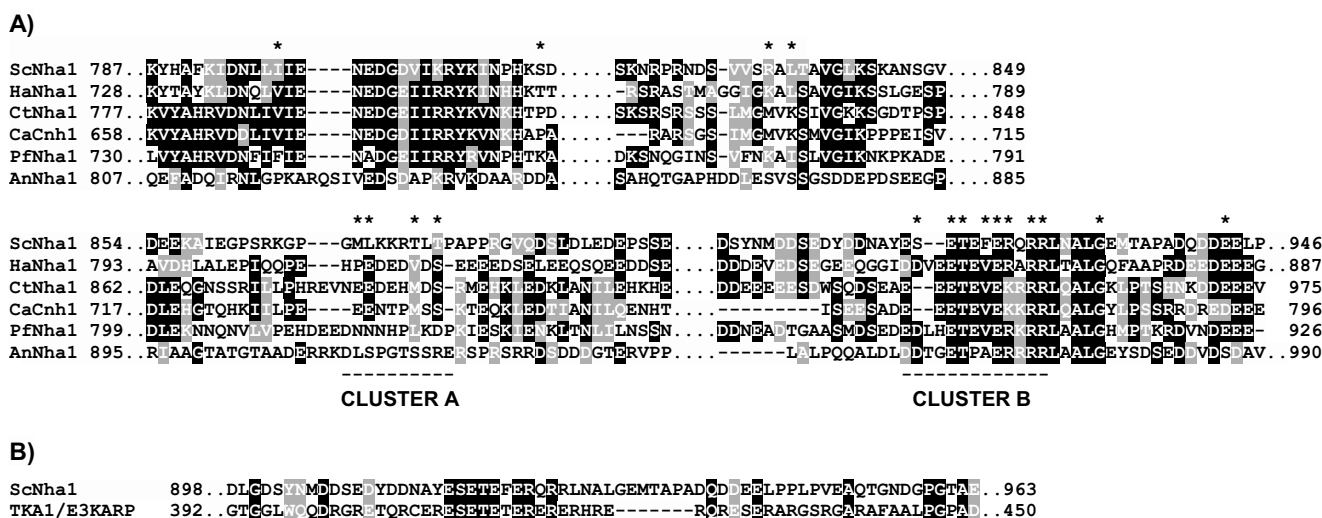


Fig. 4. Comparative analysis of residues important for Nha1 cell cycle function in other yeast antiporter sequences. A: The complete amino acid sequences of the Na^+/H^+ antiporters from *S. cerevisiae* (ScNha1, GenBank, DDBJ accession number Z73310), *Hansenula anomala* (HaNha1, AB073976), *Candida tropicalis* (CtNha1, AB073975), *C. albicans* (CaCnh1, AF375984), *Pichia farinosa* (PfNha1, AJ496431) and *Aspergillus nidulans* (AnNha1, AB073977) were aligned using Clustal W (version 1.8). The regions corresponding to the mutagenized segment of *S. cerevisiae* Nha1 are represented. Very poorly conserved regions, not comprising point mutations described in this paper (shown as asterisks), have been eliminated and are represented by several dots. Conserved residues are denoted by black-shaded boxed, while conservative changes are shaded in gray. B: Alignment (Clustal W 1.8) of the region surrounding cluster B in *S. cerevisiae* Nha1 and the carboxy-terminal end of isoform 3 of human TKA1/E3KARP (GenBank, DDBJ Z50150).

suggesting that these regions are particularly important in function. Cluster B corresponds to a short region highly conserved between most fungal antiporters (Fig. 4), defined as C6 in [8], while cluster A contains a non-conserved sequence, specific for *S. cerevisiae*. This probably explains why the *C. albicans* antiporter Cnh1, which does not contain a similar sequence, was unable to replace Nha1 [18] despite their overall similarity (54% of identity). In addition, we have identified mutations, such as L870F, T874A or T920A with relatively weak effect on cell cycle, while others (for instance, most mutations in cluster B) appear to aggravate the growth defect, resulting in a dominant negative phenotype. This would be compatible with the notion of this region acting as a regulatory one.

The availability of these mutations allowed us to evaluate their effect on the ability of the antiporter to increase tolerance to alkaline cations. Perhaps the most interesting finding is the observation that 11 out of 18 mutations strongly increase tolerance to lithium cations. Two aspects are remarkable: (1) the position of the mutated residues is not random, as none of the six mutations from residues 834 to 876 results in increased tolerance, and (2) all mutations in cluster B, with the only exception of the R926K change, improve lithium tolerance. It is reasonable to assume that the lack of positive effect of this mutation is due to the conservative nature of the change, although it must be noted that a similar change in the following position (R927K) does improve tolerance. In fact, with this only exception, all mutations from position 918 to the carboxy-terminal end of Nha1 result in increased lithium tolerance, suggesting that this region of the protein contains a negative element for lithium transport. The observation that Nha1 versions truncated at positions 888 and 890 also increase lithium tolerance [9] and this work) suggests that this negative element might extend at least 20 residues upstream in the protein sequence. It should be noted that the relevance of residues 920–928 in Nha1 with respect to lithium

tolerance has been pointed out in a recent report [32], showing that truncation at residues 920, 923 and 928 resulted in increased tolerance to lithium. Therefore, our data confirm and expand these results, by showing that residues at positions 817, 834, 932 and 943 also play an important role in regulating the ability of Nha1 to extrude lithium.

The identification of sequences important for Nha1 to play a role in cell cycle (as well as in saline homeostasis) reinforces the notion that a possible role for the carboxy-terminal tail of Nha1 would be to regulate specific functions of this antiporter. It is worth noting that we do not observe here a correlation between cell cycle and saline phenotypes, supporting the idea that both are probably unrelated events. In mammalian cells, the carboxy-terminal tail of Na^+/H^+ exchangers has been identified as target for regulation (see [33] for review), including phosphorylation by different protein kinases. It is suggestive that five of the mutated residues identified in this work correspond to Ser or Thr residues that are located in a favorable context [34] for phosphorylation by casein kinase-2 (S⁸¹⁷, S⁹¹⁸ and T⁹²⁰), cAMP-dependent protein kinase (T⁸⁷⁴) or calcium-calmodulin kinase II (T⁸⁷⁶). In addition, at least in the case of mammalian NHE3, the existence of interacting proteins (named NHERFs, for Na^+/H^+ exchanger regulatory factors) that can serve as adapters for specific protein–protein interactions has been demonstrated. It is suggestive that, while in the overall the carboxy-terminal tail sequence of Nha1 does not display evident sequence similarity with other proteins, a structural element quite similar to the conserved cluster B in Nha1 (Fig. 4B) can be found at the carboxy-terminal end of one of the variants of the regulatory factor NHERF2 (TKA1/E3KARP, accession number Z50150). The possibility of this element playing a regulatory role is being investigated in our laboratory.

We have recently carried out a two-hybrid approach using the carboxy-terminal tail of Nha1 as bait to search for proteins able to interact with this region, which yielded no detect-

able interactions. However, very recently, a different approach based on affinity precipitation and mass spectrometry analysis has revealed a possible interaction between Nha1 and the product of the YHL010c ORF [35]. This gene encodes a 585-residue protein of unknown function, which is remarkably similar (31% identity, 47% conserved residues) to BRAP2, a human protein able to bind to nuclear localization signal motifs [36] found in BRCA1, a breast cancer susceptibility gene product that contributes to homologous recombination, DNA repair and transcriptional regulation [37]. A data bank survey reveals that YHL010c may contain several interesting structural domains, such as a RING finger domain (C3HC4-type), a Zn finger found in ubiquitin hydrolases and other proteins, and an ERM-like binding domain. These structural elements are known in many cases to mediate protein–protein interactions, often involved in signal transduction and cell proliferation. Therefore, it would be most interesting to investigate if the Nha1 residues essential for cell cycle function identified in this work are involved in binding and/or signalling through YHL010C.

Acknowledgements: We thank M.A. Bañuelos for strain B31, and M. Aldea for plasmid pCM113. The excellent technical assistance of Anna Vilalta and Manuel Clemente are acknowledged. This work was supported by grants PB98-0565-C04-02 and BMC2002-04011-C05-04 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional), and by an 'Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya' (2001SGR00193) to J.A. E.S. was recipient of a fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.

References

- [1] Counillon, L. and Pouyssegur, J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 1–4.
- [2] Wiebe, C.A., Dibattista, E.R. and Fliegel, L. (2001) *Biochem. J.* 357, 1–10.
- [3] Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. and Young, P.G. (1992) *EMBO J.* 11, 1631–1640.
- [4] Watanabe, Y., Miwa, S. and Tamai, Y. (1995) *Yeast* 11, 829–838.
- [5] Iwaki, T., Higashida, Y., Tsuji, H., Tamai, Y. and Watanabe, Y. (1998) *Yeast* 14, 1167–1174.
- [6] Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L. and Sychrova, H. (1996) *FEBS Lett.* 387, 89–93.
- [7] Soong, T.W., Yong, T.F., Ramanan, N. and Wang, Y. (2000) *Microbiology* 146, 1035–1044.
- [8] Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujiike, S., Haga, M., Nakamura, N., Inoue, H., Sakajo, S., Ueda, M., Tanaka, A. and Kanazawa, H. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 821–831.
- [9] Bañuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L. and Potier, S. (1998) *Microbiology* 144, 2749–2758.
- [10] Sychrova, H., Ramirez, J. and Peña, A. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 167–172.
- [11] Bañuelos, M.A., Ruiz, M.C., Jiménez, A., Souciet, J.L., Potier, S. and Ramos, J. (2002) *Yeast* 19, 9–15.
- [12] Sutton, A., Immanuel, D. and Arndt, K.T. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 2133–2148.
- [13] Fernández-Sarabia, M.J., Sutton, A., Zhong, T. and Arndt, K.T. (1992) *Genes Dev.* 6, 2417–2428.
- [14] Clotet, J., Posas, F., de Nadal, E. and Ariño, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 26349–26355.
- [15] de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gómez, N. and Ariño, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7357–7362.
- [16] Di Como, C.J., Bose, R. and Arndt, K.T. (1995) *Genetics* 139, 95–107.
- [17] Clotet, J., Garí, E., Aldea, M. and Ariño, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 2408–2415.
- [18] Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J. and Ariño, J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 29740–29747.
- [19] Adams, A., Gottschlings, D.E., Kaiser, C.A. and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [20] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [21] Becker, D.M. and Lundblad, V. (1997) in: *Introduction of DNA into Yeast Cells* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seitman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, pp. 13.7.5–13.7.7, Wiley, New York.
- [22] Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) *Curr. Genet.* 16, 339–346.
- [23] Cormak, C. (1997) In: *Directed Mutagenesis Using the Polymerase Chain Reaction* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seitman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, pp. 8.5.7–8.5.9, Wiley, New York.
- [24] Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., Herrero, E. and Aldea, M. (1997) *EMBO J.* 16, 7196–7206.
- [25] Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) *Gene* 74, 527–534.
- [26] Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapite, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J. and Guarente, L. (1992) *Cell* 70, 251–265.
- [27] Fromant, M., Blanquet, S. and Plateau, P. (1995) *Anal. Biochem.* 224, 347–353.
- [28] Posas, F., Camps, M. and Ariño, J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13036–13041.
- [29] Calero, F., Gómez, N., Ariño, J. and Ramos, J. (2000) *J. Bacteriol.* 182, 394–399.
- [30] Watanabe, Y., Iwaki, T., Shimono, Y., Ichimiya, A., Nagaoka, Y. and Tamai, Y. (1999) *J. Biosci. Bioeng.* 88, 136–142.
- [31] Kinclova, O., Potier, S. and Sychrova, H. (2002) *Microbiology* 148, 1225–1232.
- [32] Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S. and Sychrova, H. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 656–668.
- [33] Hayashi, H., Szaszi, K. and Grinstein, S. (2002) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 976, 248–258.
- [34] Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (1999) *J. Mol. Biol.* 294, 1351–1362.
- [35] Ho, Y. et al. (2002) *Nature* 415, 180–183.
- [36] Li, S., Ku, C.Y., Farmer, A.A., Cong, Y.S., Chen, C.F. and Lee, W.H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 6183–6189.
- [37] Welsh, P.L., Owens, K.N. and King, M.C. (2000) *Trends Genet.* 16, 69–74.