

Modèle topologique de la structure d'un antiport vacuolaire de type NHX chez la vigne cultivée (*Vitis vinifera*)

Mohsen Hanana, Olivier Cagnac, Ahmed Mliki et Eduardo Blumwald

Résumé : Après avoir identifié et isolé un antiport vacuolaire de type NHX chez la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) et avant d'initier des travaux de génomique fonctionnelle, nous avons jugé nécessaire d'acquérir un minimum de connaissances en ce qui concerne la protéine VvNHX1. À cet égard, nous avons effectué une analyse bioinformatique afin d'en déterminer les caractéristiques générales et de disposer d'informations structurales pouvant orienter les travaux de caractérisation fonctionnelle. Nous avons ainsi déterminé d'importants paramètres physico-chimiques (masse moléculaire, point isoélectrique, régions hydrophobes, etc.) et obtenu des données structurales intéressantes (structures primaire, secondaire et tertiaire; domaines conservés et motifs d'interaction; etc.). Le gène *VvNHX1* codant cette protéine de 541 acides aminés, dont la masse moléculaire est estimée à 60 kDa, est composé de 14 exons et mesure 6,5 kb. La composition en acides aminés de cette protéine est très importante, notamment, pour l'établissement de la structure en hélice α , laquelle représente plus de la moitié de la protéine, ainsi que pour la distribution des charges qui génère des interactions électrostatiques capitales pour l'échange d'ions. La structure secondaire de VvNHX1 comporte plusieurs hélices α transmembranaires formées par des résidus d'acides aminés hydrophobes qui facilitent son insertion au niveau membranaire. Globalement, VvNHX1 possède une partie N-terminale hydrophobe, constituée de 10 régions transmembranaires dénombrant 440 résidus d'acides aminés, et une partie C-terminale hydrophile, composée de 100 résidus. La région comprise entre les quatrième et cinquième segments transmembranaires représente, de par sa structure en majorité hélicoïdale ainsi que l'existence d'un environnement électrostatique favorable aux cations, le pore par lequel vont s'engouffrer les cations lors de leur traversée membranaire. Par ailleurs, la présence de différents domaines d'interaction ainsi que de multiples sites putatifs de modification post-traductionnelle, principalement localisés au niveau de la partie C-terminale mais également au niveau N-terminal, est d'une grande importance pour la régulation de l'activité de la protéine, sa stabilité structurale ainsi que ses interactions avec d'autres protéines mais également avec des molécules de signalisation cellulaire.

Mots-clés : antiport NHE, bioinformatique, structure topologique, modification post-traductionnelle, *Vitis vinifera*.

Abstract: After identifying and isolating a grapevine (*Vitis vinifera* L.) NHX vacuolar antiporter and before initializing functional genomic studies, we judged necessary to acquire a minimum of knowledge about the VvNHX1 protein. Thus, we realized a bioinformatic analysis to determine its basic characteristics and to get structural informations that could guide us through the functional characterization. We have determined important physico-chemical parameters (molecular mass, isoelectric point, hydrophobic regions, etc.) and obtained interesting structural data (primary, secondary, and tertiary structures; conserved domains and interaction motives; etc.). The *VvNHX1* gene, which encodes this 541 amino-acid protein with a predicted molecular mass of 60 kDa, is made of 14 exons and measures 6.5 kb. The amino-acidic composition of this protein is very important, in particular, for the establishment of the α -helix structure, which represents more than 50% of the protein, but also for charge distribution, which generates critical electrostatic interactions for the ionic flux. The secondary structure of VvNHX1 contains multiple transmembrane α -helix segments that are made of hydrophobic amino-acid residues, thus facilitating its insertion in the membrane. Globally, VvNHX1 has one hydrophobic N-terminal region, made of 10 transmembrane segments with 440 amino-acid residues, and one hydrophilic C-terminal region, made of 100 residues. The region located between the fourth and fifth transmembrane segments represents, with its structure mainly heli-

Reçu le 11 juin 2008. Publié sur le site Web des Presses scientifiques du CNRC, au botanique.cnrc.ca, le 6 mars 2009.

M. Hanana^{1,2} et **A. Mliki**. Laboratoire de physiologie moléculaire de la vigne, Centre de biotechnologie de Borj-Cédria, B. P. 901, Hammam-lif 2050, Tunisie.

O. Cagnac et **E. Blumwald**. Department of Plant Sciences, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA.

1. Auteur correspondant (courriel : punto80@yahoo.com).

2. Adresse actuelle : Laboratoire Caractérisation et qualité de l'huile d'olive, Centre de biotechnologie de Borj-Cédria, B. P. 901, Hammam-lif 2050, Tunisie.

coidal and the presence of a favourable electrostatic environment, the pore where cation flux is performed across the membrane. VvNHX1 contains various interaction domains as well as several putative posttranslational modification sites, mainly at the C-terminus but also at the N-terminus, that play an important part in regulating protein activities, influence protein structural stability, or interact with other proteins or signalling molecules.

Key words: NHE antiporter, bioinformatics, topological structure, posttranslational modification, *Vitis vinifera*.

Introduction

En utilisant une approche gènes candidats, nos récents travaux sur la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) ont abouti à l'identification et l'isolement d'un antiport vacuolaire de type NHX, la protéine VvNHX1, dont nous avons décrit la fonctionnalité et les propriétés biologiques de transport (Hanana et al. 2007, 2008). Cependant, les données structurales et relatives aux modalités de régulation de cette protéine font défaut. Nous avons démontré que VvNHX1 assure l'échange de cations monovalents (Na^+ , K^+ , Li^+)/ H^+ à travers la membrane vacuolaire et qu'il est impliqué dans la régulation du pH, l'homéostasie ionique, la tolérance à la salinité et la détoxification de cations mais aussi et surtout dans la maturation de la baie du raisin par un processus de compartimentation de cations au sein de la vacuole (Hanana et al. 2007, 2008).

Les antiports NHX peuvent jouer des rôles variables et possèdent des fonctions diverses selon les organismes. Parmi eux, les antiports vacuolaires représentent une famille de protéines transmembranaires assurant les échanges cation/ H^+ au niveau du tonoplaste et jouant un rôle important dans divers processus physiologiques, notamment, la régulation du pH et de la prolifération cellulaire, l'homéostasie ionique (Blumwald et al. 2000; Putney et Barber 2003; Sottosanto et al. 2007), le contrôle de la circulation et du mouvement de cations, ainsi que l'osmorégulation et la tolérance à la salinité chez les végétaux (Apse et Blumwald 2002; Moffat 2002; Shi et al. 2003). Chez les mammifères, les antiports de type NHE assurent différentes fonctions, notamment, la régulation du pH intracellulaire et du volume cellulaire, l'élimination de l'acidité excessive chez les cellules en pleine activité métabolique et la réabsorption de NaCl à travers les épithélia intestinaux et rénaux (Orlowski et Grinstein 1997). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, ces antiports NHE maintiennent, au niveau des cellules épithéliales intestinales, le gradient de pH nécessaire à l'absorption des nutriments (Nehrke 2003). Chez la mouche *Drosophila melanogaster*, les antiports DmNHE1, DmNHE2 et DmNHE3 sont exprimés au niveau des cellules épithéliales des tubes de Malpighi et seraient impliqués dans les sécrétions fluides issues de ces tissus (Giannakou et Dow 2001). Enfin, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en plus de l'activité d'échange cation/proton à travers la vacuole, l'antiport NHX intervient au niveau de la circulation vésiculaire ainsi que de la biogenèse des vésicules et des compartiments vacuolaires (Bowers et al. 2000; Ali et al. 2004).

D'un point de vue général, les systèmes cellulaires responsables du transport d'ions chez les végétaux, du moins chez la vigne, restent encore peu caractérisés aux niveaux génétique et moléculaire. Or, il est difficile de trouver expérimentalement la fonction d'une protéine sans aucune

connaissance préalable, d'où le besoin d'un minimum de caractérisation et d'informations sur la structure pour orienter les recherches de génomique fonctionnelle mais aussi pour initier les travaux de cristallisation et de détermination de structure tridimensionnelle. Les programmes d'annotation automatique ont identifié, chez les eucaryotes, plus de 200 gènes candidats pour l'antiport NHX, et plus de 550 séquences putatives ont été enregistrées dans les bases de données bioinformatiques GenBank et Pfam (Brett et al. 2005). Malgré ce nombre de gènes orthologues relativement élevé pour une seule et même famille de protéines transmembranaires, un seul antiport, le NhaA d'*Escherichia coli*, a vu sa structure tridimensionnelle déterminée après purification, cristallisation et analyse par résonance magnétique nucléaire et microscopie à force atomique (Williams 2000).

Étant donné que le fossé s'accroît entre le nombre de séquences protéiques déterminées, le nombre de structures tridimensionnelles disponibles et le nombre de fonctions expérimentalement connues pour ces séquences, il devient impératif d'utiliser des outils de prédiction des structures ou des fonctions pour des protéines totalement ou partiellement inconnues (Tusnády et al. 2008). L'outil bioinformatique constitue un moyen efficace pour combler ce vide et répondre à ce besoin d'identification structurale et fonctionnelle. La modélisation structurale via la combinaison de plusieurs algorithmes de prédiction de structure reste un outil irremplaçable pour obtenir l'information structurale en l'absence d'information expérimentale directe (Cuthbertson et al. 2005). Pour déterminer la structure réelle d'une protéine, on a souvent recours à la cristallographie par rayons X; néanmoins, cette technique demande beaucoup de travail car il faut avoir en grande quantité une protéine très pure et réussir à la cristalliser. Or les antiports NHX sont des protéines transmembranaires intrinsèques, donc fortement liées à la membrane, d'où la nécessité d'employer un détergent pour leur extraction et solubilisation, mais cette pratique exerce un effet dénaturant indésirable pour leur étude. Par ailleurs, les protocoles de purification ainsi que les techniques de cristallisation des protéines restent complexes et nécessitent le plus souvent une optimisation afin d'obtenir une protéine native stable et fonctionnelle physiologiquement. De plus, l'analyse des résultats est longue. La résonance magnétique nucléaire peut elle aussi être utilisée mais pour des protéines qui ne sont pas trop grosses (200 acides aminés); or la séquence peptidique des antiports NHX dépasse généralement les 500 acides aminés. Il est maintenant possible de prédire *in silico*, par des méthodes informatiques, les structures bidimensionnelles et tridimensionnelles d'une protéine, certains de ses domaines fonctionnels, les modifications post-traductionnelles, voire même sa localisation cellulaire (Tusnády et Simon 2001a). L'exactitude des prédictions de structures secondaire et tertiaire semble augmenter quand

on combine plusieurs algorithmes indépendants (Cuthbertson et al. 2005). Bien que ces méthodes soient théoriques et ne donnent qu'une information probable quant à la structure réelle de la protéine, elles demeurent encore un prérequis indispensable aux travaux d'analyse de la structure tridimensionnelle dont la détermination constitue un enjeu majeur. En outre, la modélisation théorique permet de formuler des hypothèses de relation structure – fonction – régulation d'activité en l'absence de structures expérimentales (Landau et al. 2007).

Dans ce contexte et en guise de première étape avant l'initiation des travaux d'analyse de structure tridimensionnelle, nous présentons ici les résultats de l'étude structurale de l'antiport VvNHX1 en nous basant sur des analyses bioinformatiques *in silico*. Les informations apportées par ce modèle structural topologique pourraient constituer un appui précieux à l'élaboration de constructions géniques mutantes; elles permettraient alors de tester leur fonctionnalité et d'essayer certaines modalités de régulation de l'activité de transport. De plus, en parallèle, cette approche permettrait d'accéder à la structure de la protéine par morceaux, en utilisant les cristaux issus des constructions de délétions.

Méthodologie : analyses bioinformatiques *in silico*

Les séquences de l'antiport VvNHX1 ont été analysées avec le logiciel Lasergene, version 8.0 (EditSeq, lors de la réception des séquences et pour la recherche de cadre de lecture ouvert; MegAlign et SeqMan, pour la comparaison et l'alignement des séquences afin de valider la séquence finale consensus du gène) de DNASTAR, Inc. (2008). Puis, l'analyse BLAST a été effectuée au niveau des bases de données du National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland (Altschul et al. 1990) et Pfam (version 22.0, juin 2007, 9318 familles; Finn et al. 2008). Les sites de serveurs offrant des ressources en bioinformatique ont également servi à la caractérisation des différents niveaux de structure (primaire, secondaire et tertiaire) de la protéine : Infobiogen (Centre national de ressources informatiques appliquées à la génomique 2006; le site Web consulté n'est plus fonctionnel), NPS@ (Institut de biologie et de chimie des protéines 2008) et ExpASY pour l'analyse protéomique (Gasteiger et al. 2003). Les prédictions topologiques de structure ont été réalisées avec les logiciels TopPred2 et TMAP (Institut Pasteur 2008), TMHMM (Centre d'analyse de séquences biologiques 2007), DAS (Cserzo et al. 1997), PRED-TMR (Pasquier et al. 1999), TMPred (Institut suisse de bioinformatique 2008), HMMTOP (version 2; Tusnády et Simon 2001a), PHDhtm (Rost et al. 2004) et ProtParam (Réseau de bioinformatique canadien 2008); la méthode de Kyte et Doolittle (1982) a été utilisée afin de déterminer le caractère hydrophobe des résidus d'acides aminés. La combinaison et l'interprétation des résultats de ces différents outils ont permis d'obtenir et de désigner un modèle final consensus. L'obtention de ce modèle est basée sur la fréquence et l'analogie des modèles déterminés par les logiciels les plus puissants et les plus performants (notamment TMAP, TMHMM et HMMTOP), tel que décrit par Tusnády et Simon (2001b) et Cuthbertson et al. (2005); dans le cas de divergence sur certaines régions, les autres logiciels ont

été utilisés. Le logiciel NetPhos, version 2.0 (Blom et al. 1999), a servi à la détermination des sites putatifs de phosphorylation de VvNHX1. La représentation hélicoïdale d'une région de la protéine a été effectuée à l'aide du logiciel Winpep, version 3.01 (Hennig 1999).

Résultats

Description moléculaire du gène *VvNHX1*

L'ADNc entier du gène *VvNHX1* est composé de 2053 nucléotides; il possède une région 5' non traduite de 60 nucléotides, une région 3' non traduite de 367 nucléotides et une région codante de 1626 nucléotides (Hanana et al. 2007). L'analyse par BLAST de la séquence du gène *VvNHX1*, avec la séquence du génome du *V. vinifera* 'Pinot noir', clone ENTAV 115, numéro d'accèsion AM462852, nous a permis de déterminer que *VvNHX1* est localisé au niveau du chromosome 5, qu'il est composé de 14 exons et qu'il représente environ 6,5 kb. Comparativement, le gène *AtNHX1* d'*Arabidopsis thaliana* possède 13 exons et représente 4 kb (Darley et al. 2000), *InNHX1* et *InNHX2* d'*Ipomoea nil* possèdent chacun 15 exons et représentent respectivement 5,5 et 6 kb (Ohnishi et al. 2005) et, enfin, *OsNHX1* d'*Oryza sativa* a 14 exons et représente 4,5 kb (Fukuda et al. 2004). D'autre part, la consultation de la base de données du National Center for Biotechnology Information a permis de détecter la présence de deux autres isoformes de *VvNHX* localisées au niveau des chromosomes 7 et 14 du génome du *V. vinifera*. Ainsi, la présence d'au moins trois isoformes de type NHX dans le génome du *V. vinifera* supporte l'idée que cette famille de gènes est impliquée dans divers processus biologiques. L'analyse par BLAST de la séquence entière a permis d'identifier des domaines conservés relatifs au transport de cations et a également révélé des niveaux élevés de similitude avec différentes séquences codant pour des antiports végétaux de type NHX, ce qui nous a permis de classer *VvNHX1* dans le groupe des protéines transmembranaires localisées au niveau du tonoplaste.

Analyse de la structure primaire de l'antiport *VvNHX1*

La séquence peptidique de *VvNHX1* est disponible dans la base de données GenBank, sous le numéro d'accèsion AY634283. *VvNHX1* est une protéine composée de 541 résidus d'acides aminés. Elle possède une masse moléculaire estimée à 60 kDa ainsi qu'un point isoélectrique théorique de 9,51. La composition peptidique de *VvNHX1* révèle que les acides aminés les plus fréquents sont la leucine (12,4 %) et la sérine (10,5 %). D'une part, les acides aminés présentant un caractère hydrophobe nécessaire à la formation de l'hélice α représentent 53 % de l'antiport, ce qui suggère un rôle important dans l'organisation hélicoïdale de la protéine, confirmant sa localisation et son intégration au niveau membranaire. D'autre part, les acides aminés favorables à la formation de liaisons hydrogène, et donc à la stabilisation de la protéine, forment 40% de la molécule. Par ailleurs, la cystéine est très peu présente (0,9 %); la probabilité de formation de liaison disulfure rigide (comparativement aux liaisons hydrogène plus fragiles) est donc réduite, ce qui accorderait une certaine souplesse à la protéine au sein de la membrane fluide. Le nombre total de résidus chargés négativement est de 34, tandis que celui des résidus chargés posi-

tivement est de 53. La répartition des charges au niveau de la chaîne peptidique ainsi que leur nombre peuvent jouer un rôle dans l'attraction et l'affinité ioniques. En effet, nous avons constaté que près de 30 % des charges négatives (c'est-à-dire 10 résidus d'acides aminés chargés négativement) sont localisées au niveau de la région des acides aminés 145 à 207 (avec seulement 2 résidus positifs); il en résulte un environnement électrostatique très favorable à l'attraction et au flux de cations (fig. 1). Par ailleurs, nous avons noté la répétition d'une séquence peptidique SVVLF au niveau des positions 191 et 425; toutefois, ce motif n'a été reconnu chez aucune autre protéine et, par conséquent, aucun rôle particulier n'a pu lui être attribué.

Analyse de la structure secondaire de l'antiport VvNHX1

Plus de la moitié de la protéine VvNHX1 est organisée en hélice α (56 %); le reste de la protéine est en forme de chaîne allongée (37 %) et la structure en feuillet β est pratiquement négligeable (7 %). La présence continue et répétée de structures en hélice α est généralement favorable à l'insertion de la protéine au sein des membranes. En effet, la partie de la structure de l'antiport se trouvant dans le cœur non polaire de la bicouche lipidique est essentiellement composée de segments en hélices α qui parviennent à neutraliser, par formation de liaisons hydrogène, les fonctions hautement polaires N-H et C=O du squelette peptidique. La structure secondaire de VvNHX1 comporte ainsi plusieurs hélices α transmembranaires formées par des segments de chaîne contenant des résidus d'acides aminés hydrophobes. Des petites régions charnières relient les hélices α , de sorte que la chaîne polypeptidique effectue un trajet en zigzag à travers la membrane (fig. 1).

Analyse de la structure tertiaire et des modifications post-traductionnelles de l'antiport VvNHX1

La plupart des logiciels utilisés élaborent un profil d'hydrophobicité révélant la présence de 10 domaines transmembranaires hautement conservés chez les végétaux supérieurs (fig. 1), tous organisés en hélice α et constitués chacun de 23 résidus d'acides aminés (Hanana et al. 2007). Même si la prédiction de la structure peut varier selon le programme utilisé, la plupart des logiciels de prédiction de topologie exhibent des modèles quasi similaires : VvNHX1 possède deux domaines fonctionnels. La partie N-terminale hydrophobe constituée des 10 régions transmembranaires dénombre 440 résidus, alors que la partie C-terminale hydrophile est composée de 100 résidus. La partie N-terminale transmembranaire contient le pore où l'échange d'ions aura lieu, tandis que la partie cytoplasmique C-terminale semble être impliquée dans la régulation de l'activité de transport (Wakabayashi et al. 1997). Le modèle élaboré (fig. 1) indique que les parties N et C terminales font face au cytoplasme. Par ailleurs, selon Yamaguchi et al. (2003), la partie hydrophobe, située entre les quatrième et cinquième régions transmembranaires, et qui ne semble pas traverser complètement la membrane vacuolaire bien qu'elle lui soit associée, est considérée comme capitale pour l'activité de transport. De plus, différents domaines d'interaction ainsi que de multiples sites putatifs de modification post-traductionnelle, principalement localisés au niveau de la partie C-terminale, sont d'une grande importance pour la régulation de l'activité de

la protéine, sa stabilité structurale ainsi que ses interactions avec d'autres protéines mais également avec des molécules de signalisation cellulaire (fig. 1). Seulement les exemples qui nous ont semblés les plus intéressants seront évoqués en raison de la présence d'un grand nombre de ces motifs et domaines.

Cas de myristoylation

Plusieurs motifs putatifs de myristoylation, la plupart d'entre eux situés sur les segments transmembranaires, ont été répertoriés chez la protéine VvNHX1 (fig. 1). Plus de la moitié d'entre eux (cinq sur neuf) se trouvent localisés et concentrés au niveau du pore délimitant la zone de flux de cations, assurant ainsi une meilleure stabilisation et fixation de cette région qui est sujette à des phénomènes vibratoires et de distorsion en raison de ce flux (fig. 1). En plus du précédent motif, il existe un site d'attachement membranaire localisé entre les première et deuxième régions transmembranaires, qui servirait à la fois à l'adressage et à l'ancrage de la protéine au niveau de la membrane vacuolaire (fig. 1).

Cas de glycosylation

Bien que les analyses par buvardage Western effectuées par Hanana et al. (2007) n'aient révélé aucune évidence de nature glycoprotéinique pour VvNHX1, plusieurs sites potentiels de glycosylation ont été détectés au niveau de VvNHX1 (fig. 1). Cela confirme que l'existence d'un motif n'est pas forcément synonyme de fonctionnalité, mais découlerait possiblement d'un simple héritage génétique.

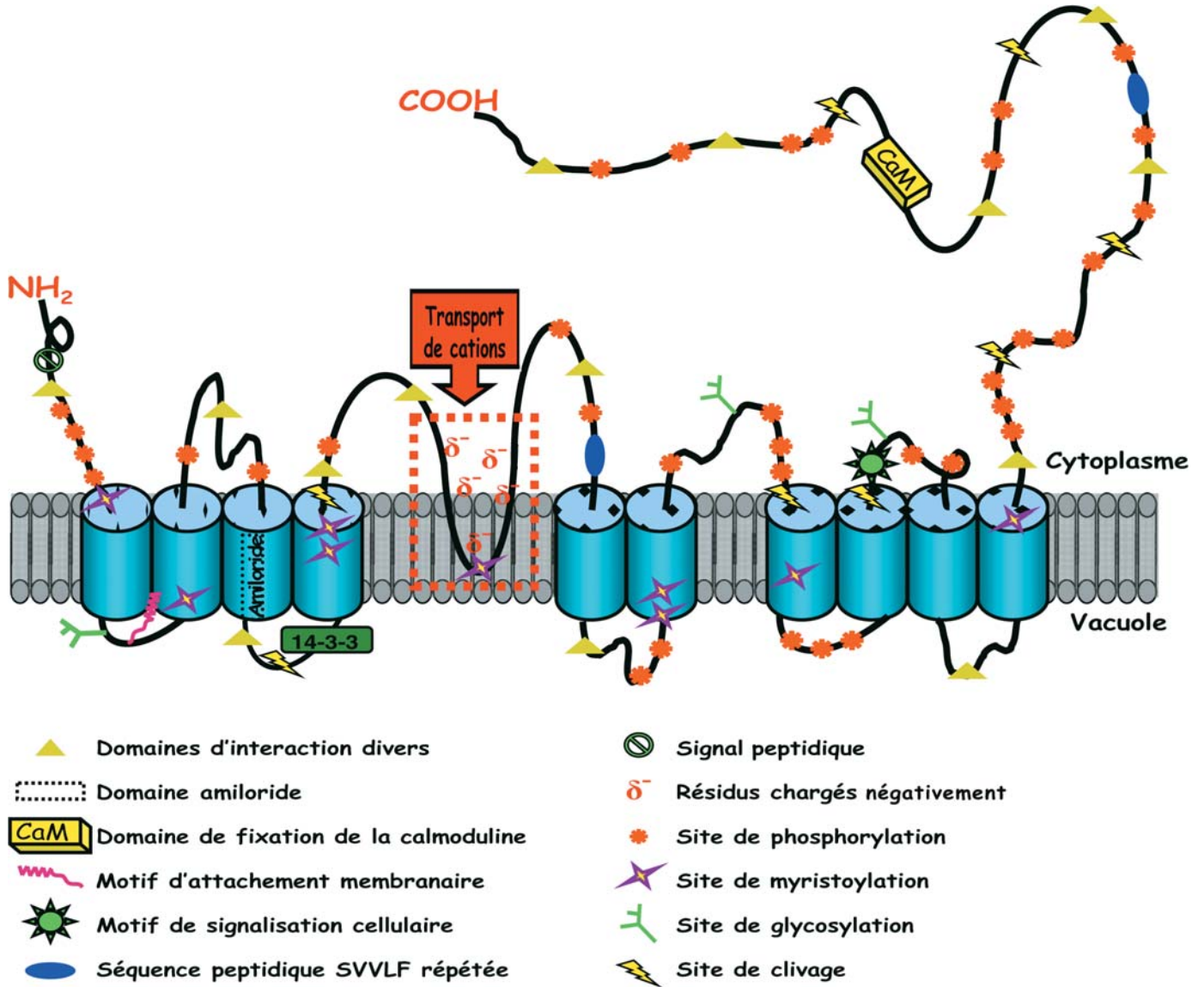
Cas de phosphorylation

Le nombre élevé et varié de sites putatifs de phosphorylation chez VvNHX1 dénote l'importance et la complexité de la régulation chez cette protéine (fig. 1). En effet, ce type de modification post-traductionnelle sert à la signalisation cellulaire et représente un mécanisme impliqué dans la régulation de l'activité de transport de la protéine et un moyen de contrôler finement le flux et l'échange d'ions.

Cas de motifs d'interaction

Un motif d'interaction putatif avec les protéines de la famille 14-3-3 (groupe de protéines répertoriées sous ce numéro de catalogue) a été identifié au niveau de la région des acides aminés 108 à 114. Les protéines 14-3-3 interviennent dans de nombreux processus cellulaires et jouent le rôle d'adaptateurs dans des interactions protéines-protéines, les mécanismes d'activation-inactivation d'enzymes ou encore dans la localisation subcellulaire de protéines. D'autre part, VvNHX1 possède un domaine (⁸⁴LFFIYLLPPI⁹³) de fixation du composé diurétique amiloride au niveau de la troisième région transmembranaire (fig. 1) (Hanana et al. 2007). Il a été rapporté que tous les antiports NHE possèdent un tel domaine (Yun et al. 1993; Harris et Fliegel 1999). Par ailleurs, la région peptidique comprenant les acides aminés 489 à 524 possède la capacité de former une structure hélicoïdale amphiphile chargée positivement (fig. 2); cette région est caractéristique d'un domaine de fixation de la calmoduline impliquée dans la régulation de l'activité de l'antiport. Ce même domaine a été identifié par Yamaguchi et al. (2003) au niveau des acides aminés 496 à 518 d'AtNHX1.

Fig. 1. Modèle topologique de la structure putative de l'antiport vacuolaire VvNHX1 du *Vitis vinifera*.

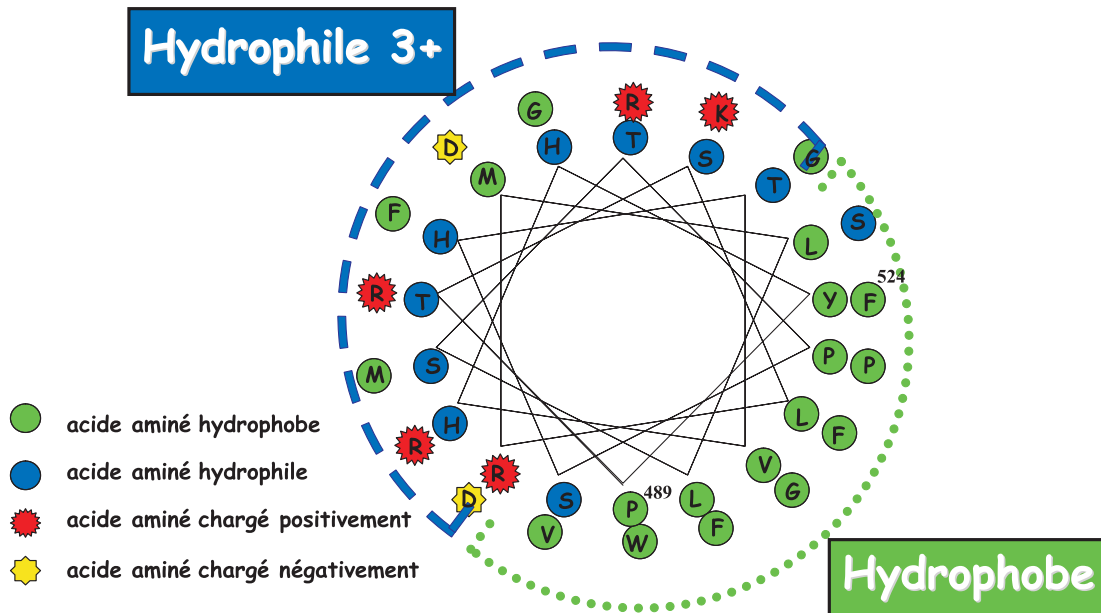


Discussion

Les antiports vacuolaires NHX sont des protéines transmembranaires composées d'environ 550 résidus d'acides aminés; ils présentent généralement 10 à 12 régions transmembranaires hydrophobes (Hamada et al. 2001; Xia et al. 2002; Yoko et al. 2002; Yamaguchi et al. 2003; Brini et al. 2005; Yu et al. 2007) et une partie C-terminale hydrophile localisée le plus probablement au niveau du cytoplasme, bien que celle d'AtNHX1 soit située au sein du lumen vacuolaire d'après Yamaguchi et al. (2003). En effet, ces derniers auteurs affirment que la structure globale d'AtNHX1 est distincte de celles de l'antiport humain NHE1 et de tout autre NHX connu; elle serait composée de neuf domaines transmembranaires hydrophobes et d'un domaine C-terminal hydrophile. La séquence de la partie N-terminale, responsable de l'activité de transport, est la plus conservée parmi les antiports NHX, tandis que la partie C-terminale semble plus spécifique (Putney et al. 2002; Yamaguchi et al. 2005; Pardo et al. 2006). Selon Yamaguchi et al. (2003), la régula-

tion de la sélectivité de transport par le domaine C-terminal ainsi que la localisation vacuolaire de ce dernier prouvent qu'il existe des mécanismes de régulation de l'activité d'échange d'ions agissant au sein de la vacuole. Entre autres, cette sélectivité d'échange et cette affinité de transport seraient régulées de l'intérieur de la vacuole par la calmoduline qui interagit avec une région spécifique de la partie C-terminale de l'antiport AtNHX1 (Yamaguchi et al. 2005). Paradoxalement, Sato et Sakaguchi (2005) s'accordent avec nous sur la localisation cytoplasmique du domaine C-terminal; ils confirment une analogie de structure entre AtNHX1 et NHE1 du fait de la présence commune de 12 régions transmembranaires, et ceci en dépit de l'absence de signal peptidique chez AtNHX1. Les auteurs s'accordent ainsi sur le fait que AtNHX1 présente des segments associés à la membrane vacuolaire sans pour autant la traverser complètement; toutefois, leurs résultats divergent quant à la localisation de ces segments. Si dans le modèle de Yamaguchi et al. (2003) l'on considère comme membranaires les segments qui ne traversent pas totale-

Fig. 2. Représentation hélicoïdale (Winpep, version 3.01; Hennig 1999) et caractère amphiphile de la région peptidique 489 à 524 de VvNHX1 du *Vitis vinifera*.



brane, alors on retrouve les 12 régions membranaires du modèle de Sato et Sakaguchi (2005) proposé pour AtNHX1.

En dehors de ces divergences d'opinion et d'interprétation concernant la structure topologique d'AtNHX1, nous pouvons constater que celle de VvNHX1 possède des caractéristiques bien spécifiques et importantes à mentionner. En effet, chez la famille des antiports humains NHE, un signal peptidique est généralement présent en aval du premier segment transmembranaire et sert à l'intégration de l'antiport au niveau membranaire (Sato et Sakaguchi 2005), or chez le *V. vinifera*, celui-ci est localisé au tout début de la séquence peptidique de VvNHX1 et bien avant le premier segment transmembranaire. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que, chez NHE1, il existe un site putatif de clivage situé juste quelques acides aminés en avant du signal peptidique, alors que pour VvNHX1, celui-ci n'est pas localisé avant le signal peptidique mais beaucoup plus loin sur la partie C-terminale de la séquence peptidique. Néanmoins, chez les deux protéines NHE1 et VvNHX1, aucune preuve expérimentale concernant un mécanisme de clivage n'a été mise en évidence. D'autre part, il a été rapporté que toutes les protéines NHE possèdent un domaine conservé (LFFIYLLPPI) de fixation de l'amiloride, composé qui a la faculté d'inhiber l'activité de transport de l'antiport (Yun et al. 1993; Harris et Fliegel 1999); cependant, après avoir identifié ce domaine au niveau de la séquence peptidique de VvNHX1, nous avons échoué à inhiber l'activité d'échange d'ions en utilisant ce composé. Ce manque de succès tient sans doute à ce que le domaine de fixation de l'amiloride chez VvNHX1 possède une isoleucine au lieu d'une leucine, et une tyrosine au lieu d'une phénylalanine, contrairement à la plupart des isoformes de NHE. En effet, de telles mutations ont été impliquées dans la réduction de l'effet inhibiteur de l'amiloride sur l'isoforme NHE3 (Counillon et al. 1993). Ainsi, l'existence d'un domaine (même s'il est conservé chez la plupart des espèces) au niveau de la séquence peptidique n'est pas forcément synonyme de fonc-

tionnement. Une autre particularité de VvNHX1 réside dans le fait que le motif d'interaction avec les protéines 14-3-3 est localisé au niveau de la partie N-terminale intravacuolaire (ce qui implique une intervention et une régulation à partir du compartiment vacuolaire) alors qu'il est situé sur la partie C-terminale cytoplasmique chez NHE (ce qui implique, par conséquent, une régulation à partir du cytoplasme) (Wakabayashi et al. 2000). En outre, il a été rapporté que certains antiports vacuolaires sont glycosylés pour former des glycoprotéines telles que AtNHX1 (Apse et al. 1999), AgNHX1 de l'*Atriplex gmelini* (Hamada et al. 2001) et OsNHX1 (Fukuda et al. 2004), mais cela n'a pas été démontré chez VvNHX1. De plus, le phénomène d'oligomérisation, qui est une caractéristique commune à plusieurs protéines transmembranaires, ne semble pas exister chez VvNHX1. En effet, et bien que l'association en dimère ait été décrite au niveau des isoformes NHE1 et NHE3 de mammifères (Fafournoux et al. 1994; Counillon et Pouyssegur 2000; Lacroix et al. 2004) et de l'antiport NhaA de la bactérie *E. coli* (Screpanti et al. 2006), nos travaux d'immunodétection (Hanana et al. 2007) ne supportent pas l'hypothèse d'une dimérisation chez VvNHX1.

Bien que les travaux de détermination de structure soient à l'heure actuelle un champ très actif de recherche, aucune structure tridimensionnelle de l'antiport vacuolaire NHX n'a encore vu le jour. La comparaison des nombreuses structures tridimensionnelles à haute résolution (obtenues par résonance magnétique nucléaire ou par cristallographie aux rayons X) disponibles pour les protéines solubles (plus de 25 000) et membranaires (95) dans la base de données des protéines reflète clairement les difficultés rencontrées avec les protéines membranaires (Institut Max-Planck de biophysique 2006)). La présence d'un environnement lipidique essentiel au maintien de leur conformation active ainsi que leur haut poids moléculaire compliquent considérablement la détermination de leur structure tridimensionnelle (Chérouati 2005). C'est pourquoi, en l'absence de structure tridi-

mensionnelle pour l'antiport VvNHX1, il est possible d'exploiter notre modèle (qui sera confirmé ou qui nécessitera quelques ajustements selon les résultats des travaux ultérieurs) en l'utilisant notamment comme carte topologique avec laquelle les zones de mutation ou délétion à effectuer pourront être choisies en fonction de la position des différents segments transmembranaires et des sites de régulation post-traductionnelle, tout particulièrement au niveau de la partie C-terminale. C'est ainsi que des travaux de délétion et mutation effectués au niveau du domaine de fixation de la calmoduline ont abouti à une activation de NHE1, à l'amélioration de son affinité pour les ions H^+ intracellulaires et à une perte de sa sensibilité au calcium intracellulaire (Bertrand et al. 1994; Wakabayashi et al. 1994). Ce domaine exerce donc un effet auto-inhibiteur sur l'activité de l'antiport. Cette auto-inhibition est logique dans le sens où elle limite l'absorption de NaCl au niveau intestinal et, par conséquent, réduit les risques de pathologie due à l'excès de sel dans l'alimentation. Un mécanisme similaire d'auto-régulation négative par la calmoduline a été mis en évidence chez AtNHX1 (Yamaguchi et al. 2005), mais pas encore chez VvNHX1, où il serait responsable de l'ajustement de la teneur en potassium ainsi que du contrôle de l'acidité au niveau de la baie du raisin. La manipulation de ce domaine pourrait probablement servir à améliorer la qualité organoleptique du raisin. Il serait aussi intéressant d'effectuer des mutations dirigées au niveau des domaines d'interaction (motifs d'interaction avec les protéines de la famille 14-3-3, séquence peptidique SVVLF, domaines calmoduline ou amiloride ou environnement électrostatique correspondant au lieu de flux de cations, etc.) et de régulation d'activité (sites de phosphorylation ou de glycosylation, etc.), puis d'analyser les caractéristiques de transport et d'échange d'ions de VvNHX1. Cette approche consistant à manipuler par mutation ou délétion de domaine (ou portion de domaine) permettrait d'accéder à de nouvelles informations concernant la structure tridimensionnelle de la protéine ainsi qu'à des voies prometteuses quant aux modalités de régulation de son activité de transport d'ions; en outre, elle permettrait d'émettre et de tester de nouvelles hypothèses quant à la structure et la fonction de cette importante protéine.

Bibliographie

- Ali, R., Brett, C.L., Mukherjee, S., et Rao, R. 2004. Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J. Biol. Chem.* **279** : 4498–4506. doi:10.1074/jbc.M307446200. PMID:14610088.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., et Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215** : 403–410. PMID:2231712.
- Apse, M.P., et Blumwald, E. 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** : 146–150. doi:10.1016/S0958-1669(02)00298-7. PMID:11950567.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., et Blumwald, E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, **285** : 1256–1258. doi:10.1126/science.285.5431.1256. PMID:10455050.
- Bertrand, B., Wakabayashi, S., Ikeda, T., Pouyssegur, J., et Shigekawa, M. 1994. The Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J. Biol. Chem.* **269** : 13 703 – 13 709. PMID:8175806.
- Blom, N., Gammeltoft, S., et Brunak, S. 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294** : 1351–1362. doi:10.1006/jmbi.1999.3310. PMID:10600390. Disponible au www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/ (version 2.0) [accédé le 2 juin 2008].
- Blumwald, E., Aharon, G.S., et Apse, M.P. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1465** : 140–151. doi:10.1016/S0005-2736(00)00135-8. PMID:10748251.
- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I., et Stevens, T.H. 2000. The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **11** : 4277–4294. PMID:11102523.
- Brett, C.L., Donowitz, M., et Rao, R. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288** : C223–C239. doi:10.1152/ajpcell.00360.2004.
- Brini, F., Gaxiola, R.A., Berkowitz, G.A., et Masmoudi, K. 2005. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol. Biochem.* **43** : 347–354. PMID:15907686.
- Centre d'analyse de séquences biologiques. 2007. TMHMM server, version 2.0. Prediction of transmembrane helices in proteins [en ligne]. Centre d'analyse de séquences biologiques, Université technique du Danemark, Lyngby, Danemark. Disponible au www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/ [accédé le 5 mai 2008].
- Centre national de ressources informatiques appliquées à la génomique. 2006. Infobiogen. Centre national de ressources informatiques appliquées à la génomique, Université d'Évry-Val-d'Essonne, Paris, France.
- Chérouati, N. 2005. Expression hétérologue de récepteurs couplés aux protéines G dans la levure *Pichia pastoris* : une contribution au projet MePNet [en ligne]. Thèse de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire, École doctorale vie et santé, Université Louis-Pasteur de Strasbourg, Strasbourg, France. Disponible au eprints-scd-ulp.u-strasbg.fr:8080/405/ [accédé le 6 juin 2008].
- Counillon, L., et Pouyssegur, J. 2000. The expanding family of eukaryotic Na^+/H^+ exchangers. *J. Biol. Chem.* **275** : 1–4. doi:10.1074/jbc.275.1.1. PMID:10617577.
- Counillon, L., Franchi, A., et Pouyssegur, J. 1993. A point mutation of the Na^+/H^+ exchanger gene (NHE1) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 4508–4512. doi:10.1073/pnas.90.10.4508. PMID:8389452.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., et Elofsson, A. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot. Eng.* **10** : 673–676. doi:10.1093/protein/10.6.673. Disponible au www.sbc.su.se/~miklos/DAS/ [accédé le 5 mai 2008].
- Cuthbertson, J.M., Doyle, D.A., et Sansom, M.S.P. 2005. Transmembrane helix prediction: a comparative evaluation and analysis. *Protein Eng. Des. Sel.* **18** : 295–308. doi:10.1093/protein/gzi032. PMID:15932905.
- Darley, C.P., Van Wuytswinkel, O.C., Van der Woude, K., Mager, W.H., et De Boer, A.H. 2000. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* *NHX1* genes encode amiloride sensitive electroneutral Na^+/H^+ exchangers. *Biochem. J.* **351** : 241–249. doi:10.1042/0264-6021:3510241. PMID:10998367.
- DNASTAR, Inc. 2008. Sequence analysis. Lasergene, version 8.0. DNASTAR, Inc., Madison, Wisc.
- Fafournoux, P., Noël, J., et Pouyssegur, J. 1994. Evidence that Na^+/H^+ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *J. Biol. Chem.* **269** : 2589–2596. PMID:8300588.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.-R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer,

- E.L.L., et Bateman, A. 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **36** (Database issue) : D281–D288. doi:10.1093/nar/gkm960. PMID:18039703. Disponible au pfam.sanger.ac.uk/ (version 23.0) et au pfam.jouy.inra.fr/ (version 22.0) [accédé le 5 mai 2008].
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., et Tanaka, Y. 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* **45** : 149–159.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., et Bairoch, A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31** : 3784–3788. doi:10.1093/nar/gkg563. PMID:12824418. Disponible au au.expasy.org/ [accédé le 2 juin 2008].
- Giannakou, M.E., et Dow, J.A.T. 2001. Characterization of the *Drosophila melanogaster* alkali-metal/proton exchanger (NHE) gene family. *J. Exp. Biol.* **204** : 3703–3716. PMID:11719534.
- Hamada, A., Shono, M., Xia, T., Ohta, M., Hayashi, Y., Tanaka, A., et Hayakawa, T. 2001. Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol. Biol.* **46** : 35–42. doi:10.1023/A:1010603222673. PMID:11437248.
- Hanana, M., Cagnac, O., Yamaguchi, T., Hamdi, S., Ghorbel, A., et Blumwald, E. 2007. A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening. *Plant Cell Physiol.* **48** : 804–811. doi:10.1093/pcp/pcm048. PMID:17463051.
- Hanana, M., Cagnac, O., Yamaguchi, T., Hamdi, S., Ghorbel, A., et Blumwald, E. 2008. Molecular biology and transport properties of grapevine Na⁺/H⁺ antiporter. *Dans Biosaline agriculture and high salinity tolerance. Sous la direction de C. Abdelly, M. Ozturk, M. Ashraf et C. Grignon.* Chap. 28. Birkhauser Verlag, Basel, Suisse. p. 305–315.
- Harris, C., et Fliegel, L. 1999. Amiloride and the Na⁺/H⁺ exchanger protein: mechanism and significance of inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Int. J. Mol. Med.* **3** : 315–321. PMID:10028059.
- Hennig, L. 1999. WinGene/WinPep: user-friendly software for the analysis of aminoacid sequences. *BioTechniques*, **26** : 1170–1172. PMID:10376156. Disponible au en.bio-soft.net/protein/WinPep.html (version 3.01) [accédé le 5 juin 2008].
- Institut de biologie et de chimie des protéines. 2008. Network protein sequence analysis [en ligne]. Pôle bioinformatique lyonnais, Institut de biologie et de chimie des protéines, Centre national de la recherche scientifique, Lyon, France. Disponible au npsa-pbil.ibcp.fr/ [accédé le 5 mai 2008].
- Institut Max-Planck de biophysique. 2006. Membrane proteins of known structure [en ligne]. Institut Max-Planck de biophysique, Société Max-Planck, Francfort-sur-le-Main, Allemagne. Disponible au www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html [accédé le 5 juin 2008].
- Institut Pasteur. 2008. Mobylye [en ligne]. Portail de logiciels et banques de données. Institut Pasteur et Ressource parisienne en bioinformatique structurale, Paris, France. Disponible au bioweb2.pasteur.fr/structure/intro-fr.html#second [accédé le 5 mai 2008].
- Institut suisse de bioinformatique. 2008. TMPred — prediction of transmembrane regions and orientation [en ligne]. Institut suisse de bioinformatique, Université de Genève, Genève, Suisse. Disponible au www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html [accédé le 5 juin 2008].
- Kyte, J., et Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** : 105–132. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0. PMID:7108955.
- Lacroix, J., Poët, M., Maehrel, C., et Counillon, L. 2004. A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. *EMBO Rep.* **5** : 91–96. doi:10.1038/sj.embor.7400035. PMID:14710192.
- Landau, M., Herz, K., Padan, E., et Ben-Tal, N. 2007. Model structure of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1). Functional and clinical implications. *J. Biol. Chem.* **282** : 37 854 – 37 863. doi:10.1074/jbc.M705460200. PMID:17981808.
- Moffat, A.S. 2002. Plant genetics. Finding new ways to protect drought-stricken plants. *Science*, **296** : 1226–1229. doi:10.1126/science.296.5571.1226. PMID:12016289.
- Nehrke, K. 2003. A reduction in intestinal cell pH_i due to loss of the *Caenorhabditis elegans* Na⁺/H⁺ exchanger NHX-2 increases life span. *J. Biol. Chem.* **278** : 44 657 – 44 666. doi:10.1074/jbc.M307351200. PMID:12939266.
- Ohnishi, M., Fukada-Tanaka, S., Hoshino, A., Takada, J., Inagaki, Y., et Iida, S. 2005. Characterization of a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene *InNHX2* and comparison of *InNHX2* with *InNHX1*, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.* **46** : 259–267. doi:10.1093/pcp/pci028. PMID:15695437.
- Orlowski, J., et Grinstein, S. 1997. Na⁺/H⁺ exchangers in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272** : 22 373 – 22 376. doi:10.1074/jbc.272.36.22373. PMID:9278382.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., et Quintero, F.J. 2006. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Plants and salinity special issue. J. Exp. Bot.* **57** : 1181–1199. doi:10.1093/jxb/erj114. PMID:16513813.
- Pasquier, C., Promponas, V.J., Palaios, G.A., Hamodrakas, J.S., et Hamodrakas, S.J. 1999. A novel method for predicting transmembrane segment in proteins based on statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm. *Prot. Eng.* **12** : 381–385. doi:10.1093/protein/12.5.381. Disponible au o2.biol.uoa.gr/PRED-TMR [accédé le 5 juin 2008].
- Putney, L.K., et Barber, D.L. 2003. Na⁺/H⁺ exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J. Biol. Chem.* **278** : 44 645 – 44 649. doi:10.1074/jbc.M308099200. PMID:12947095.
- Putney, L.K., Denker, S.P., et Barber, D.L. 2002. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42** : 527–552. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.092001.143801. PMID:11807182.
- Réseau de bioinformatique canadien. 2008. ExPASy ProtParam tool [en ligne]. Réseau de bioinformatique canadien, Conseil national de recherches du Canada, Ottawa, Ont. Disponible au ca.expasy.org/tools/protparam.html [accédé le 5 juin 2008].
- Rost, B., Yachdav, G., et Liu, J. 2004. PredictProtein: the Predict-Protein server. *Nucleic Acids Res.* **32** (Web Server issue) : W321–W326. doi:10.1093/nar/gkh377. PMID:15215403. Disponible au www.predictprotein.org/ [accédé le 5 juin 2008].
- Sato, Y., et Sakaguchi, M. 2005. Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na⁺/H⁺ exchanger family. *J. Biochem.* **138** : 425–431. doi:10.1093/jb/mvi132. PMID:16272136.
- Screpanti, E., Padan, E., Rimon, A., Michel, H., et Hunte, C. 2006. Crucial steps in the structure determination of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaA in its native conformation. *J. Mol. Biol.* **362** : 192–202. doi:10.1016/j.jmb.2006.07.019. PMID:16919297.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J., et Zhu, J.K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **21** : 81–85. doi:10.1038/nbt766. PMID:12469134.
- Sottosanto, J.B., Saranga, Y., et Blumwald, E. 2007. Impact of AtNHX1, a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter, upon gene expression during short- and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana* [ré-

- sumé en version imprimée; version intégrale en ligne]. *BMC Plant Biol.* **7** : 18–32. doi:10.1186/1471-2229-7-18. PMID:17411438. Disponible au biomedcentral.com/1471-2229/7/18 [accédé le 15 janvier 2008].
- Tusnády, G.E., et Simon, I. 2001a. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17** : 849–850. doi:10.1093/bioinformatics/17.9.849. PMID:11590105. Disponible au www.enzim.hu/hmmtop/ (version 2.0) [accédé le 5 juin 2008].
- Tusnády, G.E., et Simon, I. 2001b. Topology of membrane proteins. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41** : 364–368. PMID:11277724.
- Tusnády, G.E., Kalmar, L., Hegyi, H., Tompa, P., et Simon, I. 2008. TOPDOM: database of domains and motifs with conservative location in transmembrane proteins. *Bioinformatics*, **24** : 1469–1470. doi:10.1093/bioinformatics/btn202. PMID:18434342.
- Wakabayashi, S., Bertrand, B., Ikeda, T., Pouyssegur, J., et Shigekawa, M. 1994. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *J. Biol. Chem.* **269** : 13 710 – 13 715. PMID:8175807.
- Wakabayashi, S., Shigekawa, M., et Pouyssegur, J. 1997. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol. Rev.* **77** : 51–74. PMID:9016300.
- Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X., et Shigekawa, M. 2000. A novel topology model of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *J. Biol. Chem.* **275** : 7942–7949. doi:10.1074/jbc.275.11.7942. PMID:10713111.
- Williams, K.A. 2000. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature*, **403** : 112–115. doi:10.1038/47534. PMID:10638764.
- Xia, T., Apse, M.P., Aharon, G.S., et Blumwald, E. 2002. Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiol. Plant.* **116** : 206–212. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1160210.x. PMID:12354197.
- Yamaguchi, T., Apse, M.P., Shi, H., et Blumwald, E. 2003. Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** : 12 510 – 12 515. doi:10.1073/pnas.2034966100. PMID:14530406.
- Yamaguchi, T., Aharon, G.S., Sottosanto, J.B., et Blumwald, E. 2005. Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺ and pH-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** : 16 107 – 16 112. doi:10.1073/pnas.0504437102. PMID:16249341.
- Yoko, S., Bressan, R.A., et Hasegawa, P.M. 2002. Salt stress tolerance of plants. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Working Report 25-33.
- Yu, J.N., Huang, J., Wang, Z.N., Zhang, J.S., et Chen, S.Y. 2007. An Na⁺/H⁺ antiporter gene from wheat plays an important role in stress tolerance. *J. Biosci.* **32** : 1153–1161. doi:10.1007/s12038-007-0117-x. PMID:17954976.
- Yun, C.H., Little, P.J., Nath, S.K., Levine, S.A., Pouyssegur, J., Tse, C.M., et Donowitz, M. 1993. Leu143 in the putative fourth membrane spanning domain is critical for amiloride inhibition of an epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193** : 532–539. doi:10.1006/bbrc.1993.1656. PMID:8512555.