

Université de Montréal

**Implication du glutamate 346 de NHE1 dans
le transport du Na⁺ et l'interaction
avec les inhibiteurs**

par

David GERMAIN

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Physiologie
option Physiologie et Biophysique moléculaires

Février 2006

© David GERMAIN, 2006



w
4
U58
2006
v.062

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Implication du glutamate 346 de NHE1 dans
le transport du Na⁺ et l'interaction
avec les inhibiteurs

présentée par :

David GERMAIN

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Louis Schwartz, président-rapporteur

Dr Josette Noël, directeur de recherche

Dr Rémy Sauvé, membre du jury

Dr Paul Isenring, examinateur externe

Dr Jean-Louis Schwartz, représentant du doyen de la FES

La famille des échangeurs Na^+/H^+ comprend neuf membres (NHE1 à NHE9). Ces isoformes diffèrent entre elles par leur structure primaire ainsi que par leur profil pharmacologique. Plusieurs études par mutagenèse ont permis d'identifier les acides aminés impliqués dans l'activité d'échange, dans l'interaction de l'échangeur Na^+/H^+ avec ses inhibiteurs et le Na^+ . Les résidus Phe₁₆₂, Leu₁₆₃, Gly₁₇₄ dans le M4 (domaine transmembranaire 4), Glu₂₆₂ et Asp₂₆₇ dans le M7, Glu₃₄₆ et His₃₄₉ dans le M9 et Glu₃₉₁ dans le M10 ont ainsi été caractérisés.

Nous rapportons ici la sélection et la caractérisation d'un variant spontané de NHE1 extrêmement résistant au HOE694, un puissant inhibiteur spécifique des échangeurs Na^+/H^+ . Le séquençage de l'ADNc correspondant à la région associée à la membrane a révélé la présence de la seule mutation Glu₃₄₆Asp située dans le neuvième domaine transmembranaire. L'introduction de cette mutation dans un NHE1 de type sauvage a reproduit le phénotype du variant NHE1 original.

Le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 est 2000 fois plus résistant au HOE694 et près de 200 fois plus résistant au EIPA (ethylisopropyl amiloride) que le NHE1 de type sauvage et nous montrons que la charge ainsi que la position relative, du résidu Glu₃₄₆ est critique pour l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs. De plus, le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 présente une affinité pour le Na^+ diminuée de quatre fois. Bien que la mutation des acides aminés adjacents à Glu₃₄₆ n'affecte ni l'activité de NHE1, ni sa sensibilité aux inhibiteurs, les différences observées au niveau des sensibilités à l'EIPA et au HOE694 et de l'affinité pour le Na^+ des différents mutants suggèrent que Glu₃₄₆ n'interagit pas directement avec les inhibiteurs mais participe plutôt à l'élaboration d'une structure propice à la liaison des inhibiteurs et du Na^+ .

La mutation de Glu₃₄₆ en d'autres acides aminés aux propriétés physico-chimiques différentes comme la taille, la charge ou la polarité, nous a permis d'affirmer que la charge de Glu₃₄₆ est impliquée dans l'interaction des inhibiteurs avec NHE1 alors que sa taille est

relativement peu importante. De plus, nous montrons que la position de cet acide aminé est cruciale. Finalement, la charge de Glu₃₄₆ est critique pour l'activité intrinsèque de NHE1.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que le résidu Glu₃₄₆ de NHE1 est crucial pour l'activité de NHE1 ainsi que pour son interaction avec les inhibiteurs et le Na⁺.

De plus, en se basant sur la structure résolue de l'échangeur Na⁺/H⁺ bactérien NhaA, nous proposons un alignement de la séquence de NHE1 avec celle de NhaA afin de préciser la topologie de NHE1 définie ultérieurement.

Finalement, la structure connue de NhaA ajoutée à l'alignement NhaA-NHE1 nous permet de proposer une structure prédite de NHE1.

Mots-clés : NHE, inhibiteurs, Na⁺, glutamate, structure-fonction, activité

Abstract

Na^+/H^+ exchangers (NHE) form a family in which nine members have been cloned thus far. These isoforms display differences in their primary structure and their pharmacological profile. Extended mutagenesis analyses have been performed to identify amino acids involved in the exchange activity, in the interaction of mammalian NHE1 with its inhibitors and the Na^+ . Residues Phe₁₆₂, Leu₁₆₃, Gly₁₇₄ in M4 (transmembrane domain 4), Glu₂₆₂ and Asp₂₆₇ in M7, Glu₃₄₆ and His₃₄₉ in M9 and Glu₃₉₁ in M10 have been shown to participate in these interactions.

Here we report the selection and the characterization of a NHE1 variant that exhibits a very high resistance to HOE694, a specific inhibitor of Na^+/H^+ exchangers. Sequencing of the coding region corresponding to the N-terminal domain of this variant revealed the presence of only one mutation Glu₃₄₆Asp located within membrane spanning segment 9 (M9). The introduction of this mutation by site-directed mutagenesis in a wild-type NHE1 reproduced the original NHE1 variant phenotype.

We reproduced this amino acid change in the wild-type NHE1 and found that this mutation alone is responsible for the huge decrease in sensitivity to the HOE694 compound and to ethylisopropyl amiloride (EIPA). We found that the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant was more than 2000-fold more resistant to HOE694 and up to 200-fold more resistant to EIPA than was the wild-type NHE1.

By mutating this amino acid into several others with different properties regarding their size, charge and polarity, we were able to determine that the size of Glu₃₄₆ presents little effect on the sensitivity to inhibitors. The charge of Glu₃₄₆ showed a significative effect on the sensitivity to inhibitors but not on the Na^+ affinity. Interestingly, mutations abolishing the charge in position 346 lead to a great decrease of the NHE1 activity while the Glu₃₄₆Asp-NHE1 mutant showed a modest 2-fold decrease in NHE1 activity.

Exchanging Glu₃₄₆ with its neighbours Ala₃₄₅ and Leu₃₄₇ did not equally alter the interaction between NHE1 and inhibitors. This suggests that the spacial orientation of the glutamate charge is critical.

The most striking effect of all the mutations studied here was observed with the Glu₃₄₆Asp-NHE1. Indeed, this mutant showed decreased membrane expression and a 4-fold decreased Na⁺ affinity which is compensated by a 2-fold increased transport velocity. This mutation is thus more efficient in terms of Na⁺ transport than the wild-type NHE1.

The lack of parallelism between the effects of the different inhibitors on the different NHE1 mutants as well as between the IC₅₀ and the K_m measured lead us to suggest that Glu₃₄₆ may not interact directly with inhibitors or Na⁺ but rather is part of a conformational architecture ideal to the binding of inhibitors and Na⁺.

Together, these results state that Glu₃₄₆ is crucial for both the interaction with Na⁺ and pharmacological agents as well as in exchange activity.

With the structure of NhaA published earlier as a basis, we propose a sequence alignment between NHE1 and NhaA in order to refine the NHE1 topology proposed by Wakabayashi *et al.* (382).

Finally, based on the resolved structure of NhaA and the NhaA-NHE1 alignment, we propose a predicted structure of NHE1.

Keywords : NHE, inhibitors, Na⁺, glutamate, structure-function, activity

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction	
1. Définitions.....	18
2. L'échangeur Na^+/H^+	18
2.1 Historique.....	18
2.1.1 Mise en évidence d'un système d'échange Na^+/H^+	18
2.2.2 Clonage de NHE1.....	19
2.2 Diversité et localisation des échangeurs Na^+/H^+	21
2.2.1 NHE1 (SLC9A1).....	21
2.2.2 NHE2 (SLC9A2).....	22
2.2.3 NHE3 (SLC9A3).....	22
2.2.4 NHE4 (SLC9A4).....	23
2.2.5 NHE5 (SLC9A5).....	23
2.2.6 NHE6 (SLC9A6).....	23
2.2.7 NHE7 (SLC9A7).....	24
2.2.8 NHE8 (SLC9A8).....	25
2.2.9 NHE9 (SLC9A9).....	25
2.2.10 Les NHE chez les organismes inférieurs et les végétaux.....	26
2.3 Rôles physiologiques.....	27
2.3.1 Régulation du pH intracellulaire.....	28
2.3.2 Régulation du volume cellulaire.....	29
2.3.3 Absorption du HCO_3^- , du NaCl et sécrétion du NH_4^+	32

2.3.4 Autres rôles	38
2.4 Régulation	41
2.4.1 Activation à court terme.....	41
2.4.2 Régulation à long terme	51
2.5 Inhibiteurs pharmacologiques	53
2.6 Paramètres cinétiques et sélectivité des échangeurs Na^+/H^+	58
2.6.1 Électroneutralité	59
2.6.2 Affinité pour le Na^+	59
2.6.3 Affinité pour les protons	59
2.6.4 Inhibiteurs et Na^+	60
2.7 Éléments de structure des échangeurs Na^+/H^+	61
2.7.1 Difficultés d'étude de la structure des transporteurs membranaires	61
2.7.2 NHE et les autres familles de transporteurs ioniques.....	63
2.7.3 Les différents niveaux de structure des NHE.....	69
2.7.4 Études structure-fonction des échangeurs Na^+/H^+	78
2.8 Conclusions et justification de la recherche.....	86
Chapitre 2 : Publications.....	89
Avant-Propos	89
Méthodologie	90
Article 1.....	98
Sommaire	98
Glutamate 346 of human Na^+/H^+ exchanger NHE1 is crucial for modulating both affinity for Na^+ and interaction with amiloride derivatives	100
Abstract	101
List of Abbreviations.....	102
Introduction	103
Experimental Procedures	106
Results and Discussion.....	110

References	118
Figure captions	121
Figures.....	122
Accord des coauteurs	130
Permission de l'éditeur de la revue	130
Permission de l'éditeur de la revue	131
Article 2.....	132
Sommaire	132
The side-chain and negative charge of glutamate 346 in human NHE1 modulate the access to, and the reorientation of the Na ⁺ binding site	133
Experimental Procedures	137
Results.....	139
Discussion	143
References.....	149
Figures legends	151
Accord des coauteurs	170
Permission de l'éditeur de la revue	171
Chapitre 3 : Discussion.....	172
1. Implication de Glu ₃₄₆ dans l'interaction avec les inhibiteurs et le Na ⁺	173
2. La charge de Glu ₃₄₆ est impliquée dans l'interaction avec les inhibiteurs et le Na ⁺	176
3. L'encombrement stérique en position 346 ne module pas de façon importante l'affinité au Na ⁺ et sa sensibilité aux inhibiteurs.	178
4. La charge en position 346 est importante pour l'activité de NHE1	180
5. Signification des résultats sur la localisation des sites d'interaction de l'EIPA et du Na ⁺	181
6. Confrontation de ces résultats à la littérature.....	182
7. Alignement des séquences de NHE1 et de NhaA	184
Chapitre 4 : Conclusions.....	191

Chapitre 5 : Perspectives.....	193
Références.....	195
Curriculum vitae.....	238

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pourcentage d'identité entre les différentes isoformes de NHE.	25
Tableau 2 : Distribution des différentes isoformes de NHE le long du néphron.	36
Tableau 3 : Compilation des constantes d'inhibitions des différentes isoformes de NHE par divers inhibiteurs.....	55

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du néphron.....	33
Figure 2 : Positions des sites d'interaction des différentes protéines régulatrices sur le domaine cytoplasmique de NHE1.....	50
Figure 3 : Structure de l'hétéroaroylguanidine à cycle hexagonal.	54
Figure 4 : Structure des composés HOE694 et HOE642 (cariporide)	56
Figure 5 : Schématisation de la liaison des ions Na^+ et H^+ sur NHE1.....	60
Figure 6 : Topologie membranaire des canaux K^+ , Na^+ et Ca^{2+}	64
Figure 7 : Coupe du canal ENaC	65
Figure 8 : Topologie du canal calcique.	66
Figure 9 : Topologie membranaire de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1.....	68
Figure 10 : Structure du canal KcsA.....	69
Figure 11 : Alignement des séquences des neuf isoformes connues de l'échangeur Na^+/H^+	73
Figure 12 : Topologie membranaire de NHE1.....	75
Figure 13 : Représentation schématique de l'arrangement possible d'un dimère de NHE1	77
Figure 14 : Structure de NhaA et modèle de la translocation des ions.	86
Figure 15 : Schématisation des domaines transmembranaires 4, 7 et 9 de NHE1.....	172
Figure 16 : Profils pharmacologiques des mutants E_{346}Q , $\text{L}_{163}\text{F}/\text{E}_{346}\text{D}$ et $\text{L}_{163}\text{F}/\text{E}_{346}\text{Q}$ comparés au NHE1 de type sauvage.....	188
Figure 17 : Modélisation de NHE1 selon la structure de NhaA.....	190

Abréviations

μCi	Microcurie
μM	Micromolaire
Å	Angström
A23187	Ionophore Ca ²⁺
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ala, A	Alanine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP1	Lignée cellulaire <i>Antiporter1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Arg, R	Arginine
Asn, N	Asparagine
Asp, D	Aspartate
AtNHX	<i>Arabidopsis thaliana Na⁺/H⁺ Exchanger</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BAPTA	<i>O,O'-bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N,N',N' tetraacetic acid</i>
C/EBP	<i>CAAT enhancer binding protein</i> – Protéine se liant à l' <i>enhancer</i> CAAT
Ca ²⁺	Ion Calcium
Caco-2	Lignée cellulaire <i>colonic adenocarcinoma 2</i> – adénocarcinome de colon
CaM	Calmoduline
CAMK	<i>Ca²⁺/CaM dependent protein kinase</i> – Protéine kinase dépendante de la Ca ²⁺ /CaM
CeNHX	<i>Coenorhabditis elegans Na⁺/H⁺ Exchanger</i>
CFCCP	<i>Carbonyl chloride p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHO	Lignée cellulaire <i>Chinese Hamster Ovary</i> – Ovaire de hamster chinois
CHP	<i>Calcineurin Homologous Protein</i> – Protéine homologue à la calcineurine
Cl ⁻	Ion Chlore
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i> – Protéine se liant aux éléments de réponse à l'AMPc
Csk	<i>C-Terminal Src kinase</i> – kinase du C-terminale de Src
Cys, C	Cystéine
DAG	Diacyl glycérol
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DMA	Diméthyl-amiloride
DSS	<i>Disuccinimidyl suberate</i>
E3KARP	<i>NHE3 kinase regulatory protein</i> – Protéine régulatrice de la kinase de NHE3
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> – facteur de croissance épidermique
EIPA	Ethyl-isopropyl amiloride
EMS	Éthyl-méthane sulfonate
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i> – Kinase régulée par les signaux extracellulaires

ERM	<i>Ezrin/radixin/moesin</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gln, Q	Glutamine
Glu, E	Glutamate
Gly, G	Glycine
GST	Glutathione S-transférase
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺	Ion Hydrogène
HCO ₃ ⁻	Ion Bicarbonate
His, H	Histidine
HKT1	<i>High Affinity K⁺ Transporter</i> – Transporteur K ⁺ à haute affinité
HMA	Héxaméthylène-amiloride
HOE694	Hoechst 694 : <i>(3-methylsulphonyl-4-piperidinobenzoyl) guanidine methanesulphonate</i>
hNHE	<i>NHE humain</i>
HR100	High Resistance 100
IC ₅₀	<i>Inhibitory Constant</i> – Constante d'inhibition
K ⁺	Ion Potassium
Kb	Kilobases
Km	Constante de Michaelis
KO	<i>Knock-out</i>
LAP1	Lignée cellulaire <i>L cells antiporter</i>
Leu, L	Leucine
Li ⁺	Ion lithium
LLC-PK	Lignée cellulaire <i>Lily Laboratories culture-Porcine kidney</i> – Rein de porc
LPA	Acide Lysophosphatidique
MAPK	<i>Mitogens activated protein kinase</i> – Protéine kinase activée par les mitogènes
MDCK	Lignée cellulaire <i>Madin-Darby cells kidney</i> – Cellules de rein Madin-Darby
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
mEq	milliéquivalent
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i> – Kinase des chaînes légères de myosine
mM	Millimolaire
MTSET	2-triméthylammoniumméthyl-méthanethiosulfate
mV	millivolt
Na ⁺	Ion Sodium
NFY	<i>Nuclear factor Y</i> – Facteur nucléaire Y
Nha	<i>Na⁺/H⁺ antiporter</i> – Antiporteur Na ⁺ /H ⁺
NHE	<i>Na⁺/H⁺ Exchanger</i> – Échangeur Na ⁺ /H ⁺
NHE-RF	<i>NHE regulatory factor</i> – facteur de régulation de NHE
NIH/3T3	Lignée cellulaire murine <i>National Institute of Health/3T3</i>
NIK	Nck interacting kinase – Kinase interagissant avec Nck
OK	Lignée cellulaire <i>Opposum Kidney</i> – Rein de Opposum
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – Cadre de lecture ouvert
p160 ^{ROCK}	<i>p160-Rho associated kinase</i> – Kinase associée à rho
p90 ^{RSK}	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i> – kinase p90 ribosomale S6

PD98059	Inhibiteur de MEK
PDB	<i>Protein Data Bank</i> – Base de données sur les protéines
PDBU	<i>Phorbol 12,13 dibutyrate</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> – Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDZ	PSD-95/Dlg/Zo-1
pH	Potentiel hydrogène
Phe, F	Phénylalanine
pHi	pH intracellulaire
pK	Constante d'ionisation
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca ²⁺
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Pro, P	Proline
PS120	Lignée cellulaire Proton Suicide 120, déficiente en échangeurs Na ⁺ /H ⁺
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i> – Amplification rapide des extrémités d'ADNc
RKPC-2	Lignée cellulaire <i>Rabbit kidney proximal cell 2</i> – Cellules du tubule proximale de reins de lapin
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
rNHE	NHE de rat
ROMK	<i>Renal outer medulla K⁺ channel</i> – Canal K ⁺ de la médullaire externe rénale
SDS-PAGE	<i>Sodium-dodecyl-sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i> – Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium-dodécyl-sulphate
Ser, S	Sérine
SGK1	<i>Serum abd glucocorticoids inducible kinase</i> – Kinase inductible par le sérum et les glucocorticoïdes
SHR	Lignée de rat <i>spontaneous hypertensive rat</i> – Rat spontanément hypertendu
SLC9AX	<i>Solute carrier 9 member X</i>
Sod2	Sodium2
SOS	<i>Salt Overly Sensitive</i> – Grande sensibilité au sel
Src	Sarcoma
Thr, T	Thréonine
TM, M	Domaine transmembranaire
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
Trp, W	Tryptophane
Tyr, Y	Tyrosine
WKY	Lignée de rat Wistar-Kyoto

Aux 3 lumières de ma vie...

Remerciements

Cette thèse ne saurait être complète sans mes remerciements les plus chaleureux aux personnes suivantes :

- Dr. Josette Noël, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir soutenu (et supporté !) durant toutes ces années autant dans mes moments d'excitation que dans mes découragements. Je tiens à rendre particulièrement hommage à sa disponibilité, sa compréhension et sa gentillesse.
- Dr. Alfred Berteloot pour son inestimable contribution; sans laquelle cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est aujourd'hui.
- Julie Vadnais, dont les conseils techniques toujours avisés et la bonne humeur ont rendu mon travail très agréable.
- Mohammad Amraei, dont l'aide me fût précieuse bien que notre cohabitation fût trop courte.
- Tous les étudiants de notre laboratoire : Yolaine, Zeinab, Joe, Carlos, Eugénie, Ingrid, Karl-Philippe et tous les autres stagiaires, ça a vraiment été le fun de travailler avec vous !
- Laurent Berrou, mon inséparable ami, avec qui j'ai partagé des discussions scientifiques certes très enrichissantes mais aussi beaucoup de fou-rires. Sans toi, ce doctorat n'aurait pas été le même.
- Joanne Vallée et Julie Verner pour m'avoir donné de sérieux coups de mains avec mes cellules, un gros merci pour ça !
- Joanne Payette, Pierrette Fournel et Louise Lefort pour m'avoir simplifié tous mes tracass administratifs (Dieu sait que je déteste ça !).
- À tous les membres du GEPROM avec qui j'ai pu avoir un contact à un moment ou à un autre.
- Aux membres du jury d'évaluation de cette présente thèse : vous faites partie finalement des personnes les plus importantes impliquées dans ce doctorat !
- Au Dr. Muriel Aubry, pour m'avoir permis de préciser mon après-doctorat.
- Et finalement, à mon épouse Delphine dont le soutien de jour (et de nuit !) durant toutes ces années m'a été absolument essentiel.
- Et je ne veux pas omettre de mentionner mon petit pirate Hugo : même si d'innombrables nuits ont été difficiles, tu as été une joie de tous les instants.
- Enfin, le petit boutchou né en février : tu as été assez compréhensif pour me laisser dormir la nuit !
- À Jacqueline et Jean pour leur précieux soutien malgré la distance.

Chapitre 1 : Introduction

1. Définitions

Les systèmes de transport ionique sont classés en deux grands groupes selon la force motrice qui les fait fonctionner : 1) le transport passif : le transport des ions s'effectue dans le sens du gradient électrochimique de l'ion. Ce groupe comprend la diffusion simple au cours de laquelle l'ion diffuse directement à travers la membrane lipidique et le transport facilité par une protéine spécifique de type canal ou transporteur tel que les canaux K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- ; 2) le transport actif : ce type de transport nécessite un apport d'énergie afin de transporter un ion contre son gradient de concentration chimique ou un potentiel électrique. Ce groupe est séparé en transport actif primaire quand il y a hydrolyse directe de l'ATP par le transporteur (H^+ -ATPase, la Na^+/K^+ -ATPase...), et en transport actif secondaire, quand les ions sont transportés dans le sens inverse de leur gradient de concentration mais sans hydrolyse directe d'ATP. L'énergie requise est fournie par un système de transport primaire qui établit un gradient ionique, et ce gradient est utilisé comme source d'énergie pour diriger le transport à contre courant d'un autre ion. Deux cas se présentent alors : 1- les deux ions traversent la membrane dans le même sens (symporteur) ou 2- les deux ions traversent la membrane en sens inverse (antiporteur), c'est le cas de l'échangeur Cl^-/HCO_3^- , de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} ainsi que de l'échangeur Na^+/H^+ .

2. L'échangeur Na^+/H^+

2.1 Historique

2.1.1 Mise en évidence d'un système d'échange Na^+/H^+

Il faut remonter en 1961 pour retrouver les premiers indices de l'existence d'un système d'échange cation/ H^+ . En effet, Mitchell proposait alors son hypothèse chemiosmotique pour expliquer le couplage de la phosphorylation et du transfert d'électrons et de protons (16, 256), et ce n'est qu'en 1967 qu'il démontra l'existence d'un tel échange dans les mitochondries (16, 257). La première démonstration réelle d'un échange Na^+/H^+ a été réalisée en 1972 par Harold *et*

al. dans la bactérie *Streptococcus faecalis* (146). Enfin, en 1976, Mürer et ses collaborateurs ont prouvé l'existence d'un échangeur Na^+/H^+ dans des vésicules de bordures en brosse de rein et de petit intestin de lapin (269), ces préparations membranaires étant très pratiques car affranchies de tout métabolisme intracellulaire. À cette fin, les auteurs ont incubé les deux types de vésicules dans un bain contenant 0.5M de Na_2SO_4 et ont observé une acidification du milieu d'incubation qui pouvait être abolie lors de l'ajout du détergent Triton X-100. De plus, si les vésicules étaient préalablement traitées au Triton, aucune acidification n'était observée. De cette expérience, les auteurs ont conclu que les protons étaient transloqués du milieu intra vers le milieu extravésiculaire, et ce, de façon induite par le Na^+ . Deux possibilités peuvent expliquer cette translocation : les deux ions utilisent différents systèmes de transport qui s'influenceraient mutuellement via le potentiel membranaire (l'entrée de la charge positive du Na^+ entraîne la sortie de la charge positive du H^+ en absence d'un anion qui diffuserait en même temps que le Na^+). Alternativement, les deux ions sont déplacés par un système de contretransport qui serait indépendant du potentiel membranaire. Pour trancher entre ces deux hypothèses, les auteurs ont incubé les vésicules avec de la valinomycine, un ionophore qui augmente la conductance au K^+ et permet d'abolir le potentiel membranaire. Ce traitement n'influence pas l'acidification du milieu induite par le Na^+ . Ce résultat a aussi été obtenu avec un découpleur CFCCP qui aurait eu un rôle facilitateur dans la sortie de protons si celle-ci était couplée au potentiel membranaire. Les auteurs ont donc conclu que l'influx de Na^+ et l'efflux de H^+ étaient couplés par un antiport électroneutre. De plus, en préincubant les vésicules dans un bain de faible pH puis en mesurant l'influx de $^{22}\text{Na}^+$ en présence de différentes conditions de pH externes, la réversibilité de l'échange Na^+/H^+ a pu être démontrée. Dès lors, la présence d'un échange Na^+/H^+ a été mise en évidence dans pratiquement tous les types cellulaires (pour revue voir (19)).

2.2.2 Clonage de NHE1

L'existence d'un système d'échange Na^+/H^+ ne faisait donc plus aucun doute. En 1986, Franchi *et al.* (107) ont isolé un ensemble de fragments EcoRI de génome humain qui, une fois transfectés dans des cellules LAP1 déficientes en échangeurs, étaient capables de sauvegarder celles-ci d'une charge acide. Ces six fragments EcoRI réunis avaient une taille d'environ 55000 paires de bases et contenaient des éléments répétés humains. Puis, en 1989, le premier échangeur

Na^+/H^+ a été finalement cloné par l'équipe de Jacques Pouysségur selon une technique astucieuse (323, 324). En effet, en absence d'anticorps ou de ligands pour permettre une purification par affinité de l'échangeur, les auteurs ont utilisé la fonction même d'échange au cours d'un criblage de type « proton suicide ». La base de leur travail a été fournie par les travaux décrits précédemment. En effet, Sardet et ses collaborateurs ont d'abord montré que les six fragments EcoRI identifiés par Franchi *et al.* étaient progressivement surexprimés dans les cellules soumises à plusieurs charges acides consécutives (cette souche a été alors appelée ST31A). Parallèlement, ces cellules présentaient une augmentation de leur activité d'échange. Donc, il était fort probable que le gène codant pour un échangeur Na^+/H^+ se situait à l'intérieur de ces fragments de restriction. Afin d'isoler ce gène, les auteurs ont construit une banque d'ADN génomique à partir de cellules transfectées et sélectionnées par charge acide lors des recherches de Franchi *et al.* (107). Les divers fragments de restriction ont été incorporés dans le vecteur-phage λ et transfectés dans une souche d'*E. coli*. Un criblage à l'aide d'une sonde radiomarquée d'ADN génomique humain a ensuite permis d'isoler quatre clones possédant des inserts de 12 à 18 kb. En établissant un profil de restriction et une hybridation avec les fragments EcoRI décrits précédemment, il a été possible de situer les 4 clones les uns par rapport aux autres. Trois des clones se recoupaient, tandis que le quatrième n'était pas lié aux autres, rendant sa localisation relative impossible à ce stade. Un des clones a été digéré par une enzyme de restriction, donnant un fragment PstI de 800 paires de bases qui a été radiomarqué puis utilisé comme sonde lors d'une hybridation de type Northern sur l'ARN total des cellules ST31A décrites plus haut. Un seul ARNm de 5.6kb a alors été détecté. Afin d'isoler l'ADNc codant pour l'échangeur Na^+/H^+ , une banque d'ADNc a été construite à partir de l'ARNm des cellules ST31A en utilisant uniquement des ADNc dont la taille était supérieure à 2kb. Cette banque a été finalement criblée avec la sonde PstI, donnant 30 clones positifs dans lesquels l'insert le plus grand a été identifié, par séquençage, comme celui codant pour l'échangeur Na^+/H^+ .

Ce travail a constitué le point de départ au clonage par homologie des différentes isoformes de NHE, les plus récentes isoformes ayant été découvertes par l'analyse de séquences génomiques disponibles dans les bases de données de type GenBank.

2.2 Diversité et localisation des échangeurs Na^+/H^+

Antérieurement au clonage de NHE1 en 1989, l'ubiquité de l'échangeur Na^+/H^+ avait déjà été mise en évidence par sa détection dans un grand nombre de types cellulaires : hépatocytes, fibroblastes, neurones, muscles lisses, squelettique ou cardiaque, cellules sanguines et cellules épithéliales (20, 136, 213, 243). La caractérisation moléculaire de NHE1 a servi de base au clonage d'autres isoformes et, donc, à mettre en évidence un certain nombre de différences tant au niveau moléculaire qu'au niveau de leur distributions cellulaire et tissulaire, ou encore aux niveaux de leur réponse à différents stimuli et de leur sensibilité à différents inhibiteurs.

2.2.1 NHE1 (SLC9A1)

NHE1 est l'isoforme ubiquitaire. En effet, des analyses par Northern blot ou par immunohistochimie ont montré la présence de NHE1 dans de nombreux tissus, parmi lesquels on peut citer le tractus gastro-intestinal et le rein (287, 367). Dans ce dernier, toutefois, aucun signal n'a été détecté dans les segments S1 et S2 des néphrons superficiels chez le lapin (121). De plus, et de façon concordante avec son ubiquité tissulaire, des NHE présentant plus de 90% d'homologie de séquences ont été détectés dans de nombreuses espèces dont l'humain (104, 324, 356), le rat (287), le lapin (154, 367), le porc (311), la truite (55), le nématode (248) et la levure (174). Chez l'humain, le gène codant pour NHE1 se situe au niveau du chromosome 1p35-p36.1 (236, 249). Ce gène, d'une taille de 70kb, est composé de 12 exons et de 11 introns (255). L'ARNm issu de ce gène présente un cadre de lecture ou ORF (pour Open Reading Frame) de 2682 nucléotides codant pour une protéine de 815 acides aminés (816 chez le lapin (367), 820 chez le rat (287)). Au niveau cellulaire, NHE1 réside à la membrane plasmique. Dans les cellules épithéliales *in vivo*, NHE1 est localisé à la membrane basolatérale (48, 50, 367). Toutefois, son expression est détectée à la fois dans les membranes apicale et basolatérale de cellules épithéliales fraîchement mises en culture, c'est-à-dire avant qu'il n'y ait ségrégation à la membrane basolatérale suite à la polarisation cellulaire (221). À l'inverse, il a été démontré que, dans le placenta humain, NHE1 se localisait à la membrane apicale (214). En outre, il a été démontré que NHE1 pouvait s'accumuler préférentiellement dans des microdomaines de la

membrane plasmique et ce, dépendamment du type cellulaire. En effet, en plus de sa localisation basolatérale dans les épithélia, NHE1 se concentre en bordure des lamellipodes des fibroblastes (89, 139, 225) et dans les disques intercalaires et les tubules t des cardiomyocytes de rat (296).

2.2.2 NHE2 (SLC9A2)

En utilisant l'ADNc de NHE1 comme sonde lors de criblages de banque d'ADNc en condition de basse stringence, il a été possible de cloner la deuxième isoforme NHE2 de l'échangeur Na^+/H^+ chez le lapin (366), le rat (390) et l'humain (123, 246). La localisation tissulaire et cellulaire de NHE2 diffère de celle de NHE1. En effet, chez le lapin, NHE2 est exprimé préférentiellement dans les reins, les intestins et les glandes surrénales, mais aussi à un moindre niveau dans le muscle squelettique et la trachée (366). Chez le rat, NHE2 est surtout localisé dans le petit intestin, le colon et l'estomac, alors que des traces sont trouvées dans le rein, le cerveau, le cœur, le testicule, le poumon et le muscle squelettique (390). Au niveau cellulaire, NHE2 est exprimé à la membrane apicale de cellules Caco-2 transfectées (366) mais aussi à la membrane basolatérale des cellules du tubule collecteur de la médullaire interne (345). Le gène du NHE2 humain est situé sur le chromosome 2q11.2 (123). Chez l'humain, ce gène, constitué de plus de 90kb organisées en 12 exons et 11 introns (245), code pour une protéine de 698 acides aminés. Les NHE2 de rat et de lapin, quant à eux, sont respectivement constitués de 813 et 809 acides aminés. Ces différents NHE2 présentent environ 90% d'homologie entre eux (246) et environ 50% avec le NHE1 humain.

2.2.3 NHE3 (SLC9A3)

En utilisant le NHE2 de lapin (363) ou le NHE1 humain (287), il a été possible de cloner la troisième isoforme de l'échangeur Na^+/H^+ chez le lapin et le rat respectivement. Plus tard, la même isoforme a été clonée chez l'humain (58). Au niveau de sa distribution tissulaire, l'ARNm de NHE3 est retrouvé préférentiellement chez le lapin dans l'iléon, le colon ascendant et le rein (363). Un profil similaire a été trouvé chez l'humain. Toutefois, un signal important a été localisé dans le testicule et l'ovaire et, dans une moindre mesure, dans le thymus et la prostate (58). Au niveau cellulaire, NHE3 est exprimé à la membrane apicale des cellules polarisées du tubule proximal ou de l'intestin (47, 50, 343). Le gène de NHE3 est situé sur le chromosome 5p15.3

chez l'humain (57). Ce gène code pour une protéine de 834 acides aminés chez l'humain (58), 831 chez le rat (287) et 832 chez le lapin (363). Entre eux, les trois NHE3 clonés présentent une homologie de 82% (58) et environ 40% avec le NHE1 humain.

2.2.4 NHE4 (SLC9A4)

Cette isoforme a été clonée de concert avec NHE3 de rat en utilisant la même approche, soit le criblage d'une banque d'ADNc de rat avec le NHE1 humain en tant que sonde (287). À ce jour, seul le NHE4 de rat a été cloné et caractérisé. Son gène est localisé sur le chromosome 2q11-q12. L'ARNm de NHE4 a été trouvé en grande quantité dans l'estomac, le petit et le gros intestin et, en moindre quantité, dans l'utérus, le cerveau, le rein et le muscle squelettique (287). NHE4 est exprimé à la membrane basolatérale des cellules du tubule distal (65). Le gène du NHE4 humain a été localisé sur le chromosome 2 (352); toutefois, son locus exact reste encore à être déterminé. Le NHE4 de rat est une protéine de 717 acides aminés (287) qui présente 49% d'homologie avec le NHE1 de rat et 44% avec le NHE1 humain.

2.2.5 NHE5 (SLC9A5)

Cette isoforme a été clonée en criblant une banque d'ADN génomique humaine avec la région codant pour les domaines transmembranaires du NHE2 de rat (197). L'ARNm de NHE5 a été détecté en grande quantité dans le cerveau, la rate et les testicules (197). La même étude a été en mesure de localiser le gène sur le chromosome 16q22.1. Toutefois, les auteurs n'ont pas pu déterminer la structure complète du gène ni la séquence primaire de NHE5. Ces informations ont été publiées trois ans plus tard lors du criblage d'une banque d'ADNc de rate humaine à l'aide des exons 2 et 5 en tant que sondes. Le gène consiste en 16 exons et 15 introns pour un total de 18kb (27). Ce gène code donc pour une protéine de 896 acides aminés. Le NHE5 humain présente des homologies respectives de 50% et 67% avec NHE1 et NHE3 (27).

2.2.6 NHE6 (SLC9A6)

Le clonage de NHE6 est le résultat des travaux de l'équipe d'Orlowki au cours desquels un nouvel échangeur a été découvert dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (283). Ce clonage

a été possible grâce à l'analyse des séquences rendues publiques dans les bases de données informatiques. En effet, la recherche de séquences homologues à NHE dans le génome de la levure a permis d'identifier plusieurs ORF dont l'un s'avérait plus intéressant car l'analyse de sa séquence prédisait sa localisation à la membrane interne mitochondriale. La protéine issue de ce gène cloné a été baptisée NHA2 (pour Na⁺/H⁺ Antiporter 2, en référence au NHA1 cloné chez la levure *S.cerevisiae* (305)). La comparaison de séquence a révélé que NHA2 avait une forte homologie avec un ADNc partiel qui avait été publié dans la base de donnée GenBank™ quelque temps auparavant. Finalement, grâce à cet ADNc, le NHE6 humain a pu être cloné à partir d'une banque d'ADNc de rein (283). Le gène de cette isoforme se situe sur le chromosome Xq26.3. Grâce à un couplage au GFP, les auteurs ont démontré que cette isoforme était effectivement intracellulaire et très probablement mitochondriale. Néanmoins, une étude plus récente a démontré que sa localisation était plutôt restreinte aux endosomes de recyclage et de sécrétion (59, 258). Enfin, le criblage de tissus par Northern blot a montré que NHE6 était ubiquitaire, avec toutefois une expression préférentielle dans le cœur, le cerveau et le muscle squelettique (283). NHE6 est constitué de 669 acides aminés et partage environ 25% d'homologie avec les autres membres de la famille NHE et 30% avec NHA2 (283).

2.2.7 NHE7 (SLC9A7)

La septième isoforme de NHE a été clonée par la recherche d'EST (Expressed Sequence Tag) dans GenBank™ (282). Parmi ces séquences, deux présentaient une certaine homologie avec les NHEs. L'ADNc pleine longueur a été obtenu après une amplification rapide des extrémités de l'ADNc (ou RACE pour Rapid Amplification of cDNA Ends). Le gène de NHE7 a été localisé chez l'humain sur le chromosome Xp11.3. NHE7 est une forme largement ubiquitaire qui, à l'instar de NHE6, présente une localisation intracellulaire. En effet, NHE7 colocalise avec des marqueurs du réseau trans-golgien de type CD25-TGN38 (282). NHE7 est composé de 725 acides aminés et présente des homologies respectives d'environ 27% et 5 à 68% avec NHE1 et NHE6.

2.2.8 NHE8 (SLC9A8)

Tout comme les NHE6 et 7, NHE8 a été découvert en cherchant des homologues de NHE (ici NHE3 de lapin) dans GenBank™, ce qui a conduit au clonage du NHE8 de souris (126). NHE8 est ubiquitaire avec une forte expression dans le foie, le rein, le muscle squelettique et le testicule. À la différence des deux dernières isoformes, les auteurs ont montré que NHE8 est exprimé à la membrane plasmique et, plus particulièrement, à la membrane apicale des cellules rénales. Toutefois, des résultats non publiés font état d'une compartimentation intracellulaire (Numata *et al.* non publié, voir référence (285)). De plus, l'orthologue de NHE8 du nématode *Caenorhabditis elegans*, CeNHX8, s'accumule dans des vésicules périnucléaires (275). La séquence primaire de NHE8 est composée de 581 acides aminés avec une homologie d'environ 26% avec les autres membres de la famille NHE et de 54% avec le NHE1 de *Drosophila melanogaster* (126).

2.2.9 NHE9 (SLC9A9)

Très récemment, ce nouveau membre de la famille NHE a été caractérisé lors de la recherche de gènes impliqués dans le syndrome d'hyperactivité avec déficit d'attention (84). Ce gène est localisé sur le chromosome 3q et est composé de 16 exons. La protéine codée par ce gène est composée de 645 acides aminés pour un poids moléculaire de 72.6 kDa et présente une certaine homologie avec NHE6 et NHE7 (Tableau 1). Par ailleurs, NHE9 est exprimé de façon ubiquitaire notamment dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le rein et le foie.

	hNHE2	hNHE3	rNHE4	hNHE5	hNHE6	hNHE7	hNHE8	hNHE9
hNHE1	44	34	40	33	22	21	25	21
hNHE2		37	56	37	23	21	25	19
hNHE3			36	50	21	22	24	22
rNHE4				35	20	1	24	21
hNHE5					23	19	24	23
hNHE6						68	28	56
hNHE7							27	59
hNHE8								29

Tableau 1 : Pourcentage d'identité entre les différentes isoformes de NHE. Les valeurs ont été obtenues grâce au logiciel CLUSTALW avec les numéros d'accèsion GenBank suivants :

NP_003038.2, NP_003039.2, P48764, P26434, NP_004585.1, NP_006350.1, Q96T83, NP_056081.1, NP_775924.1 pour NHE1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 et -9 respectivement . hNHE : NHE humain, rNHE : NHE de rat.

2.2.10 Les NHE chez les organismes inférieurs et les végétaux.

2.2.10.1 NHE végétal

La salinité du sol est un facteur essentiel dans la vie végétale et spécialement dans le domaine de l'agriculture. La cellule végétale doit pouvoir empêcher une accumulation trop importante de Na^+ et pour cela, elle dispose de trois solutions : la restriction de l'influx de Na^+ , l'efflux de Na^+ ou la compartimentation du Na^+ à l'intérieur de la cellule (278). À cette fin, la cellule dispose du transporteur de K^+ à haute affinité HKT1 qui fonctionne comme un cotransporteur Na^+/K^+ , de canaux non sélectifs (18). Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve aussi la famille d'échangeurs Na^+/H^+ AtNHX 1 à 6 dont les deux premiers sont situés au niveau des tonoplastes (118, 410), et de l'échangeur SOS1 qui est situé à la membrane plasmique (337). Les AtNHX sont des protéines de 529 à 575 acides aminés qui présentent entre elles 21 à 87% d'homologie et environ 25% envers le NHE1 humain et le NHX1 de levure (voir plus loin). AtNHX1 est détecté dans les racines, les feuilles et dans les pousses (118, 308). SOS1 (pour Salt Overly Sensitive), quant à lui, fait partie du locus SOS qui comprend SOS1, SOS2 et SOS3 codant pour un échangeur Na^+/H^+ , une protéine kinase à résidus sérine/thréonine et un régulateur de SOS2 respectivement (145, 239). Le gène SOS1, localisé sur le chromosome 2 d'*Arabidopsis Thaliana* (337), code pour une protéine de 1146 acides aminés. SOS1 présente 26% d'identité avec le NHE1 de hamster chinois et 31% avec le NhaP de *Pseudomonas aeruginosa*. SOS1 est retrouvé plus abondamment dans les racines que dans les pousses.

2.2.10.2 NHE bactérien

Le premier échangeur Na^+/H^+ bactérien a été cloné en 1988 à la suite des travaux ayant isolé une souche mutante d'*Escherichia coli* capable de croître à des concentrations normalement toxiques de Li^+ (277). Une mutation a été identifiée sur le gène melB (un des quatre symporteurs $\text{Na}^+/\text{substrat}$ connus chez *E.coli*) et une autre mutation semblait perturber l'activité d'échange

Na^+/H^+ (277, 339). La cartographie de la région appelée antup a permis de localiser le gène d'un échangeur Na^+/H^+ appelé ant et de le séquencer. La protéine ant (ultérieurement appelé nhaA) est constituée de 362 acides aminés et ne présente pas d'homologie significative avec les NHE eucaryotes (290). Un deuxième échangeur appelé nhaB a été cloné 5 ans plus tard par complémentation d'une souche *E.coli* knock-out pour nhaA (299). Le gène code pour une protéine de 504 acides aminés et ne montre pas d'homologie particulière avec les NHE eucaryotes, ni avec nhaA à l'exception d'un court domaine présentant 43% d'identité.

2.2.10.3 NHE de levure

À la différence des autres organismes, les levures dont *Zygosaccharomyces rouxii* utilisent leur système d'échange Na^+/H^+ pour exporter le Na^+ en utilisant le gradient entrant de H^+ (391). Le clonage de cet antiporteur a été possible grâce à la sélection de souches de levure soumises à une procédure de mutagenèse et criblées selon leur tolérance au lithium et au sodium (174). Cette tolérance est due à une amplification génique et ces mutants ont été appelés *sod2* (pour *sodium2*). La cartographie d'une banque génomique de *Schizosaccharomyces pombe* a permis de localiser le gène responsable de cette tolérance. La protéine encodée par ce gène est constituée de 468 acides aminés et ne présente pas d'homologie avec d'autres NHEs. Toutefois, une légère similarité avec le nhaA bactérien et avec la portion hydrophobe du NHE1 de mammifère a pu être mise en évidence (174).

2.3 Rôles physiologiques

Le nombre toujours grandissant de NHEs clonés et caractérisés, ainsi que les différences observées au niveau de leur localisation tissulaire et cellulaire, suggèrent de multiples rôles physiologiques. En effet, dans cette section, nous verrons comment NHE est impliqué non seulement dans des phénomènes évidents comme la régulation du pH intracellulaire ou la réabsorption du bicarbonate et du chlorure de sodium au niveau du rein, mais aussi dans des phénomènes *a priori* inattendus comme la motilité cellulaire.

2.3.1 Régulation du pH intracellulaire

La plupart des cellules de mammifères présentent un pH intracellulaire (pHi) de 7.1 à 7.2. Néanmoins, si on prend en compte l'activité métabolique, le potentiel de repos et le gradient électrochimique des protons de part et d'autre de la membrane, le pHi devrait être plus acide d'environ 1 unité pH par rapport au pH extracellulaire qui est de 7.3 – 7.4. Un tel pHi est incompatible avec la physiologie normale d'une cellule. Cette dernière est donc munie d'un ensemble de transporteurs membranaires dont le rôle est de réguler le pHi et de le maintenir dans des valeurs acceptables. Ce sont des pompes comme la H^+ -ATPase (8), les canaux (266) et divers transporteurs actifs secondaires tels que les échangeurs Cl^-/HCO_3^- dépendants et indépendants du Na^+ (80, 207, 319), l'échangeur Cl^-/OH^- (231) et enfin l'échangeur Na^+/H^+ (269).

Le pHi intracellulaire est le facteur le plus déterminant dans l'activation de NHE. Au pHi physiologique normal (7.1-7.2), l'échangeur Na^+/H^+ est inactif. Lorsque le pHi descend au dessous de 7, NHE est dramatiquement activé (21), ce qui est cohérent avec son rôle régulateur du pHi. Lors de leurs études, Aronson *et al.* ont observé que, lorsque des vésicules de membranes de microvilli rénales sont soumises à une charge acide pour fixer le pHi à différentes valeurs, l'influx de $^{22}Na^+$ augmente en même temps que le pH diminue. Ce comportement n'est pas compatible avec la présence d'un seul site de transport pour les protons. En effet, si tel était le cas, l'influx de Na^+ aurait dû augmenter jusqu'à atteindre un plateau qui correspondrait à la saturation du site de transport du H^+ . Étant donné que NHE est électroneutre et présente une cinétique simple de type Michaelis-Menten de l'influx de Na^+ par rapport à la concentration externe de Na^+ (193, 195), une explication probable est la présence d'un ou plusieurs sites activateurs allostériques de NHE différents du site de transport. Plus tard, le même comportement a été observé dans des cellules intactes de rein (56) ou dans des lymphocytes (134). Cette propriété est conservée au moins chez NHE1 à 5 (67, 233, 284); toutefois le seuil d'activation varie en fonction de l'isoforme avec des pK respectifs d'activation de 6.21, 6.43, 6.45, 6.75, et 6.90 pour NHE4, NHE5, NHE3, NHE1 et NHE2 (67, 284, 351, 412). Cette disparité illustre bien les rôles différents que peuvent exercer les différents NHE dans leurs tissus d'origine.

Cette propriété est donc précieuse pour la cellule qui doit se débarrasser d'une concentration très importante de protons et, par là-même, réguler son pHi. De plus, comme nous le verrons dans une section ultérieure, le seuil d'activation de NHE (donc sa sensibilité au pHi) peut être modulé par différents agents dont les facteurs de croissance (263).

Des études de délétions et de mutagenèses ont révélé que le site d'activation par les H^+ était situé dans la zone transmembranaire de NHE1 (378) car la délétion du domaine cytoplasmique, même si elle déplace le pK d'environ 0.5 unité vers les pH plus acides, n'empêche pas son activation par les H^+ intracellulaires. Bien sûr, les résidus histidine sont apparus comme des candidats de choix dans la sensibilité aux protons car, à pH physiologique, ces acides aminés sont partiellement protonés. Toutefois, et contre toute attente, il a été rapporté que le Na^+_i pouvait aussi allostériquement activer l'échangeur et ce, de manière compétitive avec le H^+ (128, 129), ce qui semble écarter l'implication de résidus histidine protonables dans l'activation par les protons. En accord avec cette conclusion, la mutation des résidus histidine en position 35, 120 et 349 n'a aucun effet sur l'activité de NHE1 (386). Plus récemment, Wakabayashi *et al.* ont mis en évidence que les mutations Arg₄₄₀Asp et Gly₄₅₅Glu déplacent le pK de NHE1 vers des valeurs respectivement plus acides ou plus alcalines (380).

2.3.2 Régulation du volume cellulaire

Les cellules de mammifère sont généralement localisées dans un milieu isoosmotique d'environ 300mosmol/l. Toutefois, dans certains organes, l'osmolarité extérieure peut devenir plus élevée ou plus basse par rapport à l'osmolarité intracellulaire, comme par exemple dans la medulla interne du rein où l'osmolarité peut varier entre 300 et 1400mosmol/l. Il est donc important pour ces cellules de disposer d'un système pouvant réguler leur volume. En cas de choc hyperosmotique, il y a principalement trois systèmes activés pour rétablir un volume normal, soient le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$, NHE et l'échangeur Cl^-/HCO_3^- (9). En outre, une diminution de la perméabilité aux ions des canaux K^+ et Cl^- est observée (100).

La première indication que l'échangeur Na^+/H^+ était impliqué dans la régulation du volume cellulaire a été obtenue suite à l'observation que des cellules de salamandre traitées à l'amiloride et ses dérivés, inhibiteurs classiques des NHE, étaient incapables de récupérer leur

volume initial suite à un choc hyperosmotique (62). Parallèlement, des études menées sur le lymphocyte de rat ont montré que le regonflement de la cellule dans le milieu isoosmotique suite au rétrécissement causé par le choc hyposmotique était aussi inhibé par l'amiloride (132). De plus, il a été observé que ce regonflement exige la présence de Na^+ du côté extracellulaire, une entrée mesurable de Na^+ et, enfin, qu'il n'exige aucun changement du potentiel membranaire (120). À mesure que le pH augmente suite à l'activation de NHE, l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ autorise l'entrée de Cl^- dans la cellule et la sortie parallèle de HCO_3^- (131). Finalement, l'action combinée des deux échangeurs résulte en une entrée nette de NaCl suivie par une entrée d'eau et, donc, en un rétablissement du volume cellulaire. La preuve la plus directe de l'implication de NHE dans la régulation du volume cellulaire est venue quelques années plus tard des travaux de Rotin et Grinstein au cours desquels ces auteurs ont utilisé une lignée cellulaire CHO déficiente en NHE (lignée AP-1) (318) qui fut soumise à un choc hyperosmotique dans un milieu sans bicarbonate. Comparativement aux cellules CHO de type sauvage qui ont été capables d'alcaliniser le milieu intracellulaire (signe de l'activation de NHE), les cellules AP-1 n'ont pas été en mesure de le faire (ainsi que les cellules CHO traitées avec un dérivé de l'amiloride). De plus, la mesure du volume cellulaire a montré que les cellules AP-1 sont incapables d'augmenter leur volume suite à un choc hyperosmotique.

Il a été montré qu'un choc hyperosmotique pouvait activer NHE en augmentant son affinité pour les H^+ via une augmentation de son degré de phosphorylation (129). Cette augmentation dépend de la disponibilité en ATP dans certaines lignées cellulaires dont les lymphocytes et les astrocytes (133, 340) mais, dans les fibroblastes, le choc osmotique n'augmente pas le degré de phosphorylation de NHE1 (138). Plusieurs études appuient cette conclusion. La protéine kinase C (PKC) n'est pas impliquée dans l'activation de NHE suite à un choc hyperosmotique étant donné que NHE est activé dans des lymphocytes et des astrocytes déplétés en PKC (135, 340). La protéine kinase A (PKA) n'est pas davantage impliquée dans l'activation suite à un choc osmotique. En effet, un tel stress n'augmente pas le niveau d'AMPc des astrocytes de rat (340) et, de plus, une augmentation de l'AMPc ne reproduit pas les effets d'un choc hypertonique dans les ostéoblastes (82).

L'activation de NHE suite à un choc osmotique n'est pas davantage médiée par le Ca^{2+} . Bien qu'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire ait été observée suite à un

stress osmotique dans les lymphocytes, cette augmentation est inhibée par l'amiloride. Ceci suggère qu'elle est la conséquence de l'activation de NHE plutôt que sa cause (137). Un traitement à l'ionomycine (un ionophore Ca^{2+}) réalisé dans le but de mimer une augmentation du Ca^{2+}_i n'a pas d'effet sur l'activation osmotique de NHE (82). De même, l'hypothèse d'une implication très locale du Ca^{2+} a été écartée en traitant les cellules au chélateur de Ca^{2+} , le BAPTA. Dans ces cellules, NHE est quand même activé par un choc hyperosmotique (340).

Bien qu'il ait été démontré que le Ca^{2+} n'était pas impliqué dans l'activation de NHE suite à un choc osmotique, plusieurs travaux ont porté sur le rôle possible de la calmoduline (CaM) dans cette activation. En effet, le traitement d'ostéoblastes de rat avec la chlorpromazine ou le W-7, deux inhibiteurs de la calmoduline, empêche l'activation osmo-dépendante de NHE (82). De plus, la délétion ou la mutation du domaine de liaison à haute affinité de la CaM de NHE1 (résidus 636 à 656) empêche fortement l'activation de NHE1 par un choc osmotique (41). Contrairement à NHE1, NHE3 n'est pas activé par un traitement à l'ionomycine. Cependant, une chimère composée du domaine transmembranaire de NHE3 et du domaine cytoplasmique de NHE1 est activable par le même traitement (381). Il est donc clair à présent que la CaM est un facteur important dans l'activation de NHE suite à un choc osmotique. Toutefois, un mutant de NHE1 privé d'une large portion de son domaine cytoplasmique (698-815) est toujours capable d'être activé par une hyperosmolarité (42). Plusieurs régions sont donc probablement impliquées dans l'activation de NHE1 par un choc hyperosmotique.

L'activation de NHE a aussi été reliée aux intégrines (167, 247, 332-334). De plus, NHE1 se colocalise, chez les fibroblastes, avec des protéines du cytosquelette (139). Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre le cytosquelette et NHE. Un traitement à la cytochalasine B (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine F) inhibe en effet l'activation dépendante de l'osmolarité de NHE (83). De même, le ML-7, un inhibiteur de la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*), empêche l'activation osmo-dépendante de NHE dans les astrocytes (340). Enfin, Kurashima *et al.* ont montré que NHE3 (mais non NHE1) est régulé par le cytosquelette (217). Toutes ces données tendent à suggérer qu'un choc osmotique pourrait activer NHE via un réarrangement du cytosquelette.

Finalement, le choc osmotique active la voie *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (170). Or, des travaux ayant déjà mis en évidence un lien entre les MAPK et les NHEs (2, 43, 354, 387), il est donc tout à fait envisageable que ces derniers soient activés par les MAPK en réponse à un stress osmotique.

2.3.3 Absorption du HCO_3^- , du NaCl et sécrétion du NH_4^+

Si, dans les cellules non polarisées, l'échangeur Na^+/H^+ est un agent alcalinisateur du cytoplasme, un couplage de NHE avec des échangeurs Cl^-/base n'a pas d'influence sur le pH_i mais plutôt sur l'osmolarité de la cellule. Dans les cellules épithéliales rénales, le NHE fonctionne en relation avec d'autres transporteurs de protons situés sur la membrane opposée, créant ainsi un transport transépithélial de H^+ . De plus, le couplage de NHE avec d'autres échangeurs Cl^-/base constitue un système de transport transépithélial de NaCl . Ces fonctions reposent essentiellement sur le type de cellule épithéliale étudiée et sur l'isoforme de NHE exprimée dans cette cellule. La répartition des différentes isoformes de NHE le long du néphron est représentée à la Figure 1 et résumée au Tableau 2

Cette section couvrira brièvement l'implication de NHE dans le transport du HCO_3^- , du NaCl et du NH_4^+ le long du néphron.

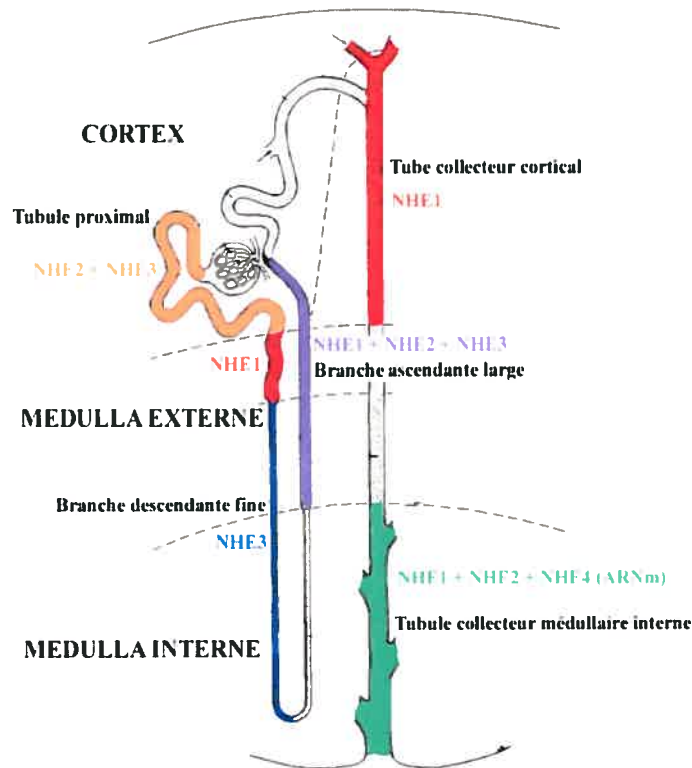


Figure 1 : Représentation schématique du néphron avec les différentes isoformes de NHE associées à chacun de ses segments. Tiré des références (16, 47, 48, 52, 210, 268, 345)

2.3.3.1 Absorption du HCO_3^-

2.3.3.1.1 Tubule proximal

Avec 3700 mEq d'ions HCO_3^- filtrés quotidiennement par le glomérule, il est capital de récupérer cet HCO_3^- sous peine de déclencher une acidose fatale. Un des rôles du rein est donc de réabsorber le bicarbonate et 80% de cette réabsorption a lieu dans le tubule proximal (11). En fait, le bicarbonate n'est pas directement absorbé mais le processus utilise plutôt la sécrétion de H^+ (94). Étant donné le pH luminal et la différence de potentiel entre la cellule et la lumière du tubule (environ -70mV), cette sécrétion nécessite de l'énergie. Un tiers de la sécrétion d' H^+ est relié au fonctionnement de la pompe H^+ -ATPase apicale et les deux tiers restants sont dus au

fonctionnement de l'échangeur Na^+/H^+ apical (281, 303). Des études ont montré que NHE3 est l'isoforme ayant un comportement similaire au NHE apicale (284) et que cette isoforme était exprimée seulement à la membrane apicale des cellules du cortex rénal et ce, chez le lapin et le rat (16, 47). De plus, les cellules OK et LLC-PK, deux lignées provenant du tubule proximal, expriment NHE3 (17, 344). Cette isoforme est donc probablement responsable de l'échange Na^+/H^+ dans le tubule proximal mais d'autres isoformes pourraient y contribuer. En effet, NHE2 est exprimé à la membrane apicale des cellules RKPC-2 (*Rabbit Kidney Proximal Cell - 2*), une lignée provenant du tubule proximal de lapin (268).

Alors qu'aucun ARNm codant pour NHE et qu'aucune activité NHE n'ont été respectivement trouvés dans le cortex rénal et dans les membranes basolatérales du tubule contourné proximal (12, 127, 171, 208), une étude a mentionné la présence d'un NHE basolatéral dans le segment S3 du tubule proximal de lapin (220). De par sa position, cet échangeur ne participe pas à l'absorption du bicarbonate du fait qu'il ne fonctionne pas dans le sens de l'acidification de l'urine. Il pourrait donc plutôt participer à la régulation du volume cellulaire.

2.3.3.1.2 Anse descendante de Henlé

La fonction de l'anse descendante du néphron est controversée en ce qui concerne la sécrétion de protons ou l'absorption de NaCl. En effet, on retrouve une grande variabilité entre les espèces mais aussi au niveau des néphrons. Par exemple, chez le rat, la portion la plus haute de l'anse descendante longue présente des microvilli, une pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, une haute perméabilité au Na^+ et un NHE3 apical alors que les cellules de l'anse descendante courte sont lisses, n'expriment pas de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ ni de NHE3 et sont relativement imperméables au Na^+ (16, 99, 165, 166, 212). Une situation contraire est observée chez le lapin où l'anse descendante présente une faible perméabilité au Na^+ (165, 203) et n'exprime pas de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ (99), de NHE1 et de NHE3 (47, 48). Toutefois, et de façon surprenante, une activité NHE a été décelée au niveau de ce segment chez le lapin (219), ce qui suggère la présence d'une isoforme de NHE autre que NHE1 ou NHE3 non encore identifiée.

2.3.3.1.3 Anse ascendante de Henlé

NHE3 et NHE1 sont aussi présents dans les membranes respectivement apicales et basolatérales des cellules de l'anse large ascendante de Henlé (16, 48, 209). Cette zone du néphron est responsable de l'absorption de 30 à 50% du bicarbonate qui sort du tubule proximal (93, 124) via la sécrétion de protons par le NHE apical (124, 189).

2.3.3.1.4 Tubule contourné distal

Il s'agit de la zone du néphron où le bicarbonate non capté par le tubule proximal ou l'anse ascendante est récupéré. Bien qu'une absorption de bicarbonate via une sécrétion apicale de protons ait été mise en évidence (242, 389), ce transport n'a toujours pas été relié directement à une activité NHE malgré le fait que la réabsorption soit inhibée par 10^{-4} M EIPA (125). En effet, l'immunomarquage anti-NHE3 à la membrane apicale cesse brusquement à la transition de l'anse ascendante avec le tubule contourné (16). Un marquage NHE1 a été mis en évidence mais seulement à la membrane basolatérale (47).

2.3.3.1.5 Tubule collecteur cortical

Ce segment est capable soit d'absorber, soit de sécréter le HCO_3^- en fonction de l'équilibre acido-basique de l'organisme (250-252). Ce segment est constitué des cellules principales dont le rôle est d'absorber le NaCl, des cellules intercalaires α qui sécrètent des protons et des cellules intercalaires β qui sécrètent le bicarbonate (10). Aucun signal ou marquage apical de NHE n'a été mis en évidence dans cette portion du néphron (16, 47). Une activité d'échange Na^+/H^+ a cependant été mesurée au niveau des membranes basolatérales des cellules intercalaires β (392). Cet échangeur pourrait expulser les protons en utilisant le gradient entrant de Na^+ mais un traitement à l'amiloride du côté basolatéral ou un retrait du Na^+ ne perturbe pas la sécrétion apicale de HCO_3^- (251, 331). Toutefois, quand les cellules sont soumises à une charge acide aiguë, le NHE basolatéral présente un rôle plus évident que celui de la pompe H^+ -ATPase dans le retour à un pH_i normal (392). Ce NHE serait donc relativement inactif à un pH_i normal et aurait donc probablement pour rôle de protéger la cellule contre une surcharge acide. L'ARNm de NHE1 a été détecté dans les tubules collecteurs corticaux de rat (210). Toutefois, chez le lapin, le marquage NHE1 ne se colocalise pas avec un marqueur apical des cellules intercalaires β (48).

2.3.3.1.6 Tubule collecteur médullaire

Dans ce segment, les protons sont sécrétés contre un gradient de pH dans une lumière exempte de bicarbonate où la plupart des H^+ sont titrés par le NH_3 sécrété pour donner du NH_4^+ (10). La sécrétion apicale de protons n'est pas due aux NHEs mais une activité d'échange Na^+/H^+ a été mise en évidence à la membrane basolatérale (60, 149, 150). Au niveau de la bande interne du tubule collecteur médullaire, le NHE basolatéral semble être actif au pH de repos car le retrait du Na^+ basolatéral acidifie la cellule. Un faible marquage NHE1 a été observé au niveau des membranes basolatérales de ce tubule chez le lapin (48). De plus, chez des cellules immortalisées de tubule collecteur médullaire de souris, l'ARNm de NHE1 et NHE2 a été mis en évidence mais l'activité d'échange reste restreinte à la membrane basolatérale, ce qui signifie que NHE2 est situé à cette membrane (345). Enfin, l'ARNm de NHE4 a été localisé in situ au niveau du tubule collecteur de la médulla interne et externe (52). Toutefois, la contribution de chacune de ces isoformes à l'activité NHE du tubule collecteur médullaire est encore inconnue.

Le tableau ci-dessous résume la distribution des différentes isoformes de NHE le long du néphron.

	Apical	Basolatéral
Tubule proximal		
S1	NHE3	-
S2	NHE3	-
S3	NHE3	NHE1
Anse descendante	NHE3	-
Anse ascendante épaisse	NHE2, NHE3	NHE1
Tubule contourné distal	+	NHE1
Tubule collecteur cortical		
cellules principales	-	NHE1
Cellules intercalées β	-	+
Cellules intercalées α	-	-
Tubule collecteur médullaire	-	NHE1, NHE4, NHE2?

Tableau 2 : Distribution des différentes isoformes de NHE le long du néphron. + : activité d'échange Na^+/H^+ détectée, - : activité d'échange Na^+/H^+ non détectée. Tiré de la référence (288).

2.3.3.2 Absorption du NaCl

2.3.3.2.1 Tubule proximal

La moitié du NaCl filtré est réabsorbé au niveau du tubule proximal; 30 à 60% sont récupérés par voie transcellulaire et le reste emprunte la voie paracellulaire (13, 304). La partie transcellulaire est médiée par le NHE apical couplé à un échange Cl^-/base (29, 304, 325) étant donné que la microperfusion du tubule proximal avec une solution équivalente à celle trouvée normalement dans ce tubule mais, additionnée d'amiloride, inhibe l'absorption de chlore et l'augmentation de volume de 44% ce qui correspond à la part de NaCl réabsorbée par la voie transcellulaire (304)

2.3.3.2.2 Anse descendante de Henlé

Tel que mentionné au chapitre 2-3-3-1-2, la fonction de cette portion d'anse est assez controversée en ce sens qu'elle varie entre les différentes espèces mais aussi entre les néphrons. Ces variations sont énumérées dans cette section.

2.3.3.2.3 Anse ascendante large de Henlé

L'absorption du NaCl par l'anse ascendante de Henlé a été mise en évidence par les travaux de Rocha *et al.* (317). La particularité de ce segment est qu'il est imperméable à l'eau (151). Bien qu'il ait été démontré que le cotransporteur apical $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ est responsable de l'absorption du NaCl (151, 202), un système supplémentaire au niveau de l'anse ascendante corticale de souris a été proposé. Ce mécanisme consiste en un NHE couplé avec un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (110). Toutefois, la situation est plus complexe car la partie du transport du NaCl dépendante du $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ est sensible au bumétanide et à la concentration luminale de K^+ , ce qui suggère l'implication des cotransporteurs $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (111).

2.3.3.2.4 Tubule collecteur cortical

L'absorption du NaCl dans le tubule collecteur cortical est assurée par les cellules principales. Le transport transépithélial de Na^+ s'effectue en deux étapes : la capture du Na^+ du

coté apical des cellules principales et le rejet de Na^+ dans la circulation via la membrane basolatérale. Tel que mentionné plus haut, il n'y a pas de NHE3 apical dans ce segment, le transport du Na^+ luminal s'effectuant par des canaux Na^+ . Un NHE basolatéral ainsi que d'autres transporteurs tel que l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ont été décrits dans les cellules principales (64, 392).

2.3.3.3 Sécrétion du NH_4^+

Le NH_3 est le principal agent tampon de protons de l'urine. En effet, l'urine peut atteindre un pH aussi bas que 5 (et donc une concentration de protons de 10^{-5} moles/L) alors que l'excrétion journalière de protons peut atteindre 10^{-1} moles. Il est donc évident que la majorité de ces protons est tamponnée. La production de NH_3 est très abondante et hautement régulée par le pH (10). Le tubule proximal est le principal producteur de NH_3 et de NH_4^+ (272). Le NH_3 issu principalement de la déamination des peptides et des acides aminés diffuse passivement à travers la membrane apicale alors que le NH_4^+ est évacué dans la lumière via l'échangeur Na^+/H^+ qui est capable de transporter cet ion (195, 302).

2.3.4 Autres rôles

En dehors des rôles physiologiques reliés à sa fonction même, NHE est impliqué dans plusieurs autres processus tels que la prolifération, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette et la migration. Cette section a donc pour but de résumer brièvement ce que l'on connaît sur le rôle ou l'implication de NHE1 dans chacun de ces processus.

2.3.4.1 Prolifération cellulaire

Les premiers éléments démontrant une implication de NHE dans la prolifération cellulaire ont été apportés par les travaux de Pouyssegur *et al.* en 1984 (301). En effet, les auteurs ont observé que la prolifération de cellules déficientes en activité NHE était grandement perturbée. Plus tard, il a été rapporté que les inhibiteurs de NHE de type EIPA ou HOE694 provoquaient une diminution de la prolifération des cellules traitées (38, 87, 161). Toutefois, le rôle de NHE est considéré comme permissif et non obligatoire comme l'ont démontré les travaux de Kapus *et al.* (183). En effet, des cellules CHO déficientes en NHE prolifèrent en présence de sérum mais le taux de prolifération augmente avec l'expression tant de NHE1 que de NHE2 et

NHE3. Ces observations tendent à démontrer qu'un pH cytosolique alcalin est favorable à la prolifération cellulaire; l'activité de certaines cyclines du cycle cellulaire ou de facteurs d'élongation pourrait être favorisée à un tel pH.

2.3.4.2 Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée s'accompagne d'une diminution du volume de la cellule et d'une acidification intracellulaire qui pourrait être induite par une perte d'activité de NHE (235). À l'état normal, NHE peut être alors considéré comme un agent anti-apoptotique. De plus, des preuves supplémentaires de l'implication de NHE dans la survie cellulaire ont été apportées par les analyses de délétions de NHE *in vivo* : 1) chez des souris *knock-out* pour NHE1, le taux de mortalité de certaines cellules neuronales est augmenté dans les tissus ayant une haute activité métabolique tel que le cervelet (76); 2) des souris K-O pour NHE2 présentent une nécrose accentuée des cellules pariétales de l'estomac (330). Enfin la stimulation du récepteur CD95 (Fas/Apo1) (273), un récepteur impliqué dans l'apoptose, inhibe l'activité NHE1 alors que l'inhibition de NHE1 par le HOE694 accélère la fragmentation de l'ADN induite par CD95 (228).

2.3.4.3 Cytosquelette et migration

Récemment, des travaux ont démontré que NHE1 pouvait servir de protéine d'ancrage aux filaments d'actine et ce, indépendamment de son activité d'échange Na^+/H^+ (90). En effet, Denker et Barber proposent que le domaine cytoplasmique de NHE1 se lie à la famille des protéines *Ezrin-Radixin-Moesin* (ERM) qui se lient à l'actine et servent ainsi de lien entre le cytosquelette et le front antérieur des lamellipodes des fibroblastes. Les cellules déficientes en NHE présentent une organisation défailante du cytosquelette qui est rétablie après transfection de l'ADNc codant pour le NHE1 de type sauvage ou pour le mutant inactif Glu₂₆₆Ile-NHE1. Ce rétablissement n'a pas lieu si ces cellules sont transfectées avec l'ADNc des NHE1 porteurs de mutations qui préviennent la liaison avec la famille ERM (90). Toutefois, la migration cellulaire nécessite l'activité d'échange de NHE, tel que démontré par les expériences de plaies cellulaires effectuées par Denker et Barber (89) et les vidéomicroscopies en mode « *time lapse* » réalisés par Lagana *et al.* (225).

Bien qu'une conformation optimale du domaine cytoplasmique de NHE1 soit essentielle pour assurer l'interaction avec l'actine et le complexe ERM, l'activité d'échange de NHE1 n'est pas dépendante de l'activité polymérisation/dépolymérisation de l'actine (217). En effet, l'utilisation de la cytochalasine D, un composé qui perturbe la polymérisation/dépolymérisation de l'actine F en se liant au bout positif, induit une inhibition de NHE3 mais non de NHE1.

La signification du choix de NHE1 en tant que protéine d'ancrage au cytosquelette pourrait relever de son aptitude à provoquer des variations micro-localisées du pHi ou de l'osmolarité et ces micro-variations pourraient être essentielles aux processus de signalisation et de régulation.

L'inhibition de NHE1 par des agents tels que l'amiloride ou le HOE694 perturbe la migration chémoattractique dirigée mais non aléatoire des leucocytes, en réponse au chemoattractant N-formyl-Met-Leu-Phe (316, 341). Dans ce cas, la motilité de ces cellules est affectée. D'autre part, l'inhibition de NHE1 diminue la motilité spontanée des cellules endothéliales (61) ainsi que de deux lignées différentes de cellules MDCK transformées (198, 225) dont l'une aux propriétés invasives. Dans ce dernier cas, NHE1 est surexprimé dans la souche transformée et invasive de cellules MDCK, comparativement aux lignées parentales, et ce NHE1 est colocalisé avec l'actine β dans les pseudopodes. Ceci suggère donc que NHE1 pourrait jouer un rôle dans le phénomène d'invasion. De plus, l'inhibition de NHE1 par l'EIPA provoque le désassemblage des fibres de stress et une redistribution des fibres d'actine. Finalement, le traitement à l'EIPA est capable de contrer la formation de fibres de stress induite par le nocodazole et ce, plus efficacement dans un milieu sans HCO_3^- comparativement à un milieu avec HCO_3^- . Ce résultat semble donc suggérer que NHE1 régule la formation des fibres de stress grâce à son pouvoir régulateur du pHi (225). Les travaux récents de Denker *et al.* (89) confirment la nécessité de l'échange Na^+/H^+ dans le processus de migration cellulaire même si cette fonction n'est pas nécessaire à l'ancrage du cytosquelette à la membrane.

Il est donc maintenant certain que NHE1 est un acteur déterminant dans le phénomène de migration cellulaire mais les mécanismes le reliant à la motilité restent encore à être déterminés. Récemment, notre laboratoire a montré que NHE1 est impliqué dans l'extrusion des protons au niveau des pseudopodes afin d'assurer localement le flux glycolytique nécessaire à la production

de l'ATP indispensable à la polymérisation de l'actine et, surtout, à la phosphorylation des différentes tyrosine-kinase et autres médiateurs intracellulaires impliqués dans le processus de migration cellulaire (225).

2.4 Régulation

L'activité de l'échangeur Na^+/H^+ est régulée par une multitude de signaux tels que les facteurs de croissance, les esters de phorbol, les neurotransmetteurs, l'hyperosmolarité, les hormones stéroïdiennes, etc. Certains de ces signaux agissent rapidement (de l'ordre de la seconde ou de la minute), comme les facteurs de croissance et d'autres plus lentement (quelques heures à quelques jours), comme les hormones stéroïdiennes (136). La réponse à ces signaux dépend largement de l'isoforme de NHE ainsi que du type cellulaire.

2.4.1 Activation à court terme

Dans la majorité des cas, l'activation rapide de NHE n'est pas précédée d'une acidification du cytoplasme. Cette activation est donc indépendante de l'affinité de NHE pour les protons. Afin d'éclaircir les mécanismes impliqués dans cette activation, de nombreuses études ont été menées à l'aide de techniques permettant d'induire une acidification du milieu intracellulaire et de mesurer ensuite le transport du Na^+ en fonction du pH_i avec et sans stimulation. C'est ainsi que l'action activatrice ou inhibitrice des facteurs de croissance et hormones a été répertoriée. Avant même le clonage de NHE1 en 1989, il avait déjà été déterminé que le traitement par les facteurs de croissance agissait en augmentant l'affinité de NHE pour les protons, ce qui se traduit par le déplacement la dépendance de NHE au pH_i vers des valeurs alcalines (295). De ce fait, après stimulation, NHE était capable de s'activer à des pH_i plus élevés.

D'énormes efforts ont été ensuite nécessaires pour élucider les mécanismes moléculaires responsables de cette activation. Cette section a pour but de résumer ce qui est connu concernant la régulation de l'échangeur Na^+/H^+ .

2.4.1.1 Phosphorylation

De prime abord, étant donné la vitesse à laquelle NHE répond à ces stimuli (quelques secondes à minutes), la piste de la phosphorylation de NHE a tout de suite été envisagée (295). Par ailleurs, en 1982, Pouysségur *et al.* ont mis en évidence un lien entre l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ et la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (300). En effet, la protéine S6 est phosphorylée après stimulation aux facteurs de croissance et les auteurs ont montré que l'amiloride, un inhibiteur de NHE, ainsi que le protonophore dinitrophénol, sont capables d'empêcher cette phosphorylation. Ces expériences mettent donc en évidence un lien entre la régulation du pHi et la phosphorylation de protéines. Ce n'est que plus tard, dans les années 90, que plusieurs études ont véritablement apporté la preuve que NHE est phosphorylé en réponse aux facteurs de croissance. Sardet *et al.*, suite au clonage de NHE1 et à la production d'anticorps spécifiques anti-NHE1, ont montré qu'un traitement par l'EGF et la thrombine induisait une augmentation du taux de phosphorylation de NHE1 parallèlement à une augmentation du pHi et que cette phosphorylation s'effectuait sur les résidus sérine, uniquement quel que soit le facteur de croissance utilisé (321). En effet, l'EGF active spécifiquement son récepteur à activité tyrosine kinase alors que la thrombine active le récepteur thrombine, un récepteur couplé aux protéines G activant successivement la phospholipase C (PLC) et les protéines kinases C (PKC). De plus, ces deux facteurs de croissance induisent la phosphorylation de sites communs (322). Parallèlement, les auteurs ont montré que le traitement à l'acide okadaïque, un inhibiteur des protéines phosphatases à résidus sérine/thréonine, permet d'activer NHE1 (44, 322). Ces observations suggèrent qu'un point de convergence de ces deux voies devrait exister pour permettre la phosphorylation de ces sites. La voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), des kinases phosphorylant les résidus sérine et thréonine, semblait être une bonne candidate du fait de son rôle essentiel dans la transmission du signal induit par les facteurs de croissance stimulant les récepteurs possédant une activité kinase sur les résidus tyrosine (291, 384). En effet, Bianchini *et al.* ont montré que même si la p44 MAPK ne phosphoryle pas directement NHE1, l'expression d'une protéine à action dominant négatif p44 MAPK inhibe près de 50% l'activation de NHE1 en réponse aux facteurs de croissance (43). Alors que la plupart des sites de phosphorylation de NHE1 se situent entre les acides aminés 636 et 815 dans l'extrémité cytoplasmique, la délétion de cette région n'abolit pas complètement la

réponse aux facteurs de croissance alors que la délétion de la région 567- 635 qui ne contient pas de sites de phosphorylation, abolit complètement l'activation de NHE1 par les facteurs de croissance (377). Ceci signifie qu'une autre voie, indépendante d'une phosphorylation directe de NHE1, est requise pour activer NHE1. Cette hypothèse avait d'ailleurs déjà été émise par Grinstein *et al.* lors de leurs travaux sur l'activation de NHE par des modifications du volume cellulaire (138). L'explication la plus simple consistait à envisager l'existence d'une ou plusieurs protéines régulatrices qui pourraient être elles-mêmes phosphorylées en réponse aux facteurs de croissance (73, 384). D'autres travaux sont effectivement en accord avec cette idée. Winkel *et al.*, après avoir microinjecté l'anticorps dirigé contre les 157 derniers acides aminés de NHE1 et produit par Sardet et Pouyssegur (321), ont observé que l'endothéline 1 et la thrombine étaient incapables d'activer NHE1 alors que l'ester de phorbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) et les contraintes physiques (acidité et osmolarité) avaient toujours cette capacité (406).

La cascade PLC-DAG-PKC constitue une voie importante de régulation de NHE. Son action aboutit la plupart du temps à une activation de l'échange Na^+/H^+ mais, dans quelques cas, une inhibition est observée. Plusieurs résultats ont souligné l'importance des PKC dans l'activation de NHE : 1) les esters de phorbol tels que le PMA ou le PDBU, qui activent les PKC classiques (α , β , γ) et nouvelles (σ , ϵ , η , θ , μ) sans mobiliser le Ca^{2+} , activent l'échange Na^+/H^+ , 2) les inhibiteurs de PKC préviennent l'activation de NHE par des agonistes et, enfin, 3) les cellules dont les PKC ont été désensibilisées par une incubation prolongée présentent une activité NHE diminuée (240). Tel que mentionné précédemment, la région 567-635 est cruciale pour la réponse aux PKC mais les sites de phosphorylation se situent en aval, entre les résidus 636 et 815 (377). L'identité de l'isoforme de PKC impliquée dans l'activation de NHE est encore inconnue.

La régulation des autres isoformes de NHE par les PKC a été moins étudiée. Dans la lignée RKPC-2 transformée, NHE2 est stimulé par le PMA (268) de même que le NHE2 de lapin transfecté dans des fibroblastes de type PS120 (233) et le NHE2 de rat transfecté dans des cellules CHO-AP1 (*Chinese Ovary Cells-AntiPorter*) (182). Le NHE3 de rat exprimé dans les cellules AP-1 est inhibé par le PMA (182) de même que les NHE3 humain et de lapin dans les cellules PS120 (58, 233, 234). Pour cette dernière isoforme, la région médiant la réponse à la PKC a été localisée entre les résidus 585 et 689 (234).

La régulation de NHE1 par la PKA (Protéine Kinase A), une kinase activée par l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) a été sujet de controverses. En effet, s'il est généralement admis que l'AMPc n'a aucun effet sur cette isoforme, comme l'ont attesté quelques études (55, 233), plusieurs travaux ont fait état d'un pouvoir stimulateur ou inhibiteur de PKA sur NHE1 en fonction du type cellulaire. En effet, le NHE1 humain transfecté dans des cellules OK est inhibée par l'activation de la PKA (153). Au contraire, l'activité d'échange est stimulée par l'AMPc dans les macrophages murins (206), les hépatocytes primaires de rat (267) et les ostéoblastes de rat (143) (à noter que ces cellules n'expriment que NHE1 (25, 88, 287, 390)). Finalement, le NHE1 de rat transfecté dans des cellules AP-1 est aussi stimulable par les agonistes provoquant une accumulation intracellulaire d'AMPc (182). Pour résumer, NHE1 est donc régulé par la PKA mais sa réponse dépend du type cellulaire. Historiquement, le NHE1 cloné à partir de la truite a été la première isoforme (appelée β -NHE) pour laquelle on a démontré que la régulation par l'AMPc passait par le domaine cytoplasmique (55). Cette isoforme contient deux sites consensus pour la phosphorylation par la PKA (Arg-Arg/Lys-X-Ser-Thr) aux sérines 641 et 648. Lorsque ces sérines sont mutées en glycine, la stimulation de NHE1 par l'AMPc est diminuée de 72% (54). Les quelques 30% restant sont imputables à la région 559-661 qui pourrait contenir un autre site PKA non encore identifié ou un site de liaison avec un facteur sensible à l'AMPc.

La régulation des autres isoformes par la PKA est moins connue. Dans les cellules RKPC-2, NHE2 est inhibé par un analogue de l'AMPc (268) alors que le NHE2 de lapin transfecté dans des cellules PS120 est insensible aux analogues de l'AMPc (233). De même, le NHE2 de rat exprimé dans des cellules AP-1 est activé par de tels analogues (182). Le NHE3 de rat dans les cellules AP-1 est inhibé par les analogues de l'AMPc (182), ce qui est compatible avec les résultats obtenus pour le NHE3 endogène des cellules OK (24, 153). De même, le NHE3 de vésicules de membranes de bordures en brosse est inhibé par la PKA (395). À l'inverse, le NHE3 de lapin exprimé dans les cellules PS120 ne répond pas à une élévation de l'AMPc_i (233).

2.4.1.2 Ca²⁺/Calmoduline

L'implication du Ca²⁺ en tant que régulateur de l'échangeur Na⁺/H⁺ a d'abord été suggérée par Villereal qui a montré qu'un traitement au A23187, un ionophore Ca²⁺, était capable de stimuler l'influx de Na⁺ (dépendant de l'amiloride) dans des fibroblastes humains

(374). Cependant, ces résultats ne pouvaient pas cependant distinguer un effet direct du Ca^{2+} d'un effet secondaire de l'acidification cellulaire. Plus récemment, il a été démontré qu'une élévation du Ca^{2+}_i augmente l'affinité de NHE1 pour les protons (143, 376). Étant donné que le taux de phosphorylation de NHE1 n'augmente pas après activation par le Ca^{2+} (376), l'implication directe de kinases dépendantes du Ca^{2+} telles que la *Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase* (CAMK) ou la PKC peut être écartée. L'implication de la calmoduline, une protéine liant le Ca^{2+} avec une grande affinité, a été suspectée par Bertrand, Wakabayashi *et al.* (41). En effet, ces auteurs ont montré que NHE1 liait la calmoduline par deux sites compris entre les acides aminés 636 à 656 et 657 à 700. En effectuant des délétions et/ou en introduisant des mutations, ce groupe a observé que les NHE1 ainsi mutés étaient activés à des pHi plus élevés comparativement au NHE1 sauvage, la courbe d'activation par les H^+ étant déplacée de 0.3 unité de pH vers des valeurs plus alcalines. En conséquence, le pHi de repos des cellules exprimant ces NHE1 mutés est plus élevé (376). L'existence d'une séquence autoinhibitrice (région A) à haute affinité pour la calmoduline ($K_d \sim 20\text{nM}$) contenant plusieurs acides aminés basiques (Arg, Lys, His) et comprise entre les résidus 636 et 656 du domaine cytoplasmique a donc été proposée. En se liant à cette séquence, le complexe Ca^{2+} /calmoduline lève l'inhibition et permet à la séquence 567-635 d'augmenter la sensibilité de NHE1 aux protons via peut-être une protéine régulatrice. Ces auteurs ont donc démontré que la calmoduline était une voie majeure de régulation de NHE1 (376). Contrairement à NHE1, NHE3 n'est pas sensible à une augmentation du Ca^{2+}_i (381). En construisant des chimères entre les isoformes NHE1 et NHE3, c'est-à-dire en remplaçant le domaine cytoplasmique de NHE1 par celui de NHE3 (chimère N1N3) et inversement (chimère N3N1) (381), les auteurs ont observé que la chimère N1N3 devenait insensible à un traitement à la ionomycine ou à la thrombine, deux agents provoquant une libération transitoire de Ca^{2+}_i , alors que la chimère N3N1 devenait sensible à ce même traitement. Toutefois, le transfert de la région A de NHE1 dans NHE3 ne suffit pas à rendre ce dernier sensible au Ca^{2+} (327). NHE3 présente une certaine homologie de séquence avec NHE1 entre les acides aminés 588 à 644, mais dans NHE3, cette séquence est interrompue par une série de 27 acides aminés, Wakabayashi *et al.* ont montré que NHE3 n'est effectivement pas sensible à une élévation du Ca^{2+} mais cette isoforme est tout de même capable de fixer la calmoduline dépendamment du Ca^{2+} (381).

2.4.1.3 Protéines régulatrices

Des observations précédentes, il est clair que la phosphorylation ne peut pas être le seul mécanisme de régulation de NHE (377), la délétion des sites majeurs de phosphorylation ne diminuant que de 50% la réponse de NHE1 au sérum, au PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), au PMA et à la thrombine. Il est donc probable qu'un ou plusieurs cofacteurs soient impliqués dans la régulation de NHE et que ces cofacteurs pourraient être phosphorylés suite à la stimulation par les facteurs de croissance ou autres stimuli et agir sur NHE1 sans phosphoryler celui-ci.

2.4.1.3.1 NHE-RF

C'est lors de l'étude du mode de régulation de NHE3 par l'AMPC que Weinman et ses collaborateurs ont envisagé (393, 396), puis identifié un facteur de régulation de NHE, appelé NHE-RF (pour Na^+/H^+ Exchange-Regulatory Factor) (398, 400). Ce facteur est composé de 358 acides aminés parmi lesquels on trouve une répétition en tandem d'une centaine de résidus. Cette séquence a été ensuite intégrée dans la famille PSD-95/Dlg/Zo-1 (PDZ) (417) qui constitue la signature des facteurs liant les protéines membranaires au cytosquelette sous-jacent (102). Ce facteur s'est avéré être un inhibiteur de l'activité de NHE3, et sa phosphorylation par la PKA (398) augmente son pouvoir inhibiteur sur NHE3 (393, 399). Un homologue de NHE-RF, NHE-RF2 (ou E3KARP (*NHE3 Kinase Regulatory Protein*)) a été caractérisé peu après par des expériences de double hybride (415). Comme NHE3, NHE-RF1 et 2 sont localisés au niveau des bordures en brosse bien que NHERF ait aussi été détecté à la membrane basolatérale (394). Cette localisation pourrait être due à l'interaction avec d'autres transporteurs tel que le cotransporteur $Na^+-HCO_3^-$ (40). En outre, plusieurs autres transporteurs ont été identifiés comme des cibles de NHE-RF : CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (224), ROMK (*Renal Outer Medulla K^+ channel*) (411), TRP (*Transient Receptor Potential*) (147), etc. De plus, toutes les protéines ayant un domaine ERM (*Ezrin-Radixin-Moesin*) sont capables de lier NHE-RF (271) sur un site éloigné du site de liaison à NHE3. La création d'un complexe contenant NHE-RF, NHE3 et l'eitrine (227, 415) facilite la phosphorylation de NHE3 par la PKA et, ainsi, son inhibition (397, 401).

De façon intéressante, les cellules PS120, caractérisées à l'origine pour leur absence d'expression d'un système d'échange Na^+/H^+ , n'expriment aucune des deux isoformes de NHERF (au contraire des cellules OK, LLC-PK et CHO) (417). Ainsi, les cellules PS120 transfectées avec NHE3 ne répondent pas à l'activation de la PKA par le 8-Br-cAMP, un analogue de l'AMPc. La cotransfection de NHE3 et de NHERF 1 ou 2 rétablit l'inhibition de NHE3 par l'AMPc (417).

2.4.1.3.2 $p90^{\text{RSK}}$

L'implication de la voie MEK1-ERK1/2 dans la régulation de NHE1 avait déjà été proposée étant donné que l'expression d'une p44 MAPK à caractère dominant négatif diminue de 50% l'activation de NHE1 par les facteurs de croissance (43). En parallèle, le groupe de Fliegel a montré que la phosphorylation induite par la MAPK concernait les 158 derniers acides aminés de NHE1 (387). Toutefois, NHE1 n'est pas directement phosphorylé par la p44 MAPK *in vitro* (43). Plusieurs pistes ont amené à l'identification de $p90^{\text{RSK}}$ (*p90 Ribosomal S6 Kinase*), un substrat de ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) (349), comme régulateur de l'activité de NHE1: a) une kinase de 90kDa présente une activité augmentée envers NHE1 dans des lysats cellulaires de muscles lisses de rats SHR (*Spontaneous Hypertensive Rat*) comparativement aux rats WKY (*Wistar-Kyoto Rat*) (297); b) le PD98059, un inhibiteur de MEK1/2 (*MAPK/ERK Kinase*) bloque l'activation de $p90^{\text{RSK}}$ par les facteurs de croissance et diminue aussi la phosphorylation de NHE1(81); c) le délai d'activation de $p90^{\text{RSK}}$ et de l'échange Na^+/H^+ , suite à l'activation exogène, sont similaires (353). De plus, le groupe de Berk (354) a apporté la preuve que, suite à une stimulation par le sérum, $p90^{\text{RSK}}$ phosphoryle NHE1 sur la sérine 703 qui fait partie d'une séquence consensus RXXS déjà connue (98). Finalement, en démontrant que cette phosphorylation est inhibée par le PD98059, les auteurs suggèrent que ERK1/2 active NHE1 via l'activation de $p90^{\text{RSK}}$, laquelle phosphoryle NHE1 sur la sérine 703.

2.4.1.3.3 *Calcineurin Homologous Protein (CHP)*

CHP a été identifiée comme étant une protéine se liant à NHE1 lors du criblage d'une banque d'expression avec le domaine cytoplasmique de NHE1 fusionné avec la glutathione S-transférase (GST) (237). Cette protéine a été dénommée CHP (pour *Calcineurin Homologous*

Protein) étant donnée sa similarité avec la calcineurine (une phosphatase Ca^{2+} -dépendante). CHP lie le Ca^{2+} (cette protéine présente une bonne homologie avec la calmoduline) et se lie à la région 567-637 de NHE1, la région critique pour la réponse aux facteurs de croissance (377), mais pas à la région spécifique à la calmoduline (637-691). La surexpression de CHP n'a pas d'effet sur l'activité basale de NHE1 mais a pour conséquence d'inhiber la stimulation de NHE1 par le sérum ou par la GTPase. CHP pourrait donc se lier au NHE1 quiescent et être libéré lors de la stimulation par les facteurs de croissance, ce qui permettrait à NHE1 d'adopter une conformation active. Les auteurs ont par ailleurs observé que CHP est sensible à la phosphorylation : une diminution de son taux de phosphorylation est accompagnée par une augmentation de l'activité de NHE1. Dans le même temps, une autre équipe (28) a identifié une protéine appelée p22 présentant 99% d'homologie avec CHP. Ces deux protéines sont donc probablement homologues dans des espèces différentes (humain pour CHP et rat pour p22). Plus tard, Pang *et al.* (292), bien que travaillant sur des isoformes humaines, à l'instar de Lin et Barber (237), ont déterminé une région différente de liaison à CHP dans NHE1 (résidus 515 à 530) sans pouvoir toutefois expliquer cette divergence. Les isoformes NHE1-5 présentent une forte homologie au niveau de ce segment et se lient toutes à CHP. En outre, lors de cette étude, la localisation membranaire de CHP dans des cellules transfectées avec NHE1 n'est pas affectée par l'ester de phorbol, le sérum ou d'autres facteurs de croissance, ce qui contredit la proposition de Lin *et al.* selon laquelle CHP se dissocie de NHE1 en réponse aux facteurs de croissance (237). Par conséquent, l'implication de CHP dans la régulation à court terme de NHE1 n'est pas encore certaine.

En 2002, une deuxième isoforme de CHP, CHP2, a été découverte (293). Cette isoforme partage 61% d'identité avec CHP1 et présente la particularité de se lier plus fortement à NHE1 que CHP1. Les cellules PS120 transfectées exprimant NHE1 et CHP2 ont un pHi plus élevé (7.4-7.5) que les cellules transfectées avec NHE1 et CHP1 ou NHE1 seul. En outre, un traitement au sérum n'alcalinise pas davantage le cytoplasme des cotransfectants NHE1-CHP2 (contrairement à NHE1-CHP1). De plus, ces cellules résistent à une déprivation prolongée en sérum du milieu de culture. CHP2 semble ainsi protéger la cellule contre une absence de sérum en augmentant le pHi via l'activation de NHE1 à un pHi plus élevé.

2.4.1.3.4 Autres facteurs liant NHE1

A part NHE-RF, CHP et p90^{RSK}, NHE1 se lie à au moins quatre autres protéines régulatrices.

En effet, en observant que NHE1 se lie à p90^{RSK} dépendamment de la phosphorylation de sa sérine 703 (354) et que cette sérine fait aussi partie d'une séquence consensus (RSXSXP) pour la liaison de la protéine 14-3-3, l'équipe de Berk (232) a montré que la liaison de cette protéine nécessite la phosphorylation de la sérine 703 de NHE1. Une fois liée, la protéine 14-3-3 protège NHE1 des phosphatases ce qui prolongent ainsi l'état activé de NHE1. De plus, l'inhibition de MEK1 empêche complètement la liaison de la protéine 14-3-3 à NHE1 dans des cellules traitées par du sérum. Cette observation est en accord avec la nécessité que la sérine 703 soit phosphorylée par la p90^{RSK} (354) pour que 14-3-3 se lie à NHE1.

L'équipe de Dedio, quant à elle, a isolé par la technique du double hybride de levure la tescalcine et a montré qu'elle est une autre protéine régulatrice de NHE1 (244). La tescalcine appartient à une famille de protéines présentant une certaine homologie avec la calcineurine et les CHP. Tous les membres de cette famille possèdent au moins un motif EF de haute affinité pour le Ca²⁺ et leur activité est régulée par le Ca²⁺. Il n'est pas encore connu si la tescalcine et CHP se lient au même domaine.

Par cette même technique du double hybride, une association entre NHE1 et NIK (*Nck Interacting Kinase*) a été mise en évidence (408). NIK est donc une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle directement NHE1 dans le domaine cytoplasmique. Son domaine de liaison est situé entre les acides aminés 538 à 638 de NHE1 alors que son site de phosphorylation est localisé en aval du résidu 638. L'expression d'une forme inactive de NIK bloque l'activation de NHE1 par le PDGF (408).

En 1998, Tominaga *et al.* ont identifié p160^{ROCK} (*Rho Associated Kinase*) comme agent régulateur de NHE1 (359). La protéine RhoA est connue pour son rôle dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (162, 309, 313). De plus, RhoA stimule l'activité de NHE1 et agit comme médiateur de l'activation de NHE1 par l'acide lysophosphatidique (LPA) et la GTPase G α 13. Enfin, l'activité de NHE1 est nécessaire à la réorganisation du cytosquelette induite par rhoA (157, 371). La p160^{ROCK}, une kinase à résidus sérine/thréonine, médie l'assemblage des

points focaux et des fibres de stress induit par RhoA (168). Cette kinase agit en permettant la phosphorylation de la chaîne légère de myosine par l'inhibition de la myosine phosphatase ou par la phosphorylation directe de la chaîne légère de myosine (15, 191). Tominaga *et al.* ont démontré que p160^{ROCK} phosphoryle directement NHE1 et l'inhibition de NHE1 empêche p160^{ROCK} d'induire des fibres de stress.

L'ensemble des interactions présentées dans cette section est résumé par la Figure 2, ci-dessous.

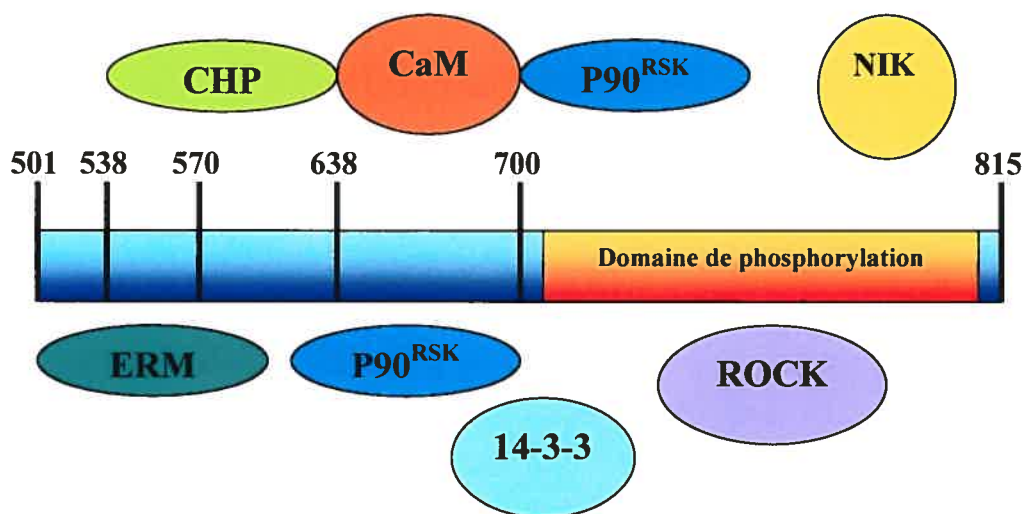


Figure 2 : Positions des sites d'interaction des différentes protéines régulatrices sur le domaine cytoplasmique de NHE1 (adapté de la référence (306))

2.4.2 Régulation à long terme

En plus de la régulation rapide décrite ci-dessus, l'échangeur Na^+/H^+ dispose d'un mécanisme de régulation à long terme. Ce type de régulation intervient au niveau de la transcription, de la traduction et des modifications post-traductionnelles. Quelques stimuli ont été reliés à une telle régulation : acidose prolongée, traitement aux glucocorticoïdes, aux hormones thyroïdiennes, etc.

2.4.2.1 Acidose prolongée

L'exposition prolongée de cellules épithéliales rénales à un milieu acide provoque une augmentation de l'activité et de la quantité d'ARNm de NHE1 et de NHE3 (17, 158-160, 164, 209, 259, 307) mais pas de NHE2 (345). Toutefois, l'activité et la quantité d'ARNm de NHE1 sont diminuées lorsque les cellules NIH/3T3 sont exposées à de telles conditions expérimentales (259). Horie *et al.* ont montré que l'augmentation de la quantité d'ARNm de NHE1 en réponse à une acidose prolongée est reliée à l'activité des PKC (158, 159). En outre, l'expression des facteurs de transcription c-fos et c-jun, ainsi que l'activité de AP-1 (*Activator Protein 1*), augmentent lors d'une acidose (159). L'analyse du promoteur du NHE1 humain révèle l'existence de trois sites AP-1, d'un site AP-3, d'un site CREB (*cAMP responsive element binding protein*), et d'un site NFY (*Nuclear Factor Y*) (205, 255). Plus récemment, le groupe de Madias a montré que la protéine C/EBP (*CAAT-Enhancer Binding Protein*) est impliquée dans la régulation de la transcription du gène NHE1 dans le muscle lisse vasculaire (204). Dans le cas de NHE3, l'augmentation de l'ARNm semble être reliée à une activité de type tyrosine kinase étant donné que l'herbimycine A, un inhibiteur à large spectre, empêche cette augmentation en réponse à un traitement acide alors que l'inhibition de l'activité PKA/PKC n'a, pour sa part, aucun effet (407). Ceci suggère donc que l'activité tyrosine kinase agit sur l'expression de NHE1 via une autre voie que celle des PKC. De plus, la surexpression de Csk (*C-terminal Src Kinase*), un inhibiteur physiologique des Src non récepteurs, inhibe aussi l'activation de NHE3 induite par l'acidose. Ceci suggère que Src joue un rôle important dans cette activation (407). Ainsi donc, la

régulation de NHE en réponse à une acidose est complexe et implique des voies de signalisation différentes dépendamment de l'isoforme de NHE et du type cellulaire.

2.4.2.2 Glucocorticoïdes

L'administration de glucocorticoïdes à un animal provoque une augmentation de la sécrétion de protons par le tubule proximal (34), ainsi que de l'activité de NHE apical (192). Dans les cellules OKP, l'effet des glucocorticoïdes sur l'activité de NHE3 est visible en quatre heures (32). Dans ces mêmes cellules, le dexaméthasone augmente la quantité d'ARNm de NHE3 (par augmentation de la transcription) parallèlement à une augmentation de son activité (30). Toutefois, dans le tubule en suspension, trois heures d'incubation avec le dexaméthasone n'augmentent pas la quantité d'ARNm de NHE3 bien que son activité soit stimulée (33), ce qui suggère qu'il existe d'autres niveaux de régulation par les glucocorticoïdes. Contrairement à NHE3, les glucocorticoïdes sont sans effets sur les niveaux d'ARNm de NHE1 et NHE2 (33, 69, 414). Ces résultats suggèrent donc NHE3 comme cible potentielle des glucocorticoïdes; toutefois les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus bien qu'une régulation au niveau transcriptionnel soit très probable. Très récemment, Yun *et al.* ont montré que la régulation de NHE3 par les glucocorticoïdes nécessite la présence de NHERF2 (et pas NHERF1) qui est activé par une kinase nommée SGK1 (*Serum and Glucocorticoids inducible Kinase-1*) (413).

2.4.2.3 Autres stimuli

En dehors de l'acidose et des glucocorticoïdes, plusieurs facteurs ont été identifiés comme régulateurs à long terme de NHE. Les facteurs de croissance tels que le PDGF et le FGF, ainsi que le sérum, augmentent la quantité d'ARNm de NHE1 dans le muscle lisse vasculaire (310). Un milieu riche en glucose augmente aussi la quantité d'ARNm de NHE1 et ce, dépendamment de la PKC (404). L'acide rétinoïque, connu pour provoquer la différenciation des cellules neuronales, provoque une augmentation d'un facteur 10 de la transcription de NHE1 dans les cellules P19 (96). L'hyperthyroïdisme augmente l'ARNm de NHE3 mais pas de NHE1, NHE2 et NHE4 dans le cortex rénal de rat (26). Enfin, le stade développemental exerce également une influence sur le taux d'ARNm de NHE. En effet, le cortex rénal de rats néonataux présente un quart de l'ARNm de NHE3 retrouvé dans les rats adultes (31). À l'inverse, l'ARNm

de NHE1 dans le cœur de lapin foetal ou nouveau-né est environ deux fois plus élevé que chez l'adulte (68).

2.5 Inhibiteurs pharmacologiques

Il faut remonter à la fin des années 70 pour retrouver, dans la littérature, les premières indications d'un inhibiteur de l'échange Na^+/H^+ . En effet, les équipes de Thomas et de Epel ont rapporté que l'amiloride inhibait l'échange Na^+/H^+ respectivement dans le muscle de souris et dans l'œuf d'oursin (4, 179). Puis, en 1980, Kinsella *et al.* ont montré que l'amiloride inhibait l'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ dans des vésicules de microvilli rénales (196). Cette molécule était déjà connue pour son action sur le canal Na^+ de l'épithélium urinaire (200). Sa découverte est issue de l'effort de recherche d'agents diurétiques qui possèdent aussi bien des propriétés natriurétiques que antikaliurétiques (77, 79). L'amiloride (ou 3,5-diamino-6-chloro-N-(diaminométhylène) pyrazinecarboxamide) est formé d'un noyau pyrazinoylguanidine substitué en positions 3 et 5 par des groupements amine et, en position 6, par un groupement chlore (Figure 3, p.54). Depuis sa découverte, plus de 1000 analogues ont été synthétisés (77).

L'amiloride et ses analogues possèdent un groupement guanidinium dont la forme protonée est requise pour son action inhibitrice (39, 181, 226). Le pKa de l'amiloride est de 8.8 dans l'eau (199). En plus d'inhiber l'échangeur Na^+/H^+ , selon sa concentration, l'amiloride est également capable d'inhiber entre autres, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (IC_{50} de 1mM environ) (181), la pompe Na^+ , K^+ -ATPase (IC_{50} de plus de 3mM) (347, 422), les canaux Ca^{2+} de type L, N et T (IC_{50} de 90 μM pour le type L) (45, 103, 116, 350, 357), etc.

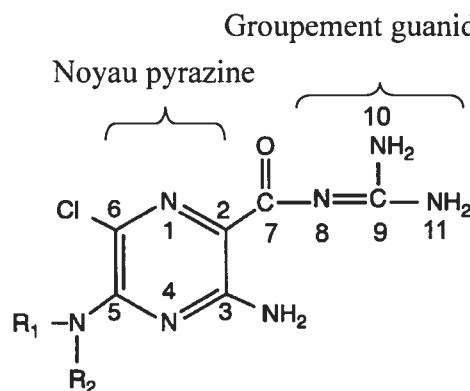


Figure 3 : Structure de l'hétéroaroylguanidine à cycle hexagonal. Dans le cas de l'amiloride R1=R2=H

Afin d'augmenter la puissance et la spécificité des inhibiteurs de NHE, plusieurs dérivés de l'amiloride ont été synthétisés en substituant divers groupements à la molécule d'amiloride initiale. NHE1 et NHE2 sont les isoformes les plus sensibles à l'amiloride et à ses dérivés tels que le DMA (diméthyl-amiloride), le HMA (hexaméthylène-amiloride) ou l'EIPA (éthyl-isopropyl-amiloride) tandis que NHE3 et NHE4 sont les plus résistantes (66, 71, 75, 284, 364, 368, 412). Ces trois derniers inhibiteurs résultent d'une double substitution du groupement amine porté par le noyau pyrazine et sont beaucoup plus efficaces que l'amiloride; c'est pourquoi ces inhibiteurs ont été très utilisés dans les études pharmacologiques des différents NHE. Selon le Tableau 3, nous pouvons observer que la séquence de sensibilité des différentes isoformes à l'ensemble des inhibiteurs est : NHE1>NHE2>NHE5>NHE3. Toutefois, la clonidine semble être plus efficace sur NHE2 que sur NHE1 et 3. NHE7, pour sa part, est insensible à l'amiloride (282). La cimétidine est connue en tant qu'antagoniste des récepteurs histaminiques de type II mais l'équipe de Leibach a démontré son action sur l'échangeur Na⁺/H⁺ en se basant sur le fait que la cimétidine et l'amiloride sont tous les deux des dérivées de la guanidine (115). En effet, c'est la présence du groupement guanidinium (ou guanidine) (Figure 3) dans les inhibiteurs de NHE qui est essentiel au pouvoir inhibiteur. Frelin *et al.* ont montré que la récupération du pHi suite à une charge acide est bloquée par l'ion guanidinium (108).

Inhibiteur	IC ₅₀ (μM)					
	NHE1	NHE2	NHE3	NHE4	NHE5	NHE7
Amiloride	1.6 (rat) 1 (lapin) 3 (humain)	1.4 (rat) 1 (lapin)	100 (rat) 39 (lapin) 49 (humain)	813 (rat)	21 (humain)	>2mM (humain)
EIPA	0.01 (rat) 0.02 (lapin) 0.02 (humain)	0.08 (rat) 1 (lapin)	2.4 (rat) 8 (lapin) 6.6 (humain)		1.53 (rat)	
HMA	0.013 (rat)		2.4 (rat)		0.37 (humain)	
DMA	0.02 (rat) 0.1 (humain)	0.25 (rat)	14 (rat)			
HOE694	0.16 (humain)	5 (lapin)	650 (rat)		9.1	
Cariporide	0.08 (humain)		1 (humain)	545		
Zoniporide	0.014 (humain)	12	>500 (rat)			
Sabiporide	0.05	3	>1mM			
Harmaline	140 (rat)	330 (rat)	1mM (rat)		940	
Cimétidine	26 (rat) 28 (humain)	330 (rat)	6.2mM (rat)		>1mM (rat)	
Clonidine	210 (rat)	42 (rat)	620 (rat)			

Tableau 3 : Compilation des constantes d'inhibitions des différentes isoformes de NHE par divers inhibiteurs. Les valeurs sont exprimées en μM sauf indication contraire. Tiré des références (23, 66, 67, 144, 282, 284, 286, 351, 366, 412)

De plus, ces auteurs montrent que l'efficacité d'inhibition varie en fonction de la substitution du noyau pyrazine. C'est sur cette particularité que se sont basées les recherches concernant la synthèse d'inhibiteurs plus puissants et plus spécifiques. En fait, en 1969, Paolini a suggéré que l'ion Na⁺, en solution aqueuse, est entouré de trois molécules d'eau formant un triangle autour du Na⁺ et que cette conformation ressemble à celle de l'ion guanidinium (294). Finalement, au début des années 80, Natochin, en redécouvrant cette étude alors qu'il travaillait sur le canal Na⁺ épithélial (EnaC), a émis l'hypothèse que c'est le groupement guanidinium et non le noyau pyrazine de l'amiloride qui est responsable de son pouvoir inhibiteur (274). Ceci est par ailleurs appuyé par le fait que le pouvoir inhibiteur de l'amiloride est diminué par de hautes concentrations de Na⁺. En 1984, l'équipe de Lazdunski et celle de Cassel ont entrepris une large étude des analogues de l'amiloride et, sur la soixantaine de molécules synthétisées et testées, l'EIPA est celle qui avait le plus d'efficacité (K_{0.5} de 0.05 vs. 7μM pour l'amiloride) (372, 422). Toutefois, ces molécules se sont révélées peu intéressantes du point de vue clinique étant donnés les effets secondaires qu'elles provoquent (199). Plus tard, le composé HOE694 a été découvert

comme étant un inhibiteur très sélectif de NHE1 présentant un effet cardioprotecteur intéressant lors des syndromes d'ischémie-reperfusion (329), bien qu'il soit légèrement moins actif que l'EIPA. Toutefois, il a été observé que le HOE694 formait des cristaux dans les glomérules et provoquait ainsi une inflammation rénale. Cette observation a conduit à la synthèse du composé HOE642 (cariporide), une molécule structurellement proche du HOE694 qui ne semble pas présenter ces effets secondaires (328). Pour cette raison, le HOE642 a été choisi pour une investigation clinique à grande échelle. Ces deux dernières molécules voient leur noyau pyrazine remplacé par un noyau benzénique substitué en position 3 par un groupement méthylsulfonyl et, en position 4, par un groupement piperidine dans le cas de HOE694 ou par un groupement diméthyl dans le cas de HOE642 (Figure 4). De plus, ces molécules, tout comme l'éniporide (35) ou le BIIB-513 (141) ne présentent plus d'action non spécifique sur l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou sur le canal Na^+ .

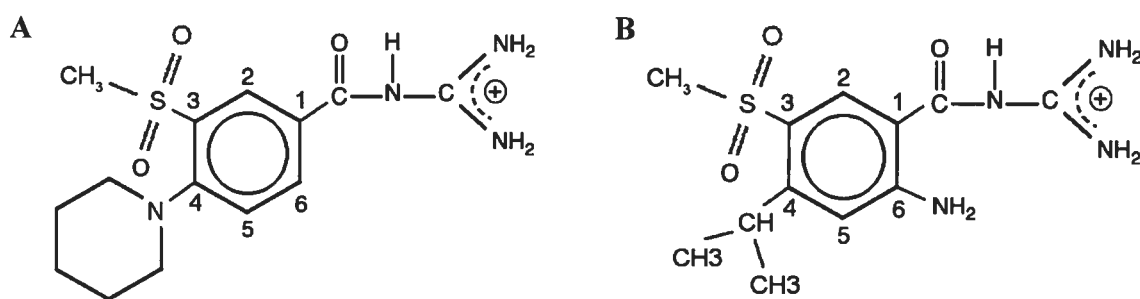


Figure 4 : Structure des composés HOE694 (A) et HOE642 (cariporide) (B)

Les inhibiteurs de l'échangeurs Na^+/H^+ sont à présent divisés en cinq classes selon leur structure :

1. Les aroylguanidines

Cette classe est caractérisée par un groupement aryl tel que le phényl relié au groupement guanidinium par un groupement carbonyle. On retrouve dans cette classe le HOE694 et le HOE642.

2. Les hétéroaroylguanidines

Dans cette classe, le groupement guanidine est relié à un cycle hétéroaromatique via un groupement carbonyle. On y retrouve deux sous-classes.

2.1 – Les hétéroaroylguanidines à cycle hexagonal

On retrouve dans cette sous-classe l'amiloride et ses dérivés qui se distinguent par un cycle pyrazine.

2.2 – Les hétéroaroylguanidines à cycle pentagonal

C'est la sous-classe des pyrrazoloylguanidines tel que le zoniporide (144) qui présente une très bonne sélectivité envers les NHE1, -2 et -3 avec des IC_{50} respectives de 0.06, 120 et 700 μ M. On y retrouve aussi les indoloylguanidines comme le composé SM-20220 qui inhibe NHE1 avec un IC_{50} de 5nM dans les neurones en culture et 20nM dans les cellules gliales (218).

3. Les aroylguanidines à « spacer »

Ces inhibiteurs sont caractérisés par un groupement aryl relié au carbonylguanidine par un *bras* de longueur et de nature variables. Ce bras peut être un groupement méthylène ou encore un cycle, comme par exemple dans le cas des cinnamoylguanidines et plus particulièrement des indenoylguanidines qui ont un effet inhibiteur sur les échangeurs Na^+/H^+ (229). Si ce bras est un groupement cyclopropane, on obtient alors une molécule de type arylcyclopropanecarboxylguanidine à haut potentiel inhibiteur (3). C'est le cas du composé BMS-284640 qui présente des IC_{50} respectifs de 0.09, 1.8, >30 et 3.36 μ M pour NHE1, -2, -3 et -5 (3). De façon intéressante, on trouve dans cette catégorie, quelques molécules comme le S1611, un inhibiteur de type 1,2-bis(méthacryloyl), caractérisé par son efficacité plus grande sur NHE3 que sur NHE2 et NHE1 (IC_{50} : 0.69, 89 et 4.70 μ M respectivement) (229).

4. Les guanidines non-acyl

Ces molécules sont constituées par un cycle penta ou hexagonal relié au groupement guanidine sans l'intermédiaire d'un groupement carbonyle. Le T-162559 présente un IC_{50} de 14nM dans les plaquettes sanguines de rat (112).

5. Les inhibiteurs non guanidiques

Les inhibiteurs de cette classe sont relativement peu nombreux. On y retrouve le SL59.1227, un agent assez discriminant pour NHE1 et NHE2 (IC_{50} respectifs de 3.3nM et

2.3 μ M) (241), ainsi que la squalamine qui n'est active que sur NHE3 mais probablement par un mécanisme intracellulaire (7).

On peut donc remarquer que 4 des 5 groupes ci-dessus présentent un groupement guanidine, ce qui montre l'importance de ce groupement dans l'activité inhibitrice de la molécule. D'ailleurs, l'efficacité des inhibiteurs de NHE est reliée non seulement à leur structure mais également au degré d'ionisation de leur groupement guanidine. À pH 7.4, les groupements acylguanidine de l'amiloride (pKa=8.78) et aminoguanidine du TY-162559 (pKa=8.4) sont protonés et peuvent interagir avec NHE (6, 112). Cela a aussi une incidence sur l'aspect thérapeutique : durant l'ischémie, le pH descend à 6.2. Dans ces conditions, le cariporide ou le zoniporide (pKa respectifs de 6.28 et 7.2) sont chargés positivement et donc plus efficaces (6, 144).

2.6 Paramètres cinétiques et sélectivité des échangeurs Na⁺/H⁺

Depuis la mise en évidence d'un système d'échange Na⁺/H⁺ dans les vésicules de membranes de bordure en brosse de reins et d'intestins par Murer et coll. (269), de nombreuses études ont été menées pour caractériser son mécanisme de fonctionnement. Ces recherches ont alors permis d'établir que ce transporteur, plus tard identifié comme étant NHE3, possède un seul site de liaison extracellulaire aux cations, présente une sélectivité aux ions telle que H⁺>>Li⁺>NH₄⁺>Na⁺>>K⁺ (22, 109, 134, 314, 373), et démontre une affinité pour le Na⁺ (K_{mNa+}) variant de 3 à 50mM. Ces valeurs sont bien inférieures à la concentration en Na⁺ extracellulaire (19). Par conséquent, ce NHE est saturé dans les conditions physiologiques. L'activation par les protons suit une courbe sigmoïdale dont la pente atteint son maximum à des pH inférieurs à 7. De plus, il a été suggéré que ce NHE possède un site senseur de H⁺ dont la protonation provoque l'activation de NHE. En outre, il a aussi été montré que ce NHE est capable de plusieurs modes d'échange : Na⁺ pour H⁺, H⁺ pour Na⁺, Na⁺ pour Na⁺, Na⁺ pour Li⁺...(19).

2.6.1 Électroneutralité

L'électroneutralité de l'échange Na^+/H^+ a été montrée en utilisant plusieurs approches expérimentales. La première méthode a consisté à mesurer le flux de Na^+ et à le comparer au flux de H^+ dans l'autre direction. Dans ce cas, le ratio Na^+/H^+ variait entre 0.6 et 1.2, donc peu différent de 1 (56, 63, 134, 179, 211, 261). La seconde méthode a consisté en la mesure de la différence de potentiel membranaire induite par un mouvement net de charges. Cette méthode très sensible a permis de confirmer que l'activité d'échange est électriquement neutre et, donc, que la stœchiométrie de cet échange est de 1 :1 (1, 5, 53, 63, 85, 131, 134, 262, 264, 373). Finalement, l'électroneutralité de l'échange Na^+/H^+ peut être testée en faisant varier le potentiel membranaire. L'utilisation de cette méthode n'a montré aucun effet sur l'activité d'échange Na^+/H^+ (63, 194, 196, 201, 223, 264, 269, 314, 315, 402).

2.6.2 Affinité pour le Na^+

Le clonage des différentes isoformes de NHE a permis de caractériser les propriétés cinétiques de la plupart de celles-ci. Les mesures de l'affinité pour le Na^+ de NHE1 peuvent varier de 4.7mM (284) à 13.9mM (72) chez le rat et de 23mM (360) à 136mM (386) chez l'humain. Ces deux dernières valeurs ont été déterminées par deux méthodes différentes, ce qui pourrait rendre compte de leur disparité. Par ailleurs, NHE2 et NHE3 présentent des $K_{m\text{Na}^+}$ variant respectivement de 14.4 à 50mM (156, 412, 416) et de 10 à 17mM (233, 284). Le transport de sodium par les différentes isoformes suit une cinétique michaelienne (233, 284, 412), ce qui suggère la présence d'un site unique de liaison pour le Na^+ . NHE4, quant à lui, semble posséder deux sites de liaisons externes aux cations (51).

2.6.3 Affinité pour les protons

Avant le clonage de NHE1, il était déjà connu que l'acidification intracellulaire stimule l'activité d'échange Na^+/H^+ (1, 4, 56, 109, 134, 261, 263). Cet effet est du à une augmentation du V_{max} sans changement du K_m pour le Na^+ externe (142). Le pK de NHE1 pour les H^+ intracellulaires a été déterminé et se situe entre 6.43 et 7, dépendamment de l'origine cellulaire (233, 284, 355). Des pK respectifs de 6.85 pour NHE2 (233) et de 6,45 à 7.1 pour NHE3 (233,

284, 381) ont été établis ultérieurement. Contrairement à ce qui a été observé pour le site externe de liaison au Na^+ , le transport des protons ne suit pas une cinétique michaelienne simple (21, 56, 134), ce qui suggèrent l'existence de deux sites de liaison pour les H^+ dont l'un servirait au transport et l'autre serait responsable d'une activation allostérique (21). Au niveau moléculaire, ces deux sites sont encore assez mal connus. Wakabayashi *et al.* ont montré que le domaine transmembranaire contient le senseur à H^+ alors que le domaine C-terminal a pour rôle de moduler le pH_i d'activation de NHE1 (378). Récemment, le même auteur a mis en évidence la présence de ces deux sites de liaisons. En effet, l'efflux de $^{22}\text{Na}^+$ par NHE1 est considérablement stimulé par une acidification intracellulaire et est inhibé par une modeste alcalinisation (379). En outre, une modélisation de la séquence de liaison des ions au NHE1 est proposée (Figure 5).

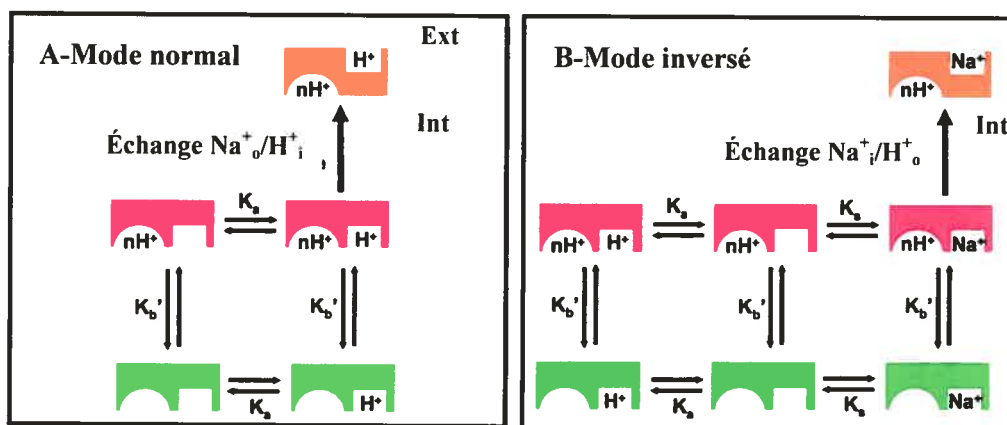


Figure 5 : Schématisation de la liaison des ions Na^+ et H^+ sur NHE1. Le site senseur de protons et le site de transport des H^+ sont représentés par une cavité respectivement circulaire ou rectangulaire. Dans le mode normal de transport (A), les deux sites doivent être occupés par des protons afin de permettre l'échange Na^+/H^+ . Dans le mode inverse de transport (B), le site senseur de protons doit être occupé par un H^+ tandis que le site de transport peut accueillir un Na^+ et ainsi initier l'échange de Na^+/H^+ .

2.6.4 Inhibiteurs et Na^+

La localisation des sites de liaison des inhibiteurs et du Na^+ l'un par rapport à l'autre est encore un sujet controversé. Du fait que l'ion Na^+ hydraté et le groupement guanidium se ressemblent en forme et en taille (294), il est tout à fait envisageable que ces deux molécules soient en compétition pour le même site. De plus, l'inhibition par les dérivés de l'amiloride, la cimétidine et le HOE694, est réduite par des concentrations croissantes de Na^+ , ce qui suggère que ces inhibiteurs se lient au même site que le Na^+ ou dans son immédiate proximité (19, 75).

Toutefois, d'autres études ont plutôt suggéré que les deux sites sont bien distincts (106, 172). Dans le même ordre d'idée, les études combinant la mutagenèse et la construction de chimères à l'analyse du transport de Na^+ par les protéines exprimées dans les systèmes hétérologues ont montré que le site d'interaction des inhibiteurs peut être perturbé sans affecter l'affinité pour le Na^+ (71, 286, 386). Plus récemment, Touret *et al.* ont démontré que la mutation Phe₁₆₂Ser diminue l'affinité de NHE1 pour le cariporide et le Na^+ (360). Les auteurs suggèrent donc que les deux sites d'interaction sont les mêmes. Toutefois, un mutant qualifié de révertant et possédant cette même mutation en plus de Ile₁₆₉Ser ou Ile₁₇₀Thr présente une affinité pour le Na^+ équivalente au NHE1 de type sauvage mais reste toujours très résistant à l'inhibition par le cariporide. Ces observations semblent plutôt supposer que les deux sites sont distincts. De même, l'utilisation d'analogues radiomarqués de l'amiloride pour quantifier la liaison des inhibiteurs sur NHE avec ou sans Na^+ a montré que la présence de cet ion ne perturbe pas la liaison des inhibiteurs (78). Ces résultats contradictoires rendent donc l'analyse difficile.

2.7 Éléments de structure des échangeurs Na^+/H^+

Alors que l'existence d'un système d'échange Na^+/H^+ était connue depuis le milieu des années 70, ce n'est qu'à la fin des années 80 que le premier échangeur Na^+/H^+ a été cloné par l'équipe de Pouysségur (324). De la séquence d'ADN obtenue, les auteurs ont pu en déduire la séquence en acides aminés de la protéine et, aussi, en utilisant un algorithme mathématique, la topologie probable de ce transporteur dans la membrane lipidique. Depuis lors, l'échangeur Na^+/H^+ a fait l'objet de nombreuses études afin d'essayer de comprendre sa structure et d'identifier les sites importants pour sa fonction et son interaction avec les inhibiteurs pharmacologiques. Cette section a pour but de faire le point sur ce qui est connu de la structure de l'échangeur Na^+/H^+ et, plus particulièrement, de NHE1.

2.7.1 Difficultés d'étude de la structure des transporteurs membranaires

Le chercheur qui s'intéresse à la structure moléculaire d'une protéine ne dispose que de peu d'outils présentant chacun leurs avantages mais, aussi, leurs inconvénients qui peuvent être rédhibitoires. La technique actuelle la plus précise au niveau de la résolution est la cristallographie par rayons X. Près de 85% des structures protéiques répertoriées dans la *Protein*

Data Bank (PDB) ont été résolues grâce à cette technique, ce qui représente environ 30000 structures. Comme son nom l'indique, cette méthode exige la préparation d'un cristal pur de la protéine à étudier. Cette étape est généralement difficile à compléter, c'est pourquoi on considère souvent la cristallographie comme un art plus qu'une science. Cette technique exige en outre l'utilisation de métaux lourds, donc riches en électrons, dont le but est de délimiter les domaines structuraux du cristal. Là encore, cette étape est fastidieuse car les nombreux réactifs utilisés par les chimistes ont peu d'affinité pour les dits domaines. Comme mentionnée plus haut, cette technique reste très séduisante car c'est celle qui présente le plus grand pouvoir de résolution et donc le plus grand pouvoir « grossissant ». En effet, la longueur d'onde des rayons X n'est que de 0.1 à 0.2 nanomètre, donc assez courte pour « distinguer » les atomes du cristal. Il ne s'agit pas d'une visualisation directe comme à l'aide d'un microscope : lorsque le cristal est frappé par les rayons X, ces derniers sont réfractés selon la position des atomes et viennent rencontrer un film photographique. Une fois développé, ce film présente une multitude de taches dont les positions sont soumises à un programme informatique capable de convertir ce diffractogramme en une structure moléculaire de la protéine. La qualité de la structure obtenue dépend largement de la qualité de la préparation qui est en général fonction de la taille et du type de protéine. Les protéines membranaires, possédant de larges domaines hydrophobes, sont plus difficiles à cristalliser que les protéines globulaires car elles nécessitent souvent l'ajout de détergents. Ceux-ci permettent de les stabiliser en solution mais interfèrent toutefois avec la formation du cristal. De plus, rien ne permet d'assurer que la conformation obtenue de la protéine est effectivement celle qu'on retrouverait dans son environnement normal. En fait, le profil obtenu est la moyenne des conformations présentes dans le cristal et les sites à haute mobilité sont souvent difficiles à modéliser. Enfin, cette méthode ne permet pas de situer les atomes d'hydrogène. Compte-tenu de toutes ces exigences, on comprend mieux pourquoi l'échangeur Na^+/H^+ , une protéine membranaire de plus de 800 acides aminés, n'a pas encore été cristallisée. Néanmoins, une structure du NHE d'*E.coli*, NhaA (384 acides aminés), a quand même été proposée à deux reprises. La première par cryo-microscopie à une résolution de 7 à 14 Å (405). Cette résolution, assez grossière, permet surtout de visualiser l'organisation générale de la protéine. La deuxième, plus récemment, a été déterminée par diffraction aux rayons X à une résolution de 3.5 Å (163). Cette structure sera discutée plus en détail à la section 2.7.4.4.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est l'autre grande approche utilisée pour établir la structure moléculaire d'une protéine (environ 15% des structures répertoriées dans PDB ont été résolues par RMN). Cette technique consiste à appliquer un champ magnétique à une protéine en solution et à mesurer la résonance des atomes de la protéine à étudier. Comme la réponse d'un atome donné subit l'influence des atomes adjacents, les acides aminés sont d'autant plus perturbés qu'ils sont proches. L'intensité de cette perturbation permet de déduire la distance entre chaque résidu et, donc, d'établir un modèle tridimensionnel de la protéine. Cette méthode n'utilise pas de cristaux, ce qui la rend plus facile d'emploi. Toutefois, elle est restreinte à l'étude de protéines de petite taille, ou de domaines d'une protéine (moins de 200 résidus). Son pouvoir de résolution est le même que celui de la diffraction aux rayons X, soit de l'ordre de 2 Å. En outre, cette technique permet de modéliser des protéines actives en apportant des informations quant à leur flexibilité et leur dynamique moléculaire.

Finalement, la troisième approche permettant de caractériser des domaines fonctionnels d'une protéine implique la mutagenèse ou la construction de chimères. Qu'elle soit aléatoire par l'utilisation d'agents mutagènes ou dirigée par l'utilisation de la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la mutagenèse permet de remplacer certains acides aminés par d'autres pour en analyser les effets sur les fonctions de la protéine étudiée. La construction de chimères quant à elle, consiste à construire une protéine artificielle contenant des fragments polypeptidiques caractéristiques de différents membres d'une même famille de protéines. Ces approches ont été utilisées avec succès dans le cas de l'échangeur Na^+/H^+ issu d'organismes supérieurs pour lequel il n'existe encore aucune structure cristalline à haute résolution. Toutefois, récemment, la structure de l'échangeur Na^+/H^+ NhaA de la bactérie *E. coli* a été déterminée avec une résolution de 3.5Å (163). Étant donné la faible homologie de séquence entre NhaA et les NHE, il est difficile d'extrapoler une structure fine de NHE en fonction de celle de NhaA. Toutefois des analogies peuvent être observées sur la base de certains résidus ou de structures invariables (voir section 10 de la discussion, p.184).

2.7.2 NHE et les autres familles de transporteurs ioniques

Hormis l'échangeur Na^+/H^+ , il existe plusieurs systèmes transportant le Na^+ : les canaux sodiques épithéliaux ou non, les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dépendant du

Na^+ . Cette section est dédiée à une description sommaire de la structure de quelques transporteurs de Na^+ . De plus, la structure des canaux Ca^{2+} qui partagent des similarités avec les canaux K^+ et Na^+ voltage dépendant sera aussi brièvement abordée.

2.7.2.1 Les canaux ioniques

Les canaux sont divisés en deux grandes superfamilles : les canaux dépendants du voltage et les canaux dépendants d'un ligand. Dans les années 90, il a été établi que le pore des canaux Na^+ , Ca^{2+} et K^+ dépendant du voltage présentait des motifs structuraux communs. En effet, le pore de ces canaux est composé du segment M2 ou S6 de plusieurs sous-unités présentant deux hélices transmembranaires séparées par une boucle intramembranaire (appelée *P-loop*) qui contient le filtre de sélectivité. Le fait que beaucoup de canaux ayant des propriétés différentes présentent un repliement similaire est en accord avec l'idée que la structure, plus que la séquence, est importante pour comparer plusieurs protéines (419).

Les canaux ioniques Na^+ et Ca^{2+} sont composés de quatre sous-unités incluses dans une seule chaîne polypeptidique, chacune étant constituée des domaines transmembranaires S1, S2, S3 et S4, dans lequel est localisé le détecteur de voltage, et du pore (deux hélices transmembranaires S5 et S6 séparées par une boucle) (voir Figure 6, p.64). Le canal Na^+ épithélial, quant à lui, est composé de quatre sous-unités indépendantes. Chacune de ces sous-unités est formée de deux domaines transmembranaires M1 et M2 séparés par une large boucle extracellulaire.

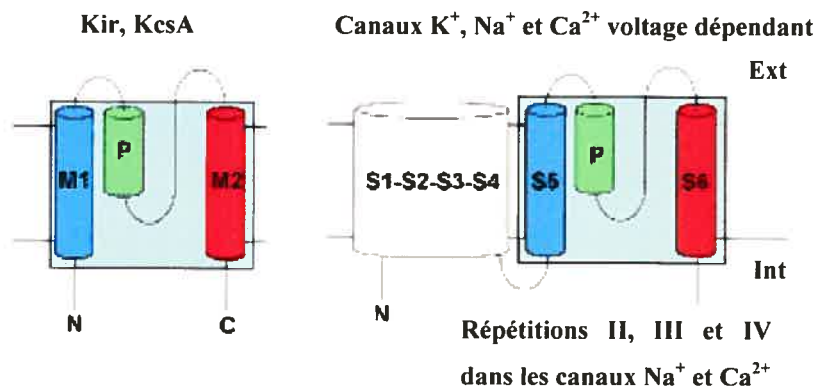


Figure 6 : Topologie membranaire des canaux K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Adapté de la référence (419).

Si la structure du canal K^+ bactérien Kcsa a été résolue (92), seule la topologie membranaire putative des canaux Na^+ et Ca^{2+} est connue à ce jour. Cette topologie a été par la suite consolidée par des études de structure-fonction qui ont permis d'identifier la position exacte dans la structure primaire, et parfois secondaire, des acides aminés importants dans la physiologie de ces canaux.

2.7.2.1.1 Les canaux Na^+ sensibles à l'amiloride

Les canaux Na^+ épithéliaux (ENaC pour *Epithelial Na^+ Channel*) sont des transporteurs hétéromultimériques composés par l'association de trois sous-unités α , β et γ . Les sous-unités α peuvent former seules des canaux mais pas les sous-unités β et γ ; celles-ci ont plutôt un rôle de régulation. Différentes combinaisons des trois sous-unités permettent une diversité fonctionnelle des canaux au niveau des cinétiques de transport, des sélectivités ioniques ou de la sensibilité à l'amiloride (113, 253). La comparaison des séquences des différents membres de la famille ENaC a révélé que le deuxième domaine transmembranaire M2 est extrêmement conservé ce qui suggère un rôle essentiel dans la physiologie de ce canal. De plus la mutation de tous les résidus de ce segment transmembranaire présente un effet sur la sensibilité à l'amiloride et la sélectivité ionique (184, 312, 326, 385), confirmant ainsi l'importance du domaine transmembranaire M2 des trois différentes sous-unités. Il a été aussi démontré que les résidus WYRFHY (278-283) de la sous-unité α font partie du site d'interaction de l'amiloride (169). La délétion de ces résidus a provoqué une augmentation du K_i de l'amiloride d'un facteur 160. Le segment M2 est aussi impliqué dans la sélectivité du canal étant donné que des mutations telles que S₅₃₉D dans la sous-unité α rend le canal perméable aux ions K^+ et Ca^{2+} (voir Figure 7, p.65) (184).

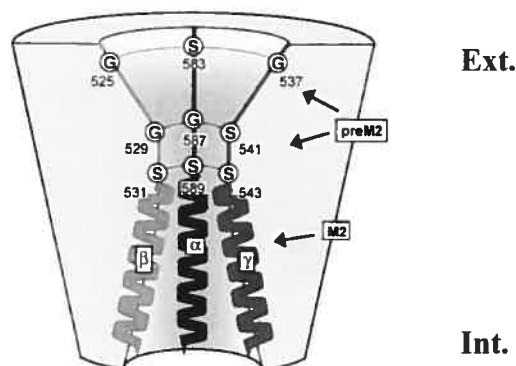


Figure 7 : Coupe du canal ENaC (adapté de la référence (185))

Le canal présente un pore étroit formé par le pré-M2 de chaque sous-unité et il est probable que le squelette de la chaîne peptidique fasse face à la lumière du pore plutôt que les chaînes latérales des acides aminés (185). Le radical guanidinium de l'amiloride peut accéder à l'entrée du canal et ainsi le bloquer tandis que le noyau pyrazine pourrait interagir avec le domaine extracellulaire (14). Il est intéressant de noter qu'aucun résidu chargé négativement ne participe à la coordination des ions dans le pore.

2.7.2.1.2 Le canal calcique

Les canaux calciques sont des transporteurs hétéromultimériques composés d'une sous-unité α_1 (formée de quatre domaines constitués chacun de 6 segments transmembranaire S1 à S6 et d'une boucle intramembranaire, appelée « P-loop » entre S5 et S6), à laquelle s'associe une combinaison variable des sous-unités β , $\alpha_2\delta$ et γ (voir Figure 8, p.66). Ces dernières sous-unités sont considérées comme des protéines régulatrices des canaux calciques.

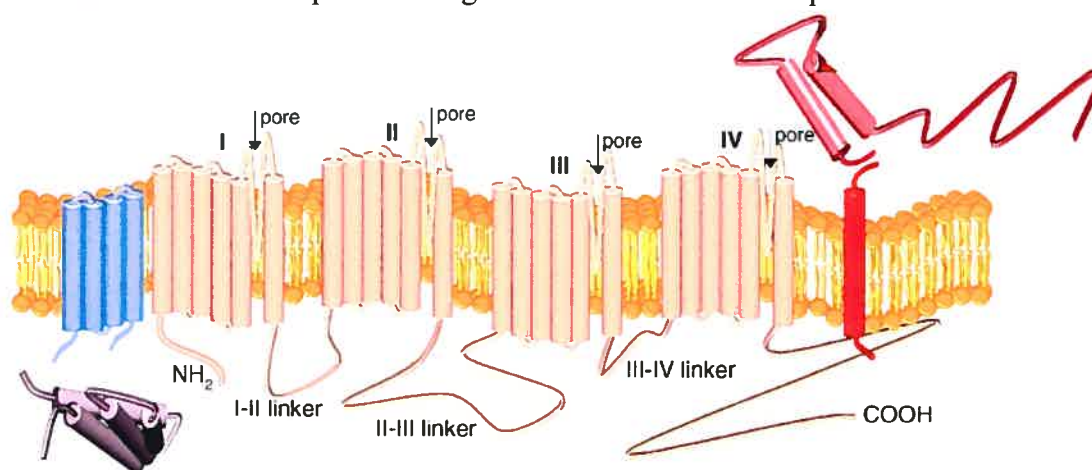


Figure 8 : Topologie du canal calcique. En rose : sous-unité α_1 , en violet : sous-unité β , en rose : sous-unité α_2 , en rouge : δ , en bleu : sous-unité γ (adapté de la référence (348))

Le filtre de sélectivité des canaux Ca^{2+} est composé de quatre résidus glutamate très conservés répartis dans les quatre « P-loop » (190, 254, 409). Deux modèles proposent de décrire la coordination des ions Ca^{2+} par le filtre de sélectivité : celui de Lipkind *et al.* dans lequel les quatre glutamates convergent vers l'axe du pore pour coordonner deux ions Ca^{2+} (238) et celui

de Zhorov *et al.* qui propose que les quatre glutamates se séparent en paires chacune coordonnant un ion Ca^{2+} (418). De façon intéressante, c'est cette dernière situation que l'on retrouve dans la pompe calcique de type SERCA 1a (361). Yang *et al.* ont montré que la contribution des quatre résidus glutamate n'est pas équivalente, la mutation du glutamate du domaine M3 en glutamine est plus dramatique sur l'interaction du Ca^{2+} que celle des domaines M4, M2 et M1 (409).

On retrouve dans le canal Na^+ un ensemble de quatre acides aminés, DEKA, situé à la même position que les quatre résidus glutamate du canal Ca^{2+} , constituant le filtre de sélectivité. La mutation des résidus lysine et alanine en glutamate confère au canal sodique mutant des propriétés similaires au canal Ca^{2+} (152).

2.7.2.1.3 L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) est un membre d'une importante superfamille de protéines membranaires caractérisée par la présence de séquences répétées homologues, très conservées parmi les NCX, à l'intérieur des domaines transmembranaires des protéines. Ces séquences, nommées répétitions α (α repeats), proviennent probablement d'une duplication génique et sont importantes pour la translocation des ions (276, 335). Les NCX sont constitués de neuf domaines transmembranaires et les répétitions α comprennent la moitié C-terminale du M2 jusqu'à une courte portion N-terminale du M3 (α -1) et de la moitié C-terminale du M7 jusqu'à la moitié de la boucle entre les M7 et 8 (α -2) (Figure 9, p.68). La mutation dans ces répétitions α des résidus Ser₁₀₉, Ser₁₁₀, Glu₁₁₃, Ser₁₃₉, Asn₁₄₃, Thr₈₁₀, Ser₈₁₁, Asp₈₁₄, Ser₈₁₈, et Ser₈₃₈ a pour conséquence d'inactiver l'échangeur et la mutation des résidus Thr₁₀₃, Gly₁₀₈, Pro₁₁₂, Glu₁₂₀, Gly₁₃₈, Gly₈₀₉, Gly₈₃₇ et Asn₈₄₂ provoque une diminution de l'activité d'échange (276). Ces résultats montrent donc l'importance des répétitions α dans l'activité de NCX1 mais aussi que les acides aminés impliqués ne sont pas forcément des résidus chargés négativement.

En dehors des répétitions α qui sont très conservées et qui sont retrouvées dans plusieurs protéines, très peu de similarité existe entre la séquence des NCX et celles d'autres protéines. Ainsi, il n'est pas possible d'étendre aux NCX les connaissances de la structure-fonction d'autres transporteurs dont la structure aurait été résolue.

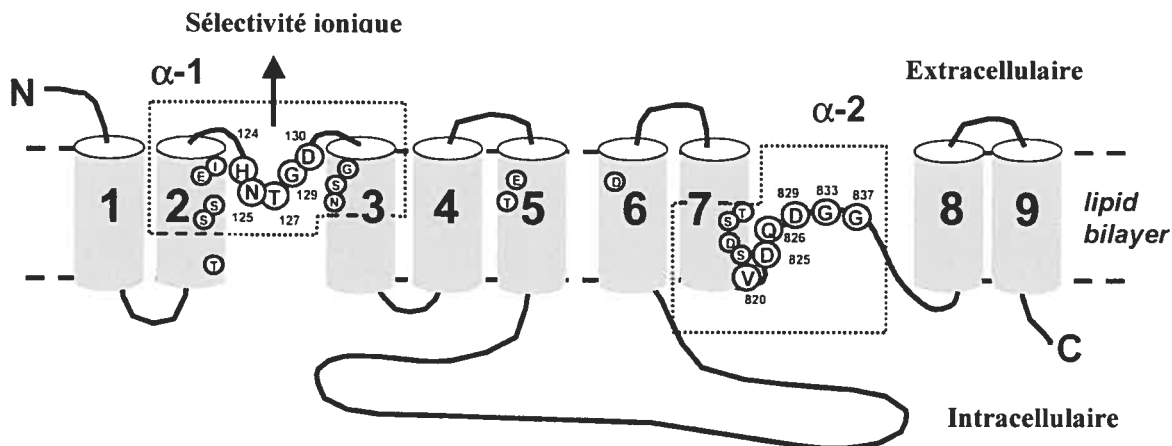


Figure 9 : Topologie membranaire de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1. Les acides aminés importants pour la fonction du transporteur sont indiqués. Adapté de la référence (338).

2.7.2.1.4 Le canal K^+ KcsA

Le canal KcsA a été le premier canal K^+ dont la structure a été résolue (92). À ce titre, les informations obtenues de cette structure sont toujours utiles pour comprendre le fonctionnement de plusieurs canaux ioniques. Depuis cette première cristallisation, la structure de plusieurs autres canaux K^+ a été résolue (MthK (175), KvAP (177), KirBAC (216)) et la résolution de la structure de KcsA a été améliorée (265, 420, 421).

Tel que mentionné plus haut, les canaux K^+ présentent une structure homologue à celle des canaux Ca^{2+} et Na^+ , c'est-à-dire une « P-loop » (qui comprend le filtre de sélectivité) comprise entre les deux domaines transmembranaires dans le cas de KcsA, Kir et MthK ou entre les deux derniers des six segments transmembranaires du canal K^+ voltage-dépendant (voir Figure 6, p.64). Le canal KcsA est composé de quatre sous-unités de 97 résidus (92). Le filtre de sélectivité est formé de la séquence TVGYG des quatre sous-unités. Les atomes d'oxygène du squelette peptidique de cette séquence définissent un tunnel qui interagit fortement avec les ions K^+ . La structure du filtre de sélectivité pourrait coordonner jusqu'à quatre ions K^+ . Un des aspects les plus intéressants de la structure de KcsA est l'orientation de l'hélice interne présente dans la boucle P. En effet, cette hélice est orientée vers le centre de la cavité du canal et pourrait stabiliser les ions K^+ de façon électrostatique lorsque le canal est fermée (Figure 10, p.69).

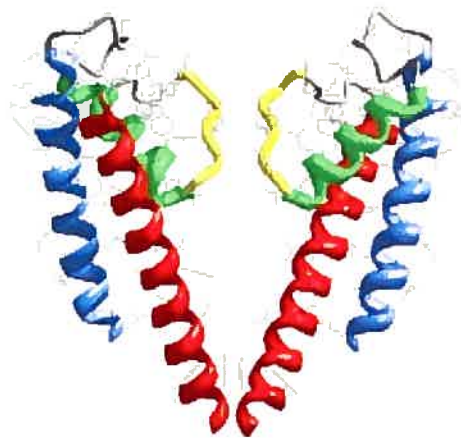


Figure 10 : Structure du canal KcsA. En bleu : hélice M1, en rouge : hélice M2, en jaune : filtre de sélectivité, en vert : hélice du pore. Seulement deux sous-unités sont représentées. Adapté de la référence (419).

Malheureusement, il existe très peu d'homologie entre ces différents canaux et échangeurs avec NHE. Il est donc impossible de prédire une structure en trois dimensions de l'échangeur Na^+/H^+ en réalisant une modélisation par homologie utilisant les structures connues d'autres transporteurs. Étant donné que sa fonction est très similaire à celle de NHE1, la structure de NhaA est certainement très proche de celle de NHE1, tout en étant significativement différente au point de vue structure primaire. Des informations très intéressantes peuvent être tirées des comparaisons et alignements des séquences de NhaA et NHE1 (voir section 7 de la discussion, p.184).

2.7.3 Les différents niveaux de structure des NHE

Comme n'importe quelle autre protéine, les NHE présentent plusieurs niveaux de structure : 1) la structure primaire constituée par la séquence en acides aminés, 2) la structure secondaire reflétant l'arrangement en hélices α ou feuillets β , 3) la structure tertiaire donnée par l'arrangement en trois dimensions des deux précédentes structures et, enfin, 4) la structure quaternaire ou organisation multimérique par association de plusieurs sous-unités identiques ou différentes.

2.7.3.1 Structure primaire

Tel que déjà mentionné à la section 2.1.2, NHE1 est composé de 815 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 90 kDa. L'analyse de la séquence révèle la présence de trois sites putatifs de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) en position 75, 370 et 410, de même que plusieurs sites possibles de O-glycosylation (agglomérations de résidus sérines et thréonines). Counillon *et al.* ont montré que NHE1 est N-glycosylé en Asn₇₅ et O-glycosylé sur une ou des positions inconnues (74). Par la mutation des sites de N-glycosylation un à un, deux à deux ou les trois à la fois, les auteurs ont montré que cette glycosylation n'est pas essentielle à la fonction de NHE1 (74, 148). NHE2 possède un site consensus de N-glycosylation en Asn₃₅₀ mais les études de digestions en présence d'endoglycosidases ont montré que cette isoforme est O-glycosylée mais non N-glycosylée (365). NHE3, pour sa part, possède le site Asn₃₇₀ mais les traitements aux endoglycosidases, neuraminidase et glycanase ont révélé que le NHE3 de rat n'est ni N-, ni O-glycosylé (74). Toutefois, des études ultérieures ont montré que, dans les cellules LLC-PK (lignée cellulaire issue de reins de porc), l'inhibition de la glycosylation par la tunicamycine diminue l'activité de NHE3 et bloque son transport à la membrane (346). Dans le même ordre d'idée, Bizal *et al.* ont montré que les NHE3 de rat et de chien ne sont pas glycosylés alors que le NHE3 de lapin l'est (49).

Une analyse de l'alignement des séquences protéiques des neuf isoformes de NHE (Figure 11) révèle que celles-ci se ressemblent le plus entre les résidus 162 et 500 (selon les coordonnées de NHE1), ce qui suggère *a priori* que cette zone est importante pour la fonction de l'échangeur Na⁺/H⁺. Ces acides aminés sont situés entre les domaines transmembranaires (M) 4 et 12 et certains des résidus les plus conservés ont fait l'objet d'études par mutagenèse dirigée comme nous le verrons aux sections 2.7.1.2 et 2.7.2.

M1

```

NHE1_humain MVLRSGLCGLSPHRFPPSLLVVVALVLLPVLFSSHLQLSPTASTIRSEPPRERSIGDV 60
NHE2_humain -----MEPLGNWRSLFAPLPPMLLLLLLVAEPVGGALAEITLLNAP-----RAMGTS 46
NHE3_humain -----MWGLGARGPFGLLLALALGS-----LALALALGS----- 21
NHE4_rat -----MGLPAMLRAFSSWKWLLLLMVL-----TCLEAS-----SYVNES 33
NHE5_humain -----MLPAALS-----LLALPLA----- 15
NHE6_humain --MARRGWRRAPLRGVSSSPARFLMPLWLLLAAGVFDWAGASD-GGGGEARAMDEEI 57
NHE7_humain --MEPGDAARPGSGFATGAPP-PPILLPLLLLGWGLRVAASASASSSGAAAEEDSSAMEEL 57
NHE8_humain -----MGEKMAEEEFPPNTTHEE----- 18
NHE9_humain --MER-----QSRV 7

```

M2

```

NHE1_humain TTAPPEVTPESRPVNHSVTDHGMKPRKAPVVLGIDYTHVRTPFEISLWILLACLMEIFGH 120
NHE2_humain SSPP--SPASVVAPGTTLFES-----RLPVFTLDYPHVQIPFEITLWILLASLAMIIGFH 99
NHE3_humain -----LARAGGVVEVPPGGAHGESGGQVVTTFWAHVQDPYVIALWILVASLAMIIGFH 73
NHE4_rat SSPTGQQTPDARFAASSSDPDE-----RISVVELDYDYVQIPYEVTLWILLASLAMIIGFH 88
NHE5_humain -----AAEPTQKPEESPGEPPGLELFRWQWHEVEAPYLVALWILVASLAMIIVFH 65
NHE6_humain VSEKQAEESHQRQDSANLLIFILLTTLTILTIWLFKRRARFLHETGLAMIVGLVGLVLE 117
NHE7_humain ATEKQAEESHQRQDSVSLTIFILLTTLTILTIWLFKRRVRFLHETGLAMIVGLVGLVLE 117
NHE8_humain -FNVTLHTTLVTTKLVLPKIPVQTEQAQQEEQSSGMTIFPSLLVLAITLILVH 77
NHE9_humain MSEKDEYQFQHQGAVLELVFNFLIILTILTIWLFKNHRFRFLHETGLAMIVGLVGLVLE 67

```

M3

```

NHE1_humain VIPTISSIVP-ESCLLIVVGLLVGGIIRGV-----ETPP 154
NHE2_humain LYHKLPTIIVP-ESCLLIMVGLLVGGIIFGVDE-----KSP 134
NHE3_humain LSHKVTSMVP-ESALLIVLGLVGGIVWAADH-----IASF 108
NHE4_rat LYHRLPHLMP-ESCLLIVGALVGSIIFGTHH-----KSP 123
NHE5_humain LSRKVTSLVP-ESCLLILGLVLSGGIVLAVAK-----KAEY 100
NHE6_humain YGIHVPSDWN-NVTLSCVQSSPTLLV----- 144
NHE7_humain YGTPATSGPD-KSLSCVQEDRAPSTLLVNVVSGKFFEYTLKGEISPGKINSVEQNDMLRKV 176
NHE8_humain LLIRYFLHFLPESVAVVSLGILMGAVIITIEFKKLAN-----WKEE 119
NHE9_humain YATAPTDIESGTVYDCVRLTFSPSTLLVNIIDQVVEYKYKREISQHNINPHQGNALIEKM 127

```

M4 **TM5**

```

NHE1_humain FLQSDVFFFLPPIILDAGYFLPLRQFTENLGTILIFAVVGTLWNAFFLGGMLMYAVCLV 214
NHE2_humain AMKTDVFFLYLLPPIVLDAGYFMPTRPFFENIGTIIFWYAVVGTLWNSIGIGVSLPGICQI 194
NHE3_humain TLTPTVFFFYLLPPIVLDAGYFMPNRLFFGNLGTILLYAVVGTVWNAATGSLSLYGVFLS 168
NHE4_rat VMDSSIYFLYLLPPIVLESGYFMPTRPFFENIGSILWVWAGLALINAFGIGLSLYFICQI 183
NHE5_humain QLEPGTFFFLPPIVLDAGYFMPTRPFFENIGSILWVWAGLALINAFGIGLSLYFICQI 160
NHE6_humain TFDPEVFFNILLPPIIFYAGSLIKRRHFRNLGSIILAYAFLGTATISCFVIGSIMYGCVTL 204
NHE7_humain TFDPEVFFNILLPPIIFHAGYSLIKRRHFRNLGSIILAYAFLGTAVSCFIIGNLMYGVVWKL 236
NHE8_humain MFRPNMFLLPPIIFESGYSLHKNFQNLGSIILFAVFGTATISAFVVGGLYIFLQQA 179
NHE9_humain TFDPEIFFNVLLPPIIFHAGYSLIKRRHFRNLGSIILYAFLGTATISCFVIGLIMYGVVKA 187

```

M6 **M7**

```

NHE1_humain G---GEQ-INNIGLLDNLFGSITSAVDPAVLAVFEEIHIINELLHILVFGESLLNDAVT 270
NHE2_humain E---AFG-LSDITLLCNLLFGSLTSAVDPAVLAVFENIHVNEQLYIIVFGESLLNDAVT 250
NHE3_humain G---LMG-DLQIGLLDFLLFGSLMAAVDPAVLAVFEEVHVNEVLFIIIVFGESLLNDAVT 224
NHE4_rat K---AFG-LGDINLLCNLLFGSLTSAVDPAVLAVFEEARVNEQLYMMIFGEALLNDGIS 239
NHE5_humain G---LVAPRVQAGLLDFLLFGSLTSAVDPAVLAVFEEVHVNETLFIIVFGESLLNDAVT 217
NHE6_humain MKVITGQLA-GDFYFTDCLLFGAIVSATDPVTVLAIFHELQVDVVELYALLFGESVLNDAVA 263
NHE7_humain MKIMGQLS-DKFFYYTDCFFFGAIVSATDPVTVLAIFNELHADVDLYALLFGESVLNDAVA 295
NHE8_humain D-----VISKLNMTDSFAFGSLTSAVDPAVTAIFNALHVDVPLNMLVFGESILNDAVS 233
NHE9_humain MIHAGQLKNGDFHFTDCLLFGSLMSATDPVTVLAIFHELHVDVLDLYTLLFGESVLNDAVA 247

```

M8

```

NHE1_humain VVLYHLFEEFANYE-----HVGIVDIFLGFSLFFVVALGGVLVGVVYGVIAAFTSRFTSH- 325
NHE2_humain VVLYNLFKSFQMK-----TIETIDVFAGIANFFVVGIGGVLLIGIFLGFIAAFTSRFTSH- 305
NHE3_humain VVLYNVFESFVALGG--DNVTGVDVCKGIVSFFVSLGGILVGVVPAFLLSLVTRFTKH- 281
NHE4_rat VVLYNLIATKMKHF-EDIEAVDILAGCARFVIVCGGVVFGIIFGPTSAFIRFTQN- 297
NHE5_humain VVLYKVCNSFVEMGS--ANVQATDYLKGVASLFFVSLGGAAVGLVPAFLLALTRFTKR- 274
NHE6_humain IVLSSSIVAYQPAGDNSHTFDVTAMFKSIGIFLGFISGFSFAMGAATGVVIALVTKFTKLR 323
NHE7_humain IVLSSSIVAYQPAGLNTAFDAAFFKSVGIFLGFISGFSFTMGAVTGVN-ANVTKFTKLR 354
NHE8_humain IVLNTAEGELTRKNMS-DVSGWQTFLOALDYFLKMFFGSAAALGTLTGLISALVLRKIDLR 292

```



```

NHE8_humain -----EAHYIRRDQLKGFVWLDKYLNPFFTRRL 543
NHE9_humain TTLPEWCG-----PISRLLTSPQAYG--EQLKEDDVEECIV 582
:
:

NHE1_humain VADPYEEAWNQMLLRQKARQLEQK-----INNYLT--VPAHKLDSPTMSRARIGS 703
NHE2_humain TADTSEKQAKEILIRRRHSRESIR-----KIDSSLNREHRASTSTSRYLSLFPKNTK 675
NHE3_humain TPTEDEKQDREIFHRIMRKRLESFKSTKLGlnQNKKAakLYKREARQKR--RNSSI PNGK 698
NHE4_rat KPQTS EKQAKEILIRRQNTLRESLR-----KGQSLPWVKPAGTKNFRYLSFPYSNP 666
NHE5_humain SEDAQERQDKEVFQONMKRRLESFKSTKHNICFTKSKPRPRKTGRKKDGVANA EATNGK 684
NHE6_humain NDGDISLTYGDSTVNT E PATSSAPR-----RFMGNSEDALDRELAFGD 637
NHE7_humain TEGDLTLTYGDSTVTANGSSSHTAS-----TSLEGSRRTKSSSEEVLERDLGMD 707
NHE8_humain TQEDLHHG-----RIQMKTLTNKWEVVRQGP 570
NHE9_humain NQDELAINYQE QASSP---CSPPARL-----GLDQKASPQT PGKENIYEGDLGLGG 630

NHE1_humain DP---LAYEPKEDLPVITIDPAS PQSPESVDLVNEELKGVLG----- 743
NHE2_humain LP---EKLOKRRRTISIADGNSSDSDADAGTTVLNLQFRARRFLPEQFSKKS PQSYKMEWK 732
NHE3_humain LP---MESPQNFTIK-EKDL ELSDT EEPNYDEEMSGGIEFLASVT KDTASD----- 747
NHE4_rat QP---ARRGAR-----AAESTGNPCWLLHF----- 689
NHE5_humain HRGLGFQDTAAVILTVESEEEEEESDSSETEKEDDE--GIFVARATSEVLQEGK VSGS 741
NHE6_humain HE-----LVIRGTRLVLPMDDEPPLNLLDNTRHGPA----- 669
NHE7_humain QK-----VSSRGTRLVFPLEDNA----- 725
NHE8_humain SG-----SEDDEQELL----- 581
NHE9_humain YE-----LKLEQTLGQS QLN----- 645

NHE1_humain -----LSRDPAKVAEEDDDGGIMMR---SKETSSPGTDDV----- 777
NHE2_humain NEVDVDSGRDMPSTPPTPHSREKGTQTSGLLQQPLLSKDQSGSEREDS----- 780
NHE3_humain -----SPAGIDN-PVFS PDEALDRSLLARLPPWLSPGETVVP SQRART----- 789
NHE4_rat -----LLCRAMVEKIWPGGQE----- 706
NHE5_humain LEVCPSPRIIPPSPTCAEKELPWKSGQGLAVYVSSETTKIVPVD MQTGNQSISSLES L 801
NHE6_humain -----
NHE7_humain -----
NHE8_humain -----
NHE9_humain -----

NHE1_humain -----FTPAPSDSPSSQRIQRCLSDP-----GPHPE 803
NHE2_humain -----LTEGIPPKPPRLVWRASEPG-----SRKAR 806
NHE3_humain -----QIPYSPGTFRRLMFPRLSSKSVDSFLQ-----ADGPE 821
NHE4_rat -----TQPRLLCRNLN----- 717
NHE5_humain ASPPCNQAPILTCLPPHPRGTEEPQVPLHLPSDPRSSFAFPPLAKAGRSRSESSADLPQ 861
NHE6_humain -----
NHE7_humain -----
NHE8_humain -----
NHE9_humain -----

NHE1_humain PGEGEPFFPKGQ----- 815
NHE2_humain FGS EKP----- 812
NHE3_humain ER---PPAALPESTHM----- 834
NHE4_rat -----
NHE5_humain QQELQPLMGHKDHTHLSPGTATSHWC IQFN RGSRL 896
NHE6_humain -----
NHE7_humain -----
NHE8_humain -----
NHE9_humain -----

```

Figure 11 : Alignement des séquences des neuf isoformes connues de l'échangeur Na^+/H^+ . L'alignement a été réalisé à l'aide du programme CLUSTALW avec les numéros d'accension GenBank™ indiqués au tableau I. Le code de couleurs est le suivant : Rouge : résidus hydrophobes (A, V, F, P, M, I, L, W), Bleu : Résidus acides (D, E), Noir : résidus basiques (R,

H, K), Vert : Résidus hydroxyl et amine (S, T, Y, C, N, G, Q). Les acides aminés constituant les domaines transmembranaires putatifs ont été surlignés en grisé.

2.7.3.2 Structure secondaire

Lors du clonage de NHE1 (324), la séquence protéique déduite a été analysée avec les algorithmes d'Engelman (97) et de Kyte et Doolittle (222). De ces analyses, un profil d'hydropathie a été obtenu, ce qui a permis de prédire l'arrangement probable des acides aminés au niveau de la membrane plasmique. Tel que présenté sur la Figure 12, NHE1 se décompose en deux grands domaines. Un domaine membranaire N-terminal d'environ 500 acides aminés et un domaine cytoplasmique C-terminal d'environ 300 acides aminés. Le clonage des autres isoformes a révélé que la longueur du domaine membranaire varie entre 450 et 500 résidus alors que celle du domaine cytoplasmique varie entre 130 et 450 acides aminés. Selon la méthode d'analyse utilisée, le domaine associé à la membrane se décompose en 12 Ms (Kyte et Doolittle) ou en 10 Ms (Engelman). Ce dernier algorithme a été peu à peu délaissé au profit du premier. La première boucle extracellulaire contient le site de N-glycosylation, lequel a été discuté à la section 2.7.1.1.

En 2000, Wakabayashi *et al.* ont proposé une nouvelle topologie de NHE1 grâce à une analyse de l'accessibilité de résidus cystéine au composé hydrophile MTSET (2-triméthylammoniummethyl-methanethiosulfate) (382). Bien que ce nouveau modèle propose toujours une topologie à 12 segments transmembranaires (500 acides aminés) et un large domaine cytoplasmique (315 acides aminés), certaines variations par rapport au modèle original peuvent être observées (Figure 12). De façon intéressante, les acides aminés constituant les boucles séparant les M4 et 5 et les M 8 et 9 (sensées se situer du côté intracellulaire selon le modèle proposé par l'algorithme de Kyte et Doolittle) sont sensibles au MTSET, lorsque mutés en cystéine. Ces observations ont amené les auteurs à conclure que, bien que situées du côté cytoplasmique, ces boucles sont accessibles de l'extérieur de la cellule et seraient situées à l'intérieur de la membrane. Celles-ci pourraient donc former une structure délimitant le pore aqueux de NHE1 (382). L'autre changement consiste à considérer l'ancien M10 comme un domaine semi-transmembranaire et l'ancienne boucle entre les M11 et 12 comme le M11. Jusqu'à présent, c'est le modèle le plus précis concernant la structure secondaire de NHE1. Les

autres isoformes de NHE n'ont pas fait l'objet d'une telle étude intensive mais leur relative bonne homologie entre les M4 et 12 peuvent suggérer une topologie similaire à celle de NHE1.

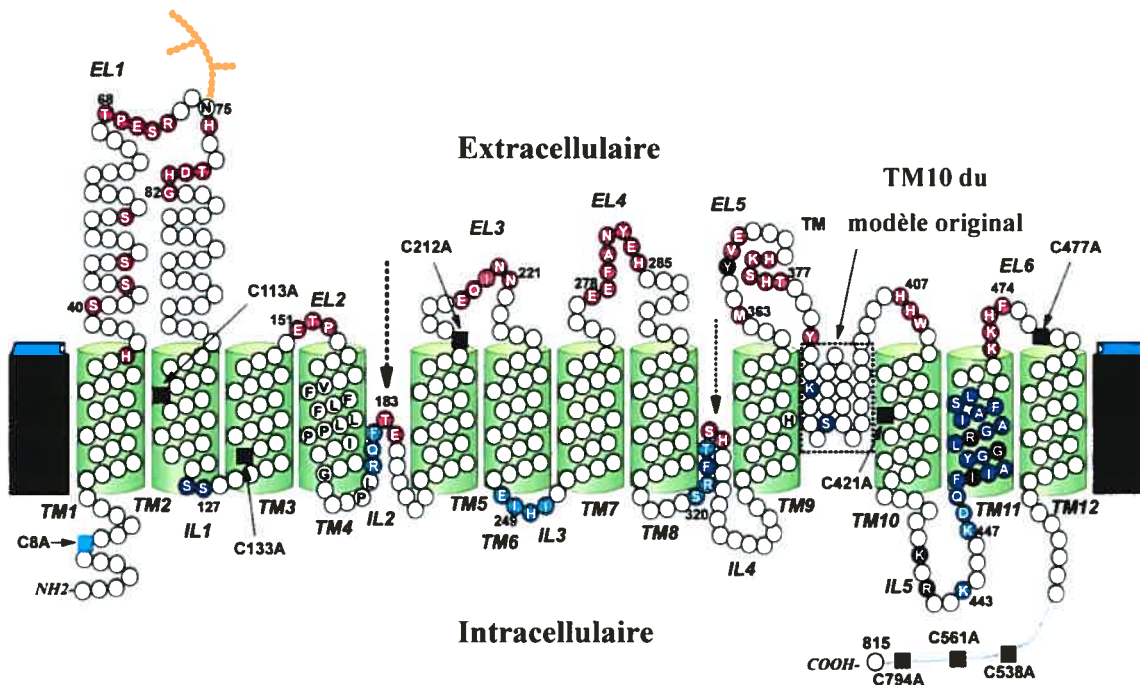


Figure 12 : Topologie membranaire de NHE1 proposée en 2000 par Wakabayashi *et al.* (382). TM : domaine transmembranaire, IL : boucle intracellulaire pour « intracellular loop », EL : boucle extracellulaire pour « extracellular loop ». Cercles : rouges : résidus accessibles au réactif du côté extracellulaire, bleus : résidus accessibles au réactif du côté intracellulaire, violets : résidus inaccessibles aux réactifs, noirs : non-analysé car échangeur trop peu exprimé. Rectangles : noirs : cystéines natives mutées en alanine, bleu : cystéine native accessible du côté cytosolique.

Les études de Khan (187) et de Biesmesderfer (46) suggèrent l'existence d'épitopes localisés sur les domaines cytoplasmiques respectifs de NHE1 et NHE3 mais accessibles du côté extracellulaire. Khan a montré que la séquence 720-802 est accessible à un anticorps spécifique dirigé contre cette région sur des vésicules de globules rouges en conformation RSO (*Right Side Out*, soit l'orientation naturelle) mais pas en conformation ISO (*Inside Out*) dans laquelle le côté intracellulaire des érythrocytes est exposé à la surface externe de la vésicule. Ces observations sont en contradiction avec le modèle de Wakabayashi et les résultats publiés par Shrode *et al.* qui ont montré qu'une étiquette hémagglutinine placée à l'extrémité C-terminale de NHE1 n'est accessible à un anticorps anti-hémagglutinine que si la membrane est perméabilisée. Par ailleurs, Khan, par une analyse informatique, montre que la séquence 720-802 présente des feuillets

β (187). Des études par dichroïsme circulaire sur le domaine cytoplasmique de NHE1 ont révélé que celui-ci est composé à 35% d'hélices α , 17% de feuillets β et à 48% de structures désordonnées (119). Selon Khan, la divergence de ses résultats avec ceux des équipes de Wakabayashi, Shrode et Pouyssegur serait due aux techniques utilisées.

Il est donc difficile de favoriser une interprétation par rapport à l'autre. Néanmoins, nous favoriserons pour la suite de ce texte le modèle, plus populaire, publié par Wakabashi *et al.* (382), dans lequel le domaine C-terminal dans son entier est cytoplasmique et n'est pas accessible du côté externe de la cellule.

2.7.3.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire est définie par l'organisation en trois dimensions des deux précédentes structures. Si la structure secondaire est imputable à l'existence de liaisons hydrogène entre les différents groupements des acides aminés, la structure tertiaire dépend des interactions hydrophobes entre résidus apolaires ainsi que de la présence de ponts disulfure entre les acides aminés cystéine. En raison de leur grande taille, de leur localisation membranaire et des limitations des techniques d'investigations des structures moléculaires, très peu d'information est disponible quant à l'organisation spatiale des échangeurs Na^+/H^+ . Toutefois, Williams a réussi à obtenir une représentation à une résolution de 7 à 14Å de NhaA, un échangeur Na^+/H^+ bactérien, par cryo-microscopie électronique (405). À cette résolution, l'image ne montre que l'arrangement plus ou moins grossier des domaines transmembranaires entre eux et au travers de la membrane. Néanmoins, il est possible d'observer un segment transmembranaire ayant une conformation en forme de « L ». Finalement, cette représentation montre surtout que NhaA s'organise en dimère. Plus récemment, la structure de NhaA a finalement été résolue par Hunte *et al.* à une résolution de 3.5 Å (163). Cette organisation sera amplement discutée plus en détails à la section 2.7.4.

2.7.3.4 Structure quaternaire

Là encore, peu d'information est disponible. En 1988, l'existence de NHE1 dans un état oligomérique a été suggérée par des études d'inactivation par radiations (37). Plus tard, Fafournoux *et al.* ont montré que NHE1 et NHE3 forment des homodimères et non des

hétérodimères (101). En effet, lorsque NHE1 est révélé grâce à la technique SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), en plus de la bande prévue à 110kDa, il est possible d'observer une bande plus ou moins intense à 210-220kDa qui pourrait représenter une forme dimérique de NHE1 résistante au traitement au SDS et au β -mercaptoéthanol présent dans le tampon d'échantillon. L'utilisation d'un agent pontant, le DSS (DiSuccinimidyl Suberate), provoque la disparition de la bande à 110kDa au profit de la bande à 220kDa. Selon ces auteurs, cette dimérisation n'implique pas le domaine cytoplasmique car sa délétion n'affecte pas le degré de dimérisation. De plus, les auteurs ont montré que l'unité fonctionnelle est le monomère puisque la coexpression d'un NHE1 de type sauvage avec un mutant NHE1 inactif en excès n'a pas eu d'influence sur le transport de $^{22}\text{Na}^+$. La même conclusion est fournie par les travaux de Fliegel *et al.* où il est montré que la réduction des ponts disulfure assurant la dimérisation ne perturbe pas l'activité de NHE1 (105). Ces résultats prouvent donc l'existence d'homodimères de NHE1 ou NHE3 dans lesquels chaque monomère est fonctionnel. Les travaux de Williams sur NhaA appuient aussi l'existence de dimères (405). Très récemment, et de façon surprenante, l'équipe de Wakabayashi a montré que NHE1 dimérise par les cystéines 561 et 794 du domaine cytoplasmique suite à l'action d'un agent pontant les cystéines (155). De plus, les auteurs montrent que les domaines cytoplasmiques exprimés dans des cellules PS120 interagissent ensemble par la séquence 562-580. Ces résultats suggèrent donc que, en plus du domaine membranaire, deux molécules de NHE1 interagissent aussi directement au niveau des acides aminés 562 à 580 et sont probablement proches l'une de l'autre en aval de cette zone (Figure 13).

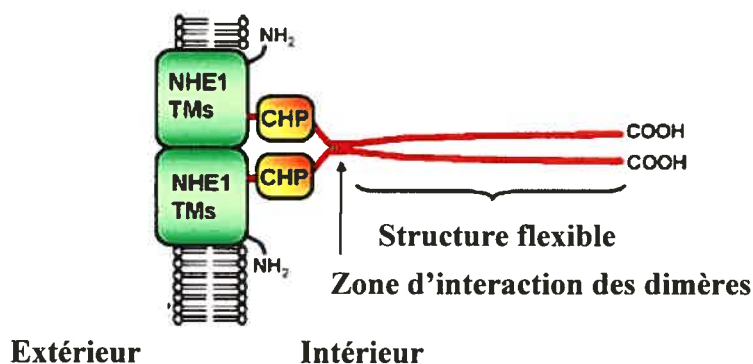


Figure 13 : Représentation schématique de l'arrangement possible d'un dimère de NHE1. Les deux molécules interagissent directement au niveau des acides aminés 562 à 580. Tiré de la référence (155).

2.7.4 Études structure-fonction des échangeurs Na^+/H^+

2.7.4.1 Quelques acides aminés importants pour l'activité de NHE1

Les résidus cystéine ont aussi fait l'objet d'une étude par l'équipe de Fliegel (388). En effet, des travaux antérieurs ont montré que l'oxyde de phénylarsine, un réactif spécifique des groupements dithiol, diminue très nettement l'activité de NHE via une diminution du V_{max} sans perturber le K_{mNa^+} . Ceci suggère l'existence de ponts disulfure à un site différent du site de transport du Na^+ . De plus, cet effet est prévenu par un pré-traitement à l'amiloride (215). Le groupe de Fliegel s'est donc intéressé aux neuf résidus cystéine endogènes de NHE1 (388). Sur ces neuf résidus cystéine, six font partie du domaine transmembranaire (Cys_{8, 113, 133, 212, 421, 477}) et les trois derniers appartiennent au domaine cytoplasmique (Cys_{538, 561, 794}). L'étude des mutations de chacune de ces cystéines en sérine a révélé que seule la mutation des Cys₈ et 477 provoque une diminution importante de l'activité d'échange de NHE1. La mutation de l'une ou l'autre de ces deux cystéines a pour effet de retenir la protéine dans l'appareil de Golgi. Les auteurs proposent que ces deux résidus sont impliqués dans le repliement de la protéine ou, alternativement, forment un pont disulfure. Cette dernière hypothèse étant toutefois peu probable étant donné que ces deux acides aminés seraient situés de part-et-d'autre de la membrane plasmique selon la topologie proposée par Wakabayashi *et al.* (382).

Les acides aminés polaires sont de bons candidats à étudier du fait de leur hydrophilicité et, donc, de leur probabilité de se trouver à la surface du site de translocation des ions. Parmi ces acides aminés polaires, les résidus acides sont encore plus intéressants puisque leur charge négative pourrait jouer un rôle dans l'interaction de NHE1 avec les cations. D'ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de tels résidus pour l'activité de plusieurs transporteurs membranaires tels que la bactériorhodopsine (260, 289), l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (276), ou encore la pompe Na^+/K^+ -ATPase (178, 370) ainsi que l'échangeur Na^+/H^+ Sod2 de la levure (91). La topologie de NHE1 proposée par Wakabayashi et ses collaborateurs prévoit l'existence d'un domaine semi-transmembranaire entre les acides aminés 387 et 406 (382). Cette structure n'est d'ailleurs pas sans rappeler celle du filtre de sélectivité du canal K^+ (92) qui consiste aussi en un domaine partiellement transmembranaire. L'analyse de la séquence de cette structure dans NHE1

montre la présence de plusieurs acides aminés polaires : Ser₃₈₇, Ser₃₈₈, Ser₃₉₀, Glu₃₉₁ et Thr₃₉₂. La recherche de résidus acides mène aussi aux M6 et M7 dans lesquels se trouvent les résidus très conservés Asp₂₃₈, Glu₂₆₂ et Asp₂₆₇. Une étude impliquant la mutation systématique de ces acides aminés révèle que Glu₂₆₂, Asp₂₆₇ et Glu₃₉₁ sont importants pour l'activité de NHE1 (270). Fafournoux *et al.* ont déjà attribué un rôle crucial au résidu Glu₂₆₂ lors de leurs travaux sur la dimérisation de NHE1 (101). En effet, la mutation de cet acide aminé en alanine provoque l'inactivation complète de NHE1. En fait, l'équipe de Fliegel montre que la charge de chacun des trois acides aminés Glu₂₆₂, Asp₂₆₇ et Glu₃₉₁ est impliquée dans l'activité de NHE1 étant donné que la mutation de chacun d'eux en un acide aminé neutre (glutamine ou asparagine) provoque un effet beaucoup plus prononcé que leur mutation en un résidu de même pKa. De plus, l'annulation de la charge en position 262 et 391 induit une forte accumulation de formes immatures de NHE1 de plus faible poids moléculaire. Ainsi, la charge de ces acides aminés influe sur la maturation du transporteur (de tels résultats ont aussi été obtenus par Wakabayashi *et al.* concernant les résidus Tyr₄₅₄ et Arg₄₅₈ (383)). Bien qu'aucun profil pharmacologique des NHE1 mutés aux positions Glu₂₆₂, Asp₂₆₇ et Glu₃₉₁ ne soit fourni, Murtazina *et al.* (270) affirment que ces résidus ne sont pas impliqués dans l'affinité pour le sodium. Il est à noter également que la mutation des résidus adjacents à ces trois résidus ne perturbe pas l'activité de NHE1, ce qui semble écarter un changement de conformation induit par la mutation de Glu₂₆₂, Asp₂₆₇ et Glu₃₉₁. Un tel changement local de conformation aurait pu être aussi provoqué par les acides aminés voisins, mais ce n'est pas le cas; une influence beaucoup plus ponctuelle des acides aminés Glu₂₆₂, Asp₂₆₇ et Glu₃₉₁ doit être alors privilégiée selon ces auteurs.

Les acides aminés responsables de la sensibilité au pH_i de NHE1 ont eux aussi fait l'objet d'une étude extensive par l'équipe de Wakabayashi (380). Les auteurs se sont intéressés au M11 et à ses régions environnantes. La mutation des résidus Arg₄₄₀ (boucle IL5), Gly₄₅₅ et Gly₄₅₆ (M11), lesquels sont très conservés (Figure 11), provoque une variation de la dépendance de NHE1 au pH_i. En effet, la mutation Arg₄₄₀Asp de NHE1 déplace la courbe de dépendance de l'échangeur au pH_i vers des valeurs plus acides, ce NHE1 muté est donc moins sensible au pH_i que le NHE1 de type sauvage (pK respectifs de 6.2 et 6.7). En introduisant à cette place des acides aminés de tailles et de charges différentes, il a été possible d'observer que la charge, et non la taille du résidu en position 440, est importante pour la dépendance au pH_i. En effet, toutes

les mutations entraînant la perte de la charge positive en 440 provoquent une diminution de cette dépendance alors que l'introduction de la lysine, qui porte une charge comparable à l'arginine, provoque un effet moins prononcé. L'hypothèse la plus attrayante, proposée par les auteurs et en relation avec les travaux antérieurs sur CHP, est que l'Arg₄₄₀ de la boucle IL5 interagirait avec les résidus chargés négativement localisés dans le domaine de liaison de CHP. La mutation de l'Arg₄₄₀ supprimerait cette interaction et perturberait donc la dépendance au pHi. Au contraire, la mutation Gly₄₅₅Gln déplace la courbe de dépendance au pHi vers des valeurs plus alcalines par rapport au NHE1 de type sauvage (pK respectifs de 7.1 vs 6.7). Dans ce cas, les effets de la mutation sur la dépendance au pHi dépendent de la taille de l'acide aminé en remplacement de Gly₄₅₅ : plus l'acide aminé est volumineux, plus l'effet est important. Le fait que la glycine serve de charnière et permette des changements de conformation (176, 362) pourrait expliquer son importance et les effets de sa mutation en des acides aminés plus volumineux.

2.7.4.2 Importance du domaine transmembranaire M4

Les premières études visant à identifier des acides aminés de NHE1 impliqués dans le transport ionique ou dans l'interaction avec les inhibiteurs pharmacologiques ont véritablement commencé au début des années 90 avec les travaux de Counillon et collaborateurs (71). Préalablement à leurs travaux, Franchi *et al.* avaient caractérisé une lignée cellulaire très résistante à l'inhibition par le MPA (107). L'ADN génomique de cette population de cellules a été transfecté dans une lignée cellulaire dépourvue d'activité d'échange Na⁺/H⁺ et l'activité d'échange a été restaurée avec la même résistance à l'inhibition (107). Ceci suggérait la présence d'un NHE1 muté. En utilisant l'ADNc de NHE1 en tant que sonde, Counillon *et al.* ont été capables d'isoler l'ADNc du NHE1 muté et son séquençage a révélé la présence d'une mutation dans laquelle la substitution d'une cytosine par une thymidine a pour effet de changer la Leu₁₆₇ du NHE1 de type sauvage (selon la séquence du hamster, dans le NHE1 humain, ceci correspond à la Leu₁₆₃) en phénylalanine (mutation Leu₁₆₇Phe). L'introduction de cette mutation dans un NHE1 de type sauvage confère à ce dernier la même résistance au MPA. Selon la topologie proposée par Wakabayashi (Figure 12) et la comparaison des séquences des différentes isoformes de NHE (Figure 11), cet acide aminé est situé dans le M4 dans une région très conservée. Toutefois, comme certaines variations peuvent être observées entre les isoformes 1, 2, 3 et 4, surtout au niveau des résidus 165, 167 et 168 de NHE1 humain, Counillon *et al.* ont

introduit les acides aminés correspondant des NHE2, 3 et 4 dans NHE1 sans toutefois reproduire le phénotype de résistance accrue. Ces résultats ont mené les auteurs à proposer que d'autres acides aminés sont certainement impliqués, avec la Leu₁₆₃, dans l'interaction de l'échangeur avec les inhibiteurs.

De même, Yun *et al.* se sont intéressés à l'équivalent de la Leu₁₆₇ du NHE1 de hamster dans le NHE2 de lapin, soit la Leu₁₄₃ (416). Ces auteurs ont donc muté cet acide aminé afin de mimer le résidu correspondant dans NHE1 et NHE3. La mutation Leu₁₄₃Phe (mimant NHE3) diminue de 20 fois la sensibilité du NHE2 muté à l'EIPA, atteignant ainsi une résistance similaire à celle de NHE3. De plus, la Tyr₁₄₄ de NHE2 a été mutée en Phe, son équivalent dans NHE1. Malheureusement, cette mutation ne reproduisait pas le phénotype de NHE1. Ces résultats appuient donc ceux de Counillon *et al.* en suggérant que d'autres acides aminés sont impliqués dans l'inhibition de l'échangeur Na⁺/H⁺ par l'amiloride et l'EIPA.

Afin de rechercher de nouveaux sites d'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs, l'approche par mutagenèse aléatoire a été utilisée par le groupe de Pouysségur (72). Cette étude a permis d'identifier la Gly₁₇₄ dans le M4 qui, mutée en sérine, diminue de près de trois fois la sensibilité de NHE1 à l'amiloride. De plus, la double mutation Leu₁₆₃Phe/Gly₁₇₄Ser provoque une diminution de l'affinité de NHE1 pour le Na⁺ (28mM contre 14mM pour le NHE1 de type sauvage). La Gly₁₇₄ est donc le deuxième acide aminé du M4, après la Leu₁₆₃, qui affecte la sensibilité de NHE1 aux inhibiteurs, ce qui suggère un rôle primordial de ce segment transmembranaire dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs, d'autant plus que les deux résidus y sont assez éloignés l'un de l'autre. Ces résultats ne peuvent cependant pas exclure l'implication d'autres acides aminés dans l'interaction de NHE1 avec ses inhibiteurs.

Le M4 présente la particularité de posséder trois résidus proline en position 167, 168 et 178 (selon la séquence du NHE1 humain). Les prolines provoquent l'apparition de coudes dans la structure d'une l'hélice α (375) et leur amalgame dans cette zone pourrait avoir un rôle dans l'interaction de NHE1 avec ses substrats. La proline, ne possédant pas d'hydrogène provenant d'un groupement amide, prive l'acide aminé en position -4 du résidu proline de donneurs d'hydrogène. Ainsi, les groupements carbonyl des Leu₁₆₃, Phe₁₆₄ et Gly₁₇₄ sont privés de tels ponts par les prolines 167, 168 et 178 respectivement. De plus, la présence du coude introduit par

la proline empêche la mise en place d'un pont hydrogène entre le résidu +1 et le résidu -3, ce qui implique que les Leu₁₆₅ et Tyr₁₇₅ ne possèdent pas de ponts hydrogène. En conséquence, cette région présenterait la flexibilité accrue nécessaire à la liaison du Na⁺ et des inhibiteurs (72) ou éventuellement à un changement conformationnel lors du transport.

L'importance du M4 a aussi été démontrée par les résultats récents de Touret *et al.* (360). Lors de cette étude, des cellules PS120 exprimant le NHE1 humain de type sauvage ont été soumises à un traitement mutagène par l'EMS (*Ethyl Methane-Sulfonate*). L'exposition des cellules à une charge acide en présence de cariporide a permis d'isoler un clone, CR5, résistant à une concentration de 30µM à 1mM (le IC₅₀ a été évalué par la suite à 87µM comparé à 0.056µM pour le NHE1 de type sauvage). De plus, ce clone présente une affinité dramatiquement diminuée pour le Na⁺ (248mM vs 23mM). Le clonage et le séquençage du domaine transmembranaire de NHE1 ont révélé une seule mutation Phe₁₆₂Ser qui, réintroduite dans un NHE1 de type sauvage provoquait le même phénotype de résistance. La comparaison des séquences des neuf isoformes de NHE montre que cette Phe₁₆₂ est extrêmement conservée (Figure 11) et, de plus, qu'elle est voisine de la Leu₁₆₃ discutée précédemment. Les auteurs ont ensuite soumis ce clone à un nouveau traitement mutagène dans le but d'obtenir des révertants suite à une sélection par charge acide avec récupération en présence de 3mM NaCl. Cette concentration est normalement létale pour les cellules issues du clone CR5 mais pas pour des cellules ayant une affinité normale pour le Na⁺ (donc des cellules ayant « réverté » par rapport à leur phénotype issu de la première mutagenèse). De façon intéressante, deux clones CRN5 et 6 ont été isolés, tous les deux ayant un K_{mNa+} comparable à celui du NHE1 de type sauvage i.e de l'ordre de 23mM, mais présentant un IC₅₀ pour le cariporide très diminué (de l'ordre de celui du clone CR5). En plus de la mutation Phe₁₆₂Ser issue du premier traitement mutagène, les révertants CRN5 et CRN6 respectivement présentent les mutations Ile₁₆₉Ser et Ile₁₇₀Thr. La réversion du phénotype de faible affinité au Na⁺ induit par la mutation Phe₁₆₂Ser n'est donc pas due à la récupération de la Phe₁₆₂ native mais à la présence d'une seconde mutation pas très éloignée. Les mutations Ile₁₆₉Ser et Ile₁₇₀Thr, qui renversent les effets de la mutation Phe₁₆₂Ser au niveau de l'affinité pour le Na⁺, recréent possiblement une conformation locale de NHE1 favorable à la liaison du Na⁺. En outre, ces résultats tendent à suggérer que le site de transport du Na⁺ est différent de celui de liaison des inhibiteurs.

Très récemment, le M4 a fait l'objet d'une étude intensive par l'équipe de Fliegel. Ces auteurs se sont proposés de caractériser le M4 dans son ensemble et de déterminer sa structure par résonance magnétique nucléaire (RMN) à haute définition et aussi d'identifier les acides aminés qui se projettent à l'intérieur du pore ionique en utilisant la technique du « cysteine-scanning » (342). La mutation de tous les acides aminés du M4 et la mesure subséquente de l'activité de l'échangeur montre que ce segment transmembranaire est extrêmement sensible aux mutations étant donné que tous les résidus mutés ont un effet sur l'activité NHE. D'autre part, cette étude démontre que seule la phénylalanine 161 mutée en cystéine est accessible au MTSET ou au MTSES, deux composés qui réagissent avec les résidus cystéines. Ce résultat signifie donc que ce résidu fait probablement face au pore ionique de NHE1. Finalement, après purification du M4, les auteurs se sont attachés à déterminer sa structure par RMN. Leur conclusion est que ce segment transmembranaire n'est pas formé d'une hélice α classique. En effet, selon cette étude, seuls les acides aminés 169-176 du segment transmembranaire adoptent une conformation d'hélice α , le reste du segment transmembranaire étant composé d'une boucle β et d'une structure étendue. Ces trois domaines sont par ailleurs indépendants d'un point de vue mobilité. Bien que cette étude se soit effectuée sur un segment transmembranaire isolé, elle montre de façon convaincante le caractère particulier et primordial de ce domaine transmembranaire dans NHE1.

2.7.4.3 Importance du domaine transmembranaire M9

Étant donné que le résidu histidine est connu pour jouer un rôle de relais dans le transport de H^+ par la Lac perméase d'*E. coli* (180) et que le DEPC (DiEthyl PyroCarbonate), un composé qui se lie aux résidus histidine, altère l'activité de transport de NHE dans les vésicules de membranes de bordures en brosse de rein (130) et de placenta (114), le rôle de cet acide aminé dans l'activité d'échange de NHE1 a aussi été étudié par l'équipe de Warnock (386). En mutant trois histidines dans trois segments transmembranaires différents (His35, 120 et 349 dans les M1, 2 et 9 respectivement), les auteurs montrent que, parmi ces trois résidus histidine, seule l'His₃₄₉ dans le domaine M9 est impliquée dans l'interaction de NHE1 avec l'amiloride. En outre, cet acide aminé n'est pas directement impliqué dans le transport du Na^+ ou du Li^+ étant donné que sa mutation ne perturbe pas l'affinité des NHE1 mutants pour ces ions. Le remplacement de cette

histidine par son équivalent dans NHE3, soit une sérine, ne reproduit pas le phénotype de résistance de NHE3 et donc, encore une fois, d'autres acides aminés sont à rechercher.

En observant que le phénotype de NHE3 n'arrivait pas à être reproduit en utilisant l'approche des mutations ponctuelles, Orłowski et Kandasamy ont construit plusieurs molécules chimères entre NHE1 et NHE3 (286). L'expression de ces chimères et leur analyse ont montré que l'introduction du M9 de NHE3 dans NHE1 rapproche son profil pharmacologique de celui de NHE3. Toutefois, dans cette étude, l'introduction du M9 de NHE3 dans la séquence de NHE1 ne reproduit l'affinité pour le Na^+ d'aucune des deux isoformes. L'affinité pour le Na^+ semble donc être dépendante de l'organisation spatiale de chacun des acides aminés et cette organisation ne peut pas être reproduite avec des chimères, bien qu'elles semblent correctement repliées puisque fonctionnelles (286).

Afin d'identifier d'autres acides aminés impliqués dans les différences observées entre les paramètres cinétiques et pharmacologiques de NHE1 et NHE3, Khadilkar *et al.* ont identifié quelques acides aminés du NHE1 de rat dont la Glu₃₅₀ et la Gly₃₅₆, correspondant à Glu₃₄₆ et Gly₃₅₂ dans la séquence du NHE1 humain (186). La mutation de ces résidus diminue l'activité de NHE1 et sa sensibilité aux inhibiteurs tels que l'amiloride, l'EIPA et le HOE694, mais ne modifie pas son affinité pour le Na^+ . La mutation de Gly₃₅₆ en son équivalent dans NHE3 (Ala), bien que diminuant la sensibilité aux inhibiteurs, ne reproduit pas la résistance de NHE3. En outre, le résidu Glu₃₅₆ est extrêmement conservé au travers des neuf isoformes (Figure 11), ceci suggère que la divergence de phénotype entre NHE1 et NHE3 n'est pas uniquement due à ces acides aminés. Toutefois, la combinaison des mutations Leu₁₆₃Phe (Leu₁₆₇ chez le rat) découverte par Counillon (71) et Gly₃₅₆Ala provoque une réduction synergique de la sensibilité à l'EIPA de NHE1 pour atteindre les valeurs de NHE3 (1.8 μM et 3.2 μM EIPA respectivement contre 0.01 μM pour le NHE1 de type sauvage) (186). Ce résultat suggère que le M4 et le M9 pourraient s'associer pour délimiter un « pore » nécessaire au passage des ions.

2.7.4.4 Structure de l'échangeur Na^+/H^+ bactérien NhaA

Récemment, la structure de l'échangeur Na^+/H^+ d'*E. coli* a été résolue à 3.45Å (163). Ce transporteur est composé de 388 acides aminés arrangés en 12 domaines transmembranaires avec

les extrémités N- et C-terminales du côté cytoplasmique. La caractéristique majeure de cette structure réside en la présence d'un assemblage des M4 et 11. En effet, ces deux segments transmembranaires sont orientés de façon opposée et se croisent au milieu de la bicouche lipidique et sont composés de deux courtes hélices α (IVc et XIc du côté cytoplasmique, IVp et XIp du côté périplasmique) séparées par une chaîne polypeptidique étendue (Figure 14, p.86). Les domaines IVc et XIp sont donc orientés de façon antiparallèle et se font face par leur extrémité N-terminal chargée positivement. La position du résidu Asp₁₃₃ permet de compenser cette charge et de stabiliser cette conformation énergétiquement peu propice. De même, les domaines XIp et IVc se font face par leur extrémité négative et cette charge est compensée par le résidu Lys₃₀₀. Ce genre d'architecture est retrouvé dans le canal Cl⁻ procaryote (95). Le TM IX joue probablement un grand rôle dans l'activation de NhaA. En effet, c'est un domaine de forme non linéaire et donc flexible. Son extrémité N-terminale fait partie du senseur de pH (notamment par le résidu Glu₂₅₂) (369) et il a déjà été montré qu'il subissait un changement conformationnel en fonction du pH (122, 369). De plus, la position du coude du TM IX est en contact direct avec l'assemblage TM IV/XI.

À l'état inactivé à pH acide, le pore ionique est fermé par la barrière formée notamment par l'hélice XIp (Figure 14, 2a, p.86). Lorsque NhaA s'active à pH alcalin, le TM IX subit un changement de conformation suite à un signal du senseur de pH. Cette nouvelle conformation conduit à un réarrangement des hélices XIp et IVc ce qui exposerait le site de liaison des ions Na⁺ (constitué par les résidus Asp₁₆₃, Asp₁₆₄ et probablement Thr₁₃₂) au côté cytoplasmique et enlèverait la barrière périplasmique (Figure 14, 2b et 2c, p.86).

Il est à noter que NhaA a été cristallisé en conformation inactive et que le modèle de translocation des ions est une spéculation basée sur la structure inactive obtenue. Il est donc primordial d'obtenir un échangeur cristallisé sous forme active, lié au Na⁺, afin de confirmer ces suppositions.

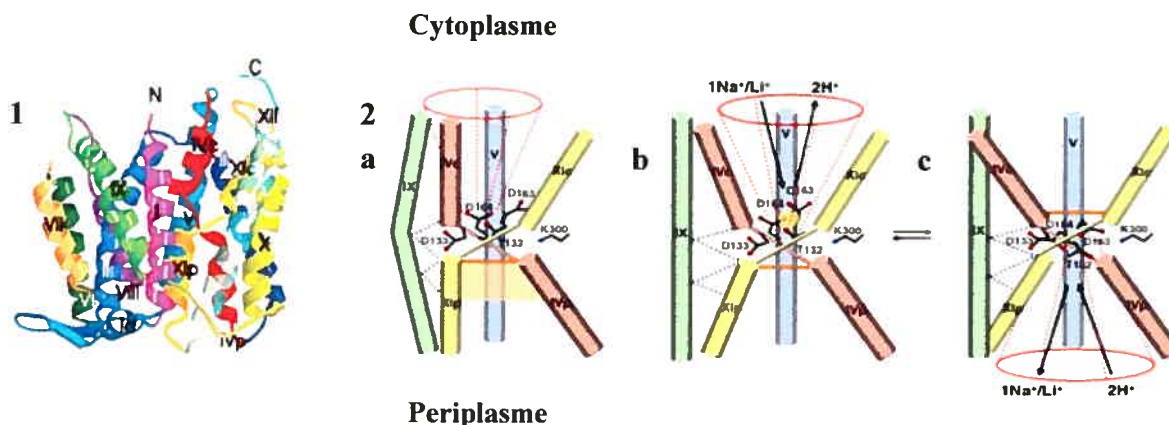


Figure 14 : Structure de NhaA et modèle de la translocation des ions. **1**, structure générale de NhaA tel qu'inséré dans la membrane plasmique, les domaines transmembranaires sont indiqués en chiffres romains. **2**, Modèle de la translocation des ions, seuls les TM IV, V, IX et XI sont schématisés; **a**, conformation inactive à pH acide; **b**, conformation suite à l'activation en milieu alcalin : le site d'interaction des ions Na^+ et H^+ est exposé (cercle jaune); **c**, ouverture du tunnel et relache des ions. Adapté de la référence (163).

2.8 Conclusions et justification de la recherche

La mutagenèse aléatoire ou dirigée de NHE1 a mis en évidence plusieurs acides aminés importants pour la liaison des inhibiteurs et dans certains cas pour la liaison du Na^+ . Même si la structure de l'échangeur NhaA d'*E. coli* a été récemment résolue (163), la faible homologie (moins de 20%) associée à des différences fondamentales de fonctionnement (NhaA est électrogénique) nous empêche d'extrapoler une structure précise de NHE1 à partir de celle de NhaA, d'autant que ce transporteur a été cristallisé en conformation inactive, c'est-à-dire sans liaison au Na^+ . La compréhension de la structure et de la fonction de NHE1 nécessite donc encore la mutagenèse qu'elle soit aléatoire ou dirigée. Néanmoins, un certain nombre d'informations pertinentes peut être retiré de la comparaison des séquences de NhaA et NHE1 en se basant sur la topologie de NHE1 (382) et la structure de NhaA (163) (voir article no2 et section 2.7.4.4 Structure de l'échangeur Na^+/H^+ bactérien NhaA)

Comme décrit dans les sections précédentes, deux hélices transmembranaires ont été principalement impliqués dans la liaison des inhibiteurs et éventuellement du Na^+ . Ce sont le M4

(avec les résidus Phe₁₆₂, Leu₁₆₃, Ile₁₆₉, Ile₁₇₀ et Gly₁₇₄), et le M9 avec les résidus Glu₃₄₆, His₃₄₉ et Gly₃₅₂.

La découverte par notre laboratoire d'un variant spontané de NHE1 extrêmement résistant à l'inhibition et présentant la seule mutation Glu₃₄₆Asp appuie donc l'implication du M9 dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs (manuscrit #1). De plus, l'importance de ce résidu et par là-même du M9 est renforcée par le fait que la mutation Glu₃₄₆Asp diminue de façon significative l'affinité de NHE1 pour la Na⁺. Il était donc intéressant de déterminer si ce M9 est impliqué dans la construction d'un pore permettant le passage des ions Na⁺ et H⁺.

Étant donné la faible différence structurale entre le résidu glutamate présent en position 346 dans le NHE1 de type sauvage et le résidu aspartate trouvé dans le variant spontané résistant à l'inhibition, il était intéressant de se pencher sur les mécanismes moléculaires responsables de l'acquisition de ce phénotype de résistance. En effet, ces deux acides aminés ne diffèrent que d'un seul groupement carbonyle et présente un pKa similaire d'environ 4.5. Nous nous proposons donc d'expliquer la participation du glutamate en position 346 dans la liaison de NHE1 avec les inhibiteurs et le Na⁺ en tentant de décomposer les facteurs de taille, de charge et de position. Pour ce faire, une série de mutations visant soit à introduire un acide aminé de taille radicalement différente du glutamate (glycine, sérine, tryptophane) soit à annuler la charge du Glu₃₄₆ sauvage ou de l'Asp₃₄₆ du variant spontané (glutamine, asparagine) soit à déplacer le glutamate en position 345 ou 347 (mutations Glu₃₄₅AlaLeu et AlaLeuGlu₃₄₇) a été réalisée. La sensibilité aux inhibiteurs, l'affinité pour le Na⁺ ainsi que l'activité intrinsèque ont été mesurées pour chaque mutant de NHE1.

Afin de déterminer si le M9 s'associe avec le M4, délimitant ainsi un pore composé des M4, 5, 6, 7, 8 et 9, une série de double mutations concernant la Leu₁₆₃ du M4 et le résidu Glu₃₄₆ du M9 a été construite. Selon les résultats d'Orlowski, une telle combinaison devrait s'accompagner d'une additivité ou d'une synergie des effets des mutations doubles.

Finalement, en se basant sur la structure récemment résolue de l'échangeur Na⁺/H⁺ bactérien NhaA (163), un alignement de séquence entre NhaA et NHE1 sera proposé en délimitant des zones de haute homologie au niveau des domaines transmembranaires.

Les mutations ont été réalisées par mutagenèse dirigée par PCR et les vecteurs contenant les NHE1 mutés ont été transfectés dans des cellules PS120 qui ne présentent aucune activité d'échange Na^+/H^+ . Ces cellules, dérivées de fibroblastes issus de poumons de hamster chinois (lignée CCL39), ont été sélectionnées et caractérisées par Pouysségur et ses collaborateurs (301). Les cellules exprimant un NHE1 muté et fonctionnel ont été sélectionnées par charge acide. Cette technique décrite par Paris *et al.* (301) consiste à acidifier le milieu intracellulaire des cellules au moyen d'une incubation dans une solution de NH_4Cl sans Na^+ . Au terme de cette incubation, les cellules sont transférées dans un milieu de récupération comprenant 120mM de Na^+ . Seul un NHE1 fonctionnel échangeant les protons intracellulaires contre le Na^+ extracellulaire permet à la cellule de survivre à l'acidification qui autrement est létale. Après plusieurs cycles de sélection, l'expression des différents mutants de NHE1 à la membrane plasmique des cellules est vérifiée par immunobuvardage de type Western sur des préparations de membranes brutes à l'aide d'un anticorps anti-NHE1 dirigé contre le domaine cytoplasmique de NHE1 (321). Finalement, la sensibilité des mutants de NHE1 pour les inhibiteurs et leur affinité pour le Na^+ sont déterminées par la mesure de l'accumulation par les cellules de $^{22}\text{Na}^+$ en présence de différentes concentrations d'inhibiteur ou de sodium non radioactif, respectivement suite à une charge acide. Parallèlement, la capacité de chaque mutant de NHE1 à transporter le Na^+ est mesurée.

Chapitre 2 : Publications

Avant-Propos

Les deux articles inclus dans la présente thèse ont été le fruit d'un travail d'équipe impliquant Julie Vadnais, technicienne de laboratoire, Josette Noël, directrice de recherche et moi-même.

Le premier article est né de travaux préliminaires réalisés par le Dr Josette Noël dans lesquels un mutant spontané de NHE1 a été isolé et son phénotype de haute résistance au HOE694 caractérisé. Les profils pharmacologiques, ainsi que les paramètres cinétiques de ce mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1, ont été établis par Julie Vadnais et Josette Noël. En tant que co-premier auteur de cet article, j'ai construit, exprimé et caractérisé les différents mutants qui ont permis de préciser l'implication du Glu₃₄₆ dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs et le Na⁺. En outre, j'ai participé activement à la rédaction de cet article avec le concours de Josette Noël.

Dans le deuxième article, je suis responsable du choix des mutations qui y sont étudiées (après discussion avec le Dr Noël) et de leur construction. J'ai en outre pris en charge la totalité des expériences utiles à leur caractérisation tant aux niveaux pharmacologique que cinétique, de même que toute la culture cellulaire imposée par ce type d'expériences. J'ai finalement effectué l'analyse des résultats et entièrement la première version d'un manuscrit qui a ensuite été remanié conjointement avec les Dr. Josette Noël et Alfred Berteloot pour aboutir à l'article final. Ce dernier est par ailleurs l'auteur principal du modèle cinétique et a participé activement à l'élaboration de l'alignement NhaA-NHE1.

Durant la réalisation de ces travaux, j'ai eu l'occasion de recevoir le prix de la meilleure présentation orale au « Congrès des Stagiaires de Recherche », organisé par *l'Association des Étudiants aux Grades Supérieurs de la Faculté de Médecine* à Montréal en janvier 2000, ainsi qu'au colloque du *Groupe de Recherche en Transport Membranaire* en juin 2001.

Méthodologie

Lignées et cultures cellulaires.

Les cellules PS120 utilisées dans cette étude sont issues d'un clone de fibroblastes de poumon de hamster chinois (lignée CCL39 (ATCC)) qui ne présente aucune activité d'échange Na^+/H^+ (301). Ces cellules ont été obtenues à la suite d'un traitement mutagénique sur des cellules CCL39 sauvages suivi par une sélection utilisant leur aptitude à résister à une charge en lithium. Cet ion a été utilisé car il est moins toxique que le Na^+ à ces concentrations (120mM). L'échangeur Na^+/H^+ a la capacité de transporter le Li^+ et il est ainsi possible en incubant les cellules dans un milieu contenant 120 mM de Li^+ de renverser le sens de l'échange Na^+/H^+ . Les cellules sont ensuite transférées dans un milieu acide et si la cellule exprime un NHE fonctionnel à sa membrane plasmique, les ions Li^+ sont expulsés contre une entrée létale de protons, d'où l'appellation « proton-suicide ». À l'inverse, si la cellule n'exprime aucun échangeur Na^+/H^+ fonctionnel, l'entrée de H^+ est évitée, permettant la survie de la cellule au terme de la sélection. Les cellules PS120 constituent ainsi un excellent outil pour l'étude de l'échangeur Na^+/H^+ du fait de l'absence d'expression d'un NHE endogène. Ces cellules peuvent être aisément transfectées par un vecteur contenant la séquence d'un NHE (les fibroblastes sont des cellules très pratiques à cet effet) et sélectionnées sur la seule présence de ce NHE exogène.

Les cellules sont cultivées dans un milieu essentiel Eagle's modifié (H21, Gibco) contenant 25mM de NaHCO_3 complémenté avec 50 U/ml de pénicilline, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine (afin de prévenir les contaminations bactériennes) et une concentration de 7,5% en sérum de veau (CS) ou sérum bovin (FBS pour fetal bovin serum)). Les cellules ont été maintenues à 37°C en présence de 5% de CO_2 .

Sélection des variants résistants au HOE694.

Les fibroblastes PS120 exprimant le NHE1 de type sauvage ont été soumis à des charges acides répétées en présence de 50mM de NH_4Cl à 37°C et en absence de bicarbonate et de CO_2 ,

tel que décrit antérieurement (71). Ce traitement consiste à charger le milieu intracellulaire en NH_4Cl en absence d'ions Na^+ . Le chlorure d'ammonium se dissocie en ammoniaque (NH_3) et en proton (H^+). Au bout d'une heure, les concentrations des différents composés sont à l'équilibre de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les cellules sont alors rapidement rincées par un milieu sans Na^+ et incubées pendant une heure à 37°C dans un milieu de récupération en absence de CO_2 (afin d'éviter toute activité de transport de bicarbonate) et en présence de 120mM de NaCl en absence ou en présence de $30\mu\text{M}$ de HOE694 pour inhiber toute activité NHE1 de type sauvage (280). Ce temps de récupération, en absence d'inhibiteurs, permet à la cellule exprimant un NHE1 fonctionnel à sa membrane plasmique d'extruder les protons contre les ions Na^+ présent dans le milieu extracellulaire. La présence d'une telle concentration de HOE694 permet l'inhibition de NHE1 de type sauvage et donc, la sélection de cellules pouvant exprimer des protéines plus résistantes. Les cellules n'exprimant pas de NHE ne résistent pas à cette sélection et meurent dans les heures qui suivent par cette sélection. Après aspiration de cette solution, du milieu nutritif DMEM contenant du bicarbonate et du sérum de veau est ajouté aux cellules pour les laisser récupérer à 37°C en présence de CO_2 .

Dans ces conditions, plus de 99% des cellules sont mortes après le premier test. Toutefois, quelques colonies ont survécu à trois procédures de charges acides répétées tous les 2 à 4 jours. Les cellules ont ensuite été exposées à un traitement à la trypsine puis à nouveau étalées. Elles ont ensuite été soumises à une charge acide suivie d'une récupération en présence d'une concentration plus importante de HOE694, soit $100\mu\text{M}$ afin de s'assurer qu'aucune cellule exprimant un NHE1 de type sauvage n'était cachée par les cellules résistantes dans les groupes de cellules formant une colonie. Après deux procédures de ce type, plusieurs colonies survécurent encore. Ces colonies ont encore soumises à la trypsine, étalées puis exposées à trois charges acides suivies de récupérations en présence de $300\mu\text{M}$ de HOE694. Cette population cellulaire résistante était stable, les charges acides subséquentes ne tuant plus aucune cellule. Finalement, le même protocole a été répété en présence de $1000\mu\text{M}$ de HOE694. Les différentes populations cellulaires ont été nommées en fonction de leur phénotype de résistance au HOE694 : HR100, HR300 et HR1000. Après chaque étape de sélection, les cellules résistantes ont été congelées à -80°C pour analyses ultérieures. Les populations HR100 et HR300 montraient une résistance stable à de très hautes concentrations d'inhibiteurs mais beaucoup de

cellules de la colonie HR1000 mourraient pendant la procédure de sélection. Cette mortalité des cellules HR1000 était peut-être due à une limitation de la sélection à de telles doses d'inhibiteur.

Analyse par buvardage de type Northern.

Afin de vérifier le niveau d'ARN messager codant pour l'échangeur Na^+/H^+ , un buvardage de type Northern a été réalisé. L'ARN total a été obtenu à partir de cellules exprimant les NHE1 variants à l'aide de la trousse BioProbe™ dont le principe consiste à exploiter la différence de solubilité des ARN et des ADN dans un mélange de milieux aqueux et organique. Les ARN obtenus (30µg d'ARN total ont été chargés) ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante en présence de formaldéhyde et enfin transférés sur membranes de nitrocellulose de type Hybond N. Les membranes de nitrocellulose ont été incubées à 65°C pendant 16 heures avec le fragment PstI-SacI de NHE1 (570pb) (ou avec le fragment PstI-EcoRI (1290pb) de NHE3) marqués au ^{32}P -dCTP. L'hybridation d'une sonde NHE3 radiomarquée a été effectuée afin d'écarter toute implication de NHE3 dans le phénotype de résistance observé. Dans ces conditions, les fragments de NHE1 ou de NHE3 radiomarqués sont capables de s'hybrider à leur séquence complémentaire présente dans l'extrait d'ARN obtenu plus tôt. Après lavage, les membranes de nitrocellulose ont été appliquées sous un film radiographique. Après développement du film, la présence d'une bande de taille correspondante à l'une ou à l'autre des isoformes assure la présence d'ARNm codant pour NHE1 ou pour NHE3 dans les pistes correspondantes.

RT-PCR.

Afin d'obtenir l'ADN complémentaire des ARN codant pour NHE1, 1µg d'ARN total extrait des cellules exprimant un NHE1 de type sauvage ou variant a été retrotranscrit à 42°C en présence de 2.5 mM de MgCl_2 en utilisant une amorce spécifique à NHE1 (310; 5'-TgggAgTATgCgCTCggAAgg), la trousse de synthèse d'ADN de Boeringher-Mannheim et deux unités de la transcriptase inverse MuLV. Un volume correspondant à 1/10^{ème} du milieu réactionnel contenant le cDNA a été utilisé ainsi que des amorces spécifiques à NHE1 (amorce antisens 310 (5'-TgggAgTATgCgCTCggAAgg) et sens biotinylée 503-B (5'-gggCTgCTgCCtgTTCTCAgg)). Le fragment amplifié et biotinylé de 1785pb a été isolé par des billes magnétiques couplées à la streptavidine et dénaturé dans 0.1N de NaOH. Le fragment

d'ADN ainsi isolé a été séquencé en utilisant la trousse Pharmacia (qui utilise la méthode décrite par Sanger (320)) et plusieurs amorces spécifiques de NHE1 et couvrant entièrement le domaine transmembranaire.

Immunobuvardage de type Western.

Les membranes cellulaires brutes ont été préparées à partir des cellules exprimant les variants de NHE1 ou des transfectants cultivés à 80-90% de confluence, tel que décrit précédemment (101). Afin d'éviter la dégradation des molécules de NHE1 (et des protéines en général), la préparation a été effectuée en présence d'inhibiteurs de protéase aux concentrations indiquées (leupeptine (1mM), pepstatine (1mM), aprotinine (1mM), phénanthroline (1mM), PMSF (0.1mM)). Les cellules ont été rincées deux fois par du PBS à 4°C puis une fois par de l'eau distillée. Finalement, les cellules ont été lysées par une incubation dans un milieu TE hypotonique (Tris 10mM-EDTA 1mM, pH 7.5). Les lysats ont été récupérés et centrifugés une première fois à 3000 rpm pendant 5 minutes à 4°C afin de séparer les noyaux du reste du lysat. Les surnageants ont ensuite été centrifugés à 14000rpm pendant 30 minutes à 4°C afin de précipiter les membranes cellulaires. Celles-ci sont resuspendues dans environ 200 µL de TE contenant les inhibiteurs de protéases. Après quantification des protéines présentes dans les préparations de membranes, 20µg de protéines ont été soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE (7.5% w/v) et transférés sur une membrane de nitrocellulose de type Hybond C. Les membranes ont été bloquées par du PBS-lait 5% et incubées avec l'anticorps RPc28 durant la nuit à 4°C. L'anticorps RPc28 a été produit par l'équipe de Pouysségur (321) en fusionnant les 157 derniers acides aminés du domaine C-terminal de NHE1, en immunisant un lapin avec cette protéine de fusion et finalement, les anticorps RPc28 ont été purifiés en incubant l'antisérum avec une membrane de nitrocellulose sur laquelle était transférée la protéine de fusion partiellement purifiée. La membrane de nitrocellulose hybridée avec l'anticorps primaire a ensuite été incubée avec l'anticorps secondaire préparé chez la chèvre, lequel est dirigé contre les immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase reconnaissant NHE1. Les buvardages ont été révélés en utilisant le système de détection ECL (*enhanced chemiluminescence*). Ce système utilise la peroxydase couplé à l'anticorps secondaire pour oxyder le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. La réaction émet une lumière à 428nm qui est utilisée pour impressionner un film photographique qui est finalement révélé.

Mutagenèse dirigée.

La mutagenèse dirigée a été réalisée par PCR avec le NHE1 humain cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pECE, des oligonucléotides dont les séquences sont spécifiques et identiques à NHE1 et des oligonucléotides de mutations (de 1 à 3 bases modifiées sur environ 19-21) dont les séquences sont présentées dans les différents articles présentés dans la section « Résultats », un mélange des quatre désoxyribonucléotides tris-phosphate et l'enzyme Vent® polymérase. L'oligonucléotide de mutation est un court fragment d'ADN couvrant la région du NHE1 de type sauvage contenant un ou plusieurs nucléotide(s) non-apparié(s). Sa séquence a été déterminée en s'assurant d'une homologie maximale avec le NHE1 de type sauvage. Dans un premier temps, deux réactions parallèles ont été réalisées : l'une avec une amorce sens spécifique de NHE1 et un oligonucléotide de mutation antisens, l'autre avec une amorce antisens spécifique à NHE1 et un oligonucléotide de mutation sens complémentaire de celui de la première réaction. Les réactions PCR furent réalisées par une suite de 29 cycles comprenant une phase de dénaturation de l'ADN plasmidique à 95°C, une phase de renaturation à 55°C des oligonucléotides sur les brins d'ADN plasmidique et finalement d'une phase d'élongation à 72°C des amorces sur les brins d'ADN parentaux. Les réactions ont été soumises à une électrophorèse sur gel d'agarose, les bandes de taille attendue ont été découpées du gel et l'ADN en a été extrait soit en soumettant le fragment de gel inséré dans un sac à dialyse à un champ électrique puis purifié par extraction au phénol-chloroforme, soit en utilisant une trousse d'extraction d'ADN. Les fragments d'ADN obtenus des deux réactions précédentes ont ensuite été réunis dans une même réaction PCR en présence des deux amorces spécifiques à NHE1 et en utilisant les mêmes conditions que précédemment. Après électrophorèse et purification, les fragments mutés et amplifiés ainsi que le vecteur pECE-NHE1 de type sauvage ont été digérés par l'endonucléase de restriction *AccI*. Les fragments mutés digérés par *AccI* ont été sous-clonés dans pECE-NHE1 digéré par *AccI* par l'enzyme ADN ligase T4. Les jonctions ainsi que le fragment amplifié au complet ont été séquencés afin d'écarter toute possibilité de mutations aléatoires. Ces opérations ont été effectuées pour la construction de chaque mutant présenté dans les deux publications

ainsi que pour la construction des doubles et triples mutants impliquant les M4 et 9 de NHE1, présentés dans la discussion.

Transfection et sélection des transfectants exprimant un échangeur Na^+/H^+ .

Les fibroblastes PS120 (10^5 cellules/plat de 100mm) déficients en activité d'échange Na^+/H^+ ont été ensemencés et cultivés pendant 20 heures dans du DMEM contenant 7.5% de sérum de veau, puis transfectés avec 10 μg d'ADN plasmidique contenant la séquence codante pour NHE1 de type sauvage ou muté à l'aide de la technique de co-précipitation ADN-phosphate de calcium. Quarante-huit heures après la transfection, une première charge acide a été réalisée pour sélectionner seulement les cellules exprimant à leur membrane un échangeur Na^+/H^+ actif. Les cellules ont été incubées pendant une heure à 37°C sans CO_2 dans un milieu de charge à pH 7.5 (70mM de chlorure de choline, 50mM de chlorure d'ammonium, 5mM de chlorure de potassium, 1mM de chlorure de magnésium, 1.8mM de chlorure de calcium, 5mM de glucose, 15mM HEPES), rincées rapidement par un milieu de lavage sans ammonium à pH 7.0 (120mM de chlorure de choline, 5mM de chlorure de potassium, 1 mM de chlorure de magnésium, 1.8mM de chlorure de calcium, 5mM de glucose, 15mM de MOPS) pour créer la charge acide létale aux cellules n'exprimant pas d'échangeur Na^+/H^+ actif, puis incubées pendant une heure dans un milieu de récupération à pH 7.0 contenant du sodium pour activer l'échangeur (120mM de chlorure de sodium, 5mM de chlorure de potassium, 1 mM de chlorure de magnésium, 1.8mM de chlorure de calcium, 5mM de glucose, 15mM de MOPS). Quatre à cinq tests similaires ont été réalisés sur une période de 1.5-2 semaines pour obtenir des clones de cellules surexprimant NHE1 de façon homogène. Ultérieurement, une charge acide hebdomadaire a été réalisée pour s'assurer de la stabilité de l'expression de NHE1.

Accumulation de $^{22}\text{Na}^+$.

Les sensibilités aux inhibiteurs et les affinités pour le Na^+ des différents mutants de NHE1 ont été mesurées par la technique de l'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ par les cellules. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 24 puits à une densité de 10^5 cellules/puits et cultivées pendant deux jours jusqu'à confluence. Une charge acide a été réalisée tel que décrit ci-dessus et antérieurement (106). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C, soit pendant 30 secondes (pour les mesures d'affinité pour le Na^+ , le H^+ ou le K^+ de NHE1 de type sauvage et Glu₃₄₆Asp-

NHE1), soit pendant 20 minutes (pour tous les autres mutants) ou pendant 3 min (pour les courbes dose-réponse aux inhibiteurs) dans un milieu contenant du $^{22}\text{Na}^+$ en condition traceur ($0.2\mu\text{Ci}/\text{mL}$ pour les mesures d' IC_{50} , $1\mu\text{Ci}$ pour les mesures de K_m) en présence d'ouabaïne (un inhibiteur de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ qui expulserait le $^{22}\text{Na}^+$ avant qu'il ne s'accumule et en absence d'ions K^+ , ce qui permet d'inhiber le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$). Lorsqu'indiqué, un inhibiteur cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, le bumétanide, a aussi été ajouté. Les cellules ont ensuite été rincées rapidement (moins de 15 sec) par 4 bains successifs d'une solution de NaCl 0,9 % glacée pour freiner l'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ et éviter toute fuite de $^{22}\text{Na}^+$. Finalement, les cellules ont été solubilisées par 0.1N de NaOH et la radioactivité a été quantifiée par un compteur γ . Les concentrations de protéines ont été mesurées par l'essai BCA en utilisant l'albumine comme standard. Toutes les valeurs d'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ ont été normalisées par la quantité de protéines présentes dans les essais.

Analyse des résultats.

Les valeurs d' IC_{50} et de K_m ainsi que les statistiques ont été obtenues à l'aide du logiciel Microcal Origin 6.0.

Bioinformatique.

Afin de prédire une structure probable pour NHE1, un alignement des séquences de l'échangeur Na^+/H^+ bactérien NhaA (N° d'accèsion Genbank® : 1ZCD) et de l'échangeur Na^+/H^+ humain NHE1 (P19634) a été réalisé. À cette fin, les séquences primaires de NhaA et du domaine membranaire de NHE1 ont été soumises séparément à une recherche de séquences homologues de type BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) via le site www.expasy.org (117) afin d'obtenir un maximum de séquences présentant des similarités avec NhaA ou NHE1 et ainsi donner du poids à ces similarités pour comparer, par la suite, les séquences de NhaA et NHE1. Les BLAST de NhaA et NHE1 ont ensuite été alignés grâce au logiciel ClustalW (358). L'alignement ainsi obtenu s'est seulement montré fiable au niveau des domaines transmembranaires 10 à 12 par rapport à la topologie proposée par Wakabayashi *et al.* (382). Cette faible fiabilité est due essentiellement au fait que la séquence de NHE1 est plus longue que NhaA d'environ 130 acides aminés. Chaque résultat de BLAST pour NhaA et NHE1 a donc été

édité à l'aide du logiciel Jalview (70) afin d'isoler l'ensemble des séquences homologues aux M1, M2+3, M4+5 et M6-9 de NhaA et NHE1 en accord avec les topologies résolues ou proposée par respectivement Hunte *et al.* et Wakabayashi *et al.* (163, 382). Ces domaines transmembranaires ont été rassemblés étant donné l'absence de résidus non appariés (ou « gap ») dans leurs séquences. Chaque ensemble de séquences homologues chez NhaA et NHE1 a ensuite été aligné par ClustalW (358). Par exemple, le groupe de séquences homologues aux M2+3 de NhaA a été aligné au groupe de séquences homologues aux M2+3 de NHE1. Finalement, toutes les séquences autres que NhaA et NHE1 ont été supprimées et les alignements de chaque groupe de domaines transmembranaires ont été réunis en utilisant le logiciel Swiss-PDBViewer (140).

Article 1

Sommaire

La sélection fortuite d'une population de cellules exprimant une isoforme de NHE1 extrêmement résistante à l'inhibition par le HOE694 nous a conduit à isoler et à séquencer l'ADNc de la région associée à la membrane de ce NHE1. Nous avons ainsi démontré que le phénotype de haute résistance à l'inhibition de ces cellules était dû à la présence d'une seule mutation Glu₃₄₆Asp, située dans le M9 de NHE1.

L'introduction de cette mutation dans un NHE1 de type sauvage a reproduit exactement le même phénotype, ce qui indique que cette mutation à elle seule est responsable du phénotype observé. Le profil pharmacologique de ce NHE1 mutant montre un IC₅₀ 2000 fois plus élevé pour le HOE694 par rapport au NHE1 de type sauvage et plus de 200 fois pour l'EIPA.

Afin de déterminer si la charge négative portée par le glutamate en position 346 est impliquée dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs, nous avons muté cet acide aminé en glutamine. L'IC₅₀ (pour Inhibitory Constant 50) du mutant Glu₃₄₆Gln est augmenté d'un facteur 12 par rapport au NHE1 de type sauvage, ce qui indique une certaine implication de la charge de Glu₃₄₆ dans l'interaction de NHE1 avec l'EIPA.

La mutation des acides aminés adjacents au Glu₃₄₆ ne perturbe pas la sensibilité de NHE1 à l'EIPA. Ceci semble suggérer que Glu₃₄₆ interagit directement avec l'inhibiteur au lieu de participer à l'échafaudage d'une structure tridimensionnelle propice à l'interaction des inhibiteurs.

De façon intéressante, le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 présente une diminution marquée de son affinité pour le Na⁺ par rapport au NHE1 de type sauvage. Au contraire, les affinités pour les protons du côté extracellulaire et le potassium ne sont pas différentes de celles du NHE1 de type sauvage.

Par cette étude, nous démontrons l'importance du résidu Glu₃₄₆ non seulement pour l'interaction de NHE1 avec ses inhibiteurs mais aussi pour l'affinité pour le Na⁺. De plus, nous suggérons que le Glu₃₄₆ interagit directement avec les inhibiteurs et le Na⁺.

Glutamate 346 of human Na⁺-H⁺ exchanger NHE1 is crucial for modulating both affinity for Na⁺ and interaction with amiloride derivatives

Josette Noël†, David Germain† and Julie Vadnais*

Groupe d'étude sur les protéines membranaires (GÉPROM), département de physiologie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

†These authors contributed equally to this work

Running head: Amiloride derivatives and Na⁺ binding domains of NHE1

These studies were supported by grants from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (grant OGP0194601) and the Fonds d'établissement of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

*Corresponding author:

Josette Noël, Ph.D.
Professor
GÉPROM, Département de
physiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-ville
Montréal (Québec)
CANADA H3C 3J7

Tel.: 514-343-6111, ext. 4356

Fax: 514-343-7146

E-mail: [REDACTED]

Abstract

A NHE1 variant that exhibits very high resistance to (3-methyl sulfonyl-4-piperidinobenzoyl) guanidine methane sulfonate (HOE694), a potent inhibitor of Na^+/H^+ exchangers, was selected and characterized. Sequencing of the coding region corresponding to the N-terminal domain of this variant revealed the presence of only one mutation located within membrane spanning segment 9 (M9). This base pair change modifies a glutamate (Glu) for an aspartate (Asp). We reproduced this amino acid change in the wild-type NHE1 and found that this mutation alone is responsible for the huge decrease in sensitivity to the HOE694 compound and to ethylisopropyl amiloride (EIPA). We found that the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant was more than 2000-fold more resistant to HOE694 and up to 300-fold more resistant to EIPA than was the wild-type NHE1, with the size, rather than the charge, of the amino acid in position 346 having the greatest effect. Interestingly, its affinity for Na^+ was at least 4-fold lower than that of the wild-type NHE1. Mutation of amino acids in the vicinity of Glu₃₄₆ did not change the sensitivity of mutated NHE1 proteins to inhibitors. We suggest there is a direct interaction of Glu₃₄₆ or involvement of Glu₃₄₆ in a coordination site with NHE inhibitors and with Na^+ .

List of Abbreviations

EIPA: Ethylisopropyl amiloride

HOE694: (3-methyl sulfonyl-4-piperidinobenzoyl) guanidine methane sulfonate

HR: HOE694 resistant

M: Membrane segment

MPA: Methylpropylamiloride

NHE: Na⁺/H⁺ exchanger

PS120: A lung fibroblast cell line deficient in Na⁺-H⁺-exchange activity

VSVG: Vesicular stomatitis virus glycoprotein

Introduction

To date, nine members of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger family have been cloned (see recent publications for NHE7-9 (*1-3*) and reviews for NHE1-6 (*4-7*)). Although they all catalyze an electroneutral and reversible exchange of 1 Na⁺ for 1 H⁺, they exhibit differences in cell membrane localization, tissue expression, regulation by extracellular agents, and sensitivity to amiloride and its analogs. It was the last property that first suggested to Clark and Limbird that more than one member of the Na⁺/H⁺ exchanger family is present in the kidneys and intestine (*8*), and this property is still used today to facilitate the identification of NHE isoforms in new cell types.

By using molecular tools and heterologous systems, it has been clearly shown that NHEs exhibit marked differences in sensitivity to amiloride and its derivatives, as well as to HOECHST 694 (HOE694) and HOE642 (cariporide) (*4, 9-12*), the relationship being as follows: NHE1 > NHE2 > NHE5 > NHE3 > NHE4. Other pharmacological agents such as cimetidine, clonidine and harmaline also inhibit NHEs, with NHEs showing marked differences in sensitivity (*11, 13-18*).

Upon characterization, a variant of the hamster fibroblast NHE1 was found to be 5-fold more resistant to amiloride and 30-fold more resistant to MPA than was the wild-type NHE1. This resistance was found to be conferred by the mutation Leu₁₆₇Phe within the membrane segment four (M4), which corresponds to Leu₁₆₃Phe of human NHE1 (*19*). Random mutagenesis followed by selection of resistant Na⁺/H⁺ exchangers revealed that mutation of Gly₁₇₄ in human NHE1 in serine also induces resistance to amiloride, and that the double mutation of Leu₁₆₃Phe and Gly₁₇₄Ser produces an even more resistant protein (*20*). Mutations of other amino acids of NHE1's M4, found to be present in NHE2, were also shown to modify amiloride sensitivity (*21*). Incorporating a phenylalanine, which is present in NHE3, to replace a leucine in position 163 of human NHE1, slightly decreases sensitivity to amiloride and MPA, but does not reproduce the typical pharmacological profile of NHE3 (*19*). These results suggest that although M4 is clearly involved in the interaction with inhibitors, other amino acids and possibly other membrane segments may also be involved in the interaction of NHEs with inhibitors (*19, 21*). This

hypothesis is supported by recent studies of spontaneous and revertant mutants showing that at least three other amino acids of human NHE1 M4, Phe₁₆₂, Ile₁₆₉ and Ile₁₇₀, are involved in sodium binding and in cariporide interactions (22). Furthermore, the functional analysis of conserved amino acids, and particularly polar residues of NHE1, revealed that the Glu₂₆₂ (23-25) and Asp₂₆₇ (25) part of M7 are critical to both Na⁺/H⁺ exchanger activity and 5-(N,N-hexamethylene)-amiloride (HMA) interaction. Studies using site-directed mutagenesis (25-27) and NHE1-NHE3 chimeras (15) have demonstrated that the transmembrane segment M9, particularly histidine in position 349 of human NHE1 (26), and glutamate 350 and glycine in position 356 of rat NHE1 (27), are involved in the interaction of NHE1 with inhibitors. The glutamate in position 391 of human NHE1 was also shown to be important (25), while adjacent amino acids did not seem to have an effect on NHE activity. This amino acid is part of the membrane-associated segment between M9 and M10, according to the topology proposed by Wakabayashi and co-workers (6). These observations point to the importance of many different residues within the membrane domain of NHE1 in promoting an optimal interaction of NHE1 with Na⁺ and with inhibitors. In addition, different domains of NHE1 may be associated with a *pore* region of the transporting NHE1. Recent findings support this hypothesis: we (J. Noël, unpublished results) and others (27) found synergistic effects when amino acids of both M4 and M9 were mutated. These observations are consistent with the existence of two partial transmembrane domains between M4 and M5 (IL1), and between M8 and M9 (IL2) (6). Their exact role has yet to be determined, but some mutants within IL2 have been shown to inhibit exchange activity (6).

Whereas charged amino acids exhibited the expected special significance for Na⁺ binding and transport, other hydrophobic amino acids have also been shown to be critical for optimal activity and inhibitor interaction (22). The Na⁺ binding site and Na⁺ coordination by the NHE1 protein probably involve many amino acids. Interaction of NHE inhibitors with NHEs is modified when the concentration of Na⁺ increases, suggesting that the binding sites for Na⁺ and NHE inhibitors are identical or in close proximity to each other (28). Accordingly, changes in the affinity of NHE1 for Na⁺ were expected for the above-identified mutants. However, only a few studies have in fact reported a modified affinity for Na⁺. Indeed, apart from the spontaneous NHE1-Phe₁₆₂Ser mutant that shows a dramatic impairment in Na⁺ affinity (248 vs 23 mM) (22),

only the combination of Leu₁₆₃Phe and Gly₁₇₄Ser mutations has been shown to slightly affect affinity for Na⁺ (K_m 28 mM instead of 14 mM) (20).

Having selected variants of human NHE1 that exhibits a 1500-2000 fold decrease in sensitivity to HOE694 and a 200-fold decrease to MPA, the purpose of this study was to determine whether this high-resistance phenotype could be explained by the presence of mutated amino acid(s), and whether this highly amiloride-resistant mutant exhibits a modified affinity for Na⁺. Sequencing of the entire transmembrane region of the NHE1 variant revealed the single Glu₃₄₆Asp mutation. We reproduced this mutation in the wild-type NHE1 by site-directed mutagenesis, then studied the sensitivity of this protein to HOE694 and to other amiloride analogs, as well as its affinity for extracellular Na⁺, Li⁺, H⁺ and K⁺. Our results indicate that the Glu₃₄₆Asp mutation induces a significant change in the interaction of amiloride derivatives with NHE1, and also a significant change in the affinity of NHE1 for Na⁺. It is noteworthy that the fibroblast NHE1 transfected HR300 variant identified as the NHE1-Glu₃₄₆Asp allowed us to identify glutamate in position 346 as a highly critical amino acid involved in NHE1 interaction with Na⁺ and its NHE inhibitors. This very important role of glutamate 346 was further confirmed by demonstrating that mutation of amino acids in close proximity to Glu₃₄₆ did not affect sensitivity to inhibitors.

Data related to the identification of the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant were previously presented in abstract form at the American Society of Nephrology (29).

Experimental Procedures

Material. $^{22}\text{NaCl}$, ^{32}P -dCTP and ^{32}S -alpha-dATP were purchased from DuPont NEN (Boston, MA). Hybond N and Hybond C extra were purchased from Amersham Corp./USB (Oakville, ON). BioProbe[™] RNA reagent kit and purified biotinylated-503 primer were purchased from Eurogentec (Seraing, ON). Restriction enzymes, heat resistant Vent^R polymerase and MuLV reverse transcriptase were obtained from New England Biolabs, Inc (Beverly, MA). Streptavidin-linked magnetic beads were purchased from Dynal (A.S. Oslo, Norway). Amiloride, Methylpropylamiloride (MPA), Ethylisopropylamiloride (EIPA), trypsin-EDTA, ampicillin, Cool calf serum (CS), ouabain and cimetidine were obtained from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). The (3-methyl sulfonyl-4-piperidinobenzoyl) guanidine methane sulfonate (HOE694) compound was kindly provided by Dr. Hans J. Lang (Hoechst AG, Frankfurt am Main, Germany). We used the NHE1 polyclonal antibody (RPc28 antibody) that recognizes the last 157 amino acids at the C-terminus of human NHE1 (30), and the P4D5 antibody that recognizes the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVG) epitope. Horseradish conjugated goat anti-rabbit IgG was obtained from Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA), and DMEM high glucose from Canadian Life Technologies, Inc. (Burlington, ON). The BCA kit for determining protein concentration was from Pierce (Rockford, IL). All other chemicals and reagents used in these experiments were purchased from Fisher Scientific (Nepean, ON), and were of the highest quality available.

Cell lines and culture. PS120 is a Chinese hamster lung fibroblast clone that lacks Na^+/H^+ exchange activity (18) and was derived from the CCL39 cell line (ATTC). These cells were transfected with wild-type human NHE1 or mutated NHE1 cDNAs (see below). Fibroblasts expressing the VSVG-tagged NHE3 isoform (31) were cultured and studied in parallel. Modified Eagle's medium (H21, Gibco) containing 25 mM NaHCO_3 was supplemented with penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 7.5% cool calf serum (CS). Cells were grown at 37°C in the presence of 5% CO_2 .

Selection of HOE694-resistant variants. PS120 lung hamster fibroblasts expressing the wild-type human NHE1 were submitted to repeated acid loadings in the presence of 50 mM NH_4Cl at

37°C, and in the absence of bicarbonate and CO₂, as reported previously (19). After incubation for 1 hour, the cells were quickly washed in a sodium-free medium and incubated for 1 hour at 37°C in a recovery medium, in the absence of CO₂ and in the presence of 120 mM NaCl, with or without 30 µM HOE694, to inhibit NHE1 activity (31). After removal of this artificial medium, a bicarbonate (sodium) and calf serum containing DMEM medium (pH 7.4) was added and the cells incubated at 37°C in the presence of CO₂ to let them recover.

In these conditions, more than 99% of the cells died after the first test. Few colonies nevertheless survived to three similar acid loading procedures performed every 2-4 days. Although obtaining more than one colony could appear surprising, these different colonies may come from identical cells issued from one original colony or represent cells expressing large amount of wild-type NHE1 that resist to 30 µM HOE694 (31). Cells were then trypsinized and submitted to an acid load with recovery in the presence of 100 µM HOE694 to insure that no sensitive (wild-type) cells were hidden by resistant ones and to allow a complete blockade of NHE1 exchange activity. Following two more acid loading procedures in the presence of 100 µM HOE694, many colonies resisted. They were again trypsinized and submitted to 3 acid loading procedures in the presence of 300 µM HOE694 in the recovery medium. This cell population following trypsination was stable, no cells dying following repeated acid loading procedure. Finally, the same protocol was repeated in the presence of 1000 µM HOE694, the overall procedure was over a three-week period. The different cell populations were named after their HOE694-resistant phenotype : HR100, HR300 and HR1000, respectively. After each step in the selection process, resistant cells were frozen at -80°C until further analysis. A very stable resistance to very high inhibitor concentrations was observed for the HR100 and HR300 cell populations, but many cells within the HR1000 population lost their resistance and died during the selection process.

Northern Blot analysis. Total RNA was obtained from cells expressing the NHE1 variants using the BioProbetm kit, then submitted to agarose electrophoresis in denaturing formaldehyde conditions, transferred to Hybond N nitrocellulose membranes, and probed at 65°C for 16 hours with the ³²P-dCTP labelled 570 bp *PstI-SacI* NHE1 insert or the ³²P-dCTP labelled 1290 bp *PstI-EcoRI* NHE3 insert. We loaded 30 µg of total RNA onto the gel.

RT-PCR. Total RNA (1 µg) extracted from the wild-type NHE1 and NHE1 variants was reverse transcribed at 42°C in the presence of 2.5 mM MgCl₂ using a specific NHE1-encoding primer

(310; 5'-TgggAgTATgCgCTCggAAgg), the Boehringer Mannheim cDNA synthesis kit, and 2 units of the MuLV reverse transcriptase. PCR was done on one-tenth of the cDNA reaction mixture using the anti-sense NHE1 primer 310 and a biotinylated sense NHE1 primer (503-B; gggCTgCTgCCTgTTCTCagg). The amplified 1785 bp biotinylated fragment was isolated with streptavidin-linked magnetic beads, denatured in 0.1 N NaOH, and the trapped biotinylated single strand cDNA was sequenced according to the manufacturer's recommendations (Pharmacia kit) using specific human NHE1 primers covering the entire transmembrane domain (32).

Western Blot analysis. Crude membranes were prepared in the presence of protease inhibitors from stable NHE1 variants or stable transfectants grown to 80-90% confluency, as described previously (23). A total of 20 μ g of protein was loaded in each lane. Proteins were separated by SDS-PAGE (7.5% w/v) and electrophoretically transferred to Hybond C extra supported membranes. Membranes were blocked as described previously. The proteins were incubated with RPe28 antibodies overnight at 4°C, then revealed with horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibodies. The Western Blots were developed using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system.

Site-directed mutagenesis. Site-directed PCR mutagenesis was performed with human NHE1, specific base pair oligonucleotides (Table 1) and high fidelity temperature-resistant Vent[®] polymerase. The amplified fragments were digested by the *AccI* restriction enzyme and subcloned back in the eukaryote compatible pECE vector containing the full length digested wild-type NHE1. The fragment junctions, as well as the entire PCR-generated cDNA fragments, were sequenced to ensure no random mutations had been introduced during the amplification procedure.

Transfection and selection of stable Na⁺/H⁺ exchanger expressing transfectants. PS120 fibroblasts (1 x 10⁵ cells per 100 mm plate) deficient in Na⁺/H⁺ exchanger activity were plated and cultured in 7.5% CS containing DMEM for 20 hours, then transfected with 10 μ g of plasmid containing wild-type or mutated NHE1 encoding cDNAs using the calcium phosphate-DNA co-precipitation technique (33). Forty-eight hours following transfection, a first acid loading test (see above and (34)) was performed to select only cells expressing an active membrane-bound Na⁺/H⁺ exchanger. Four other similar tests were performed over a 2-week period to obtain cells

homogeneously over-expressing the NHE1 proteins. Subsequently, an acid-loading procedure was performed every 1-2 weeks to insure the stability of NHE1 expression.

$^{22}\text{Na}^+$ uptake. $^{22}\text{Na}^+$ uptake was measured on fibroblasts seeded in 24-well plates at 1×10^5 cells/well and grown for 2 days to confluence. An acid-load was generated by the NH_4^+ -prepulse technique, as previously described (23, 31, 34, 35). Cellular $^{22}\text{Na}^+$ accumulation was stopped, as required, after incubating at 37°C for 30 sec (for Na^+ , H^+ and K^+ affinity experiments) or 3 min (for dose-response curves) by four rapid washes in ice-cold saline. Cells were solubilized with 0.1 N NaOH and radioactivity was counted in a γ -spectrometer. Protein concentration was measured using the BCA assay with albumin as the standard.

Results and Discussion

Pharmacological profiles of the spontaneous NHE1 variant. PS120 cells expressing the NHE1 isoform and that had, quite unexpectedly, survived the five acid loading procedures performed in presence of either 100, 300 or 1000 μM HOE694 in the recovery medium, were studied for their transport activity in the presence of different concentrations of NHE inhibitors—amiloride, MPA and HOE694. For comparison purposes, we also examined PS120 cells expressing the wild-type NHE1.

Figure 1A presents the pharmacological profile for amiloride of the wild-type NHE1 and NHE1 variants resistant to 100 μM HOE694 (HR100) and to 300 μM HOE694 (HR300). For clarity, the HR1000 data were not included since the inhibitory profiles were identical to those of HR300 in addition to the lack of stability of this population. Figure 1 shows that the HR300 variant was much more resistant to NHE inhibitors than was the wild-type NHE1 for all three inhibitors, and that the difference in sensitivity was specific to each inhibitor. The difference in sensitivity was especially astonishing for the HOE694 compound (Figure 1B), the IC_{50} being around 1000-2000 fold that of the wild-type NHE1. These results reflect differences in inhibitor conformation and, based on previous studies (19-21), suggest differences in interaction with specific amino acids of NHE1. This is the first time that such a significant difference in sensitivity to NHE inhibitors compared to that of the wild-type NHE1 has been observed. The IC_{50} of the HR300 variant to the HOE694 compound is in fact very close to the IC_{50} of the amiloride-resistant NHE3 for this inhibitor (10, 36).

The HR100 population, which is resistant to 100 μM HOE694, tended to be less resistant than the HR300 population, and the flattened curve suggests a mixed population of Na^+ -transporting molecules. This population was not analyzed further. Similarly, since the HR1000 population presented a less stable phenotype in the presence of the HOE694 compound, only the HR300 was further characterized.

mRNA and protein content of the HR variant. Figure 2A shows that the acid selection pressure induced a progressive increase in NHE1 variant mRNAs. Indeed, more NHE1 mRNAs were found in cells submitted to an acid loading and selected for 3 weeks in the presence of 300 μM

HOE694 than in those selected with 100 μM HOE694 for 1.5 weeks. The same observation is true for the HR1000 variant. Similarly, the NHE1 content increased progressively for HR100, HR300 and HR1000 variants after the selection procedure (Figure 2B). Gene amplification is probably responsible for this phenomenon, as demonstrated earlier (19). Since the sensitivity of the HR300 variant to NHE inhibitors is similar to that of NHE3-VSVG (31), RNA and proteins were extracted from HR300-expressing cells in order to confirm that this HOE694 resistant phenotype was not due to the presence of NHE3 mRNA and NHE3 proteins in the resistant cells, or to NHE3-expressing cells contaminating the HR300 cell population. The results presented in Figure 2 clearly show that this was not the case.

Identification of the mutation responsible for the HOE694 resistant phenotype in HR300 cells.

Only the HR300 variant was studied further. By sequencing the near complete transmembrane domain of NHE1 corresponding to nucleotides 150 to 1600, only one nucleotide was found to be modified in the HR300 variant, when compared to the sequence of the human wild-type NHE1 published by Sardet *et al.* (37), a cytosine replacing a guanosine in position 1038 from the ATG codon. This modification prevents a PCR fragment amplified by RT-PCR from total HR300 RNA to be cleaved by *SacI* in position 1040 (data not shown). This base pair modification leads to only a minor amino acid change, an aspartic acid replacing a glutamic acid, which is, according to the recently adopted nomenclature (6), located in position 346 of segment M9. This amino acid change is very conservative relative to its molar volume (91 vs 109 Å), negative charge and pKa values (4.5 vs. 4.6, respectively). This result is surprising; it means that the high resistance phenotype is due to an aspartate replacing the glutamate in position 346 of human NHE1. A similar IC_{50} shift was found upon mutating, by site-directed mutagenesis, the glutamate in position 350 of rat NHE1 (27).

Site-directed mutagenesis of NHE1-E₃₄₆ and its surrounding amino acids in M9. To confirm that the mutation Glu₃₄₆Asp alone is responsible for the phenotype of high resistance to amiloride analogs observed in the HR300 variant, we introduced (by PCR) the Glu₃₄₆Asp mutation in the wild-type human NHE1 by modifying only the guanosine at position 1038 for a cytosine. Using the calcium phosphate precipitation procedure, cDNA encoding for this NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant was transfected in PS120 fibroblasts deficient in membrane-bound Na^+/H^+ exchange activity

(33), and stable cell transfectants over-expressing NHE1 were selected by using the acid loading selection procedure described in Experimental Procedures.

The mutagenized NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant is equally resistant to MPA and HOE694 (Figure 3) than the HR300 variant shown in figure 1. A high resistance to EIPA was also observed. For this latter inhibitor, the IC₅₀ ratio relative to the wild-type NHE1 (IC₅₀ = 0.027 ± 0.002 μM) increased 300-fold. Together, these results unequivocally confirm that the highly resistance phenotype observed for the HR300, and most probably for the other variants, was a consequence of a single point mutation substituting the glutamate in position 346 of NHE1 for an aspartate.

When comparing the amino acid sequence of M9 of NHE1 and NHE3, a glutamate was found along all the other NHE isoforms, and not an aspartate, as could be expected from our observations. These results thus indicate that despite the similar sensitivity of NHE1-Glu₃₄₆Asp and NHE3 proteins to inhibitors, the glutamate in position 346 of NHE3 cannot alone be responsible for this highly resistant phenotype. Indeed, chimera analysis (15) and the initial results of site-directed mutagenesis (19) suggest that the high resistance to NHE inhibitors must be due to more than one domain or amino acid of NHE3 being involved in interactions with inhibitors. A combination of amino acids within the same membrane segment or between different segments may be responsible for creating a specific conformation.

To determine if the glutamate in position 346 of NHE1 interacts directly with inhibitors or Na⁺ or is part of a conformational architecture that favors interaction with the inhibitors, we introduced mutations at the sites closest to Glu₃₄₆, i.e. Leu₃₄₃, Ala₃₄₅ and Leu₃₄₇. Two amino acids were chosen for each site: the structurally similar glycine and the bulky tryptophan for Ala₃₄₅, and valine and tryptophan for Leu₃₄₃ and Leu₃₄₇. The mutated NHE1s were selected as described above, and dose-response curves were determined for EIPA and HOE694. As shown in Table 2, none of the mutations induced a shift in the IC₅₀. These results were expected for mutations that induce a slight structural change (Ala₃₄₅Gly and Leu_{343, 347}Val), but were surprising for the mutations, Ala₃₄₅Trp and Leu_{343, 347}Trp. Indeed, tryptophan is a large amino acid with a molar volume of 163 Å³, compared to 67 Å³ and 124 Å³ for Ala and Leu, respectively. We therefore expected that introducing tryptophan into the primary sequence would, by evoking a conformational change, interfere with the NHE1 interaction with inhibitors, especially in close proximity to Glu₃₄₆. The fact that the mutations of amino acids adjacent to ₃₄₆ had no effect on transport activity and on sensitivity to inhibitors confirms that Glu₃₄₆ is critical for the interaction

of NHE1 with inhibitors. Furthermore, these results suggest that the decreased affinity of inhibitors for NHE1 is due to an altered interaction between Glu₃₄₆Asp and inhibitors. Indeed, if this mutation has induced a conformational change in the structure, the mutated amino acids near Glu₃₄₆ should also have induced such a change, but this was not the case, so a direct interaction should be considered. Our results are in agreement with those of Murtazina *et al.* (25) who, by modifying the amino acids closest to amino acid 391, found no effect of these mutations on NHE activity.

To determine if the charge of the amino acid in position 346 plays a significant role in interaction with inhibitors or Na⁺, the charge (pKa 4.6) was neutralized by introducing a glutamine (Gln). This mutant (exhibiting an IC₅₀ of 0.35 ± 0.17 μM to EIPA (Table 2)) was 10 times more resistant than the wild-type NHE1 but 20 times more sensitive than the Glu₃₄₆Asp. We conclude from this mutant that the charge and size of the amino acid in position 346 is critical for the interaction of NHE1 with inhibitors. Surprisingly, these results indicate that since the pKa of Glu and Asp are similar, the size of the amino acid is more influential than the charge in insuring an optimal interaction with inhibitors. These results are in accord with Khadilkar *et al.*'s findings for rat NHE1, which show that mutating Glu₃₅₀ in glutamine significantly reduces the sensitivity of the protein for inhibitors but does not interfere with its affinity for Na⁺ (27).

Affinity for Na⁺: In contrast to previous observations concerning mutations L₁₆₃F, G₁₇₄S or H₃₄₉G that showed no change in affinity for Na⁺ despite significant changes in sensitivity to NHE inhibitors, we found that the single mutation Glu₃₄₆ASP significantly affects the affinity of the NHE1 protein for Na⁺ (Figure 4). Indeed, the Km for Na⁺ of the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant is 4-fold higher (~68 mM) than that for the wild-type NHE1 (~18 mM). In contrast, no significant change in Li⁺ affinity was observed for the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant (data not shown). Touret *et al.* made a similar observation for the extremely resistant cariporide revertants (22). These results, along with those presented in this study, suggest that the amino acid Glu₃₄₆ within the M9 domain appears to be sufficient to modify on a very local basis the conformation of the protein, or at least its direct interaction with Na⁺ and its competitive inhibitors. These results again confirm the importance of Glu₃₄₆. Furthermore, these results correlate with the idea that Na⁺ and inhibitors share the same binding site or at least are located in some overlapping binding sites

(27). Indeed, considering that the hydrated Na^+ and the guanidinium group of amiloride are very similar in their shape and size, a competitive behavior could be proposed between Na^+ and inhibitors (10). Later Counillon *et al.* identified a double mutant NHE1-L₁₆₃F/G₁₇₄S presenting a 22-fold decreased affinity for HOE694 and a 2-fold decrease in Na^+ affinity (20). More recently, Touret *et al.* found a NHE1-F₁₆₂S mutant in which both the cariporide and the Na^+ affinities are impaired (22). In fact, in this work, two revertants F₁₆₂S/I₁₆₉S and F₁₆₂S/I₁₇₀T restored the Na^+ affinity but not the affinity for cariporide. These results sustained the idea of a shared binding site whereas the results provided by the revertants rather suggest a distinct binding site. Furthermore, some works have reported results suggesting that the binding sites for Na^+ and inhibitors should be distinct. Among these studies, Wang *et al.* found a NHE1-H₃₄₉G mutant which presents a 2.4- and 4.5-fold decrease in amiloride and EIPA sensitivity, respectively, whereas its affinity for Na^+ was unaltered (26). For an integrated view of these studies see review by Harris *et al.* (28). These results are corroborated by studies using the radiolabeled amiloride derivatives methylisobutylamiloride (MIA), which revealed that the Na^+ does not reduce the binding of the labeled inhibitors to the NHE (38). So, although it is more and more accepted that the Na^+ and inhibitors binding sites are physically distinct, some clues support an overlapping binding site.

Affinity for H^+ . As previously demonstrated, the Na^+/H^+ exchange is a reversible transport event (34, 39-43). H^+ in the uptake medium (out) could interact or compete with the extracellular site for Na^+ and modify $^{22}\text{Na}^+$ transport activity. Figure 5A shows that, in accord with previous findings (13, 22, 34) an acidic extracellular pH decreased the Na^+/H^+ exchange activity of NHE1 expressed in PS120 cells. Since Paris *et al.* showed that extracellular H^+ competitively inhibit the extracellular Na^+ stimulation of H^+ release (39) a mutation such as Glu₃₄₆Asp decreasing the affinity for Na^+ should likely impair the affinity for extracellular H^+ . The response of the Glu₃₄₆Asp mutant to a modification of the external pH was very similar to the wild-type NHE1 in the pH range studied (6.0 to 8.4). Our observations and results previously published (13, 22) thus support the idea that the binding sites for extracellular Na^+ and H^+ are not necessarily the same but could overlap like those of Na^+ and inhibitors. Alternatively, due to their respective size, Na^+ and H^+ may react differently to change in amino acid at that position. The H^+ ion being smaller than the Na^+ ion, H^+ could lodge more easily within the Na^+ binding site of the NHE1-Glu₃₄₆Asp than Na^+ . The observations of Touret *et al.* support this interpretation. The NHE1-F₁₆₂S mutant

presents a K_m for Na^+ impaired by a factor of 10 compared to the wild-type NHE1 while the K_m for both Li^+ and H^+ remained unchanged (22).

Affinity for K^+ . It has been reported that the amiloride-sensitive NHE1 and the amiloride-resistant isoform NHE3 differ in their sensitivity to potassium—the activity of NHE1 is inhibited in high concentrations of potassium, while that of NHE3 is unaffected (15). K^+ ions were reported to compete with Na^+ for the same binding site on NHE1 but are not transported. We wanted to determine whether the Glu₃₄₆Asp mutation, modifying the interaction with Na^+ , could also change the interaction of NHE1 with K^+ . We examined how varying the concentration of potassium in the uptake medium affected the activity of the wild-type NHE1 and the Glu₃₄₆Asp mutant expressed in PS120 fibroblasts (Figure 5B). The response of these two stable transfectants to modification of the potassium concentration was identical (Figure 5B). No change in the activity was observed up to 50 mM potassium for both the mutant and wild-type NHE1. Our results for the wild-type NHE1 contrast with those of Orłowski *et al.* (15), even though we followed the same protocol (bumetanide to inhibit a potential $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$ transporter). A species difference may, however, explain these differences since we used human NHE1 cDNA while these authors used rat NHE1 cDNAs. Small changes in amino acid sequences between rat and human NHE1 could modify some interactions between amino acids and explain these differences. Structure-function studies of NHEs from different species, particularly from human NHEs, are therefore crucial in providing new insights into structural relationships between NHEs and inhibitors that will foster drug development.

In summary, a spontaneous variant of NHE1 that exhibits a huge increase in resistance to amiloride and its derivatives (up to 2000X) has been isolated and characterized. The amino acid responsible for the phenotype of high resistance has been identified, an aspartate replacing a glutamate in position 346. Since our research shows that mutations of Leu₃₄₃, Ala₃₄₅, Leu₃₄₇ for bulky amino acids do not affect the sensitivity of mutated NHE1 proteins for EIPA, the hypothesis of a major conformation change is not valid. Together with the observation that the mutant NHE1-Glu₃₄₆Asp presents a significant difference in affinity for Na^+ , but not for H^+ and K^+ , compared to the wild-type protein, our results support the idea that competitive inhibitors and Na^+ interact with the same binding site(s) or with separated binding sites in close proximity to each other. Amino acid Glu₃₄₆ of M9 takes part of this binding site. A detailed mutagenesis study is in progress in order to understand how Glu₃₄₆ is involved in the interaction of NHE1

with inhibitors and/or Na^+ by introducing amino acids of different physical characteristics. The results presented above, by identifying the amino acid Glu_{346} within M9 as a crucial amino acid involved in interaction with both inhibitors and Na^+ , should contribute to the development of more specific and more potent drugs for therapeutic use.

Acknowledgements

The selection and identification of the HR300 variant was done at the Jacques Pouysségur Laboratory, Centre de Biochimie-CNRS, Université de Nice, Nice, France, when J.N. was a fellow. We thank J.P. for the numerous stimulating discussions, his enthusiasm and his confidence in the project. The participation of Stephane Rocci in the early stages of this project was also greatly appreciated. J.N. is a FRSQ Research Scholar. We thank Claude Gauthier for his expert graphic support, and Ivan Robert Nabi for his critical reading of the manuscript.

References

1. Nakamura, N., Y., T., Inoue, H., and Kanazawa, H. (2002) *Mol Biol Cell*.
2. Numata, M., and Orłowski, J. (2001) *J Biol Chem* 276, 17387-94.
3. Goyal, S., Vanden Heuvel, G., and Aronson, P. S. (2003) *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F467-473.
4. Orłowski, J., and Grinstein, S. (1997) *J Biol Chem* 272, 22373-22376.
5. Counillon, L., and Pouyssegur, J. (2000) *J Biol Chem* 275, 1-4.
6. Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X., and Shigekawa, M. (2000) *J Biol Chem* 275, 7942-7949.
7. Noël, J., and Pouyssegur, J. (1995) *Am J Physiol Cell Physiol* 37, C283-C296.
8. Clark, J. D., and Limbird, L. E. (1991) *Am J Physiol Cell Physiol* 261, C945-C953.
9. Chambrey, R., Achard, J. M., and Warnock, D. G. (1997) *Am J Physiol Cell Physiol* 272, C98.
10. Counillon, L., Scholz, W., Lang, H. J., and Pouyssegur, J. (1993) *Mol Pharmacol* 44, 1041-1045.
11. Szabo, E. Z., Numata, M., Shull, G. E., and Orłowski, J. (2000) *J Biol Chem* 275, 6302-6307.
12. Tse, C. M., Levine, S., Yun, C., Brant, S., Counillon, L., Pouyssegur, J., and Donowitz, M. (1993) *J Memb Biol* 135, 93-108.
13. Orłowski, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16369-16377.
14. Kulanthaivel, P., Furesz, T. C., Moe, A. J., Smith, C. H., Mahesh, V. B., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (1992) *Biochem J* 284, 33-38.
15. Orłowski, J., and Kandasamy, R. A. (1996) *J Biol Chem* 271, 19922-19927.
16. Wakabayashi, S., Bertrand, B., Ikeda, T., Pouyssegur, J., and Shigekawa, M. (1994) *J Biol Chem* 269, 13710-13715.
17. Wakabayashi, S., Bertrand, B., Shigekawa, M., Fafournoux, P., and Pouyssegur, J. (1994) *J. Biol. Chem* 269, 5583-5588.
18. Wakabayashi, S., Ikeda, T., Noël, J., Schmitt, B., Orłowski, J., Pouyssegur, J., and Shigekawa, M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 26460-26465.
19. Counillon, L., Franchi, A., and Pouyssegur, J. (1993) *Proc Natl Acad Sci* 90, 4508-4512.

20. Counillon, L., Noël, J., Reithmeier, R. A. F., and Pouysségur, J. (1997) *Biochemistry* 36, 2951-2959.
21. Yun, C. H. C., Little, P. J., Nath, S. K., Levine, S. A., Pouysségur, J., Tse, C. M., and Donowitz, M. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 193, 532-539.
22. Touret, N., Poujeol, P., and Counillon, L. (2001) *Biochemistry* 40, 5095-101.
23. Fafournoux, P., Noël, J., and Pouysségur, J. (1994) *J Biol Chem* 268, 2589-2596.
24. Denker, S. P., and Barber, D. L. (2002) *J. Cell Biol.* 159, 1087-1096.
25. Murtazina, R., Booth, B. J., Bullis, B. L., Singh, D. N., and Fliegel, L. (2001) *Eur J Biochem* 268, 4674-85.
26. Wang, D., Balkovetz, D. F., and Warnock, D. G. (1995) *Am J Physiol Cell Physiol* 269, C392-C402.
27. Khadilkar, A., Iannuzzi, P., and Orłowski, J. (2001) *J Biol Chem* 276, 43792-43800.
28. Harris, C., and Fliegel, L. (1999) *Intern.J.Mol.Med.* 3, 315-321.
29. Germain, D., and Noël, J. (2000) *J Am Soc Nephrol* 11, 4A.
30. Sardet, C., Counillon, C., Franchi, A., and Pouysségur, J. (1990) *Science* 247, 723-726.
31. Noël, J., Roux, D., and Pouysségur, J. (1996) *J Cell Sci* 109, 929-939.
32. Lifton, R. P., Hunt, S. C., Williams, P. R., Pouysségur, J., and Lalouel, J. M. (1991) *Hypertension* 17, 8-14.
33. Davis, L. G., Dibner, M. D., and Battey, J. F. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
34. Franchi, A., Cragoe, E., and Pouysségur, J. (1986) *J Biol Chem* 261, 14614-14620.
35. Noël, J., Roux, D., and Pouysségur, J. (1993) *Biochem Cell Biol* 71, A18.
36. Orłowski, J., Kandasamy, R. A., and Shull, G. E. (1992) *J Biol Chem* 267, 9331-9339.
37. Sardet, C., Franchi, A., and Pouysségur, J. (1989) *Cell* 56, 271-280.
38. Dixon, S., J., Cohen, S., Cragoe, E. J., and Grinstein, S. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 3626-3632.
39. Paris, S., and Pouysségur, J. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 3503-3508.
40. Kinsella, J., and Aronson, P. S. (1980) *American Journal of Physiology* 238, F461-F469.
41. Kinsella, J. L., and Aronson, P. S. (1982) *Biochim.Biophys.Acta* 689, 161-164.
42. Aronson, P. S., Suhm, M. A., and Nee, J. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 6767-6771.

43. Franchi, A., Perucca-Lostanlen, D., and Pouysségur, J. (1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 9388-9392.

Figure captions

Figure 1

Pharmacological profiles of HOE694-resistant NHE1 variants to NHE inhibitors, compared to the wild-type NHE1. NHE1-expressing PS12O cells (NHE1, □) and selected cell populations resistant to 100 μM (HR100, ○) and to 300 μM HOE694 (HR300, Δ) in the Na⁺-containing recovery medium were analyzed for their Na⁺/H⁺ sensitivity to amiloride (A), HOE694 (B) and MPA (C). The maximal Na⁺/H⁺ exchanger activity was measured in the near absence of cold external Na⁺ and is expressed here as the percent of ²²Na⁺ accumulation in the absence of inhibitors. The data are means of values obtained from two independent experiments performed in triplicate.

Figure 2

RNA and protein content analysis of HR100, HR300, HR1000 mutants and wild-type NHE1 and NHE3-VSVG expressing cells. A) Northern Blot analysis of total RNA isolated from HR100, HR300 and HR1000 mutants probed with NHE1-(upper panel) and NHE3-(middle panel) specific probes, compared with the wild-type NHE1. Ethidium bromide coloration (lower panel) is presented as a loading control. B) Western Blot analysis of crude membrane proteins isolated from stable HR100, HR300 and HR1000 mutants probed with antibodies recognizing the NHE1 epitope or the VSVG tag grafted to NHE3, compared with the wild-type NHE1. The data are representative results from three similar experiments.

Figure 3

Pharmacological profiles of the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant to NHE inhibitors. PS12O cells transfected with the mutated NHE1-Glu₃₄₆Asp cDNA and selected for their Na⁺/H⁺ exchanger activity were analyzed for their transport activity in the presence of different concentrations of MPA (■), EIPA (▲) (dotted line) and HOE694 (●). The activity is expressed as the percent of ²²Na⁺ accumulation in the absence of inhibitors. The data are presented as the average of values

obtained from three to eight independent experiments performed in triplicate. The normalized intrinsic activity of NHE1-Glu₃₄₆Asp is quite similar to the wild-type NHE1 (data not shown).

Figure 4

Determination of the affinity of the NHE1-Glu₃₄₆Asp mutant for Na⁺. Wild-type (■) and NHE1-Glu(●) cells were analyzed for their transport activity in the presence of different concentrations of external NaCl. The ²²Na⁺ accumulation was performed in the presence of the tracer for only 30 sec. The transport activity is expressed as the percent of cpm accumulated in cells in the absence of cold NaCl, as a function of NaCl concentration expressed in a logarithmic scale. With this method, the concentration of NaCl corresponding to 50% of the maximal Na⁺/H⁺ exchange activity (K_{m Na+}) can be directly determined in the figure or obtained from curve fitting analysis. K_m was 17.5 ± 3.4 (n=4) for wild-type NHE1, and 67.6 ± 6.3 (n=4) for NHE1-.

Figure 5

The effects of varying extracellular H⁺ and K⁺ concentrations on Na⁺/H⁺ exchange activity of wild-type and NHE1-proteins. Wild-type (■, solid line) and NHE1-Glu₃₄₆Asp (●, dashed line) cells were analyzed for their transport activity in the presence of different concentrations of external H⁺ (varying pH out) (A) and KCl concentrations (B). The ²²Na⁺ accumulation was performed in the presence of tracer for only 30 sec. The amount of ²²Na⁺ accumulated in cells and sensitive to 1 mM MPA was expressed as the percent of maximal ²²Na⁺ accumulation at pH 8.0 (A) or in the absence of external KCl (B). The data are means of values obtained from two to four independent experiments performed in triplicate.

Figures

Table 1. List of amino acid substitutions engineered in wild-type human NHE1

Mutation	Codon change	Oligonucleotides (sense)
Leu ₃₄₃ Val	TTG ⇒ GTC	5' GC TAC ATG GCC TAC GTC TCA GCC GAG CTC 3'
Leu ₃₄₃ Trp	TTG ⇒ TGG	5' GC TAC ATG GCC TAC TGG TCA GCC GAG CTC 3'
Ala ₃₄₅ Gly	GCC ⇒ GGC	5' G GCC TAC TTG TCA GGC GAG CTC TTC CAC CTG 3'
Ala ₃₄₅ Trp	GCC ⇒ TGG	5' G GCC TAC TTG TCA TGG GAG CTC TTC CAC CTG 3'
Glu ₃₄₆ Asp	GAG ⇒ GAC	5' TTG TCA GCC GAC CTC TTC CAC 3'
Glu ₃₄₆ Gln	GAG ⇒ CAG	5' TTG TCA GCC CAG CTC TTC C 3'
Leu ₃₄₇ Val	CTC ⇒ GTC	5' C TTG TCA GCC GAG GTC TTC CAC CTG TCA GG 3'
Leu ₃₄₇ Trp	CTC ⇒ TGG	5' GCC TAC TTG TCA GCC GAG TGG TTC CAC CTG TCA GGC 3'

Table 2. IC₅₀ values of NHE1 mutants for EIPA

NHE1 mutant	IC₅₀ for EIPA (μM) (n)
Wild-type NHE1	0.03 ± 0.003 (8)
Leu ₃₄₃ Val	0.03 ± 0.001 (3)
Leu ₃₄₃ Trp	0.04 ± 0.002 (3)
Ala ₃₄₅ Gly	0.07 ± 0.005 (3)
Ala ₃₄₅ Trp	0.04 ± 0.006 (3)
Glu ₃₄₆ Asp	7.52 ± 1.937 (8)
Glu ₃₄₆ Gln	0.35 ± 0.17 (3)
Leu ₃₄₇ Trp	0.03 ± 0.003 (3)

Figure 1

Figure 1

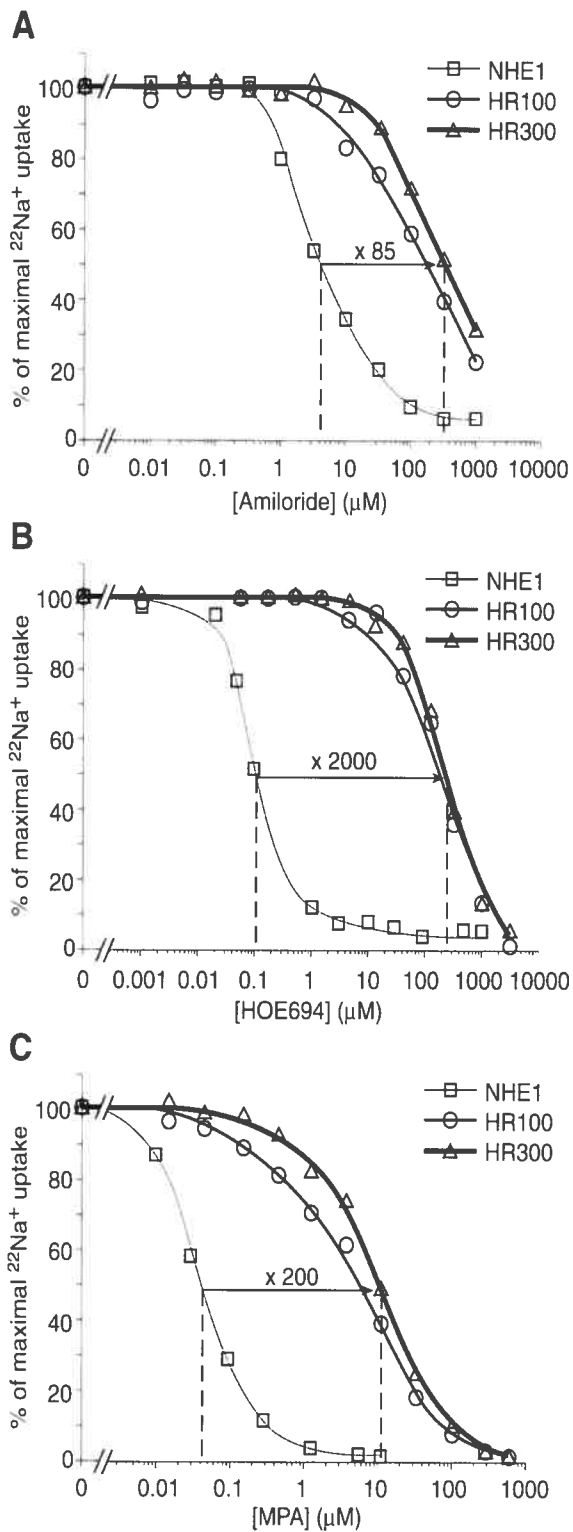


Figure 2

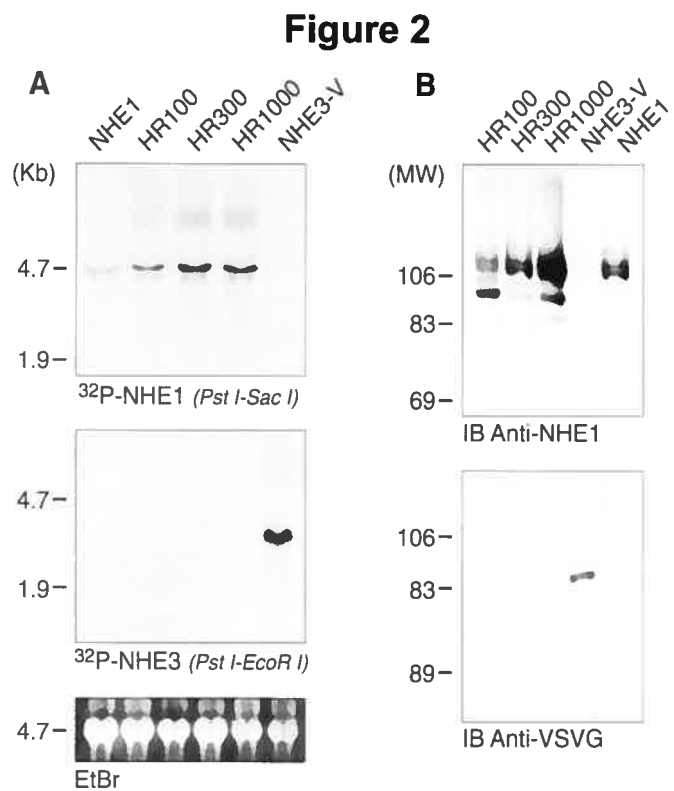


Figure 3

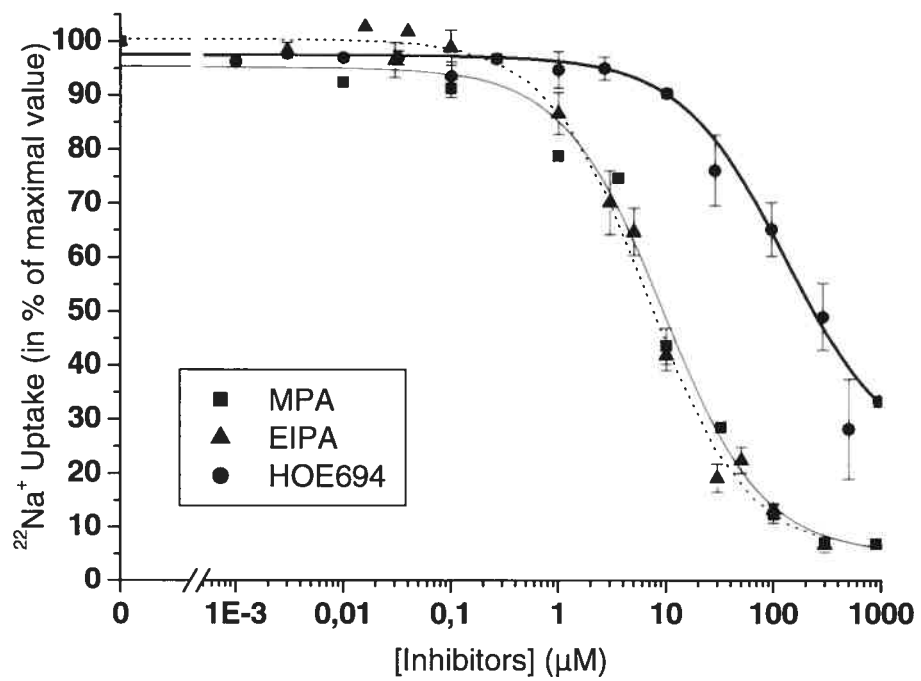


Figure 4

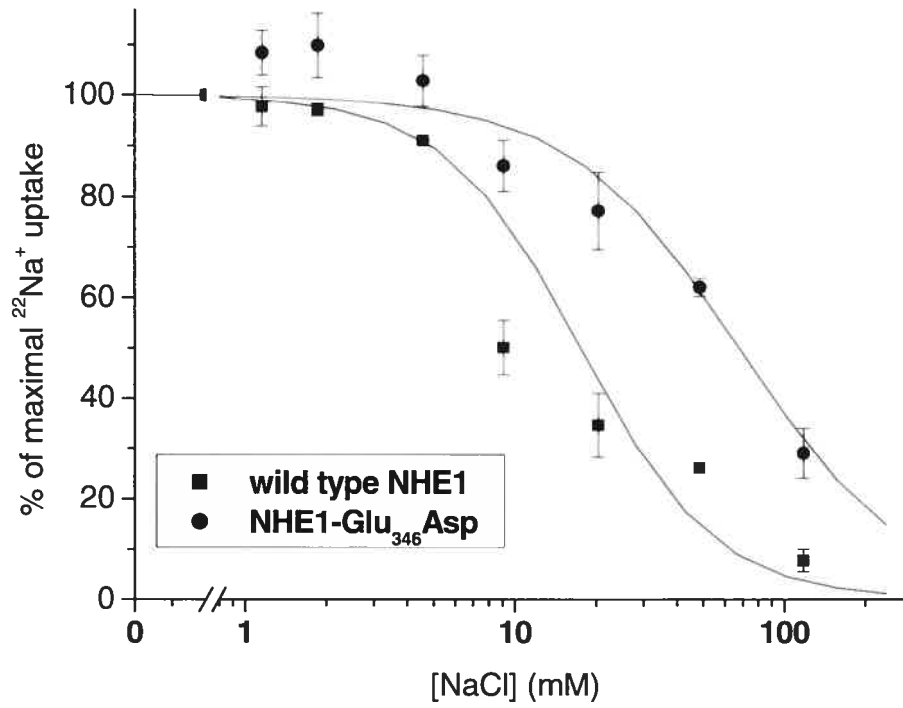
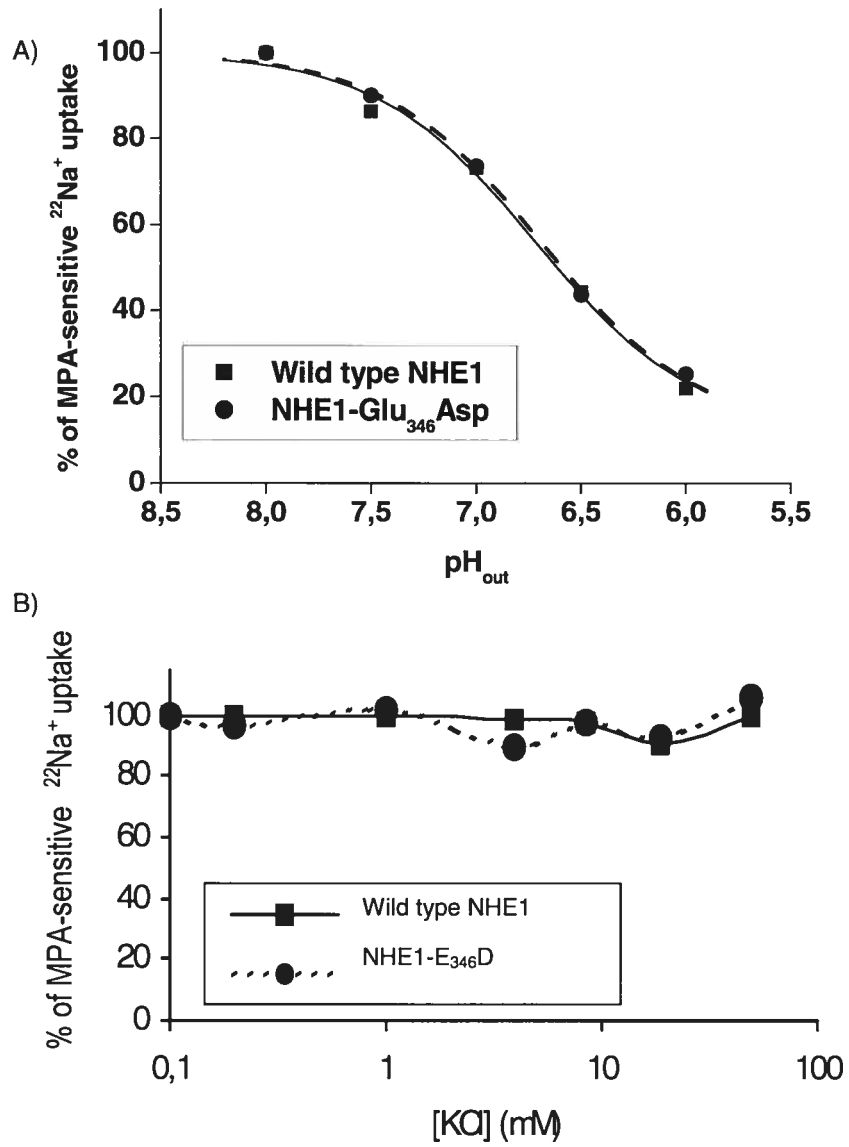


Figure 5



Accord des coauteurs

1 – Identification de l'étudiant et du programme

David GERMAIN

Programme de physiologie et biophysique moléculaire

2- Description de l'article

Josette Noël, David Germain and Julie Vadnais



Glutamate 346 of human Na^+/H^+ exchanger NHE1 is crucial for modulating both the affinity for Na^+ and the interaction with amiloride derivatives

Biochemistry, 2003, 42, 15361-15368

3- Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que David Germain inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Implication du glutamate 346 de NHE1 dans le transport du Na^+ et l'interaction avec les inhibiteurs.

Julie Vadnais
Coeuteur
Josette Noël
co-auteur


Signature

Signature

04/11/01
Date
09/12/04

Permission de l'éditeur de la revue

1 – Identification de la revue

Biochemistry
American Chemical Society
Publications Support Services
1155 Sixteenth Street, NW
Washington, DC 20036

2 – Identification de l'éditeur

Jeffrey L. Benovic
Thomas Jefferson University
Biochemistry
Kimmel Cancer Institute
233 S. 10th Street, 926 BLSB
Philadelphia, PA 19107-6799
USA

3 – Identification de l'article

Josette Noël*, David Germain* and Julie Vadnais. Glutamate 346 of human Na⁺-H⁺ exchanger NHE1 is crucial for modulating both the affinity for Na⁺ and the interaction with amiloride derivatives. *Biochemistry*, 2003, 42, 1561-15368

L'étudiant David Germain est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat intitulée : Implication du glutamate 346 de NHE1 dans le transport du Na⁺ et l'interaction avec les inhibiteurs

Copyright permission for published and submitted material from theses and dissertations
ACS extends blanket permission to students to include in their theses and dissertations their own articles, or portions thereof, that have been published in ACS journals or submitted to ACS journals for publication, provided that the ACS copyright credit line is noted on the appropriate page(s).

Source : <http://pubs.acs.org/instruct/dissertation.doc>

Article 2

Sommaire

La faible différence structurale entre le glutamate présent dans le NHE1 de type sauvage et l'aspartate présent dans le mutant spontané Glu₃₄₆Asp-NHE1 sélectionné lors de l'étude précédente, nous a poussé à rechercher les paramètres physico-chimiques nécessaires au Glu₃₄₆ pour permettre une bonne interaction de NHE1 avec ses inhibiteurs et le Na⁺.

Nous nous sommes donc intéressés à muter le Glu₃₄₆ en acides aminés de charge différente (Gln, Asn), de tailles différentes (Gly, Trp) et nous avons mis à l'épreuve l'importance de la position de Glu₃₄₆ en décalant celui-ci en position 345 ou en position 347. Les profils pharmacologiques montrent que ces mutants sont tous résistants à l'inhibition à des degrés divers. Les résultats nous permettent d'affirmer que la charge plus que la taille de Glu₃₄₆ sont critiques pour permettre une interaction idéale de NHE1 avec ses inhibiteurs.

L'affinité pour le Na⁺ a été mesurée pour tous les mutants. L'absence de corrélation entre les résistances et les affinités des différents mutants semble suggérer que les sites d'interaction des inhibiteurs et du Na⁺ ne sont pas les mêmes, même si certains déterminants peuvent être communs.

Finalement, l'activité normalisée par l'expression (v^*) de chaque mutant incluant le Glu₃₄₆Asp-NHE1 a été déterminée et nous démontrons que tous les mutants de NHE1 présentent une activité diminuée, ce qui est en accord avec la diminution observée des affinités pour le Na⁺. Néanmoins, le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 ne présente pas une diminution aussi prononcée et étant donné que son affinité pour le Na⁺ est toutefois très diminuée, nous parvenons à la conclusion que ce mutant doit présenter un V_{max} augmenté qui compense la diminution de son expression.

À cause d'événements indépendants de notre volonté, l'article qui suit n'a pas pu être soumis avant le dépôt de cette thèse. Il sera soumis aussitôt que possible à la revue *Journal of Biological Chemistry*.

The side-chain and negative charge of glutamate 346 in human NHE1 modulate the access to, and the reorientation of the Na⁺ binding site

David Germain, Alfred Berteloot and Josette Noël

From the Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), département de physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running head: Strategic location of Glu₃₄₆ in human NHE1

Address correspondance to:
Josette Noël, Ph.D.
GÉPROM, Département de physiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-ville
Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7
Tel. 514 343-6111, ext. 4356
Fax. 514 343-7146
E-Mail: [REDACTED]

THE SIDE-CHAIN AND NEGATIVE CHARGE OF GLUTAMATE 346 IN HUMAN NHE1 MODULATE THE ACCESS TO, AND THE REORIENTATION OF THE Na⁺ BINDING SITE

David Germain, Alfred Berteloot and Josette Noël

From the Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), département de physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running head: Strategic location of Glu₃₄₆ in human NHE1

Address correspondence to: Josette Noël, Ph.D., GÉPROM, Département de physiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7, Tel. 514 343-6111, ext. 4356; Fax. 514 343-7146; E-Mail: [REDACTED]

Site-directed mutagenesis was used to define the structural basis underlying the functional role of Glu₃₄₆ in transmembrane segment M9 of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1)¹. All Glu₃₄₆X mutants showed decreased V_{max} for Na⁺ transport with occasional effect on K_m, except for Glu₃₄₆Asp in which a K_m increase was associated with a gain of function as regards V_{max}. They also displayed increased resistance to two amiloride derivatives with differential effects on the K_i values characterizing drug inhibition. In addition, Glu₃₄₅AlaLeu and AlaLeuGlu₃₄₇ mutants exhibiting decreased transport rates and sensitivity to inhibitors highlight the strategic location of the negative charge with regard to its functional role. The strong likelihood of the existence in the NHE1 protein of structural elements identified in the bacterial NhaA exchanger is supported by a realistic alignment of the NhaA/NHE1 sequences², and by the synergistic effect on drug resistance of the dual substitution Leu₁₆₃Phe/Glu₃₄₆Asp in M4/M9. Accordingly, the lateral chains of X₃₄₆ would stand near the center of the membrane in close proximity to the positive dipole-ends linked to the so-called M4/M11 assembly. Although not essential for function, the negative charge of glutamate or aspartate at this position does increase the V_{max} for transport by 10- to 20-fold, respectively, thus emphasizing its importance in the gating process (destabilization/reorientation of the Na⁺ binding site) leading to transport. The lateral chain itself could affect the relative positions of M2, M4, M5, M9, and M11 shaping the access funnels to the Na⁺ binding site and the inhibitor-binding pocket, hence the differential effects observed on the K_m/K_i of Na⁺/drug binding.

Na⁺/H⁺ exchangers (NHE) form an important family of proteins currently counting 9 isoforms in mammalian tissues, namely the ubiquitous NHE1, the epithelial NHE2-4 and 8 (1-5), the non-epithelial NHE5 (6,7), the intracellular NHE6-9 (1,8-12). They are involved in critical cell functions such as internal pH and cell volume regulation, bicarbonate reabsorption, cell

proliferation in response to growth factors (13-16), and cell motility (17-19). The diuretic compound amiloride and its derivatives like 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) (20) inhibit NHE activity in a isoform-dependent manner with the following order of sensitivity NHE1 > NHE2 > NHE3 > NHE4 (14,21). More recently, newly-discovered NHE inhibitors like (3-methylsulfonyl-4-piperidinobenzoyl)-guanidine-methane-sulfonate (HOE694) have been synthesized and shown to be 4000-fold more potent in inhibiting NHE1 than NHE3 (22,23).

Limited information is presently available on the structure of the NHE proteins. Their overall organization consists of an N-terminal membrane domain responsible for Na^+/H^+ exchange, and a C-terminal cytoplasmic domain involved in the regulation of transport activity (24,25). A 12-transmembrane segments (M) model is generally predicted by hydropathy analysis of the membrane domain of NHE1 according to the Kyte-Doolittle algorithm (26,27). Based on the results from cysteine accessibility analysis, Wakabayashi *et al.* (28) proposed a novel 12-M model in which at least a portion of the intracellular loops IL2 and IL4 connecting M4/M5 and M8/M9, respectively, would be localized within the membrane and could form a structure lining an aqueous pore accessible from either side of the membrane. More recently, Slepko *et al.* (29) performed a cysteine-scan analysis of putative M4 of the human NHE1 showing that it was exquisitely sensitive to mutation, and that Phe₁₆₁ would be a pore-lining residue. The structure of purified M4 peptide was also determined in these studies using high resolution NMR, which revealed that M4 was structured but not as a canonical α -helix: residues Asp₁₅₉-Leu₁₆₂ were a series of β -turns, residues Leu₁₆₅-Pro₁₆₈ showed an extended structure, and only residues Ile₁₆₉-Phe₁₇₆ were helical in character (29).

Interestingly, a number of these predictions seems to be substantiated by the crystal structure of the bacterial Na^+/H^+ exchanger NhaA (30). The 12-M membrane domain is organized in two densely packed bundles each containing six helices (30). An ion funnel formed by M2, M4, M5 and M9 opens to the cytoplasm, and ends in the middle of the membrane at the putative ion-binding site (30). There, a unique assembly of two pairs of short helices from M4 and M11, connected by crossed extended-chains, creates a balanced electrostatic environment (30). Unfortunately, the absence of significant homology between the amino acid sequences of NhaA and NHE1 makes it difficult to establish a direct correspondence between the bacterial and

human exchangers. Moreover, as presented, the crystal structure of NhaA characterizes an inactive pH-downregulated and amiloride-insensitive form of Na^+/H^+ exchanger.

So far, little is known about the overall mechanism behind cation transport by, and amiloride-drugs binding to NHE1. Yet, its functional topology was probed in a number of studies that proved successful in identifying a few key elements. For example, the studies of Counillon *et al.* (31,32) characterized the mutations Leu₁₆₃Phe and Gly₁₇₄Ser, and their results suggested that M4 contains part of the amiloride-binding site. In addition, analyses of chimeras between NHE1 and NHE3 (33), and of mutations involving His₃₄₉ (34) in M9 support the implication of these regions in drug recognition. Murtazina *et al.* (35) also identified residues Glu₂₆₂ (M7), Asp₂₆₇ (M7) and Glu₃₉₁ (M10) as putative good candidates for being involved in Na^+ coordination by the human NHE1 protein. More recently, site-directed mutagenesis of the rat NHE1 protein (36,37) and selection of HOE694-resistant cells transfected with its human counterpart (36,37) both identified a highly conserved residue in M9 (Glu₃₅₀ or Glu₃₄₆ in these two species, respectively) that when mutated affected drug recognition and Na^+/H^+ exchange activity. In this respect, the Glu₃₄₆Asp mutation was shown to decrease the sensitivity to EIPA and HOE694 by factors of 300- and 3000-fold, respectively (37). Furthermore, Na^+ affinity was also decreased (37), thus supporting the hypothesis that Glu₃₄₆ may be involved in both Na^+ transport and Na^+ /amiloride-drugs binding.

The aim of the present studies was to further define the structural basis underlying the functional role of Glu₃₄₆ in human NHE1 using site-directed mutagenesis. Our kinetic and pharmacological data were interpreted using a conventional kinetic mechanism of Na^+/H^+ exchange to demonstrate that the amino acid in position 346 affects both Na^+ /inhibitor binding and cation translocation independently of each other. We also put forward an alignment of the NhaA and NHE1 sequences suggesting that a similar fold may apply to both exchangers. We finally propose a unifying hypothesis with regard to Na^+ /drug binding to NHE1 and Na^+ transport in which the side-chain and negative charge of Glu₃₄₆ modulate both the access to, and the reorientation of the Na^+ binding site.

Experimental Procedures

PCR-mediated site-directed mutagenesis – Mutations were introduced into the human NHE1-cDNA by polymerase chain-reaction (PCR) using the Vent® DNA Polymerase (New England Biolabs) as previously described (37). The primers and oligonucleotides were synthesized in the Department of Biochemistry at the University of Montreal (Canada). Primers 309 (GATGTCTTCGATGCCTGTCAG) and 506 (GAGTTTGCCA-ACTACGAACAC) corresponding to the NHE1 sequence were used respectively as 3' and 5' extremity primers. Pairs of oligonucleotides were designed to respect wild-type sequence homology as much as possible (see Table I for sequences). The mutated PCR fragments were digested by the restriction endonuclease *AccI* (New England Biolabs), purified and sub-cloned into pEAPK using the T4 DNA-ligase (New England Biolabs). The occurrence of mutations and the proper orientation of the insert were verified by sequencing, which was performed using the T7 DNA sequencing kit (Pharmacia) or, alternatively, by Sheldon Biotechnology (McGill University, Montréal, Qc).

Transfection and functional selection – Wild-type and mutated NHE1 (20 µg) were introduced into the exchanger-deficient PS120 cells (courtesy of Dr. J. Pouysségur, Nice, France) using the Ca₂PO₄-precipitation technique (38). An acute acid-loading procedure was applied to select the NHE1-expressing cells (39). This selection was repeated 5 times, every 2 to 3 days to obtain a stable population of NHE1-expressing cells, and then performed weekly to maintain good expression levels of the Na⁺/H⁺ exchangers at the cell membrane. Two independent populations of transfected cells were selected and characterized to confirm the observed phenotypes.

Western blot analysis – Crude membranes containing plasma, Golgi and endoplasmic reticulum membranes were purified as described earlier (40). Pellets were resuspended in an hypotonic buffer containing protease inhibitors. Proteins were denatured in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE (7.5%, w/v) and transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham). Immunoblotting was performed by incubation with the anti-NHE1 N1P1 antibody (18) using PBS-milk 5% as the blocking agent followed by revelation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies (Jackson Immunoresearch). Protein signals from the nitrocellulose membrane were revealed by chemiluminescence using the ECL kit (Amersham), and documented through a photographic film (Biomax ML, Kodak).

$^{22}\text{Na}^+$ uptake – Transport activity and inhibition by EIPA (Research Biochemicals International) or HOE694 (a gift from Dr. W. Scholtz, Frankfurt) were determined for each mutant by a H^+ -driven $^{22}\text{Na}^+$ uptake procedure as previously described (23,37). When determining initial rates of transport (v^*), uptake was performed in the absence of cold Na^+ for 3 minutes in a medium containing $0.2 \mu\text{Ci/ml } ^{22}\text{Na}^+$ (Mandel), 1 mM ouabain (Fisher Scientific) to inhibit Na^+/K^+ -ATPase, and varying concentrations of the inhibitors dissolved in DMSO. When estimating the kinetic parameters of transport, uptakes were performed for 20 min in the presence of $1 \mu\text{Ci/ml } ^{22}\text{Na}^+$ and increasing cold Na^+ concentrations; choline chloride was used to maintain osmolarity. Plates were rinsed very quickly in 4 baths of ice-cold saline solution (0.9% NaCl). Cells were solubilized in 0.1N NaOH, and radioactivity measured using a γ -counter (Beckman Coulter). Protein concentrations were measured using the BCA (Bicinchoninic acid) protein-assay kit from Pierce and bovine-serum albumin as a standard. The dose-response curves were fitted and IC_{50} values determined with the Microcal Origin 6.0 software using weighted non-linear regression analysis of the data points to a sigmoid model equation.

Sequence alignments – All bioinformatic tools used in these studies were accessed through the ExPASy Proteomics Server (41) maintained by the Swiss Institute of Bioinformatics. The sequences of the Na^+/H^+ exchangers NhaA from *E. coli* (Genbank™ Data Bank Accession Number 1ZCD) and NHE1 from human (Swiss-Prot Accession Number P19634) were separately submitted to a BLAST search. Restricting the redundancy to the range of 30-90% similarity reduced the number of homologous proteins in each family. Moreover, only the first 520 amino acids corresponding roughly to the membrane domain of the NHE1-related sequences were kept for further analysis. The NhaA and NHE1 files were merged and analyzed using ClustalW (42) with the following settings: PAM protein weight matrix for slow pairwise alignment, BLOSUM weight matrix for multiple alignment parameters, and all other parameters by default. The alignment so obtained proved acceptable with respect to M10-M12 only, the rest being incompatible with the substituted cysteine accessibility analysis reported by Wakabayashi *et al.* (28). This difficulty arises due to the fact that the membrane domain of NHE1 is 120-130 amino acids longer than NhaA (30). As a second trial, then, the individual sequences and their associated files were cut to isolate M1, and the combinations of M2/M3, M4/M5 and M6-M9 that would respect either the crystal structure for the NhaA-related sequences or the cysteine-scan data of Wakabayashi *et al.* (28) for the NHE1-linked proteins. Note that the grouping of

M2/M3 and M4/M5 is also justified by the absence of gaps in these regions of the NhaA and NHE1 families of proteins (result not shown). Once again, the truncated NhaA and NHE1 files were merged and analyzed using ClustalW (42) as above to get the best alignments of the different M regions.

RESULTS

Expression and transport activities of NHE1 proteins – Fig. 1A illustrates that all cell populations showed the same pattern of immunoreactive bands following a Western blot analysis of crude membrane extracts, in which the 70 and 110 kDa bands correspond to the immature, unglycosylated, and to the mature, membrane-inserted isoforms, respectively (43). A densitometric analysis of these data reveals that the relative abundance of the latter is generally higher in cells expressing the mutants as compared to the wild-type NHE1 (Fig. 1B), a notable exception in this respect being Glu₃₄₆Asp for which a close to 60% reduction in its expression level was observed. Moreover, as expected from the selection procedure, Fig. 1C clearly indicates that all mutants were active with regard to Na⁺/H⁺ exchange activity. Following correction of these data for the relative expression of the wild-type and mutated proteins, it can be estimated that the initial rate of ²²Na⁺ transport (v^*) is decreased by 62-90% in the mutants, with the exception of Glu₃₄₆Asp showing a 49% reduction only in its transport activity (Table II).

Kinetic parameters of Na⁺ transport – Fig. 2A depicts the results of uptake time course studies performed on PS120 cells, from which it can be appreciated that initial rate conditions of ²²Na⁺ transport prevail for up to 20 min of uptake as compared to 3 min only for the mutated and wild-type NHE1 proteins, respectively. Therefore, to maximize the signal over noise ratio, the kinetic parameters of Na⁺ transport characterizing the mutant exchangers were determined using a one time-point approach in which the uptake assays were performed over a 20 min time period.

The apparent affinities (K_m) of Na⁺ transport are listed in Table II, as estimated from the normalized uptake data presented in Fig. 2B. Clearly, the mutant proteins can be subdivided into two main classes, i.e. group-I with K_m values of 12-18 mM (replacement of Glu₃₄₆ by Gln, Asn and Gly, and Glu₃₄₅AlaLeu), thus comparable to the wild type NHE1 (17.5 mM), and group-II with K_m values of 50-62 mM (Glu₃₄₆Asp, Glu₃₄₆Trp, and AlaLeuGlu₃₄₇).

The transport data shown in Fig. 1C result from uptake assays performed at a ²²Na⁺ tracer concentration of 0.01 μ M. Under these experimental conditions, the wild type and mutant

exchangers are far from being saturated by their substrate, so that the transport rates v^* listed in Table II should be directly proportional to their associated V_{\max}/K_m ratios (see Appendix). Accordingly, when normalized to wild-type activity, the decreased rates of transport seen in group-I mutants should be the consequence of V_{\max} changes alone, whereas those in group-II mutants should involve V_{\max} fluctuations in addition to the K_m modifications noted earlier. Moreover, the transport rate recorded for Glu₃₄₆Asp appears to be about 2-fold higher than predicted from the increased K_m value alone, in which case one may suspect a near to 2-fold increase in the associated transport V_{\max} . As shown in Table II, all of these predictions were indeed confirmed by a direct evaluation of the V_{\max} values pertaining to the wild type and mutated proteins.

To our knowledge, this is the first report of an increased efficiency of transport being measured in a mutant NHE1 protein. In support of this conclusion, it is interesting to note that the 60% reduction in Glu₃₄₆Asp expression relative to wild type is closely matched by a 57% increase in its functional activity. Indeed, at the Na⁺ concentration of 120 mM used for the functional selection of stable transfectants, and with the kinetic parameter values listed in Table II, a classical Michaelis-Menten equation allows us to calculate transport rates of 899 and 573 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ for the Glu₃₄₆Asp and wild type proteins, respectively.

Transport sensitivity to amiloride derivatives – The kinetic data currently available suggest that inhibition of NHE1 activity by amiloride derivatives should be competitive in the chloride-containing buffers used in the present studies (44,45). Because the dose response curves for inhibition of Na⁺/H⁺ exchange activity were further established at a ²²Na⁺ tracer concentration of 0.01 μM , thus well below the apparent K_m values of the wild-type and mutant proteins (Table II), the half-inhibitory concentrations (IC₅₀) of EIPA and HOE694 can in fact be assimilated to their real K_i values (see Appendix).

As illustrated in Fig. 3 and summarized in Table III, the present studies first confirm our previous results showing that the rather conservative Glu₃₄₆Asp mutation increases NHE1 resistance to both EIPA and HOE694 (37). In addition, it can be seen that charge neutralization by either one of the two conservative Gln or Asn mutations is not as effective with regard to the effect of EIPA (17 to 21-fold increase in K_i values as compared to wild-type). However, in the case of HOE694, the former decreases (5.6-fold) whereas the latter slightly increases the resistance of Na⁺/H⁺ exchange activity to inhibition as compared to Glu₃₄₆Asp. Similarly, the

substitution of Glu₃₄₆ for an amino acid with either a bulky (Trp) or no side chain (Gly) has differential effects on EIPA and HOE694 binding: both mutants resulted in lower and higher K_i values than the Glu₃₄₆Asp mutation, respectively (Fig. 4 and Table III).

Importance of the charge at position 346 – Our former studies showed that mutations in the next neighbors of Glu₃₄₆ (Ala₃₄₅Gly, Ala₃₄₅Trp, Leu₃₄₇Val, and Leu₃₄₇Trp) had no effect on EIPA binding to NHE1 (37). Therefore, to better define the importance of the negative charge of Glu at position 346 in relation to Na⁺ transport and EIPA binding, the two additional constructs Glu₃₄₅AlaLeu and AlaLeuGlu₃₄₇ were investigated. As depicted in Fig. 2B and 5 with kinetic parameter values listed in Tables II and III, displacement of Glu by one residue upstream or downstream from position 346 did not rescue the negative effects on transport function and sensitivity to inhibitors likely introduced by the Ala or Leu substitutions for Glu at this position.

Alignment of the NhaA and NHE1 sequences – A fair appraisal of the role played by Glu₃₄₆ would benefit from pieces of information gathered at the structural level. In this respect, the putative 12-M topology proposed for NHE1 by Wakabayashi *et al.* (28) is compatible with that obtained from the X-ray diffraction data of NhaA crystals (30) showing an arrangement of the membrane domain in two densely packed sub-domains A (formed by M3-M5 and M10-M12) and B (including the remaining 6-M). However, the model structure of NhaA does not support equal lengths for each of the 12 membrane segments as proposed in the putative topology of NHE1 (28). Therefore, to investigate whether the NhaA fold may also apply to NHE1, we attempted to get a significant alignment of the two sequences.

The strategy described under “Experimental Procedures” allows us to put forward the full alignment presented in Fig. 6. With respect to the transmembrane helices only, there is 17.6% identity and up to 69.7% similarity between the two sequences. Note that the N-terminal end of the molecule up to M2 presents the highest degree of variability among the proteins of the NHE1 family (result not shown), so that the alignment in this region shows the highest level of uncertainty. Also, as compared to NhaA, external loops EL1, EL4, and EL5 of NHE1 would be far longer. Therefore, the proposal that the latter would be mostly associated with the lipid bilayer (28) cannot be evaluated from the NhaA structure. In contrast, the suggestion of a partial penetration in the membrane of IL2 and IL4 also reported for NHE1 (28) does not seem to be verified in the NhaA structure. Indeed, these differences could reflect structural disparities and/or adaptations in NHE1 as compared to NhaA. Yet, we believe that the alignment proposed in Fig.

6 is realistic and strongly suggests that a similar fold and common structural elements may be found in the NhaA and NHE1 families of exchanger proteins, as justified below.

A characteristic feature of domain A is constituted by the so-called M4/M11 assembly in which the two segments are of opposite direction in the membrane and each is composed of a short helix, an extended polypeptide chain, and a short helix (30). The chains cross each other, forming close contacts in the middle of the membrane, so that the positive and negative dipole ends of the short helices of M4/M11 face each other, and need to be charge compensated by Asp₁₃₃ and Lys₃₀₀, respectively (30). The existence of similar structural elements in NHE1 is supported by the fact that the purified M4 peptide of NHE1 shows three ordered regions rotating quite freely with respect to the others when its structure was analyzed using high resolution NMR in a CD₃OH:CDCl₃: H₂O mixture (46). Interestingly, the alignment proposed in Fig. 6 proves successful in getting the extended parts of M4 in NhaA (Trp₁₂₆-Asp₁₃₃) (30) and NHE1 (Leu₁₆₆-Pro₁₆₈) (46) to coincide. Moreover, the motif L₁₆₅-L-P-P-I-[IV]-[LF]-[DEHY]₁₇₂ (numbered relative to human NHE1) appears to be a signature sequence for the nine mammalian NHE isoforms with Pro₁₆₈ corresponding to the highly conserved Pro₁₂₉ in the NhaA family of proteins (results not shown). Therefore, the stabilizing role played by Asp₁₃₃ in NhaA (30) could also apply to Asp₁₇₂ in NHE1 (also present in NHE2, 3 and 5, or substituted for by a Glu residue in NHE 4 and 8). Similarly, the alignment shown in Fig. 6 suggests that the negative dipole ends created by the M4/M11 assembly (30) could be charge compensated by Arg₄₂₅ in NHE1, a conservative substitution for Lys₃₀₀ in the M10 of NhaA that is also found in the eight other NHE isoforms (results not shown). As regards M11, the extended polypeptide chain encompasses residues Val₃₃₁-Gly₃₃₈ in NhaA (30), which were found to align with residues Tyr₄₅₄-Ile₄₆₁ in NHE1. Furthermore, the motif [YF]₄₅₄-[GSA]-G-[LV]-R-G-A₄₆₀ (numbered relative to human NHE1) also appears to be a signature sequence for the nine mammalian NHE isoforms with Gly₄₅₉ corresponding to the highly conserved Gly₃₃₆ in the NhaA family of proteins (results not shown).

Validation of a close association between M4 and M9 – The NhaA structure suggests that M4 and M9 may be in close spatial proximity to each other within the funnel (formed in conjunction with M2, M5, and M11) leading to the Na⁺ binding site close to the center of the membrane (30). Accordingly, one would predict additive effects of simultaneous mutations of key residues in the two helices. This presumption was evaluated by combining the M4 mutation Leu₁₆₃Phe

described by Counillon *et al.* (31) with Glu₃₄₆Asp and testing its effect on Na⁺ transport inhibition by EIPA. As shown in Fig. 7 and Table III, synergy rather than addition was in fact observed: the single Leu₁₆₃Phe or Glu₃₄₆Asp mutations increased the resistance to drug inhibition by 35- or 267-fold, with a further augmentation of 54- or 7-fold brought in by the second mutation, respectively. A similar conclusion was previously reached in the rat using the dual substitution Leu₁₆₇Phe/Gly₃₅₆Ala (equivalent to Leu₁₆₃Phe/Gly₃₅₂Ala in human) (36). In this case, the single mutations produced similar reductions in drug sensitivity of about 30-fold, with an additional 5-fold decrease introduced by the second mutation independently of which of the Leu₁₆₇Phe or Gly₃₅₆Ala mutation was performed first (36). Clearly, then, the Glu₃₄₆Asp mutation has more effect on EIPA binding than either one of the Leu₁₆₃Phe or Gly₃₅₂Ala substitutions.

DISCUSSION

The main results of the present studies establish that, when compared to wild-type NHE1, all Glu₃₄₆X mutants showed (i) decreased V_{\max} for Na⁺ transport with occasional effect on K_m , except for Glu₃₄₆Asp in which a K_m increase was associated with a gain of function as regards V_{\max} (Table II), and (ii) increased resistance to inhibition by amiloride drugs with differential effects on the K_i values of EIPA and HOE694 binding (Table III). A thorough interpretation of these kinetic and pharmacological data as a whole is complicated by the fact that ion transport and inhibitor binding are largely different processes, and by the absence of structural data on the Na⁺ and drug binding sites.

The critical issue regarding the meaning of the kinetic parameters of Na⁺ transport can be addressed through the derivation of a conventional kinetic mechanism of Na⁺/H⁺ exchange (47,48). Accordingly, as demonstrated in Appendix, it can first be stated that the IC₅₀ commonly used to report transport inhibition by amiloride-drugs can in fact be assimilated under our experimental conditions to the real K_i characterizing EIPA and HOE694 binding to the protein. In addition, equations A4-A6 clearly show that V_{\max} , K_m and v^* are not independent parameters with respect to the dissociation and microscopic rate constants characterizing the transport model. For that reason, when confronted to our results with the group-I mutants (replacement of Glu₃₄₆ by Gln, Asn, and Gly, and Glu₃₄₅AlaLeu), the simplification $k_{56} \ll k_{23}$ needs to be

introduced into this set of equations to simultaneously accommodate our observations of K_m values similar to wild-type NHE1 and concomitant 16- to 20-fold reduction in V_{max} . Therefore, it can also be stated that: (i) the K_m for Na^+ transport measures K_{45} , the dissociation constant characterizing Na^+ binding to the exchanger, (ii) the V_{max}/T_i ratio (maximum rate normalized for NHE1 expression) estimates k_{56} , the rate constant characterizing the reorientation of the Na^+ binding site from an outward- to an inward-facing configuration, and (iii) the v^*/T_i ratio (relative initial rates of tracer $^{22}\text{Na}^+$ uptake normalized for NHE1 expression) quantifies the k_{56}/K_{45} ratio and is therefore proportional to the turnover number of Na^+/H^+ exchange. Thus, this kinetic analysis allows us to convincingly conclude that the amino acid in position 346 affects both Na^+ /inhibitor binding and cation translocation independently of each other.

The structural issue can be tentatively addressed on the grounds of a strong likelihood that NHE1 and NhaA share similar structural elements, as validated by a realistic alignment of the two sequences (Fig. 6). Yet, a key question unsolved by the crystal structure of NhaA relates to the molecular basis for binding sites and passage of substrates, in part because this structure is a snapshot of the native, acidic pH-locked conformation of the protein, and also because no Na^+ ion could be localized within the protein. Yet, it clearly indicates that a funnel formed by M2, M4, M5 and M11 opens to the cytoplasm, but is blocked approximately in the middle of the membrane at the crossing of the extended chains of the M4/M11 assembly (30). This cytoplasmic channel appears to be accessible to the hydrated Na^+ , Li^+ , and K^+ ions as well as water, and could therefore represent a putative cation passage (30). However, the fully hydrated ions cannot access the end of the funnel in the middle of the membrane (30), so that dehydration of the ions and/or conformation changes in the protein structure following cation entrance into the channel ought to be necessary for efficient ion transport to occur. In this respect, the coordination cage provided by the protein as replacement for the water molecules surrounding the ion in solution might prove more efficient in the control of ionic selectivity, which appears to be dictated by the intrinsic local physical properties of the reactive groups coordinating the cation in the binding site (49) One possibility to achieve Na^+ selectivity was recently discussed by Roux (49) and involves a salt-bridge formed by the association of two charged residues directly into the pore. Such a situation could well account for Na^+ binding to NhaA through the highly conserved D₁₆₃-D₁₆₄ motif (30), which has long been recognized to be absent from the

NHE family of exchangers (50). Alternatively, then, one should also consider the previous suggestion that Na^+/H^+ exchangers may act by coordination of substrate cations through a crown ether-like cluster of polar amino acids (50). Yet, another way to achieve selectivity is also apparent when considering an extensive analysis of high-resolution crystal structures of ion binding proteins indicating that the most common donor group associated with Na^+ or K^+ binding is the main-chain carbonyl group, but that preferential metal-donor atom distances and coordination numbers are associated with the two ions (51). Indeed, the last two possibilities are not mutually exclusive, as supported by the crystal structure of a bacterial 2 Na^+ : 1 leucine cotransport system (LeuT_{Aa}) in which the ion binding sites are defined by partially unwound transmembrane helices, with main-chain carbonyls, side-chain carbonyls of Asn, and side-chain hydroxyl of Ser and Thr all contributing to Na^+ binding (52). For the NHE family of exchanger proteins lacking the D-D motif discussed above, a similar scenario could be proposed whereby the coordination cage for cation binding would in part involve the backbone carbonyls that are freely accessible in the extended chains of the M4/M11 assembly and/or, as previously suggested, at positions $i-3$ and/or $i-4$ of Pro_{167} (46,53). However, our results showing that the K_m for Na^+ transport is not affected in all of the mutants (Table II) should be taken as evidence that Glu_{346} is not directly involved in cation binding to the exchanger.

Similarly, although the bacterial exchanger NhaA is insensitive to amiloride derivatives, the likelihood of the existence in NHE1 of structural elements similar to the M4/M11 assembly, and of access funnel(s) to the center of the membrane should nevertheless help us in defining their potential relationship with the drug binding site(s). In this respect, the competitive inhibition usually observed between substrate transport and inhibitor binding is most easily interpreted using a model in which the two classes of molecules interact with the same conformation of the exchanger (see Fig. A1). If this view is correct, then it is logical to postulate that the Na^+ ion and the amiloride derivatives compete for binding to the exchanger protein at the level of the structural elements discussed above. It is therefore justified to address the question of whether these molecules share or not a common docking site on the protein, more specifically within the putative outside channel leading to the Na^+ binding site under physiological conditions. In this regard, Fig. 8 illustrates the fact that EIPA and HOE694 have in common a guanidinium moiety, the protonated form of which is absolutely required for pharmacological

activity. Interestingly, the guanidinium ion shares structural similarities with the hydrated sodium species (54) and its K_i for competitive inhibition of exchange activity is close to the apparent K_m for Na^+ transport (55). These pieces of information seem to indicate that the guanidinium moiety of the amiloride derivatives may interact directly with the Na^+ binding site, or at least sense the electrostatic potential attracting the Na^+ ion towards this location. Yet, the observations that higher affinities are noted for the drugs as compared to Na^+ (and guanidinium), and that some mutations affecting the K_i for drug binding do not alter the K_m for Na^+ transport (see Tables II and III) should both be taken as evidence that sites different from and/or complementary to the Na^+ binding site itself are also involved in inhibitor binding. Besides, there is no indication that the free energy of binding should be identical for inhibitor and Na^+ .

In connection with the present studies, a direct interaction between Glu₃₄₆ and amiloride derivatives seems to be ruled out by the differential effects of the Glu₃₄₆X mutations on EIPA and HOE694 binding (Table III). Rather, these results in conjunction with the observation that HOE694 is less potent than EIPA but more selective towards NHE1 (56) strongly suggest that specific but different amino acid residues participate to the docking of these drugs. Indeed, the residues involved cannot be identified from our studies, but their hydrophobic nature can be tentatively inferred from the observation that the potency of the pyrazine (EIPA) or benzoylguanidine (HOE694) derivatives of amiloride can be modified by substitution at positions 5 or 4 of their respective pyrazine or phenyl rings (56,57). As regards their location on the NHE1 protein, it is worth pointing out that M4 and M9 contain several of the amino acids previously identified as important in inhibitor binding (58). Our studies confirm that the Leu₁₆₃Phe (M4) or Glu₃₄₆Asp (M9) mutations significantly reduced sensitivity to EIPA (31,36,37). They further argue in favor of a close spatial proximity between M4 (or the M4/M11 assembly revealed by the crystal structure of NhaA) and M9 to form (at least part of) the inhibitor-binding pocket by showing that the dual substitution Leu₁₆₃Phe/Glu₃₄₆Asp had a synergistic effect on the reduction of drug sensitivity (Table III).

The crystal structure of NhaA (30) and the evidence discussed above suggest that Na^+/H^+ exchangers have a narrow constriction zone that acts as a selectivity filter near the membrane center and likely involves the extended chains of the M4/M11 assembly. Accordingly, the width of the dielectric barrier over which the cations are transported is small relative to the overall

thickness of the membrane, and the cation binding site ought to be reached through cytoplasmic and (putative) outward funnels likely involving M2, M4, M5, M9, and M11 (30). In the crystal structure of NhaA, M9 appears to be distorted and is in direct contact with the M4/M11 assembly close to its kink at the centre of the membrane (30). These characteristics argue in favour of M9 being the most likely structural element capable of transmitting the pH signal required to activate the exchanger function (30). Such a pH-sensing role of M9 is very improbable in NHE1, and may instead involve M11 and its neighboring IL5 (50). In this respect, it is worth noting that the curvature of M9 in NhaA starts at Pro₂₆₅, a highly conserved residue in the NhaA family of proteins (result not shown), and that this amino acid is substituted for the highly conserved Glu₃₄₆ in the NHE family of exchangers (result not shown, but see Fig. 6 for NHE1). Accordingly, the lateral chain of Glu₃₄₆ would stand near the center of the membrane in close proximity to the extended chains and positive dipole ends of the short helices of the M4/M11 assembly, and the functional and unique conformation adopted by M9 in NHE1 would correspond to its straightened configuration resulting from pH activation in NhaA (30).

The kinetic and structural considerations discussed above allow us to propose a unifying hypothesis with regard to Na⁺ and drug binding to NHE1 as follows. In the basal state, the Na⁺ binding site is accessible from the outside through the (putative) external funnel, and the overall architecture of this conformation is stabilized at the level of the central part of the M4/M11 assembly in such a way that the positive and negative dipole ends of this structural element are (mostly) neutralized by Asp₁₇₂ and Arg₄₂₅, respectively. As suggested for NhaA, Na⁺ binding to the active site would result in charge imbalance that would in turn trigger a small movement of the M4/M11 assembly and their extended chains, thus leading to the reorientation of the Na⁺ binding site towards the cytoplasm with concomitant closing and opening of the external and cytoplasmic channels, respectively (30). Because all mutations canceling the wild-type negative charge at position 346 simply reduce the V_{\max} of transport without knocking down Na⁺/H⁺ exchange activity, it must be concluded that this charge is not essential for function but that its presence increases the efficiency of the gating process leading to Na⁺ transport. Indeed, the strategic location in the central part of the membrane of a negative charge at position 346 might increase the transport rate (k_{56} in figure A1) by contributing to the destabilization/reorientation of the Na⁺ binding site, maybe through an interaction with (at least one of) the positive dipole ends

of the M4/M11 assembly. According to this view, the displacement of Glu by one residue upstream or downstream from position 346 should not rescue the negative effects on transport function likely introduced by the Ala or Leu substitutions for Glu at this position, as observed (Fig. 5). Moreover, the shorter lateral chain of Asp could slightly destabilize the M4/M11 assembly in the basal state, an effect that would result in a decreased affinity for Na^+ binding with subsequent increase in the rate of movement of the short helices of M4 and M11, hence the higher V_{max} values of transport as compared to Glu. Similarly, the bulky side chain of Trp could also destabilize the M4/M11 assembly with subsequent lower affinity for Na^+ binding, but in this case the transport rate would be close to its basal value observed in the absence of charge at position 346. In addition, any of the Glu_{346}X mutations could disturb the basal architecture to some extent without affecting Na^+ affinity if the majority of them mostly affect the relative positions of the transmembrane helices shaping the access funnel to the Na^+ binding site. Consequently, the relative accessibility of the amino acid residues lining the funnel would be essentially dictated by the X substitution for Glu_{346} , hence the differential effects observed on EIPA and HOE694 binding with specific mutations.

REFERENCES

1. Goyal, S., Vanden Heuvel, G., and Aronson, P. S. (2003) *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(3), F467-473
2. Orłowski, J., Kandasamy, R. A., and Shull, G. E. (1992) *J Biol Chem* **267**(13), 9331-9339
3. Tse, C. M., Brant, S. R., Walker, M. S., Pouyssegur, J., and Donowitz, M. (1992) *J Biol Chem* **267**(13), 9340-9346
4. Tse, C. M., Levine, S. A., Yun, C. H., Montrose, M. H., Little, P. J., Pouyssegur, J., and Donowitz, M. (1993) *J Biol Chem* **268**(16), 11917-11924
5. Wang, Z., Orłowski, J., and Shull, G. E. (1993) *J Biol Chem* **268**(16), 11925-11928
6. Baird, N. R., Orłowski, J., Szabo, E. Z., Zaun, H. C., Schultheis, P. J., Menon, A. G., and Shull, G. E. (1999) *J Biol Chem* **274**(7), 4377-4382
7. Klanke, C. A., Su, Y. R., Callen, D. F., Wang, Z., Meneton, P., Baird, N., Kandasamy, R. A., Orłowski, J., Otterud, B. E., Leppert, M., and et al. (1995) *Genomics* **25**(3), 615-622
8. Brett, C. L., Wei, Y., Donowitz, M., and Rao, R. (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* **282**(5), C1031-1041
9. Numata, M., and Orłowski, J. (2001) *J Biol Chem* **276**(20), 17387-17394
10. Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., and Orłowski, J. (1998) *J Biol Chem* **273**(12), 6951-6959
11. de Silva, M. G., Elliott, K., Dahl, H. H., Fitzpatrick, E., Wilcox, S., Delatycki, M., Williamson, R., Efron, D., Lynch, M., and Forrest, S. (2003) *J Med Genet* **40**(10), 733-740
12. Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., and Kanazawa, H. (2005) *J Biol Chem* **280**(2), 1561-1572
13. Counillon, L., and Pouyssegur, J. (2000) *J Biol Chem* **275**(1), 1-4
14. Noel, J., and Pouyssegur, J. (1995) *Am J Physiol* **268**(2 Pt 1), C283-296
15. Orłowski, J., and Grinstein, S. (1997) *J Biol Chem* **272**(36), 22373-22376
16. Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Pouyssegur, J. (1997) *Physiol Rev* **77**(1), 51-74
17. Denker, S. P., and Barber, D. L. (2002) *J Cell Biol* **159**(6), 1087-1096
18. Lagana, A., Vadnais, J., Le, P. U., Nguyen, T. N., Laprade, R., Nabi, I. R., and Noel, J. (2000) *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3649-3662
19. Cardone, R. A., Casavola, V., and Reshkin, S. J. (2005) *Nat Rev Cancer* **5**(10), 786-795
20. Kleyman, T. R., and Cragoe, E. J., Jr. (1988) *J Membr Biol* **105**(1), 1-21
21. Chambrey, R., Achard, J. M., and Warnock, D. G. (1997) *Am J Physiol* **272**(1 Pt 1), C90-98
22. Counillon, L., Scholz, W., Lang, H. J., and Pouyssegur, J. (1993) *Mol Pharmacol* **44**(5), 1041-1045
23. Noel, J., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1996) *J Cell Sci* **109** (Pt 5), 929-939
24. Shrode, L. D., Gan, B. S., D'Souza, S. J., Orłowski, J., and Grinstein, S. (1998) *Am J Physiol* **275**(2 Pt 1), C431-439

25. Sardet, C., Counillon, L., Franchi, A., and Pouyssegur, J. (1990) *Science* **247**(4943), 723-726
26. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J Mol Biol* **157**(1), 105-132
27. Engelman, D. M., Steitz, T. A., and Goldman, A. (1986) *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**, 321-353
28. Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X., and Shigekawa, M. (2000) *J Biol Chem* **275**(11), 7942-7949
29. Slepkov, E. R., Rainey, J. K., Li, X., Liu, Y., Cheng, F. J., Lindhout, D. A., Sykes, B. D., and Fliegel, L. (2005) *J Biol Chem* **280**(18), 17863-17872
30. Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., and Michel, H. (2005) *Nature* **435**(7046), 1197-1202
31. Counillon, L., Franchi, A., and Pouyssegur, J. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10), 4508-4512
32. Counillon, L., Noel, J., Reithmeier, R. A., and Pouyssegur, J. (1997) *Biochemistry* **36**(10), 2951-2959
33. Orłowski, J., and Kandasamy, R. A. (1996) *J Biol Chem* **271**(33), 19922-19927
34. Wang, D., Balkovetz, D. F., and Warnock, D. G. (1995) *Am J Physiol* **269**(2 Pt 1), C392-402
35. Murtazina, R., Booth, B. J., Bullis, B. L., Singh, D. N., and Fliegel, L. (2001) *Eur J Biochem* **268**(17), 4674-4685
36. Khadilkar, A., Iannuzzi, P., and Orłowski, J. (2001) *J Biol Chem* **276**(47), 43792-43800
37. Noel, J., Germain, D., and Vadnais, J. (2003) *Biochemistry* **42**(51), 15361-15368
38. Wigler, M., Sweet, R., Sim, G. K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S., and Axel, R. (1979) *Cell* **16**(4), 777-785
39. Pouyssegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(15), 4833-4837
40. Fafournoux, P., Noel, J., and Pouyssegur, J. (1994) *J Biol Chem* **269**(4), 2589-2596
41. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3784-3788
42. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res* **22**(22), 4673-4680
43. Counillon, L., Pouyssegur, J., and Reithmeier, R. A. (1994) *Biochemistry* **33**(34), 10463-10469
44. Ives, H. E., Yee, V. J., and Warnock, D. G. (1983) *J Biol Chem* **258**(16), 9710-9716
45. Warnock, D. G., Yang, W. C., Huang, Z. Q., and Cragoe, E. J., Jr. (1988) *J Biol Chem* **263**(15), 7216-7221
46. Slepkov, E. R., Chow, S., Lemieux, M. J., and Fliegel, L. (2004) *Biochem J* **379**(Pt 1), 31-38
47. Stein, W. D. (1986) *Am J Physiol* **250**(4 Pt 1), C523-533
48. Weinstein, R. S., Merk, F. B., and Alroy, J. (1976) *Adv. Canc. Res.* **23**, 23-89
49. Roux, B. (2005) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 153-171
50. Dibrov, P., and Fliegel, L. (1998) *FEBS Lett* **424**(1-2), 1-5
51. Harding, M. M. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 5), 872-874

52. Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. (2005) *Nature* **437**(7056), 215-223
53. Touret, N., Poujeol, P., and Counillon, L. (2001) *Biochemistry* **40**(16), 5095-5101
54. Paolini, I. (1960). In: Nachmansohn (ed). *Molecular Biology : Elementary Process of nerve conduction and muscle contraction*, Academic Press, New-York
55. Frelin, C., Vigne, P., Barbry, P., and Lazdunski, M. (1986) *Eur J Biochem* **154**(2), 241-245
56. Masereel, B., Pochet, L., and Laeckmann, D. (2003) *Eur J Med Chem* **38**(6), 547-554
57. Vigne, P., Frelin, C., Cragoe, E. J., Jr., and Lazdunski, M. (1984) *Mol Pharmacol* **25**(1), 131-136
58. Slepko, E., and Fliegel, L. (2002) *Biochem Cell Biol* **80**(5), 499-508
59. Bourguignon, L. Y. W., Singleton, P. A., Zhu, H., and Diedrich, F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(32), 29420-29434

FOOTNOTES

*These studies were supported by grants from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant OGP0194601). J.N. is a senior scholar of Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

¹The abbreviations used are : EIPA, ethylisopropyl amiloride; HOE694, 3-methyl sulfonyl-4-piperidinobenzoyl guanidine methane sulfonate; M, membrane segment; NHE, Na⁺/H⁺ exchanger; PS120, A lung fibroblast cell line deficient in Na⁺-H⁺-exchange activity; PCR, polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffered saline; NMR, nuclear magnetic resonance; ExPASy, Expert Protein Analysis System; IL, intracellular loop; EL, extracellular loop.

² NHE1 (Swiss-Prot Accession Number P19634); NhaA (Genbank™ Data Bank Accession Number 1ZCD)

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Expression and transport activity of wild type and mutant NHE1 proteins. *A*, Western blot analysis. Stably transfected PS120 cells were lysed, the membrane extracts were subjected to SDS-PAGE followed by protein transfer to Hybond-C nitrocellulose membranes, the membranes were probed with the N1P1 anti-NHE1 or anti-p125^{FAK} antibodies, and the proteins were detected using chemiluminescence as detailed in

“Experimental Procedures”. The top panel shows the plasmalemmal fully glycosylated (upper band labeled as NHE1 at right) and the intracellular core-glycosylated (lower band) forms of NHE1 whereas the lower panel displays p125^{FAK} (FAK) used as an internal control to ascertain homogenous loading of the different wells. Molecular mass (kDa) is indicated to the left. *B*, densitometric analysis of the plasma membrane bound forms of NHE1. Band densities were systematically normalized to that of the wild-type exchanger and to the relative expression of p125^{FAK}. Values represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. *C*, initial rates of H⁺-driven ²²Na⁺ uptake in PS120 cells acid-loaded by the NH₄Cl prepulse technique. Values represent the mean \pm SD of 3 independent experiments in which triplicate measurements were performed.

Fig. 2. Determination of the kinetic parameters of Na⁺ transport. *A*, uptake time course studies in PS120 cells acid-loaded by the NH₄Cl prepulse technique (see “Experimental Procedures” for details). Linear regression analysis was used to assess that initial rate conditions prevail for up to 20 min of uptake as compared to 3 min only in the case of the mutated and wild type NHE1 proteins, respectively. *B*, apparent affinities of Na⁺ transport. A one time-point approach was used to measure the initial rates of transport as a function of extracellular Na⁺ concentrations in the absence and presence of 300 μ M EIPA. The data points represent NHE-specific uptake obtained from the difference between these two rates, and normalized thereafter to the maximum value observed in each data set. Lines shown were obtained by non-linear regression analysis using a sigmoid model equation to the data points assimilated to the group I (solid line) and group II (dashed line) mutants discussed in the text. Results for the individual proteins are summarized in table 2. In *A* and *B*, values represent the mean \pm SD of 3 independent experiments in which triplicate measurements were performed for the wild type NHE1 () and mutated proteins Glu₃₄₆Asp (), Glu₃₄₆Gln (◆), Glu₃₄₆Asn (★), Glu₃₄₆Gly (▲), Glu₃₄₆Trp (▼), AlaLeuGlu₃₄₇ (►), and Glu₃₄₅AlaLeu (□). Missing error bars were smaller than the symbol size.

Fig. 3. Na⁺ transport sensitivity to EIPA (*A*) and HOE694 (*B*) in PS120 cells expressing wild-type NHE1 (●), Glu₃₄₆Gln (◆) or Glu₃₄₆Asn (★). The previously described (37) Glu₃₄₆Asp mutant (■) is also shown for comparison. The initial rates of transport were estimated by a one time-point approach (3 min) at increasing concentrations of the drugs in the extracellular medium (see “Experimental Procedures” for details), and normalized thereafter to the maximum value observed in each data set. Values in *A* represent the mean ± SD of 3 independent experiments in which triplicate measurements were performed. Those in *B* are the average of triplicate measurements performed in 3 independent experiments using different range of drug concentrations. In *A* and *B*, lines shown were obtained by non-linear regression analysis using a sigmoid model equation to the data points.

Fig. 4. Na⁺ transport sensitivity to EIPA (*A*) and HOE694 (*B*) in PS120 cells expressing wild-type NHE1 (●), Glu₃₄₆Gly (▲) or Glu₃₄₆Trp (▼). The previously described (37) Glu₃₄₆Asp mutant (■) is also shown for comparison. Experimental conditions and analyses were as described in the legend of Fig. 3.

Fig 5. Na⁺ transport sensitivity to EIPA in PS120 cells expressing wild-type NHE1 (●), Glu₃₄₅AlaLeu (□) or AlaLeuGlu₃₄₇ (►). Experimental conditions and analyses were as described for EIPA in the legend of Fig. 3.

Fig. 6. Sequence alignment of the membrane domains of NhaA and NHE1. The strategy used is described in “Experimental Procedures”. Above the NhaA sequence, the black lines indicate the transmembrane segments established from its crystal structure (30), and residues Asp₁₃₃ and Lys₃₀₀ appear in black bold. In the NHE1 sequence, the amino acid residues coloured in red, blue or violet were located by cysteine scan analysis (28) extracellularly, intracellularly or inside of the membrane, respectively. Glu₃₄₆ also appears in black bold.

Fig. 7. Effect of individual mutations Leu₁₆₃Phe (▶) and Glu₃₄₆Asp (■), and of dual substitution Leu₁₆₃Phe/Glu₃₄₆Asp (▼) in M4 and M9 on Na⁺ transport sensitivity to EIPA. Wild-type NHE1 (●) is also shown for comparison. Experimental conditions and analyses were as described for EIPA in the legend of Fig. 3.

Fig. 8. Chemical structures of EIPA and HOE694. Both molecules share a protonated guanidinium group (A), but diverge in showing either pyrazine (B) or phenyl (C) rings substituted at positions 5 or 4 with different hydrophobic groups, respectively.

APPENDIX. Derivation of a kinetic mechanism of Na⁺/H⁺ exchange

Fig. A1. Kinetic model of Na⁺/H⁺ exchange. Details are given in the text.

Table I. Oligonucleotide sequences used to construct the NHE1 mutants. Base mismatches are in bold and the codon changed are underlined.

Mutation	Sequence 5'→3'
Glu₃₄₆Gly	CTTGTCAGCC <u>GGG</u> CTCTTCC
Glu₃₄₆Trp	CTTGTCAGCC <u>TGG</u> CTCTTCC
Glu₃₄₆Gln	CTTGTCAGCC <u>CAG</u> CTCTTCC
Glu₃₄₆Asn	CTTGTCAGCC <u>AAC</u> CTCTTCC
AlaLeuGlu₃₄₇	GCCTACTTGTCAGCC <u>CTGGAG</u> TTCCACCTGTCAGGC
Glu₃₄₅AlaLeu	TACTTGTCAG <u>AGGCG</u> CTCTTCCAC
Leu₁₆₃Phe	GTCTTCTTCT <u>TTCT</u> TCTGCTG

Table II. Kinetic parameter values of wild-type and mutant NHE1 exchangers. The initial rates of tracer $^{22}\text{Na}^+$ uptake (v^*), expressed in $\text{pmol}\cdot 3\text{ min}^{-1}\cdot \text{mg protein}^{-1}$, correspond to the data shown in Fig. 1C after normalization for mature exchanger expression according to the densitometric analysis displayed in Fig. 1B. Apparent K_m values (mM) for Na^+ transport were determined from the data presented in Fig. 2B. V_{\max} values ($\mu\text{mol}\cdot \text{min}^{-1}\cdot \text{mg protein}^{-1}$) were obtained from the same data (not normalized to the highest value) and were corrected for exchanger expression at the plasma membrane.

Mutation	v^* (%)	K_m	V_{\max}	V_{\max}/K_m (%)
wtNHE1	0.23 ± 0.02 (100)	17.5 ± 3.1	656 ± 25	37.5 (100)
Glu₃₄₆Asp	0.12 ± 0.06 (51)	61.8 ± 4.1	1361 ± 88	22.0 (59)
Glu₃₄₆Gln	0.042 ± 0.009 (18)	12.4 ± 0.7	39.5 ± 1.1	3.2 (8.5)
Glu₃₄₆Asn	0.040 ± 0.010 (19)	15.1 ± 2.0	32.6 ± 1.8	2.2 (6)
Glu₃₄₆Gly	0.035 ± 0.011 (15)	16.8 ± 2.1	37.3 ± 4.0	2.2 (6)
Glu₃₄₆Trp	0.023 ± 0.007 (10)	50.8 ± 5.0	84.5 ± 20.5	1.7 (4.5)
AlaLeuGlu₃₄₇	0.024 ± 0.007 (11)	58.3 ± 0.8	106 ± 16	1.8 (5)
Glu₃₄₅AlaLeu	0.087 ± 0.008 (38)	18.4 ± 0.4	33.2 ± 7.2	1.8 (5)

Table III Dissociation constants (K_i) of drug binding to wild type and mutant NHE1 exchangers. Values shown are the best fit parameter \pm SER (standard error of regression) corresponding to the non linear regression analyses presented in Fig. 3, 4, 5, and 7.

Mutation	EIPA		HOE694	
	K_i (μM)	Ratio vs. wt	K_i (μM)	Ratio vs. wt
wtNHE1	0.027 ± 0.002		0.070 ± 0.07	
Glu₃₄₆Asp	7.2 ± 1.0	265	68.5 ± 6.8	980
Glu₃₄₆Gln	0.45 ± 0.06	17	12.2 ± 1.8	175
Glu₃₄₆Asn	0.57 ± 0.04	21	85.5 ± 12.2	1222
Glu₃₄₆Gly	1.04 ± 0.15	39	132.2 ± 16.6	1890
Glu₃₄₆Trp	5.28 ± 1.04	195	761.1 ± 104.2	10870
Glu₃₄₆Ser	0.22 ± 0.03	8	ND	
AlaLeuGlu₃₄₇	16.8 ± 2.6	622	ND	
Glu₃₄₅AlaLeu	0.8 ± 0.2	30	ND	
Leu₁₆₃Phe	0.94 ± 0.07	35	ND	
Leu₁₆₃Phe/Glu₃₄₆Asp	50.8 ± 9.1	1881	ND	

Figure 1

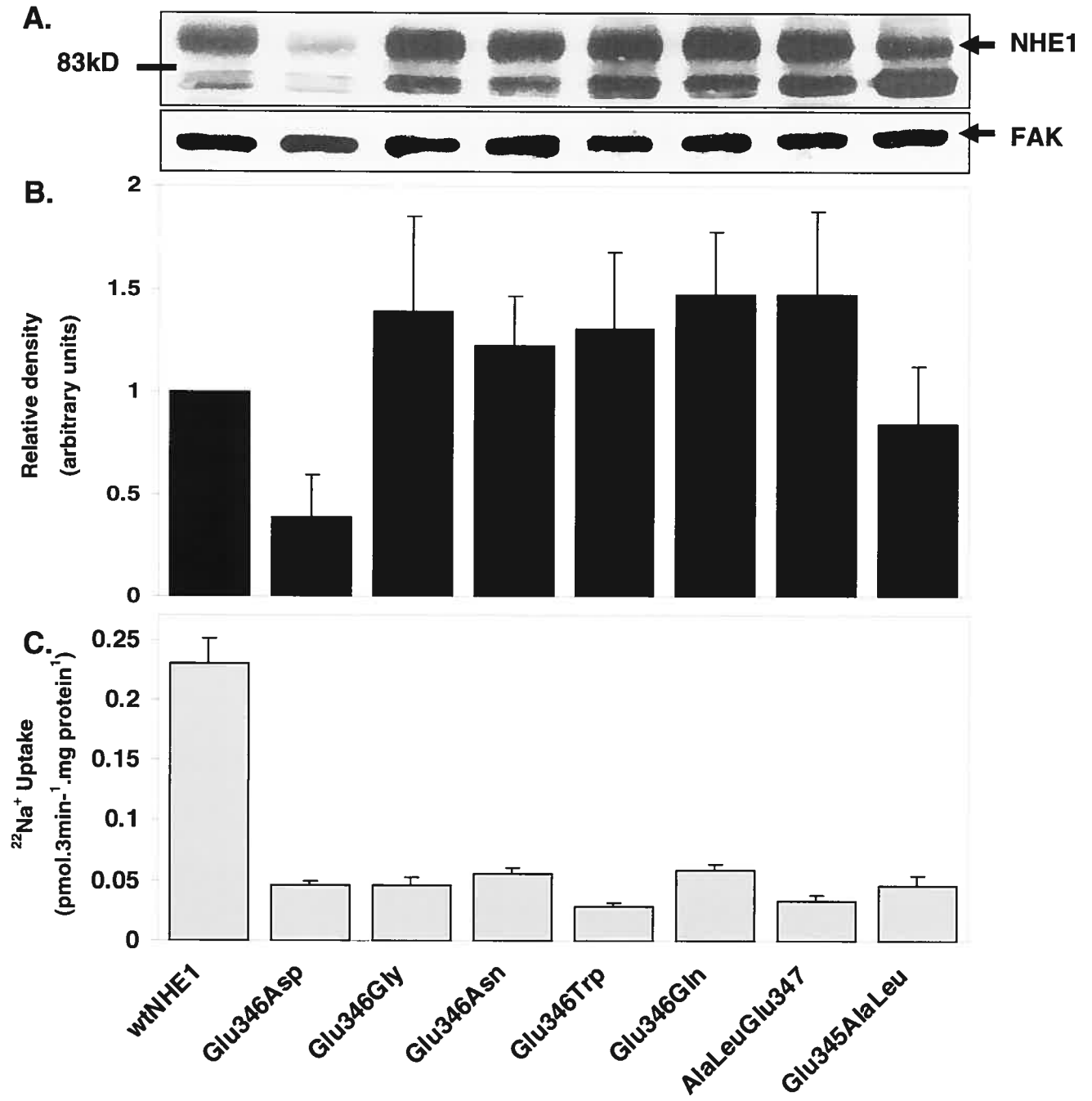


Figure 2

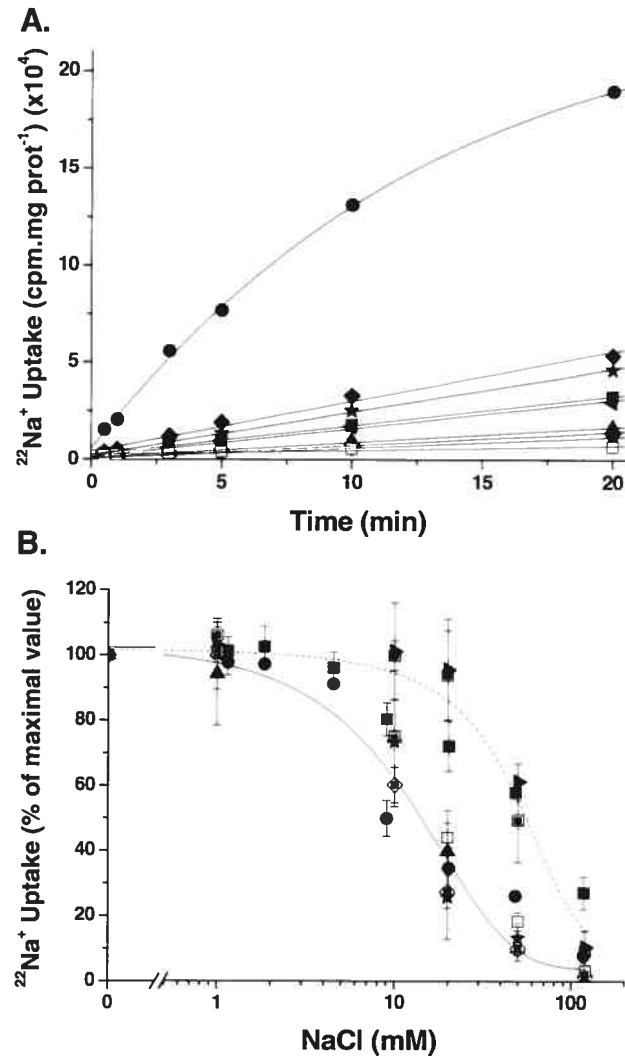


Figure 3

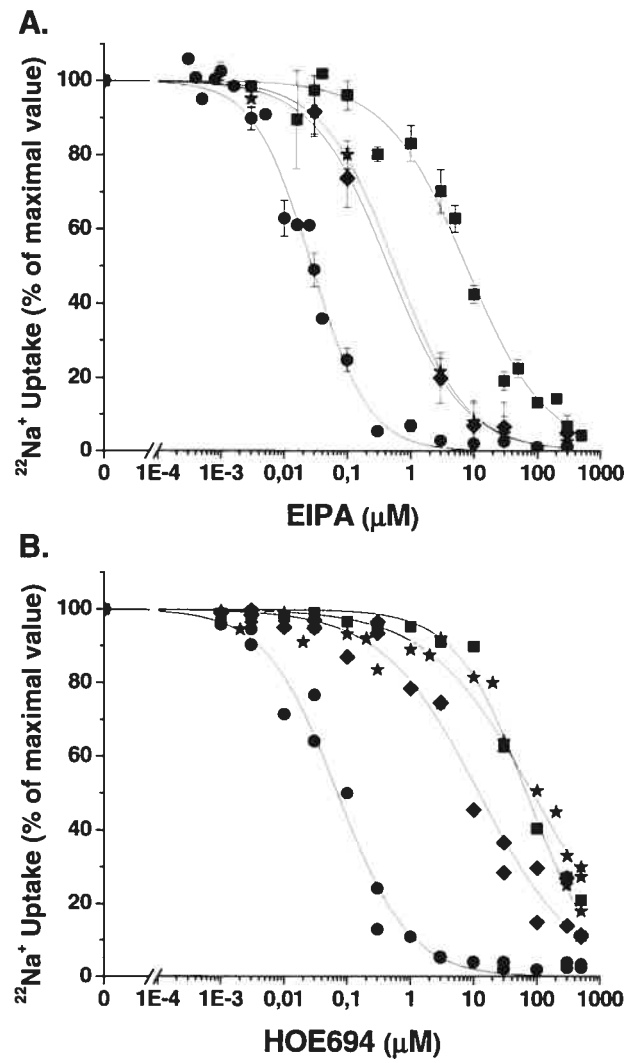


Figure 4

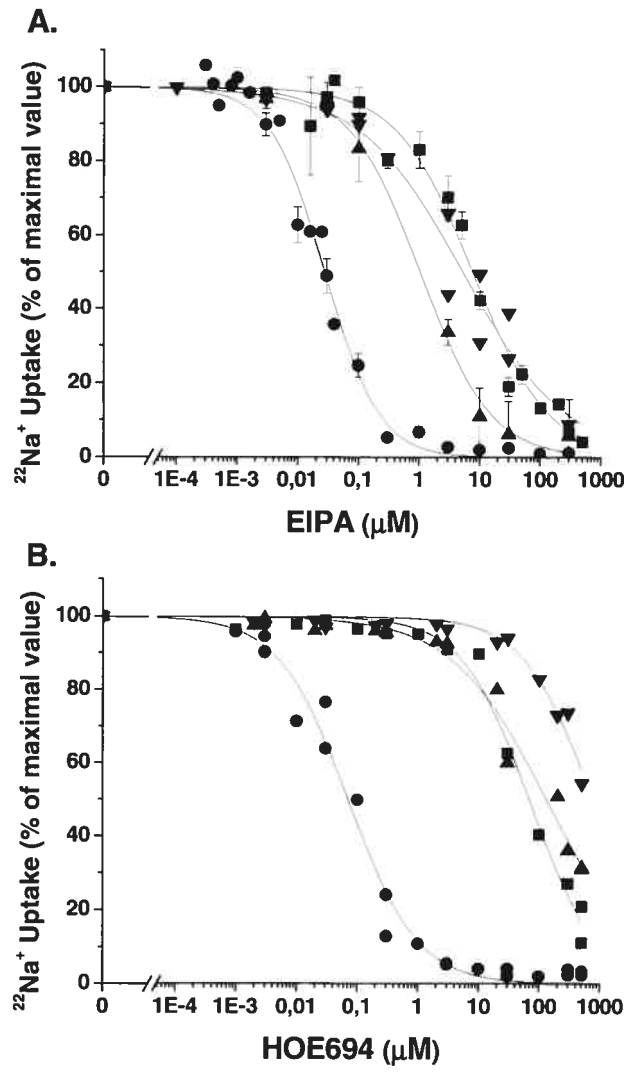


Figure 5

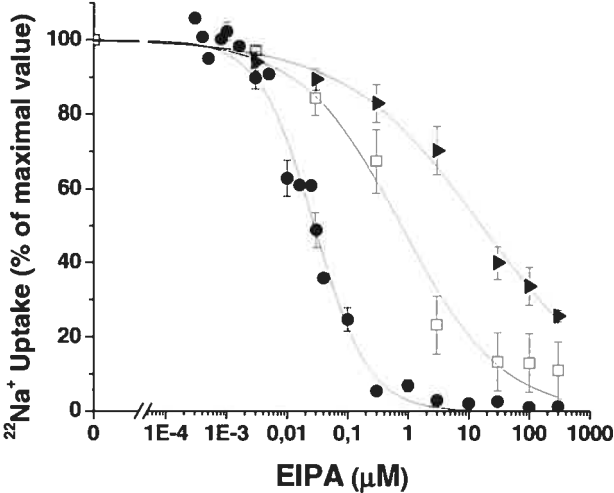


Figure 6

NhaA	9	SSDASGGIIL	IIAAILAMIM	ANSGA-----	-----
NHE1	1	MVLRSGICGL	SPHRIFPSLL	VVVALVGLLP	VLRSHGLQLS PTASTIRSE
		*:. . . . *	::*::: . . .		
NhaA	34	-----	-TSGWYHDFL	ETPVQLRVGS	LEIN--KNML LWINDALMAV
NHE1	51	PPRERSIGDV	TTAPPEVTPE	SRPVNHSVTD	HGMKPRKAFP VLGIDYTHVR
		*:.**..*..	::: *..	: .* . .
NhaA	71	FFLLVGGLEVK	RELMQGSLAS	LRQAAFPVIA	AIGGMIVPAL LYLAFFNYADP
NHE1	101	TPFEISLWIL	LACLMKIGFH	VIPTISSIVP	ESCLLIVVGL LVGGLIKGVG
		: : * :	: . . . : : .	.. : ** : * * :
NhaA	121	-----I	TREGWAIPAA	TDIAFALGVL	ALLGSRVPLA LKIFLMALAI
NHE1	151	ETPPFLQSDV	FFLFLLPPII	LDAGYFLPLR	QFTENLGTIL IFAVVGTLWN
		:	*..	*. : . * : .	: . . . : * .
NhaA	162	IDDLGAIIII	ALFYT-----	-----NDLSM	ASLGVAVAI AVLAVLNLCG
NHE1	201	AFFLGGLMYA	VCLVGGEQIN	NIGLLDNLLF	GSII SA VDPV AVLAVFEIHF
		. ** : :	: * . . : * . . .	: * * * * : :
NhaA	202	ARRTGVIILV	GVVLWTAVLK	-----	-----SGVH
NHE1	251	INELLHILVF	GESLLNDAVT	VVLYHLFEF	ANYEHLVGIIVD IFLGFLSFFV
		: : . * . *		* .
NhaA	226	ATLAGVIVGF	FIPLKEKHGR	-----SPAK	RLEHVLHPWV AYLIPLPLFAF
NHE1	301	VALGGVLVGV	VYGVIAAFTS	RFTSHIRVIE	PLFVFLYSYM AYLSAELFHL
		.:*:*:*:* *	*. : . . . : * * . . * * . .
NhaA	270	ANAGVSLQGV	TL-----	-----	-----
NHE1	351	SGIMALIASG	VVMRPYVEAN	ISHKSHTTIK	YFLKMWSSVS ETLIFIFLGV
		:		
NhaA	282	-----DGLT	SILPLGIIAG	LLIGKPLGIS	LFCWLALRLK LAHLPEGTTY
NHE1	401	STVAGSHHWN	WTFVISTLLF	CLIARVLGVL	GLTWFINKFR --IVKLTPKD
		** : . ** :	: * . . . :
NhaA	326	QQIMVVGILC	GIGFTMSIFI	ASLAFGSVD-	PELINWAKLG ILVGSISSAV
NHE1	449	QFIIAYGGLR	GAIAFSLGYL	LDKKHFPMCD	LFLTAIITVI FFTV FVQGMT
		* * . * * *	:	* :
NhaA	375	IGYSWLRVRL	-		
NHE1	499	IRPLVDLLAV	K		
		*	:		:

Figure 7

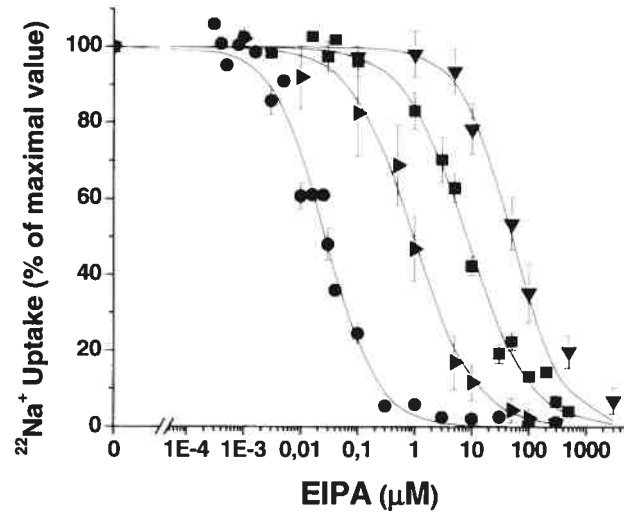
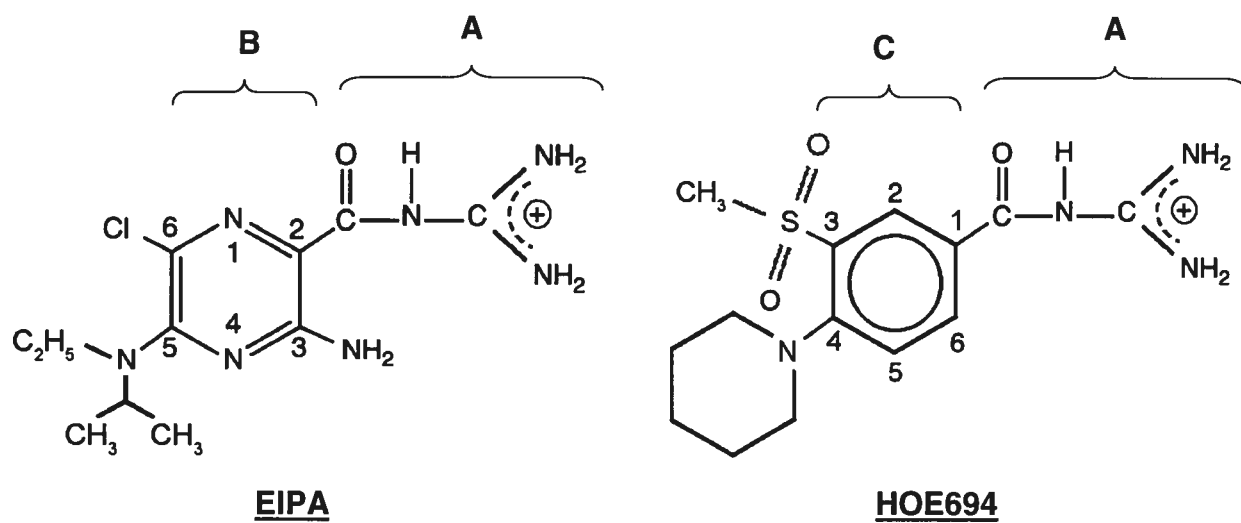


Figure 8



APPENDIX: Derivation of a kinetic mechanism of Na⁺/H⁺ exchange

The generally accepted model explaining Na⁺/H⁺ exchange corresponds to the alternating-access mechanism illustrated in figure A1 (47,48). In this model, the transporter has two major alternating conformations with the cation-binding site facing either inwards (N₁) or outwards (N₄). Interconversion between these two conformations is only possible through the H⁺-bound (N₂ and N₃) or Na⁺-bound (N₅ and N₆) forms of the protein. In the most general case, internal H⁺ (H_i) and Na⁺ (Na_i) compete for binding to N₁ whereas external H⁺ (H_o) and Na⁺ (Na_o) compete for binding to N₄, so that the net rate (*v*) of Na⁺ transport in exchange for H⁺ is dictated by the respective gradients of the two cations and is given by equation A1.

$$v = k_{56}N_5 - k_{65}N_6 \quad (\text{A1})$$

Binding of the amiloride derivatives (I_o) occurs only on the outside and is assumed to be competitive with Na⁺ binding to the N₄ carrier species. As presented in figure A1, the kinetic model assumes that the cation and inhibitor binding steps are fast (single arrows, associated with the dissociation constants K₁₂, K₁₆, K₄₃, K₄₅, and K_i) as compared to the cation transport steps (double arrows associated with the microscopic rate constants k₂₃, k₃₂, k₅₆, and k₆₅). This so-called rapid equilibrium assumption is justified by the fact that the generic form of the initial rate equation so obtained is identical to that derived under the most general steady-state assumption (result not shown).

The steady-state velocity equation was derived for the general case corresponding to the kinetic model shown in figure A1 using the computer program developed by Falk et al. (59). It was next simplified to give equation A2 describing the initial rate of Na⁺ transport

under the experimental conditions of our experiments, which favour H_i and Na_o binding over H_o and Na_i binding (acid-loading for 1 hour and ^{22}Na uptake measurements at pH 7.4, see main text).

$$v = \frac{k_{23}k_{56}(Na_o)N_T}{k_{23}K_{45} + k_{23}K_{45}[(I_o)/K_i] + (k_{23} + k_{56})(Na_o)} \quad (A2)$$

Equation A2 can be cast under the classical Michaelis-Menten form of equation A3.

$$v = \frac{V_{\max}(Na_o)}{K_m \left\{ 1 + [(I_o)/K_i] \right\} + (Na_o)} \quad (A3)$$

In the absence of inhibitor, the kinetic parameters V_{\max} and K_m are thus given by equations A4 and A5, respectively.

$$V_{\max} = \frac{k_{23}k_{56}N_T}{k_{23} + k_{56}} \quad (A4)$$

$$K_m = \frac{k_{23}K_{45}}{k_{23} + k_{56}} \quad (A5)$$

At the very low Na^+ concentrations used in figure 1, the simplification $(Na_o) \ll K_m$ can be applied to equation A3, and the initial rates of tracer ^{22}Na uptake v^* are therefore given by equation A6.

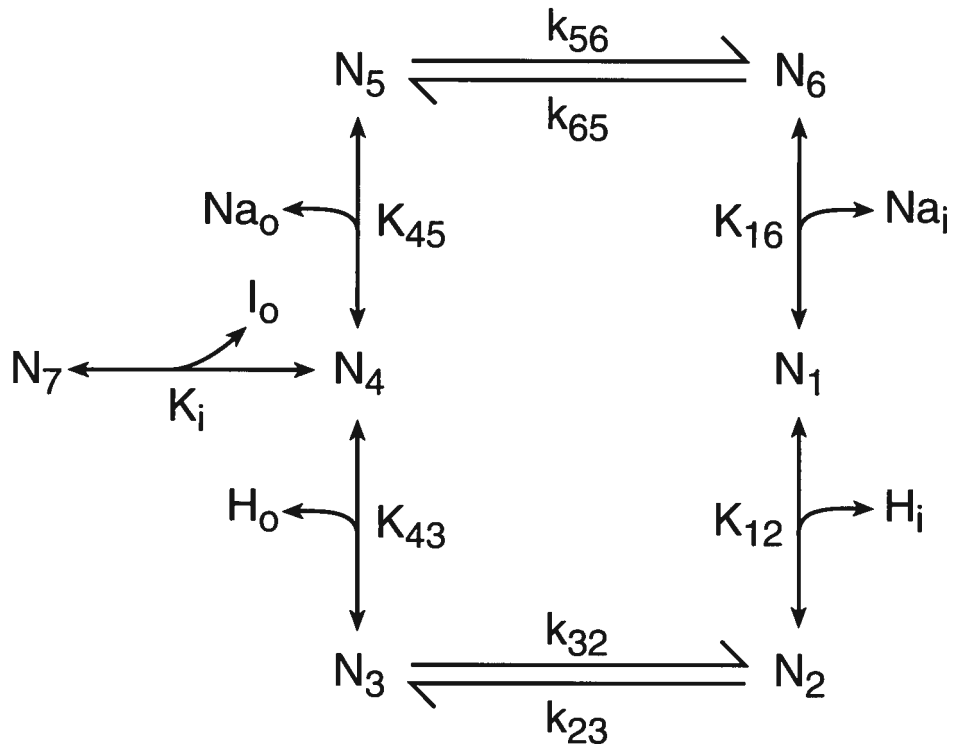
$$v^* = \frac{V_{\max}(Na_o)}{K_m} = \frac{k_{56}N_T(Na_o)}{K_{45}} \quad (A6)$$

In the inhibition studies by amiloride derivatives, the drug concentrations producing 50% inhibition of Na^+ transport (IC_{50}) are given by equation A7, which can be easily derived from equation A3 by solving the equality v_i (rate in the presence of inhibitor) / v_o (rate in the absence of inhibitor) = $1/2$.

$$(IC_{50}) = K_i \left[1 + \frac{(Na_o)}{K_m} \right] \quad (A7)$$

At the very low Na^+ concentrations used in these studies, the inequality $(Na_o) \ll K_m$ also applies, and equation A7 clearly shows that the IC_{50} value measures directly the dissociation constant of inhibitor binding K_i .

Figure A1



Accord des coauteurs

1 – Identification de l'étudiant et du programme

David GERMAIN

Programme de physiologie et biophysique moléculaires

2- Description de l'article

David Germain, Alfred Berteloot and Josette Noël

The side-chain and negative charge of glutamate 346 in human NHE1 modulate the access to, and the reorientation of the Na⁺ binding site

À soumettre à la revue Journal of Biological Chemistry au début du mois de mars 2006

3- Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que David Germain inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Implication du glutamate 346 de NHE1 dans le transport du Na⁺ et l'interaction avec les inhibiteurs.

Josette Noël

Nom

Josette, le 27-02-06

Signature

Alfred BERTELOOT

Nom

Berteloot

Signature

Permission de l'éditeur de la revue

1 – Identification de la revue

Journal of Biological Chemistry
ASBMB
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3996

2 – Identification de l'éditeur

A venir

3 – Identification de l'article

David Germain, Alfred Berteloot and Josette Noël
The side-chain and negative charge of glutamate 346 in human NHE1 modulate the access to, and the reorientation of the Na⁺ binding site
En soumission (No soumission : A venir)

L'étudiant David Germain est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat intitulée : Implication du glutamate 346 de NHE1 dans le transport du Na⁺ et l'interaction avec les inhibiteurs

ASBMB does not charge for and grants use without requiring your copyright permission request for:

- Original authors wanting to reproduce portions of their own work; or to republish their material in not-for-profit formats or venues.
- Students wanting to reproduce or republish their work for educational purposes.
- Students using other authors' material for their theses.
- Reproduction or republication of abstracts only.
- Photocopying up to 5 copies for personal use.
- Non-profit educational institutions making multiple photocopies of articles for classroom use; all such reproduction must utilize institutionally owned equipment for this purpose.

Source : http://www.jbc.org/misc/Copyright_Permission.shtml

Chapitre 3 : Discussion

Notre laboratoire s'est intéressé au domaine transmembranaire 9 de l'échangeur Na^+/H^+ NHE1 et, plus particulièrement, au résidu Glu_{346} et à son environnement proche. En effet, un variant spontané de NHE1 extrêmement résistant à l'inhibition par les inhibiteurs classiques a été isolé et caractérisé. Le séquençage de ce NHE1 a révélé la présence d'une mutation unique $\text{Glu}_{346}\text{Asp}$ qui est seule responsable du phénotype de haute résistance. Cette mutation se situe dans le M9, à proximité de l' His_{349} pour laquelle Wang *et al.* suggèrent également un rôle dans la sensibilité aux inhibiteurs (386). Il est d'ailleurs intéressant de noter que ces acides aminés ne sont séparés que par deux acides aminés, ce qui les amène grossièrement du même côté de l'hélice α (Figure 15, p.172). Par ailleurs, il convient de rappeler que la structure secondaire de NHE1 n'est pas connue. Toutefois, l'analyse informatique de la séquence de NHE1 et, plus particulièrement, du M9 (dont la position est tirée des travaux de Wakabayashi *et al.* (382)) suggère que cette région s'organise en hélice α avec une probabilité de 0.9 (valeur déterminée par le logiciel Antheprot (86)). Cette configuration est alors compatible avec son caractère transmembranaire potentiel.

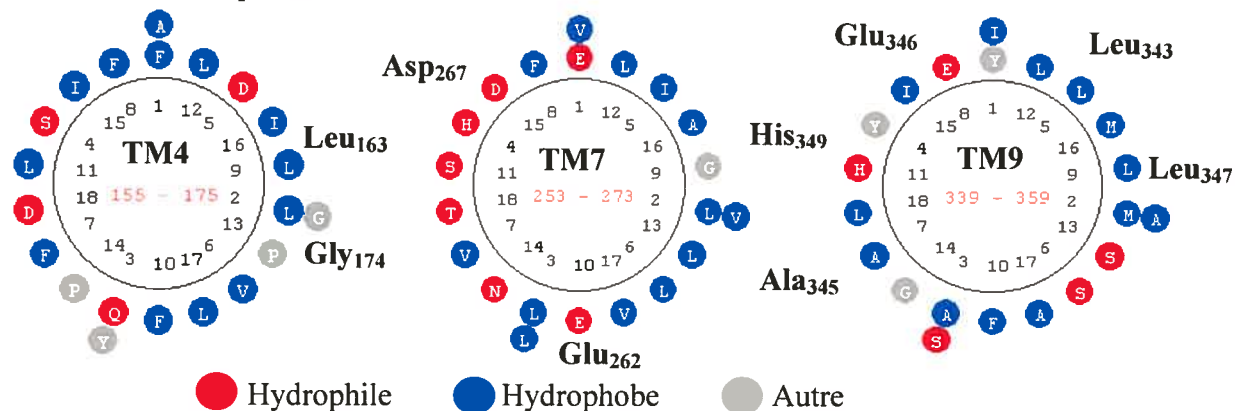


Figure 15 : Schématisation des domaines transmembranaires 4, 7 et 9 de NHE1 en projection verticale. La projection des hélices α a été réalisée à l'aide du logiciel Antheprot en utilisant la séquence de NHE1 au numéro d'accèsion GenBank® NP_003038.2. Les coordonnées des segments transmembranaires ont été tirées de la référence (382). Les résidus hydrophiles et hydrophobes sont respectivement représentés en rouge et en bleu.

1. Implication de Glu₃₄₆ dans l'interaction avec les inhibiteurs et le Na⁺

Les acides aminés acides polaires présents dans la séquence des transporteurs de cations sont de bons candidats à la mutagenèse dirigée. En effet, leurs charges négatives peuvent être engagées dans des liaisons de type électrostatique avec des charges positives d'autres acides aminés, d'inhibiteurs ou des cations transportés, ce qui rend ces acides aminés séduisants. Ainsi, les résidus Asp et Glu ont fait l'objet d'études aussi bien au niveau de l'échangeur Na⁺/H⁺ qu'au niveau d'autres transporteurs et canaux ioniques. En effet, lors de leur travaux sur l'échangeur Na⁺/H⁺ de levure, l'équipe de Fliegel a démontré que les résidus Asp₁₄₅, 178, 266 et 267 sont importants pour l'activité d'échange de sod² et a émis l'hypothèse que ces acides aminés font face à la lumière du « pore » de sod² (91, 403). Des résidus polaires et acides ont aussi été identifiés dans le canal calcique ECaC1 pour lequel la mutation de l'aspartate 542 en asparagine, glycine et alanine diminue très significativement l'affinité du canal pour le Ca²⁺ (173). La perte de cette charge négative modifie complètement l'interaction avec le Ca²⁺ puisque ce canal forme un tétramère. Dans le canal sodique ENaC, la mutation des résidus Glu₅₆₈, Glu₅₇₁, Asp₅₇₅, Glu₅₉₅, Glu₅₉₈ et Asp₆₀₂ de la sous-unité α de ENaC abolit ou diminue l'activité du canal (230, 336).

Toutefois, la coordination des ions dans le pore d'un transporteur ionique n'est pas toujours uniquement due à la chaîne latérale des acides aminés qui tapissent ce pore. En effet, dans plusieurs cas, la coordination fait intervenir les groupements carbonyle (-C=O) de l'ossature de la chaîne protéique. C'est le cas notamment du filtre de sélectivité du canal K⁺ KCsA dans lequel quatre couronnes de quatre atomes d'oxygène provenant du lien peptidique assurent la coordination et le transport du K⁺ (176).

Bien que la valeur du IC₅₀ obtenu pour le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 soit tout à fait comparable à celle de NHE3 (Tableau 3, p.55), la comparaison des séquences des différentes isoformes montrent que le Glu₃₄₆ est un acide aminé extrêmement conservé

(voir Figure 11, p.73). Ce résidu ne peut donc pas être responsable du phénotype de haute résistance à l'inhibition de NHE3 par rapport à NHE1.

Afin de déterminer si Glu₃₄₆ interagit directement avec le Na⁺ et les inhibiteurs ou intervient seulement dans l'établissement d'une conformation tridimensionnelle favorable à ces interactions, une série de mutations concernant les résidus adjacents au Glu₃₄₆ a été planifiée. Les acides aminés Ala₃₄₅ et Leu₃₄₇ sont situés de part et d'autre de Glu₃₄₆ alors que Leu₃₄₃ est située à environ un tour d'hélice en amont de Glu₃₄₆. L'Ala₃₄₅ a été mutée en Gly et en Trp afin d'étudier les effets d'une mutation majoritairement conservatrice, d'une part, et très délétère, d'autre part. Pour les mêmes raisons, Leu₃₄₃ et Leu₃₄₇ ont été mutées en Val (un acide aminé hydrophobe) et Trp. De façon surprenante, l'analyse du profil pharmacologique de tous ces mutants a montré des IC₅₀ à l'EIPA tout-à-fait comparables au IC₅₀ de NHE1 de type sauvage (environ 0.03μM). De même, tous ces mutants présentent une affinité pour le Na⁺ similaire à celle de NHE1 soit environ 18mM (276).

Deux possibilités doivent être envisagées :

1- Le résidu Glu₃₄₆ interagit directement avec les inhibiteurs et le Na⁺ ou

2- Le résidu Glu₃₄₆ prend part à un site de coordination

1- Selon la première hypothèse, le résidu Glu₃₄₆ interagit directement avec les inhibiteurs et le Na⁺ car la mutation des acides aminés voisins ne perturbe pas l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs et le Na⁺. Si Glu₃₄₆ faisait partie d'une architecture moléculaire propice aux interactions avec les inhibiteurs ou autres résidus critiques, sa mutation aurait effectivement des effets sur les IC₅₀ et le Km, mais on s'attendrait à ce que les résidus voisins fassent aussi partie de cette architecture. Or, leur mutation n'entraîne aucun effet. Toutefois, la mutation de l'His₃₄₉ diminue la sensibilité de NHE1 à l'EIPA d'un facteur 6 par rapport au NHE1 de type sauvage mais n'a pas d'effet sur l'affinité pour le Na⁺. Ces valeurs sont bien en deçà de nos résultats (le Glu₃₄₆Asp-NHE1 est 210 fois plus résistant à l'EIPA que le NHE1 de type sauvage et son affinité pour le Na⁺ est diminuée d'un facteur 3 à 4), ce qui nous permet de relativiser l'implication de His₃₄₉ dans

l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs. Selon cette première hypothèse, l'implication du M9 dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs et le Na^+ serait donc restreinte à une interaction directe de ceux-ci avec le Glu₃₄₆. L'hypothèse 2 implique que le M9 (et *a fortiori* Glu₃₄₆) n'est certainement pas le seul segment transmembranaire impliqué dans la liaison de NHE1 aux inhibiteurs et au Na^+ . Par conséquent, Glu₃₄₆ forme plutôt un site de coordination avec d'autres structures, et la mutation des acides aminés adjacents au Glu₃₄₆ (soit Leu₃₄₃, Ala₃₄₅ et Leu₃₄₇) ne devrait présenter aucun effet à la condition que ces mutations ne perturbent pas l'architecture du site de liaison ou ne modifie pas l'accès au site dans le pore.

L'attrait principal de la mutation Glu₃₄₆Asp est dû à la très faible différence de structure entre le glutamate et l'aspartate. En effet, Glu ne possède qu'un carbone de plus dans sa chaîne latérale. Toutefois, comme les profils pharmacologiques le montrent, une si petite différence peut entraîner des effets très importants (la mutation Asp₈₉₃Glu de la pompe Na^+/K^+ -ATPase provoque aussi un effet dramatique sur son activité (36)). Cette observation nous a poussés à analyser les propriétés physico-chimiques qui régissent l'interaction de Glu₃₄₆ avec le Na^+ et les inhibiteurs. À cette fin, le résidu Glu₃₄₆ a été muté en différents acides aminés aux propriétés physico-chimiques différentes. Bien qu'*a priori*, la charge de Glu₃₄₆ ne devrait pas jouer de rôle important (Glu et Asp portent la même charge, pKa de 4.5-4.6), les deux résidus induisent deux phénotypes très différents. Il faut toutefois tenir compte de la possibilité que la position relative de la charge est critique. Par conséquent, un raccourcissement de la chaîne du glutamate vers l'aspartate (1,5Å) pourrait avoir un effet conséquent sur les interactions de NHE1 avec les inhibiteurs et/ou le Na^+ . Glu₃₄₆ a donc été muté de façon à vérifier cette hypothèse; Glu a été remplacé par Gln et aussi par Asn dans le but d'observer les effets de la neutralisation et de la position relative de la charge de Asp présent dans le mutant original Glu₃₄₆Asp-NHE1. Étant donné que la seule différence entre Glu et Asp est la taille de la chaîne latérale, ce facteur a été étudié en mutant Glu₃₄₆ en Gly, un acide aminé de faible encombrement stérique (volume de 48 Å³) et en Trp, un résidu très encombrant (163 Å³), et finalement, l'effet de la position du glutamate en 346 a été mise à l'épreuve par les mutations consistant à interchanger Glu₃₄₆

avec ses deux voisins immédiats, soient Ala₃₄₅ et Leu₃₄₇ donnant les mutants Glu₃₄₅AlaLeu et AlaLeuGlu₃₄₇ respectifs.

2. La charge de Glu₃₄₆ est impliquée dans l'interaction avec les inhibiteurs et le Na⁺

Alors que la différence de phénotype entre NHE1 de type sauvage et le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 ne peut pas être due uniquement à la charge, l'annulation de celle-ci par le mutant Glu₃₄₆Gln-NHE1 entraîne toutefois une diminution de la sensibilité à l'EIPA d'un facteur 11 environ par rapport au NHE1 de type sauvage (un facteur de 210 est observé pour Glu₃₄₆Asp-NHE1). Ceci indique donc que la charge n'est pas le seul facteur critique de l'interaction de Glu₃₄₆ avec les inhibiteurs. Toutefois, il faut considérer que la mutation Glu₃₄₆Asp a aussi pour effet de déplacer la charge négative dans l'espace étant donné que cette mutation raccourcit la chaîne latérale de 1.5Å et aussi fait pivoter le radical situé en fin de chaîne. Ainsi, la charge pourrait quand même jouer un rôle important dans l'interaction de NHE1 avec ses inhibiteurs. L'explication la plus séduisante est que la charge négative portée par Glu₃₄₆ serait en mesure d'interagir avec la charge positive du guanidine des inhibiteurs. La neutralisation de celle-ci (par Gln) ou son déplacement sur la chaîne latérale (par Asp) perturbe cette interaction et empêche l'inhibiteur d'occuper sa position. Le déplacement de la charge serait donc un facteur plus critique que sa neutralisation. Un des résultats surprenants provient de la mutation Glu₃₄₆Asn dont le but était d'étudier les effets de l'annulation de la charge de Asp₃₄₆. En effet, à la lumière de l'hypothèse émise ci-dessus, l'addition des effets de l'annulation de la charge et la modification de la taille de la chaîne latérale du résidu 346 aurait dû en principe aboutir à un NHE1 encore plus résistant à l'EIPA et aux autres inhibiteurs que le mutant Glu₃₄₆Asp. Or nous avons observé le contraire, c'est-à-dire un NHE1 plus sensible que Glu₃₄₆Asp avec un IC₅₀ comparable à celui du mutant Glu₃₄₆Gln.

Ces résultats sont donc à mettre en rapport avec les activités intrinsèques de ces mutants déterminées en prenant en compte l'activité de transport globale et la quantité de

protéines exprimées (Figure 1, p.158 et tableau 2, p.156). En effet, On peut remarquer que tant que la charge négative est placée en position 346 que ce soit par le glutamate soit par l'aspartate, l'activité intrinsèque de NHE1 est plus élevée que pour tous les autres mutants éliminant la charge. La charge en elle-même, plus que sa position relative, est un déterminant important de la vitesse de transport alors que, à l'inverse, tant la charge que sa position relative sont des facteurs critiques vis-à-vis de la liaison de l'EIPA. Rappelons que l'équipe de Fliegel a trouvé des résultats similaires lors de son travail de mutagenèse sur *sod2*, la neutralisation de la charge des résidus Asp145, 178, 241, 266 ou 267 ayant diminué l'activité de *sod2* (403). La même équipe a aussi déterminé que la charge des acides aminés Glu₂₆₂, Asp₂₆₇ et Glu₃₉₁ est importante pour l'activité de NHE1 (270)

L'étude de l'affinité des différents mutants pour le Na⁺ fût très difficile du fait que les mutants Glu₃₄₆ présentaient des activités intrinsèques très diminuées (voir plus loin à ce sujet). L'équipe d'Orlowski a aussi été confrontée à un tel problème pour certains mutants (186). En effet, typiquement, la mesure des affinités pour le Na⁺ s'effectue par des essais d'accumulation de ²²Na⁺ (en concentration traceur soit environ 50pM) en présence de concentrations croissantes de NaCl non marqué (de 0 à 120mM) et ce, pendant environ 30 secondes. Toutefois, dans ces conditions standards, nous avons été incapables d'obtenir une accumulation de ²²Na⁺ mesurable pour tous les mutants sauf Glu₃₄₆Asp-NHE1. Nous savions que les NHE1 mutants étaient assez actifs pour permettre aux cellules les exprimant de survivre à une sélection par charge acide mais, dans ce cas, le temps de récupération dans un milieu contenant du NaCl 120mM est d'une heure. De plus, les essais pour obtenir les IC₅₀ aux inhibiteurs qui se déroulent sur trois minutes permettent un influx mesurable de ²²Na⁺. L'allongement du temps d'incubation peut poser problème dans le cas de la mesure des affinités pour le Na⁺ car l'accumulation de ²²Na⁺ est saturable dans le temps et dépend du volume de la cellule. La partie linéaire de la courbe d'accumulation de ²²Na⁺ en fonction du temps ne dépasse pas 4-5 minutes. Bien sûr, un efflux de ²²Na⁺ par la pompe Na⁺/K⁺-ATPase et le cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ est évité d'une part par l'ajout d'ouabaine (un inhibiteur de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase), et d'autre part par le retrait des ions K⁺ dans le milieu réactionnel ce qui permet d'empêcher le cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ de fonctionner.

Afin de déterminer si la période linéaire d'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ par les différents mutants était différente de celle pour le NHE1 de type sauvage, une mesure de l'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ en fonction du temps a été entreprise. S'étalant sur une période allant de 30 secondes jusqu'à 20 minutes, ces essais ont montré que l'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ par tous les mutants était encore linéaire au bout de 20 minutes (ce qui est compatible avec les activités intrinsèques diminuées), alors que l'accumulation de $^{22}\text{Na}^+$ par le NHE1 de type sauvage fléchit au bout de 4 à 5 minutes (Figure 2A, p.159). Ce résultat nous a permis de réaliser les mesures d'affinité pour le Na^+ par des essais de 20 minutes.

Ces expériences montrent ainsi que les mutants Glu₃₄₆Gln et Glu₃₄₆Asn présentent des $K_{m\text{Na}^+}$ équivalents (12 à 15mM). Ces valeurs ne sont pas différentes de celle du NHE1 de type sauvage (17.5mM) mais bien en-dessous de celle du mutant Glu₃₄₆Asp (62mM). La neutralisation de la charge en position 346 semble donc avoir moins d'impact sur l'affinité pour le Na^+ que sur la sensibilité aux inhibiteurs. La différence de volume entre le Na^+ et l'inhibiteur pourrait être à l'origine de cette différence. L'ion Na^+ étant beaucoup plus petit que l'inhibiteur, il pourrait éventuellement s'accommoder plus facilement d'une perte de charge de l'acide aminé en position 346. Toutefois, la coordination du Na^+ est très perturbée par la mutation Glu₃₄₆Asp alors que la charge négative est toujours présente. Donc encore une fois, le changement de position dans l'espace de la charge, en conséquence du raccourcissement de la chaîne latérale, provoque des effets plus importants que l'annulation de la charge, elle-même..

3. L'encombrement stérique en position 346 ne module pas de façon importante l'affinité au Na^+ et sa sensibilité aux inhibiteurs.

Étant donné que Glu et Asp ne sont différents qu'au niveau de la taille de leur chaîne latérale, il nous est apparu intéressant d'étudier les effets de l'introduction d'acides aminés respectivement de petite taille, comme la glycine, et de grande taille, comme le

tryptophane. Ces deux résidus représentent les deux extrémités du spectre de taille des acides aminés. La glycine étant connue pour ses effets perturbateurs sur le squelette des hélices α , l'alanine, qui présente un volume comparable à la glycine, a aussi été introduite en position 346 (résultats non présentés) : aucune différence n'a été observée dans les profils pharmacologiques entre les mutants Glu₃₄₆Gly et Glu₃₄₆Ala, ce qui nous a permis de conserver le mutant Glu₃₄₆Gly-NHE1 pour la suite des études.

L'analyse des IC₅₀ à l'EIPA obtenus pour Glu₃₄₆Gly-NHE1 et Glu₃₄₆Trp-NHE1 montre une faible différence entre ces deux mutants comparativement à la différence entre le NHE1 de type sauvage et Glu₃₄₆Asp-NHE1. En effet, Glu₃₄₆Trp-NHE1 est environ 5 fois plus résistant que Glu₃₄₆Gly-NHE1 au EIPA et au HOE694, ce qui est peu par rapport aux 265 fois entre NHE1 de type sauvage et Glu₃₄₆Asp-NHE1. De plus cette différence de 5 fois s'accompagne d'un changement presque équivalent de l'affinité pour le Na⁺ (5 fois) qui se répercute directement sur l'activité intrinsèque. L'encombrement stérique du tryptophane ne semble finalement présenter qu'un modeste impact par rapport à la glycine.

Les résidus hydrophobes vont avoir tendance à s'éloigner des molécules d'eau et, donc, de la lumière du transporteur, alors qu'on s'attend à trouver les acides aminés hydrophiles tapisser la lumière de NHE1. Néanmoins, le M9 ne présente pas un profil aussi typique dans la répartition de ses acides aminés (Figure 15, p.172). En effet, le M9 ainsi que le M4 voient leurs résidus hydrophiles répartis de façon relativement égale sur le pourtour de l'hélice α , ce qui est peu représentatif d'un segment transmembranaire participant à la création d'un pore. Au contraire, le M7 dans lequel ont été identifiés les acides aminés Glu₂₆₂ et Asp₂₆₇, critiques pour l'activité d'échange (voir chapitre 2.7.4.1 Quelques acides aminés importants pour l'activité de NHE1, p.78), présente une répartition typique d'un tel segment transmembranaire: les résidus hydrophiles occupent majoritairement une moitié de la circonférence de l'hélice α et on peut facilement imaginer que cette moitié soit tournée vers l'intérieur de la lumière. Bien qu'il ait été démontré hors de tout doute que le M4 et le M9 sont impliqués dans l'interaction avec les inhibiteurs et le transport du Na⁺ (ce qui *a priori* les placeraient face à la lumière), l'analyse de la

répartition des acides aminés de ces segments transmembranaires semble contredire cette prédiction. Encore une fois, les limites des techniques employées ici ont été atteintes et des informations plus précises provenant de l'établissement d'une structure tridimensionnelle de NHE1 sont nécessaires.

4. La charge en position 346 est importante pour l'activité de NHE1

Le dernier aspect abordé dans cette étude de l'implication de Glu₃₄₆ dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs et le Na⁺ est la mesure des effets des différentes mutations sur l'activité intrinsèque de NHE1. En effet, l'étude du transport du Na⁺ par NHE1 en présence ou non d'inhibiteurs ou de Na⁺ non marqué est effectuée à l'aide du ²²Na⁺. Après l'essai, les cellules sont lysées et la quantité de ²²Na⁺ incorporée est reflétée par les cpm (coups par minute) ou les dpm (désintégrations par minute) quantifiés dans un compteur γ . Étant donné que le nombre de cellules peut varier d'une expérience à l'autre, la quantité de ²²Na⁺ incorporée peut également varier. Cette quantité doit alors nécessairement être ramenée ou normalisée par la quantité de protéines présente dans chaque essai, la valeur ainsi obtenue étant appelée activité spécifique. Afin de mesurer les effets de chaque mutation sur une molécule de NHE1, l'activité spécifique est normalisée par le nombre de molécules de NHE1 exprimée à la membrane des cellules examinées. Cette quantité est déterminée par la densitométrie des bandes spécifiques à NHE1 obtenues lors d'un immunobuvardage de type Western anti-NHE1. L'activité intrinsèque est donc une mesure du taux de transport de Na⁺ par une seule molécule de NHE1 et prend donc en compte le niveau d'expression des différents mutants. Ces niveaux d'expression sont d'ailleurs similaires pour tous les mutants sauf pour Glu₃₄₆Asp-NHE1 et Glu₃₄₅AlaLeu-NHE1. Toutefois, l'accumulation brute de ²²Na⁺ est diminuée pour tous les mutants, ce qui confirme le caractère exceptionnel de Glu₃₄₆ dans la physiologie de NHE1. La détermination de l'activité intrinsèque montre que tous les mutants, à l'exception de Glu₃₄₆Asp-NHE1 et Glu₃₄₅AlaLeu-NHE1, fonctionnent avec un taux de transport

grandement diminué. On peut donc conclure que la charge est essentielle pour l'activité de NHE1 car Glu₃₄₆Asp-NHE1, le seul mutant qui conserve une charge équivalente présente une activité intrinsèque peu diminuée par rapport aux autres mutants. Par ailleurs, il faut comparer ces résultats à ceux de la Figure 2B, p.159 concernant l'affinité pour le Na⁺ des différents mutants de NHE1. Le K_{mNa^+} est un paramètre complexe qui fait intervenir l'affinité de NHE1 pour le Na⁺ et la vitesse de réorientation du transporteur. Un changement d'activité intrinsèque en absence d'effet sur le K_{mNa^+} indique que les mutations Glu₃₄₆Gln, Asn, Gly et Ser affectent essentiellement des changements de conformations du transporteur et, par conséquent, que Glu₃₄₆ est important pour ces changements. Inversement, le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 montre un changement de K_m qui dans les conditions expérimentales utilisées, devrait conduire à une réduction de quatre fois de l'activité intrinsèque, ce qui est plus que la diminution de deux fois observée (Tableau 2, p.156). La baisse du K_m observée doit alors être en partie compensée pour une augmentation de la vitesse de transport (V_{max}). Ceci signifie qu'en dépit d'un K_{mNa^+} et d'une activité intrinsèque diminués, le mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1 transporte plus efficacement le Na⁺ à travers la membrane que le NHE1 de type sauvage. Ce V_{max} augmenté pourrait expliquer la diminution de l'expression du mutant Glu₃₄₆Asp-NHE1.

De façon intéressante, le mutant Glu₃₄₅AlaLeu-NHE1, bien que moins exprimé à la membrane par rapport aux autres mutants (Figure 1A p.158), possède aussi une activité intrinsèque plus grande que ceux-ci. Ceci appuie donc le point abordé dans la section précédente concernant l'orientation du M9 par rapport à la lumière du pore de NHE1. Cette configuration favoriserait l'interaction du glutamate avec le Na⁺, ce qui permettrait une activité d'échange Na⁺/H⁺ optimale.

5. Signification des résultats sur la localisation des sites d'interaction de l'EIPA et du Na⁺.

La localisation des sites d'interaction des inhibiteurs et du Na⁺ l'un par rapport à l'autre a fait l'objet de plusieurs discussions. En effet, comme mentionné au chapitre II-6-4,

deux arguments s'affrontent : 1) les sites d'interaction du Na^+ et des inhibiteurs sont les mêmes ou, au moins, se recoupent comme le suggèrent plusieurs études (19, 75, 274, 294) ou 2) ces sites sont différents (71, 106, 172, 286, 386). La mutation Glu₃₄₆Asp, en plus de perturber la liaison aux inhibiteurs, diminue aussi l'affinité pour le Na^+ , ce qui semble signifier que le site d'interaction pour l'inhibiteur n'est pas totalement détaché du site d'interaction du Na^+ et que ces deux sites partagent au moins le Glu₃₄₆.

Cependant, l'affirmation que les sites d'interaction du Na^+ et des inhibiteurs sont identiques devient rapidement indéfendable. En effet, si on suppose que le groupement guanidinium et le Na^+ sont structuralement équivalents comment expliquer que les affinités pour les inhibiteurs sont plus grandes que pour le Na^+ ? Il faut en outre considérer le fait que les mutants présentent des sensibilités différentes aux inhibiteurs testés : EIPA : Glu<Gln<Asn<Gly<Trp<Asp; HOE694 : Glu<Gln<Asp<Gly<Asn<Trp. Il doit donc exister des sites supplémentaires d'interaction pour les inhibiteurs et que ces sites, en stabilisant les inhibiteurs plus que le Na^+ augmentent considérablement l'affinité observée : de l'ordre du micromolaire pour les inhibiteurs et du millimolaire pour le Na^+ . Il convient donc de se demander si le site primaire d'interaction des inhibiteurs et du Na^+ sont identiques. Malheureusement, les résultats apportés par cette étude ne permettent pas de répondre à cette question.

En outre, il n'y a aucune indication que les énergies libres de liaison des inhibiteurs et du Na^+ soient les mêmes. En effet, l'énergie libre de liaison détermine si une réaction est favorable ou non. À ce titre, la liaison des inhibiteurs et celle du Na^+ n'ont pas forcément le même potentiel.

6. Confrontation de ces résultats à la littérature.

Durant la réalisation de ce projet, l'équipe d'Orlowski a publié des résultats similaires lors d'une étude consistant à rechercher des acides aminés critiques impliqués dans la différence de sensibilité aux inhibiteurs entre NHE1 et NHE3 (186). Parmi les diverses mutations étudiées, les auteurs ont décidé d'étudier le résidu Glu₃₅₀ du NHE1 de

rat (équivalent au Glu₃₄₆ du NHE1 humain), bien que cet acide aminé soit conservé entre NHE1 et NHE3 et ne puisse, en aucun cas, être responsable d'une quelconque différence de phénotype entre ces deux isoformes. Cet acide aminé a aussi été muté en Asp, Asn et Gln. Les IC₅₀ pour l'EIPA des mutants Glu₃₅₀Asp-NHE1 et Glu₃₅₀Asn-NHE1 sont tout à fait comparables à ceux que nous avons déterminés avec des valeurs respectives de 5μM et 0.6μM (279). Néanmoins, le mutant Glu₃₅₀Gln-NHE1 présente un IC₅₀ de 1.4μM EIPA, ce qui est plus élevé que la valeur que nous avons déterminée pour Glu₃₄₆Gln-NHE1 (0.35μM). Toutefois, nous trouvons la même affinité pour le Na⁺ soit environ 15mM. Il est difficile d'expliquer la différence de comportement du mutant Glu₃₅₀Gln au niveau de la sensibilité à l'EIPA; la différence de séquence primaire dans cette région entre les NHE1 de rat et humain pourrait éventuellement en être la raison. De façon surprenante, ces auteurs n'ont pas mesuré l'affinité pour le Na⁺ des mutants Glu₃₅₀Asp-NHE1 et Glu₃₅₀Asn-NHE1. Leur détermination de l'activité intrinsèque est aussi cohérente avec nos résultats : les mutations annulant la charge sont très peu actifs (environ 5 à 10% de l'activité du NHE1 de type sauvage) et l'activité intrinsèque du mutant Glu₃₅₀Asp-NHE1 est un peu moins affectée (environ 20% de l'activité du NHE1 de type sauvage comparativement aux 50% que nous avons mesurés pour Glu₃₄₆Asp-NHE1).

Alors qu'aucune variation de l'affinité pour le Na⁺ du mutant Glu₃₅₀Gln-NHE1 n'a été décelée par rapport au NHE1 de type sauvage, les auteurs ne se prononcent pas sur la position du site d'interaction des inhibiteurs par rapport à celui du Na⁺. En outre, en se basant sur le fait que le glutamate en position 350 (ou 346 chez l'humain) n'est pas conservé dans les NHE des organismes inférieurs, ces auteurs suggèrent que ce résidu n'est pas essentiel pour la fonction d'échange de NHE. Cette hypothèse nous apparaît très surprenante étant donné que le résidu Glu₃₄₆ est extrêmement conservé parmi les 9 isoformes clonées à ce jour et dans les différents NHE clonés chez les organismes supérieurs. De plus, la physiologie des échangeurs Na⁺/H⁺ des organismes inférieurs est différente de celle des organismes supérieurs. En effet, le sens et la stoechiométrie de l'échange peuvent varier (voir sections 2.6.1 Électroneutralité, p.59)

Nos résultats montrent que la mutation Glu₃₄₆Asp affecte non seulement la sensibilité aux inhibiteurs mais aussi l'affinité pour le Na⁺. Malheureusement, ce dernier aspect n'a pas été étudié pour le mutant Glu₃₅₀Asp et les auteurs se sont donc retrouvés à émettre une hypothèse différente de la nôtre en se basant sur une étude incomplète.

Malgré quelques divergences, les résultats présentés par l'équipe d'Orlowski sont donc dans l'ensemble assez compatible avec les nôtres et confirment l'importance du résidu Glu₃₄₆ dans l'interaction de NHE1 avec les inhibiteurs. Toutefois nos résultats montrent aussi son importance dans l'affinité de NHE1 pour le Na⁺.

7. Alignement des séquences de NHE1 et de NhaA

Très récemment, la structure de l'échangeur Na⁺/H⁺ bactérien NhaA a été résolue (163). Les éléments principaux de cette structure sont discutés à la section. Les séquences des domaines membranaires ont été soumises à une recherche de type BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tool) afin d'obtenir un certain nombre de protéines homologues et ainsi donner un certain poids aux différentes séquences consensus ainsi mises en évidence. L'ensemble des protéines identifiées par la recherche a été ensuite découpé de façon à isoler les M1, 2 et 3, 4 et 5, 6 à 9 et 10 à 12 en respectant les coordonnées déterminées pour NhaA et NHE1. Toutes les hélices ou groupes d'hélices homologues à NhaA ont été soumis à un alignement de séquences par le logiciel ClustalW.

Par exemple, l'ensemble des séquences homologues correspondant aux M2+3 de NhaA a été aligné avec l'ensemble des séquences homologues correspondant aux mêmes segments transmembranaires de NHE1. Cette méthode est donc aisément reproductible et nécessite peu d'intervention de l'expérimentateur. Après suppression des séquences autres que NhaA et NHE1, l'alignement a été finalisé en ré-éditant l'ensemble des domaines transmembranaires tel que présenté à la figure 6, p.160. Avant d'extrapoler certains éléments de NhaA à NHE1, il faut tenir compte que ces deux échangeurs sont très différents aussi bien au niveau de leur nombre d'acides aminés (815 pour NHE1 et 384 pour NhaA), que de leur physiologie (NhaA est électrogénique mais pas NHE1) et de leur

pharmacologie (NHE1 est sensible à l'amiloride mais pas NhaA). Il est donc normal d'observer un faible pourcentage d'identité entre ces deux transporteurs (moins de 20%). Toutefois, NhaA et NHE1 transportent tous deux du Na^+ en échange de H^+ et il est raisonnable de penser qu'ils doivent partager certains éléments structuraux. La structure cristalline de NhaA est discutée en détail à la section 2.7.4.4 Structure de l'échangeur Na^+/H^+ bactérien NhaA et il en ressort que les TM IV et XI sont orientés de façon opposée et se croisent au milieu de la bicouche lipidique. Chacun de ces deux TM est partagé en deux demi-hélices (une périplasmique (IVp et XIp) et l'autre cytoplasmique (IVc et XIc)), séparées par chaîne étendue. Les extrémités C-terminales des demi-hélices IVc et XIp se font face et, étant donné que chacune de ces deux demi-hélices forme un dipôle électrique, deux charges positives se retrouvent en vis-à-vis. Cette conformation normalement très instable est en fait rendue possible par la présence d'une charge négative portée par un résidu Asp₁₃₃. Une situation similaire est retrouvée pour les domaines XIc et IVp dont les charges négatives sont stabilisées par la Lys₃₀₀. Les résidus Asp₁₃₃ et Lys₃₀₀ sont donc des éléments clé de la structure de NhaA. Un alignement des séquences de NHE1 et NhaA hélice par hélice montre que les résidus Asp₁₃₃ et Lys₃₀₀ de NhaA s'alignent respectivement avec l'Asp₁₇₂ et Arg₄₂₅ de NHE1, soit des acides aminés aux propriétés physico-chimiques équivalentes. Ceci valide donc que l'approche utilisée pour réaliser l'alignement.

L'analyse de la structure de NhaA met en évidence le rôle probable des résidus Asp₁₆₃ et Asp₁₆₄ dans la liaison des ions Na^+ à NhaA bien qu'aucune preuve ne soit disponible à ce jour. En effet, l'échangeur NhaA ayant été cristallisé en absence d'ions Na^+ , il est impossible de prédire avec précision la conformation du site de liaison en présence de Na^+ . L'alignement de NhaA et NHE1 montre que Asp₁₆₃ et Asp₁₆₄ correspondent respectivement aux Phe₂₀₂ et Phe₂₀₃, soit des acides aminés aux propriétés très différentes. Cette différence pourrait être attribuée au fait que NhaA est un transporteur électrogénique (un ion Na^+ échangé contre deux protons). La structure du site de liaison des ions de NhaA et NHE1 doit être donc différente.

Il est intéressant de comparer la structure résolue de NhaA avec les travaux de Slepko *et al.* (342). En effet, ces derniers ont isolé le quatrième domaine transmembranaire de NHE1 et en ont résolu la structure par RMN. Selon cette étude le M4 serait composé de trois domaines séparés : un « β -turn» et une hélice α séparés par une structure étendue. Ces domaines peuvent bouger indépendamment les uns des autres et cette structure appuie de façon séduisante celle de NhaA dans laquelle le TM IV est aussi composé de trois domaines. Les études de Hunte *et al.* et celles de Slepko *et al.* confirment donc l'importance et le caractère unique du M4 aussi bien chez les bactéries que chez les humains.

La structure de NhaA met aussi en évidence l'importance du TM IX dans la structure du site de liaison des ions à NhaA. En effet, lorsque NhaA est dans une conformation inactive, le TM IX présente un coude en son centre et, à la suite d'un signal du senseur de protons, ce segment transmembranaire pourrait subir un changement conformationnel qui le redresserait et induirait une réorientation des hélices XIp et IVc, ce qui finalement exposerait le site de liaison des ions Na^+ du côté cytoplasmique. Bien que l'alignement proposé par notre étude suggère que les M9 de NhaA et NHE1 partagent environ 45% d'homologie, les acides aminés Glu₃₄₆ (279), His₃₄₉ (386) ou Gly₃₅₂ (186) qui jouent un rôle dans la fonction ou dans la pharmacologie de NHE1 ne trouvent pas de résidus homologues dans NhaA. Étant donné que NhaA n'est pas sensible à l'amiloride au contraire de NHE1, il serait séduisant d'émettre l'hypothèse que ces acides aminés sont responsables de la sensibilité de NHE1 à l'amiloride et à ses dérivés. Toutefois, NhaB, un autre échangeur Na^+/H^+ bactérien qui partage peu d'homologie avec NhaA, est quant à lui sensible à l'amiloride (K_i : 0.5mM) (298). Un alignement entre NhaA et NhaB (non montré) montre que ce dernier ne présente pas de résidu chargé négativement à la place de la Pro₂₆₅ de NhaA (qui s'aligne avec le Glu₃₄₆ de NHE1). D'autres acides aminés seraient donc responsables de la sensibilité de l'échangeur Na^+/H^+ à l'amiloride. Il convient toutefois d'être prudent sur cette dernière affirmation étant donné le faible pourcentage d'homologie entre NhaA et NhaB et aussi l'absence de structure résolue pour NhaB.

Une partie de ce projet a consisté à construire des doubles mutants impliquant Glu₃₄₆ et Leu₁₆₃ du M4 afin de mettre en évidence une éventuelle interaction physique entre ces résidus et donc des domaines transmembranaire. La combinaison de la mutation Leu₁₆₃Phe identifiée par Counillon *et al.* (71) et de la mutation Glu₃₄₆Asp au sein d'un même NHE1 provoque une résistance à l'EIPA plus importante (facteur de 2500 par rapport au NHE1 de type sauvage) que les mutations Leu₁₆₃Phe et Glu₃₄₆Asp seules (facteurs de 100 et 1000 respectivement).

Afin de déterminer si la charge de Glu₃₄₆ peut être impliquée dans l'interaction M4-M9, la double mutation Leu₁₆₃Phe/Glu₃₄₆Gln a été construite et exprimée (Figure 16, p188). La molécule de NHE1 portant ces deux mutations est un peu moins résistante que Leu₁₆₃Phe/Glu₃₄₆Asp-NHE1 à l'inhibition par l'EIPA mais plus que Glu₃₄₆Gln-NHE1 et Glu₃₄₆Asp-NHE1. Ceci semble donc exclure une implication de la charge négative de Glu₃₄₆ dans l'interaction M4-M9. La position relative de la charge négative située en position 346 semble donc être un facteur déterminant dans l'effet synergique des doubles mutants.

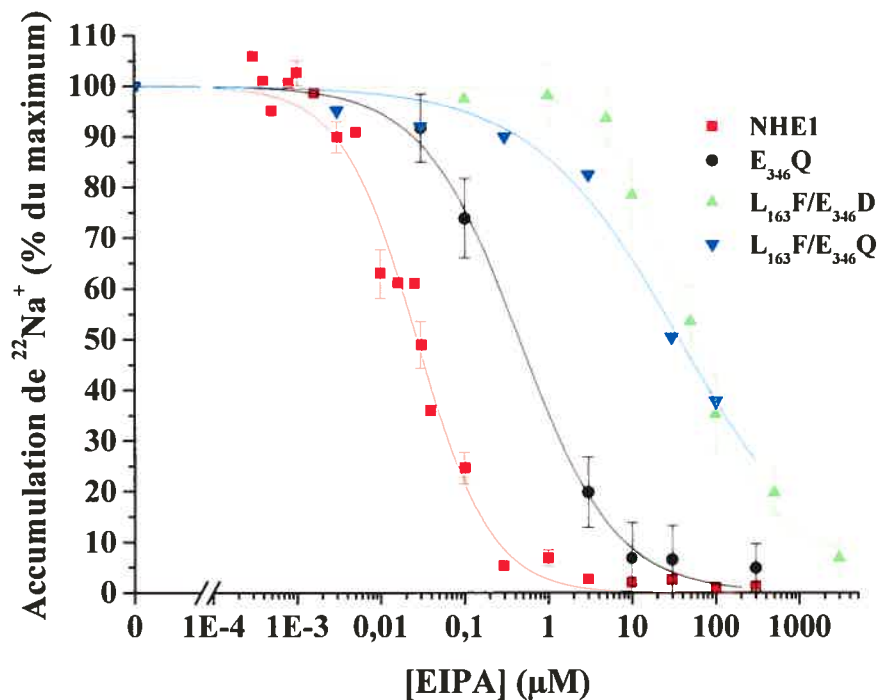


Figure 16 : Profils pharmacologiques des mutants E₃₄₆Q, L₁₆₃F/E₃₄₆D et L₁₆₃F/E₃₄₆Q comparés au NHE1 de type sauvage. Les cellules exprimant les différents NHE1 ont été cultivées dans des plaques à 24 puits puis soumises à une charge acide pendant 1 heure. Après un bref rinçage, l'accumulation de ²²Na⁺ a été réalisée pendant 3 minutes en présence de quantités croissantes d'EIPA. Les cellules ont été rincées dans 4 bains rapides de solution saline à 4°C. Le ²²Na⁺ incorporé a été mesuré à l'aide d'un compteur γ et normalisé par la quantité de protéines présente dans chaque puits.

Si ces résultats semblent suggérer une interaction entre les M4 et 9 de NHE1 qui serait appuyée par la structure de NhaA, les deux échangeurs sont suffisamment différents au point de vue fonctionnel et structure primaire pour envisager que les deux segments transmembranaires n'interagissent pas directement. En effet, la mutation d'un résidu dans une de ces deux hélices pourrait avoir une influence sur l'autre hélice tout en restant dissocié de celle-ci. C'est d'ailleurs ce que suggère la structure de NHE1 prédite par l'alignement NhaA-NHE1. Il est toutefois primordial d'obtenir la structure réelle de NHE1 pour confirmer ou infirmer les hypothèses émises ici.

Disposant d'un alignement raisonnable de NHE1 sur la séquence primaire de NhaA, il est tentant de procéder à une modélisation de NHE1 en se servant de la structure de NhaA comme canevas. En effet, grâce à des logiciels comme Swiss-PDBviewer ou SAM-T02, il est possible d'appliquer une structure primaire d'une protéine quelconque sur la structure d'une protéine qui a été cristallisée. Dans le cas qui nous intéresse, il s'agirait donc d'appliquer l'alignement NhaA-NHE1 proposé dans le deuxième manuscrit sur la structure résolue de NhaA. Toutefois, un certain nombre d'arguments s'oppose à cette tentative de modélisation. En effet, il convient de rappeler que l'échangeur Na⁺/H⁺ bactérien NhaA a été cristallisé sous sa forme inactive, c'est-à-dire non lié au Na⁺. Dans ces conditions, le M9 adopte une courbure due à la présence de résidus proline dont la Pro₂₆₅. Selon les auteurs ayant cristallisé NhaA, le M9 constitue le site senseur de protons. A la suite d'un changement de pH environnant, le M9 subirait un changement de conformation qui le redresserait et influencerait ainsi sur l'assemblage M4/M11, dégageant un passage pour les ions Na⁺.

Dans NHE1, la Pro₂₆₅ s'aligne avec le Glu₃₄₆. La modélisation de NHE1 est présentée à la Figure 17, p.190. Nous pouvons remarquer que le Glu₃₄₆ est présent dans un M9 présentant la même conformation que celui de NhaA ce qui est normal étant donné que la structure de NhaA a servi de base pour cette modélisation mais peu logique étant donné l'absence de résidus proline dans la séquence du M9 de NHE1. La conformation plus redressée similaire à celle prédite par Hunte *et al.* (163) lors de l'activation de NhaA serait attendue. Or, dans cette structure, le Glu₃₄₆ ne se trouve à proximité d'aucun résidu dans un rayon de 4Å, à l'exception de quelques acides aminés dans le M1. Toutefois, le M1 étant très peu conservé parmi l'ensemble des NHE, cette interaction nous apparaît peu pertinente. De plus, aucune observation de la littérature n'a mis en évidence une quelconque implication d'acides aminés de M1 dans la sensibilité aux inhibiteurs.

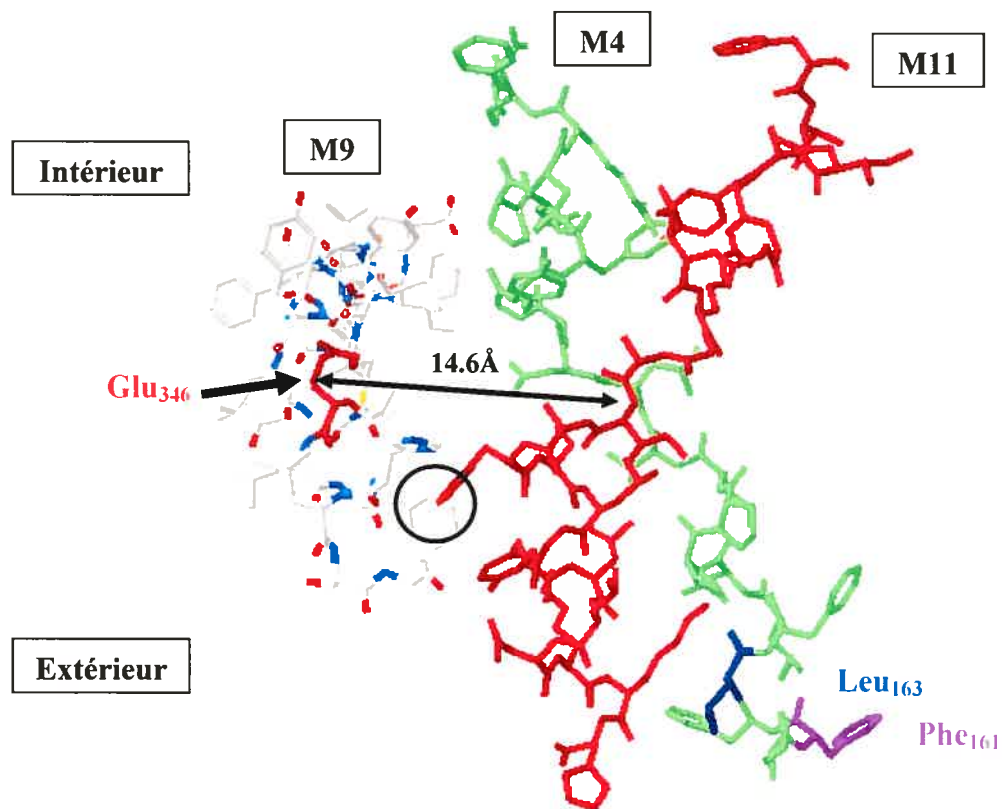


Figure 17 : Modélisation de NHE1 selon la structure de NhaA. L'alignement NhaA-NHE1 a été réalisé tel que décrit précédemment. La séquence de NHE1 ainsi obtenue a été appliquée sur la structure de NhaA à l'aide du logiciel Swiss-PDBviewer. Pour plus de clarté, seuls les domaines transmembranaires 4, 9 et 11 ont été représentés. En vert : M4, en rouge : M11, en blanc : M9. Cercle : collision entre molécules.

En outre, cette structure de NHE1 présente plusieurs collisions entre acides aminés, ce qui est impossible dans une structure réelle. Afin de crédibiliser la proposition d'un modèle de NHE1 sur la base de la structure de NhaA, il conviendrait de procéder à un travail de modélisation par homologie qui comprend entre autre la minimisation des énergies qui permet d'optimiser la distance entre les acides aminés d'une protéine. Toutefois, il n'est pas utile d'effectuer un tel travail sur une conformation inactive. Il est donc nécessaire de cristalliser NhaA sous sa forme active pour pouvoir en retirer des renseignements significatifs.

Pour toutes ces raisons, il nous apparaît prématuré de proposer une structure 3D de NHE1 en se basant sur la structure de NhaA, cristallisé en mode inactif. La présente étude avait pour but de proposer un alignement des séquences de NhaA et NHE1 afin de déterminer si l'acide aminé Glu₃₄₆ de M9 pouvait être en position stratégique pour interagir avec d'autres acides aminés clés du « pore » et/ou d'acides aminés de M4 potentiellement impliqués dans l'interaction avec les inhibiteurs. L'excellente homologie ainsi mise en évidence au niveau des domaines transmembranaires nous assure que l'approche utilisée est valide et que les deux échangeurs doivent partager une certaine similarité au niveau de l'organisation de leurs domaines transmembranaires. La présence de motifs d'acides aminés hydrophobes retrouvés aux centres de M4 et M11 de NhaA et de NHE1 ainsi que l'alignement de certains acides aminés clés (Asp₁₃₃ de NhaA avec Asp₁₇₂ de NHE1; Lys₃₀₀ de NhaA avec Arg₄₂₅ de NHE1) donnent aussi du poids à cette comparaison. Cependant, à ce stade, pousser plus loin l'analyse serait de la spéculation. L'élucidation de la structure active de NhaA ou de NHE1 permettra de pousser plus loin les analyses.

Chapitre 4 : Conclusions

Le but de cette étude était de définir précisément l'importance du résidu glutamate en position 346 de l'isoforme 1 de l'échangeur Na^+/H^+ pour sa fonction d'échange et lors de son inhibition par les inhibiteurs.

L'étude de diverses mutations de NHE1 en position 346 nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- Le résidu glutamate en position 346 de NHE1 est important pour la liaison des inhibiteurs et du Na^+ .
- Les acides aminés adjacents à Glu_{346} soient Leu_{343} , Ala_{345} , Leu_{347} ne sont pas impliqués dans les interactions qui régissent l'affinité de NHE1 pour les inhibiteurs et le Na^+ .
- Les mutations de Glu_{346} modifiant la charge ($\text{Glu}_{346}\text{Gln}$, Asn) ou la taille ($\text{Glu}_{346}\text{Asp}$, Gly , Trp) ou encore impliquant un changement de position du Glu en position adjacente ($\text{Glu}_{345}\text{AlaLeu}$, AlaLeuGlu_{347}) ont pour conséquence une réduction significative de l'activité intrinsèque de NHE1.
- L'affinité pour le Na^+ n'est diminuée que pour les mutants $\text{Glu}_{346}\text{Asp}$, $\text{Glu}_{346}\text{Trp}$ et AlaLeuGlu_{347} .
- L'augmentation du $K_{m\text{Na}^+}$ du mutant $\text{Glu}_{346}\text{Asp}$ -NHE1 est compensée par une augmentation de la vitesse de transport. $\text{Glu}_{346}\text{Asp}$ -NHE1 est donc un transporteur de Na^+ plus efficace que la forme sauvage de NHE1.
- Toutes les mutations concernant Glu_{346} provoquent une diminution de la sensibilité de NHE1 aux inhibiteurs de type EIPA ou HOE694.

- Étant donné que les diminutions d'affinité pour le Na^+ des différents mutants ne corrélaient pas nécessairement avec les diminutions d'affinité pour les inhibiteurs, il est probable que les sites d'interactions du Na^+ et des inhibiteurs ne soient pas strictement les mêmes.
- La résistance différentielle des différents mutants aux différents inhibiteurs testés, l'absence d'effet de certaines mutations sur le $K_{m\text{Na}^+}$ ainsi que le non parallélisme entre IC_{50} et $K_{m\text{Na}^+}$ suggèrent que Glu₃₄₆ n'interagit pas directement avec les inhibiteurs ou le Na^+ mais plutôt qu'il participe à l'élaboration d'une conformation tridimensionnelle idéale à la liaison des inhibiteurs et du Na^+ .
- La présence d'effets additifs ou synergiques de mutations impliquant les M4 et 9 suggère que ces deux domaines transmembranaires interagissent ou à tout le moins s'influencent mutuellement.
- La position du glutamate en position 346 est cruciale car son déplacement en position 345 ou 347 s'accompagne d'une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs et de l'affinité pour le Na^+ . Une orientation différente du glutamate dans l'axe du M9, par rapport aux segments transmembranaires environnants dont le M4 précédemment identifié, est proposée pour expliquer cette différence.

Chapitre 5 : Perspectives

Une meilleure connaissance de la structure de NHE1 nécessitera la cristallisation de la protéine, étape nécessaire à l'élaboration d'une structure en trois dimensions par rayons X (ce qui s'annonce difficile), ou l'identification d'autres résidus importants pour la fonction de l'échangeur Na^+/H^+ ou son interaction avec les inhibiteurs pharmacologiques.

Bien que la cristallisation de l'échangeur Na^+/H^+ bactérien NhaA inactivé fournisse de très intéressantes informations sur la structure de ce transporteur, il demeure primordial de le cristalliser sous forme active, c'est-à-dire en mode transport avec un ou des ions Na^+ à l'intérieur afin d'observer véritablement les changements de conformation provoqués par le passage des ions.

La cristallisation de NhaA a néanmoins permis de localiser quelques acides aminés de toute première importance dans la fonction d'échange tels que la Thr₁₃₂, l'Asp₁₃₃, l'Asp₁₆₃, l'Asp₁₆₄ et la Lys₃₀₀. Ces acides aminés sont très conservés dans les différents transporteurs analogues à NhaA et une comparaison de séquence entre NhaA et NHE1 révèle que les résidus Asp₁₃₃ et Lys₃₀₀ ont aussi leur équivalent dans NHE1 (respectivement Asp₁₇₃ et Arg₄₂₅). Il apparaît alors intéressant de muter ces acides aminés afin d'étudier leur importance dans l'activité d'échange Na^+/H^+ de NHE1. De plus, étant donné que le Glu₃₄₆ de NHE1 ne trouve pas d'homologue dans NhaA, il serait aussi intéressant d'introduire un résidu chargé négativement Glu ou Asp à la même position, soit en position 265, pour pouvoir en mesurer ainsi un effet potentiateur sur la sensibilité de NhaA à l'amiloride

L'étude des changements éventuels de conformation au niveau du site d'interaction de NHE avec l'amiloride pourrait être entreprise avec l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques spécifique à l'amiloride. Ces anticorps présentent la particularité de mimer la forme de la molécule d'amiloride et de pouvoir se fixer sur le site d'interaction de NHE1 avec l'amiloride. L'équipe de Kleyman a réalisé une série d'études sur le canal sodique épithélial ENaC qui lui ont permis de définir le site d'interaction précis de l'ENaC avec

l'amiloride (188). Il est ainsi observé que le site d'interaction est formé d'acides aminés de plus d'un segment membranaire. Malheureusement, nous n'avons pas eu la chance de développer une collaboration avec ce groupe afin de nous procurer ces anticorps. Ceux-ci nous auraient pourtant permis de démontrer une différence de la liaison avec les différents mutants de NHE1 que nous avons construits et exprimés dans les cellules PS120 par rapport au NHE1 de type sauvage et à d'autres isoformes. Une telle différence aurait reflété un changement de conformation du site d'interaction de NHE1 avec l'amiloride induite par les mutations. Dans le cas où aucune différence n'aurait pas été détectée, un changement de conformation aurait pu être écarté ou tout au moins minimisé et ainsi appuyer le point que le résidu Glu₃₄₆ interagit directement avec les inhibiteurs. Toutefois, cette approche suppose qu'une seule mutation ponctuelle dans NHE1 ne perturbe pas la reconnaissance de l'anticorps.

Une modélisation par homologie de NHE1 pourrait être entreprise en se basant sur les données fournies par la cristallisation de NhaA. Bien que le pourcentage d'homologie entre ces deux transporteurs soit faible, certaines régions présentent une homologie significativement plus forte et pourraient servir à modéliser par voie informatique une structure tridimensionnelle de NHE1. C'est néanmoins un processus fort complexe faisant intervenir de nombreux paramètres. En outre, les résultats devront être considérés avec beaucoup de prudence étant donné le faible pourcentage d'homologie entre NhaA et NHE1 ainsi que leurs différences fondamentales dans leur fonctionnement : NhaA est électrogénique et fonctionne en sens inverse de NHE1 (expulsion de Na⁺ contre accumulation de H⁺). En conséquence, même si une structure globale identique peut être attendue entre ces deux transporteurs, des différences structurales ponctuelles majeures doivent aussi être envisagées.

Finalement, une communication personnelle du Dr. James Féthière nous a permis d'apprendre que NHE1 a été exprimé en quantité suffisante dans des cellules Sf9 avec une pureté satisfaisante par son équipe. Ceci implique que la cristallisation et l'élucidation de la structure de NHE1 pourrait être possible dans un futur proche.

Bibliographie

1. **Abercrombie RF and Roos A.** The intracellular pH of frog skeletal muscle: its regulation in hypertonic solutions. *J Physiol* 345: 189-204, 1983.
2. **Aharonovitz O and Granot Y.** Stimulation of mitogen-activated protein kinase and Na⁺/H⁺ exchanger in human platelets. Differential effect of phorbol ester and vasopressin. *J Biol Chem* 271: 16494-16499, 1996.
3. **Ahmad S, Doweiko LM, Dugar S, Grazier N, Ngu K, Wu SC, Yost KJ, Chen BC, Gougoutas JZ, DiMarco JD, Lan SJ, Gavin BJ, Chen AY, Dorso CR, Serafino R, Kirby M, and Atwal KS.** Arylcyclopropanecarboxyl guanidines as novel, potent, and selective inhibitors of the sodium hydrogen exchanger isoform-1. *J Med Chem* 44: 3302-3310, 2001.
4. **Aickin CC and Thomas RC.** The effect of external Na and amiloride on pHi recovery in mouse soleus muscle [proceedings]. *J Physiol* 269: 80P-81P, 1977.
5. **Aickin CC and Thomas RC.** An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J Physiol* 273: 295-316, 1977.
6. **Aihara K, Hisa H, Sato T, Yoneyama F, Sasamori J, Yamaguchi F, Yoneyama S, Mizuno Y, Takahashi A, Nagai A, Kimura T, Kogi K, and Satoh S.** Cardioprotective effect of TY-12533, a novel Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor, on ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 404: 221-229, 2000.
7. **Akhter S, Nath SK, Tse CM, Williams J, Zasloff M, and Donowitz M.** Squalamine, a novel cationic steroid, specifically inhibits the brush-border Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3. *Am J Physiol* 276: C136-144, 1999.
8. **Al-Awqati Q.** Proton-translocating ATPases. *Annu Rev Cell Biol* 2: 179-199, 1986.
9. **al-Habori M.** Cell volume and ion transport regulation. *Int J Biochem* 26: 319-334, 1994.

10. **Alpern R and Stone D.** Renal acidification mechanisms. In: *The Kidney*, edited by Brenner B and Rector Jr F. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1991, p. 318-379.
11. **Alpern RJ.** Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiol Rev* 70: 79-114, 1990.
12. **Alpern RJ.** Mechanism of basolateral membrane H⁺/OH⁻/HCO₃⁻ transport in the rat proximal convoluted tubule. A sodium-coupled electrogenic process. *J Gen Physiol* 86: 613-636, 1985.
13. **Alpern RJ, Howlin KJ, and Preisig PA.** Active and passive components of chloride transport in the rat proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 76: 1360-1366, 1985.
14. **Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, and Zhang P.** Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 62: 573-594, 2000.
15. **Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, and Kaibuchi K.** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271: 20246-20249, 1996.
16. **Amemiya M, Loffing J, Lotscher M, Kaissling B, Alpern RJ, and Moe OW.** Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* 48: 1206-1215, 1995.
17. **Amemiya M, Yamaji Y, Cano A, Moe OW, and Alpern RJ.** Acid incubation increases NHE-3 mRNA abundance in OKP cells. *Am J Physiol* 269: C126-133, 1995.
18. **Amtmann A and Sanders D.** Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv Bot Res* 29: 76-112, 1999.
19. **Aronson PS.** Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol* 47: 545-560, 1985.
20. **Aronson PS.** Mechanisms of active H⁺ secretion in the proximal tubule. *Am J Physiol* 245: F647-659, 1983.

21. **Aronson PS, Nee J, and Suhm MA.** Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299: 161-163, 1982.
22. **Aronson PS, Suhm MA, and Nee J.** Interaction of external H⁺ with the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *J Biol Chem* 258: 6767-6771, 1983.
23. **Attaphitaya S, Park K, and Melvin JE.** Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* 274: 4383-4388, 1999.
24. **Azarani A, Goltzman D, and Orlowski J.** Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide inhibit the apical Na⁺/H⁺ exchanger NHE-3 isoform in renal cells (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C. *J Biol Chem* 270: 20004-20010, 1995.
25. **Azarani A, Orlowski J, and Goltzman D.** Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway. *J Biol Chem* 270: 23166-23172, 1995.
26. **Azuma KK, Balkovetz DF, Magyar CE, Lescale-Matys L, Zhang Y, Chambrey R, Warnock DG, and McDonough AA.** Renal Na⁺/H⁺ exchanger isoforms and their regulation by thyroid hormone. *Am J Physiol* 270: C585-592, 1996.
27. **Baird NR, Orlowski J, Szabo EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG, and Shull GE.** Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* 274: 4377-4382, 1999.
28. **Barroso MR, Bernd KK, DeWitt ND, Chang A, Mills K, and Sztul ES.** A novel Ca²⁺-binding protein, p22, is required for constitutive membrane traffic. *J Biol Chem* 271: 10183-10187, 1996.
29. **Baum M.** Evidence that parallel Na⁺-H⁺ and Cl⁻-HCO₃⁻-(OH⁻) antiporters transport NaCl in the proximal tubule. *Am J Physiol* 252: F338-345, 1987.

30. **Baum M, Amemiya M, Dwarakanath V, Alpern RJ, and Moe OW.** Glucocorticoids regulate NHE-3 transcription in OKP cells. *Am J Physiol* 270: F164-169, 1996.
31. **Baum M, Biemesderfer D, Gentry D, and Aronson PS.** Ontogeny of rabbit renal cortical NHE3 and NHE1: effect of glucocorticoids. *Am J Physiol* 268: F815-820, 1995.
32. **Baum M, Cano A, and Alpern RJ.** Glucocorticoids stimulate Na⁺/H⁺ antiporter in OKP cells. *Am J Physiol* 264: F1027-1031, 1993.
33. **Baum M, Moe OW, Gentry DL, and Alpern RJ.** Effect of glucocorticoids on renal cortical NHE-3 and NHE-1 mRNA. *Am J Physiol* 267: F437-442, 1994.
34. **Baum M and Quigley R.** Glucocorticoids stimulate rabbit proximal convoluted tubule acidification. *J Clin Invest* 91: 110-114, 1993.
35. **Baumgarth M, Beier N, and Gericke R.** (2-Methyl-5-(methylsulfonyl)benzoyl)guanidine Na⁺/H⁺ antiporter inhibitors. *J Med Chem* 40: 2017-2034, 1997.
36. **Becker S, Schneider H, and Scheiner-Bobis G.** The highly conserved extracellular peptide, DSYG(893-896), is a critical structure for sodium pump function. *Eur J Biochem* 271: 3821-3831, 2004.
37. **Beliveau R, Demeule M, and Potier M.** Molecular size of the Na⁺-H⁺ antiport in renal brush border membranes, as estimated by radiation inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 484-489, 1988.
38. **Benedetti A, Di Sario A, Casini A, Ridolfi F, Bendia E, Pignini P, Tonnini C, D'Ambrosio L, Feliciangeli G, Macarri G, and Svegliati-Baroni G.** Inhibition of the NA(+)/H(+) exchanger reduces rat hepatic stellate cell activity and liver fibrosis: an in vitro and in vivo study. *Gastroenterology* 120: 545-556, 2001.
39. **Benos DJ, Simon SA, Mandel LJ, and Cala PM.** Effect of amiloride and some of its analogues of cation transport in isolated frog skin and thin lipid membranes. *J Gen Physiol* 68: 43-63, 1976.
40. **Bernardo AA, Kear FT, Santos AV, Ma J, Steplock D, Robey RB, and Weinman EJ.** Basolateral Na(+)/HCO(3)(-) cotransport activity is regulated by the

- dissociable Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J Clin Invest* 104: 195-201, 1999.
41. **Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J, and Shigekawa M.** 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: 13703-13709, 1994.
 42. **Bianchini L, Kapus A, Lukacs G, Wasan S, Wakabayashi S, Pouyssegur J, Yu FH, Orlowski J, and Grinstein S.** Responsiveness of mutants of NHE1 isoform of Na⁺/H⁺ antiport to osmotic stress. *Am J Physiol* 269: C998-1007, 1995.
 43. **Bianchini L, L'Allemain G, and Pouyssegur J.** The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem* 272: 271-279, 1997.
 44. **Bianchini L, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Takai A, and Grinstein S.** Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, induces activation and phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiport. *J Biol Chem* 266: 15406-15413, 1991.
 45. **Bielefeld DR, Hadley RW, Vassilev PM, and Hume JR.** Membrane electrical properties of vesicular Na-Ca exchange inhibitors in single atrial myocytes. *Circ Res* 59: 381-389, 1986.
 46. **Biemesderfer D, DeGray B, and Aronson PS.** Membrane topology of NHE3. Epitopes within the carboxyl-terminal hydrophilic domain are exoplasmic. *J Biol Chem* 273: 12391-12396, 1998.
 47. **Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, and Aronson PS.** NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 265: F736-742, 1993.
 48. **Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, and Aronson PS.** Immunocytochemical characterization of Na(+)-H⁺ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am J Physiol* 263: F833-840, 1992.

49. **Bizal GL, Howard RL, Bookstein C, Rao MC, Chang EB, and Soleimani M.** Glycosylation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE-3 is species specific. *J Lab Clin Med* 128: 304-312, 1996.
50. **Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y, Niu P, Musch MW, Rao MC, and Chang EB.** Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest* 93: 106-113, 1994.
51. **Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Rabenau K, Villereal M, Rao MC, and Chang EB.** Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus. *Am J Physiol* 271: C1629-1638, 1996.
52. **Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Villereal M, Rao MC, and Chang EB.** A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *J Biol Chem* 269: 29704-29709, 1994.
53. **Boonstra J, Moolenaar WH, Harrison PH, Moed P, van der Saag PT, and de Laat SW.** Ionic responses and growth stimulation induced by nerve growth factor and epidermal growth factor in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Cell Biol* 97: 92-98, 1983.
54. **Borgese F, Malapert M, Fievet B, Pouyssegur J, and Motais R.** The cytoplasmic domain of the Na⁺/H⁺ exchangers (NHEs) dictates the nature of the hormonal response: behavior of a chimeric human NHE1/trout beta NHE antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5431-5435, 1994.
55. **Borgese F, Sardet C, Cappadoro M, Pouyssegur J, and Motais R.** Cloning and expression of a cAMP-activated Na⁺/H⁺ exchanger: evidence that the cytoplasmic domain mediates hormonal regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6765-6769, 1992.
56. **Boron WF and Boulpaep EL.** Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Na-H exchange. *J Gen Physiol* 81: 29-52, 1983.
57. **Brant SR, Bernstein M, Wasmuth JJ, Taylor EW, McPherson JD, Li X, Walker S, Pouyssegur J, Donowitz M, Tse CM, and et al.** Physical and genetic mapping of a human apical epithelial Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) isoform to chromosome 5p15.3. *Genomics* 15: 668-672, 1993.

58. **Brant SR, Yun CH, Donowitz M, and Tse CM.** Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/N⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol* 269: C198-206, 1995.
59. **Brett CL, Wei Y, Donowitz M, and Rao R.** Human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1031-1041, 2002.
60. **Breyer MD and Jacobson HR.** Regulation of rabbit medullary collecting duct cell pH by basolateral Na⁺/H⁺ and Cl⁻/base exchange. *J Clin Invest* 84: 996-1004, 1989.
61. **Bussolino F, Wang JM, Turrini F, Alessi D, Ghigo D, Costamagna C, Pescarmona G, Mantovani A, and Bosia A.** Stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. Evidence for a role in proliferation and migration. *J Biol Chem* 264: 18284-18287, 1989.
62. **Cala PM.** Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The role of Ca²⁺ as a modulator of alkali metal/H⁺ exchange. *J Gen Physiol* 82: 761-784, 1983.
63. **Cala PM.** Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. *J Gen Physiol* 76: 683-708, 1980.
64. **Chaillet JR, Lopes AG, and Boron WF.** Basolateral Na-H exchange in the rabbit cortical collecting tubule. *J Gen Physiol* 86: 795-812, 1985.
65. **Chambrey R, Achard JM, St John PL, Abrahamson DR, and Warnock DG.** Evidence for an amiloride-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger in rat renal cortical tubules. *Am J Physiol* 273: C1064-1074, 1997.
66. **Chambrey R, Achard JM, and Warnock DG.** Heterologous expression of rat NHE4: a highly amiloride-resistant Na⁺/H⁺ exchanger isoform. *Am J Physiol* 272: C90-98, 1997.
67. **Chambrey R, St John PL, Eladari D, Quentin F, Warnock DG, Abrahamson DR, Podevin RA, and Paillard M.** Localization and functional characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F707-717, 2001.

68. **Chen F, Jarmakani JM, and Van Dop C.** Developmental changes in mRNA encoding cardiac Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-1) in rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 960-967, 1995.
69. **Cho JH, Musch MW, DePaoli AM, Bookstein CM, Xie Y, Burant CF, Rao MC, and Chang EB.** Glucocorticoids regulate Na⁺/H⁺ exchange expression and activity in region- and tissue-specific manner. *Am J Physiol* 267: C796-803, 1994.
70. **Clamp M, Cuff J, Searle SM, and Barton GJ.** The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20: 426-427, 2004.
71. **Counillon L, Franchi A, and Pouyssegur J.** 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, 1993.
72. **Counillon L, Noel J, Reithmeier RA, and Pouyssegur J.** Random mutagenesis reveals a novel site involved in inhibitor interaction within the fourth transmembrane segment of the Na⁺/H⁺ exchanger-1. *Biochemistry* 36: 2951-2959, 1997.
73. **Counillon L and Pouyssegur J.** Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). *Cardiovasc Res* 29: 147-154, 1995.
74. **Counillon L, Pouyssegur J, and Reithmeier RA.** The Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 possesses N- and O-linked glycosylation restricted to the first N-terminal extracellular domain. *Biochemistry* 33: 10463-10469, 1994.
75. **Counillon L, Scholz W, Lang HJ, and Pouyssegur J.** Pharmacological characterization of stably transfected Na⁺/H⁺ antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol Pharmacol* 44: 1041-1045, 1993.
76. **Cox GA, Lutz CM, Yang CL, Biemesderfer D, Bronson RT, Fu A, Aronson PS, Noebels JL, and Frankel WN.** Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell* 91: 139-148, 1997.
77. **Cragoe E.** In: *diuretics*, edited by e.j. cragoe J. New-York: Wiley, 1983.

78. **Cragoe E, Kleyman TR, and Simchowicz L.** *Amiloride and its analogs*. New-York: VHC publishers, Inc, 1992.
79. **Cragoe EJ, Jr., Woltersdorf OW, Jr., Bicking JB, Kwong SF, and Jones JH.** Pyrazine diuretics. II. N-amidino-3-amino-5-substituted 6-halopyrazinecarboxamides. *J Med Chem* 10: 66-75, 1967.
80. **Cremaschi D, Henin S, and Meyer G.** Stimulation by HCO_3^- of Na^+ transport in rabbit gallbladder. *J Membr Biol* 47: 145-170, 1979.
81. **Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, and Cohen P.** Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 273: 1496-1505, 1998.
82. **Dascalu A, Nevo Z, and Korenstein R.** Hyperosmotic activation of the Na^+ - H^+ exchanger in a rat bone cell line: temperature dependence and activation pathways. *J Physiol* 456: 503-518, 1992.
83. **Davis BA, Hogan EM, and Boron WF.** Shrinkage-induced activation of Na^+ - H^+ exchange in barnacle muscle fibers. *Am J Physiol* 266: C1744-1753, 1994.
84. **de Silva MG, Elliott K, Dahl HH, Fitzpatrick E, Wilcox S, Delatycki M, Williamson R, Efron D, Lynch M, and Forrest S.** Disruption of a novel member of a sodium/hydrogen exchanger family and DOCK3 is associated with an attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype. *J Med Genet* 40: 733-740, 2003.
85. **Deitmer JW and Ellis D.** Interactions between the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 304: 471-488, 1980.
86. **Deleage G, Clerc FF, Roux B, and Gautheron DC.** ANTHEPROT: a package for protein sequence analysis using a microcomputer. *Comput Appl Biosci* 4: 351-356, 1988.
87. **Delvaux M, Bastie MJ, Chentoufi J, Cragoe EJ, Jr., Vaysse N, and Ribet A.** Amiloride and analogues inhibit Na^+ - H^+ exchange and cell proliferation in AR42J pancreatic cell line. *Am J Physiol* 259: G842-849, 1990.

88. **Demaurex N, Orlowski J, Brisseau G, Woodside M, and Grinstein S.** The mammalian Na⁺/H⁺ antiporters NHE-1, NHE-2, and NHE-3 are electroneutral and voltage independent, but can couple to an H⁺ conductance. *J Gen Physiol* 106: 85-111, 1995.
89. **Denker SP and Barber DL.** Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* 159: 1087-1096, 2002.
90. **Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H, and Barber DL.** Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁽⁺⁾ translocation. *Mol Cell* 6: 1425-1436, 2000.
91. **Dibrov P, Young PG, and Fliegel L.** Functional analysis of amino acid residues essential for activity in the Na⁺/H⁺ exchanger of fission yeast. *Biochemistry* 37: 8282-8288, 1998.
92. **Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R.** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77, 1998.
93. **DuBose TD, Jr., Pucacco LR, Lucci MS, and Carter NW.** Micropuncture determination of pH, PCO₂, and total CO₂ concentration in accessible structures of the rat renal cortex. *J Clin Invest* 64: 476-482, 1979.
94. **DuBose TD, Jr., Pucacco LR, Seldin DW, and Carter NW.** Direct determination of PCO₂ in the rat renal cortex. *J Clin Invest* 62: 338-348, 1978.
95. **Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, and MacKinnon R.** X-ray structure of a Cl⁻ chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415: 287-294, 2002.
96. **Dyck JR and Fliegel L.** Specific activation of the Na⁺/H⁺ exchanger gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 270: 10420-10427, 1995.

97. **Engelman DM, Steitz TA, and Goldman A.** Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 15: 321-353, 1986.
98. **Erikson E and Maller JL.** Substrate specificity of ribosomal protein S6 kinase II from *Xenopus* eggs. *Second Messengers Phosphoproteins* 12: 135-143, 1988.
99. **Ernst SA and Schreiber JH.** Ultrastructural localization of Na⁺,K⁺-ATPase in rat and rabbit kidney medulla. *J Cell Biol* 91: 803-813, 1981.
100. **Eveloff JL and Warnock DG.** Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am J Physiol* 252: F1-10, 1987.
101. **Fafournoux P, Noel J, and Pouyssegur J.** 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, 1994.
102. **Fanning AS and Anderson JM.** PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. *Curr Top Microbiol Immunol* 228: 209-233, 1998.
103. **Feigenbaum P, Garcia ML, and Kaczorowski GJ.** Evidence for distinct sites coupled to high affinity omega-conotoxin receptors in rat brain synaptic plasma membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 298-305, 1988.
104. **Fliegel L, Dyck JR, Wang H, Fong C, and Haworth RS.** Cloning and analysis of the human myocardial Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol Cell Biochem* 125: 137-143, 1993.
105. **Fliegel L, Haworth RS, and Dyck JR.** Characterization of the placental brush border membrane Na⁺/H⁺ exchanger: identification of thiol-dependent transitions in apparent molecular size. *Biochem J* 289 (Pt 1): 101-107, 1993.
106. **Franchi A, Cragoe E, Jr., and Pouyssegur J.** Isolation and properties of fibroblast mutants overexpressing an altered Na⁺/H⁺ antiporter. *J Biol Chem* 261: 14614-14620, 1986.
107. **Franchi A, Perucca-Lostanlen D, and Pouyssegur J.** Functional expression of a human Na⁺/H⁺ antiporter gene transfected into antiporter-deficient mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9388-9392, 1986.

108. **Frelin C, Vigne P, Barbry P, and Lazdunski M.** Interaction of guanidinium and guanidinium derivatives with the Na⁺/H⁺ exchange system. *Eur J Biochem* 154: 241-245, 1986.
109. **Frelin C, Vigne P, and Lazdunski M.** The amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 258: 6272-6276, 1983.
110. **Friedman PA and Andreoli TE.** CO₂-stimulated NaCl absorption in the mouse renal cortical thick ascending limb of Henle. Evidence for synchronous Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in apical plasma membranes. *J Gen Physiol* 80: 683-711, 1982.
111. **Friedman PA and Andreoli TE.** Effects of (CO₂ + HCO₃⁻) on electrical conductance in cortical thick ascending limbs. *Kidney Int* 30: 325-331, 1986.
112. **Fukumoto S, Imamiya E, Kusumoto K, Fujiwara S, Watanabe T, and Shiraishi M.** Novel, non-acylguanidine-type Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger inhibitors: synthesis and pharmacology of 5-tetrahydroquinolinylidene aminoguanidine derivatives. *J Med Chem* 45: 3009-3021, 2002.
113. **Fyfe GK and Canessa CM.** Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel. *J Gen Physiol* 112: 423-432, 1998.
114. **Ganapathy V, Balkovetz DF, Ganapathy ME, Mahesh VB, Devoe LD, and Leibach FH.** Evidence for histidyl and carboxy groups at the active site of the human placental Na⁺-H⁺ exchanger. *Biochem J* 245: 473-477, 1987.
115. **Ganapathy V, Balkovetz DF, Miyamoto Y, Ganapathy ME, Mahesh VB, Devoe LD, and Leibach FH.** Inhibition of human placental Na⁺-H⁺ exchanger by cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 192-197, 1986.
116. **Garcia ML, King VF, Shevell JL, Slaughter RS, Suarez-Kurtz G, Winqvist RJ, and Kaczorowski GJ.** Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J Biol Chem* 265: 3763-3771, 1990.
117. **Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, and Bairoch A.** ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31: 3784-3788, 2003.

118. **Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, and Fink GR.** The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1480-1485, 1999.
119. **Gebreselassie D, Rajarathnam K, and Fliegel L.** Expression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal region of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem Cell Biol* 76: 837-842, 1998.
120. **Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeiffer B, and Heinz E.** Electrically silent cotransport on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells. *Biochim Biophys Acta* 600: 432-447, 1980.
121. **Geibel J, Giebisch G, and Boron WF.** Basolateral sodium-coupled acid-base transport mechanisms of the rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 257: F790-797, 1989.
122. **Gerchman Y, Rimon A, and Padan E.** A pH-dependent conformational change of NhaA Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter of *Escherichia coli* involves loop VIII-IX, plays a role in the pH response of the protein, and is maintained by the pure protein in dodecyl maltoside. *J Biol Chem* 274: 24617-24624, 1999.
123. **Ghishan FK, Knobel SM, and Summar M.** Molecular cloning, sequencing, chromosomal localization, and tissue distribution of the human Na⁺/H⁺ exchanger (SLC9A2). *Genomics* 30: 25-30, 1995.
124. **Good DW.** Sodium-dependent bicarbonate absorption by cortical thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol* 248: F821-829, 1985.
125. **Good DW, Knepper MA, and Burg MB.** Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol* 247: F35-44, 1984.
126. **Goyal S, Vanden Heuvel G, and Aronson PS.** Renal expression of novel Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F467-473, 2003.
127. **Grassl SM and Aronson PS.** Na⁺/HCO₃⁻-co-transport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *J Biol Chem* 261: 8778-8783, 1986.
128. **Green J, Yamaguchi DT, Kleeman CR, and Muallem S.** Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na⁺ and H⁺ with the extracellular and intracellular faces of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* 92: 239-261, 1988.

129. **Green J, Yamaguchi DT, Kleeman CR, and Muallem S.** Selective modification of the kinetic properties of Na⁺/H⁺ exchanger by cell shrinkage and swelling. *J Biol Chem* 263: 5012-5015, 1988.
130. **Grillo FG and Aronson PS.** Inactivation of the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger by histidine-specific reagents. *J Biol Chem* 261: 1120-1125, 1986.
131. **Grinstein S, Clarke CA, and Rothstein A.** Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. *J Gen Physiol* 82: 619-638, 1983.
132. **Grinstein S, Cohen S, Goetz JD, and Rothstein A.** Na⁺/H⁺ exchange in volume regulation and cytoplasmic pH homeostasis in lymphocytes. *Fed Proc* 44: 2508-2512, 1985.
133. **Grinstein S, Cohen S, Goetz JD, and Rothstein A.** Osmotic and phorbol ester-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange: possible role of protein phosphorylation in lymphocyte volume regulation. *J Cell Biol* 101: 269-276, 1985.
134. **Grinstein S, Cohen S, and Rothstein A.** Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport. *J Gen Physiol* 83: 341-369, 1984.
135. **Grinstein S, Mack E, and Mills GB.** Osmotic activation of the Na⁺/H⁺ antiport in protein kinase C-depleted lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 134: 8-13, 1986.
136. **Grinstein S and Rothstein A.** Mechanisms of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Membr Biol* 90: 1-12, 1986.
137. **Grinstein S, Rothstein A, and Cohen S.** Mechanism of osmotic activation of Na⁺/H⁺ exchange in rat thymic lymphocytes. *J Gen Physiol* 85: 765-787, 1985.
138. **Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, and Rotin D.** Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem* 267: 23823-23828, 1992.
139. **Grinstein S, Woodside M, Waddell TK, Downey GP, Orlowski J, Pouyssegur J, Wong DC, and Foskett JK.** Focal localization of the NHE-1 isoform of the

- Na⁺/H⁺ antiport: assessment of effects on intracellular pH. *Embo J* 12: 5209-5218, 1993.
140. **Guex N and Peitsch MC.** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723, 1997.
141. **Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C, Moore J, Daemmgen J, and Gross GJ.** Inhibition of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation* 100: 2519-2526; discussion 2469-2572, 1999.
142. **Gunther RD and Wright EM.** Na⁺, Li⁺, and Cl⁻ transport by brush border membranes from rabbit jejunum. *J Membr Biol* 74: 85-94, 1983.
143. **Gupta A, Schwiening CJ, and Boron WF.** Effects of CGRP, forskolin, PMA, and ionomycin on pHi dependence of Na-H exchange in UMR-106 cells. *Am J Physiol* 266: C1088-1092, 1994.
144. **Guzman-Perez A, Wester RT, Allen MC, Brown JA, Buchholz AR, Cook ER, Day WW, Hamanaka ES, Kennedy SP, Knight DR, Kowalczyk PJ, Marala RB, Mularski CJ, Novomisle WA, Ruggeri RB, Tracey WR, and Hill RJ.** Discovery of zoniporide: a potent and selective sodium-hydrogen exchanger type 1 (NHE-1) inhibitor with high aqueous solubility. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 803-807, 2001.
145. **Halfter U, Ishitani M, and Zhu JK.** The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3735-3740, 2000.
146. **Harold FM and Papineau D.** Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis*. II. Proton and sodium extrusion. *J Membr Biol* 8: 45-62, 1972.
147. **Harteneck C.** Proteins modulating TRP channel function. *Cell Calcium* 33: 303-310, 2003.
148. **Haworth RS, Frohlich O, and Fliegel L.** Multiple carbohydrate moieties on the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J* 289 (Pt 3): 637-640, 1993.

149. **Hays SR and Alpern RJ.** Apical and basolateral membrane H⁺ extrusion mechanisms in inner stripe of rabbit outer medullary collecting duct. *Am J Physiol* 259: F628-635, 1990.
150. **Hays SR and Alpern RJ.** Inhibition of Na⁽⁺⁾-independent H⁺ pump by Na⁽⁺⁾-induced changes in cell Ca²⁺. *J Gen Physiol* 98: 791-813, 1991.
151. **Hebert SC, Culpepper RM, and Andreoli TE.** NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am J Physiol* 241: F412-431, 1981.
152. **Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, and Numa S.** Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356: 441-443, 1992.
153. **Helmle-Kolb C, Counillon L, Roux D, Pouyssegur J, Mrkic B, and Murer H.** Na/H exchange activities in NHE1-transfected OK-cells: cell polarity and regulation. *Pflugers Arch* 425: 34-40, 1993.
154. **Hildebrandt F, Pizzonia JH, Reilly RF, Reboucas NA, Sardet C, Pouyssegur J, Slayman CW, Aronson PS, and Igarashi P.** Cloning, sequence, and tissue distribution of a rabbit renal Na⁺/H⁺ exchanger transcript. *Biochim Biophys Acta* 1129: 105-108, 1991.
155. **Hisamitsu T, Pang T, Shigekawa M, and Wakabayashi S.** Dimeric interaction between the cytoplasmic domains of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 revealed by symmetrical intermolecular cross-linking and selective co-immunoprecipitation. *Biochemistry* 43: 11135-11143, 2004.
156. **Honda T, Knobel SM, Bulus NM, and Ghishan FK.** Kinetic characterization of a stably expressed novel Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-2). *Biochim Biophys Acta* 1150: 199-202, 1993.
157. **Hooley R, Yu CY, Symons M, and Barber DL.** G alpha 13 stimulates Na⁺-H⁺ exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways. *J Biol Chem* 271: 6152-6158, 1996.

158. **Horie S, Moe O, Miller RT, and Alpern RJ.** Long-term activation of protein kinase c causes chronic Na/H antiporter stimulation in cultured proximal tubule cells. *J Clin Invest* 89: 365-372, 1992.
159. **Horie S, Moe O, Tejedor A, and Alpern RJ.** Preincubation in acid medium increases Na/H antiporter activity in cultured renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4742-4745, 1990.
160. **Horie S, Moe O, Yamaji Y, Cano A, Miller RT, and Alpern RJ.** Role of protein kinase C and transcription factor AP-1 in the acid-induced increase in Na/H antiporter activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5236-5240, 1992.
161. **Horvat B, Taheri S, and Salihagic A.** Tumour cell proliferation is abolished by inhibitors of Na⁺/H⁺ and HCO₃⁻/Cl⁻ exchange. *Eur J Cancer* 29A: 132-137, 1992.
162. **Hotchin NA and Hall A.** The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* 131: 1857-1865, 1995.
163. **Hunte C, Screpanti E, Venturi M, Rimon A, Padan E, and Michel H.** Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* 435: 1197-1202, 2005.
164. **Igarashi P, Freed MI, Ganz MB, and Reilly RF.** Effects of chronic metabolic acidosis on Na(+)-H⁺ exchangers in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol* 263: F83-88, 1992.
165. **Imai M.** Functional heterogeneity of the descending limbs of Henle's loop. II. Interspecies differences among rabbits, rats, and hamsters. *Pflugers Arch* 402: 393-401, 1984.
166. **Imai M, Hayashi M, and Araki M.** Functional heterogeneity of the descending limbs of Henle's loop. I. Internephron heterogeneity in the hamster kidney. *Pflugers Arch* 402: 385-392, 1984.
167. **Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ, Jr., Lechene C, and Schwartz MA.** Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 110: 1803-1811, 1990.

168. **Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, and Narumiya S.** p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* 404: 118-124, 1997.
169. **Ismailov, II, Kieber-Emmons T, Lin C, Berdiev BK, Shlyonsky VG, Patton HK, Fuller CM, Worrell R, Zuckerman JB, Sun W, Eaton DC, Benos DJ, and Kleyman TR.** Identification of an amiloride binding domain within the alpha-subunit of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 272: 21075-21083, 1997.
170. **Itoh T, Yamauchi A, Miyai A, Yokoyama K, Kamada T, Ueda N, and Fujiwara Y.** Mitogen-activated protein kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* 93: 2387-2392, 1994.
171. **Ives HE, Yee VJ, and Warnock DG.** Asymmetric distribution of the Na⁺/H⁺ antiporter in the renal proximal tubule epithelial cell. *J Biol Chem* 258: 13513-13516, 1983.
172. **Ives HE, Yee VJ, and Warnock DG.** Mixed type inhibition of the renal Na⁺/H⁺ antiporter by Li⁺ and amiloride. Evidence for a modifier site. *J Biol Chem* 258: 9710-9716, 1983.
173. **Jean K, Bernatchez G, Klein H, Garneau L, Sauve R, and Parent L.** Role of aspartate residues in Ca(2+) affinity and permeation of the distal ECaC1. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C665-672, 2002.
174. **Jia ZP, McCullough N, Martel R, Hemmingsen S, and Young PG.** Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *Embo J* 11: 1631-1640, 1992.
175. **Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, and MacKinnon R.** Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417: 515-522, 2002.
176. **Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, and MacKinnon R.** The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417: 523-526, 2002.
177. **Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, and MacKinnon R.** X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 33-41, 2003.

178. **Johnson CL, Kuntzweiler TA, Lingrel JB, Johnson CG, and Wallick ET.** Glutamic acid 327 in the sheep alpha 1 isoform of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase is a pivotal residue for cation-induced conformational changes. *Biochem J* 309 (Pt 1): 187-194, 1995.
179. **Johnson JD and Epel D.** Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. *Nature* 262: 661-664, 1976.
180. **Kaback HR.** Site-directed mutagenesis and ion-gradient driven active transport: on the path of the proton. *Annu Rev Physiol* 50: 243-256, 1988.
181. **Kaczorowski GJ, Barros F, Dethmers JK, Trumble MJ, and Cragoe EJ, Jr.** Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of amiloride. *Biochemistry* 24: 1394-1403, 1985.
182. **Kandasamy RA, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, and Orłowski J.** Plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J Biol Chem* 270: 29209-29216, 1995.
183. **Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, and Orłowski J.** Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem* 269: 23544-23552, 1994.
184. **Kellenberger S, Gautschi I, and Schild L.** A single point mutation in the pore region of the epithelial Na⁺ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4170-4175, 1999.
185. **Kellenberger S, Hoffmann-Pochon N, Gautschi I, Schneeberger E, and Schild L.** On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na⁺ channel. *J Gen Physiol* 114: 13-30, 1999.
186. **Khadilkar A, Iannuzzi P, and Orłowski J.** Identification of sites in the second exomembrane loop and ninth transmembrane helix of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger important for drug recognition and cation translocation. *J Biol Chem* 276: 43792-43800, 2001.

187. **Khan I.** Topology of the C-terminus of sodium hydrogen exchanger isoform-1: presence of an extracellular epitope. *Arch Biochem Biophys* 391: 25-29, 2001.
188. **Kieber-Emmons T, Lin C, Foster MH, and Kleyman TR.** Antiidiotypic antibody recognizes an amiloride binding domain within the alpha subunit of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 274: 9648-9655, 1999.
189. **Kikeri D, Azar S, Sun A, Zeidel ML, and Hebert SC.** Na⁽⁺⁾-H⁺ antiporter and Na⁽⁺⁾-(HCO₃⁻)_n symporter regulate intracellular pH in mouse medullary thick limbs of Henle. *Am J Physiol* 258: F445-456, 1990.
190. **Kim MS, Morii T, Sun LX, Imoto K, and Mori Y.** Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett* 318: 145-148, 1993.
191. **Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, and Kaibuchi K.** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248, 1996.
192. **Kinsella J, Cujdik T, and Sacktor B.** Na⁺-H⁺ exchange activity in renal brush border membrane vesicles in response to metabolic acidosis: The role of glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 630-634, 1984.
193. **Kinsella JL and Aronson PS.** Amiloride inhibition of the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 241: F374-379, 1981.
194. **Kinsella JL and Aronson PS.** Determination of the coupling ratio for Na⁺ -H⁺ exchange in renal microvillus membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 689: 161-164, 1982.
195. **Kinsella JL and Aronson PS.** Interaction of NH₄⁺ and Li⁺ with the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Am J Physiol* 241: C220-226, 1981.
196. **Kinsella JL and Aronson PS.** Properties of the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 238: F461-469, 1980.
197. **Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M, and et al.** Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 25: 615-622, 1995.

198. **Klein M, Seeger P, Schuricht B, Alper SL, and Schwab A.** Polarization of Na(+)/H(+) and Cl(-)/HCO₃(-) exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* 115: 599-608, 2000.
199. **Kleyman TR and Cragoe EJ, Jr.** Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* 105: 1-21, 1988.
200. **Kleyman TR and Cragoe EJ, Jr.** The mechanism of action of amiloride. *Semin Nephrol* 8: 242-248, 1988.
201. **Knickelbein R, Aronson PS, Atherton W, and Dobbins JW.** Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am J Physiol* 245: G504-510, 1983.
202. **Koenig B, Ricapito S, and Kinne R.** Chloride transport in the thick ascending limb of Henle's loop: potassium dependence and stoichiometry of the NaCl cotransport system in plasma membrane vesicles. *Pflugers Arch* 399: 173-179, 1983.
203. **Kokko JP.** Sodium chloride and water transport in the descending limb of Henle. *J Clin Invest* 49: 1838-1846, 1970.
204. **Kolyada AY, Johns CA, and Madias NE.** Role of C/EBP proteins in hepatic and vascular smooth muscle transcription of human NHE1 gene. *Am J Physiol* 269: C1408-1416, 1995.
205. **Kolyada AY, Lebedeva TV, Johns CA, and Madias NE.** Proximal regulatory elements and nuclear activities required for transcription of the human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-1) gene. *Biochim Biophys Acta* 1217: 54-64, 1994.
206. **Kong SK, Choy YM, Fung KP, and Lee CY.** cAMP activates Na⁺/H⁺ antiporter in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 131-137, 1989.
207. **Kopito RR and Lodish HF.** Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* 316: 234-238, 1985.
208. **Krapf R, Alpern RJ, Rector FC, Jr., and Berry CA.** Basolateral membrane Na/base cotransport is dependent on CO₂/HCO₃ in the proximal convoluted tubule. *J Gen Physiol* 90: 833-853, 1987.

209. **Krapf R, Pearce D, Lynch C, Xi XP, Reudelhuber TL, Pouyssegur J, and Rector FC, Jr.** Expression of rat renal Na/H antiporter mRNA levels in response to respiratory and metabolic acidosis. *J Clin Invest* 87: 747-751, 1991.
210. **Krapf R and Solioz M.** Na/H antiporter mRNA expression in single nephron segments of rat kidney cortex. *J Clin Invest* 88: 783-788, 1991.
211. **Kregenow FM, Caryk T, and Siebens AW.** Further studies of the volume-regulatory response of *Amphiuma* red cells in hypertonic media. Evidence for amiloride-sensitive Na/H exchange. *J Gen Physiol* 86: 565-584, 1985.
212. **Kriz W and Kaissling B.** Structural organization of the mammalian kidney. In: *The kidney : physiology & pathophysiology*, edited by Seldin D and Giebisch G. New York: Raven Press, 1992, p. 707-778.
213. **Krulwich TA.** Na⁺/H⁺ Antiporters. *Biochem Biophys acta* 726: 245-264, 1985.
214. **Kulanthaivel P, Furesz TC, Moe AJ, Smith CH, Mahesh VB, Leibach FH, and Ganapathy V.** Human placental syncytiotrophoblast expresses two pharmacologically distinguishable types of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchangers, NHE-1 in the maternal-facing (brush border) membrane and NHE-2 in the fetal-facing (basal) membrane. *Biochem J* 284 (Pt 1): 33-38, 1992.
215. **Kulanthaivel P, Simon BJ, Leibach FH, Mahesh VB, and Ganapathy V.** An essential role for vicinal dithiol groups in the catalytic activity of the human placental Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger. *Biochim Biophys Acta* 1024: 385-389, 1990.
216. **Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, and Doyle DA.** Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300: 1922-1926, 2003.
217. **Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orłowski J, and Grinstein S.** The apical Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 274: 29843-29849, 1999.
218. **Kuribayashi Y, Itoh N, Kitano M, and Ohashi N.** Cerebroprotective properties of SM-20220, a potent Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor, in transient cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol* 383: 163-168, 1999.

219. **Kurtz I.** Apical and basolateral Na⁺/H⁺ exchange in the rabbit outer medullary thin descending limb of Henle: role in intracellular pH regulation. *J Membr Biol* 106: 253-260, 1988.
220. **Kurtz I.** Basolateral membrane Na⁺/H⁺ antiport, Na⁺/base cotransport, and Na⁺-independent Cl⁻/base exchange in the rabbit S3 proximal tubule. *J Clin Invest* 83: 616-622, 1989.
221. **Kuwahara M, Sasaki S, Uchida S, Cragoe EJ, Jr., and Marumo F.** Different development of apical and basolateral Na-H exchangers in LLC-PK1 renal epithelial cells: characterization by inhibitors and antisense oligonucleotide. *Biochim Biophys Acta* 1220: 132-138, 1994.
222. **Kyte J and Doolittle RF.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132, 1982.
223. **LaBelle EF and Eaton DC.** Amiloride-inhibited Na⁺ uptake into toad bladder microsomes is Na⁺-H⁺ exchange. *Biochim Biophys Acta* 733: 194-197, 1983.
224. **Ladiaz JA.** Structural insights into the CFTR-NHERF interaction. *J Membr Biol* 192: 79-88, 2003.
225. **Lagana A, Vadnais J, Le PU, Nguyen TN, Laprade R, Nabi IR, and Noel J.** Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na(+)/H(+) exchanger NHE1. *J Cell Sci* 113 (Pt 20): 3649-3662, 2000.
226. **L'Allemain G, Franchi A, Cragoe E, Jr., and Pouyssegur J.** Blockade of the Na⁺/H⁺ antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. Structure-activity relationships in the amiloride series. *J Biol Chem* 259: 4313-4319, 1984.
227. **Lamprecht G, Weinman EJ, and Yun CH.** The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J Biol Chem* 273: 29972-29978, 1998.
228. **Lang F, Madlung J, Bock J, Lukewille U, Kaltenbach S, Lang KS, Belka C, Wagner CA, Lang HJ, Gulbins E, and Lepple-Wienhues A.** Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na⁺/H⁺-exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-receptor stimulation. *Pflugers Arch* 440: 902-907, 2000.

229. **Lang j.** Chemistry of New Inhibitors. In: *The Sodium-Hydrogen Exchanger : From Molecule to its Role in Disease*, edited by Karmazyn M, avkiran M and Fliegel L: Kluwer Academic Publishers, 2003, p. 239-253.
230. **Langloh AL, Berdiev B, Ji HL, Keyser K, Stanton BA, and Benos DJ.** Charged residues in the M2 region of alpha-hENaC play a role in channel conductance. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C277-291, 2000.
231. **Leem CH and Vaughan-Jones RD.** Sarcolemmal mechanisms for pHi recovery from alkalosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 509 (Pt 2): 487-496, 1998.
232. **Lehoux S, Abe J, Florian JA, and Berk BC.** 14-3-3 Binding to Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchange. *J Biol Chem* 276: 15794-15800, 2001.
233. **Levine SA, Montrose MH, Tse CM, and Donowitz M.** Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J Biol Chem* 268: 25527-25535, 1993.
234. **Levine SA, Nath SK, Yun CH, Yip JW, Montrose M, Donowitz M, and Tse CM.** Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. *J Biol Chem* 270: 13716-13725, 1995.
235. **Li J and Eastman A.** Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na(+)/H(+)-antiport. *J Biol Chem* 270: 3203-3211, 1995.
236. **Lifton RP, Sardet C, Pouyssegur J, and Lalouel JM.** Cloning of the human genomic amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiporter gene, identification of genetic polymorphisms, and localization on the genetic map of chromosome 1p. *Genomics* 7: 131-135, 1990.
237. **Lin X and Barber DL.** A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12631-12636, 1996.
238. **Lipkind GM and Fozzard HA.** Modeling of the outer vestibule and selectivity filter of the L-type Ca²⁺ channel. *Biochemistry* 40: 6786-6794, 2001.

239. **Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, and Zhu JK.** The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3730-3734, 2000.
240. **Lonchamp MO, Pinelis S, Goulin J, Chabrier PE, and Braquet P.** Proliferation and Na⁺/H⁺ exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 4: 776-779, 1991.
241. **Lorrain J, Briand V, Favennec E, Duval N, Grosset A, Janiak P, Hoornaert C, Cremer G, Latham C, and O'Connor SE.** Pharmacological profile of SL 59.1227, a novel inhibitor of the sodium/hydrogen exchanger. *Br J Pharmacol* 131: 1188-1194, 2000.
242. **Lucci MS, Pucacco LR, Carter NW, and DuBose TD, Jr.** Evaluation of bicarbonate transport in rat distal tubule: effects of acid-base status. *Am J Physiol* 243: F335-341, 1982.
243. **Mahnensmith RL and Aronson PS.** The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 56: 773-788, 1985.
244. **Mailander J, Muller-Esterl W, and Dedio J.** Human homolog of mouse tescalcin associates with Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger type-1. *FEBS Lett* 507: 331-335, 2001.
245. **Malakooti J, Dahdal RY, Dudeja PK, Layden TJ, and Ramaswamy K.** The human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE2 gene: genomic organization and promoter characterization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G763-773, 2001.
246. **Malakooti J, Dahdal RY, Schmidt L, Layden TJ, Dudeja PK, and Ramaswamy K.** Molecular cloning, tissue distribution, and functional expression of the human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE2. *Am J Physiol* 277: G383-390, 1999.
247. **Margolis LB, Rozovskaja IA, and Cragoe E.** Intracellular pH and cell adhesion to solid substrate. *FEBS Lett* 234: 449-450, 1988.
248. **Marra MA, Prasad SS, and Baillie DL.** Molecular analysis of two genes between let-653 and let-56 in the unc-22(IV) region of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Gen Genet* 236: 289-298, 1993.

249. **Mattei MG, Sardet C, Franchi A, and Pouyssegur J.** The human amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiporter: localization to chromosome 1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 48: 6-8, 1988.
250. **McKinney TD and Burg MB.** Bicarbonate absorption by rabbit cortical collecting tubules in vitro. *Am J Physiol* 234: F141-145, 1978.
251. **McKinney TD and Burg MB.** Bicarbonate secretion by rabbit cortical collecting tubules in vitro. *J Clin Invest* 61: 1421-1427, 1978.
252. **McKinney TD and Burg MB.** Bicarbonate transport by rabbit cortical collecting tubules. Effect of acid and alkali loads in vivo on transport in vitro. *J Clin Invest* 60: 766-768, 1977.
253. **McNicholas CM and Canessa CM.** Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *J Gen Physiol* 109: 681-692, 1997.
254. **Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, and Schwartz A.** Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca²⁺ channel pore. *FEBS Lett* 335: 265-269, 1993.
255. **Miller RT, Counillon L, Pages G, Lifton RP, Sardet C, and Pouyssegur J.** Structure of the 5'-flanking regulatory region and gene for the human growth factor-activatable Na/H exchanger NHE-1. *J Biol Chem* 266: 10813-10819, 1991.
256. **Mitchell P.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften* 191: 144-148, 1961.
257. **Mitchell P.** Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochemical Journal* 105: 1147-1162, 1967.
258. **Miyazaki E, Sakaguchi M, Wakabayashi S, Shigekawa M, and Mihara K.** NHE6 protein possesses a signal peptide destined for endoplasmic reticulum membrane and localizes in secretory organelles of the cell. *J Biol Chem* 276: 49221-49227, 2001.
259. **Moe OW, Miller RT, Horie S, Cano A, Preisig PA, and Alpern RJ.** Differential regulation of Na/H antiporter by acid in renal epithelial cells and fibroblasts. *J Clin Invest* 88: 1703-1708, 1991.

260. **Mogi T, Stern LJ, Marti T, Chao BH, and Khorana HG.** Aspartic acid substitutions affect proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4148-4152, 1988.
261. **Moolenaar WH, Boonstra J, van der Saag PT, and de Laat SW.** Sodium/proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 256: 12883-12887, 1981.
262. **Moolenaar WH, Mummery CL, van der Saag PT, and de Laat SW.** Rapid ionic events and the initiation of growth in serum-stimulated neuroblastoma cells. *Cell* 23: 789-798, 1981.
263. **Moolenaar WH, Tsien RY, van der Saag PT, and de Laat SW.** Na⁺/H⁺ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 304: 645-648, 1983.
264. **Moolenaar WH, Yarden Y, de Laat SW, and Schlessinger J.** Epidermal growth factor induces electrically silent Na⁺ influx in human fibroblasts. *J Biol Chem* 257: 8502-8506, 1982.
265. **Morais-Cabral JH, Zhou Y, and MacKinnon R.** Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414: 37-42, 2001.
266. **Morgan D and DeCoursey TE.** Diversity of voltage gated proton channels. *Front Biosci* 8: s1266-1279, 2003.
267. **Moule SK and McGivan JD.** Epidermal growth factor and cyclic AMP stimulate Na⁺/H⁺ exchange in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 187: 677-682, 1990.
268. **Mrkic B, Tse CM, Forgo J, Helmle-Kolb C, Donowitz M, and Murer H.** Identification of PTH-responsive Na/H-exchanger isoforms in a rabbit proximal tubule cell line (RKPC-2). *Pflugers Arch* 424: 377-384, 1993.
269. **Murer H, Hopfer U, and Kinne R.** Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J* 154: 597-604, 1976.
270. **Murtazina R, Booth BJ, Bullis BL, Singh DN, and Fliegel L.** Functional analysis of polar amino-acid residues in membrane associated regions of the NHE1 isoform of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger. *Eur J Biochem* 268: 4674-4685, 2001.

271. **Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E, Pinney D, Candia C, Solomon F, Gusella J, and Ramesh V.** NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J Biol Chem* 273: 1273-1276, 1998.
272. **Nagami GT.** Luminal secretion of ammonia in the mouse proximal tubule perfused in vitro. *J Clin Invest* 81: 159-164, 1988.
273. **Nagata S and Golstein P.** The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995.
274. **Natochin Yu V.** Mechanism of drugs action on ion and water transport in renal tubular cells. *Prog Drug Res* 26: 87-142, 1982.
275. **Nehrke K and Melvin JE.** The NHX family of Na+-H+ exchangers in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 277: 29036-29044, 2002.
276. **Nicoll DA, Hryshko LV, Matsuoka S, Frank JS, and Philipson KD.** Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal Na+-Ca2+ exchanger. *J Biol Chem* 271: 13385-13391, 1996.
277. **Niiya S, Yamasaki K, Wilson TH, and Tsuchiya T.** Altered cation coupling to melibiose transport in mutants of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 257: 8902-8906, 1982.
278. **Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, and Pardo JM.** Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol* 109: 735-742, 1995.
279. **Noel J, Germain D, and Vadnais J.** Glutamate 346 of human Na(+)-H(+) exchanger NHE1 is crucial for modulating both the affinity for Na+ and the interaction with amiloride derivatives. *Biochemistry* 42: 15361-15368, 2003.
280. **Noel J, Roux D, and Pouyssegur J.** Differential localization of Na+/H+ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. *J Cell Sci* 109 (Pt 5): 929-939, 1996.
281. **Noel J, Vinay P, Tejedor A, Fleser A, and Laprade R.** Metabolic cost of bafilomycin-sensitive H+ pump in intact dog, rabbit, and hamster proximal tubules. *Am J Physiol* 264: F655-661, 1993.

282. **Numata M and Orlowski J.** Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 276: 17387-17394, 2001.
283. **Numata M, Petrecca K, Lake N, and Orlowski J.** Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* 273: 6951-6959, 1998.
284. **Orlowski J.** Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem* 268: 16369-16377, 1993.
285. **Orlowski J and Grinstein S.** Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 447: 549-565, 2004.
286. **Orlowski J and Kandasamy RA.** Delineation of transmembrane domains of the Na⁺/H⁺ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J Biol Chem* 271: 19922-19927, 1996.
287. **Orlowski J, Kandasamy RA, and Shull GE.** Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* 267: 9331-9339, 1992.
288. **Orlowski J and Shull GE.** Characteristics of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger gene family. In: *The Na⁺/H⁺ exchanger*, edited by Fliegel L. Austin: R.G. Landes Company, 1996, p. 123-148.
289. **Otto H, Marti T, Holz M, Mogi T, Lindau M, Khorana HG, and Heyn MP.** Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9228-9232, 1989.
290. **Padan E and Schuldiner S.** Molecular biology of Na⁺/H⁺ antiporters: molecular devices that couple the Na⁺ and H⁺ circulation in cells. *Biochim Biophys Acta* 1187: 206-210, 1994.
291. **Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, and Pouyssegur J.** Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8319-8323, 1993.

292. **Pang T, Su X, Wakabayashi S, and Shigekawa M.** Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem* 276: 17367-17372, 2001.
293. **Pang T, Wakabayashi S, and Shigekawa M.** Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* 277: 43771-43777, 2002.
294. **Paolini I.** In: *Molecular Biology : Elementary Process of nerve conduction and muscle contraction*, edited by Nachmansohn. New-York: Academic Press, 1960, p. 173.
295. **Paris S and Pouyssegur J.** Growth factors activate the Na⁺/H⁺ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H⁺. *J Biol Chem* 259: 10989-10994, 1984.
296. **Petrecce K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, and Shrier A.** Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol* 276: H709-717, 1999.
297. **Phan VN, Kusuhara M, Lucchesi PA, and Berk BC.** A 90-kD Na(+)-H⁺ exchanger kinase has increased activity in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 29: 1265-1272, 1997.
298. **Pinner E, Padan E, and Schuldiner S.** Amiloride and harmaline are potent inhibitors of NhaB, a Na⁺/H⁺ antiporter from Escherichia coli. *FEBS Lett* 365: 18-22, 1995.
299. **Pinner E, Padan E, and Schuldiner S.** Cloning, sequencing, and expression of the nhaB gene, encoding a Na⁺/H⁺ antiporter in Escherichia coli. *J Biol Chem* 267: 11064-11068, 1992.
300. **Pouyssegur J, Chambard JC, Franchi A, Paris S, and Van Obberghen-Schilling E.** Growth factor activation of an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange system in quiescent fibroblasts: coupling to ribosomal protein S6 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3935-3939, 1982.

301. **Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, L'Allemain G, and Paris S.** A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4833-4837, 1984.
302. **Preisig PA and Alpern RJ.** Pathways for apical and basolateral membrane NH₃ and NH₄⁺ movement in rat proximal tubule. *Am J Physiol* 259: F587-593, 1990.
303. **Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ, Jr., Alpern RJ, and Rector FC, Jr.** Role of the Na⁺/H⁺ antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J Clin Invest* 80: 970-978, 1987.
304. **Preisig PA and Rector FC, Jr.** Role of Na⁺-H⁺ antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol* 255: F461-465, 1988.
305. **Prior C, Potier S, Souciet JL, and Sychrova H.** Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387: 89-93, 1996.
306. **Putney LK, Denker SP, and Barber DL.** The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 527-552, 2002.
307. **Quednau B, Rosskopf D, Reusch HP, Luft FC, and Siffert W.** Enhanced Na(+)-H⁺ exchanger activity and NHE-1 mRNA levels in human lymphocytes during metabolic acidosis. *Am J Physiol* 266: C480-488, 1994.
308. **Quintero FJ, Blatt MR, and Pardo JM.** Functional conservation between yeast and plant endosomal Na(+)/H(+) antiporters. *FEBS Lett* 471: 224-228, 2000.
309. **Rankin S, Morii N, Narumiya S, and Rozengurt E.** Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin. *FEBS Lett* 354: 315-319, 1994.
310. **Rao GN, Sardet C, Pouyssegur J, and Berk BC.** Differential regulation of Na⁺/H⁺ antiporter gene expression in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic stimuli. *J Biol Chem* 265: 19393-19396, 1990.
311. **Reilly RF, Hildebrandt F, Biemesderfer D, Sardet C, Pouyssegur J, Aronson PS, Slayman CW, and Igarashi P.** cDNA cloning and immunolocalization of a

- Na(+)-H+ exchanger in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol* 261: F1088-1094, 1991.
312. **Renard S, Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M, and Barbry P.** Biochemical analysis of the membrane topology of the amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem* 269: 12981-12986, 1994.
313. **Ridley AJ and Hall A.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399, 1992.
314. **Rindler MJ and Saier MH, Jr.** Evidence for Na⁺/H⁺ antiport in cultured dog kidney cells (MDCK). *J Biol Chem* 256: 10820-10825, 1981.
315. **Rindler MJ, Taub M, and Saier MH, Jr.** Uptake of ²²Na⁺ by cultured dog kidney cells (MDCK). *J Biol Chem* 254: 11431-11439, 1979.
316. **Ritter M, Schratzberger P, Rossmann H, Woll E, Seiler K, Seidler U, Reinisch N, Kahler CM, Zwierzina H, Lang HJ, Lang F, Paulmichl M, and Wiedermann CJ.** Effect of inhibitors of Na⁺/H⁺-exchange and gastric H⁺/K⁺ ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leucocytes. *Br J Pharmacol* 124: 627-638, 1998.
317. **Rocha AS and Kokko JP.** Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest* 52: 612-623, 1973.
318. **Rotin D and Grinstein S.** Impaired cell volume regulation in Na(+)-H+ exchange-deficient mutants. *Am J Physiol* 257: C1158-1165, 1989.
319. **Russell JM and Boron WF.** Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. *Nature* 264: 73-74, 1976.
320. **Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467, 1977.
321. **Sardet C, Counillon L, Franchi A, and Pouyssegur J.** Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* 247: 723-726, 1990.

322. **Sardet C, Fafournoux P, and Pouyssegur J.** Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na^+/H^+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* 266: 19166-19171, 1991.
323. **Sardet C, Franchi A, and Pouyssegur J.** Molecular cloning of the growth-factor-activatable human Na^+/H^+ antiporter. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2: 1011-1018, 1988.
324. **Sardet C, Franchi A, and Pouyssegur J.** Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell* 56: 271-280, 1989.
325. **Schild L, Giebisch G, Karniski LP, and Aronson PS.** Effect of formate on volume reabsorption in the rabbit proximal tubule. *J Clin Invest* 79: 32-38, 1987.
326. **Schild L, Schneeberger E, Gautschi I, and Firsov D.** Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen Physiol* 109: 15-26, 1997.
327. **Schmitt B, Ikeda T, Shigekawa M, and Wakabayashi S.** The Regulatory Cytoplasmic Domain of the Na^+/H^+ Exchanger. In: *The Na^+/H^+ Exchanger*, edited by Fliegel L. New-York: R.G. Landes Company, 1996, p. 149-170.
328. **Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, and Scholkens BA.** Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 29: 260-268, 1995.
329. **Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, and Scholkens BA.** Hoe 694, a new Na^+/H^+ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. *Br J Pharmacol* 109: 562-568, 1993.
330. **Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Harline M, Boivin GP, Stemmermann G, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML, and Shull GE.** Targeted disruption of the murine Na^+/H^+ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest* 101: 1243-1253, 1998.

331. **Schuster VL.** Cyclic adenosine monophosphate-stimulated bicarbonate secretion in rabbit cortical collecting tubules. *J Clin Invest* 75: 2056-2064, 1985.
332. **Schwartz MA, Ingber DE, Lawrence M, Springer TA, and Lechene C.** Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res* 195: 533-535, 1991.
333. **Schwartz MA and Lechene C.** Adhesion is required for protein kinase C-dependent activation of the Na⁺/H⁺ antiporter by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6138-6141, 1992.
334. **Schwartz MA, Lechene C, and Ingber DE.** Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7849-7853, 1991.
335. **Schwarz EM and Benzer S.** Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10249-10254, 1997.
336. **Sheng S, McNulty KA, Harvey JM, and Kleyman TR.** Second transmembrane domains of ENaC subunits contribute to ion permeation and selectivity. *J Biol Chem* 276: 44091-44098, 2001.
337. **Shi H, Ishitani M, Kim C, and Zhu JK.** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6896-6901, 2000.
338. **Shigekawa M, Iwamoto T, Uehara A, and Kita S.** Probing ion binding sites in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 976: 19-30, 2002.
339. **Shiota S, Yazyu H, and Tsuchiya T.** *Escherichia coli* mutants with altered cation recognition by the melibiose carrier. *J Bacteriol* 160: 445-447, 1984.
340. **Shrode LD, Klein JD, O'Neill WC, and Putnam RW.** Shrinkage-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange in primary rat astrocytes: role of myosin light-chain kinase. *Am J Physiol* 269: C257-266, 1995.
341. **Simchowicz L and Cragoe EJ, Jr.** Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. *J Biol Chem* 261: 6492-6500, 1986.
342. **Slepkov ER, Rainey JK, Li X, Liu Y, Cheng FJ, Lindhout DA, Sykes BD, and Fliegel L.** Structural and functional characterization of transmembrane segment IV

- of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* 280: 17863-17872, 2005.
343. **Soleimani M, Bookstein C, Bizal GL, Musch MW, Hattabaugh YJ, Rao MC, and Chang EB.** Localization of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE-3 in rabbit and canine kidney. *Biochim Biophys Acta* 1195: 89-95, 1994.
344. **Soleimani M, Bookstein C, McAteer JA, Hattabaugh YJ, Bizal GL, Musch MW, Villereal M, Rao MC, Howard RL, and Chang EB.** Effect of high osmolality on Na⁺/H⁺ exchange in renal proximal tubule cells. *J Biol Chem* 269: 15613-15618, 1994.
345. **Soleimani M, Singh G, Bizal GL, Gullans SR, and McAteer JA.** Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medullary collecting duct cells. Expression, functional localization, and differential regulation. *J Biol Chem* 269: 27973-27978, 1994.
346. **Soleimani M, Singh G, Bookstein C, Rao MC, Chang EB, and Dominguez JH.** Inhibition of glycosylation decreases Na⁺/H⁺ exchange activity, blocks NHE-3 transport to the membrane, and increases NHE-3 mRNA expression in LLC-PK1 cells. *J Lab Clin Med* 127: 565-573, 1996.
347. **Soltoff SP and Mandel LJ.** Amiloride directly inhibits the Na,K-ATPase activity of rabbit kidney proximal tubules. *Science* 220: 957-958, 1983.
348. **Stotz SC, Jarvis SE, and Zamponi GW.** Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* 554: 263-273, 2004.
349. **Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, and Maller JL.** Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334: 715-718, 1988.
350. **Suarez-Kurtz G and Kaczorowski GJ.** Effects of dichlorobenzamil on calcium currents in clonal GH3 pituitary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 248-253, 1988.
351. **Szabo EZ, Numata M, Shull GE, and Orlowski J.** Kinetic and pharmacological properties of human brain Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 5 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 275: 6302-6307, 2000.

352. **Szpirer C, Szpirer J, Riviere M, Levan G, and Orlowski J.** Chromosomal assignment of four genes encoding Na/H exchanger isoforms in human and rat. *Mamm Genome* 5: 153-159, 1994.
353. **Takahashi E, Abe J, and Berk BC.** Angiotensin II stimulates p90rsk in vascular smooth muscle cells. A potential Na(+)-H⁺ exchanger kinase. *Circ Res* 81: 268-273, 1997.
354. **Takahashi E, Abe J, Gallis B, Aebersold R, Spring DJ, Krebs EG, and Berk BC.** p90(RSK) is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1. *J Biol Chem* 274: 20206-20214, 1999.
355. **Takaichi K, Balkovetz DF, Van Meir E, and Warnock DG.** Cytosolic pH sensitivity of an expressed human NHE-1 Na(+)-H⁺ exchanger. *Am J Physiol* 264: C944-950, 1993.
356. **Takaichi K, Wang D, Balkovetz DF, and Warnock DG.** Cloning, sequencing, and expression of Na(+)-H⁺ antiporter cDNAs from human tissues. *Am J Physiol* 262: C1069-1076, 1992.
357. **Tang CM, Presser F, and Morad M.** Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240: 213-215, 1988.
358. **Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680, 1994.
359. **Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, and Barber DL.** p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *Embo J* 17: 4712-4722, 1998.
360. **Touret N, Poujeol P, and Counillon L.** Second-site revertants of a low-sodium-affinity mutant of the Na⁺/H⁺ exchanger reveal the participation of TM4 into a highly constrained sodium-binding site. *Biochemistry* 40: 5095-5101, 2001.
361. **Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, and Ogawa H.** Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655, 2000.

362. **Toyoshima C and Nomura H.** Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418: 605-611, 2002.
363. **Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, and Donowitz M.** Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem* 267: 9340-9346, 1992.
364. **Tse CM, Levine SA, Yun CH, Brant SR, Pouyssegur J, Montrose MH, and Donowitz M.** Functional characteristics of a cloned epithelial Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9110-9114, 1993.
365. **Tse CM, Levine SA, Yun CH, Khurana S, and Donowitz M.** Na⁺/H⁺ exchanger-2 is an O-linked but not an N-linked sialoglycoprotein. *Biochemistry* 33: 12954-12961, 1994.
366. **Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouyssegur J, and Donowitz M.** Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *J Biol Chem* 268: 11917-11924, 1993.
367. **Tse CM, Ma AI, Yang VW, Watson AJ, Levine S, Montrose MH, Potter J, Sardet C, Pouyssegur J, and Donowitz M.** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na⁺/H⁺ exchanger. *Embo J* 10: 1957-1967, 1991.
368. **Tse M, Levine S, Yun C, Brant S, Counillon LT, Pouyssegur J, and Donowitz M.** Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family. *J Membr Biol* 135: 93-108, 1993.
369. **Tzuberly T, Rimon A, and Padan E.** Mutation E252C increases drastically the K_m value for Na⁺ and causes an alkaline shift of the pH dependence of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of Escherichia coli. *J Biol Chem* 279: 3265-3272, 2004.
370. **Van Huysse JW, Jewell EA, and Lingrel JB.** Site-directed mutagenesis of a predicted cation binding site of Na, K-ATPase. *Biochemistry* 32: 819-826, 1993.

371. **Vexler ZS, Symons M, and Barber DL.** Activation of Na⁺-H⁺ exchange is necessary for RhoA-induced stress fiber formation. *J Biol Chem* 271: 22281-22284, 1996.
372. **Vigne P, Frelin C, Cragoe EJ, Jr., and Lazdunski M.** Structure-activity relationships of amiloride and certain of its analogues in relation to the blockade of the Na⁺/H⁺ exchange system. *Mol Pharmacol* 25: 131-136, 1984.
373. **Vigne P, Frelin C, and Lazdunski M.** The amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange system in skeletal muscle cells in culture. *J Biol Chem* 257: 9394-9400, 1982.
374. **Villereal ML.** Sodium fluxes in human fibroblasts: effect of serum, Ca²⁺, and amiloride. *J Cell Physiol* 107: 359-369, 1981.
375. **von Heijne G.** Proline kinks in transmembrane alpha-helices. *J Mol Biol* 218: 499-503, 1991.
376. **Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, and Shigekawa M.** Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H(+)-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *J Biol Chem* 269: 13710-13715, 1994.
377. **Wakabayashi S, Bertrand B, Shigekawa M, Fournoux P, and Pouyssegur J.** Growth factor activation and "H(+)-sensing" of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 5583-5588, 1994.
378. **Wakabayashi S, Fournoux P, Sardet C, and Pouyssegur J.** The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2424-2428, 1992.
379. **Wakabayashi S, Hisamitsu T, Pang T, and Shigekawa M.** Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na⁺/H⁺ exchangers by measurement of reverse mode reaction. *J Biol Chem* 278: 43580-43585, 2003.
380. **Wakabayashi S, Hisamitsu T, Pang T, and Shigekawa M.** Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 oppositely change pH sensing of Na⁺/H⁺ exchanger 1. *J Biol Chem* 278: 11828-11835, 2003.

381. **Wakabayashi S, Ikeda T, Noel J, Schmitt B, Orłowski J, Pouyssegur J, and Shigekawa M.** Cytoplasmic domain of the ubiquitous Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 can confer Ca²⁺ responsiveness to the apical isoform NHE3. *J Biol Chem* 270: 26460-26465, 1995.
382. **Wakabayashi S, Pang T, Su X, and Shigekawa M.** A novel topology model of the human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 1. *J Biol Chem* 275: 7942-7949, 2000.
383. **Wakabayashi S, Pang T, Su X, and Shigekawa M.** Second mutations rescue point mutant of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE1 showing defective surface expression. *FEBS Lett* 487: 257-261, 2000.
384. **Wakabayashi S, Sardet C, Fafournoux P, Counillon L, Meloche S, Pages G, and Pouyssegur J.** Structure function of the growth factor-activatable Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 119: 157-186, 1992.
385. **Waldmann R, Champigny G, and Lazdunski M.** Functional degenerin-containing chimeras identify residues essential for amiloride-sensitive Na⁺ channel function. *J Biol Chem* 270: 11735-11737, 1995.
386. **Wang D, Balkovetz DF, and Warnock DG.** Mutational analysis of transmembrane histidines in the amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol* 269: C392-402, 1995.
387. **Wang H, Silva NL, Lucchesi PA, Haworth R, Wang K, Michalak M, Pelech S, and Fliegel L.** Phosphorylation and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger through mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry* 36: 9151-9158, 1997.
388. **Wang H, Singh D, and Fliegel L.** Functional role of cysteine residues in the Na⁺/H⁺ exchanger effects of mutation of cysteine residues on targeting and activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Arch Biochem Biophys* 358: 116-124, 1998.
389. **Wang T, Malnic G, Giebisch G, and Chan YL.** Renal bicarbonate reabsorption in the rat. IV. Bicarbonate transport mechanisms in the early and late distal tubule. *J Clin Invest* 91: 2776-2784, 1993.
390. **Wang Z, Orłowski J, and Shull GE.** Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem* 268: 11925-11928, 1993.

391. **Watanabe Y, Miwa S, and Tamai Y.** Characterization of Na⁺/H⁽⁺⁾-antiporter gene closely related to the salt-tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* 11: 829-838, 1995.
392. **Weiner ID and Hamm LL.** Regulation of intracellular pH in the rabbit cortical collecting tubule. *J Clin Invest* 85: 274-281, 1990.
393. **Weinman EJ, Dubinsky WP, Dinh Q, Steplock D, and Shenolikar S.** Effect of limited trypsin digestion on the renal Na⁺-H⁺ exchanger and its regulation by cAMP-dependent protein kinase. *J Membr Biol* 109: 233-241, 1989.
394. **Weinman EJ and Shenolikar S.** The Na-H exchanger regulatory factor. *Exp Nephrol* 5: 449-452, 1997.
395. **Weinman EJ, Shenolikar S, and Kahn AM.** cAMP-associated inhibition of Na⁺-H⁺ exchanger in rabbit kidney brush-border membranes. *Am J Physiol* 252: F19-25, 1987.
396. **Weinman EJ, Steplock D, Bui G, Yuan N, and Shenolikar S.** Regulation of renal Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 258: F1254-1258, 1990.
397. **Weinman EJ, Steplock D, Donowitz M, and Shenolikar S.** NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry* 39: 6123-6129, 2000.
398. **Weinman EJ, Steplock D, and Shenolikar S.** CAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na⁺-H⁺ exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. *J Clin Invest* 92: 1781-1786, 1993.
399. **Weinman EJ, Steplock D, Tate K, Hall RA, Spurney RF, and Shenolikar S.** Structure-function of recombinant Na/H exchanger regulatory factor (NHE-RF). *J Clin Invest* 101: 2199-2206, 1998.
400. **Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, and Shenolikar S.** Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger. *J Clin Invest* 95: 2143-2149, 1995.

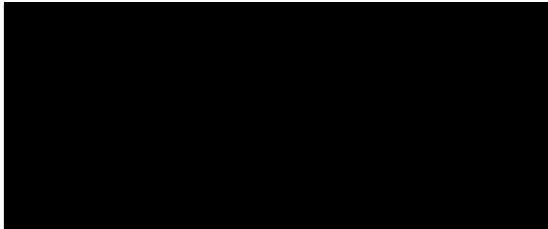
401. **Weinman EJ, Wang Y, Wang F, Greer C, Steplock D, and Shenolikar S.** A C-terminal PDZ motif in NHE3 binds NHERF-1 and enhances cAMP inhibition of sodium-hydrogen exchange. *Biochemistry* 42: 12662-12668, 2003.
402. **Weinman SA and Reuss L.** Na⁺-H⁺ exchange at the apical membrane of Necturus gallbladder. Extracellular and intracellular pH studies. *J Gen Physiol* 80: 299-321, 1982.
403. **Wiebe CA, Rieder C, Young PG, Dibrov P, and Fliegel L.** Functional analysis of amino acids of the Na⁺/H⁺ exchanger that are important for proton translocation. *Mol Cell Biochem* 254: 117-124, 2003.
404. **Williams B and Howard RL.** Glucose-induced changes in Na⁺/H⁺ antiport activity and gene expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of protein kinase C. *J Clin Invest* 93: 2623-2631, 1994.
405. **Williams KA.** Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* 403: 112-115, 2000.
406. **Winkel GK, Sardet C, Pouyssegur J, and Ives HE.** Role of cytoplasmic domain of the Na⁺/H⁺ exchanger in hormonal activation. *J Biol Chem* 268: 3396-3400, 1993.
407. **Yamaji Y, Amemiya M, Cano A, Preisig PA, Miller RT, Moe OW, and Alpern RJ.** Overexpression of csk inhibits acid-induced activation of NHE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6274-6278, 1995.
408. **Yan W, Nehrke K, Choi J, and Barber DL.** The Nck-interacting kinase (NIK) phosphorylates the Na⁺-H⁺ exchanger NHE1 and regulates NHE1 activation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 276: 31349-31356, 2001.
409. **Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, and Tsien RW.** Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* 366: 158-161, 1993.
410. **Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, and Pardo JM.** Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J* 30: 529-539, 2002.

411. **Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, and Welling PA.** Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279: 6863-6873, 2004.
412. **Yu FH, Shull GE, and Orłowski J.** Functional properties of the rat Na/H exchanger NHE-2 isoform expressed in Na/H exchanger-deficient Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 268: 25536-25541, 1993.
413. **Yun CC, Chen Y, and Lang F.** Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J Biol Chem* 277: 7676-7683, 2002.
414. **Yun CH, Gurubhagavatula S, Levine SA, Montgomery JL, Brant SR, Cohen ME, Cragoe EJ, Jr., Pouyssegur J, Tse CM, and Donowitz M.** Glucocorticoid stimulation of ileal Na⁺ absorptive cell brush border Na⁺/H⁺ exchange and association with an increase in message for NHE-3, an epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform. *J Biol Chem* 268: 206-211, 1993.
415. **Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, and Sidor A.** NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem* 273: 25856-25863, 1998.
416. **Yun CH, Little PJ, Nath SK, Levine SA, Pouyssegur J, Tse CM, and Donowitz M.** 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, 1993.
417. **Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, and Donowitz M.** 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, 1997.
418. **Zhorov BS, Folkman EV, and Ananthanarayanan VS.** Homology model of dihydropyridine receptor: implications for L-type Ca(2+) channel modulation by agonists and antagonists. *Arch Biochem Biophys* 393: 22-41, 2001.
419. **Zhorov BS and Tikhonov DB.** Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action. *J Neurochem* 88: 782-799, 2004.

420. **Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, and MacKinnon R.** Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411: 657-661, 2001.
421. **Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, and MacKinnon R.** Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-48, 2001.
422. **Zhuang Y, Cragoe EJ, Jr., Shaikewitz T, Glaser L, and Cassel D.** Characterization of potent Na⁺/H⁺ exchange inhibitors from the amiloride series in A431 cells. *Biochemistry* 23: 4481-4488, 1984

Curriculum vitae

David GERMAIN



Parcours Académique :

- Oct. 1994-Juin 1996 :** Diplôme d'Études Universitaires Générales
Biologie/Biochimie
Université de Reims (France)
Rang : 94^{ème}/211 étudiants inscrits
- Oct. 1996-Juin 1997 :** Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie
Université de Reims (France)
Rang : 7^{ème}/110 étudiants inscrits
- Oct. 1997-Juin 1998 :** Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie
Université de Reims (France)
Rang : 3^{ème}/69 étudiants inscrits
- Sept. 1998- Juin 1999 :** Diplôme d'Études Approfondies de Biologie et Physiologie Cellulaire.
Université de Nice (France)/Université de Montréal (Québec)
- Sept. 1999-2005 :** Doctorat de Biophysique et Physiologie Moléculaires
Université de Montréal

Communications :

- Juin 1999 :** Présentation par affiche au colloque du Groupe de Recherche en Transport Membranaire.
Titre : L'échangeur Na^+/H^+ : étude structure-fonction du site de transport du Na^+ et du site d'interaction des analogues de l'amiloride. ***Germain D., Oulianova N., Vadnais J., Noël J.***
- Oct. 1999 :** Présentation par affiche au congrès du Club de Recherche Clinique du Québec (Montebello).
Titre : L'échangeur Na^+/H^+ : étude structure-fonction du site de transport du Na^+ et du site d'interaction des analogues de l'amiloride. ***Germain D., Noël J.***
- Jan. 2000 :** Présentation orale au congrès des stagiaires de recherche organisé par l'Association des Étudiants aux Grades Supérieurs de la Faculté de Médecine à Montréal.
Titre : L'échangeur Na^+/H^+ : étude structure-fonction du site de transport du Na^+ et du site d'interaction des analogues de l'amiloride. ***Germain D., Noël J.***
Prix de la meilleure présentation.
- Mai 2000 :** Présentation orale au congrès de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences à Montréal.
Titre : Caractérisation du site d'interaction de l'échangeur Na^+/H^+ NHE1 avec ses inhibiteurs spécifiques. ***Germain D., Noël J.***
 Co-auteur de la présentation du Dr Noël :
Titre : Des mutants spontanés de l'échangeur Na^+/H^+ nous livrent leurs secrets et davantage. ***Noël J., Germain D., Oulianova N., Vadnais J., Pouysségur J.***
- Oct. 2000 :** Présentation par affiche au congrès de l'American Society of Nephrology (Toronto).

Titre : The Na⁺/H⁺ Exchanger : A study of aminoacids involved in the amiloride class inhibitor interaction. ***Germain D., Noël J.***

Juin 2001 : Présentation par affiche au colloque du Groupe de Recherche en Transport Membranaire.

Titre : Importance de l'acide glutamique en position 346 de NHE1 dans son interaction avec les inhibiteurs de type amiloride. ***Germain D., Noël J.***

Prix de la meilleure présentation.

Jan. 2002 : Présentation orale au congrès des stagiaires de recherche organisé par l'Association des Étudiants aux Grades Supérieurs de la Faculté de Médecine à Montréal.

Titre : L'échangeur Na⁺/H⁺ : Identification d'acides aminés impliqués dans la liaison des inhibiteurs. ***Germain D., Noël J.***

Mai 2002 : Présentation par affiche au colloque du Groupe de Recherche en Transport Membranaire

Titre : Delineation of the minimal region involved in the interaction of the NHE1's ninth transmembrane domain with EIPA. ***Germain D., Vadnais J., Noël J.***

Déc. 2002 : Présentation par affiche au 42ème congrès de L'American Society for Cell Biology

Titre : Defining an interaction between the TMs 4 and 9 of the human Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform I. ***Germain D., Oulianova N., Vadnais J., Noël J.***

Publications :

- 1) Glutamate 346 of human Na⁺-H⁺ exchanger NHE1 is crucial for modulating both the affinity for Na⁺ and the interaction with amiloride derivatives. **Noël J.* , Germain D.* , Vadnais J.**

Biochemistry. 2003 Dec 30;42(51):15361-8.

- 2) The side-chain and negative charge of glutamate 346 in human NHE1 modulate the access to, and the reorientation of the Na⁺ binding site.

Germain D., Berteloot A., Noël J.

En préparation

Expériences de recherche :

Novembre 1997 à Août 1998 : Stage de recherche sous la direction du Dr Albert (Dpt de Biologie Cellulaire, Univ. de Reims) dans le cadre d'un cours de Maîtrise ayant pour thème : Caractérisation des anticorps anti-chaînes légères et anti-chaînes lourdes des IgG humaines. Techniques utilisées : Western Blot, injections de souris et de lapins, extraction de sang, purification d'anticorps, titration, etc....

Septembre 1998 – Juin 1999 : Stage de recherche sous la direction du Dr Josette Noël (Dpt de Physiologie, Univ. de Montréal) dans le cadre du Diplôme d'Études Approfondies (Univ. de Nice, France).

Septembre 1999 – Novembre 2004 : Stage de recherche sous la direction du Dr Josette Noël (Dpt de Physiologie, Univ. de Montréal) dans le cadre du Doctorat de Biophysique et Physiologie Moléculaires.

Décembre 2004 – Octobre 2005 : Stage postdoctoral sous la direction du Dr Muriel Aubry (Dpt de biochimie, Univ. De Montréal)

Enseignement :

Automne 2002-Automne 2004 : Poste de démonstrateur dans le département de biochimie.

Thèmes :

- Purification et caractérisation de la β -galactosidase
- Minipréparation d'ADN et carte de restriction

Compétences :

Biologie moléculaire : Transformation de bactéries, sous clonage, préparation d'ADN, digestion enzymatique, ligation, PCR, mutagenèse, séquençage, transfection, essais transcriptionnels par essai luciférase, BRET, extinction génique par siRNA...

Biologie cellulaire : Sélection fonctionnelle de cellules transfectées, microscopie optique et à fluorescence.

Biochimie : Préparation de membranes brutes, Western Blot, quantification de protéines, mesures de cinétiques à l'aide d'isotopes radioactifs ($^{22}\text{Na}^+$).

Divers : Culture cellulaire en milieu stérile.

Informatique : Analyse des données grâce au logiciels Microcal Origin, Microsoft Excel, modélisation moléculaire par HyperChem 6.0., Traitement de texte Microsoft Word, présentations Microsoft Powerpoint, imagerie avec Adobe Photoshop 7.0, recherche d'informations via les serveurs GenBank et PubMed, divers outils logiciels d'analyse de séquences et très bonne maîtrise de l'outil Internet en général.