



**CSIC**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN, CSIC, GRANADA**  
**Departamento de Bioquímica, Biología Celular y**  
**Molecular de Plantas**

**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización funcional de transportadores**  
**KEA de Arabidopsis**

**María de las Nieves Aranda Sicilia**

**Granada, 2010**



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María de las Nieves Aranda Sicilia  
D.L.: GR 4263-2010  
ISBN: 978-84-693-6024-8



**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN  
CSIC, GRANADA**

**Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas**

**Caracterización funcional de transportadores KEA de  
Arabidopsis**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Biología, **María  
de las Nieves Aranda Sicilia** para aspirar al grado de Doctor

**Fdo. María de las Nieves Aranda Sicilia**

**VºBº Directores de la Tesis**

**Fdo. María Pilar Rodríguez Rosales**  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Científico Titular del CSIC

**Fdo. Cornelis M. Venema**  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Científico Titular del CSIC

**Fdo. Olivier Cagnac**  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Investigador Contratado JAE-Doc del CSIC

**GRANADA 2010**



El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Granada, en el seno del Grupo de Investigación Bioquímica y Biología Molecular del Estrés Abiótico en Plantas.

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos del Plan Nacional (BIO2005-00878) "Transportadores iónicos implicados en la adaptación de las plantas al estrés salino: Caracterización funcional" y (BIO 2008-01691) "Análisis funcional de antiportadores Catión/Protón de plantas"



*A mi familia*





# ÍNDICE



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	9
<b>I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....</b>	<b>25</b>
<b>1. IMPORTANCIA DEL POTASIO EN LA NUTRICIÓN VEGETAL.....</b>	<b>27</b>
1.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL POTASIO .....	27
1.1.1. Activación enzimática .....	28
1.1.2. Síntesis proteica.....	29
1.1.3. Fotosíntesis.....	29
1.1.4. Osmorregulación.....	29
1.1.5. Mantenimiento del potencial eléctrico en la membrana plasmática.....	32
1.2. SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA DE K <sup>+</sup> .....	33
<b>2. EL POTASIO EN EL SUELO: DISPONIBILIDAD PARA LAS PLANTAS .....</b>	<b>34</b>
2.1. FORMAS DEL POTASIO EN EL SUELO Y SU DINÁMICA .....	34
2.2. EL K EN SISTEMAS AGRÍCOLAS.....	35
<b>3. ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE POTASIO EN PLANTAS.....</b>	<b>36</b>
3.1. ABSORCIÓN DE K <sup>+</sup> A NIVEL DE LA RAÍZ. HATS Y LATS: MODELO DE DOBLE SISTEMA .....	37
3.2. PROTEÍNAS RESPONSABLES DEL TRANSPORTE DE K <sup>+</sup> EN PLANTAS .....	41
3.2.1. Transportadores KT/HAK/KUP.....	41
3.2.2. Transportadores HKT.....	42
3.2.3. Antiportadores catión protón: CPA .....	45
3.2.4. Canales de K <sup>+</sup> .....	53
3.2.4.1. Canales de K <sup>+</sup> tipo “Shaker”.....	53
3.2.4.2. Canales de K <sup>+</sup> TPK ( <i>tandem-pore K<sup>+</sup> channels</i> ).....	55
3.2.4.3. Canales de cationes no selectivos (NSCC) .....	56
3.2.5. Superfamilia CaCA. ....	57
3.3. MECANISMOS DE DETECCIÓN Y SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTA A DEFICIENCIA DE POTASIO.....	58
<b>4. NUTRICIÓN DE POTASIO Y SALINIDAD.....</b>	<b>63</b>
4.1. PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD EN AGRICULTURA .....	63
4.2. EFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE LAS PLANTAS.....	64
4.3. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN PLANTAS.....	67
4.3.1. Mantenimiento de la razón K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> citosólica como mecanismo clave para la tolerancia a la salinidad .....	67
4.3.2. Regulación de los transportadores de K <sup>+</sup> bajo condiciones salinas.....	68

<b>5. IDONEIDAD DEL USO DE LEVADURA COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE PLANTAS .....</b>	<b>71</b>
5.1. Conservación de transportadores de cationes alcalinos de levadura en plantas .....	72
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>77</b>
1.1. BACTERIAS.....	77
1.1.1. Cepas utilizadas .....	77
1.1.2. Cultivo bacteriano.....	77
1.1.3. Obtención de células competentes .....	78
1.1.4. Transformación de <i>E. coli</i> .....	79
1.2. LEVADURAS .....	79
1.2.1. Cepas utilizadas .....	79
1.2.2. Cultivo de levaduras .....	80
1.2.3. Transformación de levaduras .....	82
1.3. MATERIAL VEGETAL .....	83
1.3.1. Germinación de semillas y cultivo de plantas de <i>Arabidopsis</i> .....	83
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>84</b>
2.1. MÉTODOS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	84
2.1.1. Amplificación por PCR.....	84
2.1.2. Mutagénesis dirigida .....	85
2.1.3. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa.....	87
2.1.4. Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa. ....	88
2.1.5. Concentración de ADN por precipitación .....	88
2.1.6. Cuantificación del ADN o ARN .....	88
2.1.7. Aislamiento de plásmidos .....	88
2.1.8. Digestión de ADN con enzimas de restricción .....	89
2.1.9. Clonaje de fragmentos de ADN .....	89
2.1.10. Creación de vectores de expresión por recombinación entre el vector de entrada y el vector de destino .....	92
2.1.11. Secuenciación .....	93
2.2. CONSTRUCCIONES GÉNICAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS FUNCIONALES .....	94
2.2.1. Construcciones para expresión en levadura .....	94
2.2.2. Construcciones para expresión en planta .....	95

2.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS ANTIPORTADORES EN LEVADURA .....	97
2.3.1. Determinación del crecimiento por el método de goteo ( <i>Drop test</i> ).....	97
2.3.2. Determinación del contenido iónico en levadura .....	97
2.3.2.1. Contenido iónico intracelular total.....	97
2.3.2.2. Contenido iónico vacuolar y citoplasmático .....	98
2.3.3. Extracción de proteínas totales de levadura .....	99
2.3.4. Aislamiento de vacuolas .....	99
2.3.5. Aislamiento de microsomas .....	101
2.3.6. Purificación de proteínas .....	102
2.3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	103
2.3.8. Tinción de proteínas separadas por electroforesis .....	104
2.3.9. Electrotransferencia e inmunodetección .....	104
2.3.10. Reconstitución en liposomas .....	105
2.3.11. Medida de la actividad de los antiportadores .....	106
2.3.11.1 En proteoliposomas reconstituidos.....	106
2.3.11.2 En vacuolas intactas.....	110
2.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR .....	112
2.4.1. Localización subcelular en protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i> .....	112
2.4.1.1 Aislamiento de protoplastos .....	112
2.4.1.2 Transfección de protoplastos mediada por PEG .....	114
2.4.1.3 Observación al microscopio confocal de los transformantes transitorios .....	115
2.4.2. Localización subcelular en levaduras que expresan las proteínas de fusión AtKEA::GFP y AtKEA::YFP .....	115
2.4.3. Inmunodetección en fracciones de membrana de levadura .....	116
2.4.3.1 Fraccionamiento de membranas de levadura mediante centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa .....	116
2.4.3.2 Inmunodetección de la proteína AtKEA3 y las proteínas usadas como marcadores de membrana .....	116
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>119</b>
<b>1. CLONAJE Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE AtKEA .....</b>	<b>121</b>
<b>2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE ANTIPORTADORES AtKEA EN LEVADURA .....</b>	<b>126</b>
2.1. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN .....	126

2.1.1. Complementación de la sensibilidad a NaCl, KCl e higromicina en levaduras con disrupción en NHX .....	127
2.1.2. Complementación del fenotipo causado por la disrupción de Kha1p de levadura .....	131
2.1.3. Comparación de transportadores de las familias CPA1 y CPA2.....	133
2.1.4. Efecto del epítipo V5-H6 sobre la funcionalidad de las proteínas .....	137
2.2. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE AtKEA1 Y AtKEA2 EN EL CONTENIDO INTRACELULAR DE Na <sup>+</sup> Y K <sup>+</sup> EN LEVADURA .....	138
2.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> .....	140
2.3.1. Inmunodetección y purificación de proteínas KEA de Arabidopsis expresadas en levadura .....	140
2.3.2. Determinación de la actividad de proteínas KEA purificadas de levadura y reconstituidas en proteoliposomas .....	141
2.3.3. Determinación del mecanismo de transporte catalizado por AtKEA2 .....	144
2.3.4. Análisis de aminoácidos posiblemente implicados en la regulación de la actividad de AtKEA2 .....	151
2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE INTERCAMBIO CATIÓN/H <sup>+</sup> EN VACUOLAS AISLADAS DE LEVADURA QUE EXPRESA AtKEA2 DE ARABIDOPSIS .....	158
<b>3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE AtKEAs .....</b>	<b>162</b>
3.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN LEVADURAS .....	162
3.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN PROTOPLASTOS DEL MESÓFILO DE ARABIDOPSIS .....	165
3.3. INMUNODETECCIÓN DE AtKEA3 EN FRACCIONES DE MEMBRANA DE LEVADURA .....	174
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>179</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>193</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>197</b>







# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

### FIGURAS

Fig. A1. Principales funciones del K <sup>+</sup> .....	28
Fig. A2. Componentes del motor osmótico implicado en la apertura estomática .....	31
Fig. A3. Movimiento de la hoja de <i>Samanea saman</i> .....	32
Fig. A4. Ciclo del potasio en el suelo .....	35
Fig. A5. Esquema general de la cinética del influjo de K <sup>+</sup> en raíces de plantas.....	39
Fig. A6. Representación de transportadores y canales putativos de potasio en una célula de la raíz .....	40
Fig. A7. Clasificación de los transportadores CPAs.....	46
Fig. A8. Árbol filogenético de la familia de transportadores CPA2 .....	49
Fig. A9. Representación esquemática de la relación entre la detoxificación de metilglioxal y la protección mediada por KefB/KefC .....	52
Fig. A10. Mecanismo de activación para AKT1 en condiciones de bajo K <sup>+</sup> externo ...	60
Fig. A11. Modelo ilustrativo de la generación y transducción de la señal de deficiencia de K <sup>+</sup> en células vegetales .....	62
Fig. A12. Efectos adversos de la salinidad sobre la homeostasis de K <sup>+</sup> y relaciones iónicas en plantas.....	66
Fig. A13. Principales transportadores de cationes de membrana plasmática e intracelulares en <i>S. cerevisiae</i> .....	71

## MATERIAL Y MÉTODOS

### FIGURAS

Fig. M1. Método de mutagénesis dirigida según <i>Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis System</i> .....	85
Fig. M2. Clonaje utilizando la tecnología <i>Gateway</i> .....	90

Fig. M3. Mapas de los vectores pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup> y pENTR <sup>TM</sup> /SD/D-TOPO <sup>®</sup> .....	91
Fig. M4. Mapa del vector pYES-DEST52 .....	95
Fig. M5. Relación entre el peso seco de las células de levadura y la DO <sub>660</sub> .....	98
Fig. M6. Esquema de la metodología seguida para la obtención de vacuolas intactas a partir de células de levadura .....	100
Fig. M7. Esquema de la metodología seguida para la obtención de membranas microsomales a partir de células de levadura.....	101
Fig. M8. Relación entre la fluorescencia de la piranina y el pH.....	108
Fig. M9. Espectro de excitación de piranina (emisión a 511 nm) encapsulada en proteoliposomas .....	109
Fig. M10. Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia dependientes del tiempo que tienen lugar en los ensayos de transporte en vacuolas .....	111
Fig. M11. Esquema de la metodología seguida para la obtención de protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i> .....	113

## TABLAS

Tabla M1. Características de las cepas de <i>E.coli</i> utilizadas .....	77
Tabla M2. Medios utilizados para el cultivo de bacterias.....	78
Tabla M3. Características de las cepas de levadura utilizadas.....	80
Tabla M4. Composición del medio SD/SG.....	81
Tabla M5. Composición del medio SC-Ura.....	81
Tabla M6. Composición del medio APD/APG .....	81
Tabla M7. Composición del medio YPD/YPG .....	82
Tabla M8. Mezcla de transformación.....	83
Tabla M9. Mezcla de PCR .....	84
Tabla M10. Condiciones generales para la amplificación por PCR .....	84
Tabla M11. Cebadores usados en la mutagénesis de AtKEA2 .....	86

Tabla M12. Mezcla de PCR (primera etapa) .....	86
Tabla M13. Condiciones para la amplificación por PCR (primera etapa) .....	86
Tabla M14. Condiciones para la amplificación por PCR (segunda etapa) .....	87
Tabla M15. Cebadores usados en la clonación de AtKEA1, AtKEA2, AtKEA3 y AtKEA6 en pENTR/D-TOPO o pENTR/SD/D-TOPO .....	91
Tabla M16. Vectores de entrada .....	92
Tabla M17. Vectores de destino .....	93
Tabla M18. Listado de construcciones génicas utilizadas en este trabajo .....	96
Tabla M19. Soluciones utilizadas para la purificación de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad .....	102
Tabla M20. Marcadores de orgánulos usados en este trabajo y su localización subcelular .....	115
Tabla M21. Configuración común de los filtros en Zeiss LSM510 .....	115

## RESULTADOS

### FIGURAS

Fig. R1. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias aminoacídicas de los antiportadores KEA de <i>Arabidopsis</i> , KefB, KefC, Nha de <i>E. coli</i> y <i>NHA1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	122
Fig. R2. Alineamiento de las secuencias de los antiportadores AtKEA1-3 de <i>Arabidopsis</i> y KefB y KefC de <i>E. coli</i> .....	123
Fig. R3. Alineamiento de las secuencias de los antiportadores AtKEA1-6 de <i>Arabidopsis</i> .....	123
Fig. R4. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	127
Fig. R5. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	128
Fig. R6. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	129

Fig. R7. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	130
Fig. R8. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	131
Fig. R9. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	132
Fig. R10. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	133
Fig. R11. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	134
Fig. R12. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	135
Fig. R13. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	136
Fig. R14. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	136
Fig. R15. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	137
Fig. R16. Contenido de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> intracelular total en <i>S. cerevisiae</i> .....	139
Fig. R17. Tinción (A) e inmunodetección (B) de las proteínas AtKEA1 (1), AtKEA2 (2) y AtKEA3 (3) .....	141
Fig. R18. Actividad antiporte de AtKEA2 .....	143
Fig. R19. Actividad antiporte en presencia de diferentes cationes. A) AtKEA1; B) AtKEA2; C) AtKEA3; D) Liposomas (control negativo) .....	144
Fig. R20. Cálculo del flujo inicial de protones .....	146
Fig. R21. Efecto de la adición de FCCP, Valinomicina y Nigericina sobre la velocidad de alcalinización de liposomas en respuesta a un gradiente de pH y K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	147
Fig. R22. Actividad antiporte de AtKEA2 en presencia de K <sup>+</sup> , y en presencia de K <sup>+</sup> + FCCP .....	148
Fig. R23. Actividad antiporte de AtKEA2 en presencia de GSH y NADH .....	149
Fig. R24. Relación entre la fluorescencia de la piranina y el pH .....	150
Fig. R25. Actividad antiporte de AtKEA2 en presencia de K <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> + GSH, K <sup>+</sup> + NADH y K <sup>+</sup> + GSH + NADH .....	151

Fig. R26. A) Alineamiento de las secuencias pertenecientes al dominio intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de varios transportadores de la familia CPA; B) Alineamiento de las secuencias de los antiportadores KEA1-3, con la secuencia HALESDIEPFK correspondiente al bucle citoplasmático regulador en KefC .....	153
Fig. R27. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	154
Fig. R28. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	155
Fig. R29. Crecimiento de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	155
Fig. R30. A) Tinción (a) e inmunodetección (b) de las proteínas AtKEA2 D166A y AtKEA2; B) Actividad antiporte de AtKEA2 D166A y AtKEA2 en presencia de diferentes cationes .....	156
Fig. R31. A) Tinción (a) e inmunodetección (b) de las proteínas AtKEA2 E278K y AtKEA2; B) Actividad antiporte de AtKEA2 E278K y AtKEA2 en presencia de diferentes cationes .....	157
Fig. R32. Transporte catión/H <sup>+</sup> dependiente de sal a través de la membrana vacuolar (A y B) y efecto de la disrupción de Vcx1 en el transporte vacuolar de potasio (C) .....	159
Fig. R33. Localización vacuolar de Vcx1 .....	160
Fig. R34. Actividad antiporte de AtKEA2 en vacuolas aisladas .....	161
Fig. R35. Localización de AtKEA1 y AtKEA2 en levadura .....	163
Fig. R36. Localización de AtKEA1 y AtKEA2 en levadura .....	164
Fig. R37. Expresión transitoria de las proteínas de fusión AtKEA1::GFP (A) y GFP::AtKEA1 (B) en protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i> visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510 .....	166



Fig. R38. Expresión transitoria de las proteínas de fusión AtKEA2::GFP en protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i> visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510 .....	167
Fig. R39. Expresión transitoria de las proteínas de fusión AtKEA6::GFP (A) y GFP::AtKEA6 (B) en protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i> visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510 .....	168
Fig. R40. Expresión transitoria de marcadores de orgánulos fusionados a GFP en protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i> visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510 .....	169
Fig. R41. Colocalización AtKEA1::GFP y proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP (Syp22, $\gamma$ -TIP y St) .....	171
Fig. R42. Colocalización AtKEA2::GFP y proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP (Syp21, Syp22, $\gamma$ -TIP y St).....	172
Fig. R43. Colocalización AtKEA6::GFP y proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP (St, mMan1 y Syp22) .....	173
Fig. R44. Fraccionamiento subcelular de levadura transformada con una construcción para la expresión de AtKEA3.....	175
Fig. R45. Fraccionamiento subcelular de levadura transformada con una construcción para la sobreexpresión de AtKEA3 .....	176

## DISCUSIÓN

### FIGURAS

Fig. D1. Modelo propuesto del mecanismo de acumulación de cationes en la vacuola mediado por AtKEA1 y AtKEA2 expresadas en levadura .....	191
---	-----





# **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



El potasio es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que participa en una serie de funciones vitales para el metabolismo celular, el crecimiento vegetal y la adaptación a distintos estreses. Entre estas funciones se incluyen activación enzimática, síntesis proteica, funcionalidad del aparato fotosintético, neutralización de cargas negativas en proteínas y ácidos orgánicos, mantenimiento de la homeostasis del pH citoplasmático, expansión celular, desarrollo del tubo polínico, apertura y cierre de estomas, movimientos de órganos inducidos por luz y movimientos sismonásticos (Marschner, 1995; Amtmann et al., 2004; Britto y Kronzucker, 2008; Maathuis, 2009). Por todo ello, la deficiencia de potasio es uno de los factores que más afecta al rendimiento de los cultivos, provocando una reducción de la cantidad y calidad de la producción, afectando al procesado de los productos recolectados e incrementando la susceptibilidad de dichos cultivos al ataque por hongos, insectos y otros organismos patógenos, así como a daños por helada y sequía (Marschner, 1995; Amtmann et al., 2008).

El potasio es el catión más abundante en los tejidos vegetales, representando entre el 1 y 10% del peso seco de la planta (Leigh y Jones, 1984). En las células vegetales la concentración citosólica de potasio está sometida a un control homeostático muy estricto, manteniéndose entre 100 y 200 mM (Leigh y Jones, 1984). El mantenimiento de esta concentración citosólica se establece mayoritariamente a expensas del potasio vacuolar, pues las vacuolas constituyen el principal reservorio de este catión en las células vegetales. Los flujos de  $K^+$  que se producen entre el citosol y los reservorios intracelulares del catión o entre el citosol y el exterior celular dependen de la actividad de transportadores iónicos que, dada la similitud entre los iones  $K^+$  y  $Na^+$ , pueden participar en los flujos de ambos cationes. Por consiguiente, los sistemas de transporte de  $K^+$  en plantas pueden desempeñar un papel importante no sólo en la nutrición de  $K^+$  sino también en la tolerancia de las plantas a la salinidad, fenómeno asociado mayoritariamente a la presencia de elevadas concentraciones externas de NaCl.

Numerosos estudios indican que la capacidad de las plantas para mantener una alta razón  $K^+/Na^+$  citosólica es un mecanismo clave en la tolerancia a estrés salino. En consecuencia, la investigación de las bases moleculares que contribuyen a la homeostasis de  $K^+$  y  $Na^+$  permitirá identificar los transportadores y canales iónicos implicados tanto en la adecuada nutrición de  $K^+$  como en la prevención de la acumulación citosólica de  $Na^+$  que podría ser tóxico para la planta. El gran número de transportadores y canales de  $K^+$  identificados hasta el momento a nivel molecular, ha puesto de manifiesto la compleja naturaleza del transporte de  $K^+$  en plantas. Sin embargo, los papeles fisiológicos de estas proteínas en el influjo, eflujo,

compartimentación y transporte de potasio y también de Na<sup>+</sup>, han sido sólo parcialmente caracterizados (Gierth y Mäser, 2007; Lebaudy et al., 2007; Szczerba et al., 2009).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres familias de genes que codifican los transportadores de K<sup>+</sup> KT/HAK/KUP, TRK/HKT y CPA (Mäser et al., 2001), y otras tres familias más de genes que codifican canales selectivos de K<sup>+</sup>, de los tipos *Shaker*, TPK (*tandem-pore*) y Kir (*inward-rectifying*) (Lebaudy et al., 2007). La familia de antiportadores CPA se divide a su vez en dos subfamilias, CPA1 y CPA2. La mayoría de los transportadores bien caracterizados de esta familia pertenecen a la subfamilia CPA1 e inicialmente fueron descritos como antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> intracelulares y de membrana plasmática (Brett et al., 2005). La familia CPA2 incluye seis genes KEA (*K<sup>+</sup> Exchange Antiporters*) de función desconocida. Estos genes se han identificado mediante homología de secuencias con antiportadores K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> bacterianos, y constituyen la familia de transportadores de plantas menos estudiada (Mäser et al., 2001).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la **caracterización funcional de antiportadores KEA de *Arabidopsis***. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. **Análisis de las secuencias de AtKEA.** Se ha llevado a cabo el análisis topológico y el alineamiento con las secuencias de otras proteínas de la familia CPA2 con el fin de determinar sus homologías y relaciones filogenéticas, y así, por analogía a la función descrita para proteínas cercanas filogenéticamente, establecer una aproximación de sus posibles funciones.
2. **Caracterización funcional de antiportadores de AtKEA mediante expresión heteróloga en levadura.** Para examinar la función de los genes KEA de *Arabidopsis*, hemos estudiado si estos transportadores complementan los fenotipos causados por la disrupción de Nhx1p y Kha1p en levadura. Este estudio nos permite además comparar la función de las proteínas KEA con la de otros antiportadores pertenecientes a las familias CPA1 y CPA2. También hemos investigado si la expresión de estos transportadores en levadura tiene algún efecto en el contenido iónico, analizando para ello los contenidos intracelulares de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.
3. **Caracterización funcional de las proteínas AtKEA *in vitro*.** Se han desarrollado ensayos funcionales con el objetivo de determinar la actividad de intercambio

iónico de estas proteínas. Para ello se utilizaron proteínas purificadas y reconstituidas en liposomas, con el fin de evitar las interferencias causadas por otros transportadores presentes en las membranas nativas. En el caso concreto de AtKEA2, también se ha determinado la actividad de intercambio catión/H<sup>+</sup> en vacuolas aisladas de levadura que expresan este antiportador, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en las medidas de actividad en proteoliposomas.

4. **Análisis de aminoácidos posiblemente implicados en la regulación de la actividad de AtKEA2.** Mediante mutagénesis dirigida se han obtenido dos proteínas mutantes. Los aminoácidos diana de la mutagénesis fueron un aspartato identificado como sitio de unión al Na<sup>+</sup>, universalmente conservado en todos los antiportadores de las familias CPA1 y CPA2; y un glutamato perteneciente al bucle citoplasmático regulador de la proteína KefC de *E. coli*, crítico en su funcionamiento y conservado en los transportadores KefC, KefB y AtKEA1-3. Las proteínas mutadas también se han caracterizado mediante ensayos de complementación en levadura y determinación de la actividad tras ser purificadas y reconstituidas en proteoliposomas.
5. **Localización subcelular de AtKEAs** mediante microscopía confocal, utilizando proteínas de fusión de los antiportadores con la proteína GFP expresadas transitoriamente en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis*, y mediante microscopía de fluorescencia en levaduras que expresan la proteína de fusión con GFP y eYFP. En el caso concreto de AtKEA3 se ha llevado a cabo una aproximación de su localización mediante inmunodetección en fracciones de membrana de levadura que expresan la proteína de fusión AtKEA3 con el epítipo V5-6xHis. El objetivo de los estudios de localización subcelular fue profundizar en el papel que juegan estos antiportadores en la homeostasis iónica y frente al estrés salino, comparando su localización con la de otras proteínas de la familia CPA de función conocida.





## **II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS**



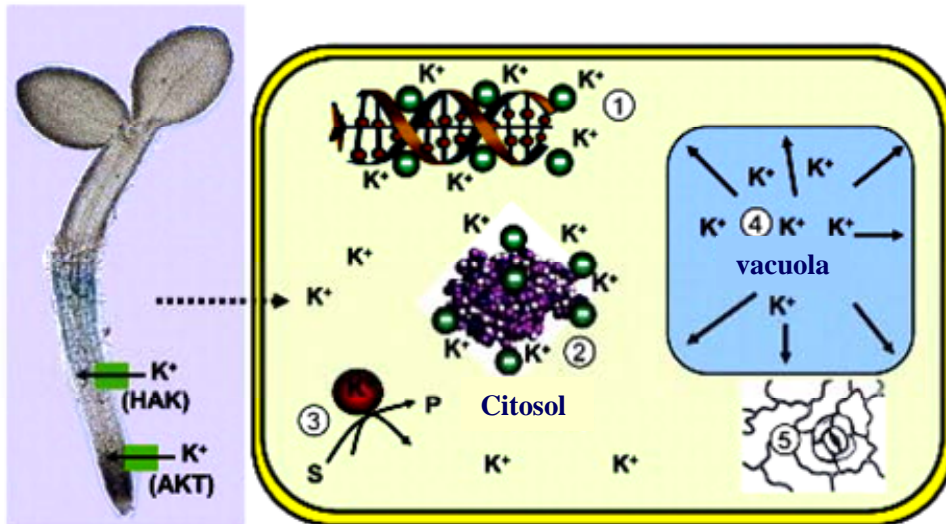
## 1. IMPORTANCIA DEL POTASIO EN LA NUTRICIÓN VEGETAL

### 1.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL POTASIO

El potasio es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de la planta pues es el catión más abundante en los tejidos vegetales, representando entre el 1 y el 10% del peso seco de la planta (Leigh y Jones, 1984).

En las células vegetales la concentración citosólica de potasio está sometida a un control homeostático muy estricto, manteniéndose en valores entre 100 y 200 mM (Leigh y Jones, 1984). Por el contrario, la concentración de potasio en los compartimentos subcelulares es altamente variable y refleja el estado de la planta respecto a este macronutriente. El *pool* de potasio vacuolar es muy dinámico, ganando y perdiendo potasio en función de los requerimientos de la célula para mantener la homeostasis en el citosol. La concentración vacuolar de potasio oscila entre 10 y 200 mM, alcanzándose concentraciones de hasta 500 mM en las células guarda de los estomas. En el apoplasto las concentraciones de potasio son normalmente bajas, a excepción de células o tejidos especializados, como estomas y pulvínulos, donde se puede alcanzar una concentración de 100 mM de manera transitoria. (Leigh y Jones, 1984; Marschner, 1995; Ashley et al., 2006).

El potasio participa en una serie de procesos bioquímicos y biofísicos muy importantes para la planta, llevando a cabo funciones vitales en el metabolismo celular, en el crecimiento vegetal y en la adaptación a estreses. Estas funciones se pueden clasificar en dos tipos: aquellas basadas en el mantenimiento de una concentración estable de potasio (en torno a 100 mM) en compartimentos metabólicamente activos, tales como citoplasma, núcleo, estroma de cloroplastos y matriz de mitocondrias; y aquellas basadas en la alta movilidad del potasio en la planta a todos los niveles (celular, tisular y transporte a larga distancia a través del xilema y el floema) (Marschner, 1995). La primera clase de funciones incluye activación enzimática, síntesis proteica, mantenimiento del aparato fotosintético, neutralización de cargas negativas en proteínas y ácidos orgánicos, y mantenimiento de la homeostasis del pH citoplasmático. La segunda clase de funciones comprende fenómenos relacionados con la osmorregulación y mantenimiento del potencial de membrana, tales como expansión celular, desarrollo del tubo polínico, crecimiento vegetal, apertura y cierre de estomas, movimientos de órganos inducidos por luz y movimientos sismonásticos (Marschner, 1995; Amtmann et al., 2004; Britto y Kronzucker, 2008; Maathuis, 2009) (Fig. A1).



**Fig. A1. Principales funciones del K<sup>+</sup>.** La toma de potasio se lleva a cabo a través de un simporte con H<sup>+</sup> mediado por transportadores de alta afinidad (HAK) y canales iónicos de baja afinidad (AKT). Dentro de la planta, las propiedades caotrópicas del K<sup>+</sup> lo convierten en un contraión ideal para contrarrestar cargas negativas en los ácidos nucleicos (1) y proteínas (2). Además, el K<sup>+</sup> activa enzimas específicas (3) actuando como un cofactor en reacciones enzimáticas que convierten el sustrato (S) en producto (P). El K<sup>+</sup> es el principal catión en la vacuola (4), donde genera la turgencia necesaria para mantener la estructura y facilitar la expansión celular, el crecimiento de la planta y la regulación de la apertura estomática (5) (Maathuis, 2009).

### 1.1.1. Activación enzimática

La actividad de un gran número de enzimas depende completamente del K<sup>+</sup>, ó es estimulada por este catión. El K<sup>+</sup> se une a las enzimas e induce en ellas cambios conformacionales que incrementan la velocidad de las reacciones catalíticas ( $V_{max}$ ), y en algunos casos la afinidad por el sustrato ( $K_m$ ). Esta unión es muy selectiva para el K<sup>+</sup> que no puede ser sustituido por otros iones similares como el Na<sup>+</sup> ó el Li<sup>+</sup> (Suelter, 1970; Marschner, 1995).

En plantas deficientes en potasio se producen una serie de alteraciones metabólicas que incluyen la acumulación de carbohidratos de bajo peso molecular y compuestos nitrogenados solubles y la disminución en el contenido de almidón. Esto es debido a que muchas de las enzimas reguladas por el K<sup>+</sup> están implicadas en el metabolismo de carbohidratos (como piruvato quinasa, fosfofructoquinasa, ADP-glucosa sintasa y almidón sintasa) y en el metabolismo del nitrógeno (nitrato

reductasa). Otras enzimas activadas por  $K^+$  son varias isoformas de pirofosfatasa y  $H^+$ -ATPasas (Marschner, 1995).

### **1.1.2. Síntesis proteica**

El potasio desempeña un papel esencial en la síntesis de numerosas proteínas, entre ellas, la ribulosa bifosfato carboxilasa (rubisco), y la nitrato reductasa, enzimas claves en el metabolismo de la planta. Esto se pone de manifiesto en plantas deficientes en  $K^+$ , en las que se observa una acumulación de aminoácidos, amidas y nitrato. Es probable que el  $K^+$  esté implicado en varios pasos de la traducción proteica, incluyendo la unión del ARN de transferencia al ribosoma, y también en la regulación transcripcional y post-transcripcional de algunas enzimas (Marschner, 1995; Blaha et al., 2000).

### **1.1.3. Fotosíntesis**

En plantas superiores, el potasio afecta a la fotosíntesis a varios niveles. El potasio es un contraión esencial del flujo de protones a través de la membrana de los tilacoides, por lo que es necesario para el establecimiento del gradiente de pH que impulsa la síntesis de ATP a través de la fotofosforilación (Tester y Blatt, 1989). Además, es requerido para la actividad ribulosa bifosfato carboxilasa y para la fijación de  $CO_2$  en el cloroplasto. Su papel en la fijación de  $CO_2$  se ha puesto de manifiesto en cloroplastos aislados, en los que un aumento de la concentración externa de  $K^+$  hasta 100 mM (concentración de  $K^+$  en el citosol de células intactas) incrementa la fijación de  $CO_2$  más de tres veces (Marschner, 1995). Además, distintos estudios han demostrado que la deficiencia de potasio reduce la actividad fotosintética y la translocación del carbono fijado. Este descenso de la actividad fotosintética está asociado a la reducción del contenido de clorofila y a la desorganización de la estructura de los cloroplastos (Marschner, 1995; Zhao et al., 2001; Szczerba et al., 2009)

### **1.1.4. Osmorregulación**

El potasio es el principal soluto inorgánico osmóticamente activo en la vacuola, y su acumulación es responsable de la creación del potencial osmótico y de la turgencia celular (Marschner, 1995; Amtmann et al., 2004; Britto y Kronzucker, 2008). Debido a su alta movilidad provoca cambios en la presión osmótica y en la turgencia, responsables de fenómenos tales como expansión celular, crecimiento vegetal, desarrollo del tubo polínico, apertura y cierre de estomas, movimientos

inducidos por luz y movimientos sismonásticos (Britto y Kronzucker, 2008). Además, el potasio es el principal responsable del mantenimiento de un potencial osmótico alto en la estela de las raíces, necesario para el transporte de solutos impulsado por presión en el xilema, y para el balance de agua en la planta (Marschner, 1995).

### ***Expansión celular:***

La expansión celular se define como el aumento del volumen celular provocado por el aumento del volumen vacuolar y el consiguiente incremento de la superficie de la célula (Dolan y Davies, 2004).

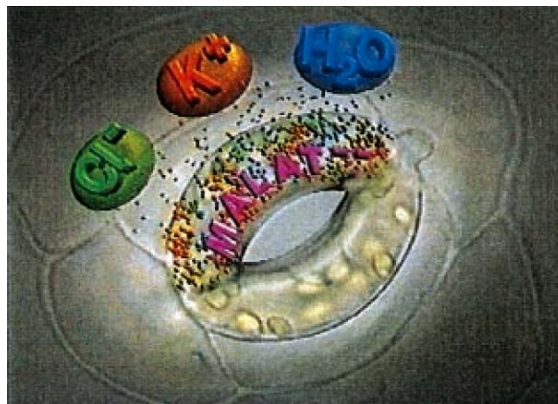
La expansión celular implica no sólo la formación de una gran vacuola central que ocupa el 80-90% del volumen celular, sino también un incremento en la extensibilidad de la pared celular y una acumulación de solutos, necesaria para la creación del potencial osmótico interno (Marschner, 1995). Para que este fenómeno ocurra de una forma rápida, los osmolitos implicados tienen que presentar una alta movilidad. Por ello, el  $K^+$  (junto con un anión) es el principal soluto que interviene en la expansión celular, pudiendo ser sustituido por un reducido número de iones inorgánicos (entre ellos  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ) (Amtmann et al., 2004; Dolan y Davies, 2004). Una vez que el crecimiento celular se detiene, el mantenimiento del potencial osmótico puede llevarse a cabo por solutos menos móviles como azúcares. En este caso el potasio puede almacenarse en la vacuola, dando lugar a un *pool* vacuolar que, si es preciso, podría ser movilizado para mantener la homeostasis del  $K^+$  citosólico (Marschner, 1995).

### ***Movimientos de los estomas:***

En la mayoría de las especies vegetales, el  $K^+$ , asociado con un anión, es el principal responsable de los cambios de turgencia en las células guarda durante el movimiento de los estomas. Un aumento en la concentración de  $K^+$  en estas células incrementa su potencial osmótico provocando la entrada de agua procedente de células adyacentes, el incremento de la turgencia y la apertura de los estomas. Por otro lado, el cierre de los estomas en oscuridad, o inducido por ácido abscísico (ABA) está relacionado con la salida de  $K^+$  y la correspondiente disminución de la presión osmótica de las células guarda (Marschner, 1995). La entrada de  $K^+$  inducida por la luz en las células guarda es impulsada por una  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática. Por tanto, la apertura de los estomas está precedida por una disminución del pH en el apoplasto de las células guarda (Edwards et al., 1988). La acumulación de  $K^+$  en las vacuolas está acompañada por la entrada de un contraión, principalmente  $Cl^-$  o malato<sup>2-</sup>, dependiendo de la especie vegetal y de la disponibilidad de  $Cl^-$  en las inmediaciones de las células guarda. La toma de  $K^+$  tiene

lugar principalmente a través de canales altamente selectivos, mientras que los iones  $\text{Cl}^-$  entran al citoplasma a través de un simporte  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  y el malato<sup>2-</sup> procede de la ruta de degradación del almidón (Dietrich et al., 2001) (Fig. A2).

Dependiendo de las condiciones de crecimiento de la planta y del momento del día, el movimiento estomático puede estar dirigido por otros solutos osmóticamente activos como los azúcares (Tallman y Zeiger, 1988). En condiciones de deficiencia de potasio, los azúcares contribuyen en gran medida a la osmorregulación en las células guarda (Poffenroth et al., 1992). Sin embargo, la producción de azúcar en estas células no es suficiente para cubrir los requerimientos de una apertura estomática rápida. Por tanto, tiene lugar una respuesta lenta de las células guarda cargadas de azúcar, que resulta en una incompleta apertura y cierre de los estomas en plantas deficientes en potasio (Reckmann et al., 1990).



**Fig. A2. Componentes del motor osmótico implicado en la apertura estomática.** Los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  entran en el citoplasma de las células guarda, las cuales además acumulan aniones orgánicos procedentes de la síntesis de malato<sup>2-</sup>. Este incremento en el contenido iónico en las células guarda provoca la entrada de agua siguiendo el gradiente osmótico, lo que eventualmente determina la apertura estomática (Dietrich et al., 2001)

#### ***Movimientos impulsados por luz y movimientos sismonásticos***

En muchas plantas, principalmente de la familia *Leguminosae*, las hojas sufren una reorientación en respuesta a señales luminosas direccionales (como orientación de las láminas foliares hacia la fuente de luz) y no direccionales (ritmos circadianos, por ejemplo el plegamiento de las láminas foliares en la oscuridad y desplegamiento en presencia de luz). Estos movimientos son llevados a cabo por órganos especializados denominados órganos motores o pulvínulos, en los que se producen cambios reversibles en la turgencia que provocan expansiones y



contracciones de células situadas en regiones opuestas (extensoras y flexoras) a dichos órganos. Como se ha mencionado anteriormente, los principales solutos implicados en la osmorregulación y cambio de volumen son  $K^+$ ,  $Cl^-$  y malato<sup>2-</sup>, y por tanto, también son los implicados en el movimiento de las hojas y folíolos (Satter et al., 1988; Marschner, 1995; Moran, 2007) (Fig. A3)

El movimiento de hojas y otras partes de la planta en respuesta a estímulos mecánicos se establece por mecanismos similares al descrito para la respuesta a señales luminosas. En respuesta a tales señales sismonásticas (contacto, agitación, vibración, calentamiento, etc.), en *Mimosa pudica*, los folíolos de las hojas compuestas se pliegan en pocos segundos y se vuelven a abrir transcurridos 30 minutos (Campbell y Thomson, 1977).



**Fig. A3. Movimiento de la hoja de *Samanea saman*.** Fotografía de la misma hoja tomada al mediodía (hoja expandida) y por la noche (hoja plegada). Los círculos marcan las posiciones recta y curvada de la pareja de pulvínulos terminal secundaria (Moran, 2007).

### 1.1.5. Mantenimiento del potencial eléctrico en la membrana plasmática

El transporte de potasio es un componente clave en la regulación homeostática de la diferencia de potencial eléctrico de la membrana plasmática en células vegetales (Cheeseman y Hanson, 1979). La concentración externa de  $K^+$  provoca cambios en el potencial eléctrico de las membranas celulares debido a su transporte pasivo mediado por canales. La dirección de este transporte es determinada por el potencial de difusión del  $K^+$  (Cheeseman y Hanson, 1979; Maathuis y Sanders, 1993). Por tanto, al aumentar la concentración externa de  $K^+$  se produce una entrada de este catión a la célula que provoca una rápida despolarización de la membrana, mientras que al disminuir la concentración externa de  $K^+$ , tiene lugar una salida del mismo de la célula que causa la hiperpolarización

de la membrana (Britto y Kronzucker, 2008 y sus referencias). Por otro lado, el transporte de potasio a través de canales regulados por voltaje rectifica alteraciones del potencial eléctrico de las membranas provocadas por otras causas. Así, los canales de eflujo de potasio *outward-rectifying* se abren cuando se despolariza la membrana causando una repolarización. De manera similar la entrada de K<sup>+</sup> a través de canales *inward-rectifying* contrarresta la hiperpolarización de la membrana (Lebaudy et al., 2007).

## 1.2. SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA DE K<sup>+</sup>

Un contenido de potasio inferior a 10g/Kg de peso seco provoca síntomas de deficiencia en la mayoría de las especies vegetales. Algunos de los trastornos ocasionados por la deficiencia de potasio son: extensión celular limitada, reducción de la fotosíntesis, alteración en la regulación de la transpiración, disminución de la translocación de los azúcares a la raíz y acumulación de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (Marschner, 1995; Gierth y Mäser, 2007). Debido a la gran cantidad de funciones esenciales que desempeña este catión en el crecimiento vegetal y el metabolismo (ver apartado 1.1), las plantas deficientes en potasio muestran un fenotipo que se caracteriza por un crecimiento reducido, especialmente de las partes aéreas y de las raíces laterales. Los síntomas visibles de la deficiencia comienzan con el amarillamiento y clorosis de las áreas intervenales de las hojas más viejas, que se vuelven necróticas con la progresión de la deficiencia, y bajo condiciones severas tiene lugar la muerte de meristemos laterales y terminales (Marschner, 1995; Amtmann et al., 2004). Por tanto, la deficiencia de potasio es uno de los factores más importantes que afectan al rendimiento de los cultivos, provocando una reducción de la cantidad y calidad de la producción, y afectando al procesado de los productos recolectados (Marschner, 1995), ya que el potasio es importante para mantener la firmeza y textura del fruto, así como el contenido de azúcar de tubérculos y de otros órganos de almacenamiento.

Las plantas deficientes en potasio presentan una mayor susceptibilidad al ataque por hongos, insectos y otros organismos patógenos. Esto es debido a que se produce una alteración de la síntesis de compuestos de alto peso molecular (proteínas, almidón y celulosa), acumulándose compuestos de bajo peso molecular como azúcares solubles, ácidos orgánicos, aminoácidos y nitrato, lo que crea un ambiente beneficioso para el desarrollo y la alimentación de patógenos e insectos (Marschner, 1995; Amtmann et al., 2008). Estas plantas también son más susceptibles a los daños por helada y sequía, lo cual a nivel celular se relaciona con la deficiencia de agua (Marschner, 1995).

## 2. EL POTASIO EN EL SUELO: DISPONIBILIDAD PARA LAS PLANTAS

### 2.1. FORMAS DEL POTASIO EN EL SUELO Y SU DINÁMICA

El  $K^+$  representa aproximadamente el 2,6% de la corteza terrestre. La concentración de potasio en el suelo se sitúa entre 0,1 y 1 mM. La mayor parte de este potasio está deshidratado y coordinado con átomos de oxígeno, y no es disponible para las plantas (Maathuis, 2009).

En función de su disponibilidad para la planta el K del suelo se clasifica en 4 *pools* diferentes: 1) K soluble, el que se encuentra en la solución del suelo, pudiendo ser absorbido por las plantas de forma inmediata; 2) K intercambiable, la forma iónica del potasio ( $K^+$ ) unido electrostáticamente a los materiales que componen la fase sólida coloidal mineral y orgánica, es intercambiable por otros cationes; 3) K fijado no intercambiable, localizado en los espacios interlaminares de los minerales de arcilla, especialmente del tipo 2:1:1; 4) K estructural, es la fracción que se encuentra formando parte de los minerales, constituyendo un 90-99% del K total (Rengel y Damon, 2008).

Las plantas toman el K exclusivamente del *pool* de K soluble del suelo, que está en equilibrio dinámico con los *pools* intercambiable y, en menor medida, con el no intercambiable. A medida que la cantidad de potasio en solución disminuye, el potasio adsorbido se libera rápidamente de los sitios de cambio en la superficie de minerales de arcillas y materia orgánica. A su vez, si la concentración de K de la solución del suelo aumenta por la aplicación de fertilizantes potásicos, parte de éste dejará la solución y se unirá electrostáticamente al material coloidal de la fase sólida (Steingrobe y Claassen, 2000). El potasio no intercambiable puede liberarse a la solución del suelo, pero es un proceso muy lento y sobre todo importante en la reposición de los *pools* de potasio soluble e intercambiable a largo plazo, es decir, regulando el abastecimiento de K disponible del sistema en períodos de alta demanda (Pal et al., 2001a, 2001b). La liberación del K estructural a la solución del suelo se produce únicamente por la meteorización de arcillas, por tanto, es un proceso extremadamente lento (Pal et al., 2001b).

La figura A4 muestra las formas más importantes en que está presente el potasio en el suelo, y los distintos procesos de ganancias y pérdidas que las relacionan.

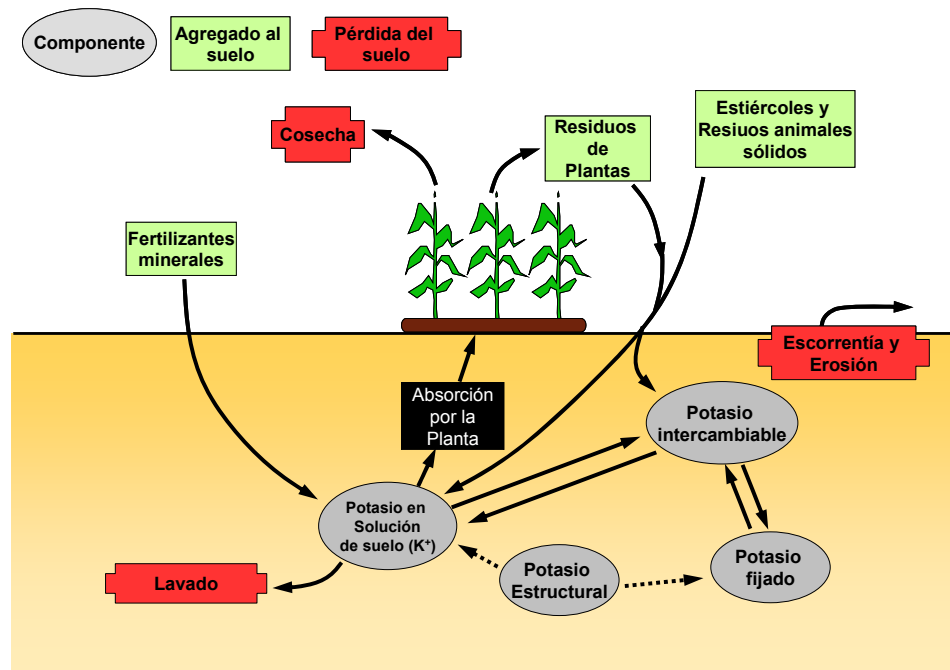


Fig. A4. Ciclo del potasio en el suelo.

Modificado de <http://www.authorstream.com/Presentation/dantescience-263720-nutrient-cycles-ecology-snc-1d1-atoms-cycle-organic-compounds-education-ppt-powerpoint/>.

## 2.2. EL K EN SISTEMAS AGRÍCOLAS

Debido al crecimiento de la población mundial y la expansión de la agricultura, el consumo global de K ha aumentado con una tasa media del 4,4% por año en el período comprendido entre 1999 y 2005 (IFA 2005 <http://www.fertilizer.org/ifa/statistics.asp>) y se prevé un incremento en el consumo del 12% para el año 2010 (Rengel y Damon, 2008 y sus referencias).

A pesar de que las reservas globales de K son suficientes para cientos, o incluso miles de años de agricultura, en algunas áreas cultivadas de manera intensiva, los suelos son deficientes en potasio. Esto ocurre en 3/4 partes de los campos de arroz de China, y 2/3 partes de los campos de trigo del Sudeste de Australia (Dobermann et al., 1998; Pal et al., 2001b; Yang et al., 2004; Rengel y Damon, 2008), en los que la carencia de K<sup>+</sup> es debida fundamentalmente a las pérdidas ocasionadas por lixiviación en los suelos arenosos (Kayser e Isselstein, 2005) y por la retirada durante la cosecha de la mayor parte de la masa aérea de los cultivos (Pal et al., 2001b). Este hecho amenaza con disminuir la disponibilidad de K y su uso eficiente por parte de las plantas y, por tanto, el rendimiento de los

cultivos. Otros estreses medioambientales como la toxicidad por metales pesados, salinidad y sequía también afectan negativamente la toma y transporte de K en la planta (Amtmann et al., 2006; Shabala y Cuin, 2008; Szczerba et al., 2009).

Los efectos negativos en la disponibilidad de potasio pueden disminuir mediante el suministro de fertilizantes potásicos (Cakmak, 2005). El potasio constituye, junto con nitrato y fosfato, uno de los principales componentes de fertilización mineral de rutina. A nivel mundial, se aplican más de 25 TM de fertilizante potásico al año a las tierras de cultivo (Minerals Mining and Sustainable Development 2002: [http://www.iied.org/mmsd/mmsd/pdfs/065\\_ifa.pdf](http://www.iied.org/mmsd/mmsd/pdfs/065_ifa.pdf)), que es adicionado a los suelos en forma de sales solubles (como yoduro potásico, sulfato potásico, nitrato potásico y sulfato potásico magnésico). La consecuencia de esta utilización masiva de fertilizantes es la acumulación de una gran cantidad de nutrientes inorgánicos en los suelos de cultivo, lo que puede alterar los ciclos biogeoquímicos normales de los nutrientes, además de provocar una progresiva contaminación y salinización del suelo y las aguas (Kayser e Isselstein, 2005; Drinkwater y Snapp, 2007). En este sentido, no cabe duda de que la investigación de los mecanismos moleculares implicados en la absorción y transporte de nutrientes (entre ellos el  $K^+$ ) por las plantas permitirá mejorar la calidad y productividad de los cultivos, reduciendo el uso de fertilizantes y la salinización de suelos y agua que ello conlleva.

### 3. ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE POTASIO EN PLANTAS

La alta demanda de potasio por parte de las plantas necesita ser mantenida mediante una toma efectiva desde la solución del suelo por las raíces y mediante su translocación a las partes aéreas. Además, el potasio necesita ser distribuido dentro de las células en distintos compartimentos, para mantener sus concentraciones adecuadas. La absorción de  $K^+$  del suelo y su distribución en la planta requiere la presencia de proteínas transportadoras en las membranas. El transporte puede ser mediado por canales, que utilizan el potencial de membrana para facilitar el flujo de iones a favor de su gradiente electroquímico, o por transportadores secundarios, que operan acoplados a bombas de  $H^+$  también localizadas en las membranas. Un gran número de estos transportadores ha sido identificado a nivel molecular, demostrando la compleja naturaleza del transporte de  $K^+$ . Los papeles fisiológicos de estas proteínas en el influjo, eflujo, compartimentación y transporte de potasio en la planta han sido sólo parcialmente caracterizados (Gierth y Mäser, 2007; Lebaudy et al., 2007; Szczerba et al., 2009).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado genes que codifican canales y transportadores de  $K^+$ , los cuales se clasifican en 3 familias principales de

transportadores (Mäser et al., 2001; Lebaudy et al., 2007), y tres familias principales de canales selectivos de  $K^+$ , de los que se hablará más adelante.

### 3.1. ABSORCIÓN DE $K^+$ A NIVEL DE LA RAÍZ. HATS Y LATS: MODELO DE DOBLE SISTEMA

Como para la mayoría de los nutrientes minerales, la adquisición primaria de  $K^+$  del medio externo sigue un patrón bifásico, descrito como la suma de dos mecanismos de toma en la membrana plasmática, diferenciados en términos de saturación, capacidad de flujo, sensibilidad diferencial a tratamientos fisicoquímicos y mecanismo de transporte (Epstein y Bloom, 2005; Gierth y Mäser, 2007; Lebaudy et al., 2007; Britto y Kronzucker, 2008)

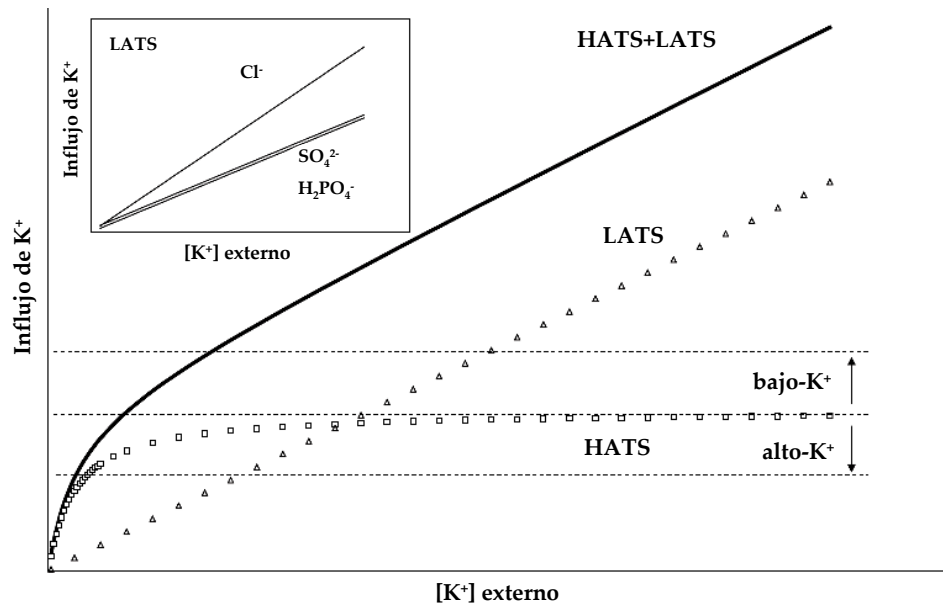
Los estudios pioneros en transporte de potasio en las raíces de las plantas llevados a cabo por Epstein y colaboradores hace más de 40 años establecieron que, en condiciones de baja concentración de  $K^+$  externo (por debajo de 1 mM), la toma de  $K^+$  sigue una cinética de Michaelis-Menten (Epstein et al., 1963; Epstein, 1966). A este tipo de transporte se le llamó "Mecanismo 1", y, posteriormente, sistema de transporte de alta afinidad (HATS, *High Affinity Transport System*) para potasio. Además, estos autores observaron que a concentraciones externas por encima de 1 mM, el transporte de  $K^+$  seguía una cinética distinta, que presenta poca o ninguna saturación. Este componente lineal del transporte de  $K^+$  se denominó inicialmente "Mecanismo 2" y, más tarde, sistema de transporte de baja afinidad (LATS, *Low Affinity Transport System*) (Fig. A5).

Los sistemas HATS y LATS se diferencian en el mecanismo por el que se produce el transporte a través de la membrana plasmática y en su regulación. En el caso de HATS, el  $K^+$  entra vía simporte con un  $H^+$  (con una estequiometría propuesta 1:1) (Kochian et al., 1989; Maathuis y Sanders, 1994; Maathuis et al., 1997), en un proceso dependiente de energía que implica la fuerza protón motriz transmembrana. El gradiente de protones y el eléctrico es mantenido por la protón ATPasa de la membrana plasmática que hidroliza ATP y bombea protones desde el citosol al medio externo (Cheeseman y Hanson, 1980; Cheeseman et al., 1980; Kochian et al., 1989; Maathuis y Sanders, 1994; Palmgren, 2001; Pardo et al., 2006). Los HATS se regulan por la limitación del sustrato que se une al transportador y por retroalimentación sobre la transcripción génica (Gierth et al., 2005). En el caso de LATS, el  $K^+$  es transportado a través de canales (tanto canales específicos de  $K^+$  como canales no selectivos), cuya actividad depende del gradiente de potencial electroquímico del potasio. Los canales están regulados por una gran variedad de factores: potencial de membrana, pH, nucleótidos cíclicos, activación luminosa y dependiente de  $CO_2$ , especies de oxígeno reactivo y el propio  $K^+$  (Britto y

Kronzucker, 2008 y sus referencias). Por tanto, se puede establecer que la adquisición de potasio a bajas concentraciones externas es un proceso demandante de energía, mientras que a altas concentraciones es energéticamente pasivo.

Otra distinción entre HATS y LATS es su regulación en función del contenido de potasio en la planta. Se ha demostrado que el influjo de potasio mediado por HATS está inversamente relacionado con el contenido de  $K^+$  en los tejidos vegetales, es decir, se regula negativamente en condiciones de suficiencia de  $K^+$  y positivamente en condiciones de ayuno de  $K^+$  (Glass y Dunlop, 1978; Kochian y Lucas, 1982). Por el contrario, el influjo en el rango de LATS parece ser insensible al estado de  $K^+$  en la planta (Kochian y Lucas, 1982), aunque esta afirmación puede no ser exacta debido a los errores que se pueden cometer en las estimaciones en este rango de transporte (Szczërba et al., 2006) (Fig. A5).

Otra notable diferencia entre estos dos sistemas de transporte, es cómo afecta la presencia de otros iones a la toma de  $K^+$ . En este sentido, el transporte HATS es muy sensible a iones competidores o tóxicos como  $NH_4^+$  y  $Na^+$ , mientras que el transporte LATS parece insensible a su presencia (Britto y Kronzucker, 2008 y sus referencias; Szczërba et al., 2009 y sus referencias). En el caso de HATS se ha demostrado que el suministro de  $NH_4^+$  reduce enormemente el influjo de  $K^+$ , lo que puede deberse a una competición directa entre ambos iones (Szczërba et al., 2009 y sus referencias). Sin embargo la interacción entre el  $K^+$  y el  $Na^+$  no está tan clara. Maathuis y colaboradores (1996) observaron en una gran variedad de plantas terrestres (incluida *Arabidopsis*) que la adición de  $Na^+$  no tenía ningún efecto en la absorción de  $K^+$  en el rango HATS. Por el contrario, Spalding y colaboradores (1999) demostraron que en raíces de *Arabidopsis* la toma de  $K^+$  no mediada por canales a una concentración externa de  $K^+$  de 10  $\mu M$ , era estimulada por  $Na^+$ . El trabajo de Kronzucker y colaboradores (2006) en raíces de cebada puso de manifiesto que el  $Na^+$  suprime el influjo de  $K^+$  a una concentración de  $K^+$  externo de 0,1 a 1,5 mM, no existiendo un efecto recíproco del  $K^+$  en el influjo de  $Na^+$ , al contrario de lo observado por Rains y Epstein (1967). Otro aspecto diferencial entre HATS y LATS respecto a la interacción iónica, es el efecto del anión acompañante en el transporte de  $K^+$ . Epstein y colaboradores (1963) demostraron que el influjo de  $K^+(Rb^+)$  en el rango LATS era mucho mayor con  $RbCl$  que con  $RbSO_4$ . Kochian y colaboradores (1985) observaron que la velocidad del transporte de  $K^+$  en el rango LATS era un 60% mayor cuando el contraión era  $Cl^-$  que cuando se trataba de  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$  o  $H_2PO_4^-$  (Fig. A5, panel superior). En ningún estudio se pudo detectar un efecto del contraión en el rango HATS.



**Fig. A5. Esquema general de la cinética del influjo de  $K^+$  en raíces de plantas.**

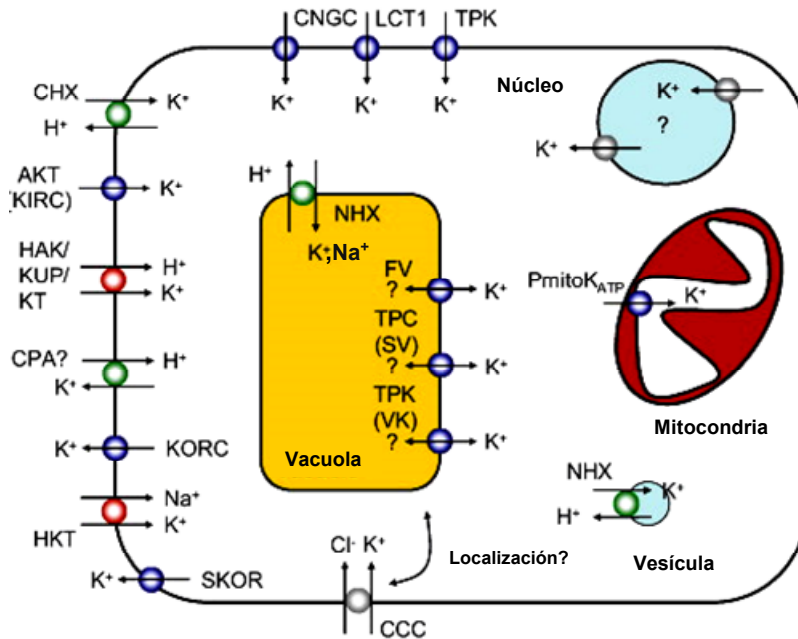
Se indican las curvas de HATS (cuadrados abiertos) y LATS (triángulos abiertos), y el flujo combinado de ambos (línea continua). Las flechas y las líneas punteadas indican regulación positiva y negativa de HATS en respuesta al estado de  $K^+$  de la planta. Inserto: Efecto de los aniones acompañantes en el influjo de  $K^+$  de baja afinidad. Tomado de Britto y Kronzucker (2008).

A pesar de la clara distinción entre HATS y LATS, varios estudios han demostrado que algunos transportadores pueden presentar ambos tipos de actividad (de alta y de baja afinidad) (Britto y Kronzucker, 2008). Esta afinidad dual también se ha demostrado para transportadores de nitrato y fosfato (Liu et al., 1999; Shin et al., 2004). En el caso del  $K^+$ , al menos tres transportadores de *A. thaliana* parecen tener esta afinidad dual (o de muy amplio espectro): AtKUP1, AKT1 y KAT1. El transportador AtKUP1 expresado en células de levadura, presenta dos constantes de saturación  $K_M$ : una en el rango de 22-44  $\mu\text{M}$  y otra en torno a 11 mM de  $K^+$  externo (Fu y Luan, 1998). Es probable que este cambio en la afinidad implique fosforilación de la proteína, como se ha demostrado en el caso del transportador de nitrato CHL1 (Liu y Tsay, 2003). El canal AKT1 presenta una afinidad dual (o de amplio espectro) ya que permite el crecimiento de *A. thaliana* bajo condiciones en las que el transporte de alta afinidad de  $K^+$  es bloqueado por  $\text{NH}_4^+$  (Hirsch et al., 1998; Spalding et al., 1999). Un estudio llevado a cabo por Li y colaboradores (2006) pone de manifiesto que AKT1 es regulado positivamente en condiciones de baja concentración externa de  $K^+$  a través de un evento de fosforilación dependiente de calcio, lo que demuestra su papel en el influjo de  $K^+$  de



alta afinidad. El canal KAT1 de células guarda interviene en la toma de K<sup>+</sup> en condiciones de baja concentración, cuando se expresa en *Arabidopsis* y levadura (Bruggemann et al., 1999). Todos estos estudios ponen de manifiesto la existencia de un solapamiento en la cinética del transporte de K<sup>+</sup> entre grupos de proteínas genéticamente distintas (Britto y Kronzucker, 2008).

En la figura A6, se muestran los principales transportadores de potasio en las células de la raíz (Szczerba et al., 2009).



**Figura A6. Representación de transportadores y canales putativos de potasio en una célula de la raíz.** Abreviaturas: CNGC: Canales regulados por nucleótidos cíclicos; LCT1: transportador de cationes de baja afinidad; TPK: Canal de K<sup>+</sup> “tandem-pore”; CCC: cotransportador catión/cloruro; SKOR: canal de K<sup>+</sup> rectificador hacia afuera de la estela; HKT: transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad; KORC: canal de K<sup>+</sup> rectificador hacia afuera; CPA: antiportador catión/H<sup>+</sup>; HAK/KUP/KT: familia de simportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad; KIRC: canal de K<sup>+</sup> rectificador hacia adentro; CHX: intercambiador catión/H<sup>+</sup>; PmitoKATP: canal de K<sup>+</sup> de mitocondria sensible a ATP; NHX: transportadores Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; FV: canal vacuolar de rápida activación; TPC: canal de dos poros; SV: canal vacuolar de activación lenta; VK: canal de K<sup>+</sup> vacuolar. Tomado de Szczerba y colaboradores (2009).

### 3.2. PROTEÍNAS RESPONSABLES DEL TRANSPORTE DE K<sup>+</sup> EN PLANTAS

Los genes identificados como transportadores de potasio en el genoma de *A. thaliana* se clasifican en 3 familias principales: KT/HAK/KUP; TRK/HKT y CPA (Mäser et al., 2001). Además, se han identificado en el genoma de *Arabidopsis* canales selectivos de K<sup>+</sup> que también se agrupan en tres familias: *Shaker*, TPK (*tandem-pore*) y Kir (*inward-rectifying*) (Lebaudy et al., 2007)

#### 3.2.1. Transportadores KT/HAK/KUP

Las proteínas KT/HAK/KUP se encuentran en procariotas, hongos y plantas donde median el transporte de potasio, probablemente a través de un mecanismo de simporte K<sup>+</sup>:H<sup>+</sup>. En plantas están implicadas en la adquisición de potasio del medio externo, en la expansión celular y, posiblemente, en la distribución de auxinas en las raíces (Gierth y Mäser, 2007). Constituyen una familia con 13 miembros en *Arabidopsis* (Mäser et al., 2001), al menos 17 miembros en arroz (Bañuelos et al., 2002) y 5 en cebada (Santa-María et al., 1997). Estudios de localización han puesto de manifiesto que estos transportadores se expresan en todos los tejidos de la planta, tanto en membrana plasmática como en tonoplasto (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Bañuelos et al., 2002). También se ha demostrado que están implicados en la toma de potasio de alta y baja afinidad (Santa-María et al., 1997; Vallejo et al., 2005).

Estos transportadores catalizan la mayoría del influjo de K<sup>+</sup> en el rango de HATS, particularmente en condiciones de ayuno de K<sup>+</sup> (Gierth y Mäser, 2007). En estas condiciones se ha observado un aumento del contenido de transcritos de HAK en una amplia variedad de especies (Szczerba et al., 2009 y sus referencias). Al menos en tomate se ha demostrado una correlación entre los niveles de transcrito de LeHAK5 y la diferencia de potencial eléctrico a nivel de la membrana plasmática de células epidérmicas y corticales de la raíz, que parece indicar un papel del potencial de membrana en la regulación de la expresión de este transportador (Nieves-Cordones et al., 2008) En el caso concreto de *Arabidopsis*, estudios de microarrays han puesto de manifiesto que AtHAK5 es el transportador que está más fuertemente regulado en condiciones de ayuno de K<sup>+</sup>, lo que demuestra que, en estas condiciones, es el principal responsable de la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad en raíces (aproximadamente del 78% de este transporte) (Rubio et al., 2000; Gierth et al., 2005; Gierth and Mäser, 2007). Así mismo, estudios en *Arabidopsis* con dobles mutantes *Knock-out athak5-athak1* han permitido concluir que AtHAK5 es el único sistema implicado en la absorción de K<sup>+</sup> a concentraciones inferiores a 0,01 mM (Rubio et al., 2010).

Otros miembros de esta familia muestran distinta afinidad por el potasio cuando se expresan en levadura. AtKUP1 de *A. thaliana* presenta una afinidad dual, mediando el transporte de K<sup>+</sup> en el rango HATS y LATS (Fu y Luan, 1998), mientras que el transportador AtKUP2 funciona en el rango de baja afinidad, ya que complementa el fenotipo de un mutante de levadura deficiente en la toma de K<sup>+</sup> cuando la concentración de K<sup>+</sup> externa es mayor de 2,5 mM, y reduce su crecimiento cuando la concentración es de 1 mM (Quintero y Blatt, 1997).

Varios estudios han puesto de manifiesto que en presencia de Na<sup>+</sup>, los niveles de transcrito y la actividad de varios transportadores de este grupo se inhiben (Szczerba et al., 2009; Leidi et al., 2010; Nieves-Cordones et al., 2010). También existen evidencias que sugieren un influjo de Na<sup>+</sup> de baja afinidad mediado por transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad (Santa-María et al., 1997; Takahashi et al., 2007). HAK1 de cebada expresado en levadura interviene en el transporte de Na<sup>+</sup> de baja afinidad y en la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad (Santa-María et al., 1997). En experimentos de expresión heteróloga se ha demostrado que concentraciones elevadas de Na<sup>+</sup> inhiben el transporte de K<sup>+</sup> por AtKUP1 (Fu y Luan, 1998) y AtHAK5 (Rubio et al., 2000). También se ha observado que los niveles de transcrito de KUP2 disminuyen en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (Maathuis, 2006). Por otra parte, tanto la carencia de K<sup>+</sup> como el estrés por NaCl aumentan los niveles de expresión de las proteínas McHAK1 y McHAK2 de *Mesembryanthemum crystallinum* (Su et al., 2002). Estas isoformas parecen estar implicadas en el mantenimiento de los niveles de K<sup>+</sup> citoplasmático y/o en la regulación del turgor bajo condiciones en las que el Na<sup>+</sup> externo inhibe la toma de K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup> celular reemplaza al K<sup>+</sup>.

### 3.2.2. Transportadores HKT

Las proteínas HKT de plantas pertenecen a una familia de transportadores específicos de células no animales, la familia Trk/Ktr/HKT (acrónimos para "Transporter of K<sup>+</sup>" en hongos y bacterias; "K<sup>+</sup> transporter" en bacteria; y "High affinity K<sup>+</sup> transport" en plantas). Estos transportadores están implicados en diversas funciones: desde la toma de K<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> al control del potencial de membrana, adaptación al estrés osmótico o salino, o recirculación de Na<sup>+</sup> desde la parte aérea a las raíces de la planta (Corratge-Faillie et al., 2010; Haro et al., 2010). Las proteínas HKT de plantas, en un principio fueron estudiadas en relación con el transporte de K<sup>+</sup>. Sin embargo, actualmente se sabe que todos los transportadores HKT de plantas son permeables a Na<sup>+</sup>, y algunos de ellos también a K<sup>+</sup>. Por ello, la investigación en relación a estos transportadores se ha centrado en su implicación en la adaptación a ambientes salinos más que en un posible papel en la nutrición de K<sup>+</sup> (Haro et al.,

2005; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Gierth and Mäser, 2007; Corratge-Faillie et al., 2010; Haro et al., 2010).

La familia de transportadores HKT es ubicua en plantas, pero el número de genes que la representa es enormemente variable entre especies. Mientras que en dicotiledóneas, como *Arabidopsis* y otras especies se ha identificado un miembro, y en *Eucalyptus* o en *Mesembryanthemum*, al menos dos, en gramíneas se han descrito hasta 9 genes en arroz y un número similar en trigo y cebada (Uozumi et al., 2000; Mäser et al., 2001; Garciadeblas et al., 2003; Platten et al., 2006; Huang et al., 2008). La familia de transportadores HKT ha sido dividida en dos subfamilias (Platten et al., 2006) que se diferencian en un aminoácido de la primera región *pore loop* de la proteína, el cual juega un papel en la selectividad del catión. Las proteínas de la subfamilia 1 estarían implicadas en el transporte pasivo de  $\text{Na}^+$  de baja afinidad. Las proteínas de la subfamilia 2 catalizan el transporte activo de  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$  de alta afinidad (Horie et al., 2007; Munns y Tester, 2008). Las proteínas HKT de la subfamilia 2 no se han identificado en plantas dicotiledóneas (Platten et al., 2006).

El primer transportador HKT clonado, *TaHKT2;1* de trigo (nombrado anteriormente *TaHKT1*) (Platten et al., 2006) fue inicialmente caracterizado como un simportador  $\text{K}^+\text{-H}^+$ , que mediaba la absorción de  $\text{K}^+$  de alta afinidad en raíces (Schachtman and Schroeder, 1994). Posteriormente, la caracterización funcional de *TaHKT2;2* en levadura y oocitos de *Xenopus* puso de manifiesto que este transportador llevaba a cabo un simporte  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , al menos en estos sistemas de expresión (Rubio et al., 1995).

El único transportador HKT identificado en *Arabidopsis* es *AtHKT1;1*. Cuando esta proteína se expresa en oocitos de *Xenopus* o en levadura funciona como un uniporte selectivo para  $\text{Na}^+$ , pero también complementa la toma de  $\text{K}^+$  en un mutante de *E. coli* deficiente en transportadores de  $\text{K}^+$ , aumentando su acumulación, lo que sugiere algún papel de esta proteína en el transporte de  $\text{K}^+$  (Uozumi et al., 2000). A nivel de planta completa, *AtHKT1;1* se expresa en los tejidos vasculares de todos los órganos de *Arabidopsis*, concretamente en las células del parénquima del xilema y/o floema, dependiendo de los estudios (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005). El fenotipo de las líneas mutantes de *AtHKT1;1* (*Atthkt1*) se caracteriza por una alta sensibilidad a la sal asociada a una hiperacumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea y una baja acumulación de  $\text{Na}^+$  en raíces (Rus et al., 2004; Sunarpi et al., 2005). Se ha propuesto que *AtHKT1;1* interviene en procesos de recirculación de  $\text{Na}^+$  en la raíz desde la parte aérea mediante la carga del floema en las hojas y la respectiva descarga desde el floema en la raíz (Berthomieu et al., 2003). Sin embargo, su función más aceptada es la del control de la velocidad de transporte de  $\text{Na}^+$  de las raíces a la parte aérea, retirando o reabsorbiendo el ión desde los vasos xilemáticos a las células parenquimáticas del xilema de hojas y raíces (Sunarpi et al., 2005;

Davenport et al., 2007). Un estudio reciente llevado a cabo por Møller y colaboradores (2009), puso de manifiesto que la sobreexpresión específica de HKT1;1 en la estela de raíces maduras de *Arabidopsis*, mediante el uso del sistema de expresión *enhancer trap*, provoca una reducción de la transferencia de Na<sup>+</sup> de la raíz a la parte aérea. Esta reducción del contenido de Na<sup>+</sup> en la parte aérea tiene como consecuencia un incremento de la tolerancia a la salinidad. Por el contrario, observaron que plantas que expresaban constitutivamente HKT1;1 bajo el control del promotor 35S, presentaban un alto contenido de Na<sup>+</sup> en la parte aérea y eran sensibles al Na<sup>+</sup>.

Como se ha indicado anteriormente, en arroz se han identificado nueve transportadores tipo HKT (Garcia-deblas et al., 2003; Platten et al., 2006). Recientemente se comprobó que el transportador OsHKT2;1 cataliza la absorción activa de Na<sup>+</sup> en raíz con alta afinidad en condiciones de carencia de K<sup>+</sup>, demostrando que en estas condiciones el Na<sup>+</sup> puede reemplazar parcialmente al K<sup>+</sup> (Garcia-deblas et al., 2003; Horie et al., 2007). Altas concentraciones de K<sup>+</sup> inhiben el transportador (Garcia-deblas et al., 2003), mientras que a altas concentraciones de Na<sup>+</sup>, la expresión del transportador se reduce fuertemente para evitar niveles tóxicos de Na<sup>+</sup> en la planta. Los análisis funcionales de OsHKT2;1 en oocitos de *Xenopus* realizados por Jabnourne y colaboradores (2009) revelan una gran diversidad y complejidad en su permeabilidad y selectividad iónica. Se ha comprobado que este transportador es permeable a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup>, y que presenta distintos modos de transporte en función de las concentraciones externas de K<sup>+</sup> y/o Na<sup>+</sup>: simporte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, predominante a concentraciones externas de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en el rango micromolar; uniporte de Na<sup>+</sup>, cuando la concentración externa de Na<sup>+</sup> está en el rango milimolar y la de K<sup>+</sup> en el rango micromolar; y estado de no conductividad a concentraciones externas de K<sup>+</sup> en el rango milimolar. OsHKT2;2 cataliza el transporte acoplado de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Horie et al., 2001). Un estudio reciente llevado a cabo por Lan y colaboradores (2010) en oocitos de *Xenopus*, ha puesto de manifiesto que el transportador OsHKT2;4 funciona como un canal catiónico no selectivo, permeable al Ca<sup>2+</sup> y a un amplio rango de cationes monovalentes y divalentes. Además, se ha determinado que este transportador está localizado en la membrana plasmática de varios tipos celulares, entre ellos pelos radicales y células del parénquima, lo que facilita la toma de cationes por parte de la planta. OsHKT1;1 y OsHKT1;3 son permeables únicamente a Na<sup>+</sup> (Jabnourne et al., 2009). Se ha demostrado que el gen OsHKT1;5 coincide con el gen SKC1, identificado como un QTL implicado en el mantenimiento de la homeostasis de K<sup>+</sup> en condiciones salinas en una variedad tolerante a la salinidad. Se trata de un transportador específico de Na<sup>+</sup> que resultó ser más activo en la variedad tolerante que en la sensible, correlacionándose con una

menor acumulación de  $\text{Na}^+$  a la vez que una mayor de  $\text{K}^+$  en la parte aérea (Ren et al., 2005).

Por tanto, basándose en los datos disponibles, se puede concluir que existen dos tipos de transportadores HKT en plantas superiores, aquéllos descritos como transportadores de  $\text{Na}^+$ , presentes en todas las especies, y aquéllos que son capaces de co-transportar  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y que al parecer están presentes sólo en especies de monocotiledóneas. El significado biológico de esta diferencia entre especies dicotiledóneas y monocotiledóneas se desconoce hasta el momento (Corratge-Faillie et al., 2010).

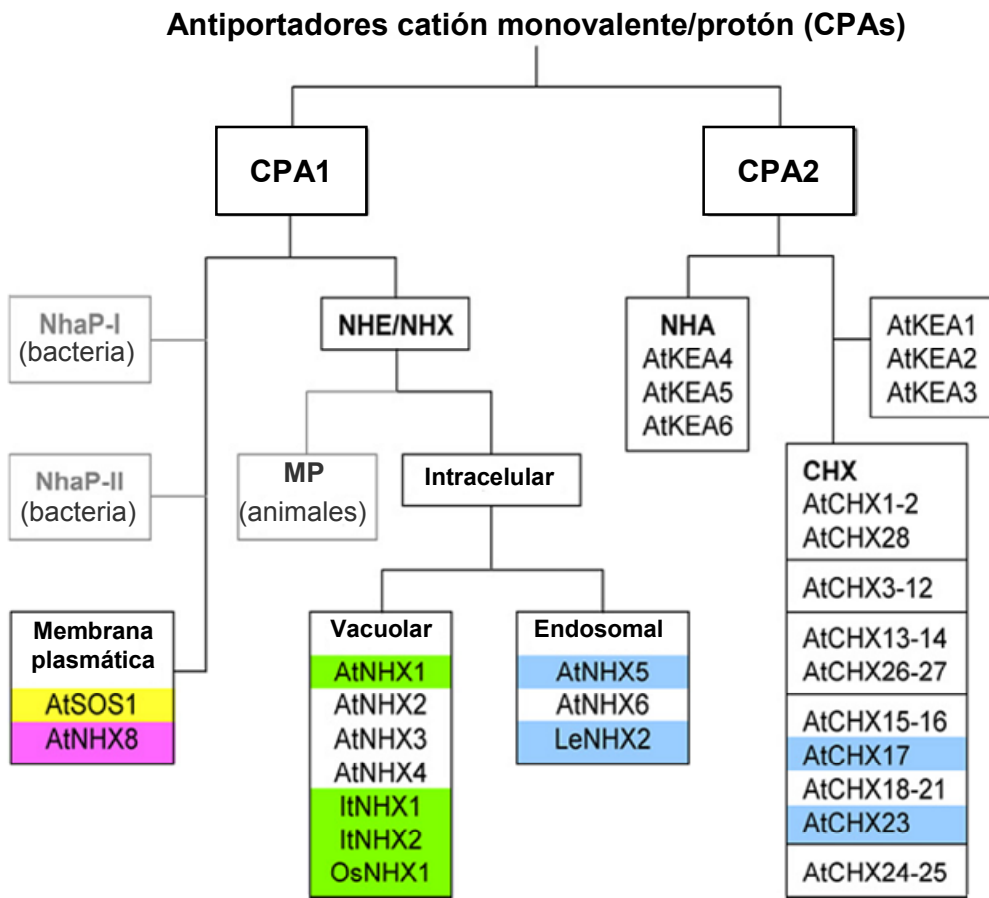
### 3.2.3. Antiportadores Cation Protón: CPA

Una vez completa la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* se ha podido identificar un total de 42 genes que codifican proteínas que forman parte de la superfamilia CPA, *Cation Proton Antiporters* (Saier et al., 1999; Mäser et al., 2001; Sze et al., 2004). Estas proteínas, que contienen un  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *exchanger domain* (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00999>), se pueden dividir en 2 subfamilias: CPA1, constituida por las proteínas tipo NHX (6) y SOS (2), y CPA2, constituida por transportadores del tipo CHX (28) y KEA (6). El estudio de los transportadores CPA2 de bacterias y hongos indica la existencia de antiportadores  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (KHA1; *S. cerevisiae*, NhaS4; *Synechocystis*),  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NAPA; *E. hirae*),  $\text{Na}^+/(H^+-K^+)$  (GerN; *B. cereus*) y canales de  $\text{K}^+$  regulados por ligandos (KefB, KefC; *E. coli*) (Mäser et al., 2001; Sze et al., 2004).

Los transportadores de las dos familias relacionadas CPA1 y CPA2 son ubicuos en plantas, hongos, animales y bacterias. Las familias CPA1 y CPA2 a su vez se subdividen, y algunas de las subfamilias están restringidas a reinos particulares, como es el caso de las dos familias NhaP de bacterias, la familia NHE-PM de animales y la familia SOS1 de plantas (Fig. A7, Brett et al., 2005; Gierth y Mäser, 2007). Por otro lado, los genes NhaP presentan una alta homología de secuencia con antiportadores de membrana plasmática del tipo AtSOS1 (*SOS-like*), que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Rodríguez-Rosales et al., 2009).

Los antiportadores CPAs operan de un modo electroneutro, sin afectar a la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana. Tienden a ajustar los gradientes de concentración de protones y de su(s) catión(es) sustrato(s). Por tanto, sus funciones están relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis de cationes monovalentes y la regulación del pH (Gierth y Maser, 2007). La superfamilia de antiportadores catión/protón (CPA) también es responsable del transporte de  $\text{K}^+$ , a pesar de que los análisis funcionales inicialmente describieron a

los antiportadores catión/protón como reguladores de homeostasis de Na<sup>+</sup> en situaciones de salinidad (Brett et al., 2005; Pardo et al., 2006; Apse y Blumwald, 2007; Gierth y Maser, 2007).



**Fig. A7. Clasificación de los transportadores CPAs.** Las proteínas para las que existen datos experimentales acerca de su especificidad de sustrato se representan coloreadas (amarillo: preferencia por Na<sup>+</sup>; azul: preferencia por K<sup>+</sup>; rosa: preferencia por Li<sup>+</sup>; verde: la misma afinidad por Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Las subfamilias que no están presentes en plantas se muestran en gris. MP: membrana plasmática (Gierth y Mäser, 2007).

La mayoría de los transportadores bien caracterizados de esta superfamilia pertenecen a la subfamilia CPA1, inicialmente caracterizados como antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> intracelulares y de membrana plasmática (Brett et al., 2005). Las proteínas de esta subfamilia más estudiadas en relación al transporte de Na<sup>+</sup> son SOS1 y NHX1 de *Arabidopsis thaliana*. La proteína AtSOS1 es un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de plasmalema y tiene un papel muy importante en la tolerancia a sal catalizando el

eflujo de  $\text{Na}^+$  desde la célula al medio extracelular (Shi et al., 2000). La proteína AtNHX1 se identificó inicialmente como un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de tonoplasto que aumentaba la tolerancia a sal cuando era sobreexpresada en plantas transgénicas (Apse et al., 1999; Gaxiola et al., 1999; Zhang y Blumwald, 2001). Estudios posteriores han puesto de manifiesto que la proteína AtNHX1 de tonoplasto, además, acepta  $\text{K}^+$  como sustrato (Zhang y Blumwald, 2001; Venema et al., 2002). Se ha comprobado que la proteína AtNHX1 purificada y reconstituida en liposomas transporta  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  con la misma afinidad, con valores de  $K_m$  de 42 mM para el  $\text{K}^+$  y 45 mM para el  $\text{Na}^+$  (Venema et al., 2002). Venema y colaboradores (2003) identificaron y caracterizaron el gen *LeNHX2* de tomate, estrechamente relacionado con *NHX5* de *A. thaliana* (Yokoi et al., 2002). Contrariamente a la proteína AtNHX1, la proteína LeNHX2 tiene una localización prevacuolar/endosomal parecida a la descrita para ScNHX1 en levadura (Brett et al., 2005; Rodríguez-Rosales et al., 2008). Estos autores comprobaron que LeNHX2 complementa los fenotipos de sensibilidad a higromicina y sal causados por la disrupción de *NHX1* en levadura, afectando a la acumulación de  $\text{K}^+$ , pero no de  $\text{Na}^+$ , en las levaduras transformadas. Estudios posteriores en los que se llevó a cabo la sobreexpresión de LeNHX2 en *Arabidopsis* y su silenciamiento génico en tomate permitieron demostrar que este transportador está implicado en la tolerancia a la salinidad y homeostasis de  $\text{K}^+$ , así como en procesos relacionados con el crecimiento de las plantas y la producción de frutos y semillas (Rodríguez-Rosales et al., 2008).

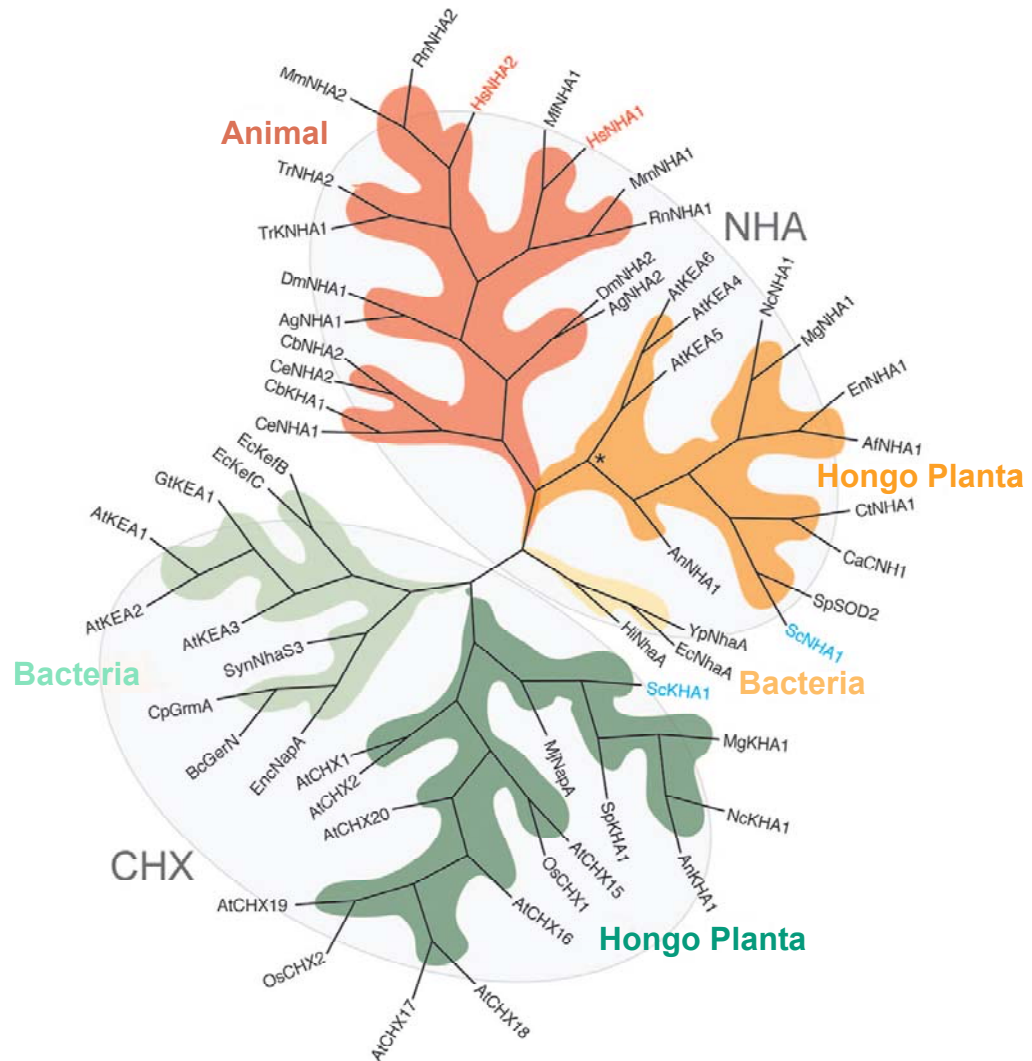
Un estudio reciente llevado a cabo por Leidi y colaboradores (2010) demuestra que la mayor tolerancia a la salinidad de las plantas de tomate que sobreexpresan AtNHX1 está más relacionada con la regulación de la homeostasis del  $\text{K}^+$  citosólico que con la acumulación vacuolar de  $\text{Na}^+$ . En este trabajo se constató que en condiciones limitantes de  $\text{K}^+$  en las plantas transgénicas se producía una mayor compartimentación de  $\text{K}^+$  en la vacuola a expensas del *pool* citosólico, conduciendo ello a una disminución de  $\text{K}^+$  en el citosol. Este déficit de  $\text{K}^+$  citosólico dispara una señal de activación temprana del sistema de alta afinidad HAK5, aumentando la toma de  $\text{K}^+$  por las raíces, e incrementando el contenido de  $\text{K}^+$  en los tejidos y en la savia del xilema de las plantas transformadas. Resultados similares se han obtenido en nuestro laboratorio en plantas de tomate que sobreexpresan el transportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  endosomal LeNHX2 (Huertas et al, no publicado). Estos estudios sugieren que las plantas sobreexpresoras de AtNHX1 y LeNHX2 detectan la deficiencia de  $\text{K}^+$  antes que las silvestres. Es posible que, además de AtNHX1 y LeNHX2, otros transportadores de tipo NHX también estén implicados en la mejora de la tolerancia a la salinidad de las plantas a través del control de la homeostasis de  $\text{K}^+$ . En este sentido, se ha demostrado que otras proteínas de la familia CPA1 llevan a cabo actividades de antiporte  $\text{K}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , como son ItNHX1, ItNHX2 de



*Ipomoea tricolor* (Ohnishi et al., 2005), OsNHX1 de *Oriza sativa* (Fukuda et al., 2004) y VvNHX1 de *Vitis vinifera* (Hanana et al., 2007).

Se ha propuesto que las proteínas CPAs de tonoplasto usan el gradiente de pH para cargar de manera indiscriminada  $K^+$  y  $Na^+$  en la vacuola, con fines de almacenamiento (en el caso del  $K^+$ ), detoxificación (en el caso de  $Na^+$ ) y generación de turgencia (Pardo et al., 2006). Además, Leidi y colaboradores (2010) han sugerido que la toma activa de  $K^+$  en el tonoplasto por acción de estos transportadores desempeña una función en el reparto de  $K^+$  entre la vacuola y el citosol. La selectividad  $K^+/Na^+$  de los transportadores NHX es aún más crítica en el caso de las proteínas de la familia CPA1 del sistema de endomembranas, importantes para la regulación del pH endosomal, ya que un exceso de carga de  $Na^+$  en el Golgi o en otros compartimentos puede ser perjudicial para las células vegetales. Además, los pocos miembros endosomales de la subfamilia CPA1 analizados hasta el momento muestran una preferencia por  $K^+$  sobre  $Na^+$ . En este sentido, LeNHX2 de tomate reconstituido en proteoliposomas transporta  $K^+$  con baja afinidad pero con una fuerte selectividad sobre otros cationes (Venema et al., 2003), mientras que AtNHX5 parece presentar preferencia por  $K^+$ , según se deduce de estudios de expresión en levadura (Yokoi et al., 2002).

Algunos miembros de la familia CPA2 pueden codificar transportadores  $K^+/H^+$ . KHA1 de *S. cerevisiae* pertenece a esta familia y parece mediar un flujo intracelular de  $K^+$  (Maresova and Sychrova, 2005, 2006). La familia CPA2 en *Arabidopsis* está constituida por 28 transportadores CHX y 6 transportadores KEA (Fig. A8) (Mäser et al., 2001; Sze et al., 2004).



**Fig. A8. Árbol filogenético de la familia de transportadores CPA2.** La familia de genes CPA2 se divide en dos subfamilias: el clado NHA (círculo superior sombreado) y el clado CHX (círculo inferior sombreado). El clado CHX tiene origen en los genes bacterianos (verde claro) que codifican los transportadores  $K^+/H^+$  NapA y KefB. Este clado CHX bacteriano además incluye los genes de plantas AtKEA1–AtKEA3. El clado de genes CHX de hongos y plantas (verde oscuro) incluye 28 genes AtCHX y genes KHA de hongos, por ejemplo ScKHA1 (texto azul). La familia NHA tiene orígenes en genes bacterianos NhaA (amarillo claro). Los genes NHA de hongos incluyen ScNHA1 (texto azul) y presentan baja similitud con los genes AtKEA4–AtKEA6 de plantas (amarillo oscuro). El clado de NHA animal, recientemente identificado, se muestra en rojo claro, e incluye 2 genes en todas las especies animales estudiadas, incluyendo HsNHA1 y HsNHA2 de humanos (texto rojo). Tomado de Brett y colaboradores (2005).

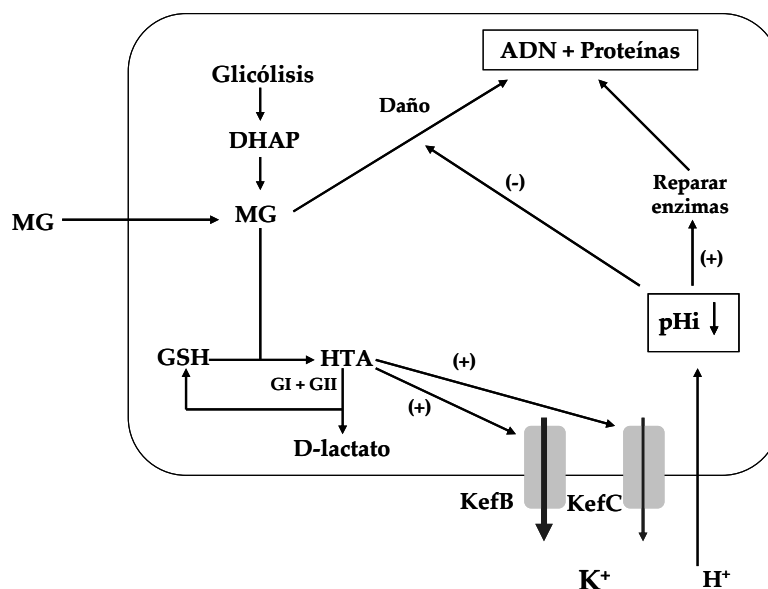
De los 28 genes de la familia CHX identificados en *Arabidopsis*, 18 se expresan específicamente durante la microgametogénesis o en tejido esporofítico, lo que sugiere que las correspondientes proteínas CHX están implicadas en la regulación de la homeostasis de  $K^+$  en el desarrollo y la germinación del polen (Sze et al., 2004). Cellier y colaboradores (2004) observaron que AtCHX17 se expresaba de forma preferencial en células epidérmicas y corticales de zonas maduras de la raíz, donde era fuertemente inducido por estrés salino, ausencia de  $K^+$ , ácido abscísico y pH ácido. Además, el análisis de mutantes de inserción *atcx17* ponía de manifiesto una función de este transportador en la adquisición y homeostasis de potasio, ya que las plantas mutantes acumulaban menos potasio que las silvestres en respuesta a estrés salino y ayuno de  $K^+$ . Otros estudios llevados a cabo en levadura, demostraron que AtCHX17 colocalizaba con marcadores del Golgi, y complementaba los fenotipos de la delección de *kha1* en *S. cerevisiae*, lo que también sugiere un papel en la homeostasis de  $K^+$  y la regulación del pH bajo estrés salino (Maresova y Sychrova, 2006). Posteriormente se estudió la proteína AtCHX23 en mutantes de pérdida de función, observándose una ultraestructura del cloroplasto alterada, una disminución del contenido de clorofila en las hojas y un pH citosólico más elevado en las células guarda (Song et al., 2004). Las plantas *atcx23* crecían mejor a altas concentraciones de  $K^+$ , pero presentaban una alta sensibilidad a NaCl. Estos datos sugieren que AtCHX23 es un antiportador  $Na^+(K^+)/H^+$  de la membrana del cloroplasto implicado en la homeostasis de potasio y la regulación del pH del estroma y del citoplasma y, por ello, importante para el desarrollo y la función del cloroplasto (Song et al., 2004). Otro de los transportadores de la familia CHX descrito en endosomas de células guarda es AtCHX20 (Padmanaban et al., 2007). Estudios en levadura pusieron de manifiesto que CHX20 complementaba la sensibilidad al déficit de  $K^+$  a pH alcalino causado por la disrupción de KHA1, lo que sugiere un papel de esta proteína en la regulación del pH y el transporte de  $K^+$  (Maresova y Sychrova, 2005; Padmanaban et al., 2007). Estudios llevados a cabo en plantas mutantes *atcx20* constataron una disminución de la apertura de los estomas inducida por luz en comparación con las plantas silvestres (Padmanaban et al., 2007). Además, se observó que el movimiento de las células guarda en los mutantes era insensible al pH externo y sensible a altas concentraciones de  $K^+$ . Teniendo en cuenta estos resultados, Padmanaban y colaboradores (2007) sugirieron que CHX20 tiene un papel crítico en la osmorregulación y, posiblemente, en la homeostasis del pH del sistema de endomembranas en células guarda.

AtCHX13 es un transportador CHX de membrana plasmática caracterizado funcionalmente por Zhao y colaboradores (2008). Se ha demostrado que facilita la toma de  $K^+$  de alta afinidad en levadura y plantas cuando el  $K^+$  es limitante. Parece que este transportador media un simporte  $K^+/H^+$  más que un antiporte, aunque

también es probable que actúe como un canal de influjo de  $K^+$ . En este sentido, Zhao y colaboradores (2008) han propuesto que AtCHX13 podría presentar distintos mecanismos de transporte en función de la concentración de  $K^+$  y el pH, de modo similar a KefC, otro miembro de la familia CPA2 de bacterias (Booth et al., 2003). Otra proteína de la familia CHX localizada en la membrana plasmática de células endodérmicas de raíz es AtCHX21 (Hall et al., 2006), un antiportador putativo  $Na^+/H^+$ . En plantas mutantes *chx21* se observó que la ausencia de esta proteína causaba una menor concentración de  $Na^+$  en las hojas de plantas cultivadas en presencia de altas concentraciones de NaCl. En base a estos resultados, se ha propuesto que AtCHX21 está implicado en la salida de  $Na^+$  a través del plasmalema de las células endodérmicas al apoplasto de la estela, desde donde es transportado a las hojas (Hall et al., 2006).

Además de AtCHX, la familia CPA2 en *Arabidopsis* incluye seis genes KEA ( $K^+$  Exchange Antiporters) de función desconocida, identificados mediante homología a antiportadores  $K^+/H^+$  bacterianos, y que constituyen la familia de transportadores de plantas menos estudiada (Mäser et al., 2001) (Fig. A7 y A8). Las secuencias KEA se separan en dos grupos distintos: KEA1-KEA3 y KEA4-KEA6. Las secuencias KEA4-KEA6 contienen un dominio intercambiador  $Na^+/H^+$ , y comparten homología con las proteínas fúngicas ScNha1 y SpSOD2, implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de  $Na^+$  y  $K^+$  citoplasmática y la regulación del pH y se agrupan junto con el antiportador bacteriano NhaA. KEA1-KEA3 constituyen un grupo estrechamente relacionado con los transportadores de eflujo de  $K^+$  regulados por glutatión, KefB y KefC, con los que comparten aproximadamente el 31% de identidad (Sze et al., 2004; Brett et al., 2005) (Fig. A8). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de un dominio intercambiador  $Na^+/H^+$  y un dominio KTN ( $K^+$  Transport Nucleotide binding) en el extremo C-terminal implicado en la sensibilidad a glutatión. Un nivel adicional de regulación se produce a través de la unión de nucleótidos. Se ha propuesto que la unión de  $NAD^+$  al dominio KTN en KefC induce una conformación activada de dímeros, que es estabilizada por la proteína auxiliar KefF, mientras que la unión de NADH induce una conformación inactiva (Miller et al., 1997; Roosild et al., 2002; Fujisawa et al., 2007; Roosild et al., 2009). El eflujo de  $K^+$  mediado por KefB o KefC en *E. coli* es activado por complejos del glutatión y negativamente regulado por glutatión. KefB o KefC comparten similitudes estructurales con canales de  $K^+$ , y basándose en la velocidad de transporte de  $K^+$  se ha sugerido que actúan como canales. Se ha propuesto que estos transportadores median en la supervivencia al estrés provocado por sulfidrilos electrofílicos, como metilglioxal o N-etilmaleimida (Booth et al., 1985; Ferguson et al., 1997; Miller et al., 1997; Booth et al., 2003). El metilglioxal es sintetizado principalmente a partir del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP), a través de la acción de la

enzima metilglioxal sintasa. Esta enzima es inhibida por fosfato inorgánico (Pi) mediante retroalimentación, y controlada alostéricamente por DHAP. Este control alostérico tiene como resultado la eliminación de la inhibición por Pi. Por lo tanto, la acumulación de DHA provoca la sobreproducción de metilglioxal por parte de la enzima metilglioxal sintasa (Ferguson, 1999). El glutatión juega un papel principal en la protección de las células de *E. coli* contra la toxicidad del metilglioxal (Ferguson y Booth, 1998), ya que es requerido por las enzimas glioxilasas I y II en el primer paso de la detoxificación de metilglioxal a D-lactato, mediante la formación de complejos del glutatión (hemitioacetil y S-lactoilglutatión). Estos complejos a su vez activan a KefB y KefC, provocando la salida de  $K^+$  y la entrada de  $H^+$  y causando la acidificación de la célula (Ferguson y Booth, 1998). Esta bajada de pH protege a la célula contra los efectos tóxicos del metilglioxal (Ferguson et al., 1995; Masip et al., 2006) (Fig. A9).



**Fig. A9. Representación esquemática de la relación entre la detoxificación de metilglioxal y la protección mediada por KefB/KefC.** DHAP, dihidroxiacetona fosfato; MG, metilglioxal; GSH, glutatión; HTA, hemitioacetil; GI y GII, glioxilasas I y II, respectivamente. La formación de glutatión-S-conjugados activa fuertemente KefB pero además tiene un efecto más débil en la activación de KefC. La salida de potasio es compensada por la entrada de protones, a través de una ruta desconocida. Modificado de Ferguson y colaboradores (1995).

Estudios recientes proponen que las proteínas KEA forman un subgrupo junto a cuatro transportadores bacterianos (KefC y KefB de *E.coli*; AmhT de *Bacillus pseudofirmus*; y YhaT de *Bacillus subtilis*) que presentan un sistema de transporte de dos componentes, existiendo proteínas auxiliares que interactúan con ellas modulando su actividad y permitiendo que puedan funcionar como antiportadores catión/H<sup>+</sup> o como canales iónicos (Miller et al., 2000; Fujisawa et al., 2007). KefC y YhaT necesitan la presencia de sus proteínas auxiliares para desempeñar la actividad antiportadora, mientras que AmhT lleva a cabo el antiporte independientemente de las mismas. Ensayos utilizando vesículas invertidas de bacterias indican que KefC presenta una actividad de intercambio K<sup>+</sup>(Rb<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> alta, Li<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> media y Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> baja, y que los dos sistemas CPA2 de dos componentes de *Bacillus* sólo catalizan intercambio K<sup>+</sup>(Rb<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> (Fujisawa et al., 2007). Sin embargo aún no se ha descrito el mecanismo de transporte de las proteínas KEA de plantas.

### 3.2.4. Canales de K<sup>+</sup>

Análisis electrofisiológicos de células guarda, células parenquimáticas del xilema, y protoplastos de raíz han revelado la presencia de canales específicos de K<sup>+</sup> que son regulados por hiperpolarización y despolarización de la membrana (Lebaudy et al., 2007). Estos canales selectivos se han identificado a nivel genético y molecular como multímeros compuestos por subunidades  $\alpha$  y se agrupan en tres familias principales: *Shaker*, TPK (*tandem-pore*) y Kir (*inward-rectifying*) (Lebaudy et al., 2007).

Además de mediar en la toma de K<sup>+</sup> del suelo, existen canales de K<sup>+</sup> que desempeñan un amplio rango de funciones en la planta. Una de las principales es el mantenimiento a corto plazo de los gradientes de potencial eléctrico a través de las membranas celulares, donde estos canales actúan de manera coordinada con bombas electrogénicas (incluida la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática) y transportadores de cloruro (Gradmann y Hoffstadt, 1998). También se ha demostrado que intervienen en los flujos de K<sup>+</sup> a larga distancia a través de los tejidos vasculares (Gaymard et al., 1998; Deeken et al., 2000; Lacombe et al., 2000)

#### 3.2.4.1. Canales de K<sup>+</sup> tipo “Shaker”

Es la familia mejor caracterizada y, probablemente, la más importante desde el punto de vista funcional. Son canales tetraméricos, compuestos por 4 subunidades  $\alpha$ , situadas alrededor de un poro central (Zimmermann y Sentenac, 1999). Cada subunidad está constituida por 6 segmentos hidrofóbicos transmembrana, con una región de aminoácidos cargados positivamente en el

cuarto segmento que actúa como un sensor de voltaje, y un dominio de poro entre el quinto y sexto segmento que contiene un motivo altamente conservado, GYGD (glicina-tirosina-glicina-aspartato), una característica clave en la selectividad de potasio (Very y Sentenac, 2003). Los canales tipo *Shaker* están localizados en la membrana celular y median la mayor parte de las corrientes selectivas de K<sup>+</sup> dependientes de potencial de membrana (Very y Sentenac, 2002). Se expresan en varios tipos de células y funcionan en un rango de concentraciones de K<sup>+</sup> milimolar (transporte pasivo de baja afinidad). En base a su dependencia de potencial de membrana, los canales se agrupan en tres subfamilias funcionales: (1) canales de rectificación hacia adentro activados por hiperpolarización (AKT1, KAT1, KAT2); (2) canales de débil rectificación hacia adentro (AKT2/3); y (3) canales de rectificación hacia afuera activados por despolarización (SKOR y GORK) (Lebaudy et al., 2007).

La familia de canales de rectificación hacia adentro activados por hiperpolarización (*Inward-Rectifying Shaker K<sup>+</sup> Channels*) incluye los primeros canales de K<sup>+</sup> identificados en plantas, los canales AKT1 y KAT1 de *Arabidopsis*. Ambos genes fueron identificados mediante complementación funcional en un mutante de levadura deficiente en la toma de potasio (Schachtman et al., 1992; Sentenac et al., 1992). AKT1 se expresa fundamentalmente en raíces de *Arabidopsis*, donde está implicado en la adquisición de K<sup>+</sup> (Hirsch et al., 1998). Se llevaron a cabo estudios en condiciones de ayuno de potasio, y se comprobó que los niveles de transcrito de AKT1 no se afectan en la mayoría de los sistemas, confirmándose la participación de este canal en el rango de baja afinidad (Lagarde et al., 1996; Su et al., 2001; Pilot et al., 2003). En trigo sí se observó un aumento del nivel de transcrito de TaAKT1 y del transporte de potasio, en condiciones de ayuno (Buschmann et al., 2000). Además, se comprobó en *A. thaliana* que, después de inhibir los sistemas HATS con NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, los mutantes *akt1* presentaban un fenotipo de crecimiento muy disminuido en condiciones de baja concentración de K<sup>+</sup> externa (del orden micromolar), mientras que las plantas silvestres estaban mucho menos afectadas, lo que demuestra que AKT1 puede funcionar en el rango de alta afinidad (Hirsch et al., 1998; Spalding et al., 1999; Rubio et al., 2010). Los canales KAT1 y KAT2 son específicos de las células guarda e intervienen en el transporte de K<sup>+</sup> que regula la apertura estomática (Szyroki et al., 2001). El canal KAT1 también participa en la toma de K<sup>+</sup> en condiciones de baja concentración cuando se expresa en *Arabidopsis* y células de levadura (Bruggemann et al., 1999).

Los canales de débil rectificación hacia adentro, AKT2/AKT3, se localizan en células del floema y permiten el transporte de K<sup>+</sup> bidireccional, participando en la carga y/o descarga del floema y en la toma de K<sup>+</sup> en células del mesófilo de la hoja (Marten et al., 1999; Deeken et al., 2000; Lacombe et al., 2000; Dennison et al., 2001).

Los canales de rectificación hacia afuera (*Outward-Rectifying Shaker K<sup>+</sup> Channels*) son activados por despolarización e incluyen las proteínas SKOR y GORK. El canal SKOR, fue el primer canal de rectificación hacia afuera activado por despolarización descrito en *Arabidopsis*. Se expresa en el cilindro vascular de la raíz, donde media en la liberación de K<sup>+</sup> al xilema, para su transporte desde la raíz a la hoja. En mutantes de *Arabidopsis* deficientes en SKOR se ha observado una reducción en el contenido de K<sup>+</sup> en la parte aérea, pero no en la raíz (Gaymard et al., 1998). El canal GORK es el principal canal de K<sup>+</sup> de rectificación hacia afuera en las células guarda, y está implicado en la rápida eliminación de K<sup>+</sup> de estas células durante el cierre estomático (Ache et al., 2000). Este canal también se expresa en pelos radiculares (Ivashikina et al., 2001). Aunque aparentemente en el genoma de *Arabidopsis* no se han identificado más genes que codifiquen este tipo de canales, la situación es más compleja. Así, cuando se coexpresan en *S. cerevisiae* o en oocitos de *Xenopus*, las subunidades  $\alpha$  de SKOR y GORK son capaces de formar canales heteroméricos, que también podrían formarse *in vivo*, aumentando de este modo el número de canales (Dreyer et al., 2004).

#### 3.2.4.2. Canales de K<sup>+</sup> TPK (*tandem-pore K<sup>+</sup> channels*)

Los transportadores TPK de plantas, animales y hongos tienen entre dos y ocho dominios transmembrana, con un poro individual, o más frecuentemente, dos poros separados por dos dominios transmembrana, y cada uno contiene la secuencia GYGD, similar a los canales *Shaker* (Czempinski et al., 1999; Zimmermann y Sentenac, 1999; Mäser et al., 2001; Maser et al., 2002; Ashley et al., 2006; Lebaudy et al., 2007). Estos canales se han identificado en raíces, hojas y flores y se localizan en el tonoplasto o la membrana plasmática, con sitios reguladores de unión al Ca<sup>2+</sup> y sitios de fosforilación (Czempinski et al., 1997; Czempinski et al., 2002; Moshelion et al., 2002; Latz et al., 2007). Se han identificado varios canales TPK en plantas, pero sólo se han caracterizado funcionalmente dos: AtTPK1 y AtTPK4. TPK1 se considera un canal VK (*Vacuolar K<sup>+</sup>*) (Ward et al., 2009). Los canales VK fueron identificados en las membranas de las vacuolas de las células guarda, son activados por aumentos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico (en el rango de 1  $\mu$ M) y son altamente selectivos para K<sup>+</sup> (Ward y Schroeder, 1994). Por tanto, TPK1 es un canal localizado en el tonoplasto activado por Ca<sup>2+</sup>, sensible a pH, e insensible a voltaje (Gobert et al., 2007). TPK4 se localiza en la membrana plasmática, y participa en el transporte de K<sup>+</sup> en el grano de polen y en el tubo polínico (Becker et al., 2004).



### 3.2.4.3. Canales de cationes no selectivos (NSCC)

La familia de canales NSCC (*Non Selective Cation Channels*) consiste en un grupo heterogéneo que incluye canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) y canales tipo *Shaker* (Demidchik y Maathuis, 2007). Estos canales son ubicuos, se encuentran tanto en membrana plasmática como en endomembranas, fundamentalmente en tonoplasto. Se han descrito 40 NSCCs putativos en el genoma de *Arabidopsis* (Mäser et al., 2001; Very y Sentenac 2002, 2003). Estos canales muestran una alta selectividad para cationes sobre aniones, pero, por lo general, no discriminan fuertemente entre cationes, presentando rangos de selectividad  $K^+/Na^+$  entre 0,3 y 3 (Demidchik et al., 2002; Demidchik y Maathuis, 2007). Tienen un papel fisiológico en la toma de  $K^+$  de baja afinidad, pudiendo ser activados por un gran número de factores y se clasifican según se activen por despolarización, por hiperpolarización o ser insensibles al voltaje. También pueden ser mecanosensibles, o activados por calcio, por nucleótidos cíclicos o por glutamato (Demidchik et al., 2002).

Las proteínas CNGCs (*Cyclic Nucleotide Gated Channels*) son canales activados por cAMP o por cGMP (Leng et al., 2002), provocando la entrada de cationes a la célula (Balague et al., 2003). Comparten homología estructural con los canales *Shaker*, con seis dominios transmembrana y un dominio poro localizado entre la quinta y la sexta unidad transmembrana. El dominio de unión del nucleótido cíclico está localizado en el extremo carboxiterminal de la proteína junto con el dominio de unión a calmodulina. Sin embargo, a diferencia de los canales *Shaker*, los CNGCs no presentan la secuencia del poro GYGD (Talke et al., 2003). Estos canales están ampliamente representados en el reino vegetal, con 20 miembros en el genoma de *Arabidopsis* (Mäser et al., 2001). En contraste con los CNGCs animales, en plantas estos canales se activan por calcio y calmodulina (Mäser et al., 2001; Very y Sentenac, 2002). Son canales no selectivos, presentando una permeabilidad muy similar para  $K^+$  y  $Na^+$  (Balague et al., 2003). Todos los CNGCs caracterizados hasta el momento catalizan el transporte de  $K^+$  y, excepto CNGC2, también de  $Na^+$ . AtCNGC1 y AtCNGC4 muestran la misma conductividad para  $K^+$  y  $Na^+$  (Balague et al., 2003; Hua et al., 2003), y AtCNGC10 es un canal putativo de  $K^+$  que influye enormemente en distintos procesos del desarrollo y el crecimiento, y en la acumulación de almidón en los cloroplastos (Borsics et al., 2007). Los canales CNGC se expresan en todos los tejidos de la planta (Talke et al., 2003), localizándose en la membrana celular (Arazi et al., 1999). El gran tamaño de esta familia de proteínas en plantas indica una amplia diversidad de funciones fisiológicas, que abarcan desde la señalización celular (Very y Sentenac, 2002) a la toma de cationes en la raíz (Maathuis y Sanders, 2001).

Los canales tipo *shaker* dentro de la familia de canales NSCC presentan una diversidad funcional muy amplia, debido a que las subunidades de estas proteínas pueden formar heterómeros (Lebaudy et al., 2007). En este sentido, se observó que la transformación de oocitos de *Xenopus* con cinco genes *Shaker* conlleva la polimerización indiscriminada de las subunidades de estas proteínas, dando como resultado una gran variedad de productos génicos. Ello sugiere que estos canales pueden constituir la mayor fuente de diversidad de canales de K<sup>+</sup> en plantas (Dreyer et al., 1997; Xicluna et al., 2007).

### 3.2.5. Superfamilia CaCA

La superfamilia de antiportadores Ca<sup>2+</sup>/catión (CaCA) está constituida por proteínas integrales de membrana con 10-11 dominios transmembrana que transportan Ca<sup>2+</sup> u otros cationes, usando el gradiente de H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> generado por transportadores primarios (Busch y Saier, 2002). Estas proteínas han sido identificadas en animales, plantas, hongos, arqueas y bacterias.

Hasta hace poco tiempo, el intercambio catión monovalente/H<sup>+</sup> se atribuía exclusivamente a la superfamilia de transportadores CPA. El antiportador ChaA de *E. coli* era el único miembro de la familia CaCA capaz de llevar a cabo el transporte de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Ivey et al., 1993; Radchenko et al., 2006). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de otros miembros de la superfamilia CaCA implicados en la compartimentación vacuolar de iones alcalinos (Cagnac et al., 2007; Pittman et al., 2009; Zhao et al., 2009). La proteína Vnx1p (*Vacuolar Na<sup>+</sup> eXchanger*) de levadura fue el primer antiportador CaCA eucariota caracterizado como transportador catión monovalente/H<sup>+</sup>, siendo descrita como el único antiportador responsable de la acumulación de cationes alcalinos contra protones en el lumen vacuolar (Cagnac et al., 2007). A pesar de su homología con otros miembros de la familia CAX (*CALcium eXanger*), Vnx1p no media el transporte de Ca<sup>2+</sup>, sino que actúa como un antiportador catión/H<sup>+</sup> de baja afinidad con mayor afinidad por Na<sup>+</sup> que por K<sup>+</sup>. La proteína Vnx1p vacuolar probablemente juega un papel importante en la homeostasis iónica y la regulación del pH intracelular, de una forma similar a la proteína prevacuolar Nhx1p. Debido a su papel predominante en el transporte iónico vacuolar, los mutantes *vnx1Δ* podrían constituir una herramienta muy útil para la expresión heteróloga y la caracterización funcional de antiportadores catión monovalente/H<sup>+</sup> endosomales (Cagnac et al., 2007).

Otro miembro de la superfamilia CaCA, CAX1 del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, presenta una actividad de transporte de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> vacuolar dependiente del gradiente de protones cuando se expresa en levadura

(Pittman et al., 2009). También se ha demostrado que la co-expresión de AtCAX1 y AtCAX3 en células de levadura da lugar a la formación de complejos “hetero-CAX” que presentan propiedades de transporte distintas a AtCAX1 y AtCAX3 expresadas individualmente, siendo capaces de transportar  $\text{Li}^+$  sin afectar la tasa de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhao et al., 2009). Además, la expresión de AtCCX3 en levadura induce una alta capacidad de toma de  $\text{Rb}^+$  radiactivo en fracciones enriquecidas en tonoplasto, que puede ser inhibida por un exceso de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$  no radiactivos, pero no por  $\text{Ca}^{2+}$  (Morris et al., 2008). La proteína AtCCX3 se localiza en el tonoplasto de células vegetales y su expresión aumenta en plantas tratadas con NaCl, KCl y  $\text{MnCl}_2$ . Se ha comprobado que los mutantes de inserción de AtCCX3 y AtCCX4 no presentan alteraciones en el crecimiento, mientras que las plantas sobrepresoras de AtCCX3 muestran un incremento en la acumulación de  $\text{Na}^+$  y en el transporte de  $^{86}\text{Rb}^+$ . En membranas enriquecidas en tonoplasto aisladas de líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban CCX3 bajo control de un promotor constitutivo, se observó un incremento en la toma de  $^{86}\text{Rb}^+$ . Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de AtCCX3 en plantas de tabaco afecta al desarrollo de la planta, provocando clorosis y necrosis como resultado de la acumulación de altos niveles de numerosos cationes. En conjunto, estos resultados sugieren que AtCCX3 funciona como un transportador de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{H}^+$  que también puede transportar  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Esta capacidad de transporte dual sugiere un papel en la homeostasis de cationes vacuolares en la planta (Morris et al., 2008).

### 3.3. MECANISMOS DE DETECCIÓN Y SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTA A DEFICIENCIA DE POTASIO

El potasio es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ello, las plantas deben disponer de mecanismos de señalización que les permitan ajustar rápidamente los sistemas de absorción de este catión a la variable disponibilidad del mismo en el medio. Se ha demostrado que las variaciones de la concentración de  $\text{K}^+$  externa afectan directamente a la actividad de canales y transportadores de  $\text{K}^+$  y, además, provocan la alternancia entre los dos mecanismos de toma de  $\text{K}^+$ . Cuando las células vegetales detectan una deficiencia de  $\text{K}^+$  en el medio externo, generan señales citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{2+}$  que son “descifradas” por sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es transmitida a proteínas diana (transportadores de  $\text{K}^+$  y canales), que son reguladas a nivel transcripcional o post-transcripcional. Como resultado se mantiene la homeostasis de  $\text{K}^+$  y las plantas pueden adaptarse a un ambiente con bajo  $\text{K}^+$  (Wang y Wu, 2010).

### Regulación transcripcional

La transcripción de los transportadores de  $K^+$  de *Arabidopsis*, *AtHAK5*, *AtKEA5*, *AtKUP3*, *AtCHX13*, y *AtCHX17*, es inducida por ayuno de  $K^+$  (Kim et al., 1998; Ahn et al., 2004; Cellier et al., 2004; Shin y Schachtman, 2004; Gierth et al., 2005; Zhao et al., 2008). Se ha comprobado que *AtHAK5*, *AtCHX13* y *AtCHX17* están implicados en la adquisición y homeostasis de  $K^+$  en plantas en condiciones de deficiencia de  $K^+$  (Cellier et al., 2004; Gierth et al., 2005; Zhao et al., 2008). Shin y Schachtman (2004) observaron que la deficiencia de  $K^+$  produce una liberación de  $H_2O_2$  que induce la expresión de genes que codifican transportadores de  $K^+$  como *AtHAK5*. Además, comprobaron que después de seis horas de ayuno de  $K^+$ , se inducía la transcripción de *AtKEA5* de manera transitoria. En otras especies vegetales también se ha demostrado la existencia de transportadores cuya transcripción es inducida por ayuno de  $K^+$ , como son *LeHAK5* de tomate, *HvHAK1* de cebada, *CaHAK1* de pimiento, y *OsHAK1* de arroz (Santa-María et al., 1997; Bañuelos et al., 2002; Wang et al., 2002; Martínez-Cordero et al., 2005; Leidi et al., 2010). Con respecto a los canales de  $K^+$ , son muy pocos los que presentan una respuesta al ayuno de  $K^+$ . Algunos de ellos son *AtKC1* de *Arabidopsis*, *LeKC1* de tomate, y *TaAKT1* de trigo (Buschmann et al., 2000; Wang et al., 2002; Shin y Schachtman, 2004).

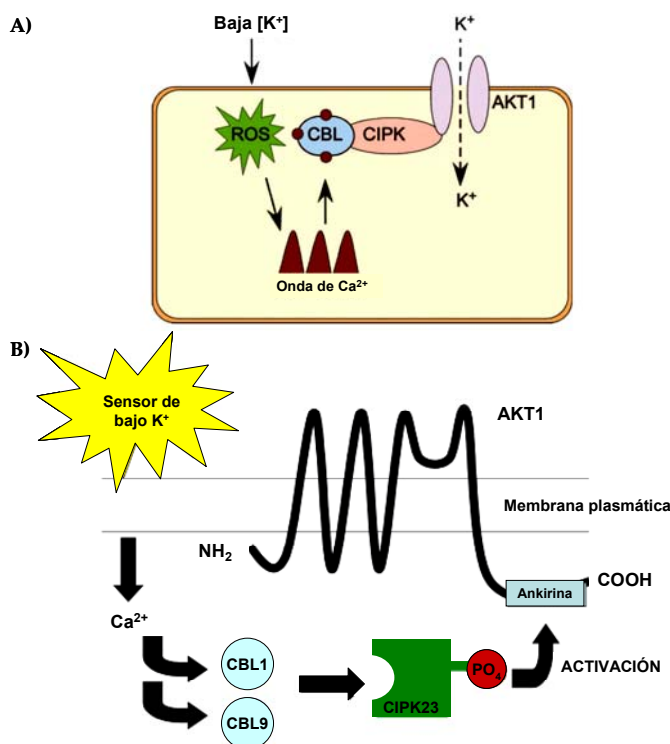
Además de estos transportadores y canales de  $K^+$ , otros muchos genes relacionados con la transcripción, la fosforilación de proteínas, el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS), la generación y transducción de la señal de  $Ca^{2+}$  o la síntesis de etileno y de ácido jasmónico, son regulados positivamente en respuesta a deficiencia de  $K^+$  (Wang y Wu, 2010 y sus referencias)

### Regulación post-traducciona

La regulación de las actividades de canales y transportadores de  $K^+$  mediante modificaciones post-traduccionales juega un papel crucial en la transducción de la señal en respuesta a deficiencia de  $K^+$ . Existen numerosas evidencias de que la fosforilación y desfosforilación de canales de  $K^+$ , mediada por quinasas y fosfatasas, respectivamente, constituyen un mecanismo importante en las respuestas de la planta a la deficiencia de  $K^+$  (Cherel et al., 2002; Li et al., 2006; Xu et al., 2006; Lee et al., 2007).

Como se ha indicado anteriormente, *AKT1* puede funcionar en el rango de alta y baja afinidad (Hirsch et al., 1998; Spalding et al., 1999). Se ha sugerido que el cambio entre los dos mecanismos de toma de  $K^+$  puede ser controlado por el estado de fosforilación de *AKT1* (Xu et al., 2006). Recientemente se ha descrito una ruta de transducción de señales desencadenada por  $Ca^{2+}$  como mecanismo regulador específico de este canal, según la cual una baja concentración de potasio sería

detectada por un sensor desconocido provocando el aumento de los niveles de ROS que, a su vez, induciría fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. A10 A; Li et al., 2006). A este respecto, se ha demostrado que el dominio ankirina de AKT1 interacciona con una proteína quinasa (CIPK23) que activa este canal por fosforilación, y que es dirigida por sensores de calcio tipo calcineurina B (*Calcineurin B Like* CBL1 y CBL9), que a su vez son activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Li et al., 2006; Xu et al., 2006; Lee et al., 2007) (Fig. A10 B). En *Arabidopsis* se ha demostrado que la sobreexpresión de *AtCIPK23* aumenta la tolerancia a estrés por bajo  $\text{K}^+$  (Xu et al., 2006). Ello, unido a la observación de que los mutantes *cipk23* de *A. thaliana* muestran un crecimiento inhibido en condiciones de bajo  $\text{K}^+$  (Cheong et al., 2007), sugiere que AKT1 fosforilado funciona como un canal de entrada de  $\text{K}^+$  en el rango de alta afinidad. Por último, existen evidencias de que la inactivación del canal AKT1 puede producirse por desfosforilación, vía proteína fosfatasa tipo 2C (Lee et al., 2007).

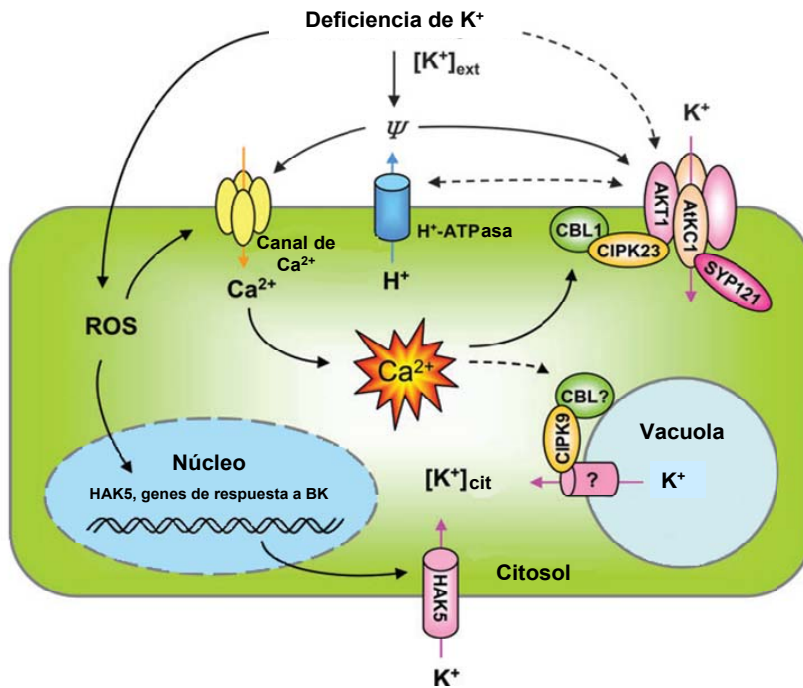


**Fig. A10. Mecanismo de activación para AKT1 en condiciones de bajo  $\text{K}^+$  externo.** A) Modelo esquemático de la ruta dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta a bajo  $\text{K}^+$  en *Arabidopsis*. ROS: especies reactivas de oxígeno. Tomado de Li et al., 2006. B) Representación de la regulación del flujo de  $\text{K}^+$  según Lee et al., 2007. CBL: sensor de calcio tipo calcineurina B (*Calcineurin B Like*); CIPK: proteína quinasa; Ankirina: región conservada en el extremo C-terminal de los canales *Shaker*. Tomado de Sczcerba et al., 2009.

Datos más recientes han puesto de manifiesto que la actividad de AKT1 además está regulada por otras proteínas, AtKC1 y una proteína SNARE (Fig. A11). AtKC1 es la subunidad  $\alpha$  del canal *shaker* de raíces de *Arabidopsis* (Reintanz et al., 2002), que según las investigaciones realizadas no forma por sí solo un canal de  $K^+$  funcional en sistemas de expresión heterólogos (Dreyer et al., 1997; Reintanz et al., 2002). Sin embargo, se ha comprobado que AtKC1 puede interactuar con AKT1 formando un canal complejo, cuyo umbral de activación es más bajo que el de AKT1 *per se*. Como resultado de esta interacción, podría prevenirse la pérdida de  $K^+$  a través del canal AKT1 bajo condiciones limitantes de  $K^+$  (Duby et al., 2008; Geiger et al., 2009). Además, la regulación del complejo AKT1-AtKC1 requiere la presencia de la proteína SNARE SYP21 (Honsbein et al., 2009). Sutter y colaboradores (2006) proponen que la proteína SNARE podría mediar en el tráfico y anclaje posicional de los canales de  $K^+$  en células vegetales. Además, la proteína SYP21 puede formar un canal complejo tripartito junto con AKT1-AtKC1 (Fig. A11). Este complejo desempeña un papel esencial en la toma y homeostasis de  $K^+$  cuando las plantas están sometidas a deficiencia de  $K^+$  (Geiger et al., 2009; Honsbein et al., 2009).

Pandey y colaboradores (2007) han propuesto otra ruta de señalización desencadenada por baja concentración de  $K^+$  en *Arabidopsis*, en la que están implicadas proteínas CBL localizadas en el tonoplasto. La vacuola es un importante *pool* de  $K^+$  que regula la homeostasis del  $K^+$  citoplasmático, mediante su acumulación o liberación al citoplasma (Walker et al., 1996). El crecimiento de la raíz de plantas mutantes *cipk9* se inhibe por tratamientos con bajo  $K^+$ , que sin embargo no afectan al contenido de  $K^+$  en los mutantes (Pandey et al., 2007). Se especula que CIPK9 puede interactuar con un CBL localizado en el tonoplasto (CBLx), de modo que, el complejo CBLx-CIPK9 activaría, mediante fosforilación, transportadores de  $K^+$  localizados en el tonoplasto (TPK1 u otros), facilitando así la liberación de  $K^+$  desde la vacuola en condiciones de bajo  $K^+$  (Fig. A10) (Amtmann y Armengaud, 2007; Pandey et al., 2007).

En la figura A11 se representa un modelo esquemático de los mecanismos implicados en la detección y señalización en respuesta a la deficiencia en potasio en la planta, propuesto por Wang y Wu (2010).



**Fig. A11. Modelo ilustrativo de la generación y transducción de la señal de deficiencia de  $K^+$  en células vegetales (Wang y Wu, 2010).** Se indica la implicación de las señales citoplasmáticas de  $Ca^{2+}$  y ROS, los canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , los transportadores de  $K^+$  y las  $H^+$ -ATPasas, así como de sus proteínas reguladoras. Las flechas con líneas discontinuas indican una regulación hipotética.  $\Psi$  representa la diferencia de potencial a nivel de la membrana plasmática. La deficiencia de  $K^+$  externo puede ser detectada por canales de  $K^+$  AKT1 localizados en la membrana plasmática junto con la bomba  $H^+$ -ATPasa. En condiciones de deficiencia de  $K^+$ , se hiperpolariza la membrana debido a un incremento en la actividad  $H^+$ -ATPasa, que además activa los canales AKT1 y de  $Ca^{2+}$ . La ausencia de  $K^+$  también provoca la acumulación de ROS en células vegetales, lo que activa la regulación transcripcional de los genes de respuesta a bajo potasio (BK), entre ellos *HAK5*. La consecuencia de la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  por la hiperpolarización de la membrana y las señales ROS es un incremento del  $Ca^{2+}$  citoplasmático. Las señales de  $Ca^{2+}$  pueden ser percibidas y traducidas aguas abajo a través de sensores de  $Ca^{2+}$  (CLBs). En la membrana plasmática, CBL1 (y/o CBL9) reclutan a la quinasa CIPK23, localizada en el citoplasma, hacia la membrana plasmática, donde CIPK23 activa, mediante fosforilación, la toma de  $K^+$  mediada por AKT1. Además, la actividad del canal AKT1 también es regulada por AtKC1 (una subunidad de canal de  $K^+$ ) y SYP21 (una proteína SNARE), a través de la formación de un canal complejo de  $K^+$ . En el tonoplasto, algunas proteínas CBL pueden interactuar con CIPK9 y activar transportadores o un canal de  $K^+$  del tonoplasto, facilitando la liberación de  $K^+$  desde la vacuola al citoplasma.

## 4. NUTRICIÓN DE POTASIO Y SALINIDAD

### 4.1. PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD EN AGRICULTURA

La salinidad es el estrés abiótico que incide más negativamente en la productividad agrícola y limita el uso potencial de nuevas áreas de cultivo. Alrededor de 800 millones de hectáreas de tierras de cultivo (aproximadamente un 7% del total) están afectadas por la salinidad en todo el mundo (Munns, 2005; Munns y Tester, 2008). El 40% de la superficie terrestre a escala mundial corresponde a regiones áridas y semiáridas caracterizadas por ser suelos secos debido a la escasez de lluvias, temperaturas extremas y una alta velocidad de evaporación, y donde la producción agrícola depende fuertemente de la irrigación. En estas condiciones, el efecto acumulativo del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, unido a una gran velocidad de evaporación y baja capacidad de lixiviación de algunos suelos, así como el uso de elevadas cantidades de fertilizantes en ciertas áreas de cultivo y la penetración del agua del mar en zonas costeras y marismas, ocasionan el fenómeno de salinización de los suelos. Se estima que aproximadamente un tercio de la superficie irrigada está afectada por la salinidad (Flowers, 2004; Munns, 2005). Además, el crecimiento de la población humana, que se espera alcance 9300 millones de habitantes en 2050, hace necesario un incremento de la producción global de alimentos en torno al 50 % en los próximos 40 años para asegurar la alimentación (<http://www.unfpa.org/swp/2001/>, (Flowers, 2004)). Este hecho implica sobreexplotar las tierras ya cultivadas y además buscar nuevas áreas donde llevar a cabo la actividad agrícola, teniendo que hacer uso de zonas áridas y semiáridas en las que es frecuente una alta salinidad de los suelos y en las que los factores climáticos (insolación intensa, altas temperaturas, baja pluviosidad) determinan la necesidad de irrigación.

La salinidad de los suelos está mayoritariamente determinada por el NaCl, aunque también puede haber cantidades considerables de otras sales como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> y NaCO<sub>3</sub> (Zhu, 2002). La toxicidad de cada ión varía según la planta: el Cl<sup>-</sup> es el componente más tóxico para cítricos y soja mientras que el Na<sup>+</sup> resulta más tóxico para la mayoría de las plantas cultivadas (Munns y Tester, 2008 y sus referencias). En base a su tolerancia al estrés salino las plantas pueden clasificarse en dos grupos: halófitas y glicófitas. Además, dentro de cada grupo hay grandes diferencias en el nivel de tolerancia al estrés salino (Greenway y Munns, 1980). La mayoría de las especies cultivadas son glicófitas y, por tanto, muy sensibles a la salinidad del suelo, de manera que no pueden crecer a una concentración de 100 mM de NaCl o superior (Tuteja, 2007).



## 4.2. EFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE LAS PLANTAS

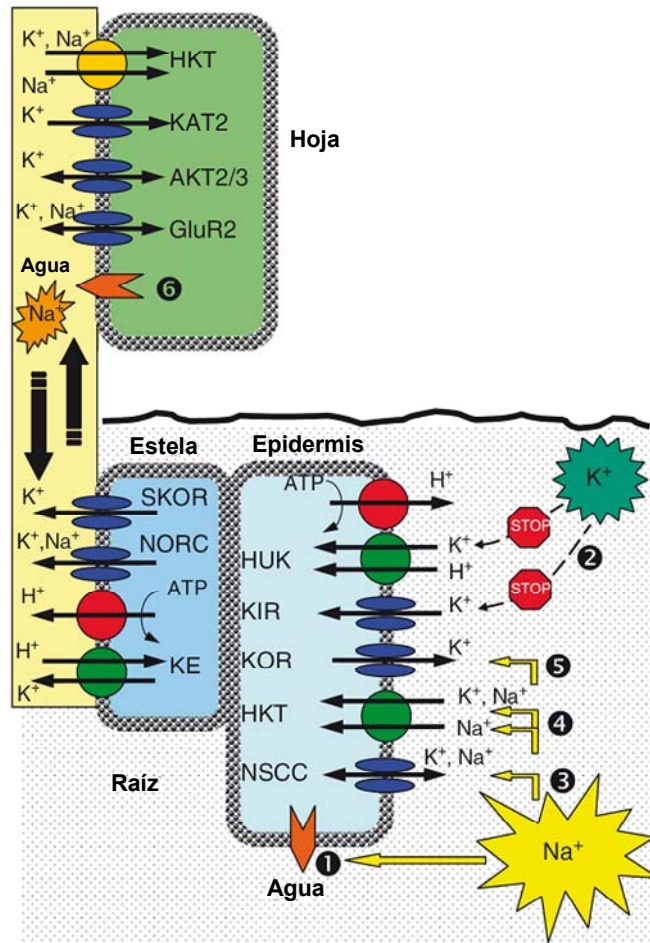
La salinidad del suelo estresa a las plantas debido a que dificulta la extracción de agua por parte de la raíces y a que provoca efectos tóxicos y desequilibrios nutricionales asociados a la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la planta (Munns y Tester, 2008). El crecimiento de la planta disminuye enormemente en situaciones de salinidad, ya que el incremento de los contenidos celulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  interfiere en la disponibilidad, transporte y distribución de agua y nutrientes minerales necesarios para la planta, como son  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{NO}_3^-$  (Flowers y Colmer, 2008; Tuteja, 2007). Por tanto, la acción negativa de la sal sobre la planta se debe tanto a su efecto osmótico como iónico (Munns y Tester, 2008).

El efecto osmótico conlleva una disminución de la capacidad de absorber agua por parte de la planta, lo que supone una reducción de la expansión foliar y una pérdida de turgencia. De manera general, en plantas sensibles el efecto osmótico provoca a largo plazo una reducción del crecimiento de la parte aérea y, en menor grado, de las raíces (Munns et al., 2000; Munns, 2002; Tester y Davenport, 2003). A altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el medio extracelular se produce una salida de agua fuera de la célula, por lo que, para mantener la actividad citosólica, el agua pasa desde la vacuola al citosol. Como consecuencia se reducen el turgor y la expansión celular casi instantáneamente, minutos después de iniciarse el estrés salino (Yeo et al., 1991). También se reduce la velocidad de división celular, lo que conduce a una ralentización en la aparición y crecimiento de las hojas. Por otro lado, los brotes laterales dejan de crecer y se forman menos ramas. Además, se afecta el desarrollo reproductivo, produciéndose floración temprana o reducción del número de botones florales (Munns y Tester, 2008).

La alta salinidad también provoca en la planta toxicidad iónica (Zhu, 2002; Munns y Tester, 2008), ya que conduce a una acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el citosol de la célula que puede ser perjudicial para la misma. El  $\text{Na}^+$  es la causa principal de toxicidad iónica. La alteración provocada por el  $\text{Na}^+$  en la toma de  $\text{K}^+$  conlleva una alteración en la razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de la célula, que es más crítica que la concentración absoluta de  $\text{Na}^+$  (Maathuis y Amtmann, 1999). El  $\text{Na}^+$  tiene la capacidad de competir con el  $\text{K}^+$  para unirse a sitios esenciales debido a la semejanza en propiedades fisicoquímicas de ambos. Sin embargo, el  $\text{Na}^+$  no puede sustituir al  $\text{K}^+$  en sus funciones metabólicas en el citoplasma (ver apartado 1.1) (Marschner, 1995; Zhu et al., 1998; Tester y Davenport, 2003). La síntesis de proteínas requiere altas concentraciones de  $\text{K}^+$  para la unión del tRNA a los ribosomas (Blaha et al., 2000), siendo la interrupción de la síntesis de proteínas una de las principales causas de toxicidad por  $\text{Na}^+$ . A nivel de la planta se ve afectado el crecimiento, ya que la acumulación de  $\text{Na}^+$  causa la necrosis de las hojas más viejas, primero en los bordes

y, posteriormente, en el interior. Cuando las hojas más viejas detienen el crecimiento, no pueden diluir la sal que les llega, tal como ocurre en las hojas jóvenes en crecimiento y, por ello, mueren. Si la tasa de muerte de las hojas viejas es mayor que la de producción de hojas nuevas, se verá afectada la capacidad fotosintética de la planta, que no será capaz de suministrar los hidratos de carbono que requieren las hojas jóvenes, lo cual reduce aún más los niveles de crecimiento y producción de la planta (Munns, 1993, 2002; Munns y Tester, 2008).

Además, como se ha comentado anteriormente, la salinidad no sólo dificulta la absorción de agua por la planta, sino también de nutrientes minerales, pudiendo conducir a una situación de desequilibrio nutricional (Silberbush y Ben-Asher, 2001). El efecto directo del  $\text{Na}^+$  sobre la toma de otros nutrientes se debe a la interferencia de este catión con la actividad de transporte iónico a nivel de la membrana celular de la raíz, afectando fundamentalmente a transportadores y canales de  $\text{K}^+$ , lo que impide la toma de este macronutriente y afecta su homeostasis (Fig. A12). Los primeros estudios llevados a cabo por Epstein y colaboradores (Epstein, 1961; Rains y Epstein, 1965), sugerían que el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Na}^+$  compiten por su entrada en la célula a través de transportadores/canales similares, lo que dio lugar a la hipótesis de que uno de los factores de toxicidad del  $\text{Na}^+$  es la inhibición del transporte de  $\text{K}^+$ , provocando su deficiencia. Esta hipótesis se ha confirmado mediante estudios genéticos posteriores, que demuestran que mutantes tolerantes a sal a menudo presentan fenotipos de deficiencia de  $\text{K}^+$  (Hasegawa et al., 2000; Munns y Tester, 2008). Además, cuando el  $\text{Na}^+$  cargado positivamente atraviesa la membrana plasmática, se observa una despolarización de la membrana significativa (Shabala y Cuin, 2008 y sus referencias). Esta despolarización hace que la toma de  $\text{K}^+$  pasiva a través de canales de potasio rectificadores hacia adentro sea imposible desde el punto de vista termodinámico, al mismo tiempo que incrementa enormemente la pérdida de  $\text{K}^+$  a través de los canales de  $\text{K}^+$  rectificadores hacia afuera activados por despolarización (KOR) (Fig. A12).



**Fig. A12. Efectos adversos de la salinidad sobre la homeostasis de K<sup>+</sup> y relaciones iónicas en plantas.** Niveles elevados de Na<sup>+</sup> en la solución del suelo inducen la salida de agua fuera de la célula siguiendo el gradiente osmótico (1). Las hojas sufren igualmente este efecto osmótico debido a la acumulación de Na<sup>+</sup> en el apoplasto de las hojas (6). La salinidad reduce sustancialmente la disponibilidad de K<sup>+</sup> por las raíces como resultado de la reducida actividad de K<sup>+</sup> en la solución del suelo (2). El Na<sup>+</sup> compete por el K<sup>+</sup> por sus sitios de absorción en la membrana plasmática incluyendo los transportadores de baja afinidad (3) y alta afinidad (4). Finalmente, la salinidad incrementa drásticamente la pérdida de K<sup>+</sup> a través de los canales de K<sup>+</sup> rectificadores hacia afuera activados por despolarización (KOR) (5). Tomado de Shabala y Cuin (2008). En esta figura no se encuentran representados transportadores de Na<sup>+</sup> claves como SOS1 y NHX1.

### 4.3. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN PLANTAS

La tolerancia a sal en glicófitas está asociada de forma predominante con la restricción de la absorción de iones tóxicos a nivel de la raíz, la extrusión de iones en el apoplasto y el secuestro de iones en compartimentos intracelulares y tejidos que son menos sensibles (Blumwald, 2000; Flowers y Colmer, 2008). Los recientes progresos en genética molecular y electrofisiología de plantas sugieren que la homeostasis del  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  es un mecanismo clave en la tolerancia a estrés salino, y constituye un proceso complejo y coordinado, que conlleva el mantenimiento en el citoplasma de una alta razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Tester y Davenport, 2003; Apse y Blumwald, 2007; Shabala y Cuin, 2008).

#### 4.3.1. Mantenimiento de la razón $\text{K}^+/\text{Na}^+$ citosólica como mecanismo clave para la tolerancia a la salinidad

La razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citosólica a menudo se confunde con la razón  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  del tejido (parte aérea u hoja), lo cual resulta erróneo, puesto que es la homeostasis citosólica de  $\text{K}^+$  y no su acumulación vacuolar, la que resulta esencial en los procesos metabólicos, si bien aquella última tiene algún impacto en el ajuste osmótico (Maathuis y Amtmann, 1999; Shabala y Cuin, 2008).

A este respecto, las evidencias recientes obtenidas en plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz, han conducido a la idea de que la homeostasis del  $\text{K}^+$  a nivel de planta entera bajo condiciones salinas tiene lugar, al menos en una gran medida, a través de la regulación de las concentraciones internas de  $\text{Na}^+$  en los diferentes tejidos. Esto es llevado a cabo a través de diferentes transportadores que controlan la selectividad de  $\text{K}^+$  sobre la de  $\text{Na}^+$ , mediante la extrusión de  $\text{Na}^+$  al medio externo, su compartimentación vacuolar, así como la carga y descarga xilemática (Zhu et al., 1998; Tester y Davenport, 2003; Horie y Schroeder, 2004; Ren et al., 2005; Rus et al., 2005; Sunarpi et al., 2005; Apse y Blumwald, 2007). En otra medida, también puede depender de la prevención de la pérdida de  $\text{K}^+$  fuera de la célula (Shabala y Cuin, 2008).

A nivel celular, la toma de  $\text{Na}^+$  restringida, su exclusión activa a la solución del suelo, a través del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática SOS1 (Zhu, 2003), y la compartimentación del exceso de este catión en la vacuola a través del transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de tonoplasto NHX1 (Zhang y Blumwald, 2001) se consideran claves para la tolerancia a la sal.

A nivel de la planta completa, la adaptación a la salinidad puede llevarse a cabo mediante la reducción de la carga de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, la recirculación de  $\text{Na}^+$  en el floema, la compartimentación específica de tejido y órgano (tales como

carga preferencial de Na<sup>+</sup> en estructuras menos sensibles como hojas senescentes o epidermis, entre otras) y, en algunas especies, mediante la secreción de sal desde la hoja a través de glándulas de sal o vesículas (Tester y Davenport, 2008 y sus referencias). Un mecanismo importante es la recirculación de Na<sup>+</sup> desde los órganos fotosintéticos hacia las raíces. Existen importantes indicios de que este proceso está mediado por transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad (Rus et al., 2004; Davenport et al., 2007). Debido a que estos transportadores están implicados en la toma de K<sup>+</sup> en los tejidos vegetales (Rubio et al., 1995) se han convertido en el principal objetivo de las estrategias para la mejora de la tolerancia a la salinidad (Byrt et al., 2007).

### 4.3.2. Regulación de los transportadores de K<sup>+</sup> bajo condiciones salinas

Debido a que el estrés salino impacta de manera muy severa en la homeostasis del K<sup>+</sup> en todos los órganos de la planta, cabe esperar una regulación diferencial del transporte de K<sup>+</sup> en función del tejido vegetal y del compartimento celular (Maathuis, 2006; Shabala y Cuin, 2008).

#### Transportadores KT/HAK/KUP

Los niveles de transcripción y la actividad de varios de los transportadores de este grupo se modifican en condiciones salinas, por lo que podrían ser objetivo para la mejora genética. HAK1 de cebada expresado en levadura interviene en el transporte de Na<sup>+</sup> de baja afinidad y en la toma de K<sup>+</sup> de alta afinidad (Santa-María et al., 1997). En experimentos de expresión heteróloga se ha demostrado que concentraciones elevadas de Na<sup>+</sup> inhiben el transporte de K<sup>+</sup> por AtKUP1 (Fu y Luan, 1998) y AtHAK5 (Rubio et al., 2000). También se ha observado que la transcripción de KUP2 disminuye en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (Maathuis, 2006) y que los niveles de transcrito de AtHAK5 se reducen de una manera drástica por el estrés salino (Nieves-Cordones et al., 2010). Por otra parte, tanto la carencia de K<sup>+</sup> como el estrés por NaCl aumentan los niveles de expresión de las proteínas McHAK1 y McHAK2 de *Mesembryanthemum crystallinum* (Su et al., 2002). Estas isoformas parecen estar implicadas en el mantenimiento de los niveles de K<sup>+</sup> citoplasmático y/o en la regulación del turgor bajo condiciones en las que el Na<sup>+</sup> externo inhibe la toma de K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup> celular reemplaza al K<sup>+</sup>.

#### Transportadores HKT

Como se ha indicado anteriormente (apartado 3.2.2.), la familia de proteínas HKT ha sido implicada en el transporte de Na<sup>+</sup> en varias especies (Schatchman y Schroeder, 1994; Rubio et al., 1995; Haro et al., 2010). Se ha observado que estos transportadores pueden mediar el transporte de Na<sup>+</sup> de alta y baja afinidad en raíces

(Gassman et al., 1996; Laurie et al., 2002), sobre todo cuando la razón  $K^+/Na^+$  es baja (Rubio et al., 1995; Rubio et al., 1999; Haro et al., 2005). Se considera que los transportadores HKT desempeñan un importante papel en la toma y recirculación de  $Na^+$  en plantas sometidas a estrés salino (Rus et al., 2001; Apse y Blumwald, 2007). Además, los transportadores HKT están implicados en la regulación del transporte y la homeostasis de  $K^+$  bajo condiciones salinas (Uozumi et al., 2000; Ren et al., 2005; Sunarpi et al., 2005).

#### **Antiportadores $K^+/H^+$**

Como se ha indicado en el apartado 3.2.3, el genoma de *Arabidopsis* contiene seis antiportadores de eflujo de  $K^+$  putativos, denominados KEA1-KEA6 (*K Efflux Antiporters*), los cuales junto con las proteínas CHX (*Cation H eXchangers*, con 28 miembros en *Arabidopsis*) pertenecen a la familia de antiportadores CPA2 (Mäser et al., 2001). Cellier y colaboradores (2004) han sugerido que al menos un miembro de la familia CPA2, AtCHX17, puede contribuir a la adquisición de  $K^+$  y a su homeostasis bajo condiciones salinas, ya que los niveles de transcrito de este gen aumentan en dichas condiciones (Maathuis, 2006). Otros miembros de la familia CHX también juegan un papel en la extrusión de  $Na^+$  desde la célula. Así, estudios de caracterización funcional de CHX21 indican que esta proteína actúa como transportador de  $Na^+$  en el parénquima del xilema (Hall et al., 2006). También se sabe que algunas proteínas de la familia NHX son antiportadores  $K^+/H^+$ , y que la mejora de la tolerancia a la salinidad por sobreexpresión de estos genes está relacionada con un efecto sobre la homeostasis de  $K^+$  (ver apartado 3.2.3.).

#### **Canales de potasio tipo *shaker***

El  $Na^+$  tiene efectos directos sobre los canales AKT, reduciendo la probabilidad de apertura, e indirectos, reduciendo el número de canales expresados (Qi y Spalding, 2004). También se ha demostrado que los canales AKT2/3 aumentan su expresión en condiciones de estrés salino (Marten et al., 1999), pudiendo estar implicados en la recirculación de  $K^+$  vía floema. De modo similar, la expresión de canales SKOR, localizados en la estela de la raíz, se incrementa por la salinidad (Maathuis, 2006). El aumento inducido por sal de la expresión de SKOR en raíces y de la expresión de AKT2/3 en parte aérea, causaría un aumento del transporte de  $K^+$  a través del tejido vascular, produciéndose una redistribución de este catión entre las raíces y la parte aérea. En contraposición a lo anterior, situaciones de ausencia de  $K^+$  provocan una disminución de la expresión de SKOR y AKT2/3 (Pilot et al., 2003). Además, la gran entrada de  $Na^+$  que tiene lugar en plantas sometidas a salinidad causa la despolarización de la membrana (Shabala y Cuin, 2008 y sus referencias), lo que puede provocar la activación de canales de  $K^+$  rectificadores hacia afuera.

Mediante el uso de bloqueadores específicos de canales de  $K^+$ , se ha observado que el eflujo masivo de  $K^+$  en células de la epidermis de raíz y en células del mesófilo de la hoja que ocurre en condiciones de alta salinidad para mantener el equilibrio osmótico, es mediado por este tipo de canales en *Arabidopsis* (Shabala et al., 2006). Es más, tras someter a alta salinidad a mutantes con deleciones en diferentes transportadores de  $K^+$ , se observó que el eflujo de  $K^+$  desde el citoplasma al exterior sólo se reducía fuertemente en los mutantes *gor1* (Shabala et al., 2006), poniendo de manifiesto la importancia de los canales GORK en la tolerancia de las plantas a la salinidad.

### **Canales de $K^+$ TPK (*Tandem-Pore $K^+$ channels*)**

La participación de estos canales en las respuestas adaptativas de las plantas a la salinidad es poco conocida. Se ha observado que los niveles de transcripción de TPK5 (KCO5) disminuyen en condiciones salinas, lo que posiblemente estaría asociado a su participación en el mantenimiento de los niveles de  $K^+$  citoplasmático y/o el intercambio de  $K^+$  vacuolar por  $Na^+$  (Maathuis, 2006).

### **Canales de cationes no selectivos (NSCC)**

Su contribución a la adquisición y el transporte de  $K^+$  en plantas sometidas a condiciones salinas no se ha cuantificado (Leng et al., 2002; Balague et al., 2003). Todos los CNGCs caracterizados hasta el momento pueden catalizar el transporte de  $K^+$  y, excepto CNGC2, también de  $Na^+$ . Los análisis del transcriptoma de *Arabidopsis* han revelado un incremento de los niveles de transcritos de CNGC1, CNGC19 y CNGC20 en raíces y de CNG19, CNGC3 y CNGC8 en parte aérea en respuesta a salinidad (Maathuis, 2006).

### **Otros transportadores de $K^+$**

Otros transportadores que pueden contribuir potencialmente a la regulación de la homeostasis iónica y osmótica en condiciones salinas son la proteína LCT1, que media la toma de baja afinidad de una amplia gama de cationes monovalentes, incluyendo  $K^+$  y  $Na^+$  (Amtmann et al., 2001) y las proteínas de la familia CCC (*Cation Chloride Cotransporters*) que catalizan el co-transporte catión-cloruro (Colmenero-Flores et al., 2007).

## 5. IDONEIDAD DEL USO DE LEVADURA COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE PLANTAS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye un sistema conveniente para la expresión heteróloga de genes eucariotas, ya que se multiplica rápidamente, está bien caracterizada genéticamente y es un sistema eucariota en el que están presentes los mecanismos post-traduccionales de modificación de proteínas. Las células de levadura constituyen sobre todo el modelo de elección para la expresión de proteínas de membrana de plantas, tóxicas en muchos casos en bacterias (Haro et al., 1993; Darley et al., 2000). Por otra parte, la existencia de mutantes desprovistos de sus sistemas de transporte propios, convierte a las células de levadura en la herramienta ideal para el estudio del transporte y homeostasis de cationes alcalinos así como para el estudio molecular de transportadores de eucariotas superiores (Maresova and Sychrova, 2005). En este sentido, la identificación de los primeros transportadores iónicos secundarios de plantas, los canales de  $K^+$  de *Arabidopsis*, se llevó a cabo mediante complementación heteróloga de una cepa de levadura mutante (*trk1Δtrk2Δ*) capaz de crecer a bajas concentraciones de  $K^+$  (Anderson et al., 1992; Sentenac et al., 1992). En la figura A13 se representan los principales transportadores de cationes alcalinos de *S. cerevisiae* y su localización.

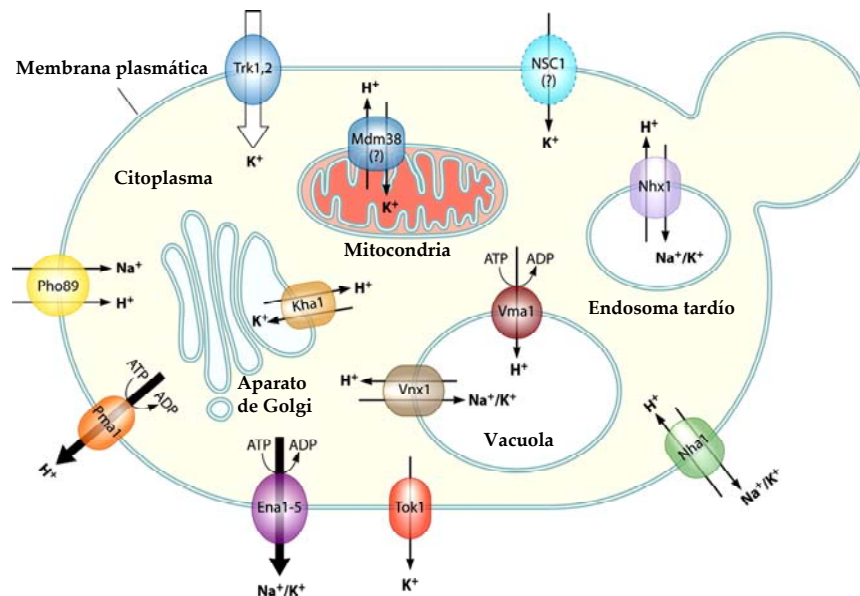


Fig. A13. Principales transportadores de cationes de membrana plasmática e intracelulares en *S. cerevisiae*. Tomado de Ariño y colaboradores (2010).



### 5.1. Conservación de transportadores de cationes alcalinos de levadura en plantas

La mayoría de los transportadores de cationes alcalinos de levadura están conservados a lo largo de la evolución, encontrándose proteínas similares en plantas superiores (Ariño et al., 2010). Una excepción relevante la constituyen los genes *ENA*, que codifican bombas de sodio muy importantes para la tolerancia a sal en *S. cerevisiae* y otros hongos, y que no se encuentran en plantas superiores (Garcia-deblas et al., 2001). Otra excepción es la proteína Vnx1p de levadura, perteneciente a la familia CaCA, descrita como el principal antiportador responsable de la acumulación de cationes alcalinos contra protones en el lumen vacuolar (Cagnac et al., 2007). Además, las plantas han desarrollado otros transportadores que con frecuencia llevan a cabo funciones redundantes, lo que conlleva una situación bastante compleja, sobre todo teniendo en cuenta que el conocimiento actual sobre la homeostasis iónica en plantas superiores no es tan detallado como en levadura (Ariño et al., 2010 y sus referencias).

#### Transportadores de K<sup>+</sup> y ATPasas de eflujo de Na<sup>+</sup>

Las dos familias de transportadores de potasio de membrana plasmática identificadas en levaduras, Trk y Hak, están presentes también en plantas (Gaber et al., 1988; Ko y Gaber, 1991; Bañuelos et al., 1995; Very y Sentenac, 2003). La familia HKT/TRK, equivalente a la familia Trk de levadura, posee una variedad de miembros que median distintos modos de transporte. De entre ellos, se ha propuesto que HKT1 media un uniporte de sodio en raíces (Haro et al., 2005). Además, muchos genes pertenecientes a la familia KUP/HAK son equivalentes a los transportadores Hak de levadura. El gen Hak1 fue identificado en *Debaryomyces occidentalis*, y se demostró que presentaba alta homología con el producto del gen Kup de *E. coli* (Bañuelos et al., 1995). Los genes *HAK* pueden desempeñar distintas funciones dependiendo, por ejemplo, de su localización en la planta. El papel exacto de estos genes en el transporte de potasio no está muy claro, y se ha propuesto que *HAK5* de *Arabidopsis thaliana* o de *Solanum lycopersicum* contribuyen al transporte de potasio de alta afinidad en raíces, y funcionan de un modo similar a las proteínas Hak de levadura (Gierth et al., 2005; Nieves-Cordones et al., 2008).

En relación al eflujo de K<sup>+</sup>, *S. cerevisiae* presenta un único canal rectificador hacia afuera en la membrana plasmática codificado por el gen *TOK1*, que presenta homología de secuencia con los canales TPK (KCO) de plantas, formando parte de la misma familia (Ariño et al., 2010). A diferencia de levadura, la familia TPK (KCO) de plantas está representada por varios miembros (5 en la familia KCO-2P y 1 en la familia KCO-1P, en *Arabidopsis*). A pesar de que la función de estos transportadores

no está muy clara, recientemente se ha demostrado que TPK1 de *A. thaliana* media corrientes de  $K^+$  selectivas entre el citoplasma y la vacuola y participa en la homeostasis del  $K^+$  (Gobert et al., 2007). Otros canales de  $K^+$  de plantas que no están representados en levadura son los pertenecientes a la familia *Shaker*. Además, en plantas se han descrito canales de  $K^+$  rectificadores hacia adentro (AKT1 y KAT1) y hacia afuera (SKOR/GORK) (Very y Sentenac, 2003; Shabala y Cuin, 2008).

Los transportadores Ena, los principales determinantes de halotolerancia en *S. cerevisiae*, no existen en plantas con flores (Garcia-deblas et al., 2001). Por otro lado, se han caracterizado dos  $Na^+$ -ATPasas en el musgo *Physcomitrella patens*, y al menos una de ellas (*PpEna1*), parece una bomba de sodio funcional en *S. cerevisiae* y en algunas especies vegetales muy primitivas (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003; Lunde et al., 2007). Teniendo en cuenta estos resultados, se ha propuesto que las sodio ATPasas tipo Ena estarían presentes en las plantas terrestres primitivas, habiéndose perdido durante la evolución de briófitas a plantas con flores (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003).

### **Antiportadores Cation/Protón**

La mayoría de los antiportadores de membrana plasmática y vacuolar identificados en plantas están relacionados con la subfamilia Nhx1 de levadura (Ariño et al., 2010 y sus referencias), aunque se han identificado homólogos de Kha1 en la subfamilia CHX de plantas localizados en cloroplastos, membranas endosomales y plasmalema (Cellier et al., 2004; Hall et al., 2006; Zhao et al., 2008). Distintos estudios han puesto de manifiesto que varios miembros de la familia NHX son esenciales en la tolerancia a sal en plantas. Así, SOS1, localizado en la membrana plasmática y homólogo funcional de Nha1 de levadura, constituye un sistema de extrusión de sodio muy importante, cuya sobreexpresión mejora el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés salino. De un modo similar, la sobreexpresión del gen *AtNHX1*, que codifica un antiportador  $Na^+/H^+$  vacuolar, mejora la tolerancia a sal en plantas (Apse et al., 1999; Shi et al., 2003).

El estudio de los antiportadores de eucariotas superiores ha avanzado mucho en los últimos años, a menudo impulsado por la expresión de estas proteínas en cepas mutantes de *S. cerevisiae* desprovistas de sus sistemas de transporte propios. Estos estudios de complementación fenotípica se han usado con éxito para caracterizar la localización y función de antiportadores de membrana plasmática de mamíferos y plantas, y de homólogos intracelulares de Nhx1 y Kha1. A pesar de estos avances, debido a la redundancia génica y a las distintas funciones y diferentes niveles de expresión en función del tejido, órgano y fase del desarrollo, es preciso llevar a cabo un estudio más profundo para llegar a comprender el papel de estos antiportadores en organismos multicelulares (Ariño et al., 2010).



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



# 1. MATERIAL BIOLÓGICO

## 1.1. BACTERIAS

### 1.1.1. Cepas utilizadas

En este trabajo se utilizaron las cepas Mach1<sup>TM</sup>T1, ccdB Survival<sup>TM</sup> 2 y NovaBlue de *Escherichia coli* para la amplificación y multiplicación de los plásmidos (Tabla M1).

**Tabla M1. Características de las cepas de *E. coli* utilizadas**

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
Mach1 <sup>TM</sup> T1 <sup>R</sup>	F- $\phi$ 80(lacZ) $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 hsdR(rK-mK+) $\Delta$ recA1398 endA1 tonA	Invitrogen <sup>TM</sup>
ccdB Survival <sup>TM</sup> 2	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 ara $\Delta$ 139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2	Invitrogen <sup>TM</sup>
NovaBlue	endA1 hsdR17(rK12-mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac [F' proA+B+ lacIqZ $\Delta$ M15::Tn10 (Tcr)]	Novagen

### 1.1.2. Cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron en diferentes medios líquidos y sólidos, éstos últimos obtenidos por adición de 15 g/l de bactoagar a los correspondientes medios líquidos (Tabla M2). La esterilización se realizó mediante autoclavado (Autoclave Selecta mod. Presoclave 75 l) a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para la selección de transformantes, los medios de cultivo se suplementaron con distintos antibióticos: Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y Kanamicina (50  $\mu$ g/ml), que se prepararon como soluciones concentradas (10 mg/ml) en agua MilliQ<sup>®</sup>. Las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,45  $\mu$ m (*Pall Corporation*, Ann Arbor, Michigan EE.UU.) y se adicionaron a los medios previamente autoclavados. La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (ESCO modelo LHC-4B1) para evitar la contaminación de los mismos.

Para cultivar las bacterias en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo previo en 3 ml de medio o se inoculó en medio fresco a

una dilución 1/250 un cultivo madre saturado. El cultivo de *E. coli* se incubó durante 16 horas a 37 °C en rotación a 40 rpm.

**Tabla M2. Medios utilizados para el cultivo de bacterias**

MEDIO	COMPOSICIÓN	UTILIDAD
LB	Bacto-triptona 1% (p/v) NaCl 1% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) pH 7,0 con NaOH	Cultivo de <i>E. coli</i>
SOB	Bacto-triptona 2% (p/v) Extracto de levadura 0,5% (p/v) NaCl 10 mM KCl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM pH 6,7-7,0 con NaOH	Cultivo de <i>E. coli</i> para obtención de células competentes
SOC	Bacto-triptona 2% (p/v) Extracto de levadura 0,5 % (p/v) NaCl 10 mM KCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucosa 2%(p/v)	Cultivo de <i>E. coli</i> tras la transformación

### 1.1.3. Obtención de células competentes

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según el método descrito por Inoue y colaboradores (1990). Se inoculó 125 µl de un cultivo saturado de *E. coli* en 250 ml de medio SOB (Tabla M2), incubándose a 18-25 °C y 250 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos, a 4 °C. Al sedimento se le añadió 80 ml de tampón de transformación frío compuesto por 100 mM PIPES (ácido piperacina-N,N'-bis(2-etanosulfónico), 250 mM KCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,70 con KOH) y se incubó en hielo 10 minutos. Después de otra centrifugación a 2500g durante 10 min, se añadió al sedimento resultante 20 ml de tampón de transformación frío y DMSO (Dimetil sulfóxido) hasta una concentración final del 7 %. Se separaron alícuotas de 200 µl que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

#### 1.1.4. Transformación de *E. coli*

Se partió de una alícuota de 200  $\mu$ l de células competentes congeladas a las que se adicionó entre 1-10 ng de plásmido o mezcla de ligación. Las células se incubaron en hielo durante 20 minutos y luego se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 1½ minutos. Seguidamente, se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se añadió 1 ml de medio SOC ó LB (Tabla M2), incubándose el conjunto a 37 °C y en agitación durante al menos una hora. Transcurrido este tiempo, las células se sedimentaron mediante un pulso de centrifugación a 15000 g y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de SOC. Se tomaron alícuotas de 50 y 200  $\mu$ l, que se sembraron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las células que contenían el plásmido.

### 1.2. LEVADURAS

#### 1.2.1. Cepas utilizadas

Se utilizaron diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo los estudios de expresión y caracterización de los transportadores iónicos de plantas (Tabla M3).

Como se ha indicado en los Antecedentes Científicos de esta Memoria, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye un sistema conveniente para la expresión heteróloga de genes eucariotas, ya que se multiplica rápidamente, está bien caracterizada genéticamente y es un sistema eucariota en el que están presentes los mecanismos post-traduccionales de modificación de proteínas. Las células de levadura constituyen sobre todo el modelo de elección para la expresión de proteínas de membrana de plantas, tóxicas en muchos casos en bacterias (Haro et al., 1993; Darley et al., 2000). Por otra parte, la existencia de mutantes desprovistos de los sistemas de transporte propios convierte a las células de levadura en la herramienta ideal para el estudio del transporte y homeostasis de cationes alcalinos así como para el estudio molecular de transportadores de eucariotas superiores (Maresova and Sychrova, 2005).

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este estudio derivan de W303-1B (*Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100*). La cepa ANT3 tiene disrupciones en los sistemas de transporte de Na<sup>+</sup> mayoritarios en levadura: ENA1-4, ATPasas de tipo P responsables de la extrusión de Na<sup>+</sup> y NHA1, un antiportador (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática. La cepa AXT3 tiene además una disrupción en el único antiportador (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> tipo NHX de levadura, Nhx1, y es altamente sensible al NaCl. La cepa WX1 sólo tiene una disrupción en el gen Nhx1. Las cepas AXT4 y KTA 40-2 presentan las mismas disrupciones que AXT3 y además una disrupción en el gen Kha1, un antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de Golgi o



endosomal, que parece regular el pH citoplasmático (Maresova y Sychrova, 2005; Galvez, 2009)

**Tabla M3. Características de las cepas de levadura utilizadas.**

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<b>W303-1B</b>	<i>(Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100)</i>	Wallis et al. (1989)
<b>ANT3</b>	<i>(Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100 Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2)</i>	Quintero et al. (2000)
<b>WX1</b>	<i>(Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100 Δnhx1::TRP1)</i>	Quintero et al. (2000)
<b>AXT3</b>	<i>(Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100 Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2 Δnhx1::TRP1)</i>	Quintero et al. (2000)
<b>AXT4</b>	<i>(Mata leu2-13 112 ura3-1 trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100 Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2 Δnhx1::TRP Δkha::KanMX)</i>	Gálvez (2009)
<b>OC5</b>	<i>(Mat a, ura3-1, leu2-3, trp1-1, his3-11,15, can1-100, ydr456wΔ::HIS3, ynl321w::KanMX6, ydl128wΔ::HphNT1)</i>	Cagnac et al. (2010)
<b>KTA 40-2</b>	<i>(Matα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 mallo ena1Δ::HIS3::ena4Δ nha1Δ::LEU2 nhx1Δ::TRP1 kha1Δ::kanMX)</i>	Maresova y Sychrova (2005)
<b>BY a</b>	<i>(Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0)</i>	Euroscraf
<b>OC11</b>	<i>(Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ydr456wΔ::KanMX4; ydl128wΔ::NatNT2)</i>	Cagnac et al. (2010)

### 1.2.2. Cultivo de levaduras

Todos los medios utilizados para el cultivo de las células de levadura se esterilizaron mediante autoclavado a 1 atmósfera de presión y 110 °C, durante 15 minutos. No obstante, algunos componentes como vitaminas, bases nitrogenadas y antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,45 μm, antes de ser adicionados a los medios previamente autoclavados. La preparación de medios sólidos se realizó mediante adición de 20 g/l de bactoagar al medio líquido correspondiente previo al autoclavado.

Para seleccionar o cultivar levaduras transformadas con plásmidos confiriendo auxotrofías, se cultivaron las cepas en medio mínimo SD (Tabla M4), al que se añadieron los compuestos necesarios para cada cepa a las concentraciones siguientes: Adenina (20 mg/l), Histidina (20 mg/l), Leucina (30 mg/l), Uracilo (20 mg/l) y Triptófano (20 mg/l), o en medio SC-Ura (Tabla M5). En todos los casos los aminoácidos se prepararon como soluciones acuosas concentradas, que fueron autoclavadas posteriormente, o esterilizadas mediante filtración.

**Tabla M4. Composición del medio SD/SG**

Glucosa/Galactosa	20 g/l
YNB <sup>1</sup>	6,7 g/l
MES	3,9g/l

<sup>1</sup>Yeast Nitrogen Base (Difco™)  
pH 5,7 ajustado con Arginina

**Tabla M5. Composición del medio SC-Ura**

Glucosa	20 g/l
YNB	6,7 g/l
Mezcla Drop-out <sup>1</sup>	1,92 g/l
MES	3,9 g/l

<sup>1</sup>Yeast Synthetic Drop-out Medium  
Supplement Without Uracil (Sigma-  
Aldrich®)  
pH 5,7 ajustado con Arginina

Para cultivar levaduras en medios suplementados con cationes alcalinos, se utilizó el medio AP (Tabla M6) (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984), al que se añadió KCl o NaCl a las concentraciones indicadas. En los ensayos de complementación de tolerancia a NaCl, KCl o Higromicina B se utilizaron los medios SD/SG y APD/APG, o el medio rico YPD/YPG (Tabla M7), al que se añadió KCl, NaCl o Higromicina B después del autoclavado. Como fuente de carbono se utilizó glucosa (D, 2%) o galactosa (G, 2%), ya que en algunos casos la expresión de los genes introducidos en los plásmidos utilizados estaba bajo control del promotor GAL1 inducible por galactosa.

**Tabla M6. Composición del medio APD/APG**

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
KCl	1 mM
L-Arginina	10 mM
Glucosa/Galactosa	20 g/l
<b>Elementos traza<sup>1</sup></b>	1 ml
<b>Vitaminas<sup>2</sup></b>	1ml

<sup>1</sup> Elementos Traza		<sup>2</sup> Vitaminas	
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0,8 mM	Biotina	0,80 μM
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,016 mM	Niacina	0,32 μM
KI	0,06 mM	Piridoxina	0,19 μM
Fe <sub>3</sub> Cl <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	0,07 mM	Tiamina	0,12 μM
MnSO <sub>4</sub>	0,26 mM	Ca-Pantotenato	0,08 μM
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub>	0,08 mM		
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,14 mM		

**Tabla M7. Composición del medio YPD/YPG**

Peptona	20 g/l
Glucosa/Galactosa	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l

La temperatura de crecimiento de las levaduras fue de 28 °C. La manipulación de los cultivos en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (Microflow modelo Horizontal 480).

Para cultivar levaduras en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo previo en 3 ml de medio o se inoculó en medio fresco una dilución 1/1000 de un cultivo madre saturado. El cultivo se incubó durante 1 día (medio rico) o 2 días (medio mínimo) en rotación a 40 rpm.

### 1.2.3. Transformación de levaduras

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo de transformación rápida de levadura según Gietz y Woods (2002). Se cultivó un inóculo de 50 μl de levadura en 3 ml de medio YPD líquido y se incubó durante toda la noche a 30 °C en rotación a 40 rpm. El cultivo se centrifugó durante 30 segundos a 15000 g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 100 mM. La suspensión resultante se incubó 5 minutos a 30 °C, se centrifugó de nuevo y al sedimento se adicionó PEG3350 (polietilenglicol) al 35% (p/v), LiAc 0,1 M y 0,28 μg/μl de ADN de cadena simple de esperma de salmón. A continuación se adicionó 0,1-1 μg de plásmido, y agua destilada estéril, hasta un volumen final de 360 μl (Tabla M8), y el conjunto se agitó 1 minuto, incubándose a 42 °C durante 20-60 minutos. Tras centrifugar la mezcla a 15000 g durante 30 segundos, se obtuvo un sedimento celular que se resuspendió en 300 μl de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se sembró en medio sólido SD suplementado con los aminoácidos adecuados o SC-Ura, incubándose a 28 °C durante 3 o 4 días, hasta que se visualizaron colonias.

Tabla M8. Mezcla de transformación

Compuesto	Volumen
PEG 3500 50% p/v	240 $\mu$ l
LiAc 1.0 M	36 $\mu$ l
ADN de cadena simple (2 mg/ml)	50 $\mu$ l
ADN plasmídico (0,1-1 $\mu$ g) + H <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l

### 1.3. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal para los estudios de localización subcelular de los antiportadores AtKEA se utilizó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia.

#### 1.3.1. Germinación de semillas y cultivo de plantas de *Arabidopsis*

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en macetas que contenían turba (*Miracle-Gro*<sup>®</sup>, *Scotts*) y fueron vernalizadas durante 3 días en oscuridad a 4 °C. Transcurrido este tiempo se transfirieron a una cámara de cultivo donde se cultivaron a 20 °C, con una iluminación de 150  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, durante 3-4 semanas (hasta que las hojas estaban bien expandidas y podían ser usadas para el aislamiento de protoplastos del mesófilo).

Alternativamente, las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en placas petri. Para ello, las semillas (aproximadamente 0,1 g) se desinfectaron en una cabina de flujo laminar horizontal, añadiendo 1 ml de etanol al 70% (v/v) a un tubo eppendorf de 1,5 ml e incubándolas en agitación durante un minuto. Una vez retirado el alcohol, se adicionó 1 ml de una solución de hipoclorito sódico al 3,5 % (v/v) conteniendo Tween-20 al 2,5%, manteniéndose en agitación durante 5 minutos. Seguidamente, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en placas Petri de 9 cm de diámetro a razón de 50 semillas por placa. Las placas contenían medio de germinación compuesto por los macro y micronutrientes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y 0,7 % de agar. Una vez sembradas las semillas, éstas se vernalizaron a 4 °C en oscuridad durante 48 horas y, posteriormente se trasladaron a cámaras donde se cultivaron en las mismas condiciones descritas previamente.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. MÉTODOS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 2.1.1. Amplificación por PCR

Los reactivos utilizados para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), las concentraciones de cada uno de ellos y la duración de las distintas etapas de la reacción, dependen del objetivo de la amplificación, la naturaleza de los cebadores utilizados o la enzima ADN polimerasa usada, entre otros factores. De forma general, el protocolo seguido en este trabajo se resume en las tablas M9 y M10

**Tabla M9. Mezcla de PCR**

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
dNTP's	0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
Cebador <i>forward</i>	0,3 $\mu$ M
Cebador <i>reverse</i>	0,3 $\mu$ M
Disolución tampón	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
ADN polimerasa	0,02 U/ $\mu$ l
ADN molde	20 ng-200 ng

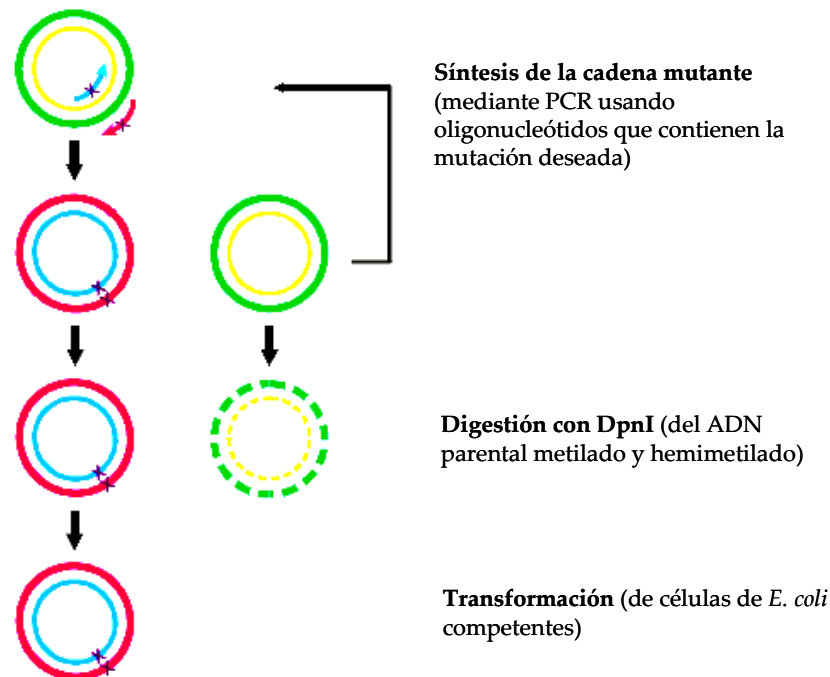
**Tabla M10. Condiciones generales para la amplificación por PCR**

FASE	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
DESNATURALIZACIÓN	1	94	3
AMPLIFICACIÓN	20-25		
Desnaturalización	1	94	0,5
Hibridación	1	50-60	Dependiendo de los cebadores (45 s)
Elongación	1	72	1,5
ELONGACIÓN FINAL	1	72	7
CONSERVACIÓN		4	Tiempo indefinido

El termociclador utilizado fue *Mastercycler personal* (Eppendorf). En este trabajo se han utilizado diferentes polimerasas: *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), *Pfu DNA polymerase* (Promega) y *JumpStart™ Accutag™ LA DNA polymerase mix* (Sigma-Aldrich).

### 2.1.2. Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo usando el protocolo de PCR en dos etapas según Wang y Malcolm (2002), que a su vez es una variación del protocolo *Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis System*, resumido en la figura M1.



**Fig. M1 Método de mutagénesis dirigida según *Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis System*** (Tomado de *Quik Change® II Site-Directed Mutagenesis Kit*)

El protocolo de mutagénesis por PCR en dos etapas, consistió en dos reacciones de extensión llevadas a cabo en dos tubos independientes, uno conteniendo el cebador *forward*, y el otro el *reverse*. A continuación, se mezclaron las dos reacciones en un solo tubo y se siguió el protocolo de *Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis System*.

Para la introducción de mutaciones puntuales, las parejas de cebadores se diseñaron siguiendo las indicaciones del manual del *Kit*, donde  $T_m$  (Temperatura de *melting*) se calcula según la fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ errores de apareamiento}$$

N= longitud del cebador (en bases)

De este modo se diseñaron las parejas de cebadores usadas para llevar a cabo las dos mutagénesis en AtKEA2 (Tabla M11). Como ADN plasmídico molde se usó D-TOPO-AtKEA2.

Las mutagénesis consistieron en la sustitución de un aspartato en posición 166 por una alanina (mutante D166A) y de un glutamato en posición 278 por una lisina (mutante E278K), mediante mutaciones puntuales de uno o varios nucleótidos del codón correspondiente. Además, se introdujeron sitios de restricción silenciosos (HindIII en el mutante D166A y EcoRI en el mutante E278K), sin alterar la secuencia codificante (con ayuda del Software Ape), que aparecen subrayados en la tabla M11.

**Tabla M11. Cebadores usados en la mutagénesis de AtKEA2**

CEBADOR	SECUENCIA
Kea2F-D(166)A	5'-CGGTCTTGCTTTTTTCAAGCTTTGGCTGTGGTCGTGTTAC-3'
Kea2R-D(166)A	5'-GTAACACGACCACAGCCAAAGCTTGAAAAAGCAAGACCG-3'
Kea2F-E(278)K	5'-GCAGAGACTGAATTCTCCTTGCAAGTTAAATCAGATATCGCTCC-3'
Kea2R-E(278)K	5'-GGAGCGATATCTGATTAACTTGCAAGGAGAATTGAGTCTCTGC-3'

Los componentes de la mezcla de PCR y las condiciones de la amplificación para llevar a cabo la primera etapa del protocolo, se enumeran en las tablas M12 y M13.

**Tabla M12. Mezcla de PCR (primera etapa)**

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
dNTP's	0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
Cebador <i>forward/reverse</i>	5 pmol
Disolución tampón	1x
<sup>1</sup> ADN polimerasa	0,02 U/ $\mu$ l
ADN plasmídico	25 ng

<sup>1</sup> Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs); Volumen total de 25  $\mu$ l en cada tubo (se completa con H<sub>2</sub>O MilliQ®)

**Tabla M13. Condiciones para la amplificación por PCR (primera etapa)**

FASE	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
DESNATURALIZACIÓN	1	95	3
AMPLIFICACIÓN	5		
Desnaturalización	1	95	0,5
Hibridación	1	55	1
Elongación	1	68	*
CONSERVACIÓN		4	Tiempo indefinido

\*Tiempo de elongación (minutos) = 2 x longitud del plásmido en Kb (Kilobases)

Una vez realizada la primera PCR, se mezclaron los dos productos en un solo tubo (volumen total de 50 µl) y se llevó a cabo la segunda PCR (Tabla M14).

**Tabla M14. Condiciones para la amplificación por PCR (segunda etapa)**

FASE	CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
AMPLIFICACIÓN	16		
Desnaturalización	1	95	0,5
Hibridación	1	55	1
Elongación	1	68	*
CONSERVACIÓN		4	Tiempo indefinido

\*Tiempo de elongación (minutos) = 2 x longitud del plásmido en Kb

A continuación se adicionó al producto de PCR 5 U de Dpn I, una endonucleasa específica para ADN metilado y hemimetilado, con el fin de digerir el ADN plasmídico de doble cadena usado como molde, y seleccionar el ADN sintetizado que contenía la mutación. Este producto de PCR tratado con Dpn I se usó para transformar células competentes de *E. coli* (*Mach1<sup>TM</sup>T1<sup>R</sup>*), según lo indicado en el apartado 1.1.4. Los plásmidos portadores de las mutaciones deseadas se aislaron y analizaron mediante digestión con enzimas de restricción (HindIII para el mutante D166A y EcoRI para el mutante E278K) y secuenciación, como se indica en los apartados 2.1.8 y 2.1.11.

### 2.1.3. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa

Se ha realizado según se describe en Sambrook y Russell (2001). Para separar fragmentos de ADN se han utilizado geles horizontales de agarosa preparados en solución TBE 0,5x (Tris-borato 45 mM, EDTA-Na (EDTA: ácido etilendiaminotetraacético) 1,25 mM), conteniendo bromuro de etidio (0,4 µg/ml) para visualizar las bandas a la luz ultravioleta. En los casos en los que se requirió la extracción de los fragmentos de ADN del gel para procesamiento posterior (clonaje, secuenciación, etc), se utilizó tampón TAE 1x (Tris/acetato 40 mM, EDTA 0,1 mM pH 8), ya que el borato y las altas concentraciones de EDTA pueden inhibir reacciones enzimáticas posteriores. La concentración de agarosa en los geles fue de 0,7 a 2 %, dependiendo del tamaño del ADN a separar. Las muestras se prepararon en tampón de carga (sacarosa 50 % (p/v), Azul de Bromofenol 0,25 %, EDTA 0,1 M). La separación electroforética se realizó en el mismo tampón utilizado para la preparación del gel, a un voltaje entre 80 y 100 V. El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN comercial (*1 Kb DNA ladder Molecular Weight Marker, Genecraft*).



#### 2.1.4. Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se utilizó *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore), que permite extraer el ADN del gel por un proceso que incluye centrifugación. Para ello, la banda de agarosa que contiene el ADN se depositó en un dispositivo con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Durapore®) y, tras centrifugar a 5000g durante 10 min., se recogió el ADN en el filtrado. Alternativamente, hemos utilizado *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma®). En este caso, las bandas de agarosa conteniendo el ADN son solubilizadas y depositadas en un dispositivo de filtración provisto de una membrana de sílice que retiene el ADN que, seguidamente, se eluye con una solución de Tris (Tris (Hidroximetil) Aminometano) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### 2.1.5. Concentración de ADN por precipitación

Para concentrar ADN por precipitación se usó *Pellet Paint co-precipitant* (Novagen). Se adicionaron 2  $\mu\text{l}$  del producto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M a la mezcla de ácidos nucleicos. Tras mezclar por agitación suave, se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% (ó 1 volumen de isopropanol) y el conjunto se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 15000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento obtenido se lavó 2 veces con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, se resuspendió en el mismo volumen mediante pipeteo y agitación suave y se centrifugó a 15000g durante 5 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 100% y se volvió a centrifugar a 15000g durante 5 minutos. El sedimento de esta centrifugación se secó en una estufa a 37 °C durante 5 minutos y se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O ó tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

#### 2.1.6. Cuantificación del ADN o ARN

La concentración de ADN o ARN se estimó espectrofotométricamente utilizando un *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* o mediante comparación visual al ultravioleta en Analizador de imagen (BioRad) con una cantidad conocida de fago  $\lambda$  digerido con *EcoRI-HindIII (Molecular Weight Marker III, Roche Diagnostic)*.

#### 2.1.7. Aislamiento de plásmidos

Se utilizó el método de *Mini-Prep Sequencing grade* adaptado de Delsal y colaboradores (1988). Se partió de un cultivo de 2 ml de células de *E. coli* incubado a 37 °C en medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0,9-1,0 a 600 nm. El cultivo bacteriano se centrifugó, obteniéndose un sedimento celular que se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de STET (10 % Sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% Tritón X-100).

Se añadió 5 µl de una solución de lisozima al 5 % y se incubó la mezcla 2 minutos a 96 °C. Seguidamente se enfrió en hielo durante 2 minutos y se centrifugó en microcentrífuga a máxima velocidad durante 10 minutos, desechándose el sedimento mucoso. Se adicionó al sobrenadante 2 µl RNasa 1%, y se incubó 10 minutos a 68 °C para eliminar contaminaciones de ARN. Para precipitar el ADN plasmídico se añadió 10 µl de solución CTAB (CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 5% y NaCl 0,5 M), se agitó y se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 300 µl de NaCl 1,25 M y se precipitó nuevamente el ADN, adicionando 750 µl de etanol al 96%. Tras centrifugar en microcentrífuga a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se obtuvo un precipitado que se lavó con 700 µl de etanol al 70 % y se secó a 37 °C durante 10 minutos. El ADN se resuspendió en 20 µl de TE o de H<sub>2</sub>O.

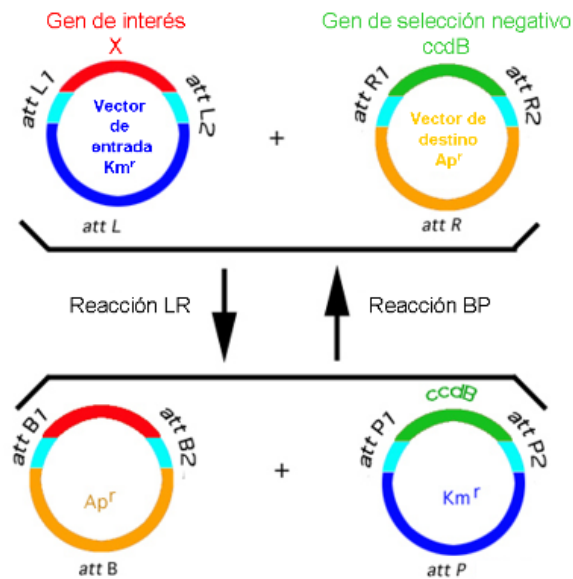
También se llevó a cabo el aislamiento de plásmidos utilizando *Plasmid Midi kit* (QIAGEN; no. 12143) conforme a las instrucciones del fabricante.

### 2.1.8. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron siempre en los tampones y las condiciones recomendadas por los fabricantes. Cuando hubo que digerir con más de una enzima y, en el caso de que no fueran compatibles sus tampones, tras digerir con la primera de las enzimas y después de inactivarla, se precipitó el ADN como se ha especificado en el apartado 2.1.5, pudiéndose tratar a continuación los fragmentos de ADN con la segunda enzima. Las manipulaciones posteriores de los productos de la digestión se realizaron tras separarlos mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (apartado 2.1.3) y extraerlos según se ha indicado en el apartado 2.1.4.

### 2.1.9. Clonaje de fragmentos de ADN

El clonaje de los fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando la tecnología *Gateway*, la cual permite introducir el gen de interés de una manera sencilla en distintos sistemas de análisis funcional, manteniéndose la orientación y el marco de lectura con una alta eficacia y eliminándose la necesidad de secuenciaciones secundarias o de subclonaje después de haber introducido el gen en un vector de entrada. Esta tecnología está basada en las propiedades de integración y escisión del bacteriófago lambda en el genoma de *E. coli* por recombinación. En el sistema *Gateway*, las reacciones de integración y escisión se llevan al cabo *in vitro*, según se explica en la Fig M2.



**Fig M2. Clonaje utilizando la tecnología Gateway.** El gen a transferir está clonado en un vector de entrada, flanqueado por dos sitios de recombinación attL1 y attL2. El vector de destino contiene todos los elementos necesarios para la expresión del gen de interés, así como dos sitios de recombinación attR1 y attR2 que flanquean el gen de selección negativo ccdB. Tomado de [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

La reacción *attL* x *attR* está catalizada por la mezcla de enzimas Gateway® LR *Clonase*<sup>TM</sup> II. La mezcla contiene, por un lado, las enzimas implicadas en la recombinación del bacteriófago lambda, la Integrasa (Int) y la Escisionasa (Xis), y por otro lado, el Factor de Integración en el Hospedador (IHF) de *E. coli*.

Para generar los vectores de entrada hemos utilizado pENTR/D-TOPO y pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), que permiten el clonaje de forma dirigida de productos de PCR entre los sitios de recombinación attL1 y attL2 (Fig M2). Ambos vectores linearizados tienen asociados de forma covalente una Topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, habiéndose añadido la secuencia GTGG a uno de los extremos 5' (Fig M3). Este extremo permite la clonación de forma orientada de los productos de PCR generados, utilizando un cebador *forward* al que se ha añadido la secuencia CACC. El extremo GTGG del vector linearizado se une a las bases complementarias CACC del producto de PCR, permitiendo la ligación orientada por la Topoisomerasa I.

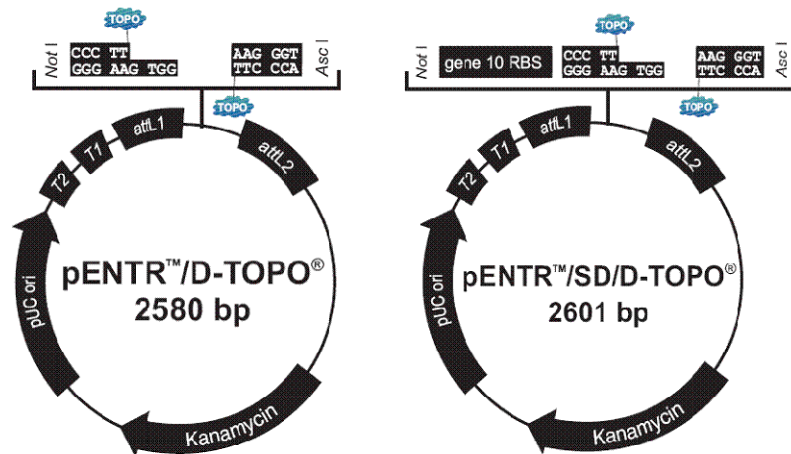


Fig M3. Mapas de los vectores pENTR™/D-TOPO® y pENTR™/SD/D-TOPO®

La clonación se realiza siguiendo las instrucciones especificadas en el [pENTR/SD/D-TOPO® Cloning Kit](#) y la selección se lleva a cabo con células competentes *E coli* Mach1™ en medio LB suplementado con 50 µg/ml Kanamicina. Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla M15; y los vectores de entrada usados en este trabajo se enumeran en la tabla M16.

Tabla M15. Cebadores usados en la clonación de AtKEA1, AtKEA2, AtKEA3 y AtKEA6 en pENTR/D-TOPO o pENTR/SD/D-TOPO

CEBADOR	SECUENCIA
AtKEA1 forward	5'-CACCATGATCCCTCACCAGGAGGTC-3'
AtKEA1 sin stop reverse	5'-GATTACGACTGTGCCTCCTTCG-3'
AtKEA1 stop reverse	5'-TCAGATTACGACTGTGCCTCCT-3'
AtKEA2 forward	5'-CACCATGTTCCCTCAGCAAGAGGT-3'
AtKEA2 sin stop reverse	5'-GATAGCGAGTGTGCCTTCAAT-3'
AtKEA2 stop reverse	5'-TTAGATAGCGAGTGTGCCTTCAAT-3'
AtKEA3 forward	5'-CACCATGAGTAGTAATGACTGGCC-3'
AtKEA3 sin stop reverse	5'-AACGATTTTATTGACAAAA-3'
AtKEA3 stop reverse	5'-TCAAACGATTTTATTGACAAA-3'
AtKEA6 forward	5'-CACCATGGTGAAGGAAGAAGAAG-3'
AtKEA6 sin stop reverse	5'-GGAGCTGTGGGATTGACGTGA-3'
AtKEA6 stop reverse	5'-TTAGGAGCTGTGGGATTGACG-3'

Tabla M16. Vectores de entrada

VECTOR	CONSTRUCCIÓN	UTILIDAD DE LA CONSTRUCCIÓN
D-TOPO	AtKEA1	Clonación en Topo de AtKEA1 sin codón de stop
	AtKEA1+stop	Clonación en Topo de AtKEA1 con codón de stop
	AtKEA2	Clonación en Topo de AtKEA2 sin codón de stop
	AtKEA2 D166A	Clonación en Topo de AtKEA2 con la mutación D166A sin codón de stop
	AtKEA2 E278K	Clonación en Topo de AtKEA2 con la mutación E278K sin codón de stop
	AtKEA2+stop	Clonación en Topo de AtKEA2 con codón de stop
	AtKEA3	Clonación en Topo de AtKEA3 sin codón de stop
	AtKEA3+stop	Clonación en Topo de AtKEA3 con codón de stop
	AtKEA6	Clonación en Topo de AtKEA6 sin codón de stop
	AtKEA6+stop	Clonación en Topo de AtKEA6 con codón de stop
SD/D-TOPO	AtKEA1+stop	Clonación en Topo de AtKEA1 con codón de stop
	AtKEA2+stop	Clonación en Topo de AtKEA2 con codón de stop

### 2.1.10. Creación de vectores de expresión por recombinación entre el vector de entrada y el vector de destino

Una vez clonado el gen de interés en el vector de entrada, se puede dirigir a diferentes vectores de destino mediante recombinación específica y así llevar a cabo diversos experimentos de análisis funcional y de expresión de proteínas. Los vectores de destino usados en este trabajo se relacionan en la tabla M17. Para llevar a cabo la reacción de recombinación se siguieron las instrucciones de *Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix*. La selección de las colonias transformadas se llevó a cabo con células competentes de *E. coli* Mach1™ cultivadas durante al menos 5 horas en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados dependiendo del plásmido. A partir de las colonias transformadas se llevó a cabo el aislamiento del plásmido por el método ya descrito en el apartado 2.1.7.

Tabla M17. Vectores de destino

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pYES-DEST52	Vector de expresión en levadura bajo el control del promotor <i>Gal1</i>	Invitrogen™
pDR196	Vector de expresión en levadura bajo el control del promotor PMA1	Rentsch et al. (1995)
pFGWDR196	Vectores de expresión en levadura bajo el control del promotor PMA1, con eGFP, usados para la localización en levadura	Li et al. (2008)
pGWFD196		
p2FGW7,0	Vectores de expresión en planta bajo el control del promotor <i>Gal1</i> , con eGFP, usados para la localización en protoplastos del mesófilo de <i>Arabidopsis</i>	Karimi et al. (2005)
p2GWF7,0		
pRS306-Gal1-ccdb-V5-6xHis	Vector de expresión en levadura bajo el control del promotor <i>Gal1</i> , usado en los estudios de medida de transporte en vacuolas	Cagnac et al. (2010)
pAG306-Gal1-ccdb-eYFP	Vectores de expresión bajo el control del promotor <i>Gal1</i> , con eYFP, usados para la localización en levadura	<a href="http://www.addgene.org/yeast_gateway">http://www.addgene.org/yeast_gateway</a>
pAG306-Gal1-eYFP-ccdb		

### 2.1.11. Secuenciación

Para determinar la secuencia de los cDNAs completos o fragmentos de cDNAs purificados, y para comprobar que no se habían producido errores en el proceso de construcción de los distintos plásmidos, se llevaron a cabo reacciones de secuenciación, utilizando 6,4 pmol de un oligonucleótido específico y una cantidad de ADN entre 0,4 y 1,0 µg. La secuenciación fue realizada por los servicios científicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada).

## 2.2. CONSTRUCCIONES GÉNICAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS FUNCIONALES

Todas las construcciones utilizadas en este trabajo se enumeran en la tabla M18.

### 2.2.1. Construcciones para expresión en levadura.

Los genes de interés clonados en el vector TOPO se integraron en distintos vectores de destino mediante recombinación específica para poder así llevar a cabo estudios de análisis funcional, de expresión de proteínas y de localización subcelular. Para ello se utilizó la tecnología *Gateway* descrita en el apartado 2.1.10. Los vectores de destino utilizados en los estudios de expresión de los antiportadores en *Saccharomyces cerevisiae* son pYES-DEST52 (Fig. M4), pRS306-Gal1-ccdb-V5-6xHis (Cagnac et al., 2010), dos vectores de destino pAG (Alberti et al., 2007), concretamente pAG306-Gal1-ccdb-Eyfp y pAG306-Gal1-eYFP-ccdb ([http://www.addgene.org/yeast\\_gateway](http://www.addgene.org/yeast_gateway)) y dos vectores de destino derivados de pDR196 (Rentsch et al., 1995), concretamente pFGWDR196 y pGWFDR196 (Li et al., 2008), basados en la tecnología *Gateway* (Tabla M17).

El vector pYES-DEST52 contiene el promotor *Gal1* de levadura. Este promotor induce la transcripción en presencia de galactosa y la inhibe en presencia de glucosa, de manera que se produce la expresión de los genes en medio suplementado con galactosa. Para facilitar el clonaje, el vector presenta el cassette de recombinación de *Gateway*<sup>®</sup>, constituido por dos sitios de recombinación, *attR1* y *attR2*, flanqueando el gen de resistencia a cloranfenicol, Cm<sup>R</sup>, y el gen de selección negativa *ccdB*, que posibilitan una eficiente recombinación con un gen clonado entre los sitios de recombinación *attL* en un *attL-flanked Gateway*<sup>®</sup> *entry vector* como D-TOPO o SD/D-TOPO. Para poder identificar y purificar la proteína expresada en levadura, el vector permite la fusión del extremo C-terminal de la proteína codificada por el gen clonado con una secuencia que codifica un epítipo V5 y una secuencia de 6 histidinas. Dicho vector presenta un origen de replicación de alto número de copias en levadura (2 $\mu$ ). Así mismo, el vector contiene un gen que codifica resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de las células transformadas con la construcción, y también el gen URA3 para la selección auxotrófica en un medio mínimo sin uracilo. Este vector ha sido utilizado en los estudios de expresión de AtKEA1, AtKEA2, AtKEA3 y AtKEA6 en levadura.

El vector pRS306-Gal1-ccdb-V5-6xHis (Cagnac et al., 2010), es una modificación del vector integrativo pRS306 (Sikorski and Hieter, 1989). Contiene el *cassette* de recombinación de *Gateway*<sup>®</sup>, el epítipo V5 y una secuencia de 6 Histidinas.

En el caso de pAG306-Gal1-ccdb-eYFP y pAG306-Gal1-eYFP-ccdb, se realizó una fusión de las construcciones génicas correspondientes a AtKEA1 y AtKEA2 con la secuencia que codifica la proteína eYFP. Ambos vectores contienen el promotor *Gal1* y el gen eYFP (*Yellow Fluorescent Protein*) (Ormo et al., 1996; Wachter and Remington, 1999) que codifica una proteína fluorescente que se fusiona con la proteína de interés en el extremo C-terminal (en el caso de pAG306-Gal1-ccdb-eYFP) o en el extremo N-terminal (en el caso de pAG306-Gal1-eYFP-ccdb). En los vectores pFGWDR196 y pGWFDR196, las construcciones génicas correspondientes a AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA6, se fusionaron con la secuencia que codifica la proteína GFP. Estos dos vectores contienen el promotor *Gal1* y el gen eGFP (*Green Fluorescent Protein*) (Cormack et al., 1996) que codifica una proteína fluorescente que se fusiona con la proteína de interés en el extremo C-terminal (en el caso de pGWFDR196) o en el extremo N-terminal (en el caso de pFGWDR196). Estos cuatro vectores además contienen el cassette de recombinación de *Gateway*<sup>®</sup> y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las células transformadas con la construcción.

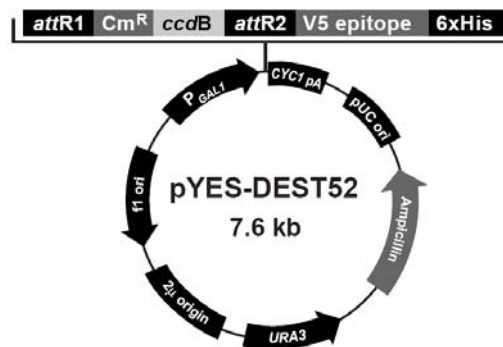


Fig M4. Mapa del vector pYES-DEST52

### 2.2.2. Construcciones para expresión en planta.

Para los estudios de localización subcelular de AtKEA1, 2 y 6 se realizó una fusión de las construcciones génicas correspondientes a cada uno de los transportadores con la secuencia que codifica la proteína GFP. Se han utilizado vectores basados en la tecnología *Gateway*, concretamente los vectores p2GWF7 y p2FGW7 (Karimi et al., 2005); <http://www.psb.ugent.be/gateway/>), que permiten llevar a cabo experimentos de localización transitoria en células vegetales. Ambos vectores contienen el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor, el gen eGFP (GFPmut1, (Cormack et al., 1996) que se fusiona con la secuencia génica que codifica la proteína de interés en el extremo C-terminal (en el caso del vector p2GWF7) o en el extremo N-terminal (en el caso del vector p2FGW7), el cassette de recombinación



de Gateway® y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las células transformadas con la construcción.

**Tabla M18. Listado de construcciones génicas utilizadas en este trabajo**

Vector	Construcción	Utilidad de la construcción
pYES-DEST52	AtKEA1	Expresión en levadura de AtKEA1 sin codón de stop
	AtKEA1+Stop	Expresión en levadura de AtKEA1 con codón de stop
	AtKEA2	Expresión en levadura de AtKEA2 sin codón de stop
	AtKEA2+Stop	Expresión en levadura de AtKEA2 con codón de stop
	AtKEA2 D166A	Expresión en levadura de AtKEA2 con la mutación D166A sin codón de stop
	AtKEA2 E278K	Expresión en levadura de AtKEA2 con la mutación E278K sin codón de stop
pDR196	AtKEA1+Stop	Expresión en levadura de AtKEA1 con codón de stop
	AtKEA2+Stop	Expresión en levadura de AtKEA2 con codón de stop
p2GWF7,0	AtKEA1	Localización de AtKEA1 con GFP en C-terminal en protoplastos de <i>Arabidopsis</i>
	AtKEA2	Localización de AtKEA2 con GFP en C-terminal en protoplastos de <i>Arabidopsis</i>
	AtKEA6	Localización de AtKEA6 con GFP en C-terminal en protoplastos de <i>Arabidopsis</i>
p2FGW7,0	AtKEA1+stop	Localización de AtKEA1 con GFP en N-terminal en protoplastos de <i>Arabidopsis</i>
	AtKEA2+stop	Localización de AtKEA2 con GFP en N-terminal en protoplastos de <i>Arabidopsis</i>
	AtKEA6+stop	Localización de AtKEA6 con GFP en N-terminal en protoplastos de <i>Arabidopsis</i>
pRS306-Gal1-ccdb-V5-6xHis	AtKEA1	Expresión en levadura de AtKEA1 sin codón de stop
	AtKEA2	Expresión en levadura de AtKEA2 sin codón de stop
pAG306-Gal1-ccdb-eYFP	AtKEA1	Localización de AtKEA1 con YFP en C-terminal en células de levadura
	AtKEA2	Localización de AtKEA2 con YFP en C-terminal en células de levadura
pAG306-Gal1-eYFP-ccdb	AtKEA1	Localización de AtKEA1 con YFP en N-terminal en células de levadura
	AtKEA2	Localización de AtKEA2 con YFP en N-terminal en células de levadura
pFGWDR196	AtKEA1	Localización de AtKEA1 con GFP en C-terminal en células de levadura
	AtKEA2	Localización de AtKEA2 con GFP en C-terminal en células de levadura
	AtKEA6	Localización de AtKEA6 con GFP en C-terminal en células de levadura
pGWFD196	AtKEA1+stop	Localización de AtKEA1 con GFP en N-terminal en células de levadura
	AtKEA2+stop	Localización de AtKEA2 con GFP en N-terminal en células de levadura
	AtKEA6+stop	Localización de AtKEA6 con GFP en N-terminal en células de levadura

## 2.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS ANTIPORTADORES EN LEVADURA

Para llevar a cabo los estudios de complementación de *nhx1Δ* y *kha1Δ* se utilizaron las cepas WX1, AXT3, AXT4 y KTA 40-2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla M3) transformadas con los plásmidos para la expresión de los antiportadores en levadura (Tabla M18), siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.3.

### 2.3.1. Determinación del crecimiento por el método de goteo (*Drop test*)

Se analizó, mediante *drop test*, la capacidad de las distintas cepas de levadura transformadas con las construcciones plasmídicas portadoras de AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA3 y con los vectores vacíos (usadas como control negativo) para crecer en medios suplementados con NaCl, KCl e Higromicina B y en medios con distinto pH. Para ello, se cultivó 1 ml de un inóculo de las distintas cepas en medio selectivo SD durante un día a 30 °C, hasta alcanzar una DO a 660 nm de aproximadamente 1,0. A continuación, los cultivos se diluyeron hasta 6 ml con el mismo medio sin glucosa y se cultivaron durante 18 h a 30 °C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con 6 ml de agua destilada estéril, se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en el mismo volumen de agua estéril. Se ajustó la densidad de los cultivos a 0,2 (medida a 660 nm) y se realizaron diluciones seriadas 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> con agua destilada estéril, sembrándose una alícuota de 5 μl de cada una de las diluciones sobre placas de medios sólidos YPD/YPG, APD/APG o SD/SG suplementados con NaCl, KCl o Higromicina B. Después de dos a cinco días de cultivo a 30 °C, las placas se fotografiaron usando el analizador de imagen Gel Doc 2000 (*Bio-Rad Molecular Imagen System*).

### 2.3.2. Determinación del contenido iónico en levaduras

La determinación del contenido iónico intracelular total, citoplasmático y vacuolar, se llevó a cabo siguiendo el protocolo utilizado por Venema y colaboradores (2003).

Se utilizaron para el estudio las cepas ANT3 y AXT3 (Tabla M3) transformadas con el vector pYES-DEST52 (controles) y con las construcciones para la expresión de los transportadores AtKEA (Tabla M18).

Como medio de cultivo se utilizó APG (Tabla M6) suplementado y sin suplementar con 20 mM de NaCl.

#### 2.3.2.1. Contenido iónico intracelular total

Se inoculó una colonia de levadura en 3 ml de medio APG (con ó sin NaCl) y se cultivó a 30 °C hasta alcanzar una DO a 660 nm de aproximadamente 1,0. Este cultivo se diluyó en 250 ml del mismo medio hasta conseguir una DO a 660 nm de

0,01, cultivándose a 30 °C y con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO a 660 nm de  $0,25 \pm 0,01$ . Una vez alcanzada esta densidad celular se tomaron tres fracciones del cultivo de 50 ml cada una y se centrifugaron a  $3000 \times g$  durante 2 minutos. El sedimento obtenido se lavó dos veces con 10 ml de solución A fría ( $MgCl_2$  10 mM;  $CaCl_2$  10 mM y HEPES (Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico) 1 mM). Las células lavadas se resuspendieron en 2 ml de la solución A y se determinó la relación entre la DO a 660 nm y el peso seco de las levaduras (Figura M5). Los iones intracelulares se extrajeron mediante la adición de HCl, hasta una concentración final de 0,4 % e incubación a 95 °C durante 20 minutos. A continuación se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a  $3000 \times g$  durante 2 minutos y se determinó el contenido de sodio y potasio en el sobrenadante mediante ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).

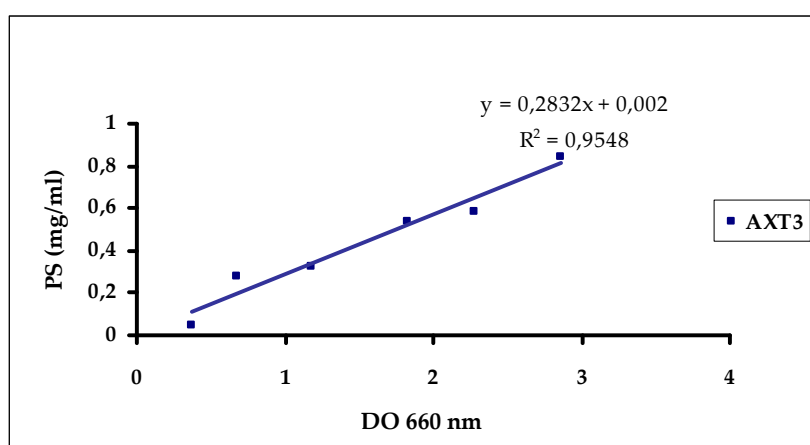


Fig. M5. Relación entre el peso seco de las células de levadura y la  $DO_{660}$

### 2.3.2.2. Contenido iónico vacuolar y citoplasmático

El contenido vacuolar y citoplasmático de  $Na^+$  y  $K^+$  se determinó mediante el tratamiento de las células de levadura con citocromo c, que permeabiliza de manera selectiva la membrana plasmática (Okorokov et al., 1980; Ramos et al., 1990).

Las levaduras se cultivaron y se lavaron con tampón A como se indica en el apartado 2.3.2.1. Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de solución B (Antimicina A 18  $\mu$ g/ml;  $MgCl_2$  10 mM;  $CaCl_2$  10 mM; 2-desoxi D-glucosa 5 mM y HEPES 1 mM) a la que se adicionó citocromo c hasta una concentración final de 2%, y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se precipitaron mediante centrifugación a  $3000 \times g$  durante 2 minutos, y se lavaron 3 veces con 2 ml de solución B. A continuación, los sobrenadantes se agruparon para determinar el

contenido iónico citoplasmático mediante ICP-OES. Los sedimentos (correspondientes a la fracción vacuolar) se resuspendieron en 2 ml de agua Milli Q® y 0,4% de HCl y se incubaron durante 20 minutos a 95 °C. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 3000 x g durante 2 minutos y se determinó el contenido en Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en el sobrenadante mediante o ICP-OES.

### 2.3.3. Extracción de proteínas totales de levadura

Se partió de 1 ml de un cultivo de levadura en medio selectivo SD con una DO a 660 nm de aproximadamente 1,0. Las células se precipitaron mediante centrifugación a 12000 g durante 30 segundos y el sedimento se resuspendió en 500 µl de agua. Con el fin de lisar las levaduras, se adicionó 50 µl de una solución que contenía NaOH 1,85 M y 3,5 % de β-mercaptoetanol y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 4°C. Para llevar a cabo la precipitación de las proteínas totales, se adicionó a la mezcla TCA (Ácido tricloroacético) 5% (p/v), y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 20 µl de una solución de tris 1 M, y después en 20 µl de Laemmli *Buffer* 2X (Laemmli, 1970).

### 2.3.4. Aislamiento de vacuolas

El aislamiento de vacuolas intactas de levadura se llevó a cabo según se describe en Ohsumi y Anraku (1981) y se resume en la Figura M6.

Las vacuolas se aislaron de la cepa de levadura OC4 (Tabla M3), transformada con las construcciones plasmídicas portadoras de AtKEA1 y AtKEA2 (Tabla M18). Para ello se inocularon 500 µl de un precultivo saturado preparado en medio YPD en 500 ml de medio YPG, y se cultivó durante 18 horas, a 30 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación a 4000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor *FiberLite* F14) durante 5-10 minutos y el sedimento se resuspendió en 50 ml de tampón de digestión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y sorbitol 1,2 M). A continuación, se adicionaron 50 mg de zimoliasa (*Zymolyase-20T*, *Seikagaku-America*) y 1 mM de β-mercaptoetanol y se agitó a 80 rpm durante 1 hora, a 30 °C. Transcurrido este tiempo, los esferoblastos se precipitaron mediante centrifugación a 3000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor *FiberLite* F14) durante 5 minutos, a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 90 ml de tampón de digestión frío y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores (este paso se repitió dos veces). A los esferoblastos precipitados se les añadió 25 ml de tampón A (MES-Tris 10 mM, pH 6,9; Ficoll-400 12%; MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM y 1/200 (v/v) de *cocktail* de inhibidores de proteasas *Cocktail Anti-protease His*, Sigma) y se mezcló bien con la ayuda de una pipeta Pasteur desechable, y con un homogeneizador de vidrio (para incrementar la lisis). El homogeneizado se incubó 20 minutos en hielo y a continuación se transfirió a tubos de ultracentrífuga (*Beckman Ultra-clear centrifuge tubes 25x89 mm*, para el

rotor SW-28) previamente enfriados. Se adicionó una sobrecapa de tampón A hasta completar los tubos y se centrifugó a 24000 rpm ( $\pm$  76000g) durante 60 minutos (centrífuga Beckman, rotor SW-28). Tras esta centrifugación, las vacuolas, flotando en la superficie, se recogieron con una espátula y se transfirieron a nuevos tubos de ultracentrífuga que contenían 10 ml de tampón A, donde se resuspendieron. Se adicionó una sobrecapa de aproximadamente 20 ml de tampón B (MES-Tris 10 mM, pH 6,9; Ficoll-400 8%; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM y 1/1000 (v/v) de *cocktail* de inhibidores de proteasas), y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Las vacuolas se recogieron con una espátula (como se ha explicado anteriormente) y se resuspendieron en 1-2 ml de tampón C (MES-Tris 10 mM, pH 6,9 y 1/1000 (v/v) de *cocktail* de inhibidores de proteasas).

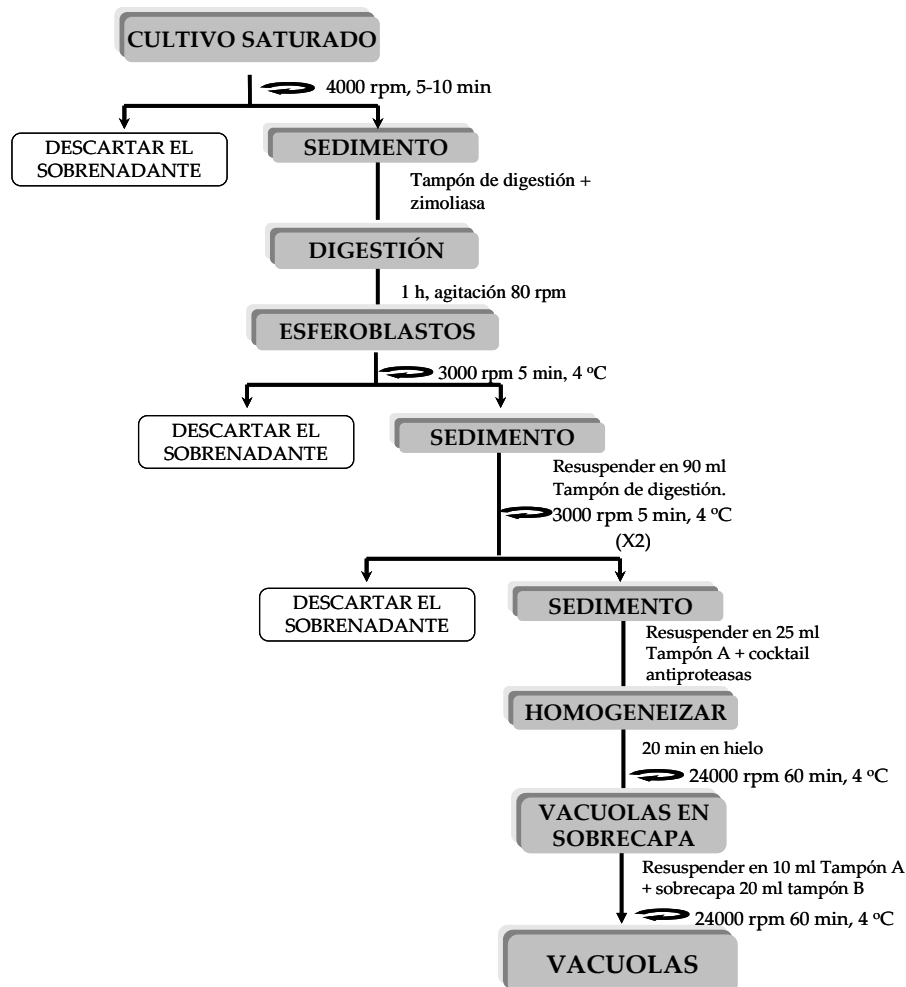


Fig. M6. Esquema de la metodología seguida para la obtención de vacuolas intactas a partir de células de levadura.

### 2.3.5. Aislamiento de microsomas

Las membranas microsomales se aislaron de levaduras de la cepa W303-1B transformada con las construcciones génicas que codifican las proteínas recombinantes AtKEAs con el epítipo V5 y una secuencia de seis histidinas en el vector pYES-DEST52. Estas membranas se utilizaron para llevar a cabo estudios de inmunodetección y para purificar las proteínas de fusión, utilizando para ello sistemas de detección de la cola de histidinas asociada al extremo C-terminal de los transportadores.

Para llevar a cabo estos experimentos, se inoculó 5 ml de un precultivo saturado preparado en medio selectivo SC sin Uracilo en 5 l de medio APG suplementado con Adenina (20 mg/ml), Histidina (20 mg/ml), Leucina (30 mg/ml) y Triptófano (20 mg/ml), y se cultivó durante dos días a 30 °C y con una agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una DO a 660 nm de aproximadamente 0,6-1,0 (equivalente a unos 20 g de peso fresco de levaduras). El procedimiento de obtención de membranas microsomales se resume en la Figura M7.

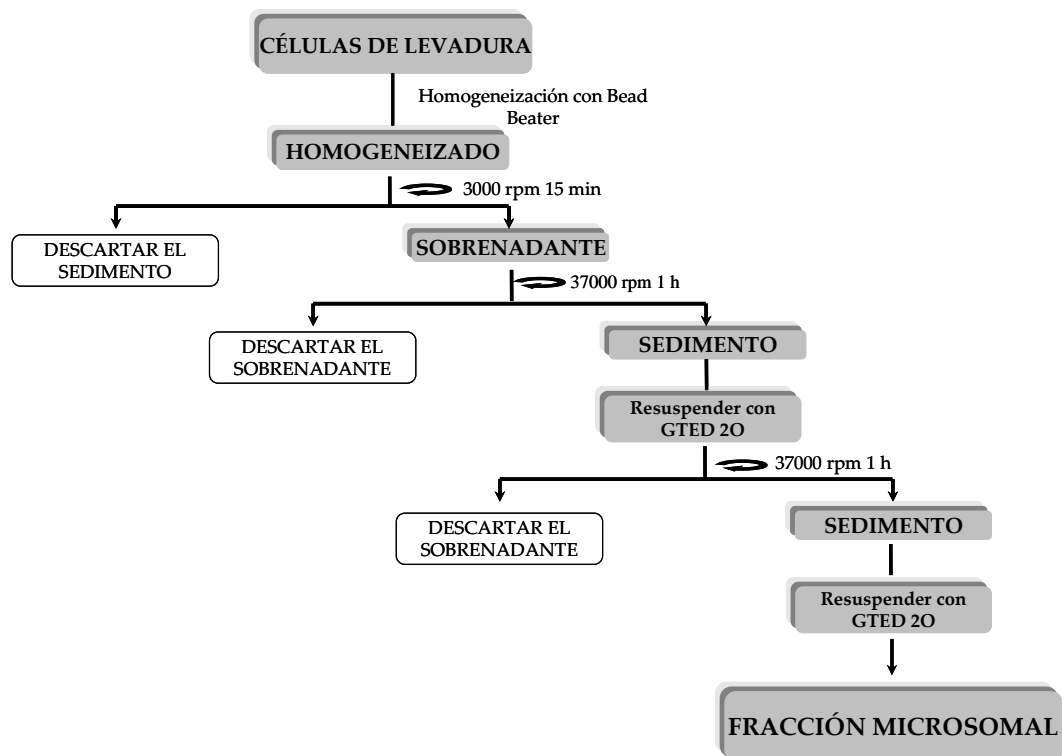


Fig. M7. Esquema de la metodología seguida para la obtención de membranas microsomales a partir de células de levadura.

Las células se sedimentaron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos (centrífuga Sorvall, rotor *FiberLite* F10). El sedimento obtenido se lavó con agua destilada fría y se volvió a centrifugar. Las células se resuspendieron en 200 ml de una mezcla fría de Tris HCl 0,2 M pH 8,0; KCl 150 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> 15 mM pH 8,0; DTT 10 mM y 1 ml de *cocktail* inhibidor de proteasas (50 mg/ml AEBSF (Clorhidrato de fluoruro 4-(2-Aminoetil bencenosulfonio), 1 mg/ml Pepstatina A, 1 mg/ml Bestatina, 0,5 mg/ml E64, 1 mg/ml Fenantrolina) y 0,5 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonio). Las células se transfirieron a un homogeneizador *Beadbeater* (Biospec) al que se adicionaron bolas de vidrio de 425-600 µm de diámetro (Sigma) hasta cubrir las aspas y se rompieron mediante tres pulsos de 45 segundos cada uno, con un intervalo de reposo en hielo de un minuto entre los pulsos. El homogeneizado se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor *FiberLite* F14), obteniéndose un sobrenadante que se volvió a centrifugar a 37000 rpm durante 1 hora (centrífuga Beckman, rotor 70Ti). El sedimento resultante se resuspendió en 25 ml de GTED20 (Glicerol al 20 %; 0,1M Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA-(Na)<sub>2</sub>; 0,1 mM DTT), 150 mM KCl y 30 µl del *cocktail* de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail for use in purification of Histidine-tagged proteins*, P8849 de Sigma®). Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, obteniéndose un sedimento que se resuspendió en 5 ml de la mezcla antes descrita y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Todo el proceso de aislamiento de membranas microsomales se llevó a cabo a 4 °C.

### 2.3.6. Purificación de proteínas

La composición de las soluciones usadas en la purificación de las proteínas de fusión se describe en la Tabla M19.

**Tabla M19. Soluciones utilizadas para la purificación de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad.**

	Tampón de solubilización	Tampón de lavado 1	Tampón de lavado 2	Tampón de elución
*(K <sub>2</sub> H-KH <sub>2</sub> )PO <sub>4</sub> / NaCl, pH 5,6	50 mM/0,5 M	50 mM/0,5 M	50 mM/0,5 M	-----
Imidazol-PO <sub>4</sub> pH 7,42	10 mM	20 mM	50 mM	200 mM
Glicerol	20%	10%	10%	20%
Dodecil Maltósido	0,5%	0,075%	0,075%	-----
PMSF	0,2 mM	-----	-----	-----
BTP-MES <sup>1</sup> , pH 7,5	-----	-----	-----	50 mM
<i>Cocktail</i> inhibidor de proteasas	0,2%	0,2%	0,2%	0,4%

\*Al diluirlo 10 veces el pH es de 6,5

<sup>1</sup>Bis-Tris Propano-(ácido 2(N-morfolino) etanosulfónico

Las proteínas AtKEA etiquetadas con una secuencia de 6 histidinas, se solubilizaron con un detergente y se purificaron a partir de microsomas de células de levadura transformadas con los genes de *Arabidopsis*, mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni<sup>2+</sup> (Venema et al., 2002; Venema et al., 2003).

Para la solubilización de las proteínas de la fracción de membrana microsomal se usó el detergente n-Dodecil β-D-maltósido. Para ello, 5 ml de fracción microsomal (aproximadamente 40 mg de proteínas) se mezcló con 45 ml de tampón de solubilización (Tabla M19) y se agitó durante 30 minutos a 4 °C. El material insolubilizado se eliminó mediante centrifugación a 37000 rpm (centrífuga Beckman, rotor 70Ti) durante 30 minutos. Al sobrenadante resultante se le añadió 2 ml de una suspensión de Ni-NTA (Níquel-Ácido nitrilotriacético), dejando la mezcla en agitación suave en un balancín durante toda la noche a 4 °C para favorecer la unión de las proteínas al Ni<sup>2+</sup>. Al día siguiente, el conjunto se centrifugó a 2000 rpm (centrífuga Martin Christ, modelo UJ1S), la resina se transfirió a una columna de polipropileno, con un diámetro de 0,5 cm y el tampón residual se dejó eluir por gravedad para empaquetar la resina en la columna. La columna se lavó con 16 ml de tampón de lavado 1 y con 4 ml de tampón de lavado 2, en orden creciente con respecto a la concentración de imidazol para reducir la unión de proteínas contaminantes a la resina de Ni<sup>2+</sup> (Tabla M19). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con tampón de elución (Tabla M19), en 8 fracciones de 175 µl cada una. Se comprobó la pureza de las proteínas por electroforesis en SDS-PAGE de alícuotas de 5 µl de las fracciones recogidas. En general, la proteína purificada se eluyó en las fracciones 3, 4 y 5.

### **2.3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (N-dodecil sulfato sódico), se realizó según (Laemmli, 1970) usando 5-25 µg de proteínas microsomales ó 1-5 µg de proteínas purificadas, resuspendidas en tampón GTED20. Una vez adicionado el tampón de carga a la solución de proteínas, la mezcla se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 10-30 minutos, para solubilizar las proteínas. Cuando fue necesario concentrar las proteínas, se realizó una precipitación con TCA al 11%. Para ello, una vez adicionado el TCA a la solución de proteínas, se incubó la mezcla durante 20 minutos en hielo y se centrifugó a 14000 rpm (Centrífuga Eppendorf de mesa) durante 15 minutos, a 4 °C. El precipitado se lavó con H<sub>2</sub>O destilada para eliminar los restos de TCA, y se resuspendió como se ha descrito anteriormente.

En este trabajo todos los geles utilizados estaban compuestos por un gel separador al 10% de poliacrilamida junto con un gel concentrador al 4% de poliacrilamida. Las electroforesis se realizaron en un equipo Mini-Protean-3™ de



Bio-Rad para geles de 8 x 7,3 cm y 0,75 mm de espesor, a temperatura ambiente y voltaje constante de 100 V.

#### 2.3.8. Tinción de proteínas separadas por electroforesis

La visualización de las proteínas separadas por SDS-PAGE se llevó a cabo mediante tinción con Azul Coomassie o con SYPRO®Ruby Protein Gel Stain (Biorad). En el caso de tinción con Coomassie, los geles se fijaron y tiñeron directamente con *Coomassie Brilliant Blue R 250* al 0,25 % (p/v) en metanol: ácido acético: agua (40:10:50, v/v/v), durante 1-2 h en agitación, y se destiñeron durante 3-5 h con metanol: ácido acético: agua (40:10:50, v/v/v). En el caso de tinción con SYPRO, los geles se fijaron durante 30 minutos en metanol al 10% y ácido acético al 7%, y se tiñeron durante al menos 4 horas en oscuridad con 50 ml de solución de tinción. Tras dos lavados con metanol al 10% y ácido acético al 7% se visualizaron las bandas a la luz ultravioleta.

#### 2.3.9. Electrotransferencia e inmunodetección

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas PVDF (difluoruro de polivinilideno) en un equipo Mini trans-blot de Bio-Rad, a voltaje constante (100V) durante 90 minutos, a 4 °C y utilizando como tampón de transferencia una solución compuesta por Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM y metanol 20% (v/v) (Towbin et al., 1979).

Como primer paso, una vez realizada la electroforesis SDS-PAGE con las muestras a analizar, el gel se incubó durante 15 minutos en tampón de transferencia. Mientras tanto se preparó una membrana de PVDF con un tamaño ligeramente superior al del gel, sumergiéndola unos segundos primero en metanol absoluto, posteriormente en agua Milli Q® y finalmente en tampón de transferencia durante 5 minutos.

El *cassette* de transferencia se preparó como sigue: sobre el polo negativo del dispositivo de transferencia, se depositó una esponja y una pieza de papel Whatman 3MM previamente humedecidas en tampón de transferencia. Sobre ellas se situó el gel separador y a continuación la membrana de PVDF. Sobre este conjunto se colocó otra pieza de papel Whatman 3MM y otra esponja, se cerró el *cassette* y se situó en el tanque del Mini trans-blot de BioRad donde se llevó a cabo la electrotransferencia.

Para visualizar la eficiencia de la transferencia, la membrana PVDF se tiñó con rojo Ponceau (0,1 %), previamente a la incubación con los anticuerpos.

Tras la electrotransferencia, las membranas PVDF fueron incubadas durante 1 hora en 10 ml de tampón de bloqueo (150 mM NaCl, leche en polvo desnatada al 2,5 %, 20 mM Tris-HCl pH 8 y Tween 20 al 0,01%). A continuación, la membrana fue incubada en 5 ml de tampón de bloqueo al que se añadió 1 µl del anticuerpo

primario, incubándola toda la noche a 4 °C y en agitación suave. Se utilizó un anticuerpo monoclonal producido en ratón frente al epítipo V5 (*V5 tag antibody [SV5-Pk1]* de abcam®) presente en las proteínas de fusión. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas de PVDF fueron sometidas a 3 lavados sucesivos de 5 minutos con el tampón de bloqueo e incubadas durante una hora y media en 5 ml del mismo tampón al que se había añadido 1 µl de anticuerpo secundario (anti IgG de ratón) ligado a la enzima fosfatasa alcalina (*Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase*; A3562 de Sigma®). Tras 5 lavados de 5 minutos con el tampón de bloqueo para eliminar los restos de anticuerpo secundario, y dos lavados en el tampón de revelado de la reacción de la fosfatasa alcalina (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5) se procedió al revelado de la reacción enzimática utilizando como sustratos cromogénicos NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) 0,033% y BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) 0,0165% en oscuridad. Como consecuencia de la reacción enzimática se formó un compuesto violeta unido al anticuerpo ligado a la proteína con el epítipo V5. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana con agua Milli Q®.

#### 2.3.10. Reconstitución en liposomas

La actividad de los antiportadores purificados se determinó tras la reconstitución de los mismos en membranas artificiales. Para ello, se utilizaron liposomas preparados con mezclas de lípidos vegetales disponibles comercialmente, concretamente asolectina (*L-α-fosfatidilcolina*; *Soybean Asolectin*, Sigma) a fin de obtener liposomas estables y sellados a pequeños iones (Pouliquin et al., 1999). El conjunto de proteínas purificadas y liposomas se solubilizó con el detergente octilglucósido. A continuación, el detergente se eliminó por filtración en gel utilizando columnas (*spin-columns*) de Sephadex G-50 (*Pharmacia Sephadex G50, fine*, Amersham Biosciences, Inc.). Se obtuvieron así proteoliposomas con aproximadamente 50 nm de diámetro, constituidos por una bicapa lipídica en la que están insertadas las proteínas (Venema et al., 1993). Para la reconstitución se prepararon dos *spin-columns* utilizando jeringas de 2 ml con lana de vidrio en uno de los extremos. El Sephadex G-50 se hidrató en tampón de reconstitución (10 mM BTP-Mes pH 7,5; 25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glicerol al 20 %) durante al menos 12 horas, y se transfirió a las columnas. Una vez empaquetado el polímero en las columnas, éstas se centrifugaron durante 5 min a 180 g para eliminar el exceso de tampón. Una de las dos columnas se precargó con 2,5 mM de piranina (Ácido 8-hidroxi-1,3,6 trisulfónico)-BTP, pH 7,4, en tampón de reconstitución. Se preparó una suspensión de 30 mg de asolectina en 1 ml de tampón de reconstitución agitando durante 5 min en presencia de argón para evitar la oxidación de los lípidos. Se mezclaron

aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de proteína purificada, 38  $\mu\text{l}$  de liposomas (1140  $\mu\text{g}$  de asolectina), 11  $\mu\text{l}$  de piranina-BTP 25 mM y tampón de reconstitución hasta un volumen de 104,25  $\mu\text{l}$ . Bajo agitación se añadió 5,75  $\mu\text{l}$  de Octil Glucósido 1 M, para solubilizar la muestra, dando lugar a la clarificación de la misma. La mezcla solubilizada se cargó en la columna precargada con piranina, y se dejó entrar en la resina por gravedad durante 5 minutos, con el fin de que la piranina quedara encapsulada dentro de los proteoliposomas durante la reconstitución. A continuación, la columna se centrifugó durante 5 min a 180 g. Mientras que la piranina no encapsulada y el detergente se retenían en la parte superior de la columna, los proteoliposomas con piranina encapsulada se recogían en el eluido. A este eluido se le añadieron 100 mg de Biobeads (SM-2; Bio-Rad) en 200  $\mu\text{l}$  de tampón de reconstitución y se agitó durante 30 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  para eliminar restos de detergente. Finalmente, los proteoliposomas se centrifugaron nuevamente a través de la segunda columna de Sefadex G-50, para eliminar restos de piranina no encapsulada.

#### 2.3.11. Medida de la actividad de los antiportadores

##### 2.3.11.1 En proteoliposomas reconstituidos

La actividad de los transportadores purificados y reconstituidos en liposomas se determinó en base a la velocidad de alcalinización de las vesículas inducida por la adición de cationes monovalentes en el exterior. El pH en el interior de las vesículas se midió con la sonda fluorescente piranina, encapsulada en los proteoliposomas (apartado 2.3.10). Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro modelo *QuantaMaster™ QM-4 (PTI® Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA)* con agitación y a 25  $^{\circ}\text{C}$ , diluyendo 100  $\mu\text{l}$  de proteoliposomas en tampón de reconstitución, en 2 ml de tampón de reacción (20 mM BTP-MES y glicerol al 10%).

La sonda fluorescente piranina contiene un grupo hidroxilo con un pKa de 7,2. La compleja estructura de la molécula de piranina da como resultado un espectro de absorbancia/excitación con diferentes máximos. Cuando las vesículas se acidifican la fluorescencia a una  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 404 nm aumenta mientras que la fluorescencia a una  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 467 nm disminuye (Fig. M8). Puesto que  $I_{404}$  e  $I_{467}$  varían de manera opuesta con respecto a los cambios de pH, la variación de la razón entre estos dos valores de intensidad de fluorescencia ( $I_{467}/I_{404}$ ) permite una estimación más sensible de los cambios de pH. Además, esta razón solamente depende de las propiedades físicas de la sonda y no de su concentración o de las características del espectrofluorímetro, por lo que proporciona medidas más reproducibles.

La asociación de protones con la piranina depende del pH y se describe con la fórmula:

$$\text{PirH} = (\text{Pir}^- \cdot \text{H}^+) / K_d \quad (1)$$

donde Pir<sup>-</sup> y PirH son las concentraciones de las formas ionizada y protonada de piranina, respectivamente, y K<sub>d</sub> la constante de disociación. La fluorescencia a λ<sub>excitación</sub> de 404 y 467 nm depende de la sumatoria de la fluorescencia de las dos formas a de piranina según:

$$F_{404} = C_{\text{pir}^-404} \cdot \text{Pir}^- + C_{\text{pirH}404} \cdot \text{PirH} \quad (2)$$

$$F_{467} = C_{\text{pir}^-467} \cdot \text{Pir}^- + C_{\text{pirH}467} \cdot \text{PirH} \quad (3)$$

Donde F<sub>404</sub> y F<sub>467</sub> son valores de fluorescencia a una λ<sub>excitación</sub> de 404 y 467 nm respectivamente, C<sub>pir<sup>-</sup>404</sub> y C<sub>pirH<sup>404</sup></sub> son coeficientes proporcionales de la fluorescencia a 404 nm de la forma ionizada Pir<sup>-</sup> y protonada PirH, y C<sub>pir<sup>-</sup>467</sub> y C<sub>pirH<sup>467</sup></sub> los coeficientes de la fluorescencia a 467 nm de la forma ionizada Pir<sup>-</sup> y protonada PirH. Combinando las ecuaciones 1, 2 y 3 e introduciendo la razón de fluorescencia R, F<sub>467</sub>/F<sub>404</sub> se llega a la fórmula:

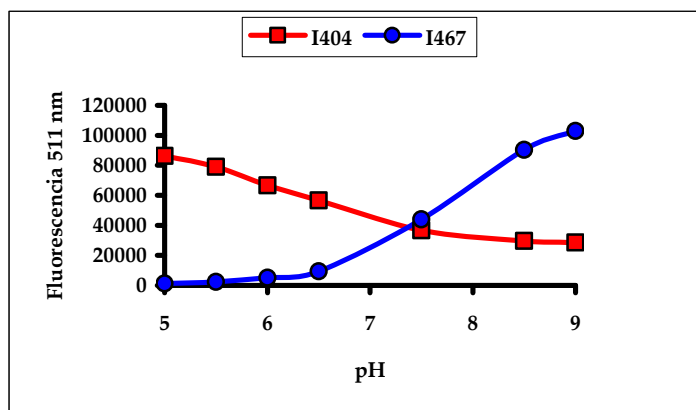
$$\text{H}^+ = K_d \cdot ((R_{\text{max}} - R) / (R - R_{\text{min}})) \cdot (F_{\text{pyr}^-404} / F_{\text{pyrH}+404}) \quad (4) \quad (\text{Grynkiewicz et al., 1985})$$

Donde R es el valor de la razón de fluorescencia I<sub>467</sub>/I<sub>404</sub>, R<sub>max</sub> es el valor máximo de esta razón en condiciones alcalinas y R<sub>min</sub> el valor mínimo en condiciones ácidas. La relación entre el pH y la razón de la fluorescencia viene dada por:

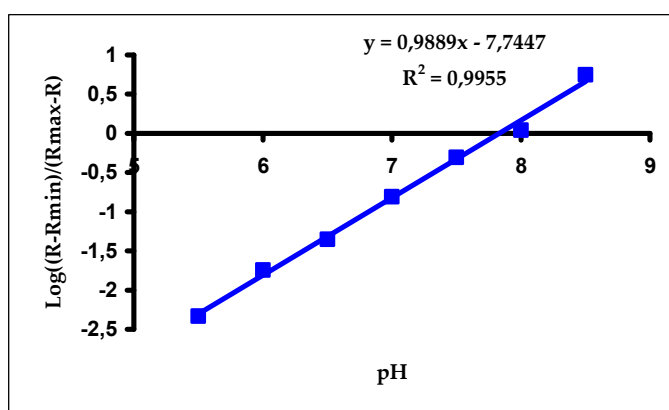
$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pKa} + \text{Log}(F_{\text{pyr}^-404} / F_{\text{pyrH}+404}) + \text{Log}(R_{\text{max}} - R) / (R - R_{\text{min}}) \\ \text{pH} &= \text{pKa}' + \text{Log}(R_{\text{max}} - R) / (R - R_{\text{min}}) \end{aligned}$$

Esta ecuación demuestra que el pH y el logaritmo de (R<sub>max</sub>-R)/(R-R<sub>min</sub>) tienen una relación lineal con pendiente 1. Experimentalmente se observa que este valor está en relación lineal con el pH a valores de 5,5 a 8,5 (Fig. M9).

A



B



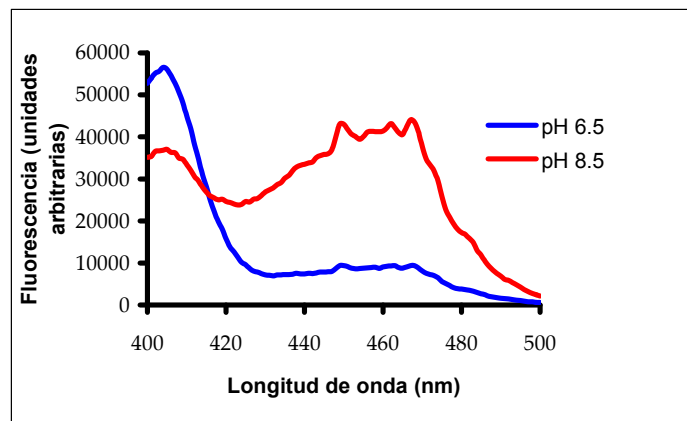
**Fig M8. Relación entre la fluorescencia de la piranina y el pH** (0,25  $\mu\text{M}$  piranina en 20 mM BTP-MES y glicerol al 10%). La emisión de fluorescencia se midió a 511 nm. En A se muestra el valor de la fluorescencia en función del pH a 404 nm y a 467 nm. En B se muestra la relación lineal entre el logaritmo de  $(R-R_{\min})/(R_{\max}-R)$  y el pH.

Para estimar el pH en el interior de las vesículas a partir de la fluorescencia de la piranina, se equilibró el pH del interior de las mismas con el pH del medio de reacción (BTP-Mes 20 mM pH 7,5 y glicerol 10%). En este caso, los proteoliposomas se diluyeron en presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para evitar un desequilibrio entre el pH interior y exterior de las vesículas y se añadió el ionóforo gramicidina (1  $\mu\text{M}$ ) para facilitar un ajuste rápido de las concentraciones iónicas y del pH entre el interior y el exterior. Posteriormente, se modificó el pH del medio añadiendo alícuotas concentradas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{NaOH}$  para determinar  $R_{\max}$  y  $R_{\min}$ , permitiendo el cálculo del pH en los proteoliposomas a partir de la razón de fluorescencia a 404 y 467 nm.

Originalmente, en el ensayo de la actividad antiporte catión/protón se utilizaba la actividad  $H^+$ -ATPasa para acidificar el interior de las vesículas, creando un gradiente de protones que energiza la reacción de intercambio catión/protón llevada a cabo por los antiportadores. Para aproximarnos a esta situación utilizamos el método del *acid load*, basado en la dilución de una base débil como el  $NH_3$ . Para crear un pH ácido en el interior de los proteoliposomas sin cambiar el pH del medio exterior, se prepararon los proteoliposomas en presencia de  $(NH_4)_2SO_4$ . Puesto que el  $NH_3$  es libremente permeable a través de la membrana lipídica, mientras que el  $NH_4^+$  es impermeable, la dilución de los proteoliposomas en un medio sin  $(NH_4)_2SO_4$  provoca un eflujo de  $NH_3$  hacia el exterior hasta que las concentraciones de  $NH_3$  en el exterior e interior se equilibran. El eflujo de  $NH_3$  provoca un nuevo equilibrio entre  $NH_4^+$  y  $NH_3$  acorde con su constante de disociación, donde la desaparición de  $NH_3$  se compensa con un aumento de la concentración de  $H^+$  y una disminución de  $NH_4^+$ .

La Figura M9 muestra el espectro de excitación con emisión a 511 nm obtenido diluyendo los proteoliposomas en ausencia (curva azul) o presencia (curva roja) de  $(NH_4)_2SO_4$ .

La calibración de la señal de fluorescencia indica que el pH en el interior de las vesículas es 7,5 cuando no se aplica un gradiente de  $(NH_4)_2SO_4$  (curva roja), y de 6,5 cuando se diluyen los proteoliposomas 20 veces en un medio sin  $(NH_4)_2SO_4$  (Fig. M9).



**Fig. M9.** Espectro de excitación de piranina (emisión a 511 nm) encapsulada en proteoliposomas diluidos en ausencia (azul) o presencia (rojo) de  $(NH_4)_2SO_4$  en el medio externo. La dilución sin  $(NH_4)_2SO_4$  provoca una acidificación del interior de las vesículas.

Para iniciar la reacción de antiporte se añadieron sales de sulfato de diferentes cationes, y se evaluó el aumento de pH intravesicular con el tiempo ( $\Delta\text{pH}/\Delta t$ ), como medida del flujo de protones catalizado por los antiportadores. La actividad antiporte se calculó a partir de los cambios iniciales en este valor.

Puesto que la capacidad tampón B está definida como la cantidad de protones  $\Delta\text{H}^+$  necesaria para provocar un cambio de pH unitario según

$$B = \Delta\text{H}^+ / \Delta\text{pH}$$

El flujo neto de protones  $J_{\text{H}^+\text{net}}$  por unidad de superficie está dado por:

$$J_{\text{H}^+\text{net}} = B \cdot (V/A) \cdot d\text{pH}/dt \text{ (Rossignol et al., 1982)}$$

Donde B es la capacidad tampón media durante el intervalo  $\Delta\text{pH}$  de medida, y V y A el volumen y área de los proteoliposomas. Por esta razón, la variación inicial de pH ( $\Delta\text{pH}/\Delta t$ ) está linealmente relacionada con el flujo de protones y la actividad de los antiportadores.

Para evaluar la especificidad de la reacción de antiporte se añadieron sales de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Rb}^+$ . Como control negativo se utilizó el catión orgánico tetrametilamonio ( $\text{TMA}^+$ ), ya que es poco probable que el antiportador pueda transportar este ión. Al final de la reacción se eliminó el gradiente de protones añadiendo sulfato de amonio.

#### **2.3.11.2. En vacuolas intactas**

Se usaron vacuolas aisladas de la cepa de levadura OC4 (Tabla M3) transformada con las construcciones plasmídicas que portan los genes AtKEA, usando como vector de expresión pRS306-Gal1-ccdb-V5-6xHis. Las vacuolas se aislaron según se describe en el apartado 2.3.4.

Para llevar a cabo las medidas de transporte en vacuolas, se usó la sonda fluorescente naranja de acridina.

La actividad antiportadora fue ensayada monitorizando la disipación de un gradiente de pH ácido en el interior de la vacuola creado previamente por la acción de la enzima V-ATPasa (Dufour et al., 1982; Blumwald et al., 1987; Yamaguchi et al., 2003). Para cada ensayo se usó el volumen de vacuolas correspondiente a unos 25  $\mu\text{g}$  de proteína total, que se adicionó a una cubeta de plástico desechable de 1,5 ml de capacidad que contenía tampón de reacción constituido por 5 mM Tris-MES, pH 7,5; 50 mM de TMA-Cl (cloruro de tetrametilamonio); 5  $\mu\text{M}$  de naranja de acridina y 3,125 mM de  $\text{MgSO}_4$ . La enzima  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar se activó mediante la adición de 2,5 mM de Tris-ATP, pH 7,5, lo que resultó en la extinción de la fluorescencia de la sonda debido a la generación de un gradiente de pH (ácido en el interior).

Cuando el nivel de fluorescencia alcanzó un punto mínimo, se disminuyó la actividad ATPasa mediante la adición de Bafilomicina A (un inhibidor específico de la enzima V-ATPasa cuando se utiliza a baja concentración), con el fin de establecer un estado de equilibrio en el gradiente de pH y estabilizar la fluorescencia. La reacción de antiporte se inició mediante la adición de los distintos iones, dando lugar a la recuperación de la fluorescencia debido a la relajación del gradiente de pH como resultado del intercambio catión/protón. Al final de cada medida se disipó el gradiente de pH mediante la adición de 12,5 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , recuperándose el nivel inicial de fluorescencia. Todas las curvas fueron normalizadas a 100% de fluorescencia (siendo el 100% la máxima fluorescencia recuperada). Los cambios en la fluorescencia dependientes del tiempo se monitorizaron por espectrofluorimetría, a una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 540 nm (Fig. M10).

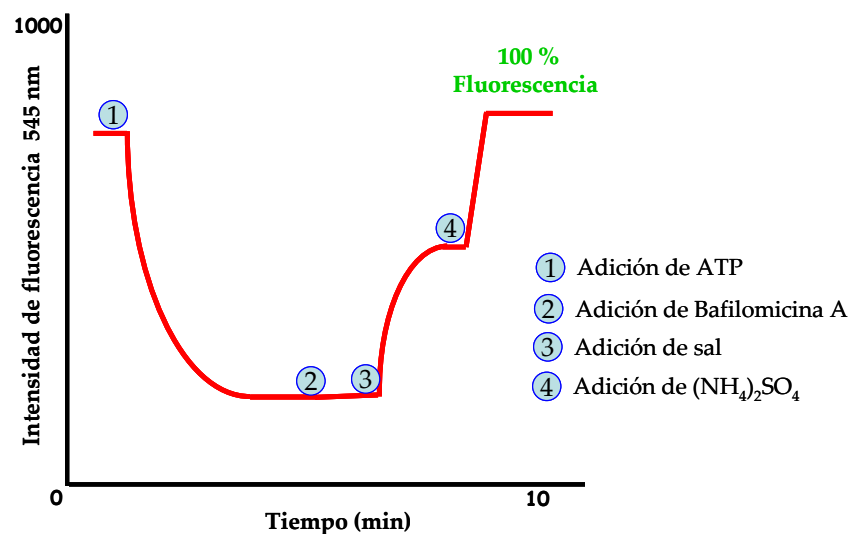


Fig.M10 Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia dependientes del tiempo que tienen lugar en los ensayos de transporte en vacuolas.



## **2.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR**

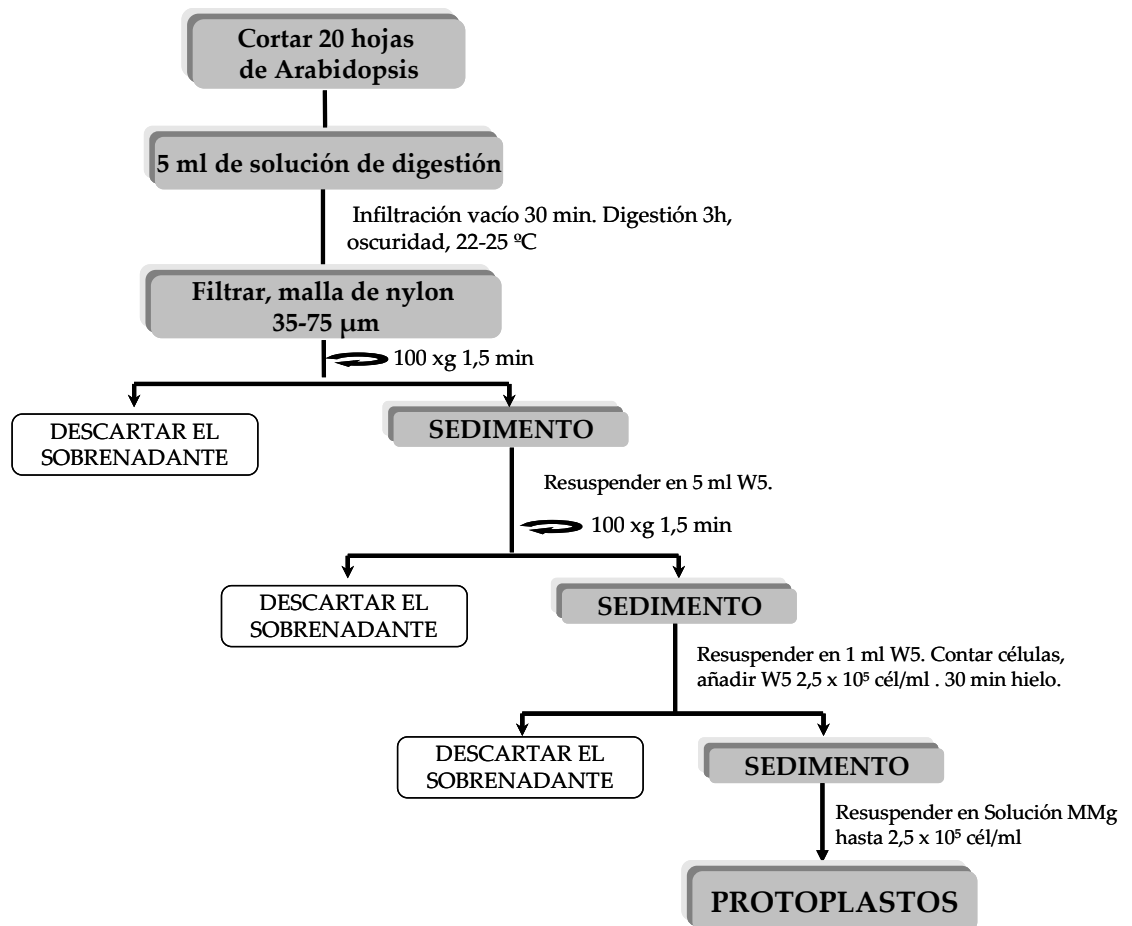
La localización subcelular de las proteínas AtKEA se determinó mediante microscopía confocal y de fluoerescencia en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* que expresaban de forma transitoria estas proteínas de fusión con GFP, y en células de levadura transformadas con las construcciones plasmídicas portadoras de las secuencias génicas que codifican las proteínas de fusión con GFP y YFP. En el caso particular de AtKEA3 se llevó a cabo una aproximación de su localización subcelular mediante inmunodetección en fracciones de membrana de levadura que expresaban la proteína.

### **2.4.1. Localización subcelular en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis***

Se siguieron protocolos previamente publicados (Kovtun et al., 2000; Sheen, 2001; Yoo et al., 2007) con algunas modificaciones. Primero se aislaron los protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* (Sheen, 2001) y a continuación estos protoplastos se transformaron con las construcciones plasmídicas correspondientes mediante el método de transfección mediado por PEG. En los transformantes transitorios se analizó la fluorescencia emitida por GFP, usando un microscopio confocal Zeiss LSM510.

#### **2.4.1.1. Aislamiento de protoplastos**

Para llevar a cabo el aislamiento de protoplastos se partió del material vegetal previamente descrito en el apartado 1.3. Se usaron hojas bien expandidas de plantas de entre 3-4 semanas y se siguió el procedimiento resumido en la Figura M11.



**Fig. M11. Esquema de la metodología seguida para la obtención de protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis*.**

Se utilizaron 20 hojas de *Arabidopsis*, que se cortaron en pequeñas tiras (0,5-1 mm) usando para ello una hoja de afeitar nueva, y se sumergieron, inmediatamente después de cortarlas, en una placa de petri de 5 cm de diámetro, que contenía 5 ml de solución enzimática. Esta solución enzimática se preparó con manitol 0.4 M; KCl 20 mM; MES 20 mM pH 5.7; Celulasa R10 1-1.5 %; Macerozima R100 (Yakult) 0.2-0.4 %. El conjunto se calentó a 55 °C durante 10 min (para inactivar las proteasas y aumentar la solubilidad de las enzimas), se dejó enfriar a temperatura ambiente, y entonces se adicionaron el resto de los componentes de la reacción: CaCl<sub>2</sub> 10 mM; β-mercaptoetanol 5 mM y FBS (Suero fetal bovino, Sigma) 0.1%.

La placa se introdujo en un desecador de vacío, y se aplicó vacío durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se continuó la digestión durante 3 horas sin agitación, en oscuridad y a temperatura ambiente (22-25 °C).

Los protoplastos se separaron del resto de material sin digerir mediante filtración a través de una malla de nylon de 35-75  $\mu\text{m}$ , y se sedimentaron, en tubos de fondo redondo por centrifugación a 100 x g durante 1,5 minutos. El sedimento se resuspendió en 5 ml de solución W5 (NaCl 154 mM; CaCl<sub>2</sub> 125 mM; KCl 5 mM y MES 2 mM, pH 5.7) y se volvió a precipitar mediante centrifugación a 100 x g durante 1,5 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 ml de solución W5, se hizo un recuento del número de células, usando para ello una cámara de Neubauer, y se adicionó solución W5 hasta alcanzar una densidad celular de  $2,5 \times 10^5$  células/ml. A continuación los protoplastos se incubaron en hielo durante 30 minutos en solución W5, y se precipitaron mediante centrifugación a 100 x g durante 1 minuto. Por último los protoplastos se resuspendieron en el volumen de solución MMg (Manitol 0,4 M; MgCl<sub>2</sub> 15 mM y MES 4 mM, pH 5.7) necesario para obtener una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/ml.

#### **2.4.1.2. Transfección de protoplastos mediada por PEG**

Para la transfección se usaron 100  $\mu\text{l}$  de protoplastos resuspendidos en solución MMg, a los que se adicionaron 10  $\mu\text{g}$  del plásmido portador de las construcciones AtKEA::GFP (en el extremo carboxiterminal ó aminoterminal) (Tabla M18) (para la transfección simple) ó bien 7  $\mu\text{g}$  de los plásmidos con las construcciones AtKEA::GFP (en el extremo carboxiterminal) y 4  $\mu\text{g}$  de las construcciones portadoras de las secuencias génicas que codifican las proteínas marcadoras de orgánulos (Tabla M20) fusionadas con RFP (*Red Fluorescent Protein*) (para la cotransfección). A continuación se adicionó una solución de PEG-Ca (PEG4000 (Fluka) 40%, manitol 0,2 M y CaNO<sub>3</sub> 0,1 M), hasta alcanzar una concentración de PEG del 20%. El conjunto se mezcló bien mediante inversión suave para no romper los protoplastos, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, la mezcla de transfección se diluyó con 2 ml de solución W5 y se centrifugó a 100 x g durante 1 minuto. El sedimento se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de solución WI (manitol 0,5 M; MES 4 mM, pH 5.7 y KCl 20 mM), y se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación suave, entre 16-20 horas antes de la observación al microscopio.

**Tabla M20. Marcadores de orgánulos usados en este trabajo y su localización subcelular**

*MARCADOR	LOCALIZACIÓN
Syp21	Membranas prevacuolares
Syp22	Membranas prevacuolares y vacuolas
$\gamma$ -TIP	Tonoplasto
<i>ER retention signal</i> (His-Arg-Glu-Leu)	Retículo endoplasmático
St (Sialiltransferasa)	Trans Golgi
mMAN1 ( $\alpha$ -1,2 Manosidasa I)	Golgi

\*Se usaron construcciones fusionadas a GFP para la transfección simple, y construcciones fusionadas a RFP, para la cotransfección y colocalización con las proteínas de fusión AtKEA::GFP

#### 2.4.1.3. Observación al microscopio confocal de los transformantes transitorios

La señal de fluorescencia emitida por los protoplastos se analizó usando un microscopio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss). Los filtros que se usaron para la emisión y la excitación se enumeran en la tabla M21.

**Tabla M21. Configuración común de los filtros en Zeiss LSM510**

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
GFP	488	BP505-530
RFP	543	BP560-615
CLOROFILA	488	LP650

Las señales se capturaron en modo multicanal y se procesaron utilizando *Zeiss LSM image browser* (Carl Zeiss) y Adobe PhotoShop.

#### 2.4.2. Localización subcelular en levaduras que expresan las proteínas de fusión AtKEA::GFP y AtKEA::YFP

Se usaron células de levadura de la cepa W303 y BY (Tabla M3) transformadas con los vectores de expresión portadores de las construcciones AtKEA::GFP, GFP::AtKEA, AtKEA::YFP y YFP::AtKEA (Tabla M18).

La señal de fluorescencia se analizó mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i, y los filtros B-2A Ex450-490; DM505; BA520. Todas las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica Nikon DS-Fi1 CCD, con un aumento de 100 X.

### 2.4.3. Inmunodetección en fracciones de membrana de levadura

#### 2.4.3.1. Fraccionamiento de membranas de levadura mediante centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa.

Se usaron membranas microsomas aisladas a partir de células de levadura que expresan la proteína de fusión AtKEA3 con el epítipo V5 y la secuencia de 6 histidinas (apartado 2.3.5.).

Se prepararon los gradientes continuos de sacarosa entre 20-60% (p/p) en un medio con EDTA (Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 10mM; DTT 1mM, 30 µl de mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma)) o en un medio con MgSO<sub>4</sub> (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgSO<sub>4</sub> 2mM, DTT 1mM, 30µl de mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma)).

Para la formación de los gradientes continuos, se utilizaron soluciones de 20, 33, 46 y 60 % (p/p) de sacarosa en los medios anteriores. Se usaron tubos *Beckman Ultraclear centrifuge tube (14\*95 mm: n.º. 344060)*, a los que se adicionaron 6,5 ml de cada una de las soluciones de sacarosa (de mayor a menor concentración) muy lentamente para evitar la mezcla de las mismas (volumen final 26 ml). Los tubos se taparon bien con parafilm, se depositaron en una gradilla y se volcaron muy lentamente hasta quedar en posición horizontal. Se mantuvieron en esta posición durante al menos tres horas, y transcurrido este tiempo se levantaron muy lentamente hasta situarlos en posición vertical.

Una vez formado el gradiente lineal de sacarosa, se adicionaron 2 ml de microsomas en la superficie (1 ml de microsomas diluido en 1 ml de una solución compuesta por 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA ó 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1mM DTT), y se centrifugó a 27000 rpm durante 18 horas (Ultracentrífuga Beckman, rotor SW-28). A continuación se recuperaron los gradientes en 13 fracciones de 2,15 ml, y en cada fracción se determinó la concentración de proteínas mediante Bradford (Bradford, 1976), y la densidad de sacarosa con un refractómetro manual.

#### 2.4.3.2. Inmunodetección de la proteína AtKEA3 y las proteínas usadas como marcadores de membrana.

La detección de las proteínas de fusión se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de electrotransferencia e inmunodetección (ver detalles en los apartados 2.3.7 y 2.3.9) de las 13 fracciones de los gradientes.

Para determinar la distribución de las distintas fracciones de membrana subcelulares dentro del gradiente, se utilizó anticuerpos monoclonales dirigidos frente antígenos de distintas proteínas de membrana usadas como marcadores, concretamente la subunidad de 100 KDa de la protón ATPasa vacuolar Vph1p; la proteína del Golgi tardío Vps10p; la proteína endosomal/prevacuolar Pep12p; la

subunidad III de la citocromo c oxidasa de la membrana mitocondrial interna; la proteína Dol-P-Man sintasa (Dpm1p) de la membrana del retículo endoplasmático y la protón ATPasa de la membrana plasmática (Pmap1) (Molecular Probes). La proteína recombinante AtKEA3 se detectó con un anticuerpo monoclonal dirigido frente al epítipo V5 (*V5 tag antibody [SV5-Pk1]* (abcam®)).



## **IV. RESULTADOS**



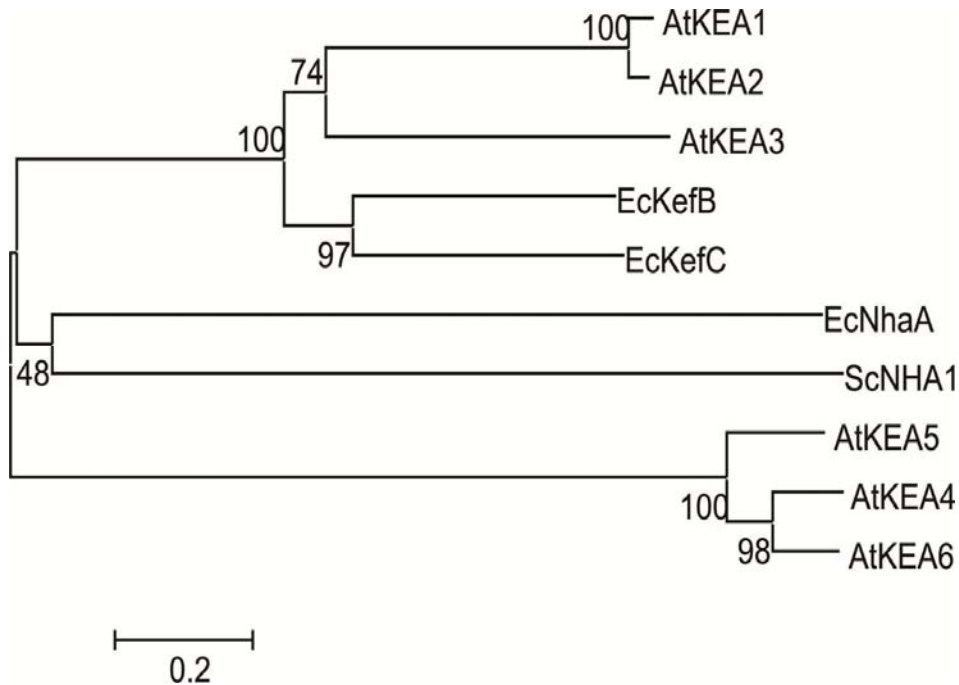


## 1. CLONAJE Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE AtKEA

Los plásmidos portadores de los cDNAs de AtKEA1 (At1g01790) y AtKEA2 (At4g00630) se obtuvieron del laboratorio de John M. Ward (Universidad de Minnesota <http://wardlab.cbs.umn.edu/arabidopsis/>). Los cDNAs de AtKEA3 (At4g04850) y de AtKEA6 (At5g11800) se obtuvieron de RIKEN *BioResource Centre* (<http://www.brc.riken.jp/>). Se comprobó mediante secuenciación que los cDNAs obtenidos correspondían a las secuencias publicadas. Solamente en el caso de AtKEA2 se constató que las primeras 120 bases de la parte N-terminal de la secuencia publicada no corresponden con la secuencia del clon, siendo la secuencia real traducida a aminoácidos casi idéntica a la secuencia de AtKEA1 (Fig. R2).

AtKEA1, 2 y 3 constituyen proteínas de 619, 620 y 488 aminoácidos respectivamente. Los genes AtKEA1, 2 y 3, codifican proteínas que son cercanas a las proteínas KefB y KefC de bacteria. Notablemente, estas proteínas tienen, además de un dominio intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , un dominio KTN. Las proteínas AtKEA4-AtKEA6 presentan bastante homología con las proteínas AtKEA1-3, sin embargo en la región N-terminal el dominio KTN no está conservado. La clasificación propuesta por Brett y colaboradores (2005) de las secuencias AtKEA4-6 en el grupo de secuencias Nha no está tan clara (Fig R1). El análisis topológico de las secuencias AtKEA1 y AtKEA2 indica la presencia de 11 hélices transmembrana (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), mientras que en KefB y KefC el mismo análisis indica 13 hélices (Daley et al., 2005). Sin embargo, el alineamiento muestra que muchas de estas regiones están muy conservadas entre proteínas de plantas y bacterias, indicando que las diferencias son debidas a inexactitudes en la predicción algorítmica (Fig. R2). Se ha descrito un bucle citoplasmático regulador en la posición 258-268 de la proteína KefC de *E. coli* (secuencia HALESDIEPFK), crítico en el funcionamiento de esta proteína (Miller et al., 1997). Se ha propuesto que interacciona con el dominio KTN y que está implicado en la sensibilidad a glutatión y complejos de glutatión, y está bastante conservado en los antiportadores AtKEA1, 2 y 3 (Roosild et al., 2002; Roosild et al., 2009). La región N-terminal del dominio KTN, incluyendo el *Rossmann fold* muestra un alto grado de homología entre las secuencias de planta y bacteria, mientras que la parte C-terminal del dominio, particularmente la hélice  $6\alpha$  que se intercambia entre subunidades en las proteínas de bacteria, está menos conservada (Roosild et al., 2002). La secuencia de AtKEA3 presenta tan solo 9 hélices de membrana. Las hélices en la parte N-terminal parecen ausentes en la secuencia, al igual que la parte C-terminal del dominio KTN. Sin embargo, en las bases de datos se pueden encontrar varias versiones del cDNA de AtKEA3. De este modo, el gen CAB80850 es parcialmente idéntico a At4g04850,

pero sí presenta las extensiones N-terminal y la región KTN completa. Esto indica que la versión obtenida de AtKEA3 constituye una versión truncada (Fig. R2).



**Fig. R1.** Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias aminoacídicas de los antiportadores KEA de *Arabidopsis*, KefB, KefC, NhaA de *E. coli* y NHA1 de *S. cerevisiae*. Las relaciones filogenéticas fueron deducidas usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama= 6.10057062. El porcentaje de árboles en el test de *bootstrap* (500 réplicas) en el que las secuencias se agrupan según lo indicado en el árbol óptimo, se indica por debajo de las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se computaron usando el método de corrección de Poisson (Zuckerkanndl y Pauling, 1965), y son las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Todas las posiciones del alineamiento que representaban *gaps* se eliminaron, dando lugar a la utilización de un total de 346 posiciones en el análisis final. El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007).

**Fig. R2.** (Página siguiente) **Alineamiento de las secuencias de los antiportadores AtKEA1-3 de *Arabidopsis* y KefB y KefC de *E. coli*.** Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Los aminoácidos similares o idénticos aparecen en azul o en púrpura respectivamente. Las hélices transmembrana han sido estimadas utilizando el programa TMHMM del CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) y aparecen sombreadas en azul. Las mutaciones que afectan a la actividad o regulación de KefC se indican debajo de la secuencia y sombreadas en amarillo (E,D,G,R,V) o púrpura (F). Las regiones  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina en la estructura del dominio KTN de EcKefC, implicado en la unión de NAD y en las interacciones con la región reguladora central en KefC (en dímeros) aparecen por debajo del alineamiento. Muchos aminoácidos esenciales están presentes en las proteínas de plantas, pero en AtKEA3 obtenido de RIKEN falta la última parte del dominio KTN. AtKEA3\* corresponde a la secuencia con número de acceso CAB80850 (Genbank) idéntico a AtKEA3, pero con el dominio KTN completo, indicando que el cDNA de RIKEN no es completo.

**Fig. R3.** (Página siguiente) **Alineamiento de las secuencias de los antiportadores AtKEA1-6 de *Arabidopsis*.** Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Los aminoácidos similares o idénticos aparecen en azul o púrpura respectivamente. Los aminoácidos importantes para la actividad de las proteínas Kef, indicados en la figura R2, están sombreados en amarillo.



AtKEA1 ---MIPHQVNEE EASLEDFLWL LLASVIFVPL FQKIPGGSPV LGYLAAGILI GFGYLSIIRN VHGTARIAEF GVWELLFNIG LELSVERLSS MKKYYVFG-LG SAQVLVTRAV  
 AtKEA2 --MEFNCLPPT FITLRMRK LPFSCCGYC LQASYSCL-Y FRKLEVTVP LGYLAAGILI GFGYLSIIRN VHGTARIAEF GVWELLFNIG LELSVERLSS MKKYYVFG-LG SAQVLVTRAV  
 AtKEA3 -----MRSNDWPY PDLWOLFEM G-LELSLAR- ---LKAARF- ---AFGMG LTVOLICTAA FTAFELPPNG AIGTKILEFL  
 AtKEA4 MRCKNNYDK FSVITMRLIT LLLICTFFFF FSEAYS-ARS DNEEDSVVTR EINGVVENN ARS- ---AKP REDSEPADMD RALEKEEPPDN DQNEVFPDGS FNNSVADQQA VLETVARV-  
 AtKEA5 -----MAR FAVIG- ---LTFLLL LGTSL-ARS D- ---EETRE RYGVVNST AFG- ---N GEGSIARMD RALEKEFEN DQNEVFPDGS FNNSVADQQA ELETVARVTH  
 AtKEA6 --VEGRR-RRR FLSLSQLAL LLLLSSFELC FSVASPRALS DSDLLDETVA NSSSSVSLN ASSSSLVKRP KEGSFADIID RALEKEFEN DQNEVFPDGS FNNSVAGQQA VLETVARVKS  
  
 AtKEA1 VGLLAHVAG QAGPAAIVIG NGLALSSTA- --VVLQIQE RGESTSRRGR ASFSVLLFQD LAVVLLILI PLISPNSRG GIGFOATAEA LGLAAKAAV AITAIAGGR LLRPYIKQI  
 AtKEA2 IGLITHVAG QAGPAAIVIG NGLALSSTA- --VVLQIQE RGESTSRRGR ASFSVLLFQD LAVVLLILI PLISPNSRG GIGFOATAEA LGLAAKAAV AITAIAGGR LLRPYIKQI  
 AtKEA3 FHSRDLVNI RSIDEAVVIG AALSLSA- --FVLQIAE KGEIPTFRGS ATGLILLIQD LAVVLLILI PLISPNSRG GIGFOATAEA LGLAAKAAV AITAIAGGR LLRPYIKQI  
 AtKEA4 --PKNETKT K- ---EAK SFNLDNENG VEDTPRLIDR KDNVFMNSK KSKYFVLQD LRLISDLVVI IVSATCG- ---GIAPACAGQP VITGVYLLAG- --SIIPGGL SFYSEMVOVE  
 AtKEA5 EKGRNDTQE NNGTRPFQIQ DVFSLEND- --SDDMTLDK KNNVFMNSK KSKYFVLQD LRLISDLVVI IVSAAIG- ---GIVFCLGQP VITGVYLLAG- --SIIPGGL SFYSEMVOVE  
 AtKEA6 --TKNETKE EK- ---RFQLH DVFNLNDR AEDTPTLIDR KDNVFIISNS KSKYFVLQD LRLISDLVVI IVSATCG- ---GIAPACAGQP VITGVYLLAG- --SIIPGGL SFYSEMVOVE  
  
 AtKEA1 AENRNEIFS ANTLVILIGT SLITARAGLS MALGAFIAGL LLAETEFSLQ VESDIAPYRG LLGLFFMTV GMSIDPKLL SNFPVIVGTL GLLIVGKTM L VVIMGKLEGI SIISAIRVGL  
 AtKEA2 AENRNEIFS ANTLVILIGT SLITARAGLS MALGAFIAGL LLAETEFSLQ VESDIAPYRG LLGLFFMTV GMSIDPKLL SNFPVIVGTL GLLIVGKTM L VVIMGKLEGI SIISAIRVGL  
 AtKEA3 AETRSSEAFV ALCLLTVAGT SLVTOVLGFS DTLGAFLAGA LLAETNERTQ EADIRPERG LLGLFFMTV GMSIDPKLL SNFPVIVGTL GLLIVGKTM L VVIMGKLEGI SIISAIRVGL  
 AtKEA4 TVAQFVIFL LFPALGFEFA AKLRVVR-AV AIFGGLLQIF LFMCLSGITA SLCCGKLEFG IFVGAFLMS STAVVVKFLM ERNSIALHG QVTVGTLILQ DCAVGLLFLAL LPVIGTSGV  
 AtKEA5 TVAQFVIFL LFPALGFEFA AKLRVVR-AV AIFGGLLQIF LFMCLSGITA SLCCGKLEFG IFVGAFLMS STAVVVKFLM ERNSTSLHG QVTVGTLILQ DCAVGLLFLAL LPVIGTSGV  
 AtKEA6 TVAQFVIFL LFPALGFEFA AKLRVVR-SV AVLGLLQIQL LFMFLCGITV SLCCGKRESEG VFVGAFLMS STAVVVKFLM ERNSTSLHG QVTVGTLILQ DCAVGLLFLAL LPVIGTSGV  
  
 AtKEA1 LLAPGGEFAP VAFGEAVNQG IMPQLSSLL FLVVGISMAI TPWLAAGQL IASREFLHDV RSLPVESET DDLOQHIIIC GFGRVQIIA QLLSERLI- ---PFVA LDVSSDRVTI  
 AtKEA2 LLAPGGEFAP VAFGEAVNQG IMPQLSSLL FLVVGISMAI TPWLAAGQL IASREFLHDV RSLPVESET DDLOQHIIIC GFGRVQIIA QLLSERLI- ---PFVA LDVSSDRVTI  
 AtKEA3 LLSOGGEFAP VVFLANRKL IIVVLSMAL TPYLNQGRK AADFLERLD PGEKIGEDVN FDVSESVII GFQMGQVLA FNLSTELVSD SDLVGWPYIG FDLNPAVKE  
 AtKEA4 LQG- ---VLSMAKSLA ILTAFGLF VLSRTWVPWF LKIMTSLSSQ TNELYQLAAV AFCLLVAMCS DKLGSLLELG SFAAGVMIST TDLAQHTLEQ VEPINRFFAA LFLAS- ---IGM  
 AtKEA5 LQG- ---IISMGKLLL ILSYHITVAS LLTWSVFPWF LKIMQISSLQ TNELYQLAAV AFCLLVAMCS DKLGSLLELG SFAAGVMIST TEFAGHTLEQ VEPINRFFAA LFLAS- ---IGM  
 AtKEA6 VHG- ---MLSIGKVVV LLSLFLAVLS ILSRTICPWL LKIMVLSLSSQ TNELYQLAAV AFCLLVAMCS DKLGSLLELG SFAAGVMIST TDLAQHTLEQ IEPINRFFAA LFLAS- ---IGM  
  
 AtKEA1 GRSLLDPYF GDAGSKEVLH KIGACRACAA VVALDAPGAN YRCVWALSKE YPNVKTFFRA HDVVHGLNLE KAGATAVVPF TLEPSLQAA AVLAQAKLPT SEIANTINEF RTRHLSLSETE  
 AtKEA2 GRSLLDPYF GDAGSKEVLH KIGACRACAA AIALDFGAN YRCVWALSKE YPNVKTFFRA HDVVHGLNLE KAGATAVVPF TLEPSLQAA AVLAQAKLPT SEIANTINEF RTRHLSLSETE  
 AtKEA3 SRKLGFFILY GDGRSPVLQ SAGVSSPKAI MIMYKGRRT TEAVQRLRA FPGVLSFL FVNVKIV- ---PVLQIAE KGEIPTFRGS ATGLILLIQD LAVVLLILI PLISPNSRG GIGFOATAEA LGLAAKAAV AITAIAGGR LLRPYIKQI  
 AtKEA4 LIHMFLWNH VDILLAVAL VVIKT-VVV AIVVYVFGYN NKTAVLVGMS LAQIGEFAY LLSRASNLHV IESKLYLILL GTTALSIVTT PLLFKLIPAV VHLGVLLRWF SPDSSTEIGF  
 AtKEA5 LINVHFLWNH VDILLASVIL VVIKT-ALA AVVVKAFRNY MRISFHVGLV LAQIGEFAY LLSRASNLHV IESKLYLILL GTTALSIVTT PLLFKLIPAV VHLGVLLRWF SPDSSTEIGF  
 AtKEA6 LVNVHFLWTH VDILLASVIL VVIKT-TIV TVVVKGFYGN NKTALLVGIS LAQIGEFAY LLSRASNLHV IESKLYLILL GTTALSIVTT PLLFKLIPAV VHLGVLLRWF SPDSSTEIGF  
  
 AtKEA1 LCEASGSLG YGYSR-TSKP KP-QPSDASG DNQIIEGGTV VI  
 AtKEA2 LCEASGSLG YGYSRSTSKP KPSPSETSD DNQIIEG-TL AI  
 AtKEA3 -----  
 AtKEA4 KGELYHSESA KRISLMIQGS LHDS- ---  
 AtKEA5 -----NESL QEKASLIEVH NRTK- ---  
 AtKEA6 KGEIVRSESG KQRMIMSRO SHSS- ---

## Proton binding

## Regulatory loop

## Rossmann fold

## 2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE ANTIPORTADORES AtKEA EN LEVADURA

### 2.1. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN

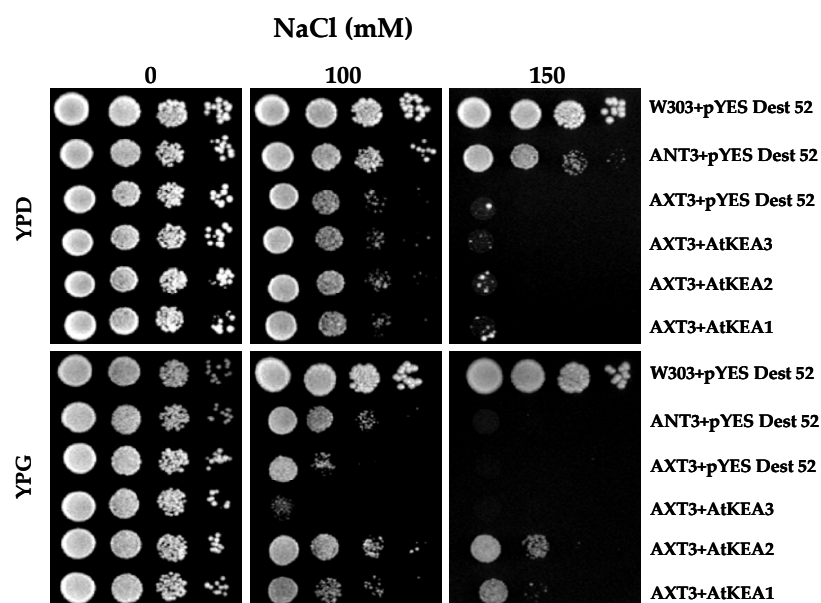
La caracterización funcional de los genes AtKEA se ha llevado a cabo, en primer lugar, mediante complementación de mutantes de levadura con disrupciones en los antiportadores de la familia CPA, así como en las ATPasas ENA1-4. La tolerancia a la salinidad o altas concentraciones de KCl de la levadura, capaz de crecer a concentraciones de NaCl hasta de 1M, se debe fundamentalmente a la actividad de la ATPasa tipo P ENA1, responsable de la extrusión activa de Na<sup>+</sup> y, en menor medida, a la actividad del antiportador (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática NHA1 (Quintero et al., 2000). La disrupción de estos genes, causa una elevada sensibilidad a Na<sup>+</sup>, así como un aumento de la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular, y una disminución de la concentración de K<sup>+</sup> cuando las células crecen en medio salino (Gaxiola et al., 1999). Un mecanismo adicional de tolerancia a NaCl o elevadas concentraciones de KCl depende de la acumulación de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> en vacuolas o compartimentos intracelulares. Las plantas, a diferencia de levaduras, no se desarrollan en un medio acuoso externo de gran volumen, por lo que este mecanismo adquiere gran importancia. El genoma de levadura codifica 2 sistemas de antiporte Cation/Protón de la familia CPA con una localización intracelular: Nhx1p, un antiportador (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> prevacuolar de la subfamilia CPA1, y Kha1p, un antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la subfamilia CPA2 de Golgi. Los antiportadores tipo NHX de plantas muestran homología de secuencias con el gen Nhx1, mientras que los antiportadores tipo CHX y KEA de plantas son más parecidos a Kha1 (ver figura A8 del apartado antecedentes científicos).

La disrupción de Nhx1p causa sensibilidad a NaCl, pH ácido y altas concentraciones de KCl en una cepa de levadura con disrupciones en los sistemas de transporte Ena1-4p y Nha1p. Sin embargo, el efecto más evidente de la disrupción de Nhx1p es la sensibilidad a higromicina, que manifiesta una cepa de levadura sin disrupciones adicionales. El efecto de la disrupción de Kha1p solamente es evidente en una cepa de levadura con disrupciones en los sistemas de transporte ENA1-4, Nha1p y Nhx1p. En esta cepa, la disrupción de Kha1p causa sensibilidad a pH alcalino cuando las células crecen en condiciones de baja concentración de K<sup>+</sup>. Se ha demostrado que la expresión en levadura de los genes NHX de plantas complementa los fenotipos causados por la disrupción de Nhx1p, mientras que la expresión de algunos genes de la familia CHX de plantas complementa la disrupción de Kha1p. Para examinar la función de los genes KEA de *Arabidopsis*,

hemos estudiado la complementación en levadura de la disrupción de Nhx1p y Kha1p.

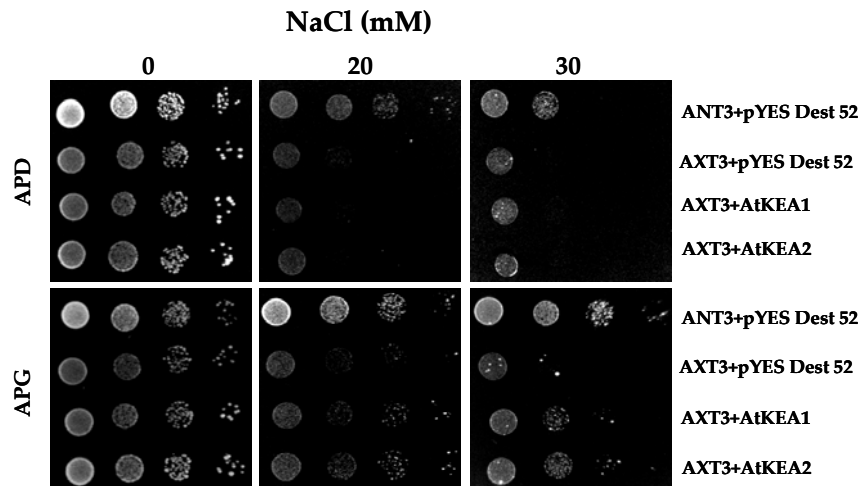
### 2.1.1. Complementación de la sensibilidad a NaCl, KCl e higromicina en levaduras con disrupción en NHX.

Se ha utilizado la cepa de levadura AXT3 con disrupciones en los sistemas de transporte ENA1-4, NHA1 y NHX1 para realizar los estudios de complementación de la sensibilidad a NaCl en células transformadas con los antiportadores de *Arabidopsis*. Como controles se utilizaron la cepa W303, sin disrupciones, y la cepa ANT3, con disrupciones en ENA1-4 y NHA1 (Fig. R4, R5)



**Fig. R4. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas W303, ANT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1) y AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1) transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA, clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de NaCl en medio YPD e YPG.**



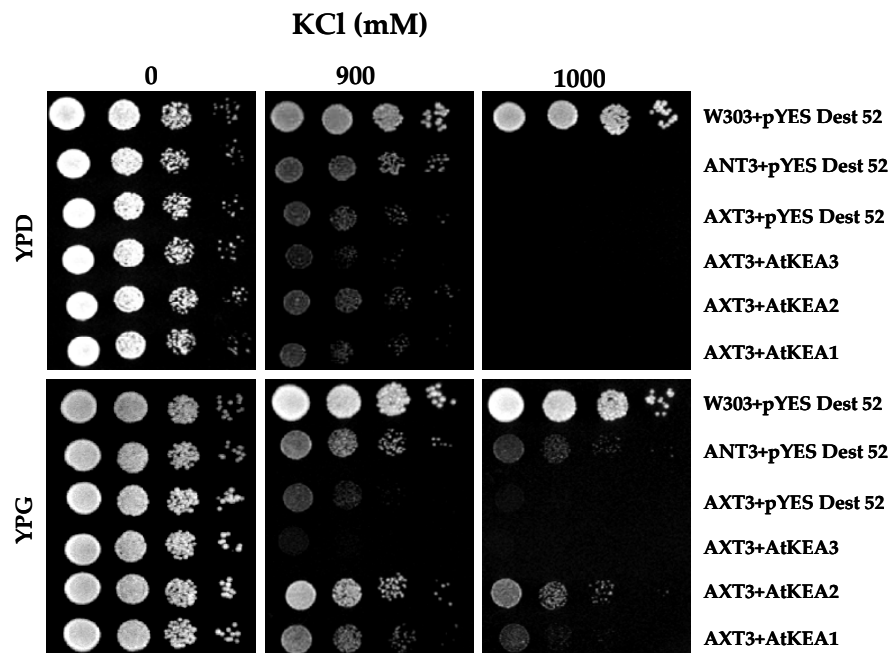


**Fig. R5. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ aha1) y AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ aha1,  $\Delta$ nhx1) transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA, clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de 0, 20 y 30 mM de NaCl en medio AP suplementado con galactosa o glucosa.**

Se realizaron los ensayos *droptests* en medios YPD o YPG suplementados con 0, 100 y 150 mM de NaCl, y en medios APD o APG suplementados con 0, 20 y 30 mM NaCl. En los dos casos se observó que el crecimiento de la cepa AXT3 era fuertemente inhibido en presencia NaCl. La expresión de los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 confiere tolerancia a NaCl a esta cepa, ya que permitió el crecimiento en medios suplementados con esta sal en presencia de galactosa, necesaria para la inducción de la expresión de los antiportadores. Además se demostró que esta tolerancia era mayor en las células que expresaban AtKEA2. En el caso de la cepa que expresaba AtKEA3 el crecimiento se vio más fuertemente inhibido que en la cepa AXT3 transformada con el vector vacío (Fig. R4 y Fig. R5).

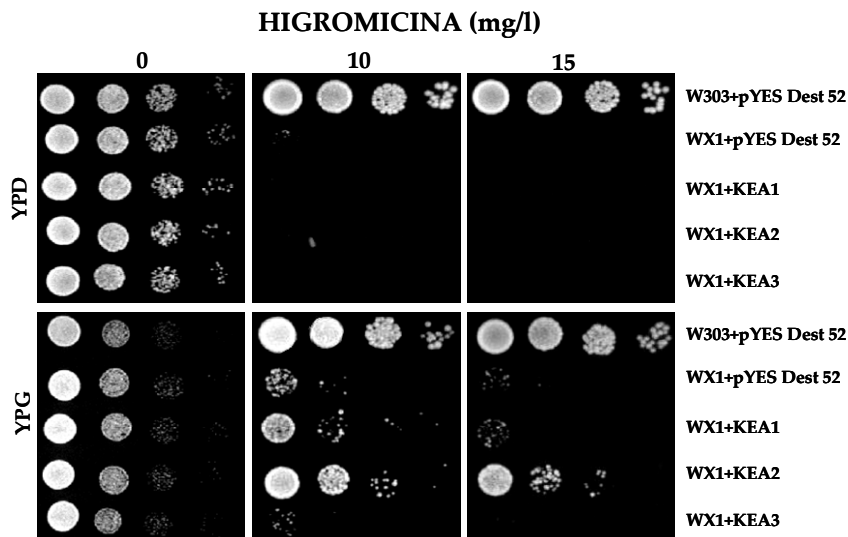
Se ha demostrado que la interrupción de ScNHX1 provoca sensibilidad a altas concentraciones de KCl a la cepa AXT3, lo que estaría relacionado con el papel de los transportadores NHX en la osmotolerancia y la acumulación de KCl en la vacuola (Venema et al., 2003). Para comprobar el efecto de los antiportadores de *Arabidopsis* sobre la tolerancia a altas concentraciones de KCl se realizaron estudios de complementación funcional, utilizando las cepas W303, ANT3 y AXT3, ésta última transformada con los plásmidos para la expresión de los antiportadores AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA3. Se utilizó medio YPD o YPG suplementado con distintas concentraciones de KCl, concretamente 700, 800, 900 y 1000 mM, y se demostró que las concentraciones más adecuadas para llevar a cabo estos ensayos

fueron 800, 900 y 1000 mM. Se observó de nuevo que solamente los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 confieren tolerancia a una concentración elevada de KCl (Fig. R6).



**Fig. R6.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas W303, ANT3 y AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1) transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA clonados en el vector pYES-DEST52, y con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de KCl en medio YP suplementado con glucosa (YPD) o galactosa (YPG).

El fenotipo más evidente de la disrupción de Nhx1p es la sensibilidad a higromicina. Se ha demostrado que el gen ScNHX1 es idéntico a VPS44 (*Vacuolar Protein Sorting 44*). La sensibilidad a higromicina es un fenotipo frecuente entre los mutantes del tipo VPS, con defectos en el tráfico y procesamiento de proteínas entre compartimentos endosomales y vacuola, y podría estar relacionado con una deficiencia en la biogénesis de la vacuola, sitio de posible degradación del compuesto, o con una deficiencia en el tráfico vesicular (Mukherjee et al., 2006).



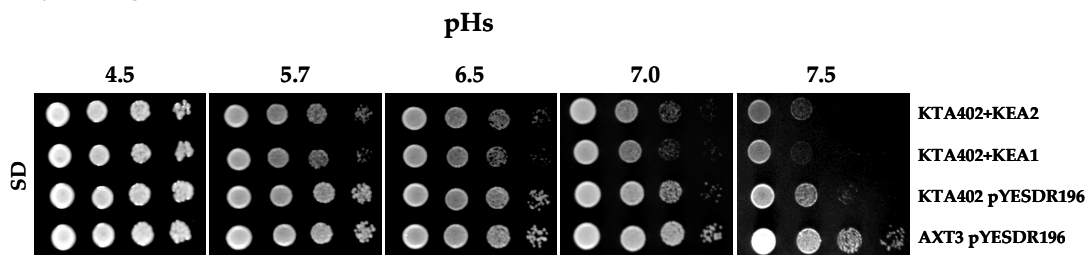
**Fig. R7. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas W303 y WX1 ( $\Delta nhx1$ ), transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA clonados en el vector pYES-DEST52 y con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de higromicina B en medios suplementados con galactosa o glucosa.**

Para comprobar la complementación de la sensibilidad a higromicina por los genes AtKEA, se utilizó la cepa de levadura WX1 con una interrupción del antiportador ScNHX1 (Tabla M3, Material y Métodos) que se transformó con los cDNAs de los antiportadores AtKEA clonados en el vector pYES-DEST52. Como control de estos ensayos se utilizó la cepa W303, que no presenta interrupciones. Tras un precultivo en medio SD selectivo, se realizaron los ensayos *droptests*, como se indica en el apartado 2.3.1. de material y métodos, en medios YPD o YPG suplementados con 0, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina B. Se observó que el crecimiento de las células de la cepa WX1 era inhibido fuertemente en presencia de higromicina B, mientras que las levaduras de la cepa W303 crecían a concentraciones de hasta 15  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina, tanto en medio YPD como YPG (Fig. R7). Ninguna de las cepas transformadas con los antiportadores de *Arabidopsis* creció en medio YPD suplementado con higromicina, ya que la expresión de los antiportadores está bajo control del promotor GAL1 y, en consecuencia, sólo se indujo en medio YPG conteniendo galactosa. En este medio YPG, solamente las cepas transformadas con los cDNAs de AtKEA1 y AtKEA2 crecían en presencia de higromicina B. De estas dos cepas la que presentó un mayor crecimiento y, por tanto, una mayor complementación de la sensibilidad a higromicina fue la que expresaba AtKEA2.

### 2.1.2. Complementación del fenotipo causado por la disrupción de Kha1p de levadura

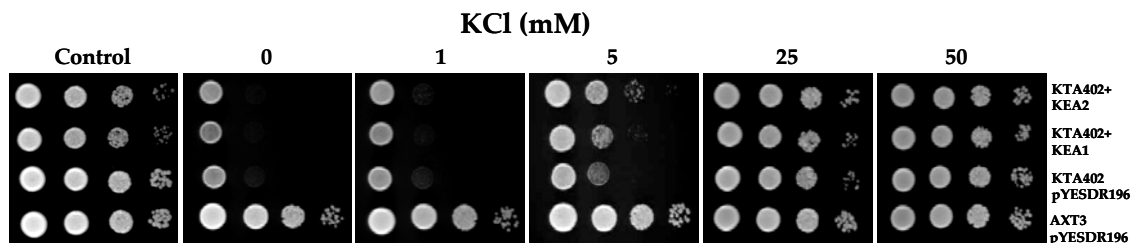
Además de ScNHX1, existe otro antiportador intracelular de la familia CPA en levadura, ScKHA1, que ha sido localizado en la membrana del Golgi, y que estaría implicado en el intercambio  $K^+/H^+$  y la tolerancia a un déficit de  $K^+$  en condiciones de pH ligeramente alcalino (Maresova y Sychrova, 2005). Este fenotipo es solamente evidente en una cepa de levadura con disrupciones en los transportadores ENA1-4, NHA1, NHX1 y KHA1 (Maresova y Sychrova, 2005). Se ha demostrado que la expresión de algunas proteínas de la familia CHX de plantas complementa el fenotipo causado por la disrupción de ScKHA1 (Maresova y Sychrova, 2006; Padmanaban et al., 2007).

Para estudiar el efecto del pH externo en el crecimiento de las levaduras que expresan los antiportadores AtKEA, se realizaron ensayos *droptests* en medio SD a distintos pH (4,5; 5,7; 6,0; 6,5; 7,0 y 7,5) sin  $K^+$  añadido (8 mM de  $K^+$  aproximadamente en el medio SD) (Fig. R8). Se utilizó la cepa KTA 40-2 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1 y  $\Delta$ kha1) transformada con las construcciones plasmídicas portadoras de las secuencias que codifican para AtKEA1 y AtKEA2 en el vector pDR196, y como controles se usaron las cepas AXT3 y KTA 40-2 transformadas con el vector pDR196 vacío. Se observó que todas las cepas crecían bien y de una manera muy similar a pH ácido entre 4,5 y 5,7. A pH 6,5 las células que expresaban los antiportadores crecían ligeramente peor que las que no los expresaban, y a pH 7,0 y 7,5 estas diferencias en el crecimiento eran más acusadas. Por tanto, la expresión de los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 en vez de conferir tolerancia al crecimiento de la levadura cuando el pH externo es ligeramente básico, como se había observado en el caso de las proteínas CHX (Padmanaban et al., 2007), causa una sensibilidad mayor (Fig. R8).

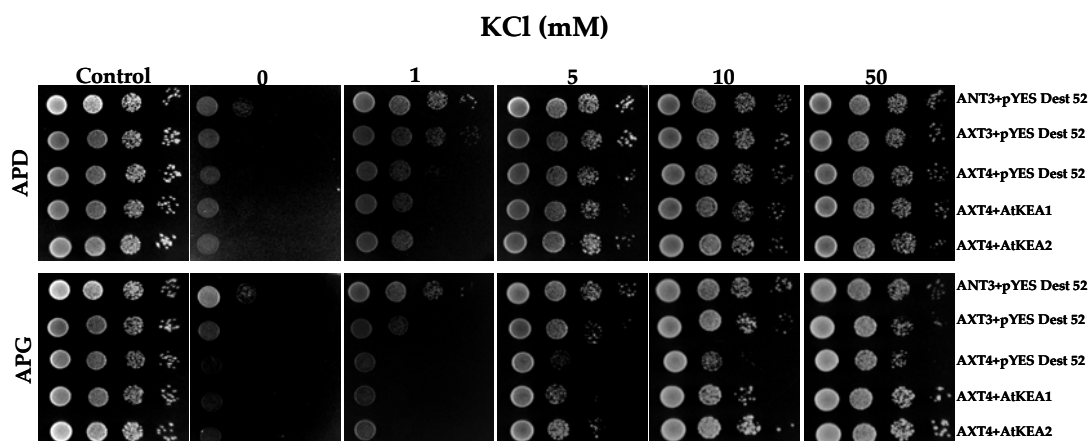


**Fig. R8.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1) y AXT4 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1,  $\Delta$ kha1) transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA clonados en el vector pDR196 y con el vector vacío. El ensayo se realizó a distintos pH en medio SD (8 mM de  $K^+$ ).

Para determinar si los genes AtKEA complementan la sensibilidad a un déficit de K<sup>+</sup> a pH alcalino causado por la interrupción de KHA1, se realizaron dos ensayos *droptests*, uno en la cepa KTA 40-2 (Maresova and Sychrova, 2005) y otro en la cepa AXT4 (Galvez, 2009), ambas con interrupciones en los sistemas de transporte ENA1-4, NHA1, NHX1 y KHA1 (Tabla M3, Material y Métodos). Se utilizó para estos ensayos el medio AP, ya que permite modificar la concentración de K<sup>+</sup> (Tabla M6, Material y Métodos). Estas cepas se transformaron con los plásmidos portadores de las secuencias que codifican para AtKEA1 y AtKEA2 en el vector pDR196 (en el caso de la cepa KTA 40-2) y en el vector pYES-DEST52 (en el caso de la cepa AXT4). Como control se usó la cepa AXT3 transformada con los vectores vacíos (Fig R9 y R10). En los dos ensayos se observó que las células que expresaban AtKEA1 y AtKEA2 crecían ligeramente mejor que la cepa portadora de la interrupción de KHA1 transformada con el vector vacío en un medio con bajo K<sup>+</sup> externo (5 y 10 mM) y ligeramente básico (pH 7,5), pero no complementaban la interrupción de KHA1 a concentraciones más bajas (0, 1 mM). Únicamente la presencia de KHA1 en la cepa AXT3 permitió el crecimiento en ausencia de K<sup>+</sup>. Al incrementar la concentración externa de K<sup>+</sup> (25 y 50 mM) se suprimía el fenotipo del mutante  $\Delta kha1$  y, por tanto, las células que expresaban los antiportadores y las transformadas con el vector vacío, usadas como control, presentaban un crecimiento muy similar (Fig. R9 y Fig. R10). También se llevaron a cabo ensayos con células que expresaban AtKEA3, observándose que no complementaba el fenotipo causado por la interrupción de KHA1 ni siquiera a concentraciones de 5 y 10 mM de KCl (datos no mostrados).



**Fig. R9. Crecimiento de células de *S cerevesiae*, cepas AXT3 y KTA 40-2 ( $\Delta ena1-4$ ,  $\Delta nha1$ ,  $\Delta nhx1$ ,  $\Delta kha1$ ) transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 clonados en el vector pDR196. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de KCl en medio APD ajustado a pH 7,5 con arginina.**



**Fig. R10. Crecimiento de células de *S cerevesiae***, cepas AXT3 y AXT4 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nh1,  $\Delta$ nhx1,  $\Delta$ kha1) transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de KCl en medio APD y APG ajustado a pH 7,5 con arginina (placa control pH 5,7 y 1 mM de KCl).

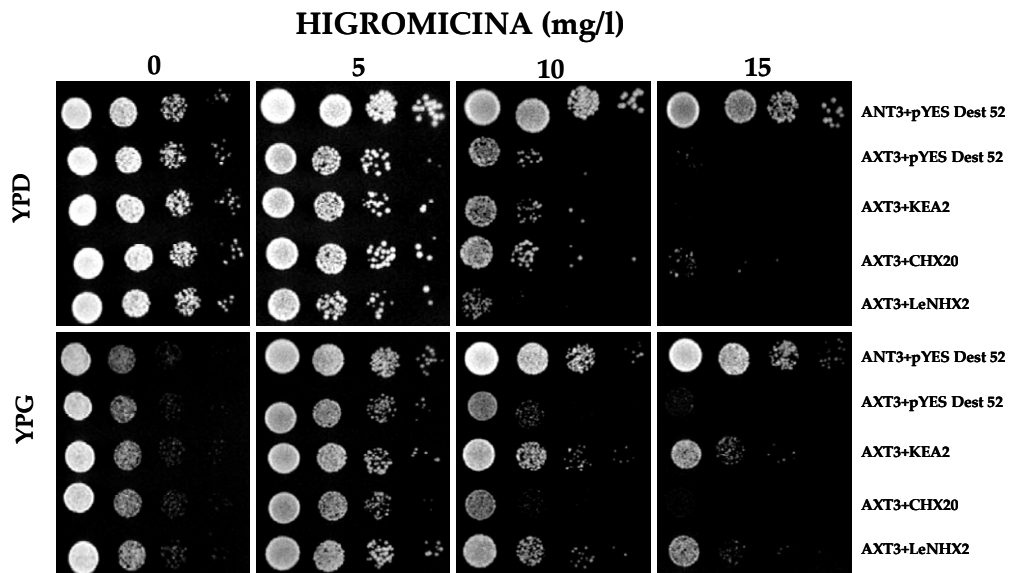
Los resultados obtenidos de los distintos ensayos *droptests* realizados en este trabajo demuestran que el antiportador AtKEA2 es el que presenta una mayor complementación de los fenotipos de sensibilidad a higromicina, a NaCl, a KCl y a déficit de  $K^+$  en condiciones de pH alcalino causado por la disrupción de KHA1 (a concentraciones de  $K^+$  externo de 5 y 10 mM).

### 2.1.3. Comparación de transportadores de las familias CPA1 y CPA2

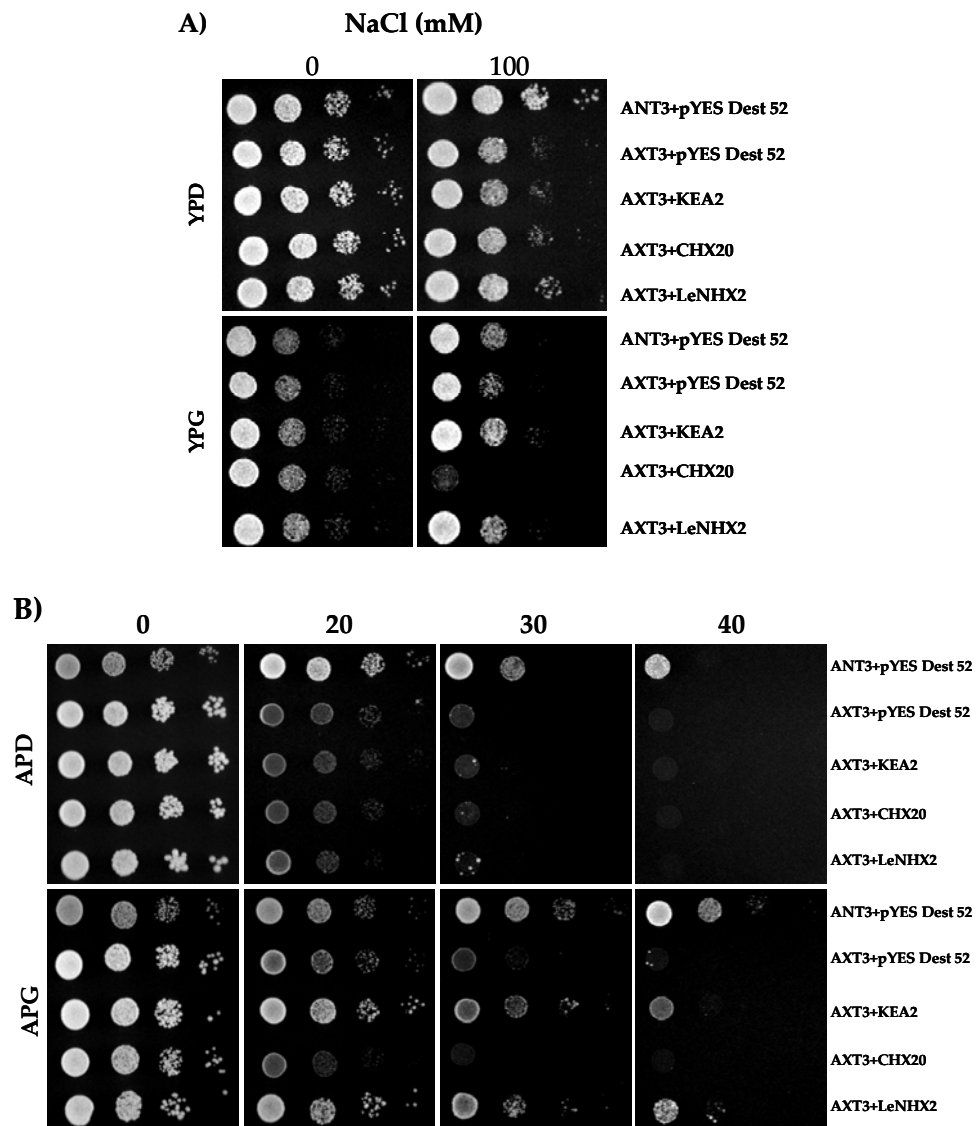
Estudios previos han demostrado que, igual que AtKEA1 y AtKEA2, la proteína LeNHX2 perteneciente a la subfamilia CPA1, complementa el fenotipo de sensibilidad a higromicina, a NaCl y a KCl causado por la disrupción de ScNHX1 (CPA1), pero no complementa el fenotipo de sensibilidad a déficit de  $K^+$  en condiciones de pH alcalino causado por la disrupción de ScKHA1 (Venema et al., 2003; Galvez, 2009). También ha sido descrito que la proteína AtCHX20 perteneciente a la subfamilia CPA2, complementa el fenotipo de sensibilidad a déficit de  $K^+$  en condiciones de pH alcalino causado por la disrupción de ScKHA1, pero no complementa los fenotipos de sensibilidad a higromicina, NaCl y KCl (Padmanaban et al., 2007).

Nuestros resultados indican que los genes AtKEA, más próximos por homología de secuencia a ScKHA1 y AtCHX20 de la familia CPA2, serían homólogos funcionales de los genes NHX de la familia CPA1. Para demostrar estas

diferencias hemos llevado a cabo un estudio comparativo del crecimiento de las cepas AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1) y AXT4 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1,  $\Delta$ kha1) transformadas con los cDNAs de los antiportadores AtKEA2, LeNHX2 y AtCHX20, clonados en el vector pYES-DEST52. Como controles de estos ensayos se utilizó la cepa ANT3 ( $\Delta$ ena1-4 $\Delta$  nha1 $\Delta$ ), y AXT3. El estudio consistió en ensayos *droptests* de complementación de sensibilidad a higromicina (Fig. R11), a NaCl (Fig. R12), a KCl (Fig. R13) y a déficit de K<sup>+</sup> en condiciones de pH alcalino (Fig. R14).

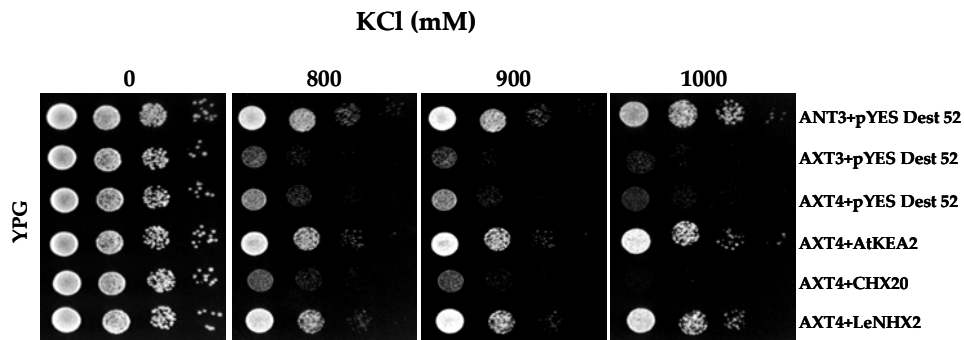


**Fig. R11.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 y AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1), transformadas con las construcciones para la expresión de AtKEA2, AtCHX20 y LeNHX2 y con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de 5, 10 y 15 mg/l de higromicina B en medios suplementados con galactosa o glucosa.

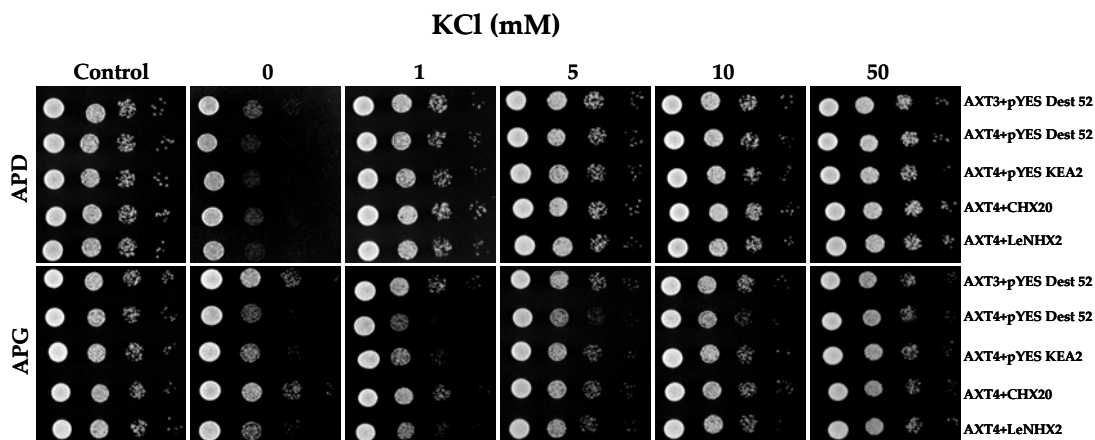


**Fig. R12.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 y AXT3 transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA, clonados en el vector pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de 0 y 100 mM NaCl en medio YPD e YPG (A) y en presencia de 0, 20 y 30 y 40 mM de NaCl en medio AP suplementado con galactosa o glucosa (B).





**Fig. R13.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3, AXT3 y AXT4 ( $\Delta na1-4$ ,  $\Delta nha1$ ,  $\Delta nhx1$ ,  $\Delta kha1$ ), transformadas con las construcciones para la expresión de AtKEA2, AtCHX20 y LeNHX2 y con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de 0, 800, 900 y 1000 mM de KCl en medio YPG.

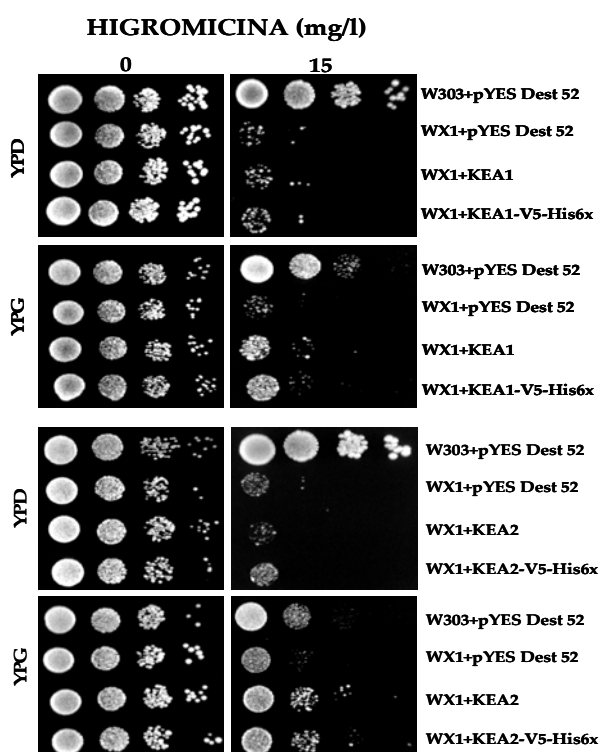


**Fig. R14.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3, AXT3 y AXT4 transformadas con las construcciones para la expresión de AtKEA2, AtCHX20 y LeNHX2 clonados en el vector pYES-DEST52 y con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de distintas concentraciones de KCl en medio APD y APG ajustado a pH 7,5 con arginina (placa control pH 5,7 y 1 mM de KCl).

En base a los resultados obtenidos en estos estudios comparativos se puede concluir que, al igual que LeNHX2, AtKEA2 complementa los fenotipos de sensibilidad a higromicina, NaCl y KCl causados por la disrupción de NHX1. Sin embargo, AtKEA2 no complementa el fenotipo de inhibición de crecimiento en medio ligeramente básico (pH 7,5) y déficit de  $K^+$  causado por la disrupción de KHA1, que sí es complementado por AtCHX20.

### 2.1.4. Efecto del epítipo V5-H6 sobre la funcionalidad de las proteínas

En los ensayos funcionales de los antiportadores *in vitro* hemos utilizado proteínas etiquetadas con una cola de 6 histidinas y el epítipo V5, para poder detectarlas y purificarlas. Con el fin de comprobar si esta etiqueta tenía algún efecto sobre la capacidad de las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 para complementar la sensibilidad a higromicina, se transformó la cepa WX1 con los cDNAs de los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 con y sin codón de *stop* clonados en el vector pYES-DEST52, cuya expresión da lugar a las proteínas nativas sin cola adicional y a las proteínas de fusión respectivamente. Los ensayos *droptests* se realizaron como se ha descrito previamente.



**Fig. R15.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas W303 y WX1 ( $\Delta nhx1$ ), transformadas con las construcciones para la expresión de las proteínas nativas AtKEA1 y AtKEA2 y de las proteínas de fusión, así como con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de 15 mg/l de higromicina B en medios suplementados con galactosa o glucosa.

Se observó que tanto las cepas que expresaban las proteínas nativas como las que expresaban las proteínas de fusión crecían en medio YPG suplementado con

higromicina B de un modo muy similar (Fig. R15). De acuerdo con estos resultados se puede concluir que la cola de seis histidinas y el epítipo V5 no parecen afectar a la funcionalidad de las proteínas, por tanto se ha utilizado esta etiqueta para posteriores experimentos de purificación y reconstitución de los antiportadores en los ensayos funcionales *in vitro*.

## 2.2. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE AtKEA1 Y AtKEA2 EN EL CONTENIDO INTRACELULAR DE Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> EN LEVADURA

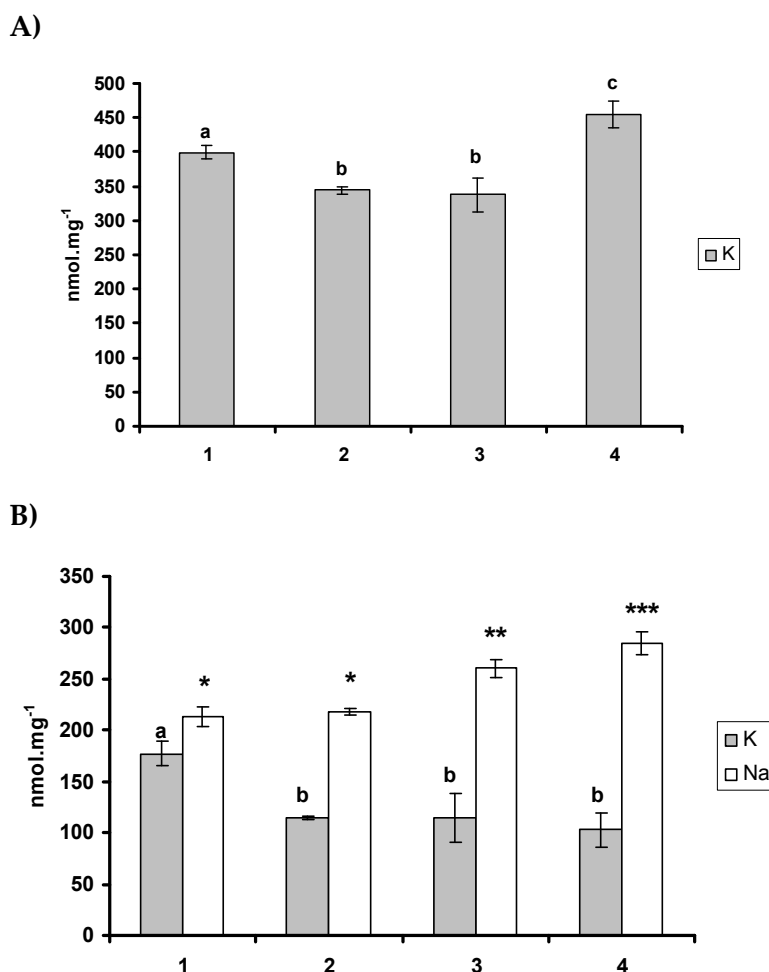
Para comprobar si los fenotipos de complementación de la sensibilidad a NaCl y a KCl mostrados por las células de levadura que expresaban AtKEA1 y AtKEA2 tenían un efecto en el contenido iónico, se determinaron los contenidos de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en células de levadura de la cepa AXT3 que expresaban estos dos antiportadores. Como controles se usaron las cepas ANT3 y AXT3 transformadas con el vector pYES-DEST52 vacío. Las células de levadura se cultivaron en ausencia de NaCl, y en presencia de 20 mM de NaCl.

Se sabe que la acumulación de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> en vacuolas proporciona un mecanismo eficiente para evitar los efectos tóxicos del Na<sup>+</sup> en el citosol y el efecto osmótico de elevadas concentraciones de sales, mientras que la acumulación de K<sup>+</sup> en vacuolas o compartimentos endosomales, así como la regulación del pH intracelular son esenciales para varios procesos celulares que se pueden ver afectados por el estrés salino. Por ello se llevó a cabo la determinación del contenido iónico de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> intracelular total, y también del contenido vacuolar y citoplasmático de estos iones (apartado 2.3.2 de Material y Métodos).

Los resultados obtenidos indicaron que en ausencia del tratamiento salino no existen diferencias significativas en el contenido de K<sup>+</sup> de las células de levadura de la cepa AXT3 transformadas con el vector vacío, y las que expresaban el antiportador AtKEA1. Sí se observó un mayor contenido intracelular de K<sup>+</sup> en las células que expresaban AtKEA2 que las células de las cepas AXT3 y AXT3 transformadas con el vector para la expresión de AtKEA1. En relación a la cepa ANT3 sí existían diferencias significativas en el contenido de K<sup>+</sup>, siendo menor en las células que expresaban AtKEA1 y mayor en las que expresaban AtKEA2 (Fig. R16 A).

Al analizar el contenido iónico de las células de levadura cultivadas en presencia de 20 mM de NaCl, se observó que no existían diferencias significativas en el contenido de K<sup>+</sup> entre las distintas cepas (AXT3, AXT3 que expresaba AtKEA1 y AXT3 que expresaba AtKEA2). Sí se observaron diferencias significativas en el contenido de Na<sup>+</sup>, concretamente las células que expresaban AtKEA1 y, sobre todo, AtKEA2 presentaban un mayor contenido de este ión que las células AXT3 que no

expresaban dichos antiportadores. En la cepa ANT3 se observó un mayor contenido de  $K^+$  y un menor contenido  $Na^+$  en comparación con la cepa AXT3 que expresaba ambos antiportadores (Fig. R16 B).



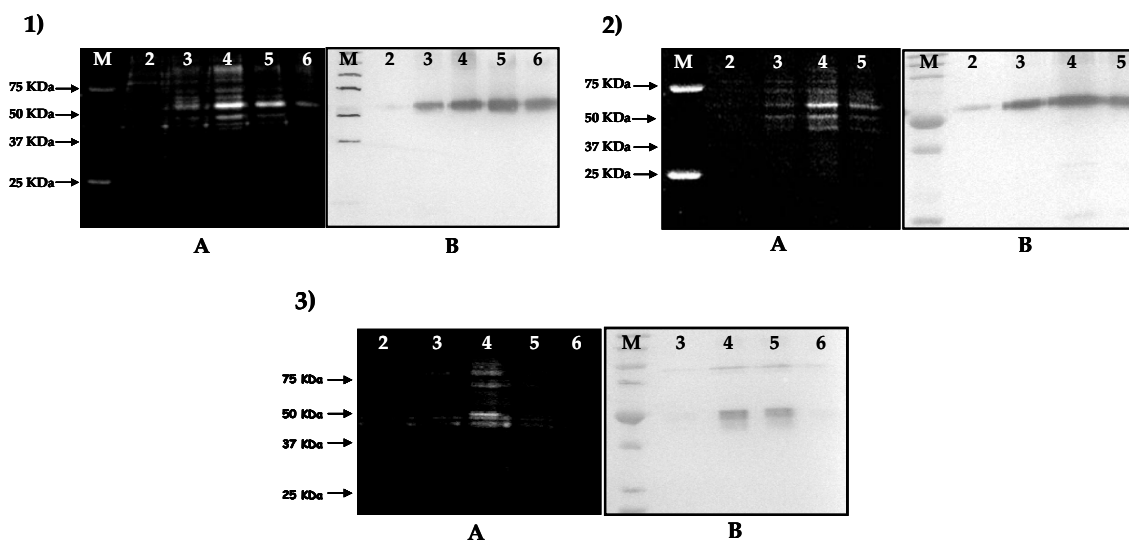
**Fig. R16. Contenido de  $Na^+$  y  $K^+$  intracelular total en *S. cerevisiae* cepas ANT3 y AXT3 transformadas con las construcciones para la expresión de los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 clonados en el vector pYES-DEST52 y con el vector vacío (1: ANT3+pYES-Dest52; 2: AXT3+pYES-Dest52; 3: AXT3+KEA1; 4: AXT3+KEA2), cultivadas en medio APG sin NaCl (A) y con 20 mM NaCl (B). Los resultados se expresan en relación al peso seco de las levaduras y son media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Diferentes letras y asteriscos indican valores significativamente diferentes según el test t de student ( $P=0,05$ ).**

## 2.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL *IN VITRO*

### 2.3.1. Inmunodetección y purificación de proteínas KEA de *Arabidopsis* expresadas en levadura.

Para detectar los antiportadores AtKEA1, 2 y 3 en membranas microsomales de levaduras transformadas con las construcciones génicas que codifican para los mismos, se utilizó un anticuerpo frente al epítipo V5 presente en el extremo C-terminal de las correspondientes proteínas de fusión. Las proteínas AtKEA1, 2 y 3 pudieron ser purificadas por cromatografía de afinidad en columna de níquel (apartado 2.3.6, Material y Métodos). La metodología de purificación se optimizó utilizando distintos pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0) y distintas concentraciones de imidazol (20, 50, 75, 100 y 200 mM) y de NaCl (500, 250 and 50 mM). Los mejores resultados se obtuvieron a pH 6.5, 500 mM de NaCl y usando unas concentraciones de 20 y 50 mM de imidazol, para lavar la columna de Ni<sup>2+</sup>, y 200 mM de imidazol para eluir la proteína (datos no mostrados). Las proteínas eluidas de la columna se separaron por electroforesis, y se tiñeron con Sypro® Ruby-Protein (Bio-Rad) o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para llevar a cabo la inmunodetección. La existencia de una banda proteica mayoritaria reconocida por el anticuerpo puso de manifiesto un importante grado de purificación (Fig. R17).

AtKEA1 y AtKEA2 presentan un tamaño prácticamente idéntico, por encima de 50 KDa, mientras que AtKEA3 muestra un tamaño ligeramente más pequeño (aproximadamente 50 KDa) (Fig. R15). Estas diferencias podrían explicarse en base al mayor número de amino ácidos de AtKEA1 (619 aa) y AtKEA2 (620 aa) comparado con AtKEA3 (488 aa), que podría estar truncado como se ha discutido anteriormente (apartado 1 de resultados).



**Fig. R17. Tinción (A) e inmunodetección (B) de las proteínas AtKEA1 (1), AtKEA2 (2) y AtKEA3 (3) purificadas de membranas microsomales de levadura tras separación por electroforesis SDS-PAGE. Los carriles numerados del 2-6 se corresponden con las fracciones de elución 2-6; M: marcador de peso molecular (KDa). Se cargó 5  $\mu$ l de cada fracción de elución en cada caso.**

### 2.3.2 Determinación de la actividad de proteínas KEA purificadas de levadura y reconstituidas en proteoliposomas.

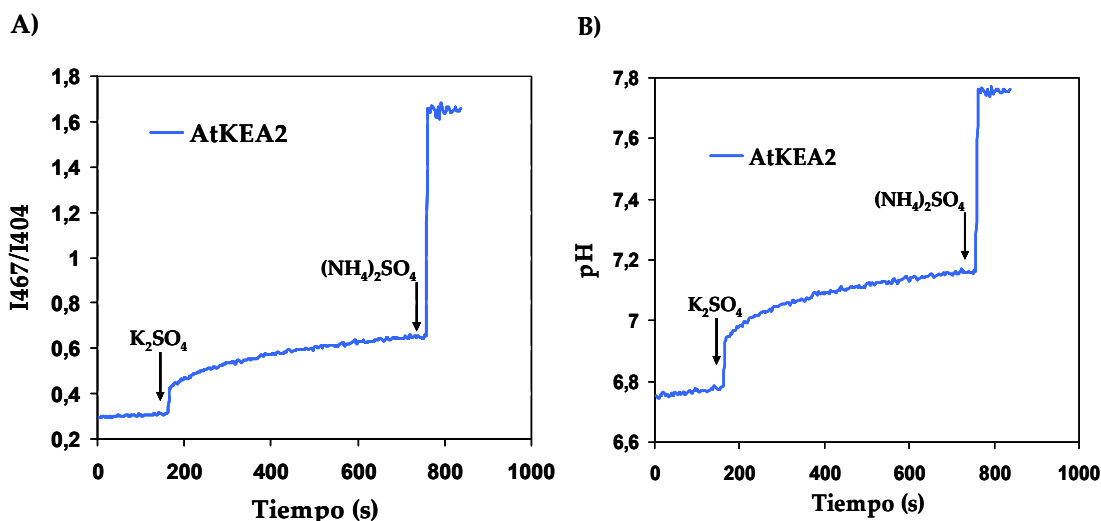
Para medir la actividad de intercambio iónico de los transportadores AtKEA1, 2 y 3, las proteínas purificadas se reconstituyeron en liposomas. Los proteoliposomas se prepararon en presencia del indicador de pH fluorescente piranina. En un segundo paso se eliminó la piranina no encapsulada en el interior de los proteoliposomas por filtración en gel utilizando Sephadex G-50. De este modo, las medidas de fluorescencia de la sonda reflejan el pH en el interior de los proteoliposomas, y esta variación de pH en función del tiempo proporciona una medida de la actividad intercambiadora del transportador reconstituido en el liposoma. El protocolo seguido y el tratamiento de los datos se describen en el apartado 2.3.11.1. de Material y Métodos.

Dentro de la familia CPA2, las proteínas KEA forman un subgrupo junto a cuatro transportadores bacterianos (KefC y KefB de *E.coli*; AmhT de *Bacillus pseudofirmus*; y YhaT de *Bacillus subtilis*) que presentan un sistema de transporte de dos componentes, existiendo proteínas auxiliares que interactúan con ellos modulando su actividad, y pueden funcionar como antiportadores catión/ $H^+$  o como canales iónicos. KefC y YhaT necesitan la presencia de sus proteínas auxiliares para

desempeñar la actividad antiportadora, mientras que AmhT lleva a cabo el antiporte independientemente de las mismas. Además, se sabe que KeffC presenta una actividad de intercambio  $K^+(Rb^+)/H^+$  alta,  $Li^+/H^+$  media y  $Na^+/H^+$  baja, y que los dos sistemas CPA2 de dos componentes de *Bacillus* sólo catalizan el intercambio  $K^+(Rb^+)/H^+$  (Fujisawa et al., 2007). Sin embargo, aún no se ha descrito el mecanismo de transporte de las proteínas KEA de *Arabidopsis*, también pertenecientes a la subfamilia CPA2.

En este trabajo se realizaron estudios de selectividad iónica para los transportadores AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA3 (Fig. R17). Para ello, se estudió el intercambio ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ )/ $H^+$  utilizando sales de sulfato de estos iones y un gradiente de  $H^+$  para energizar el transporte. Para generar un pH ácido en el interior de los proteoliposomas se utilizó la técnica de dilución de  $(NH_4)_2SO_4$  (Venema et al., 2002; Venema et al., 2003). Como control negativo se utilizó el catión orgánico tetrametil amonio ( $TMA^+$ ), ya que es poco probable que el antiportador pueda transportar este ión. Para los tres antiportadores estudiados no se observó un incremento en la velocidad de alcalinización en presencia del catión  $TMA^+$ , aparte de un salto en la fluorescencia en el momento de añadir  $(TMA_2)SO_4$ , que también se produce al añadir el resto de las sales de sulfato. Se desconoce por qué se produce este salto, pero podría estar relacionado con algún efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia de la piranina, el pH del medio o las propiedades de los proteoliposomas.

En la Fig. R18 se muestra un registro típico de la razón de la fluorescencia a 404 y 467 nm de excitación y 511 nm de emisión, en función del tiempo. Este registro se utilizó para evaluar la actividad antiporte de AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA3, mostrando el efecto de la conversión de la razón de fluorescencia a pH. La reacción de antiporte se inicia con la adición de  $K_2SO_4$  y se finaliza con la adición de  $(NH_4)_2SO_4$ , que suprime el gradiente de protones.



**Fig. R18. Actividad antiporte de AtKEA2.** Registro de la razón de la fluorescencia a 404 y 467 nm de excitación y 511 nm de emisión (A) y conversión de la razón de fluorescencia a pH (B) por AtKEA2 reconstituido en proteoliposomas. La adición de  $K_2SO_4$  y  $(NH_4)_2SO_4$ , para iniciar y finalizar la reacción de transporte se señala con flechas.

En el caso de AtKEA2 se observó que el  $K^+$  y el  $Cs^+$  provocaban el cambio de pH más fuerte en el interior de los proteoliposomas, lo que indica una actividad de transporte más alta para estos cationes. El transporte de  $Na^+$  es más bajo, y el de  $Li^+$  intermedio (Fig. R19 B). En cuanto a AtKEA1, la actividad es más baja, siendo la velocidad de alcalinización muy similar en presencia de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$  y  $Cs^+$  (Fig. R19 A). AtKEA3 reconstituido en proteoliposomas apenas presenta actividad antiportadora. En la figura R19 C, se puede observar que el cambio de pH en el interior de los proteoliposomas es prácticamente igual en presencia de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$  y  $TMA^+$ . Como se ha dicho anteriormente, el catión  $TMA^+$  no es transportado por el antiportador, por tanto es probable que la variación de pH que se produce, a modo de salto, al adicionar las distintas sales no sea una consecuencia de la actividad de intercambio catión/ $H^+$ .



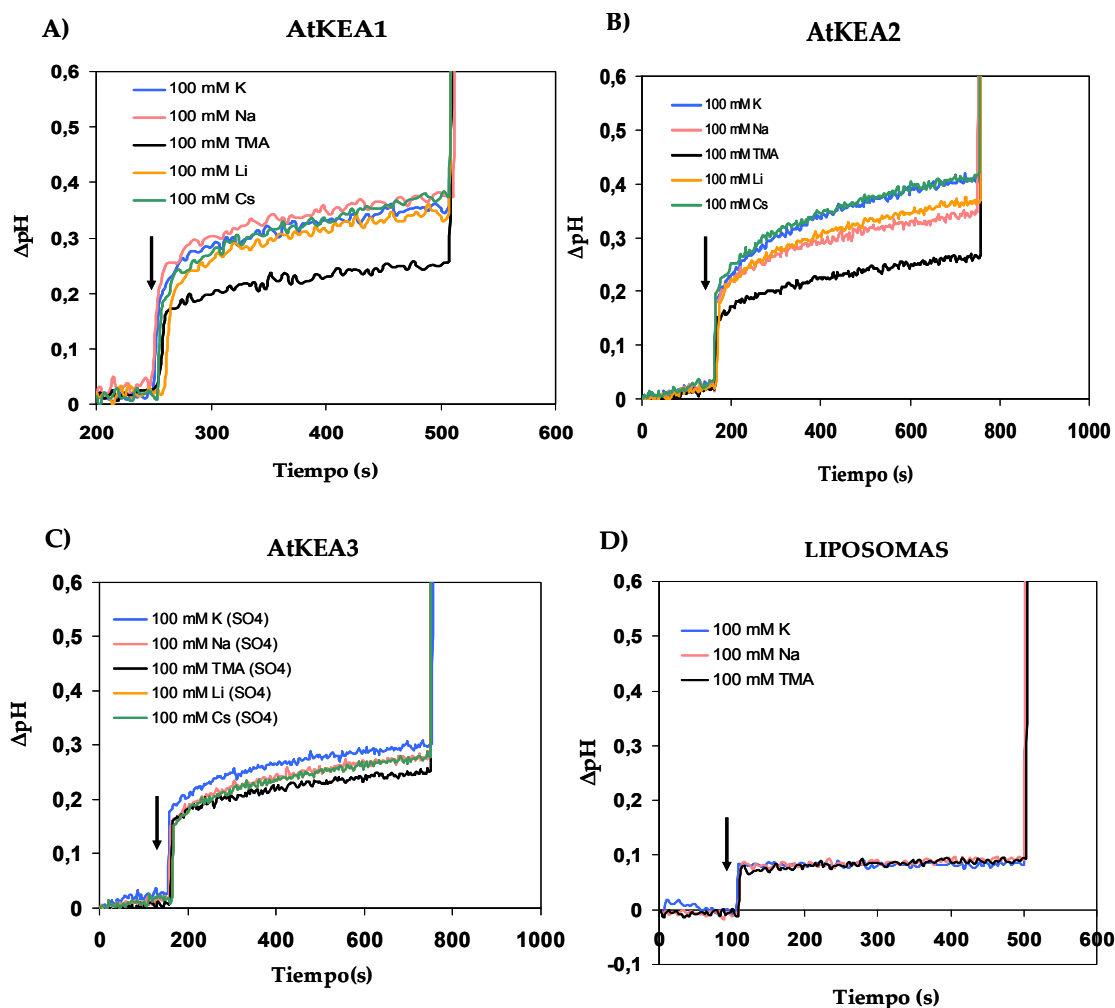


Fig. R19. Actividad antiporte en presencia de diferentes cationes. A) AtKEA1; B) AtKEA2; C) AtKEA3; D) Liposomas (control negativo). La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $TMA^+$ ,  $Li^+$  ó  $Cs^+$  como sales de sulfato, y se señala con una flecha. La medida se realizó según se ha descrito en la Fig. R16. Se representa la variación del pH ( $\Delta pH$ ) en función del tiempo.

### 2.3.3 Determinación del mecanismo de transporte catalizado por AtKEA2

Los resultados obtenidos de estos ensayos han puesto de manifiesto que la proteína AtKEA2 es la que presenta una mayor actividad de transporte, siendo el  $K^+$  el catión que provoca el cambio de pH más fuerte en el interior de los proteoliposomas. Por ello se llevaron a cabo ensayos con el fin de corroborar que esta actividad se trataba de un antiporte y no de un transporte iónico mediado por

un canal, como ocurría en el caso de KefC y YhaT en ausencia de sus proteínas auxiliares (Fujisawa et al., 2007).

El intercambio  $K^+/H^+$  a través de la membrana puede estar acoplado directamente por un mecanismo electroneutro de intercambio, o indirectamente dirigido por difusión de los iones a través de la membrana, facilitado o no por canales iónicos. En este caso los flujos iónicos están acoplados por efectos eléctricos y la velocidad de transporte depende del potencial de membrana determinada por la concentración y permeabilidad de todos los iones en solución, según la ecuación de flujo de Goldman-Hodgkin-Katz

$$F_{K^+} = P_{K^+} z_{K^+} \frac{VF [K^+]_i - [K^+]_o \exp(-z_{K^+} VF / RT)}{RT (1 - \exp(-z_{K^+} VF / RT))} \quad (1)$$

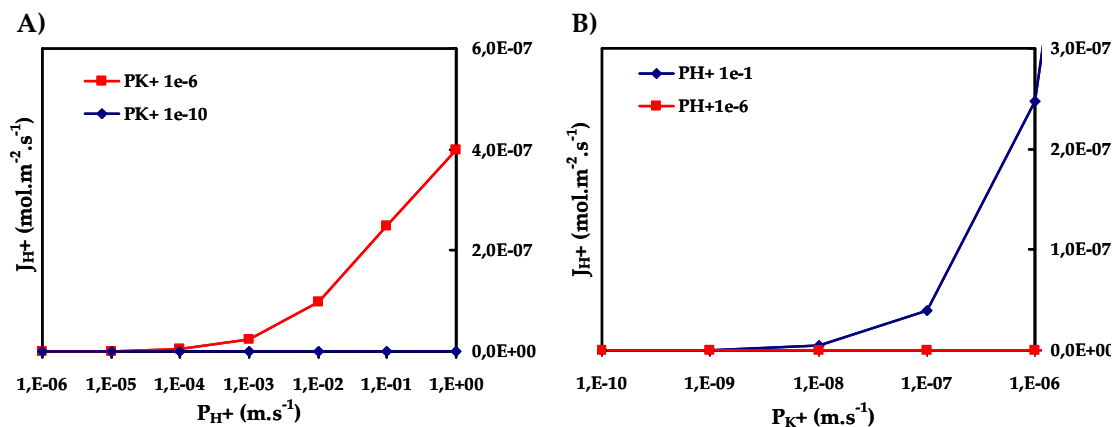
$$F_{H^+} = P_{H^+} z_{H^+} \frac{VF [H^+]_i - [H^+]_o \exp(-z_{H^+} VF / RT)}{RT (1 - \exp(-z_{H^+} VF / RT))} \quad (2)$$

Donde  $F$  es la constante de Faraday,  $P_{K^+}$  y  $P_{H^+}$  el coeficiente de permeabilidad para el  $K^+$  y  $H^+$ ,  $z_{K^+}$  y  $z_{H^+}$  la valencia de  $K^+$  y  $H^+$ ,  $V$  el potencial de membrana,  $R$  la constante de Gas,  $T$  la temperatura e  $i$  y  $o$  se refieren al interior y exterior de las vesículas, respectivamente. Para simplificar, consideramos que los iones del tampón ( $BTP^{++}$ ,  $BTP^+$ ,  $Mes^-$ ) son impermeables, y que solamente utilizamos iones monovalentes  $K^+$ ,  $H^+$  y un anión relativamente impermeable como el gluconato o sulfato. En este caso, el potencial de membrana se aproxima al potencial determinado por la permeabilidad y concentración de  $K^+$  y  $H^+$  según:

$$V = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_{H^+} [H^+]_o + P_{K^+} [K^+]_o}{P_{H^+} [H^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i} \right) \quad (3)$$

Como solamente hay dos especies iónicas permeables, el flujo de  $K^+$  es de la misma magnitud que el flujo de protones, pero de dirección opuesta para garantizar el equilibrio de cargas. En este caso, si la permeabilidad a  $K^+$  es grande por la presencia de un transportador de tipo canal, el gradiente de concentración de  $K^+$  determina mayoritariamente el potencial de membrana. Sin embargo, si la permeabilidad a  $H^+$  es baja, el flujo de  $K^+$  estará limitado por el flujo de  $H^+$ , y solamente habrá un flujo de protones significativo cuando aumente la permeabilidad a protones. De la misma manera, si la permeabilidad a protones es

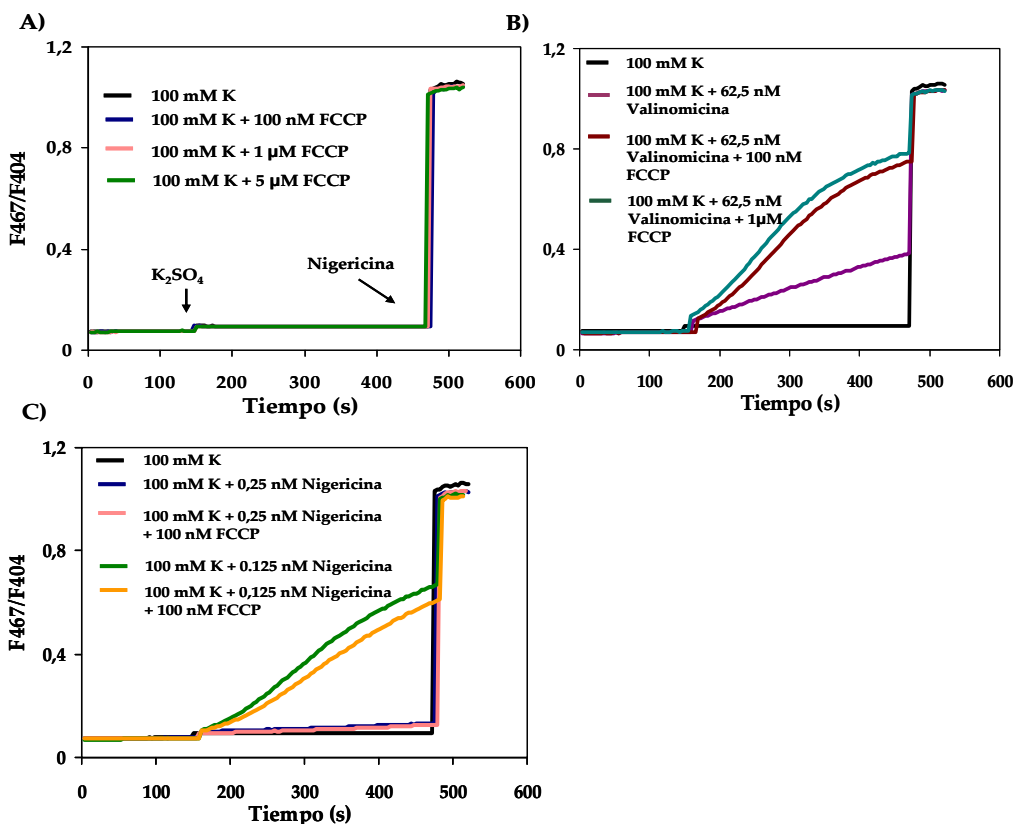
elevada, pero la permeabilidad a  $K^+$  es baja, no habrá un flujo de protones elevado. En el caso de la presencia de un antiportador electroneutro  $K^+/H^+$ , el flujo de  $H^+$  sería independiente de la permeabilidad de la membrana a  $H^+$  o  $K^+$ . En la figura R20 se muestra el resultado del cálculo de flujos iniciales de protones utilizando valores variables de  $P_{H^+}$  y  $P_{K^+}$ , tomando como situación inicial las condiciones experimentales típicas (pH interior 5, pH exterior 7, concentración de  $K^+$  exterior 100 mM, concentración de  $K^+$  interior 1 mM) y utilizando las ecuaciones 2 y 3.



**Fig R20. Cálculo del flujo inicial de protones.** A) Para valores variables de  $P_{H^+}$  y un valor fijo  $P_{K^+}$ . B) Para valores variables de  $P_{K^+}$  y un valor fijo de  $P_{H^+}$

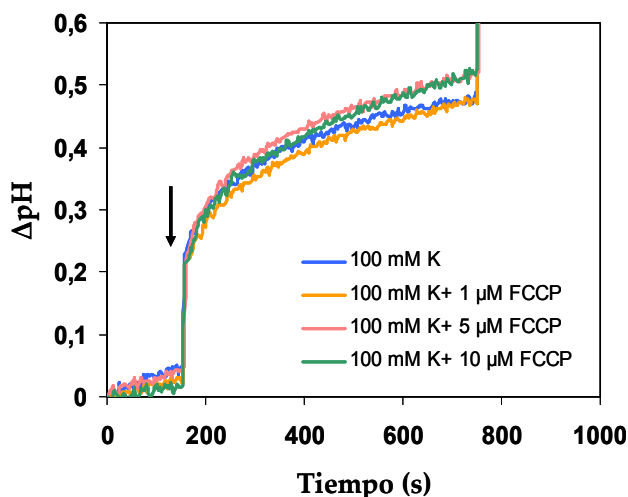
Para corroborar este razonamiento, hemos utilizado liposomas preparados de la misma manera que en los ensayos de reconstitución, pero sin proteínas. Hemos variado la permeabilidad a  $K^+$  utilizando los ionóforos valinomicina, que funciona como canal de  $K^+$ , y Nigericina, que funciona como un antiportador electroneutro  $K^+/H^+$  a bajas concentraciones. A continuación, hemos aumentado la permeabilidad a protones utilizando el protonóforo FCCP. En primer lugar se observa que la adición de FCCP solo, no aumenta el flujo de protones en respuesta a la imposición de un gradiente de  $K^+$  y  $H^+$ , lo que indica que los liposomas tienen una permeabilidad baja para el  $K^+$ , que limita el eflujo de  $H^+$  (Fig R19). Este resultado concuerda con valores de  $P_{K^+}$  del orden de  $0,6\text{-}2 \times 10^{-12} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (Venema et al., 1993). Sin embargo, la adición de valinomicina (62,5 nM) o Nigericina (0,025 y 0,125 nM) sí aumenta moderadamente la velocidad de alcalinización de los liposomas. Cuando se añaden conjuntamente Valinomicina y FCCP, se acelera aún más la alcalinización, lo que se explica en base al funcionamiento de valinomicina como canal de  $K^+$  como se ha explicado anteriormente (Fig R21). Cuando se añaden conjuntamente FCCP y

Nigericina, la velocidad de alcalinización no aumenta, lo cual concuerda con el funcionamiento de la nigericina como antiportador electroneutro de  $K^+/H^+$ .



**Figura R21.** Efecto de la adición de FCCP, Valinomicina y Nigericina sobre la velocidad de alcalinización de liposomas en respuesta a un gradiente de pH y  $K_2SO_4$ . A) Efecto de la adición de FCCP. La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$  (como  $K_2SO_4$ ) en presencia de 0, 100 nM, 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M de FCCP, y se finalizó con la adición de 25 nM de nigericina. La adición de  $K_2SO_4$  y nigericina (25 nM), para iniciar y finalizar la reacción de transporte se señala con flechas. B) Efecto de la adición de Valinomicina y de Valinomicina + FCCP (conjuntamente). La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$  (como  $K_2SO_4$ ), en ausencia de ionóforos, en presencia de Valinomicina (62,5 mM) y en presencia de Valinomicina (62,5 mM) + FCCP (100 nM, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M), y se finalizó con la adición de 25 nM de nigericina. C) Efecto de la adición de Nigericina y de Nigericina + FCCP (conjuntamente). La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$  (como  $K_2SO_4$ ); en ausencia de ionóforos, en presencia de Nigericina (0,025, 0,125 nM) y de Nigericina y FCCP (100 nM) juntos, y se finalizó con la adición de 25 nM de nigericina.

En la figura R22 se observa que en el caso de proteoliposomas reconstituidos en presencia de AtKEA2, la adición de FCCP no estimula la alcalinización inicial de los proteoliposomas a ninguna de las concentraciones ensayadas, lo que indica que AtKEA2 no actúa como un canal de  $K^+$  sino como un antiportador  $K^+/H^+$  electroneutro.

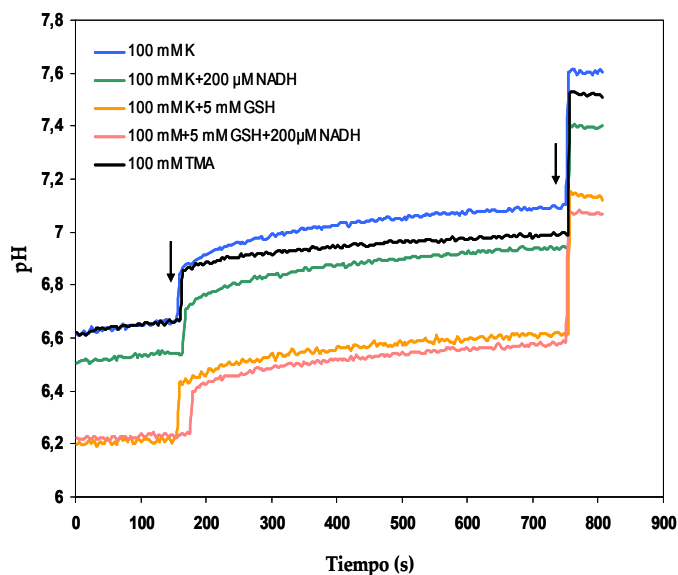


**Fig. R22. Actividad antiporte de AtKEA2 en presencia de  $K^+$ , y en presencia de  $K^+$  + FCCP.** La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$  (como  $K_2SO_4$ ) en presencia o no de FCCP (1, 5 y 10  $\mu M$ ) y se señala con una flecha. La medida se realizó según se ha descrito en la Fig. R16. Se representa la variación del pH ( $\Delta pH$ ) en función del tiempo.

Previamente se había descrito que KefC funciona como un canal de  $K^+$  regulado por GSH (glutatión), que se mantiene en un estado inactivo cuando se une a este compuesto, y activo cuando se une a complejos resultantes de la reacción de GSH con compuestos electrofílicos (N-etilmaleimida o metilglioxal) (Meury y Kepes, 1982; Booth et al., 1985; Elmore et al., 1990; Ferguson et al., 1993; Ferguson, 1999). También se sabe que cuando interactúa con su proteína auxiliar, KefFC, funciona como un antiportador  $K^+/H^+$ . En este caso el GSH inhibe el antiporte, y la presencia de NADH potencia esta inhibición (Fujisawa et al., 2007). Por ello, con el fin de comprobar si estos compuestos tenían algún efecto sobre la actividad de AtKEA2, se llevaron a cabo medidas del intercambio  $K^+/H^+$  en presencia de los mismos (Fig. R23 y R25). Se ensayaron distintas concentraciones de ambos compuestos, y se determinó que 5 mM de GSH y 200  $\mu M$  de NADH eran las más idóneas para la realización de estos estudios.

Sin embargo, la interpretación de estos resultados es difícil, ya que tanto el GSH como el NADH afectan a la fluorescencia de la piranina (Fig. R23). Por esta razón se

calibró la señal con el pH como se ha descrito en material y métodos en presencia de GSH y NADH (Fig. R24). Además, el GSH parece actuar como base débil, provocando una acidificación adicional en el interior de las vesículas, lo que hace aún más difícil la interpretación de los datos (Fig. R21). Seguramente estos problemas han afectado también los resultados obtenidos por Fujisawa y colaboradores (2007).



**Fig. R23. Actividad antiporte de AtKEA2.** Registro de la variación del pH en función del tiempo en distintas condiciones: 100 mM de K<sup>+</sup> (control); 100 mM K<sup>+</sup> + 200 μM NADH; 100 mM K<sup>+</sup> + 5 mM GSH; 100 mM K<sup>+</sup> + 200 μM NADH + 5 mM GSH; 100 mM TMA (control negativo del transporte). La adición de distintos compuestos para iniciar la reacción y la adición de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para finalizarla se señalan con flechas.

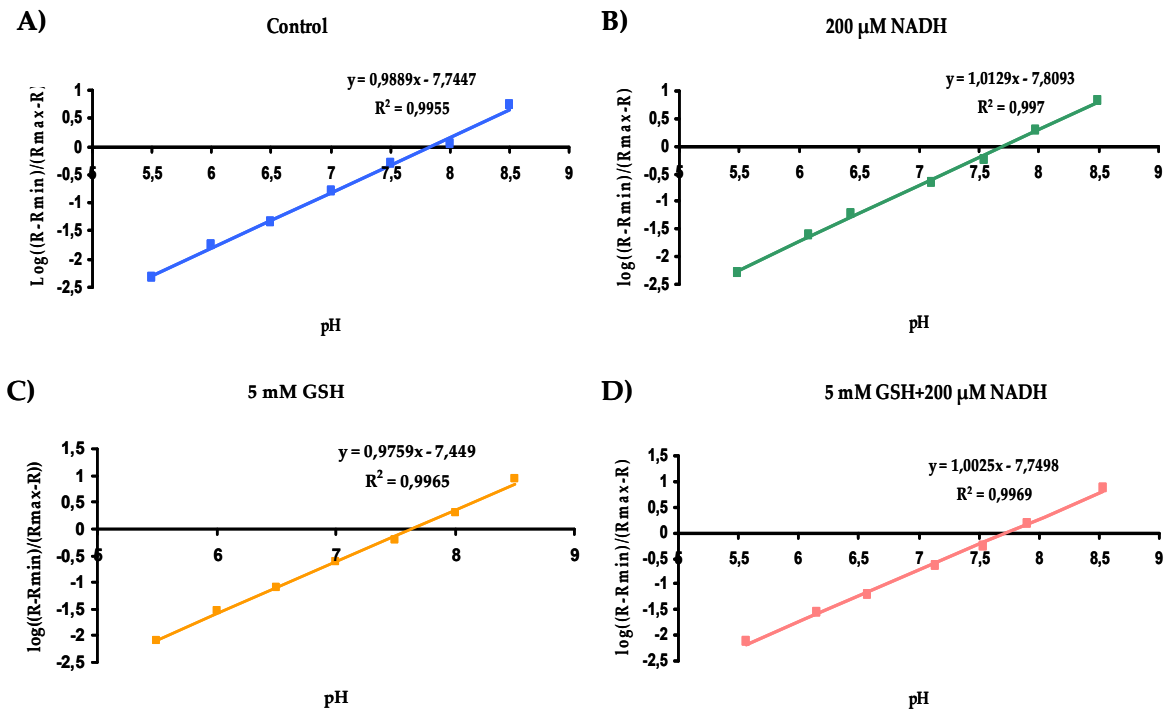
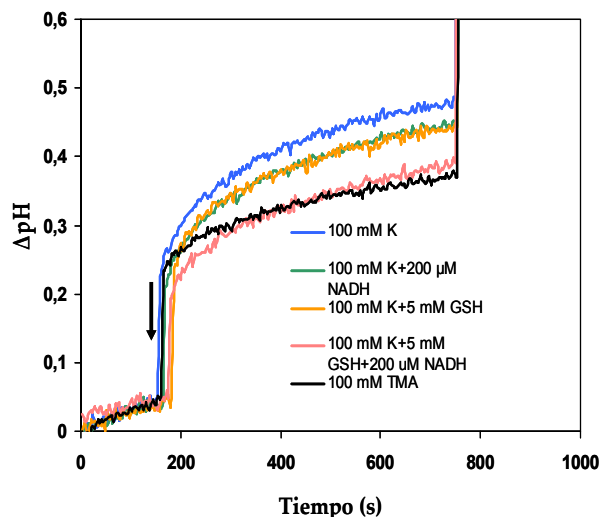


Fig. R24. Relación entre la fluorescencia de la piranina y el pH (0,25  $\mu$ M piranina en 20 mM BTP-MES y glicerol al 10%). La emisión de fluorescencia se midió a 511 nm. Se muestra la relación lineal entre el logaritmo de  $(R-R_{\min})/(R_{\max}-R)$  y el pH, en distintas condiciones: A) condiciones control; B) en presencia de 200  $\mu$ M de NADH; C) en presencia de 5 mM de GSH; D) en presencia de 5 mM de GSH + 200  $\mu$ M de NADH.



**Fig. R25. Actividad antiporte de AtKEA2 en presencia de  $\text{K}^+$ ,  $\text{K}^+$  + GSH,  $\text{K}^+$  + NADH y  $\text{K}^+$  + GSH + NADH.** La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $\text{K}^+$  (como  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) y se señala con una flecha. La medida se realizó según se ha descrito en la Fig. R16. Se representa la variación del pH ( $\Delta\text{pH}$ ) en función del tiempo.

No obstante, los resultados obtenidos indican que al adicionar 5 mM de GSH ó 200  $\mu\text{M}$  de NADH, de manera independiente, la actividad de antiporte se veía ligeramente disminuida, y esa disminución era prácticamente idéntica en ambos casos. Cuando se adicionaba 5 mM GSH y 200  $\mu\text{M}$  NADH conjuntamente, la disminución de la actividad era mucho mayor, y el cambio de pH observado era prácticamente igual al provocado por la adición del catión  $\text{TMA}^+$ , usado como control negativo en estos estudios.

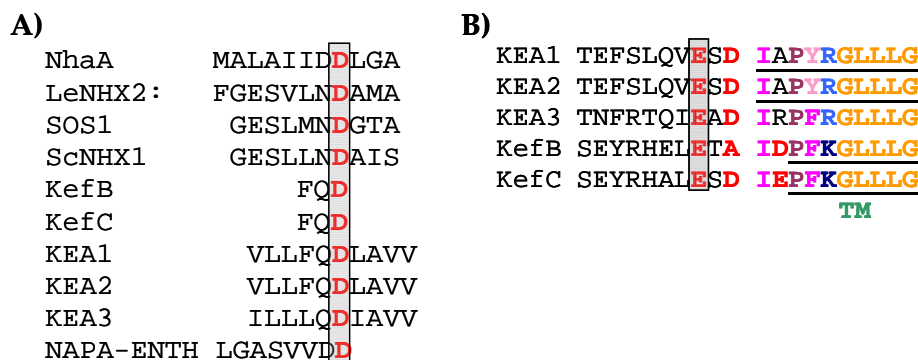
### 2.3.4 Análisis de aminoácidos posiblemente implicados en la regulación de la actividad de AtKEA2.

Las proteínas AtKEA forman parte del grupo de transportadores CPA, que contienen un dominio intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00999>). Recientemente se resolvió la estructura de la primera proteína de esta familia, el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NhaA de *E. coli* (Arkin et al., 2007). Esta proteína tiene tres aspartatos conservados, D163, D164 y D133, que son claves en el mecanismo de antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . El residuo D164 se ha identificado como el sitio de unión al  $\text{Na}^+$  y está universalmente conservado en todos los antiportadores de las familias CPA1 y CPA2 (Fig. R24A). Cuando está desprotonado se encuentra cargado negativamente, por lo que el  $\text{Na}^+$  se mantiene unido, y cuando se protona,



pierde la carga negativa y el  $\text{Na}^+$  se libera, debido a que la interacción electrostática disminuye (Arkin et al., 2007). Este residuo se corresponde con el aspartato en posición 166 en la secuencia VLLFQDLAVV de AtKEA2, por lo que fue el aminoácido elegido como diana de la mutagénesis, con el fin de obtener una proteína inactiva. Se llevó a cabo la sustitución de este aspartato, con carga negativa, por una alanina, que es un residuo neutro. De este modo cabría esperar una disminución de la interacción electrostática con el catión y por tanto una disminución de la actividad antiportadora.

Por otra parte se ha descrito un bucle citoplasmático regulador en la proteína KefC de *E. coli*, cargado negativamente, crítico en el funcionamiento de esta proteína. La secuencia de esta región reguladora está bastante conservada en los antiportadores AtKEA1-3 (Fig 25B). Se ha propuesto que interacciona con el dominio KTN y que está implicada en la sensibilidad a glutatión (GSH) y complejos del glutatión (GSX) (Miller et al., 1997; Roosild et al., 2002; Roosild et al., 2009). Roosild y colaboradores (2009) llevaron a cabo una serie de mutaciones puntuales en KefC (E262K, D264A, R416S, V427A, R516C, entre otras) con el fin de estudiar sus efectos en el transporte de  $\text{K}^+$ . Comprobaron que la sustitución E262K (en la secuencia RHALES~~D~~IEPFK) en ausencia de GSH provocaba una pérdida de potasio más rápida, y por tanto un transporte más activo que el de la proteína sin mutar. Esto sugiere una pérdida de regulación de la actividad de KefC por parte del bucle citoplasmático. El glutamato en posición 262 en KefC está conservado en las proteínas KEAs de *Arabidopsis*, y se corresponde con el residuo E278 en AtKEA2 (Fig. R25B). Con el fin de obtener una proteína KEA2 más activa, con mayor velocidad de transporte de  $\text{K}^+$ , se llevó a cabo la sustitución de este ácido glutámico (con carga negativa) por una lisina (con carga positiva) (mutante E278K).



**Fig. R26. A) Alineamiento de las secuencias pertenecientes al dominio intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de varios transportadores de la familia CPA.** La mutagénesis dirigida en KEA2 se llevó a cabo mediante la sustitución del Asp<sup>166</sup> por una Ala. Este aspartato está conservado en el dominio intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de los distintos transportadores CPA (se indica en rojo y sombreado). **B) Alineamiento de las secuencias de los antiportadores KEA1-3, con la secuencia HALESDIEPFK correspondiente al bucle citoplasmático regulador en KefC.** La mutagénesis dirigida en KEA2 se realizó mediante la sustitución del Glu<sup>278</sup> conservado en los distintos antiportadores (indicado en rojo y sombreado) por una Lys.

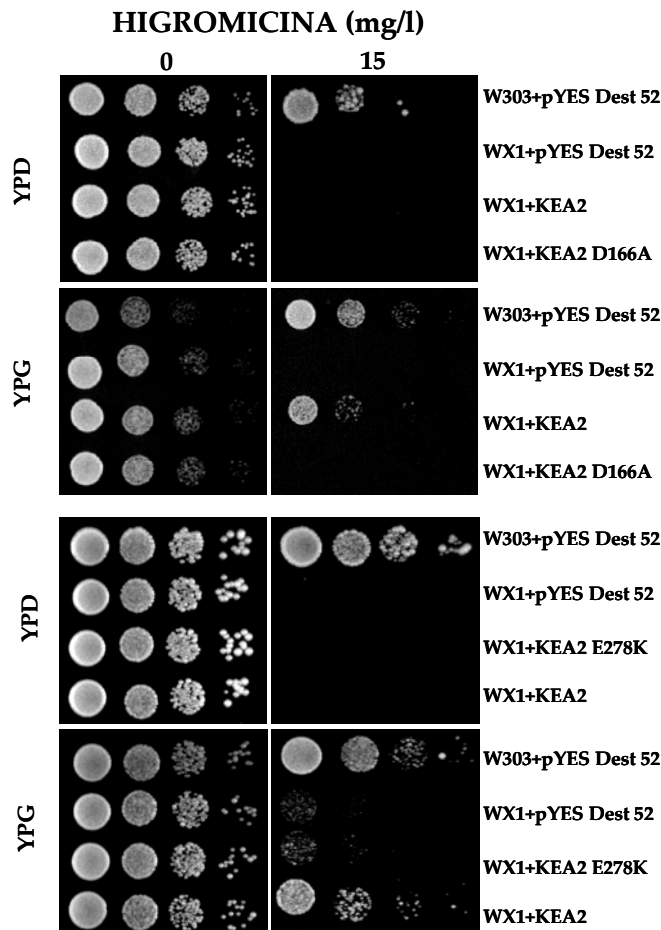
La caracterización de las proteínas mutantes AtKEA2 D166A y AtKEA2 E278K se llevó a cabo mediante ensayos de complementación en levadura y determinación de la actividad de las proteínas purificadas y reconstituidas en proteolipomas, comparándolas con la proteína AtKEA2 sin mutar.

Se realizaron ensayos de complementación de la sensibilidad a higromicina B, y se demostró que solamente la cepa WX1 ( $\Delta\text{nhx1}$ ) transformada con el vector para la expresión de AtKEA2 sin mutar crecía en medio YPG suplementado con 15 mg/l de higromicina B. El crecimiento de las células que expresaban las dos proteínas mutantes, AtKEA2-D166A y AtKEA2-E278K, se vio fuertemente inhibido en presencia de higromicina B, de un modo muy similar a la cepa WX1 transformada con el vector vacío (Fig. R27).

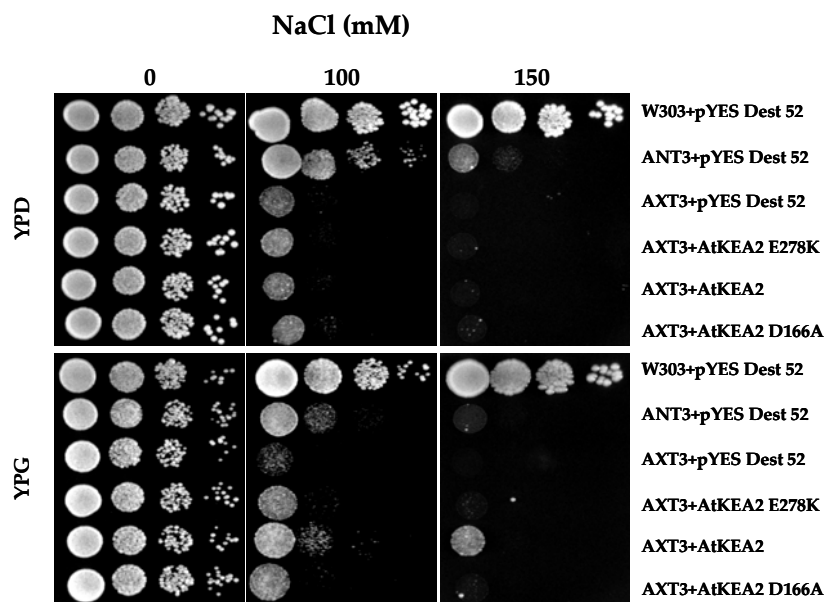
Para determinar si las proteínas mutantes conferían tolerancia a la salinidad a la cepa sensible AXT3 ( $\Delta\text{ena1-4}$ ,  $\Delta\text{aha1}$ ,  $\Delta\text{nhx1}$ ), se realizaron ensayos *droptests* en medio YPD e YPG suplementado con 100 y 150 mM de NaCl (Fig. R28). Se observó que sólo la proteína AtKEA2 nativa complementaba la sensibilidad a NaCl.

También se hicieron ensayos para comprobar el efecto de las dos mutaciones en la complementación de la sensibilidad a altas concentraciones de KCl de la cepa sensible AXT3. Los ensayos se realizaron en medio YPG suplementado con 800 y 900 mM de KCl. Se observó que las dos proteínas mutantes no complementaban el fenotipo de sensibilidad a altas concentraciones de KCl (Fig. R29).

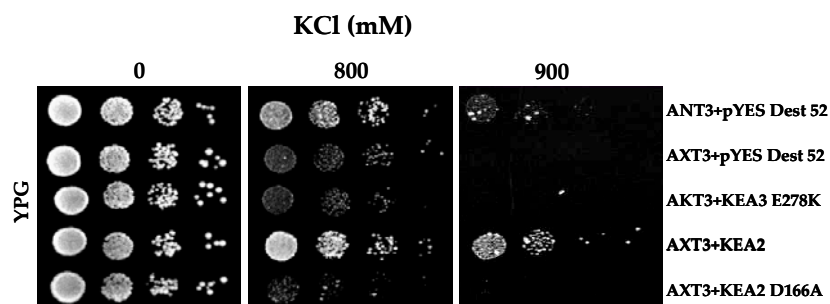
Los resultados obtenidos de los ensayos de complementación en levadura ponen de manifiesto que las dos mutaciones llevadas a cabo en la proteína AtKEA2 afectan a su actividad, provocando la pérdida de su capacidad de complementación de los fenotipos de sensibilidad a higromicina B, a salinidad y a altas concentraciones de KCl.



**Fig. R27. Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas W303 y WX1 ( $\Delta nhx1$ ), transformadas con las construcciones para la expresión de la proteína nativa AtKEA2, de las proteínas mutantes AtKEA2 D166A y AtKEA2 E278K, y con el vector vacío. El ensayo se realizó en presencia de 15 mg/l de higromicina B en medios suplementados con galactosa o glucosa.**



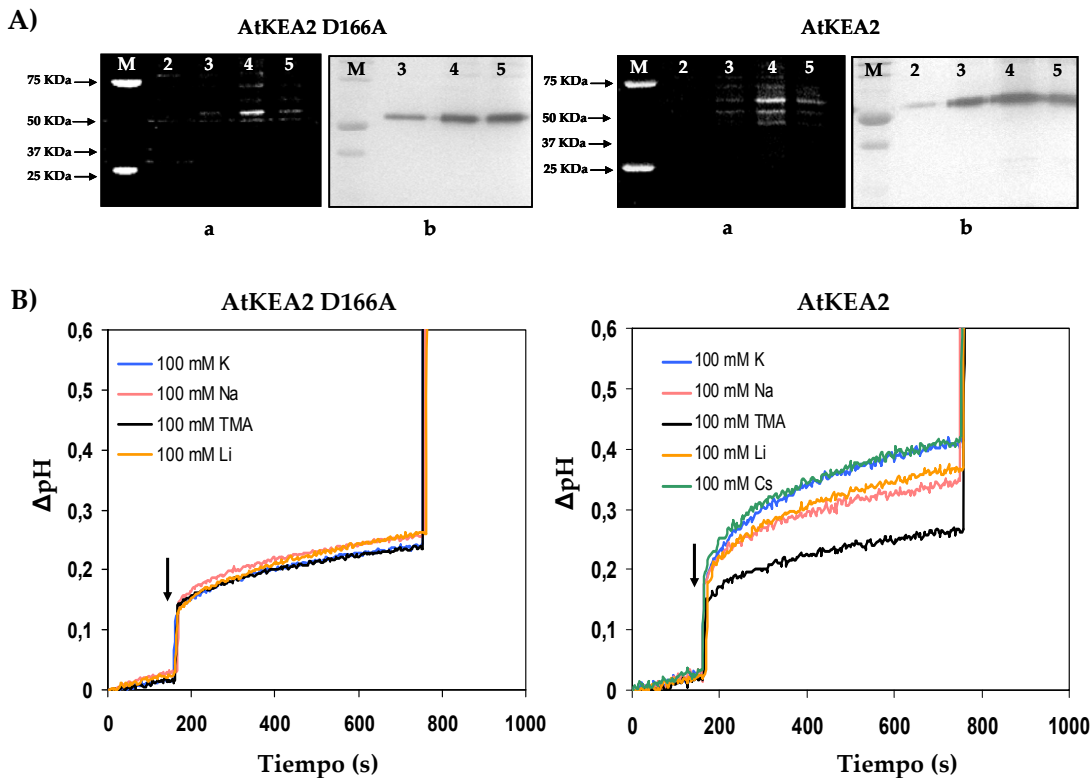
**Fig. R28.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 y AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1) transformadas con las construcciones para la expresión de la proteína nativa AtKEA2, de las proteínas mutantes AtKEA2 D166A y AtKEA2 E278K, y con el vector vacío pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de 0, 100 y 150 mM de NaCl en medio YPD e YPG.



**Fig. R29.** Crecimiento de células de *S. cerevisiae*, cepas ANT3 y AXT3 ( $\Delta$ ena1-4,  $\Delta$ nha1,  $\Delta$ nhx1) transformadas con las construcciones para la expresión de la proteína nativa AtKEA2, de las proteínas mutantes, AtKEA2 E278K, AtKEA2 D166A y con el vector vacío pYES-DEST52. El ensayo se realizó en presencia de 0, 800 y 900 mM de KCl en medio YPG.

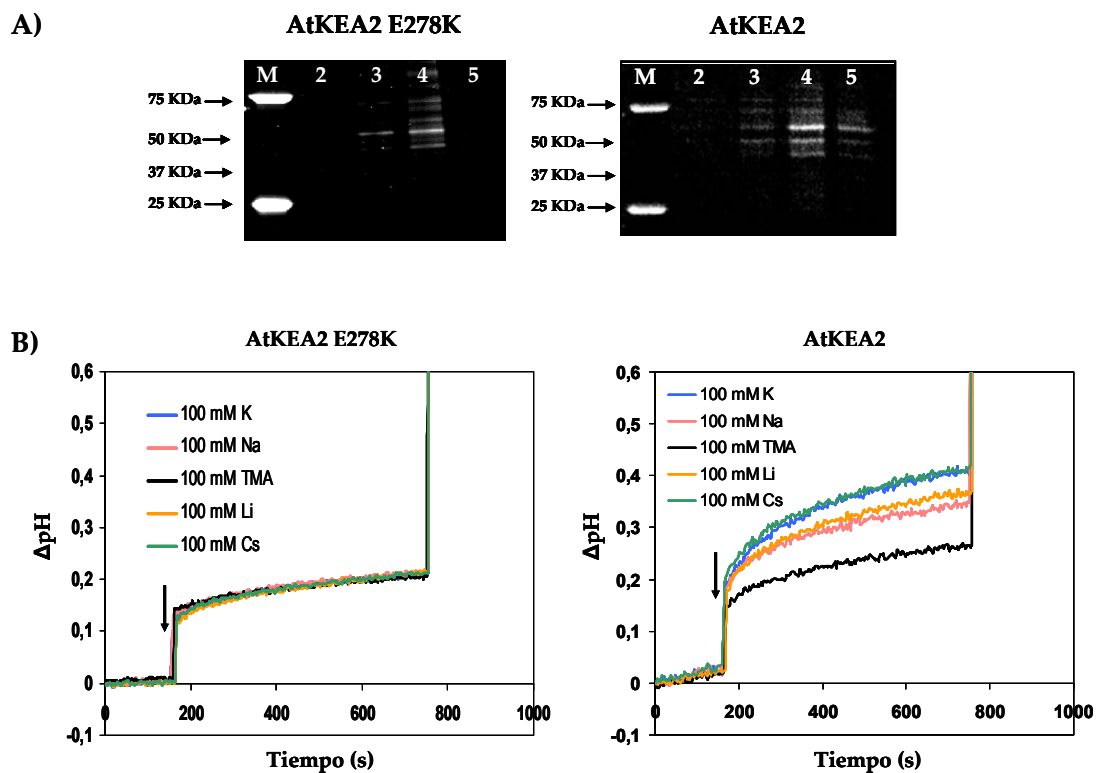
Los ensayos de medida de la actividad de intercambio iónico de las proteínas mutantes se llevaron a cabo como se indica en el apartado 2.3.11.1 de material y métodos. En las figuras R30 y R31 se compara la variación de pH en función del tiempo, que tiene lugar en el interior de los proteoliposomas que contienen AtKEA2 D166A y AtKEA2 (Fig. R30) y AtKEA2 E278K y AtKEA2 (Fig.

R31) al adicionar distintas sales de sulfato. En los proteoliposomas que contienen las proteínas mutantes se observó que la adición de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Li^+$  dio lugar a un incremento del pH a modo de salto muy similar al provocado por la adición del catión  $TMA^+$ , usado como control negativo. Estos resultados ponen de manifiesto que AtKEA2 D166A y AtKEA2 E278K no presentan actividad antiportadora.



**Fig. R30. A) Tinción (a) e inmunodetección (b) de las proteínas AtKEA2 D166A y AtKEA2 purificadas de membranas microsomales de levadura tras separación por electroforesis SDS-PAGE. Los carriles numerados del 2-5 se corresponden con las fracciones de elución 2-5; M: marcador de peso molecular (kDa). Se cargó 5  $\mu$ l de cada fracción de elución en cada caso.**

**B) Actividad antiporte en presencia de diferentes cationes de AtKEA2 D166A y AtKEA2;** La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $TMA^+$ ,  $Li^+$  ó  $Cs^+$  como sales de sulfato, y se señala con una flecha. La medida se realizó según se ha descrito en la Fig. R16.



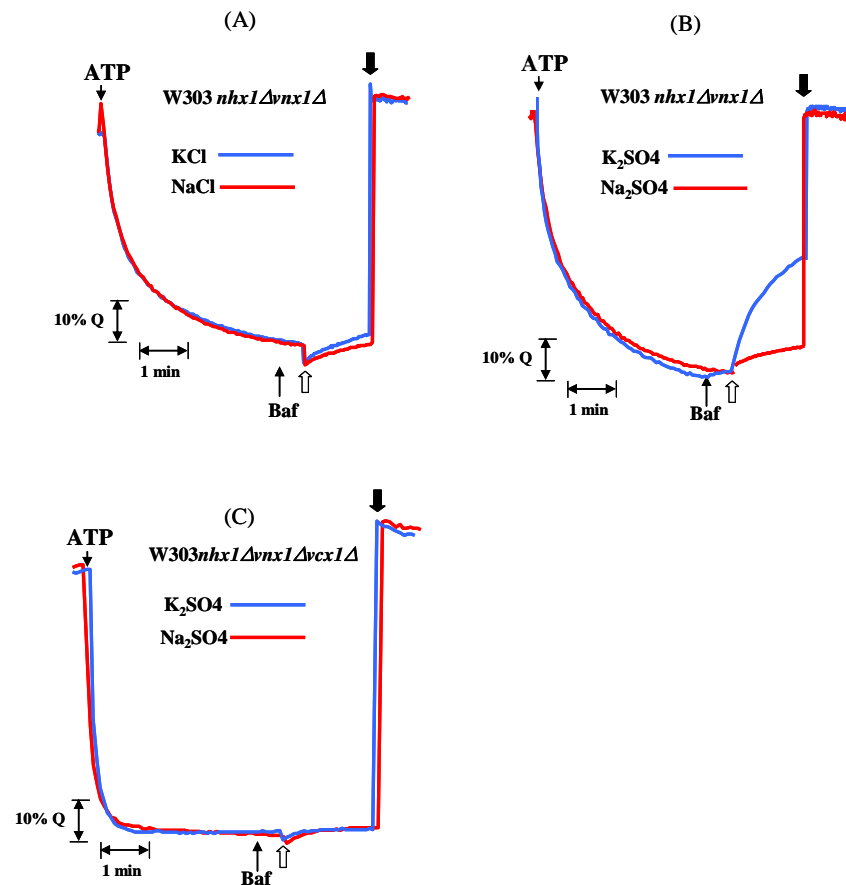
**Fig. R31. A) Tinción de las proteínas AtKEA2 E278K y AtKEA2** purificadas de membranas microsomales de levadura tras separación por electroforesis SDS-PAGE. Los carriles numerados del 2-5 se corresponden con las fracciones de elución 2-5; M: marcador de peso molecular (KDa). Se cargó 5  $\mu$ l de cada fracción de elución en cada caso. **B) Actividad antiporte en presencia de diferentes cationes de AtKEA2 E278K y AtKEA2;** La reacción de antiporte se inició con la adición de 100 mM de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $TMA^+$ ,  $Li^+$  ó  $Cs^+$  como sales de sulfato, y se señala con una flecha. La medida se realizó según se ha descrito en la Fig. R16.

En función de los resultados obtenidos se puede decir que el efecto de las mutaciones D166A y E278K es una inactivación de la proteína AtKEA2.

#### 2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE INTERCAMBIO CATION/H<sup>+</sup> EN VACUOLAS AISLADAS DE LEVADURA QUE EXPRESA AtKEA2 DE ARABIDOPSIS

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de actividad de intercambio catión/H<sup>+</sup> de AtKEA2 purificado y reconstituido en proteoliposomas, se llevaron a cabo estudios de la actividad de intercambio iónico en una fracción enriquecida en membrana vacuolar de levadura (Fig. R34). Para ello se necesita un mutante que no presente actividad antiportadora K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vacuolar.

Previamente se había demostrado que el mutante *vnx1* presentaba una pérdida total de actividad antiportadora Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en una fracción enriquecida en membrana vacuolar (Cagnac et al., 2007). Sin embargo, cambiando las condiciones experimentales (usando sales de sulfato en lugar de sales de cloruro) se puso de manifiesto otra actividad antiportadora catión monovalente/H<sup>+</sup> en esta fracción, mucho más baja que la detectada para Vnx1p (Fig. R32 A y B). Con el objetivo de identificar el gen que codificaba el transportador responsable de este transporte "residual", se siguió la misma estrategia llevada a cabo para caracterizar Vnx1p (Cagnac et al., 2007), examinando mutantes con doble disrupción. Para ello se partió de la cepa mutante *By vnx1Δ*, en la que se llevó a cabo la disrupción de cada uno de los posibles genes candidatos responsables del transporte (Kha1, Vcx1 y YDL206w). Una vez obtenidos los dobles mutantes se midió la actividad antiportadora en vacuolas aisladas y se comprobó que únicamente la cepa portadora de la disrupción *vcx1Δ* presentaba pérdida del transporte. Vcx1 ha sido previamente caracterizado como un antiportador Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> de alta afinidad, fuertemente inhibido por Cd<sup>2+</sup> y en menor medida por Zn<sup>2+</sup> pero no por Na<sup>+</sup> (Pittman et al., 2004). Para corroborar que la actividad transportadora "residual" observada en la fracción enriquecida en membrana vacuolar era dependiente de la expresión de Vcx1, se llevó a cabo la disrupción de este gen en la levadura doble mutante W303*nhx1Δvnx1* para obtener la triple mutante OC4 (W303*nhx1Δvnx1Δvcx1Δ*) (Tabla M3). La disrupción de Vcx1 eliminaba completamente el intercambio de Ca<sup>2+</sup> en la fracción enriquecida con vacuola como se había descrito previamente (del Pozo et al., 1999; Cagnac et al., 2007) y además eliminaba la actividad antiportadora K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> "residual" observada en presencia de sales de sulfato (Fig. R32 C).

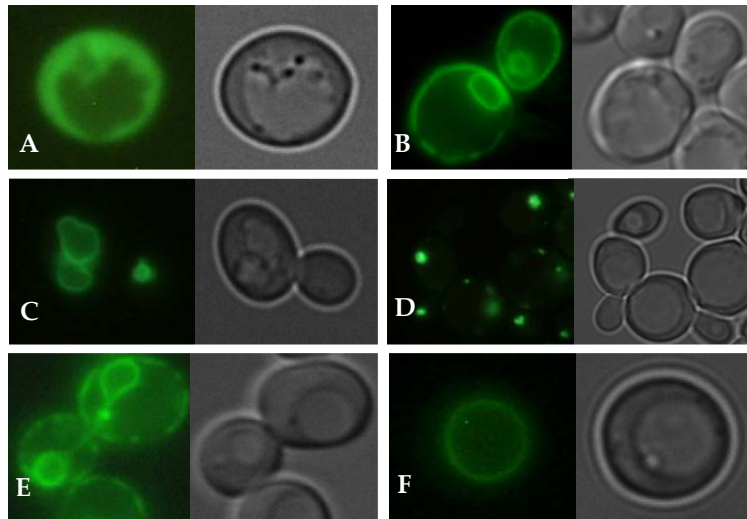


**Fig R32. Transporte catión/H<sup>+</sup> dependiente de sal a través de la membrana vacuolar (A y B) y efecto de la disrupción de Vcx1 en el transporte vacuolar de potasio (C).** El movimiento de protones se midió monitorizando la disipación de la fluorescencia de la sonda naranja de acridina como se describe en el apartado 2.3.11.2 de material y métodos. En A y B las flechas indican la adición de Bafilomicina (Baf), 100 mM de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> (flechas blancas) y de 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (flechas negras). En C las flechas indican la adición de Bafilomicina (Baf), 50 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (flecha blanca) con el fin de colapsar el gradiente de pH a través de la membrana vacuolar, lo que resulta en el movimiento de H<sup>+</sup> dependiente de catión y la alcalinización del lumen vesicular; y de 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (flecha negra). Las gráficas son la representación de al menos tres experimentos independientes.

Para comprobar que la sobreexpresión de Vcx1p no afecta a su localización, lo que podría influir en las medidas de transporte, se llevó a cabo la localización subcelular de Vcx1p mediante microscopía de fluorescencia. Se usaron dos proteínas de fusión, una con GFP fusionada en su extremo C-terminal (Vcx1::GFP) y otra con eYFP fusionada en su extremo N-terminal (eYFP::Vcx1) (Fig. R33 D y E).



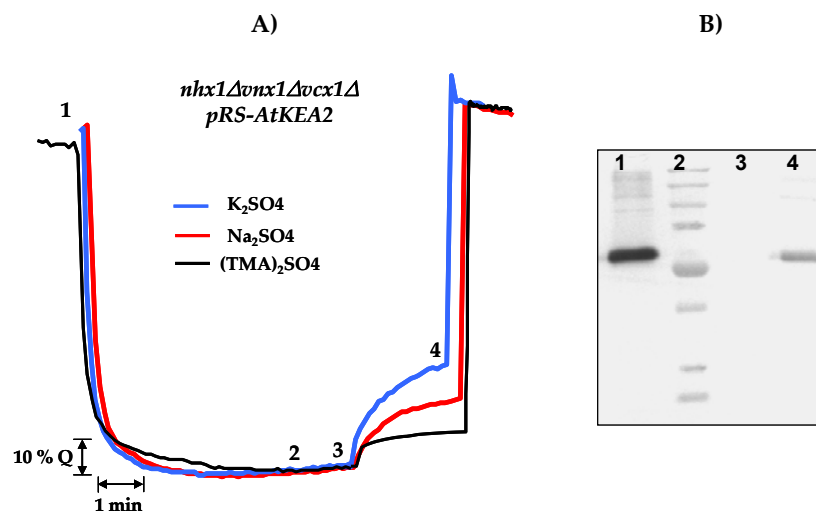
Además se usaron una serie de marcadores: eYFP (soluble, se localiza en el citoplasma); Erg1 (retículo endoplasmático); Vph1p (membrana vacuolar); Nhx1p (prevacuolas). Se observó que Vcx1::GFP presentaba el mismo patrón de distribución de la fluorescencia que el mostrado por Erg1::GFP, poniendo de manifiesto su localización en el retículo endoplasmático. En el caso de eYFP::Vcx1 el patrón de fluorescencia es muy similar al presentado por Vph1::GFP, sin mostrar ninguna señal residual atrapada en el retículo endoplasmático, indicando su localización en la membrana vacuolar (Fig. R33).



**Fig. R33. Localización vacuolar de Vcx1.** Células de levadura que expresan: A) eYFP; B) Erg1 del retículo endoplasmático fusionada a GFP en su extremo C-terminal; C) la subunidad Vph1 de la ATPasa vacuolar fusionada a GFP en su extremo C-terminal; D) el Nhx1p fusionado a GFP en su extremo C-terminal; E) el antiportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  vacuolar Vcx1p fusionado a GFP en su extremo C-terminal; F) el antiportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  vacuolar Vcx1p fusionado a eYFP en su extremo N-terminal. Las imágenes se tomaron como se indica en el apartado 2.4.2 de Material y Métodos.

Por tanto, para realizar estos ensayos de determinación de actividad de intercambio catión/ $\text{H}^{+}$  de AtKEA2 las vacuolas se aislaron de la cepa de levadura OC4 (*W303 vnx1Δ vcx1Δ nhx1Δ*) transformada con la construcción plasmídica portadora de la secuencia que codifica para AtKEA2, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.4. de Material y Métodos. Las medidas de transporte se efectuaron usando la sonda fluorescente naranja de acridina, y la actividad antiportadora fue ensayada monitorizando la disipación de un gradiente de pH ácido en el interior de la vacuola creado previamente por la acción de la V-ATPasa (apartado 2.3.11.2. de Material y Métodos).

Los resultados obtenidos en las medidas de transporte realizadas en vacuolas aisladas de la cepa de levadura OC4 transformada con la construcción plasmídica portadora de la secuencia que codifica para AtKEA2, muestran que tanto la adición de  $K_2SO_4$  como de  $Na_2SO_4$  provocaba una recuperación de la fluorescencia (disipación del gradiente del pH), y que ésta era mayor en el caso de  $K_2SO_4$ , confirmando los resultados obtenidos utilizando la proteína purificada reconstituida en liposomas. Como control negativo se utilizó el catión orgánico tetrametil amonio ( $TMA^+$ ), para el que no se observó recuperación de la fluorescencia. La presencia de la proteína de fusión en las vacuolas aisladas se comprobó mediante inmunodetección, usando el anticuerpo primario anti-V5 (Fig. R34).



**Fig. R34. Actividad antiporte de AtKEA2 en vacuolas aisladas.** A) Registro de la fluorescencia emitida por la sonda naranja de acridina; B) Inmunodetección de la proteína AtKEA2, usando el anticuerpo primario anti-V5. En A) 1: adición de ATP; 2: adición de Bafilomicina A; 3: adición de  $K_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$ , ó  $(TMA)_2SO_4$ ; 4: adición de  $(NH_4)_2SO_4$ . En B) 1: control positivo (AtKEA2 purificado); 2: Marcadores de peso molecular; 3: control negativo (vacuolas de células W303  $vnx1\Delta$   $vcx1\Delta$   $nhx1\Delta$  transformadas con la construcción para la expresión de AtKEA2 y cultivadas en YPD (no se expresa la proteína)); 4: vacuolas de células W303  $vnx1\Delta$   $vcx1\Delta$   $nhx1\Delta$  transformadas con la construcción para la expresión de AtKEA2 y cultivadas en YPG.

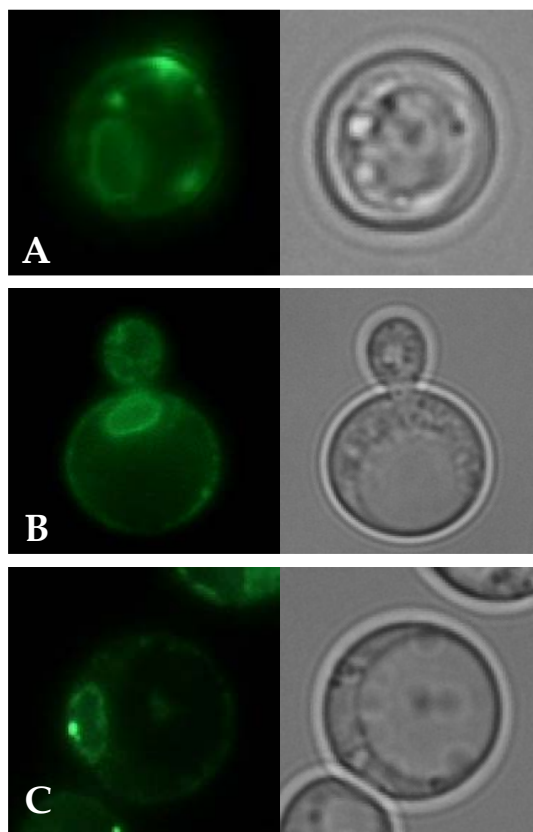
### 3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE AtKEAs

La localización subcelular de las proteínas AtKEAs, se determinó mediante microscopía confocal en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* que expresaban de forma transitoria estas proteínas fusionadas con GFP, y microscopía de fluorescencia en células de levadura transformadas con las construcciones plasmídicas portadoras de las secuencias génicas que codifican las proteínas de fusión con GFP y eYFP. En el caso particular de AtKEA3 se llevó a cabo una aproximación de su localización subcelular mediante inmunodetección en fracciones de membrana de levadura que expresaban la proteína.

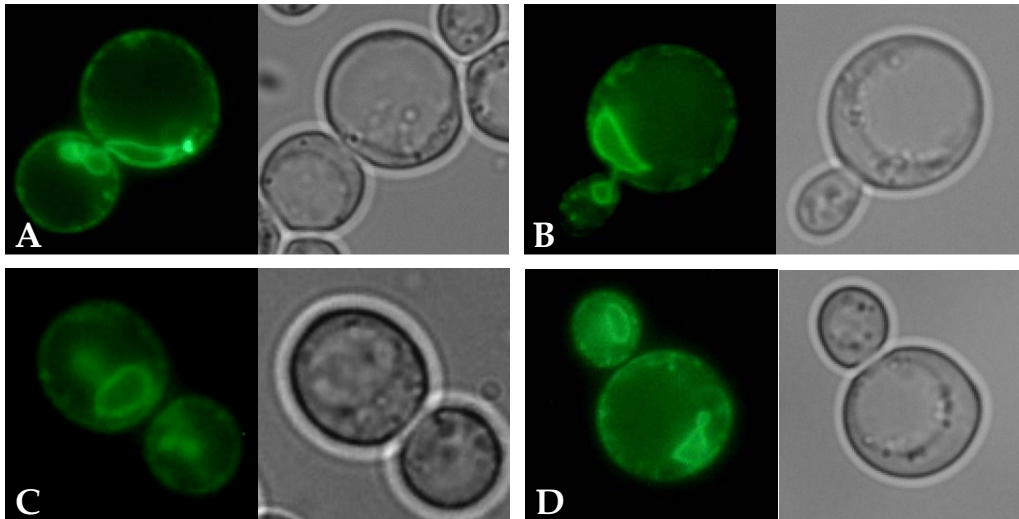
#### 3.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN LEVADURAS

La localización subcelular de las proteínas KEA1 y KEA2 se llevó a cabo en células de levadura de la cepa W303 transformadas con las construcciones plasmídicas portadoras de las secuencias génicas que codifican las proteínas de fusión con GFP y eYFP, en el extremo C-terminal y en el N-terminal. Se obtuvieron las proteínas de fusión marcadas en el extremo N-terminal debido a que previamente se ha demostrado que proteínas marcadas en el extremo C-terminal pueden quedar atrapadas en el retículo endoplasmático (Froissard et al., 2006). Esto es debido a que la etiqueta en el C-terminal puede provocar un mal plegamiento de la proteína, su retención en el retículo endoplasmático y, en algunas ocasiones, su degradación (Ahner y Brodsky, 2004).

Inicialmente se usaron los vectores de expresión multicopia derivados del vector pDR196 (pFGWDR196 y pGWFDR196), bajo el control del promotor constitutivo PMA1 (Tabla M17). Los resultados obtenidos para KEA1::GFP, GFP::KEA1 y KEA2::GFP muestran la señal de fluorescencia retenida en el retículo endoplasmático (Fig. R35) No se obtuvieron resultados con la proteína de fusión KEA2 con GFP en su extremo N-terminal. Estos resultados pueden ser debido a que la sobreexpresión de la proteína de fusión hace que se retenga en el retículo, como se ha descrito previamente en el caso de la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática de planta sobreexpresada en levadura (Villalba et al., 1992). Por ello se usaron los vectores integrativos de copia única bajo el control del promotor inducible *Gal1*, pAG306-Gal1-ccdb-eYFP y pAG306-Gal1-eYFP-ccdb (Tabla M17), con el fin de evitar la acumulación de las proteínas de fusión en el retículo endoplasmático. Sin embargo, al analizar las células de levadura transformadas con estas construcciones plasmídicas se observó que las proteínas de fusión también se localizaban en el retículo endoplasmático en todos los casos (Fig. R36).



**Fig. R35. Localización de AtKEA1 y AtKEA2 en levadura.** Células de levadura expresando: A) AtKEA1 fusionada a GFP en su extremo N-terminal; AtKEA1 fusionada a GFP en su extremo C-terminal; C) AtKEA2 fusionada a GFP en su extremo C-terminal. Los vectores de expresión usados para la transformación de las células de levadura fueron pFGWDR196 para la fusión N-terminal y pGWFDR196 para la fusión C-terminal. Las imágenes se tomaron como se indica en el apartado 2.4.2 de material y métodos.



**Fig. R36. Localización de AtKEA1 y AtKEA2 en levadura.** Células de levadura expresando: A) AtKEA1 fusionada a YFP en su extremo N-terminal; AtKEA1 fusionada a YFP en su extremo C-terminal; C) AtKEA2 fusionada a YFP en su extremo N-terminal; D) AtKEA2 fusionada a YFP en su extremo C-terminal. Los vectores de expresión usados para la transformación de las células de levadura fueron pAG306-Gal1-eYFP-ccdb para la fusión N-terminal y pAG306-Gal1-ccdb-eYFP para la fusión C-terminal. Las imágenes se tomaron como se indica en el apartado 2.4.2 de material y métodos.

### 3.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN PROTOPLASTOS DEL MESÓFILO DE *ARABIDOPSIS*

Para la localización subcelular de las proteínas KEAs se utilizaron proteínas de fusión con GFP en el extremo C-terminal (AtKEA::GFP) y N-terminal (GFP::AtKEA1) de los antipotadores. El aislamiento, transfección y observación al microscopio de los protoplastos que expresaban de forma transitoria las proteínas de fusión, se realizó como se indica en el apartado 2.4.1 de material y métodos. Estos estudios fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Heven Sze, en la Universidad de Maryland (USA).

Como se puede observar en la figura R37, los protoplastos que expresan la proteína de fusión del extremo C-terminal de AtKEA1 con la proteína GFP, presentan una distribución de la fluorescencia en vesículas, que en ocasiones se encuentran interconectadas por estructuras tubulares. En el caso de protoplastos que expresan GFP::AtKEA1, el patrón de distribución de la fluorescencia es completamente distinto, y se asemeja al presentado por la proteína GFP soluble (Fig. R39).

En la figura R38 se muestra la distribución de la fluorescencia de GFP de protoplastos que expresan transitoriamente la proteína de fusión AtKEA2::GFP. En las células 1 y 2 la fluorescencia aparece en pequeñas vesículas, y en la célula 3 aparece como estructuras granulares densas, de un tamaño ligeramente mayor que las anteriores. No se obtuvieron imágenes de la localización de la proteína de fusión GFP::AtKEA2. Tampoco se obtuvieron resultados de los ensayos de transfección de protoplastos con las construcciones portadoras de las proteínas de fusión AtKEA3::GFP y GFP::AtKEA3.

En los ensayos de localización de la proteína AtKEA6, los protoplastos que expresan la proteína de fusión con GFP en el extremo C-terminal presentan un patrón de distribución de la fluorescencia punteado. Al igual que ocurre con la proteína de fusión GFP::AtKEA1, en los protoplastos que expresan transitoriamente GFP::AtKEA6 la fluorescencia aparece distribuida por toda la célula de un modo muy similar a la proteína GFP soluble (Fig. R40).

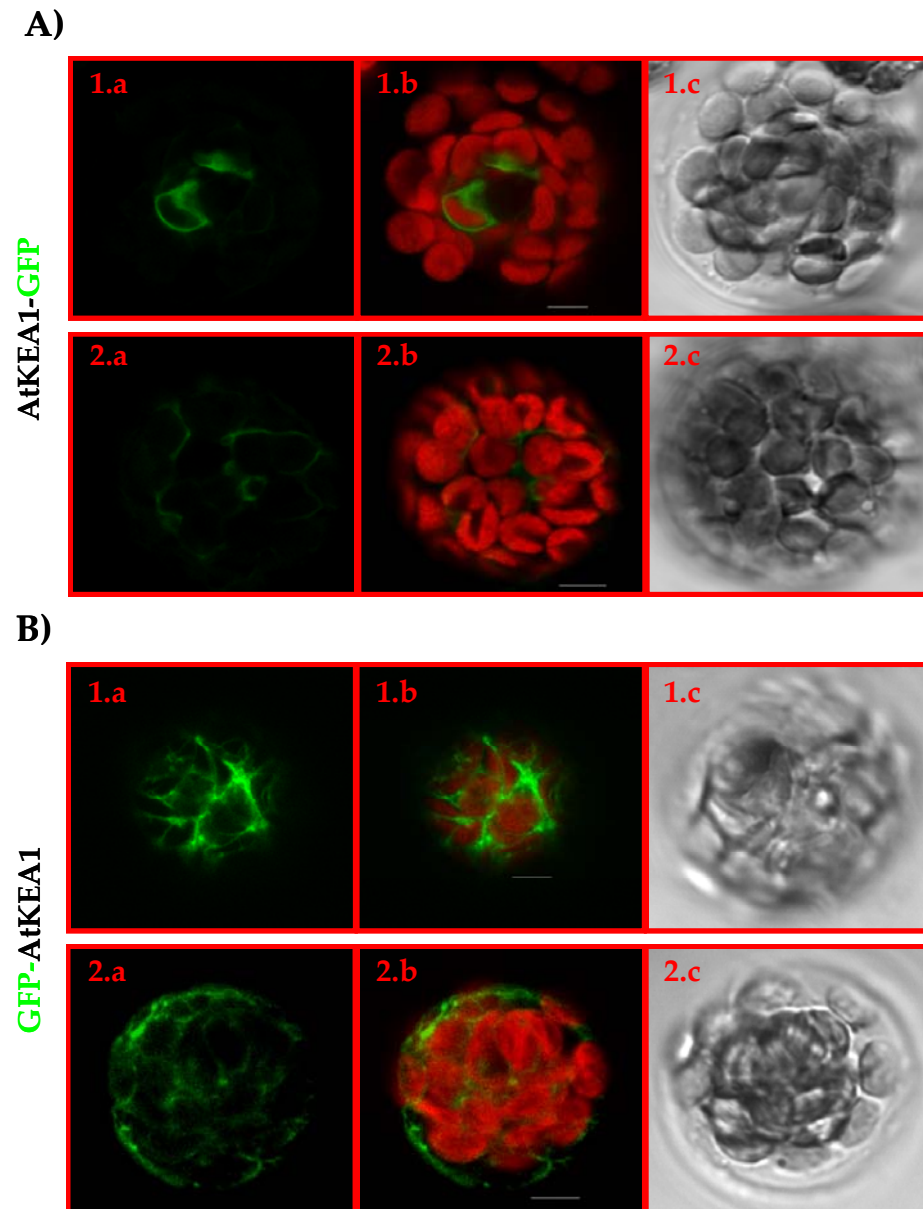
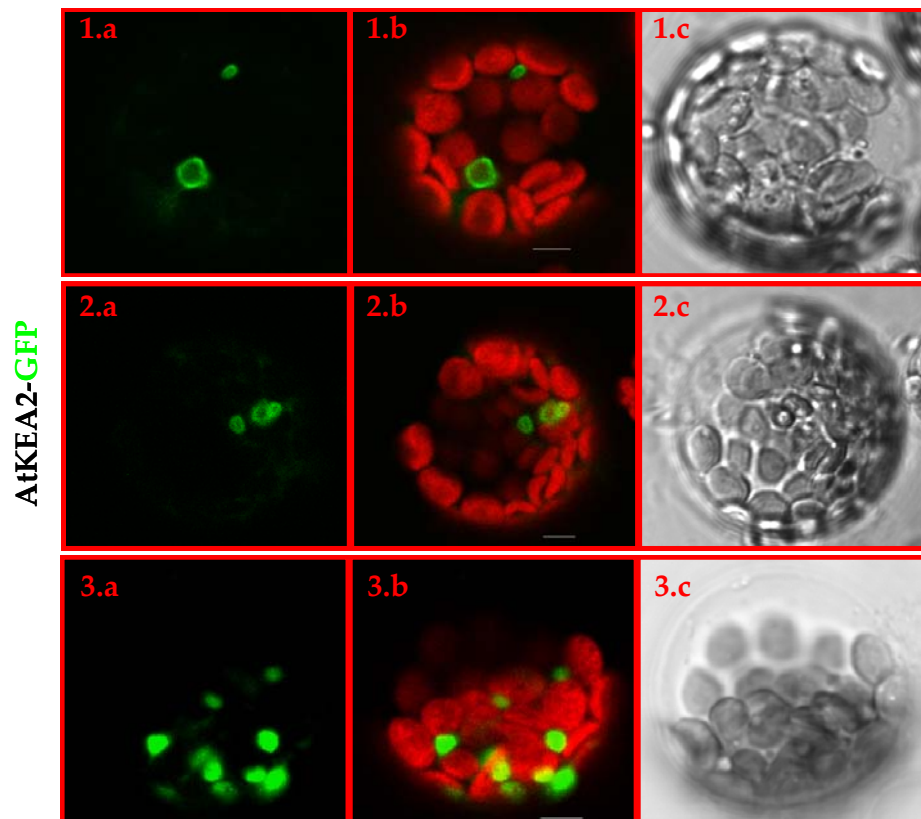


Fig. R37. Expresión transitoria de las proteínas de fusión AtKEA1::GFP (A) y GFP::AtKEA1 (B) en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510. Los números 1 y 2 corresponden a 2 protoplastos distintos; Las letras a, b y c se corresponden a la fluorescencia de GFP (a), fluorescencia de GFP y autofluorescencia de cloroplastos (b) y campo claro(c).



**Fig. R38.** Expresión transitoria de la proteína de fusión AtKEA2::GFP en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510. Los números 1, 2 y 3 corresponden a 3 protoplastos distintos; Las letras a, b y c se corresponden a la fluorescencia de GFP (a), fluorescencia de GFP y autofluorescencia de cloroplastos (b) y campo claro(c).



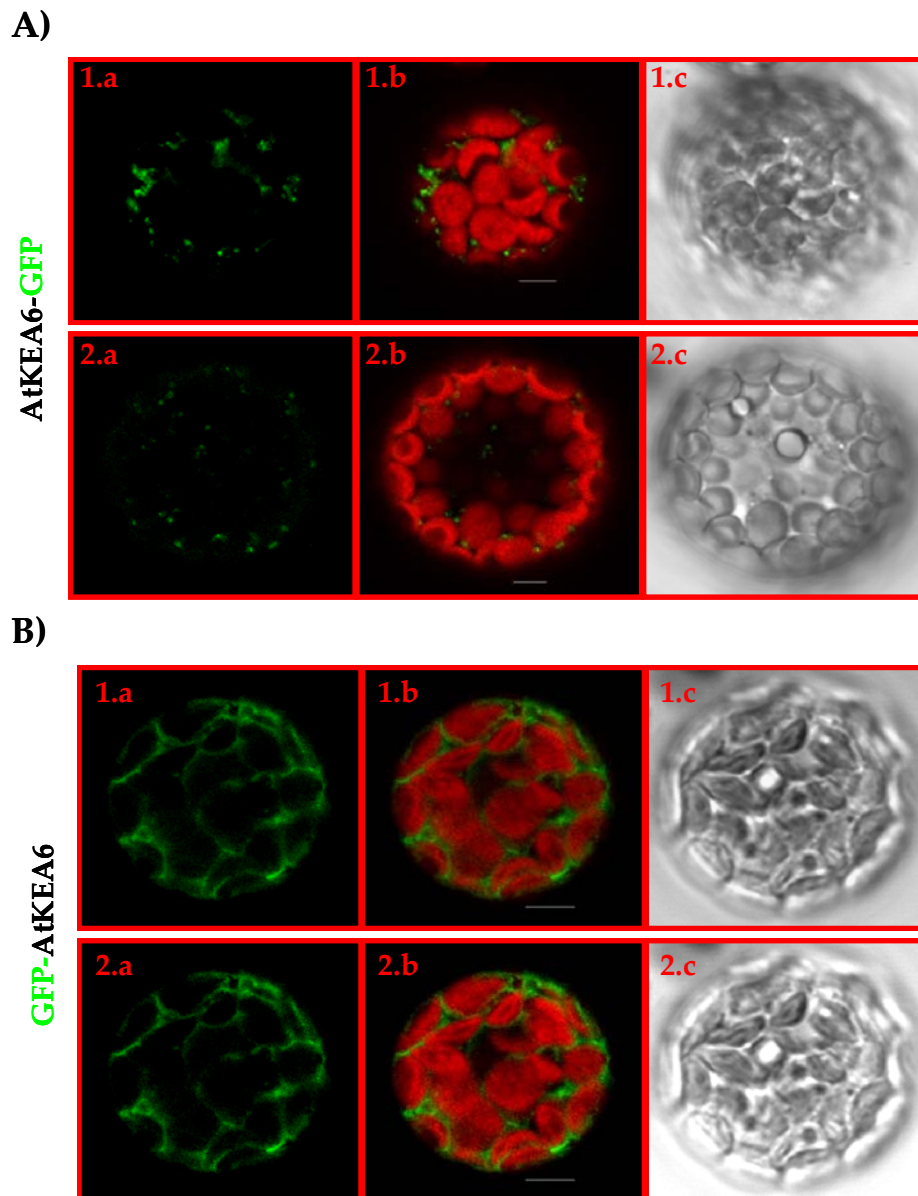


Fig. R39. Expresión transitoria de las proteínas de fusión AtKEA6::GFP (A) y GFP::AtKEA6 (B) en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510. Los números 1 y 2 corresponden a 2 protoplastos distintos; Las letras a, b y c se corresponden a la fluorescencia de GFP (a), fluorescencia de GFP y autofluorescencia de cloroplastos (b) y campo claro(c).

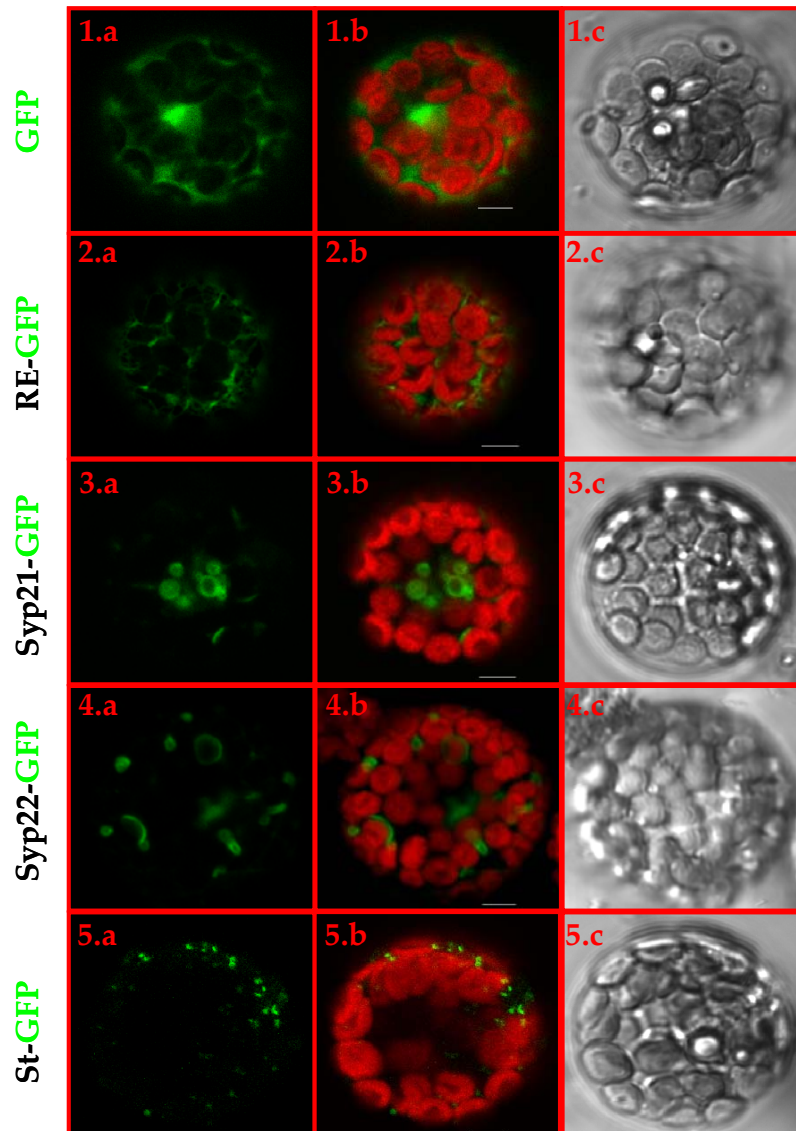


Fig.R40. Expresión transitoria de marcadores de orgánulos fusionados a GFP en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* visualizada en un microscopio confocal Zeiss LSM510. Marcadores usados: 1. GFP soluble; 2. *ER retention signal* (His-Arg-Glu-Leu): Retículo endoplasmático; 3. Syp21: prevacuola; 4. Syp22: prevacuola/vacuola; 5. Sialiltransferasa: Trans Golgi. Las letras a, b y c se corresponden a la fluorescencia de GFP (a), fluorescencia de GFP y autofluorescencia de cloroplastos (b) y campo claro (c).

Se usaron una serie de marcadores de orgánulos (Fig. R40) con el fin de comparar sus patrones de distribución de fluorescencia con los de las proteínas de fusión AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA6 con GFP. La proteína GFP soluble, se encuentra en el citoplasma y se distribuye por toda la célula, siendo característica la fuerte fluorescencia que presenta el núcleo. *ER retention signal* (His-Arg-Glu-Leu), usado como marcador de retículo endoplasmático, presenta una distribución de la fluorescencia muy característica a modo de malla, extendiéndose a lo largo de toda la célula. El marcador de trans golgi, la proteína sialiltransferasa, también presenta un patrón de distribución de la fluorescencia bien definido, mostrando un aspecto punteado. Los marcadores prevacuolares y vacuolares usados en este trabajo, Syp21 y Syp22, presentan patrones de fluorescencia más variables. Normalmente aparecen en forma de pequeñas vesículas que en ocasiones se encuentran interconectadas por estructuras tubulares, dando lugar a una estructura continua a lo largo de la célula.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que AtKEA1 y AtKEA2 presentan un patrón de distribución similar cuando se expresan transitoriamente en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis*, que a su vez se asemeja al presentado por las proteínas marcadoras de orgánulos Syp21 (prevacuolas) y Syp22 (prevacuolas/vacuolas) (Uemura et al., 2004) (Fig. R40, 3 y 4). Esto sugiere que ambas proteínas podrían localizarse en el mismo compartimento endosomal, muy probablemente un compartimento prevacuolar/vacuolar.

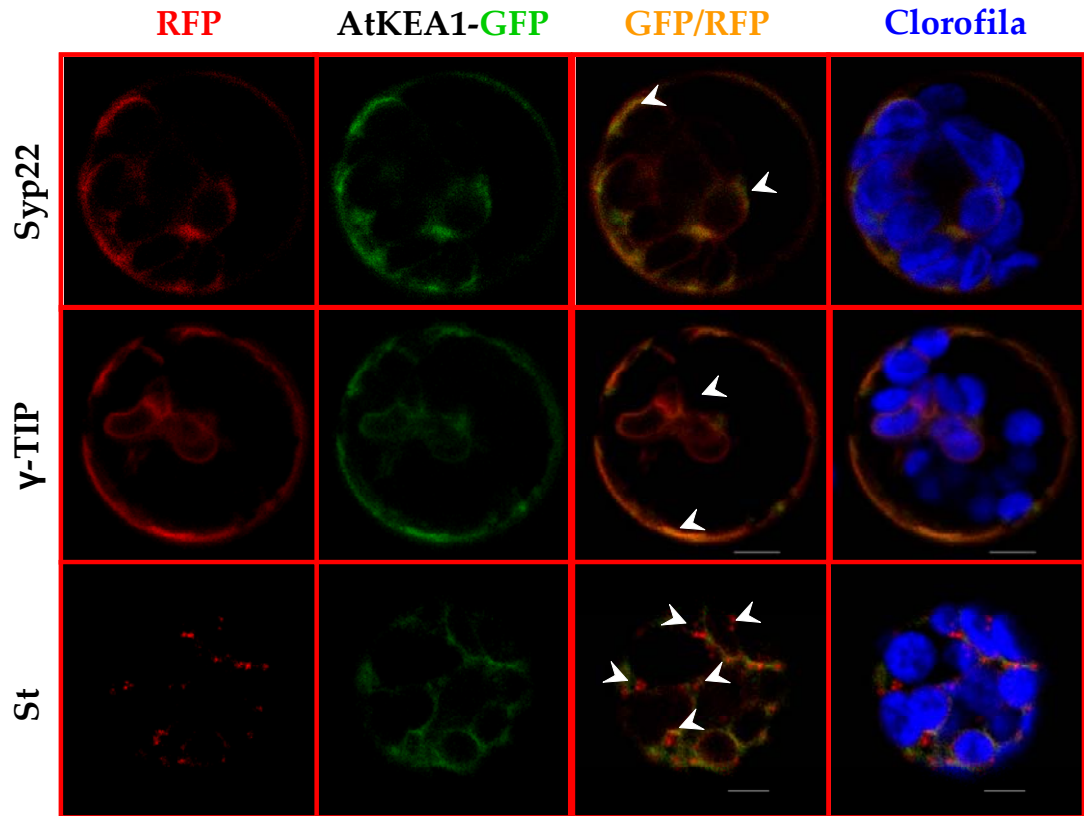
En el caso de AtKEA6 se observa un patrón de expresión punteado, muy diferente al mostrado por AtKEA1 y AtKEA2, y muy similar al presentado por los marcadores de orgánulos sialiltransferasa (trans Golgi) y  $\alpha$ -1,2 Manosidasa I (Golgi) (Fig. R40, 5) (Wee et al., 1998; Saint-Jore et al., 2002; Saint-Jore-Dupas et al., 2006). Estos resultados indican una posible localización de la proteína en el aparato de Golgi.

Con el fin de determinar la localización subcelular de los antiportadores KEA de un modo más preciso, se procedió a la cotransfección de protoplastos con los vectores de expresión portadores de las construcciones AtKEAs::GFP y las construcciones para la expresión de las proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas con RFP.

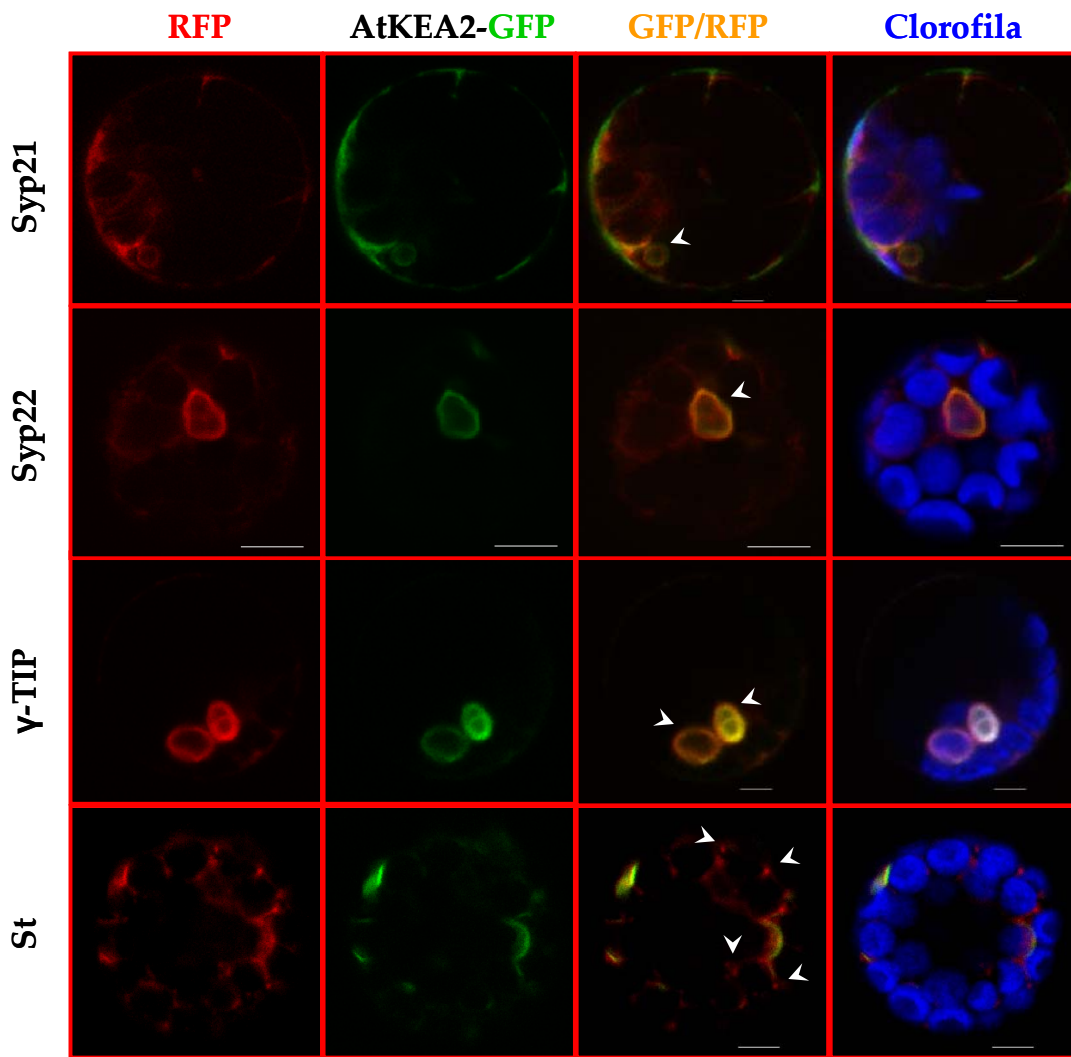
Las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 presentan una colocalización parcial con Syp21 (prevacuolas) y más especialmente con Syp22 (prevacuola/vacuola) y  $\gamma$ -TIP (tonoplasto), pero no con la proteína sialiltransferasa (Trans Golgi). Esto pone de manifiesto que las dos proteínas están localizadas en una subpoblación de endomembranas, probablemente prevacuolas o vacuolas (Fig. R41 y R42).

En el caso de la proteína de fusión AtKEA6::GFP el patrón punteado de la distribución de la fluorescencia colocaliza parcialmente con los dos marcadores de

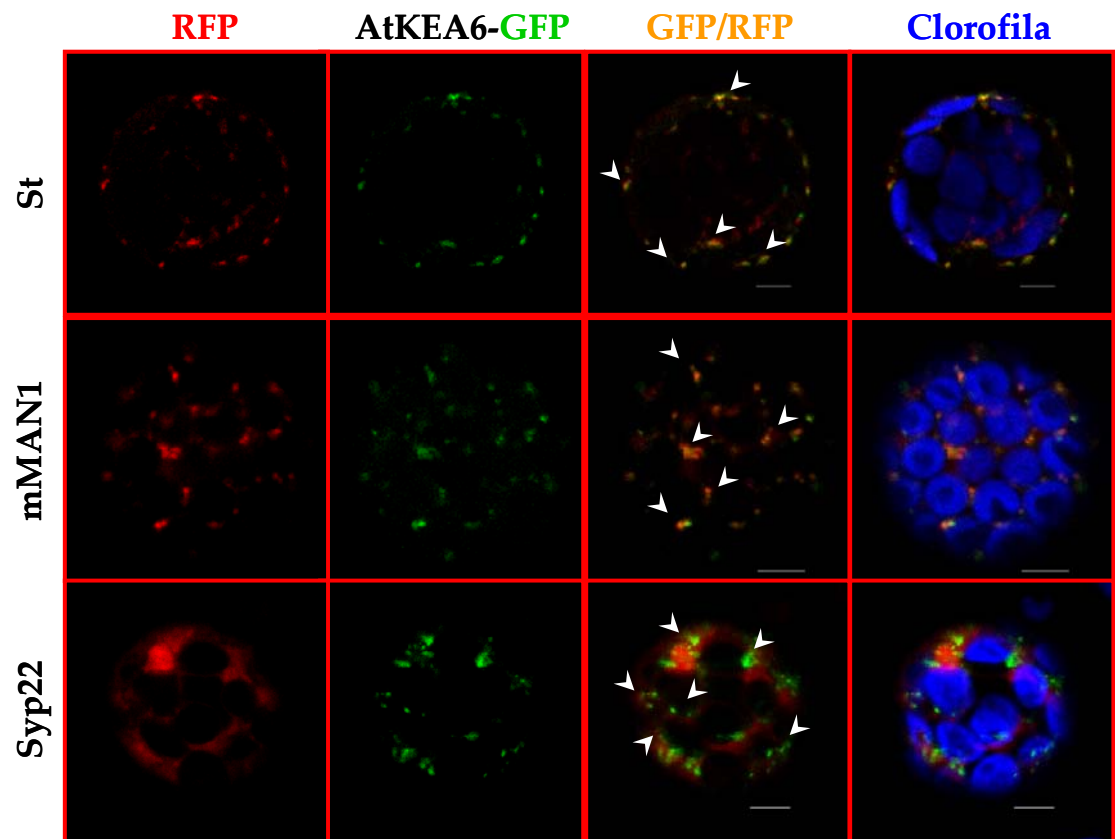
Golgi usados, pero no con los marcadores de prevacuola y vacuola (Syp22 y  $\gamma$ -TIP), lo que confirma que esta proteína se localiza en el aparato de Golgi (Fig. R43).



**Fig.R41. Colocalización AtKEA1::GFP y proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP (Syp22,  $\gamma$ -TIP y St).** En el caso de los marcadores Syp22 y  $\gamma$ -TIP las flechas indican los puntos donde colocalizan AtKEA1 y el marcador correspondiente, y en el caso del marcador St indican los puntos donde no existe colocalización.



**Fig.R42. Colocalización AtKEA2::GFP y proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP (Syp21, Syp22,  $\gamma$ -TIP y St).** En el caso de los marcadores Syp21, Syp22 y  $\gamma$ -TIP las flechas indican los puntos donde colocalizan AtKEA2 y el marcador correspondiente, y en el caso del marcador St indican los puntos donde no existe colocalización.



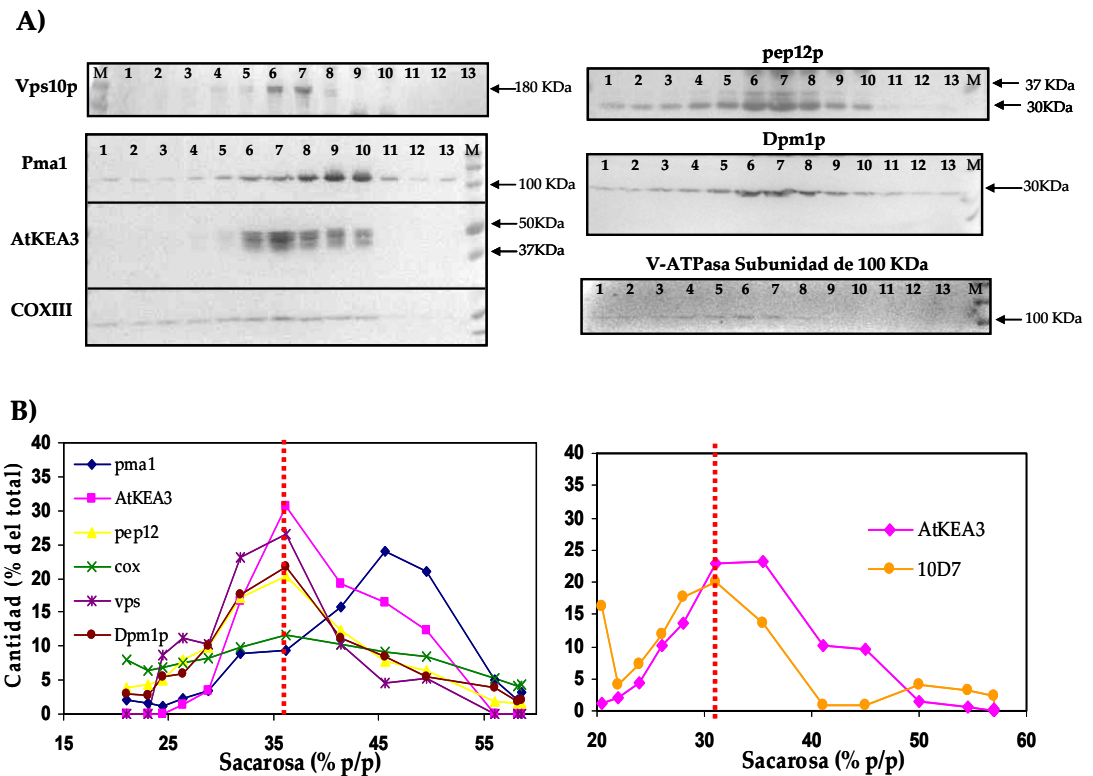
**Fig.R43. Colocalización AtKEA6::GFP y proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP (St, mMan1 y Syp22).** En el caso de los marcadores St y mMan1 las flechas indican los puntos donde colocalizan AtKEA2 y el marcador correspondiente, y en el caso del marcador Syp22 indican los puntos donde no existe colocalización.

### 3.3. INMUNODETECCIÓN DE AtKEA3 EN FRACCIONES DE MEMBRANA DE LEVADURA

Como se ha indicado anteriormente, en el caso concreto de la proteína AtKEA3 no se han obtenido resultados satisfactorios de su localización en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis*, por lo que se decidió llevar a cabo una aproximación de su localización subcelular mediante inmunodetección en fracciones de membrana de levadura (ver apartado 2.4.3. de material y métodos).

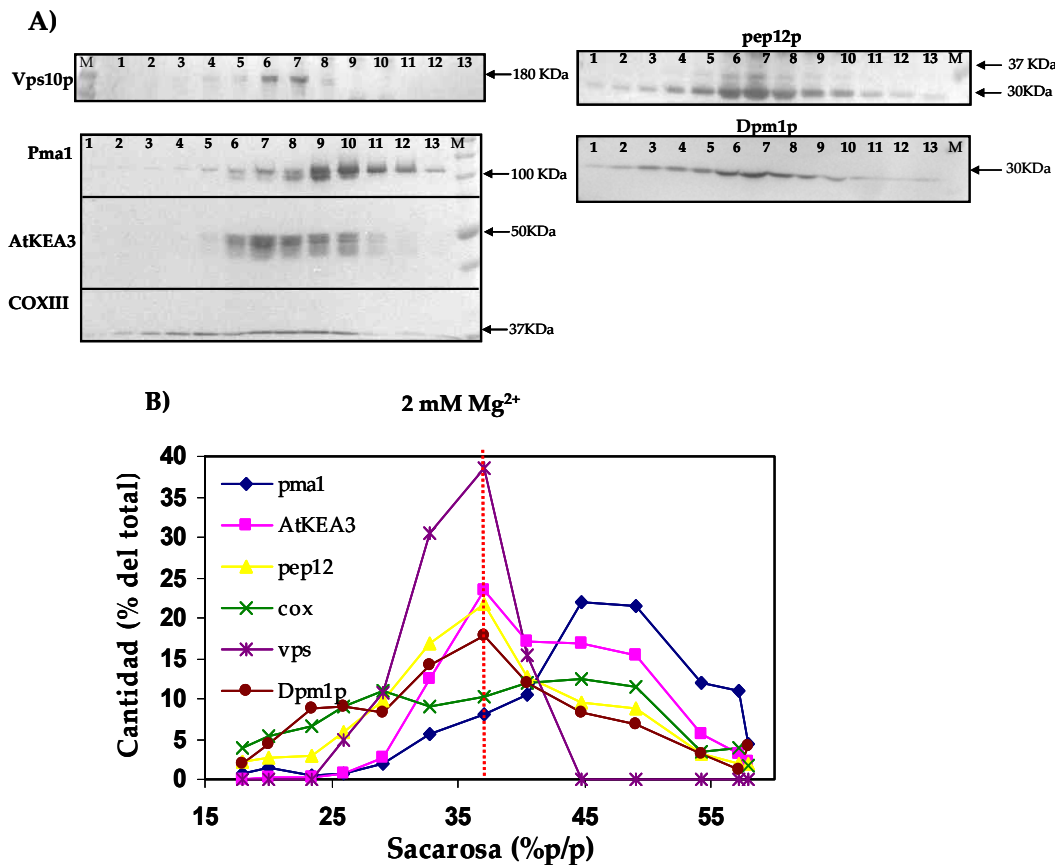
El fraccionamiento por equilibrio de sedimentación es una herramienta muy útil para la identificación de proteínas localizadas en el retículo endoplasmático o en la membrana plasmática. La membrana plasmática tiene una alta densidad, equilibrándose en las fracciones de mayor porcentaje de sacarosa del gradiente (a partir de 45 %(p/p)) lo que permite distinguir perfectamente esta fracción de otras fracciones de menor densidad, como membrana vacuolar, retículo endoplasmático, Golgi y endosomas. El Golgi y las membranas endosomales presentan propiedades muy similares debido a la íntima relación de intercambio de membranas y proteínas que existe entre ellos, lo que implica que también presenten densidades muy similares. Este hecho dificulta discernir entre estas dos fracciones de membranas. Sin embargo, el retículo endoplasmático puede presentar distinta densidad en función de la presencia o ausencia de  $Mg^{2+}$  en el medio de homogenización y fraccionamiento subcelular. El  $Mg^{2+}$  hace que se mantenga la asociación de ribosomas a las membranas del retículo endoplasmático rugoso, de modo que presenta una mayor densidad, similar a la membrana plasmática. Por el contrario, cuando las membranas se preparan en presencia de EDTA, el retículo endoplasmático tiene una densidad menor, similar a la del Golgi y membranas vacuolares (Kaiser et al., 2002). Debido a esta particularidad, y con el objetivo de poder distinguir entre retículo endoplasmático y el resto de membranas endosomales, se utilizaron dos tipos de gradientes, uno conteniendo 10 mM de EDTA y otro sin EDTA y conteniendo 2 mM de  $MgSO_4$ .

La detección de la proteína de fusión (AtKEA3 con el epítipo V5) y de las proteínas de membrana usadas como marcadores de orgánulos, se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de electrotransferencia e inmunodetección (apartado 2.4.3.2. de material y métodos). La cantidad de las distintas proteínas presentes en cada una de las 13 fracciones del gradiente, se determinó cuantificando la intensidad de las bandas resultantes de la inmunodetección mediante el uso del software Quantity One versión 4.6.2 (Bio-Rad) (Fig. R44 y Fig. R45).



**Fig. R44. Fraccionamiento subcelular de levadura transformada con una construcción para la expresión de AtKEA3.** Extractos de membranas microsomales de células W303 que expresan AtKEA3 con el epítipo V5 se fraccionaron en un gradiente continuo de sacarosa, preparado en presencia de 10 mM de EDTA. Las muestras (25µg de proteínas) se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF. A) inmunodetección de AtKEA3 y proteínas marcadoras de membranas. Se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos frente el epítipo V5 (AtKEA3) y frente a las distintas proteínas de membrana usadas como marcadores, concretamente, la subunidad de 100 KDa de la protón ATPasa vacuolar VPH1 (10D7), la proteína del Golgi tardío vps10p (vps); la proteína endosomal/prevacuolar pep12p (pep12); la subunidad III de la citocromo c oxidasa de la membrana mitocondrial interna (cox); la Dol-P-Man sintasa de la membrana del retículo endoplasmático (Dpm1p) y la protón ATPasa de la membrana plasmática (pma1). B) cuantificación de las proteínas contenidas en cada fracción del gradiente. Se representa el % de intensidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos en cada fracción del inmunoblot referido a la intensidad total, frente a la densidad de sacarosa (% p/p). La línea roja discontinua muestra la densidad de la fracción del gradiente en la que la AtKEA3 presenta la máxima concentración.





**Fig. R45. Fraccionamiento subcelular de levadura transformada con una construcción para la sobreexpresión de AtKEA3.** Extractos de membranas microsomales de células W303 que expresan AtKEA3 con el epítipo V5 se fraccionaron en un gradiente continuo de sacarosa, preparado en ausencia de EDTA y en presencia de 2 mM de Mg<sup>2+</sup>. Las muestras (25µg de proteínas) se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF. A) inmunodetección de AtKEA3 y proteínas marcadoras de membranas. Se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos frente el epítipo V5 (AtKEA3) y frente a las distintas proteínas de membrana usadas como marcadores, concretamente, la proteína del Golgi tardío vps10p (vps); la proteína endosomal/prevacuolar pep12p (pep12); la subunidad III de la citocromo c oxidasa de la membrana mitocondrial interna (cox); la Dol-P-Man sintasa de la membrana del retículo endoplasmático (Dpm1p) y la protón ATPasa de la membrana plasmática (pma1). B) cuantificación de las proteínas contenidas en cada fracción del gradiente. Se representa el % de intensidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos en cada fracción del inmunoblot referido a la intensidad total, frente a la densidad de sacarosa (% p/p). La línea roja discontinua muestra la densidad de la fracción del gradiente en la que la AtKEA3 presenta la máxima concentración.

En las figuras R44 y R45 se puede observar que no existen diferencias en la distribución de los distintos marcadores de orgánulos y de la proteína AtKEA3 a lo largo de las fracciones del gradiente en presencia o ausencia de  $Mg^{2+}$ . En ambos gradientes AtKEA3 está presente en fracciones de sacarosa de baja densidad (36-37%) que se corresponde con la densidad de membranas vacuolares y endomembranas, y está claramente separada de las fracciones de mayor densidad correspondientes a membrana plasmática y mitocondrial. En presencia y en ausencia de  $Mg^{2+}$  el patrón de distribución de AtKEA3 es similar a los patrones de distribución del marcador de Golgi tardío (vps10p), el marcador endosomal/prevacuolar (pep12p), el marcador de membrana vacuolar (VPH1) y el marcador de retículo endoplasmático (Dpm1p). Por tanto, los resultados obtenidos de este estudio sugieren que AtKEA3 está localizada en un compartimento endosomal/prevacuolar.



## V. DISCUSIÓN



En este trabajo de Tesis Doctoral se han llevado a cabo los primeros estudios de caracterización funcional de 3 miembros de la familia AtKEA de *Arabidopsis*, AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA3, y además se ha determinado la localización subcelular de la proteína AtKEA6. Las proteínas KEAs son transportadores incluidos en la familia CPA2, junto con las proteínas CHXs. Estos genes se han identificado mediante homología de secuencias con antiportadores  $K^+/H^+$  bacterianos, y constituyen la familia de transportadores de plantas menos estudiada (Mäser et al., 2001) (Fig. A7 y A8). Los genes AtKEA1, 2 y 3 codifican proteínas de 619, 620 y 488 aminoácidos respectivamente, y constituyen un grupo estrechamente relacionado con los transportadores de eflujo de  $K^+$  regulados por glutatión, KefB y KefC (Sze et al., 2004; Brett et al., 2005) (Fig. A8). Estudios recientes proponen que las proteínas KEA forman un subgrupo junto a cuatro transportadores bacterianos (KefC y KefB de *E.coli*; AmhT de *Bacillus pseudofirmus*; y YhaT de *Bacillus subtilis*) que presentan un sistema de transporte de dos componentes, existiendo proteínas auxiliares que interactúan con ellas modulando su actividad y permitiendo que puedan funcionar como antiportadores catión/ $H^+$  o como canales iónicos (Miller et al., 2000; Fujisawa et al., 2007). El análisis topológico de las secuencias de los antiportadores KEA, indica la presencia de 11 hélices transmembrana en AtKEA1 y AtKEA2, y 6 en AtKEA3. El alineamiento con las secuencias de las proteínas KefB y KefC pone de manifiesto un alto grado de homología en la región N-terminal del dominio KTN, implicado en la sensibilidad a glutatión y complejos de glutatión (Fig. R2). En el caso concreto de AtKEA3 las hélices en el extremo N-terminal parecen ausentes en la secuencia, al igual que en el extremo C-terminal, lo que indica que la secuencia podría no estar completa.

#### **Caracterización funcional de AtKEAs en levadura.**

Como ya se ha mencionado anteriormente, el genoma de levadura codifica 2 sistemas de antiporte Catión/Protón de la familia CPA con una localización intracelular: Nhx1p, un antiportador  $(Na^+,K^+)/H^+$  prevacuolar de la subfamilia CPA1, y Kha1p, un antiportador  $K^+/H^+$  de Golgi de la subfamilia CPA2. Los antiportadores tipo NHX de plantas muestran homología de secuencia con el gen Nhx1, mientras que los antiportadores tipo CHX y KEA de plantas son más parecidos a Kha1 (Fig. A8). De este modo, los estudios de complementación se realizaron en mutantes de levadura con interrupciones en estos antiportadores, así como en las ATPasas Ena1-4p, y el antiportador de membrana plasmática Nha1p. Se ha demostrado que la expresión en levadura de los genes NHX de plantas complementa los fenotipos de sensibilidad a NaCl, altas concentraciones de KCl y a higromicina B causados por la interrupción de Nhx1p (Gaxiola et al., 1999; Quintero et al., 2000; Venema et al., 2003), mientras que la expresión de algunos genes de la

familia CHX de plantas completa el fenotipo de inhibición de crecimiento en medio ligeramente básico y déficit de  $K^+$  causado por la disrupción de Kha1p (Maresova y Sychrova, 2006; Padmanaban et al., 2007). En este trabajo se ha demostrado que las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 complementan los fenotipos causados por la disrupción de Nhx1p de una manera muy similar a LeNHX2 (Fig. R8, R9 y R10), pero no complementa el fenotipo causado por la disrupción de Kha1p (Fig. R6, R7 y R11). En relación a la proteína AtKEA3, se demostró que no complementaba en ningún caso los fenotipos causados por las disrupciones de Nhx1p y Kha1p. Por lo tanto, nuestros resultados ponen de manifiesto que los genes AtKEA, más próximos por homología de secuencia a Kha1p y AtCHX20 de la familia CPA2, serían homólogos funcionales de los genes NHX de la familia CPA1. En este sentido, se ha establecido que la actividad de intercambio  $K^+/H^+$  parece ser un rasgo universal de los transportadores NHX intracelulares (Brett et al., 2005b; Mukherjee et al., 2006). Así, el hecho de que la cepa WX1 transformada con AtKEA1 y AtKEA2 sea capaz de crecer a altas concentraciones de KCl (Fig. R3), nos lleva a pensar que puedan actuar como antiportadores  $K^+/H^+$  en vacuolas o prevacuolas, del mismo modo que los transportadores NHX intracelulares.

Se sabe que la acumulación de  $Na^+$  o  $K^+$  en vacuolas proporciona un mecanismo eficiente para evitar los efectos tóxicos del  $Na^+$  en el citosol y el efecto osmótico de elevadas concentraciones de sales, mientras que la acumulación de  $K^+$  en vacuolas o compartimentos endosomales, así como la regulación del pH intracelular son esenciales para varios procesos celulares que se pueden ver afectados por el estrés salino. Con el fin de determinar si los fenotipos de complementación mostrados por las levaduras que expresan los antiportadores AtKEA1 y AtKEA2 tienen algún efecto en el contenido iónico, se han determinado los contenidos intracelulares de  $Na^+$  y  $K^+$ . Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que en condiciones normales de crecimiento, el contenido de  $K^+$  intracelular era mayor en las células que expresaban AtKEA2 que en las células con disrupción en Nhx1p y las silvestres. Se comprobó que la expresión de AtKEA1 no afectaba a la acumulación de  $K^+$  en estas condiciones (Fig. R13 A). Al cultivar las levaduras en presencia de 20 mM de NaCl, el contenido de  $K^+$  disminuye en todos los casos, no observándose diferencias entre las células con disrupción de Nhx1p y las células que expresan AtKEA1 y AtKEA2. Respecto al contenido de  $Na^+$ , las células que expresaban AtKEA1 y AtKEA2 presentaban un mayor contenido de  $Na^+$  que las que no transformadas, lo que parece indicar que en estas condiciones los dos antiportadores contribuyen a la acumulación de  $Na^+$  (Fig. R13 B). Estos resultados sugieren que las dos proteínas son antiportadores catión/ $H^+$  relativamente no específicos.

Se ha comprobado mediante western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo V5 que las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 presentan un tamaño prácticamente idéntico, por encima de 50 KDa, mientras que AtKEA3 muestra un tamaño ligeramente más pequeño (Fig. R15). Estas diferencias podrían explicarse en base al mayor número de aminoácidos de AtKEA1 y AtKEA2 comparado con AtKEA3, que podría estar truncado como se ha discutido anteriormente. Esto podría estar relacionado con la ausencia de complementación por parte de AtKEA3.

#### **Determinación de la actividad de intercambio catión/H<sup>+</sup> de las proteínas AtKEAs de *Arabidopsis* expresadas en levadura.**

Los transportadores AtKEA1, AtKEA2 y AtKEA3 de *Arabidopsis* expresados en levadura, se purificaron y reconstituyeron en liposomas, con el fin de evitar interferencias con otros transportadores de iones en las medidas de actividad. Se utilizaron proteínas de fusión con una etiqueta constituida por el epítipo V5 y una cola de 6 histidinas, que previamente se comprobó que no afectaba a la funcionalidad de las proteínas (Fig. R12).

Se realizaron estudios de selectividad iónica para los 3 transportadores, mediante la medida de la actividad de intercambio (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup>, utilizando sales de estos iones y un gradiente de H<sup>+</sup> para energizar el transporte. Se observó que la actividad de antiporte variaba en función de la sal usada, siendo más alta con sales de sulfato que con sales de cloruro (datos no mostrados). Este hecho podría explicarse en base a los cambios eléctricos no específicos de anión que tienen lugar en los proteoliposomas al adicionar las distintas sales. Los iones Cl<sup>-</sup> son mucho más permeables que los iones SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, por tanto, la adición de iones Cl<sup>-</sup> en el exterior de las vesículas alteraría el potencial de membrana, volviéndose más negativo en el interior que cuando se adicionan iones SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, contrarrestando el flujo neto de salida de H<sup>+</sup> de las vesículas. Por tanto, una importante fracción de los protones transportados fuera de la vesícula en la reacción de intercambio, podrían volver a entrar junto con los aniones Cl<sup>-</sup>, especialmente cuando la actividad antiportadora es relativamente baja. De este modo, debido a las características del sistema en relación a la permeabilidad, la actividad antiportadora real sólo podría medirse de manera adecuada usando aniones relativamente impermeables, como es el caso del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Por todo ello, se usaron sales de sulfato en todos los ensayos de determinación de actividad de intercambio iónico realizados en este estudio.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la proteína AtKEA2 presenta una actividad de transporte más alta para el K<sup>+</sup>, más baja para Na<sup>+</sup> e intermedia para Li<sup>+</sup> (Fig. R17). AtKEA1 muestra una afinidad similar para todos los cationes ensayados. Basándonos en estos datos se puede afirmar que los transportadores AtKEA1 y AtKEA2 no son antiportadores catión/H<sup>+</sup> específicos de



K<sup>+</sup>. En los ensayos de medida de intercambio iónico realizados con la proteína AtKEA3 reconstituida en proteoliposomas apenas se detectó actividad antiportadora.

De las proteínas estudiadas, AtKEA2 fue la que mostró una mayor actividad de intercambio iónico, por lo que se decidió seguir profundizando en el estudio de su mecanismo de transporte. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en proteoliposomas, se llevaron a cabo estudios de la actividad de intercambio iónico en vacuolas intactas de levadura. Para ello se usó la cepa triple mutante (W303*nhx1Δvnx1Δvcx1Δ*), con el objetivo de eliminar toda la actividad antiportadora K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de las vacuolas aisladas. Previamente se había demostrado que el mutante *vnx1* presentaba una pérdida total de actividad antiportadora Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en una fracción enriquecida en membrana vacuolar (Cagnac et al., 2007). Sin embargo, cambiando las condiciones experimentales (usando sales de sulfato en lugar de sales de cloruro) se puso de manifiesto otra actividad antiportadora catión monovalente/H<sup>+</sup> en esta fracción, mucho más baja que la detectada para Vnx1p (Fig. R31 A y B). No está claro por qué la detección de esta actividad es dependiente del contraión usado en los ensayos de transporte. Posiblemente, los iones Cl<sup>-</sup> y H<sup>+</sup>, relativamente permeables, inducen fugas pasivas que enmascaran el antiporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. En este sentido, la adición de más iones Cl<sup>-</sup> permeables comparado con los iones SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> provocaría una disipación del potencial de membrana positivo en el interior creado por la bomba H<sup>+</sup>-ATPasa, contrarrestando la salida de H<sup>+</sup> de la vacuola, y por tanto enmascarando la actividad del antiportador. Se identificó el gen *vcx1* como responsable del transporte "residual", por lo que se llevó a cabo su disrupción en la cepa doble mutante (W303*nhx1Δvnx1Δ*) obteniéndose la triple mutante, y se comprobó mediante ensayos de actividad en presencia de sales de sulfato, que con esta disrupción se eliminaba la actividad antiportadora K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> residual (Fig. R31C). Por tanto, con el objetivo de evitar artefactos que enmascaren las medidas de intercambio iónico, en todos los ensayos de determinación de la actividad de AtKEA2 en vacuolas aisladas se usaron sales de sulfato. Los resultados obtenidos mostraron que tanto al adicionar K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se detectaba actividad transportadora, y que ésta era mayor en el caso de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, confirmándose así los datos obtenidos utilizando la proteína purificada y reconstituida en liposomas. La presencia de la proteína de fusión en las vacuolas aisladas se comprobó mediante inmunodetección, usando el anticuerpo primario anti-V5 (Fig. R33).

Como se ha indicado previamente, las proteínas KefC y YhaT actúan como canales iónicos en ausencia de sus proteínas auxiliares, y como antiportadores en presencia de las mismas (Fujisawa et al., 2007). Los resultados obtenidos en las medidas de transporte para AtKEA2 se corresponden con los obtenidos para KefC,

actuando como un antiportador en presencia de su proteína auxiliar (Fujisawa et al., 2007). Por ello, con el fin de determinar el mecanismo de transporte de  $K^+$  catalizado por AtKEA2, se realizaron ensayos de medida de actividad usando distintas concentraciones del protonóforo FCCP, que previamente se había demostrado que estimulaba la alcalinización de las vesículas inducida por  $K^+$  en presencia de valinomicina, un canal de  $K^+$ , pero no en presencia de nigericina, un antiportador  $K^+/H^+$  electroneutro (Fig. R19). Con estos ensayos se comprobó que la adición de FCCP no estimulaba la alcalinización inicial de los proteoliposomas, lo que indica que AtKEA2 no actúa como un canal iónico sino como un antiportador  $K^+/H^+$  electroneutro (Fig. R20).

También se llevaron a cabo ensayos de la medida de actividad de intercambio  $K^+/H^+$  en presencia de glutatión y NADH. Como se ha comentado anteriormente, KefC funciona como un canal de  $K^+$  regulado por glutatión, que se mantiene en un estado inactivo cuando se une a este compuesto, y activo cuando se une a complejos resultantes de la reacción de glutatión con compuestos electrofílicos (N-etilmaleimida o metilglioxal) (Meury y Kepes, 1982; Booth et al., 1985; Elmore et al., 1990; Ferguson et al., 1993; Ferguson, 1999). También se sabe que cuando el complejo KefFC funciona como un antiportador, el glutatión inhibe el antiporte y la presencia de NADH potencia esta inhibición (Fujisawa et al., 2007). Los resultados obtenidos indican que al adicionar 5 mM de glutatión ó 200  $\mu$ M de NADH, de manera independiente, la actividad de antiporte se veía ligeramente disminuida, y esa disminución era prácticamente idéntica en ambos casos. Cuando se adicionaba 5 mM de glutatión y 200  $\mu$ M NADH conjuntamente, la disminución de la actividad era mucho mayor, siendo la actividad de antiporte prácticamente nula (Fig. R23). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fujisawa y colaboradores (2007) en los ensayos con KefFC. Sin embargo, cabe destacar la complejidad en la interpretación de los resultados, ya que tanto el glutatión como el NADH afectan a la fluorescencia de la piranina (Fig. R21), lo que hizo preciso la calibración de la señal de fluorescencia con el pH en presencia de ambos compuestos (Fig. R22). Además, el glutatión parece provocar una acidificación adicional en el interior de los liposomas, lo que dificulta aún más la interpretación de los datos. De este modo, es muy probable que estos problemas hayan afectado también los resultados obtenidos por Fujisawa y colaboradores (2007).

### **Análisis de aminoácidos posiblemente implicados en la regulación de la actividad de AtKEA2.**

Como se ha indicado en el apartado de Antecedentes Científicos de este trabajo, las proteínas de la familia KEA forman parte del grupo de transportadores CPA que contienen un dominio intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00999>). Recientemente se ha resuelto la estructura de la proteína NhaA de *E. coli*, perteneciente a la familia CPA, y se ha demostrado que tiene tres aspartatos conservados claves en el mecanismo de antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Arkin et al., 2007). De estos residuos, el Asp<sup>164</sup> se ha identificado como sitio de unión al  $\text{Na}^+$ , y se ha comprobado que está conservado en todos los antiportadores de las familias CPA1 y CPA2, correspondiéndose con el aspartato en posición 166 en la secuencia de AtKEA2. Por tanto, con el objetivo de comprobar si este aminoácido era esencial en la actividad de la proteína AtKEA2, se sustituyó, mediante mutagénesis dirigida, por una alanina. La proteína mutada AtKEA2 D166A, se caracterizó mediante ensayos de complementación en levadura y determinación de actividad tras ser purificada y reconstituida en proteoliposomas, con el fin de determinar su funcionalidad. Mediante estos ensayos se demostró que la proteína mutada, al contrario que la nativa, no era capaz de complementar los fenotipos de sensibilidad a higromicina, a NaCl y a altas concentraciones de KCl causados por la disrupción de Nhax1p (Figs. R26-R28), y que la mutación provocaba la pérdida de la actividad antiportadora de la proteína (Fig. R29). Estos resultados indican que la sustitución del aspartato con carga negativa por un residuo alanina con carga neutra, produce una disminución de la interacción electrostática con el  $\text{Na}^+$ , igual a la producida cuando el Asp<sup>164</sup> de NhaA se protona (Arkin et al., 2007), provocando la pérdida de su actividad antiportadora.

Como se ha comentado previamente en este trabajo, las proteínas KEA1-3 están estrechamente relacionadas con los transportadores de eflujo de  $\text{K}^+$  KefB y KefC (Sze et al., 2004; Brett et al., 2005) (Figs. A8, R1 y R2). La proteína KefC contiene un bucle citoplasmático regulador cargado negativamente crítico en su funcionamiento, que se ha propuesto que interacciona con el dominio KTN, estando implicado en la sensibilidad a glutatión y complejos del glutatión (Miller et al., 1997; Roosild et al., 2002; Roosild et al., 2009), y su secuencia (RHALES DIEPFK) está bastante conservada en los antiportadores AtKEA1-3. Roosild y colaboradores (2009) comprobaron que la sustitución del aspartato en posición 262 (en la secuencia RHALES DIEPFK) por una lisina provocaba, en ausencia de glutatión, una pérdida de potasio más rápida, y por tanto un transporte más activo que la proteína sin mutar, sugiriéndose una pérdida de regulación de la actividad de KefC. Este Glu<sup>262</sup> está conservado en las proteínas KEAs, y se corresponde con el residuo E278 en AtKEA2, por lo que fue el aminoácido elegido como diana de la mutagénesis,

sustituyéndose por una lisina. La caracterización de la proteína mutante AtKEA2 E278K se realizó como se ha indicado anteriormente para AtKEA2 D166A, mediante ensayos de complementación en levadura y determinación de su actividad tras ser purificada y reconstituida en proteoliposomas. Los resultados obtenidos demostraron que la mutación E278K afecta a la actividad de la proteína AtKEA2, provocando la pérdida de su capacidad de complementación de los fenotipos de sensibilidad a higromicina B, a salinidad y a altas concentraciones de KCl. Además los ensayos de medida de actividad de intercambio iónico de las proteínas mutantes pusieron de manifiesto su pérdida de capacidad transportadora. En conjunto, estos datos muestran que el Glu<sup>278</sup> es esencial en la actividad de la proteína. Sin embargo, la consecuencia de su sustitución por una lisina no es la obtención de una proteína más activa, como cabría esperar en base a lo descrito para la proteína KefC. Por tanto, podríamos decir que este residuo provoca una pérdida de regulación de la actividad de la proteína, aunque de un modo distinto a como tiene lugar en KefC.

#### **Localización subcelular de AtKEA1, AtKEA2, AtKEA3 y AtKEA6.**

AtKEA1 y AtKEA2 se localizan en el retículo endoplasmático cuando se expresan en células de levadura, en todos los casos ensayados: con la proteína GFP fusionada en el extremo C-terminal y N-terminal, usando un vector multicopia bajo el control del promotor constitutivo PMA1 y usando un vector integrativo de copia única bajo el control del promotor inducible *Gal1*. La retención en el retículo endoplasmático es uno de los principales problemas inherentes a la expresión heteróloga de proteínas de membrana en levadura, lo que sugiere que el mecanismo de transporte de la ruta secretora es, al menos parcialmente, diferente entre levaduras y plantas. Esta retención ocurre fundamentalmente cuando la proteína heteróloga se sobreexpresa, debido a que se estimularía la biogénesis de membrana en levadura, como se ha descrito previamente en el caso de la sobreexpresión de la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática de planta en levadura, donde se observó la proliferación del retículo endoplasmático en forma de membranas apiladas (Browse y Somerville; 1991; Villalba et al., 1992). La etiqueta de la proteína de fusión también puede dar lugar a una localización errónea, como se ha observado previamente en proteínas marcadas en el extremo C-terminal que quedan atrapadas en el retículo endoplasmático (Froissard et al., 2006). El hecho de que las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 queden retenidas en el retículo endoplasmático incluso cuando no son sobreexpresadas (usando el vector integrativo de copia única bajo el control del promotor inducible *Gal1*), sugiere que la fusión con la proteína GFP podría provocar un mal plegamiento y como consecuencia una conformación no estable de la proteína, y por último su retención en el retículo endoplasmático.

Teniendo en cuenta estos resultados, se determinó la localización subcelular de las proteínas de fusión AtKEA con la proteína GFP en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis*. Los protoplastos aislados de tejidos frescos de *Arabidopsis* presentan una serie de ventajas como sistema de expresión génica transitoria, ya que mantienen su identidad celular y estado de diferenciación, su capacidad de percepción y respuesta a hormonas, metabolitos, señales ambientales y elicitores derivados de patógenos, de manera muy similar a como tienen lugar en los tejidos intactos y en la planta completa. Además presentan una alta eficiencia de transformación y cotransfección, permitiendo el uso simultáneo de varios plásmidos para la expresión de construcciones diferentes (Sheen, 2001). Sin embargo, hay que ser cauto a la hora de interpretar los datos obtenidos en los sistemas de sobreexpresión transitoria, debido a que el sistema de endomembranas es muy dinámico, presentando fuertes interacciones entre distintos compartimentos endosomales (Ueda et al., 2004), lo que puede resultar en una localización incorrecta de la proteína de fusión. Los principales orgánulos del sistema de endomembranas son el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la red del trans-Golgi. En la ruta secretora, las proteínas son dirigidas desde el trans-Golgi hasta la vacuola a través de compartimentos prevacuolares intermedios (prevacuolas) o a la membrana plasmática a través de vesículas secretoras. En la ruta endocítica las moléculas son introducidas desde la membrana plasmática a través de compartimentos endosomales antes de llegar a la vacuola. Ambas rutas, secretora y endocítica, convergen en la vacuola y están muy relacionadas, presentando algunos compartimentos comunes en el tráfico de proteínas. También hay que tener en cuenta la gran importancia de la regulación y homeostasis del pH en el tráfico vesicular, que juega un papel muy importante en la modificación postraduccional, procesado y tráfico de proteínas (Paroutis et al., 2004). La sobreexpresión de los antiportadores catión/H<sup>+</sup> KEA podría modificar el pH de los distintos compartimentos endosomales, lo que afectaría a su localización.

Para la localización subcelular de las proteínas KEAs se utilizaron proteínas de fusión con GFP en el extremo C-terminal y N-terminal de los antiportadores. También se usaron una serie de marcadores de orgánulos con el fin de comparar sus patrones de distribución de fluorescencia con los de las proteínas de fusión. Los orgánulos en células eucariotas pueden ser clasificados, basándose en su apariencia al microscopio en dos grupos: orgánulos predominantemente pequeños y redondos, presentes en muchas copias por célula, con un patrón punteado; y grandes orgánulos, presentes en una única estructura intercomunicada y extendida a través del citoplasma, con una morfología tubular, o morfología similar a una hoja (Nelson et al., 2007). Sin embargo, la apariencia de los orgánulos depende en gran medida de la posición del plano de foco en la célula. Por lo tanto, con el fin de determinar la

localización subcelular de los antiportadores KEA de un modo más preciso, se procedió a la cotransfección de protoplastos con los vectores de expresión portadores de las construcciones AtKEAs::GFP y las construcciones para la expresión de las proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas con RFP.

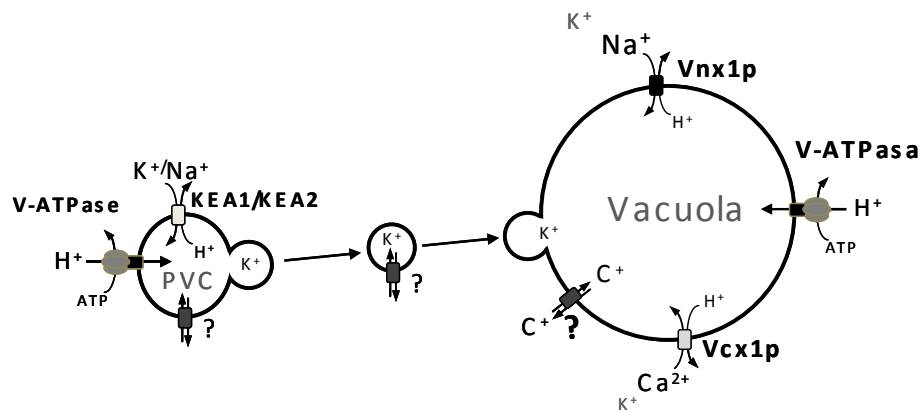
Los datos de los experimentos de transformación simple, demuestran que la fusión con GFP en el extremo N-terminal de las proteínas, afecta a su localización. De este modo, las imágenes obtenidas del patrón de fluorescencia de las proteínas GFP::AtKEA1 y GFP::AtKEA6 indican una localización citoplasmática, muy parecida a la mostrada por la proteína GFP soluble (Fig. R36 B y R38 B). Esto podría explicarse en base a un papel del extremo N-terminal en el reconocimiento del lugar al que se deben anclar las proteínas transportadoras, de forma que al fusionarse la GFP al extremo N-terminal de AtKEA1 y AtKEA2 se impediría la inserción de los transportadores en la membrana. Por otra parte, es posible que la proteína de fusión no presente una conformación estable. La degradación de la proteína daría lugar a la liberación de GFP de la parte N-terminal. En el caso de la proteína AtKEA2, no se obtuvieron imágenes de la localización de la proteína de fusión con GFP en el extremo N-terminal. Las proteínas de fusión con GFP en el extremo C-terminal, muestran un patrón de distribución de la fluorescencia distinto al presentado por la proteína GFP soluble. Las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 presentan una distribución muy similar entre sí, y muy similar a los marcadores prevacuolares/vacuolares usados en este estudio (Fig. R36 A y R37). Por otro lado, la proteína AtKEA6 presenta un patrón de fluorescencia muy distinto al mostrado por AtKEA1 y AtKEA2, y a su vez muy similar a los marcadores de Golgi usados (R38 A). Estos resultados se confirmaron mediante estudios de colocalización con distintas proteínas marcadoras de orgánulos fusionadas a RFP. Con estos ensayos se confirmaron los datos obtenidos en los estudios experimentos de transformación simple. AtKEA1 y AtKEA2 colocalizaban parcialmente con los marcadores prevacuolares/vacuolares, pero no con los marcadores de Golgi (Fig. R40, R41), y en el caso de AtKEA6 ocurre lo contrario, es decir, colocaliza parcialmente con los marcadores de Golgi usados en este estudio pero no con los marcadores prevacuolares/vacuolares (Fig. R42). Estos datos sugieren que las proteínas AtKEA1 y AtKEA2 están localizadas en la misma subpoblación de endomembranas, muy probablemente prevacuolas o vacuolas, y que AtKEA6 se localiza en el aparato de Golgi.

Los datos obtenidos en los ensayos de localización subcelular confirman lo esperado, ya que AtKEA1 y AtKEA2 presentan una alta homología de secuencia, estando muy próximos filogenéticamente, debido a que son el resultado de una duplicación génica, y además en este trabajo se ha demostrado que complementan de un modo muy similar los fenotipos causados por la disrupción de *Nhx1p* en

levadura, que también presenta una localización prevacuolar, lo que sugería que debían estar localizados en el mismo compartimento endosomal. Además presentan la misma localización subcelular que LeNHX2, según los resultados obtenidos en los estudios de localización en células de epidermis de cebolla, que ponen de manifiesto su presencia en pequeñas vesículas, lo que es indicativo de una localización prevacuolar/endosomal (Gálvez, 2009). Por tanto, como se ha indicado anteriormente, AtKEA1 y AtKEA2 más próximos por homología de secuencia a Kha1p de la familia CPA2, serían homólogos funcionales de los genes NHX de la familia CPA1. Por otro lado, se ha demostrado que AtKEA6 se localiza en el aparato de Golgi, al igual que la proteína Kha1p (Maresova y Sychrova, 2006), lo que sugiere que ambas proteínas podrían ser homólogos funcionales. En este sentido es necesario profundizar en la caracterización funcional de AtKEA6 para poder verificar esta hipótesis.

Como se ha indicado anteriormente, en el caso de las proteínas de fusión AtKEA3::GFP y GFP::AtKEA3 no se han obtenido resultados satisfactorios de su localización subcelular en protoplastos del mesófilo de Arabidopsis. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo una aproximación de su localización, mediante inmunodetección en fracciones de membrana de levadura. Esta aproximación se ha realizado con éxito en otras proteínas de la familia CPA, como es el caso de LeNHX2 (Venema et al., 2003), donde se observó el cofraccionamiento de la proteína con los marcadores de Golgi y los marcadores prevacuolares, y estos resultados se confirmaron mediante estudios de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla (Gálvez, 2009). Los datos obtenidos de estos ensayos, ponen de manifiesto la presencia de AtKEA3 en fracciones de sacarosa de baja densidad (36-37%) que se corresponde con la densidad de membranas vacuolares y endomembranas, y está claramente separada de las fracciones de mayor densidad correspondientes a la membrana plasmática y mitocondrial. Además se comprobó que el patrón de distribución de AtKEA3 es similar a los patrones de distribución del marcador de Golgi tardío (vps10p), el marcador endosomal/prevacuolar (pep12p), el marcador de membrana vacuolar (VPH1) y el marcador de retículo endoplasmático (Dpm1p) (Fig. R44 y R45). Estos datos sugieren que AtKEA3 está localizada en un compartimento endosomal/prevacuolar. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que en realidad la proteína AtKEA3 quede retenida en el retículo endoplasmático, como ocurre con las proteínas de fusión AtKEA1 y AtKEA2 con GFP y eYFP expresadas en levadura, ya que es probable que no presente una conformación estable debido a que, como se ha indicado anteriormente, su secuencia parece no estar completa.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que AtKEA1 y AtKEA2 se comportan como antiportadores catión/ $H^+$  relativamente poco específicos, y que se localizan en membranas endosomales, muy probablemente prevacuolas. Por todo ello, podrían ser responsables de la acumulación vacuolar de cationes cuando se expresan en levadura, no mediante transporte directo, sino a través de la fusión de vesículas cargadas de cationes dirigidas desde prevacuolas hacia la vacuola central, o bien controlando el tráfico de transportadores implicados en la homeostasis de cationes alcalinos hacia la vacuola, de un modo similar a Nhx1p de levadura (Fig. D1).



**Fig. D1. Modelo propuesto del mecanismo de acumulación de cationes en la vacuola mediado por AtKEA1 y AtKEA2 expresadas en levadura.** AtKEA1 y AtKEA2 podrían desempeñar un papel en la carga de prevacuolas (PVC). A partir de estas PVC se enviarían vesículas que contienen iones a la vacuola principal, contribuyendo de este modo en la acumulación de iones en el lumen vacuolar. También podrían intervenir en la orientación de transportadores de cationes no caracterizados en la membrana vacuolar, e indirectamente afectar la homeostasis iónica de la vacuola.





## **VI. CONCLUSIONES**



1. AtKEA1 y AtKEA2 complementan en levadura los fenotipos de sensibilidad a higromicina, NaCl y KCl causados por la disrupción de Nhx1p, pero no complementan el fenotipo de inhibición de crecimiento en medio ligeramente básico y déficit de K<sup>+</sup> causado por la disrupción de Kha1p. Ello indica que los genes AtKEA, más próximos por homología de secuencia a Kha1p y AtCHX20 de la familia CPA2, podrían ser homólogos funcionales de los genes NHX de la familia CPA1. La demostración de que las células de levadura de la cepa WX1 transformadas con AtKEA1 y AtKEA2 crecen a altas concentraciones de KCl, sugiere que ambas proteínas pueden actuar como antiportadores K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en vacuolas o prevacuolas.
2. AtKEA2 es, de entre las proteínas estudiadas, la que muestra una mayor actividad de transporte, presentando una mayor afinidad para el K<sup>+</sup> y el Cs<sup>+</sup> que para el Li<sup>+</sup> o el Na<sup>+</sup>. AtKEA1 presenta afinidades similares para el Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>, mientras que AtKEA3 apenas presenta actividad de transporte iónico.
3. AtKEA2 es un antiportador iónico, a diferencia de KefC y YhaT que funcionan como canales iónicos en ausencia de sus proteínas auxiliares. Se ha comprobado que el glutatión inhibe la actividad de AtKEA2 y que la presencia de NADH potencia esta inhibición, tal como se había demostrado para KefC cuando funciona como antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> al interactuar con su proteína auxiliar.
4. La sustitución de los aminoácidos Asp<sup>166</sup> y Glu<sup>278</sup> en AtKEA2 resulta en la inactivación de la proteína, lo que pone de manifiesto su importancia en la actividad de AtKEA2.
5. AtKEA1 y AtKEA2 presentan una colocalización parcial con marcadores prevacuolares/vacuolares, lo que indica que las dos proteínas están localizadas en una subpoblación de endomembranas, probablemente prevacuolas o vacuolas. AtKEA6 colocaliza con los marcadores de Golgi usados en este estudio, confirmándose su localización en el aparato de Golgi. En el caso de la proteína AtKEA3 la localización no está clara.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett* **486**: 93-98
- Ahn SJ, Shin R, Schachtman DP** (2004) Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. *Plant Physiol* **134**: 1135-1145
- Ahner A, Brodsky JL** (2004) Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* **14**: 474-478
- Alberti S, Gitler AD, Lindquist S** (2007) A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 913-919
- Amtmann A, Armengaud P** (2007) The role of calcium sensor-interacting protein kinases in plant adaptation to potassium-deficiency: new answers to old questions. *Cell Res* **17**: 483-485
- Amtmann A, Armengaud P, Volkov V** (2004) Potassium nutrition and salt stress. *In* Membrane transport in plant. Annual Plants Reviews, Vol 15. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 293-339
- Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP** (2001) The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiol* **126**: 1061-1071
- Amtmann A, Hammond JP, Armengaud P, White PJ** (2006) Nutrient sensing and signalling in plants: Potassium and phosphorus. *Advances in Botanical Research*, Vol 43 **43**: 209-257
- Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P** (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* **133**: 682-691
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3736-3740
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E** (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258
- Apse MP, Blumwald E** (2007) Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Lett* **581**: 2247-2254
- Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H** (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J* **20**: 171-182
- Ariño J, Ramos J, Sychrova H** (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 95-120
- Arkin IT, Xu H, Jensen MO, Arbely E, Bennett ER, Bowers KJ, Chow E, Dror RO, Eastwood MP, Flitman-Tene R, Gregersen BA, Klepeis JL, Kolossvary I,**



- Shan Y, Shaw DE** (2007) Mechanism of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporting. *Science* **317**: 799-803
- Ashley MK, Grant M, Grabov A** (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J Exp Bot* **57**: 425-436
- Balague C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmstrom S, Kohler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D** (2003) HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* **15**: 365-379
- Bañuelos MA, Garcíadeblas B, Cubero B, Rodríguez-Navarro A** (2002) Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol* **130**: 784-795
- Bañuelos MA, Klein RD, Alexander-Bowman SJ, Rodríguez-Navarro A** (1995) A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J* **14**: 3021-3027
- Becker D, Geiger D, Dunkel M, Roller A, Bertl A, Latz A, Carpaneto A, Dietrich P, Roelfsema MRG, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Hedrich R** (2004) AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15621-15626
- Benito B, Rodríguez-Navarro A** (2003) Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Journal* **36**: 382-389
- Berthomieu P, Conejero G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah PA, Tester M, Very AA, Sentenac H, Casse F** (2003) Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J* **22**: 2004-2014
- Blaho G, Stelzl U, Spahn CM, Agrawal RK, Frank J, Nierhaus KH** (2000) Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol* **317**: 292-309
- Blumwald E** (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 431-434
- Blumwald E, Rea PA, Poole RJ** (1987) Preparation of Tonoplast Vesicles - Applications to H<sup>+</sup>-Coupled Secondary Transport in Plant Vacuoles. *Methods in Enzymology* **148**: 115-123

- Booth IR, Edwards MD, Miller S** (2003) Bacterial ion channels. *Biochemistry* **42**: 10045-10053
- Booth IR, Epstein W, Giffard PM, Rowland GC** (1985) Roles of the *trkB* and *trkC* gene products of *Escherichia coli* in K<sup>+</sup> transport. *Biochimie* **67**: 83-89
- Borsics T, Webb D, Andeme-Ondzighi C, Staehelin LA, Christopher DA** (2007) The cyclic nucleotide-gated calmodulin-binding channel AtCNGC10 localizes to the plasma membrane and influences numerous growth responses and starch accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **225**: 563-573
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brett CL, Donowitz M, Rao R** (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C223-239
- Britto DT, Kronzucker HJ** (2008) Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiol Plant* **133**: 637-650
- Browse J, Somerville C** (1991) Glycerolipid synthesis - Biochemistry and Regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 467-506
- Bruggemann L, Dietrich P, Becker D, Dreyer I, Palme K, Hedrich R** (1999) Channel-mediated high-affinity K<sup>+</sup> uptake into guard cells from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3298-3302
- Busch W, Saier MH, Jr.** (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 287-337
- Buschmann PH, Vaidyanathan R, Gassmann W, Schroeder JI** (2000) Enhancement of Na<sup>+</sup> uptake currents, time-dependent inward-rectifying K<sup>+</sup> channel currents, and K<sup>+</sup> channel transcripts by K<sup>+</sup> starvation in wheat root cells. *Plant Physiology* **122**: 1387-1397
- Byrt CS, Platten JD, Spielmeyer W, James RA, Lagudah ES, Dennis ES, Tester M, Munns R** (2007) HKT1;5-like cation transporters linked to Na<sup>+</sup> exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *Plant Physiol* **143**: 1918-1928
- Cagnac O, Leterrier M, Yeager M, Blumwald E** (2007) Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**: 24284-24293
- Cakmak I** (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **168**: 521-530

- Campbell NA, Thomson WW** (1977) Effects of Lanthanum and Ethylenediaminetetraacetate on Leaf Movements of Mimosa. *Plant Physiol* **60**: 635-639
- Cellier F, Conejero G, Ricaud L, Luu DT, Lepetit M, Gosti F, Casse F** (2004) Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant J* **39**: 834-846
- Colmenero-Flores JM, Martinez G, Gamba G, Vazquez N, Iglesias DJ, Brumos J, Talon M** (2007) Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J* **50**: 278-292
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S** (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38
- Corratge-Faillie C, Jabnoute M, Zimmermann S, Very AA, Fizames C, Sentenac H** (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci*
- Czempinski K, Frachisse JM, Maurel C, Barbier-Brygoo H, Mueller-Roeber B** (2002) Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* 'two-pore' K<sup>+</sup> channel KCO1. *Plant J* **29**: 809-820
- Czempinski K, Gaedeke N, Zimmermann S, Muller-Rober B** (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany* **50**: 955-966
- Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, MullerRober B** (1997) New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency. *Embo Journal* **16**: 2565-2575
- Cheeseman JM, Hanson JB** (1979) Mathematical Analysis of the Dependence of Cell Potential on External Potassium in Corn Roots. *Plant Physiol* **63**: 1-4
- Cheeseman JM, Hanson JB** (1980) Does active K<sup>+</sup> influx to root occur? *Plant Science Letters* **18**: 81-84
- Cheeseman JM, Lafayette PR, Gronewald JW, Hanson JB** (1980) Effect of ATPase Inhibitors on Cell Potential and K Influx in Corn Roots. *Plant Physiol* **65**: 1139-1145
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S** (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J* **52**: 223-239
- Cherel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud JB** (2002) Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K<sup>+</sup> channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14**: 1133-1146

- Daley DO, Rapp M, Granseth E, Melen K, Drew D, von Heijne G** (2005) Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome. *Science* **308**: 1321-1323
- Darley CP, van Wuytswinkel OC, van der Woude K, Mager WH, de Boer AH** (2000) Arabidopsis thaliana and Saccharomyces cerevisiae NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Biochem J* **351**: 241-249
- Davenport RJ, Munoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M** (2007) The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **30**: 497-507
- Deeken R, Sanders C, Ache P, Hedrich R** (2000) Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K<sup>+</sup> channel of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **23**: 285-290
- del Pozo L, Osaba L, Corchero J, Jimenez A** (1999) A single nucleotide change in the MNR1 (VCX1/HUM1) gene determines resistance to manganese in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **15**: 371-375
- Delsal G, Manfioletti G, Schneider C** (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Research* **16**: 9878-9878
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M** (2002) Nonselective cation channels in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 67-107
- Demidchik V, Maathuis FJM** (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* **175**: 387-404
- Dennison KL, Robertson WR, Lewis BD, Hirsch RE, Sussman MR, Spalding EP** (2001) Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**: 1012-1019
- Dietrich P, Sanders D, Hedrich R** (2001) The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J Exp Bot* **52**: 1959-1967
- Dobermann A, Cassman KG, Mamaril CP, Sheehy JE** (1998) Management of phosphorus, potassium, and sulfur in intensive, irrigated lowland rice. *Field Crops Research* **56**: 113-138
- Dolan L, Davies J** (2004) Cell expansion in roots. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 33-39
- Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, Muller-Rober B, Palme K, Pongs O, Reintanz B, Hedrich R** (1997) Plant K<sup>+</sup> channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophys J* **72**: 2143-2150
- Dreyer I, Poree F, Schneider A, Mittelstadt J, Bertl A, Sentenac H, Thibaud JB, Mueller-Roeber B** (2004) Assembly of plant Shaker-like K(out) channels requires two distinct sites of the channel alpha-subunit. *Biophys J* **87**: 858-872

- Drinkwater LE, Snapp SS** (2007) Nutrients in agroecosystems: Rethinking the management paradigm. *Advances in Agronomy*, Vol 92 **92**: 163-+
- Duby G, Hosy E, Fizames C, Alcon C, Costa A, Sentenac H, Thibaud JB** (2008) AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K<sup>+</sup> channels. *Plant J* **53**: 115-123
- Dufour JP, Goffeau A, Tsong TY** (1982) Active proton uptake in lipid vesicles reconstituted with the purified yeast plasma membrane ATPase. Fluorescence quenching of 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine. *J Biol Chem* **257**: 9365-9371
- Edwards MC, Smith GN, Bowling DJF** (1988) Guard-Cells extrude protons prior to stomatal opening- A study using fluorescence microscopy and pH micro-electrodes. *Journal of Experimental Botany* **39**: 1541-1547
- Elmore MJ, Lamb AJ, Ritchie GY, Douglas RM, Munro A, Gajewska A, Booth IR** (1990) Activation of potassium efflux from *Escherichia coli* by glutathione metabolites. *Mol Microbiol* **4**: 405-412
- Epstein E** (1961) The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. *Plant Physiol* **36**: 437-444
- Epstein E** (1966) Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature* **212**: 1324-&
- Epstein E, Bloom A** (2005) Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. *In*, Ed Second. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, p 400
- Epstein E, Elzam OE, Rains DW** (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **49**: 684-&
- Ferguson GP** (1999) Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **7**: 242-247
- Ferguson GP, Booth IR** (1998) Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K<sup>+</sup>. *J Bacteriol* **180**: 4314-4318
- Ferguson GP, McLaggan D, Booth IR** (1995) Potassium channel activation by glutathione-S-conjugates in *Escherichia coli*: protection against methylglyoxal is mediated by cytoplasmic acidification. *Mol Microbiol* **17**: 1025-1033
- Ferguson GP, Munro AW, Douglas RM, McLaggan D, Booth IR** (1993) Activation of potassium channels during metabolite detoxification in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **9**: 1297-1303
- Ferguson GP, Nikolaev Y, McLaggan D, Maclean M, Booth IR** (1997) Survival during exposure to the electrophilic reagent N-ethylmaleimide in

- Escherichia coli: role of KefB and KefC potassium channels. *J Bacteriol* **179**: 1007-1012
- Flowers TJ** (2004) Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* **55**: 307-319
- Flowers TJ, Colmer TD** (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol* **179**: 945-963
- Froissard M, Belgareh-Touze N, Buisson N, Desimone M, Frommer WB, Haguenaue-Tsapis R** (2006) Heterologous expression of a plant uracil transporter in yeast: improvement of plasma membrane targeting in mutants of the Rsp5p ubiquitin protein ligase. *Biotechnol J* **1**: 308-320
- Fu HH, Luan S** (1998) AtKUP1: A dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 63-73
- Fujisawa M, Ito M, Krulwich TA** (2007) Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13289-13294
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y** (2004) Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant and Cell Physiology* **45**: 146-159
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR** (1988) Trk1 encodes a plasma-membrane protein required for High-Affinity Potassium-Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 2848-2859
- Galvez FJ** (2009) Caracterización de la familia de antiportadores LeNHX de tomate. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada
- Garciadeblas B, Benito B, Rodriguez-Navarro A** (2001) Plant cells express several stress calcium ATPases but apparently no sodium ATPase. *Plant and Soil* **235**: 181-192
- Garciadeblas B, Senn ME, Banuelos MA, Rodriguez-Navarro A** (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J* **34**: 788-801
- Gassman W, Rubio F, Schroeder JI** (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J* **10**: 869-852
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR** (1999) 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
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* **94**: 647-655
- Geiger D, Becker D, Vosloh D, Gambale F, Palme K, Rehers M, Anschuetz U, Dreyer I, Kudla J, Hedrich R** (2009) Heteromeric AtKC1/AKT1 channels in

- Arabidopsis roots facilitate growth under K<sup>+</sup>-limiting conditions. *J Biol Chem* **284**: 21288-21295
- Gierth M, Mäser P** (2007) Potassium transporters in plants - Involvement in K<sup>+</sup> acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* **581**: 2348-2356
- Gierth M, Mäser P, Schroeder JI** (2005) The potassium transporter AtHAK5 functions in K<sup>+</sup> deprivation-induced high-affinity K<sup>+</sup> uptake and AKT1 K<sup>+</sup> channel contribution to K<sup>+</sup> uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* **137**: 1105-1114
- Gietz RD, Woods RA** (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96
- Glass ADM, Dunlop J** (1978) Influence of potassium content on kinetics of potassium influx into excised Ryegrass and Barley roots. *Planta* **141**: 117-119
- Gobert A, Isayenkov S, Voelker C, Czempinski K, Maathuis FJ** (2007) The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10726-10731
- Gradmann D, Hoffstadt J** (1998) Electrocoupling of ion transporters in plants: interaction with internal ion concentrations. *J Membr Biol* **166**: 51-59
- Greenway H, Munns R** (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **31**: 149-190
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450
- Hall D, Evans AR, Newbury HJ, Pritchard J** (2006) Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in Arabidopsis. *J Exp Bot* **57**: 1201-1210
- Hanana M, Cagnac O, Yamaguchi T, Hamdi S, Ghorbel A, Blumwald E** (2007) A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening. *Plant Cell Physiol* **48**: 804-811
- Haro R, Banuelos MA, Quintero FJ, Rubio F, Rodriguez-Navarro A** (1993) Genetic-basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast - A model for plants. *Physiologia Plantarum* **89**: 868-874
- Haro R, Banuelos MA, Rodriguez-Navarro A** (2010) High-affinity sodium uptake in land plants. *Plant Cell Physiol* **51**: 68-79
- Haro R, Banuelos MA, Senn ME, Barrero-Gil J, Rodriguez-Navarro A** (2005) HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol* **139**: 1495-1506
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 463-499

- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR** (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**: 918-921
- Honsbein A, Sokolovski S, Grefen C, Campanoni P, Pratelli R, Paneque M, Chen Z, Johansson I, Blatt MR** (2009) A tripartite SNARE-K<sup>+</sup> channel complex mediates in channel-dependent K<sup>+</sup> nutrition in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2859-2877
- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI** (2007) Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *EMBO J* **26**: 3003-3014
- Horie T, Schroeder JI** (2004) Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol* **136**: 2457-2462
- Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A** (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. *Plant J* **27**: 129-138
- Hua BG, Mercier RW, Leng Q, Berkowitz GA** (2003) Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel. *Plant Physiol* **132**: 1353-1361
- Huang S, Spielmeier W, Lagudah ES, Munns R** (2008) Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na<sup>+</sup> transport, and salt tolerance. *J Exp Bot* **59**: 927-937
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, Felle HH, Hedrich R** (2001) K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Lett* **508**: 463-469
- Ivey DM, Guffanti AA, Zemsky J, Pinner E, Karpel R, Padan E, Schuldiner S, Krulwich TA** (1993) Cloning and characterization of a putative Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. *J Biol Chem* **268**: 11296-11303
- Jabnourne M, Espeout S, Mieulet D, Fizames C, Verdeil JL, Conejero G, Rodriguez-Navarro A, Sentenac H, Guiderdoni E, Abdelly C, Very AA** (2009) Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol* **150**: 1955-1971
- Kaiser CA, Chen EJ, Losko S** (2002) Subcellular fractionation of secretory organelles. *Methods Enzymol* **351**: 325-338
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P** (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* **10**: 103-105



- Kayser M, Isselstein J** (2005) Potassium cycling and losses in grassland systems: a review. *Grass and Forage Science* **60**: 213-224
- Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, Schroeder JI** (1998) AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* **10**: 51-62
- Ko CH, Gaber RF** (1991) Trk1 and Trk2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 4266-4273
- Kochian LV, Lucas WJ** (1982) Potassium Transport in Corn Roots : I. Resolution of Kinetics into a Saturable and Linear Component. *Plant Physiol* **70**: 1723-1731
- Kochian LV, Shaff JE, Lucas WJ** (1989) High Affinity K<sup>+</sup> Uptake in Maize Roots: A Lack of Coupling with H<sup>+</sup> Efflux. *Plant Physiol* **91**: 1202-1211
- Kochian LV, Xin-Zhi J, Lucas WJ** (1985) Potassium Transport in Corn Roots : IV. Characterization of the Linear Component. *Plant Physiol* **79**: 771-776
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2940-2945
- Kronzucker HJ, Szczerba MW, Moazami-Goudarzi M, Britto DT** (2006) The cytosolic Na<sup>+</sup> : K<sup>+</sup> ratio does not explain salinity-induced growth impairment in barley: a dual-tracer study using <sup>42</sup>K<sup>+</sup> and <sup>24</sup>Na<sup>+</sup>. *Plant Cell Environ* **29**: 2228-2237
- Lacombe B, Pilot G, Michard E, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud JB** (2000) A shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 837-851
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S, Grignon C** (1996) Tissue-specific expression of arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *Plant Journal* **9**: 195-203
- Lan WZ, Wang W, Wang SM, Li LG, Buchanan BB, Lin HX, Gao JP, Luan S** (2010) A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 7089-7094
- Latz A, Becker D, Hekman M, Muller T, Beyhl D, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR, Hedrich R** (2007) TPK1, a Ca<sup>2+</sup>-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K<sup>+</sup> channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* **52**: 449-459
- Laurie S, Feeney KA, Maathuis FJ, Heard PJ, Brown SJ, Leigh RA** (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J* **32**: 139-149
- Lebaudy A, Very AA, Sentenac H** (2007) K<sup>+</sup> channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett* **581**: 2357-2366

- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB, Luan S** (2007) A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15959-15964
- Leidi EO, Barragan V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, Fernandez JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ, Pardo JM** (2010) The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J* **61**: 495-506
- Leigh RA, Jones RGW** (1984) A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist* **97**: 1-13
- Leng Q, Mercier RW, Hua BG, Fromm H, Berkowitz GA** (2002) Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol* **128**: 400-410
- Li L, Kim BG, Cheong YH, Pandey GK, Luan S** (2006) A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12625-12630
- Li XY, Chanroj S, Wu ZY, Romanowsky SM, Harper JF, Sze H** (2008) A distinct endosomal Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> pump affects root growth through the secretory process. *Plant Physiology* **147**: 1675-1689
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF** (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**: 865-874
- Liu KH, Tsay YF** (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J* **22**: 1005-1013
- Lunde C, Drew DP, Jacobs AK, Tester M** (2007) Exclusion of Na<sup>+</sup> via sodium ATPase (PpENA1) ensures normal growth of *Physcomitrella patens* under moderate salt stress. *Plant Physiol* **144**: 1786-1796
- Maathuis F, Verlin D, Smith FA, Sanders D, Fernandez JA, Walker NA** (1996) The Physiological Relevance of Na<sup>+</sup>-Coupled K<sup>+</sup>-Transport. *Plant Physiol* **112**: 1609-1616
- Maathuis FJ** (2006) The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J Exp Bot* **57**: 1137-1147
- Maathuis FJ** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 250-258
- Maathuis FJ, Sanders D** (1994) Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9272-9276
- Maathuis FJ, Sanders D** (2001) Sodium uptake in Arabidopsis roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* **127**: 1617-1625

- Maathuis FJ, Sanders D, Gradmann D** (1997) Kinetics of high-affinity K<sup>+</sup> uptake in plants, derived from K<sup>+</sup>-induced changes in current-voltage relationships. A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta* **203**: 229-236
- Maathuis FJM, Amtmann A** (1999) K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: The basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Annals of Botany* **84**: 123-133
- Maathuis FJM, Sanders D** (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**: 302-307
- Maresova L, Sychrova H** (2005) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**: 588-600
- Maresova L, Sychrova H** (2006) *Arabidopsis thaliana* CHX17 gene complements the kha1 deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 1167-1171
- Marschner H** (1995) Functions of Mineral Nutrients: Macronutrients. *In* Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition). Academic Press, London, pp 229-312
- Marschner H** (1995) Long-Distance Transport in the Xylem and Phloem and Its Regulation. *In* Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition). Academic Press, London, pp 79-115
- Marten I, Hoth S, Deeken R, Ache P, Ketchum KA, Hoshi T, Hedrich R** (1999) AKT3, a phloem-localized K<sup>+</sup> channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7581-7586
- Martinez-Cordero MA, Martinez V, Rubio F** (2005) High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. *J Exp Bot* **56**: 1553-1562
- Maser P, Gierth M, Schroeder JI** (2002) Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* **247**: 43-54
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 1646-1667
- Masip L, Veeravalli K, Georgiou G** (2006) The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Signal* **8**: 753-762
- Meury J, Kepes A** (1982) Glutathione and the gated potassium channels of *Escherichia coli*. *EMBO J* **1**: 339-343
- Miller S, Douglas RM, Carter P, Booth IR** (1997) Mutations in the glutathione-gated KefC K<sup>+</sup> efflux system of *Escherichia coli* that cause constitutive activation. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 24942-24947

- Miller S, Ness LS, Wood CM, Fox BC, Booth IR** (2000) Identification of an ancillary protein, YabF, required for activity of the KefC glutathione-gated potassium efflux system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **182**: 6536-6540
- Moller IS, Gilliam M, Jha D, Mayo GM, Roy SJ, Coates JC, Haseloff J, Tester M** (2009) Shoot Na<sup>+</sup> exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2163-2178
- Moran N** (2007) Osmoregulation of leaf motor cells. *FEBS Lett* **581**: 2337-2347
- Morris J, Tian H, Park S, Sreevidya CS, Ward JM, Hirschi KD** (2008) AtCCX3 is an *Arabidopsis* endomembrane H<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiol* **148**: 1474-1486
- Moshelion M, Becker D, Czempinski K, Mueller-Roeber B, Attali B, Hedrich R, Moran N** (2002) Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ. *Plant Physiol* **128**: 634-642
- Mukherjee S, Kallay L, Brett CL, Rao R** (2006) Mutational analysis of the intramembranous H10 loop of yeast Nhx1 reveals a critical role in ion homeostasis and vesicle trafficking. *Biochemical Journal* **398**: 97-105
- Munns R** (1993) Physiological processes limiting plant-growth in saline soils - Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment* **16**: 15-24
- Munns R** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250
- Munns R** (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol* **167**: 645-663
- Munns R, Passioura JB, Guo J, Chazen O, Cramer GR** (2000) Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *J Exp Bot* **51**: 1495-1504
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-681
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-&
- Nelson BK, Cai X, Nebenfuehr A** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* **51**: 1126-1136
- Nieves-Cordones M, Aleman F, Martinez V, Rubio F** (2010) The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K<sup>+</sup> Transporter Is Required for Plant Growth and K<sup>+</sup> Acquisition from Low K<sup>+</sup> Solutions under Saline Conditions. *Mol Plant* **3**: 326-333
- Nieves-Cordones M, Miller AJ, Aleman F, Martinez V, Rubio F** (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of

the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol Biol* **68**: 521-532

- Ohnishi M, Fukada-Tanaka S, Hoshino A, Takada J, Inagaki Y, Iida S** (2005) Characterization of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene InNHX2 and comparison of InNHX2 with InNHX1, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol* **46**: 259-267
- Ohsumi Y, Anraku Y** (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **256**: 2079-2082
- Okorokov LA, Lichko LP, Kulaev IS** (1980) Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J Bacteriol* **144**: 661-665
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ** (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395
- Padmanaban S, Chanroj S, Kwak JM, Li X, Ward JM, Sze H** (2007) Participation of endomembrane cation/H<sup>+</sup> exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells. *Plant Physiol* **144**: 82-93
- Pal Y, Gilkes RJ, Wong MTF** (2001a) Soil factors affecting the availability of potassium to plants for Western Australian soils: a glasshouse study. *Australian Journal of Soil Research* **39**: 611-625
- Pal Y, Gilkes RJ, Wong MTF** (2001b) Mineralogy and potassium release from some Western Australian soils and their size fractions. *Australian Journal of Soil Research* **39**: 813-822
- Palmgren MG** (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 817-845
- Pandey GK, Cheong YH, Kim BG, Grant JJ, Li L, Luan S** (2007) CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Res* **17**: 411-421
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ** (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* **57**: 1181-1199
- Paroutis P, Touret N, Grinstein S** (2004) The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* **19**: 207-215
- Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Cherel I, Sentenac H** (2003) Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* **51**: 773-787

- Pittman JK, Cheng NH, Shigaki T, Kunta M, Hirschi KD** (2004) Functional dependence on calcineurin by variants of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchanger Vcx1p. *Mol Microbiol* **54**: 1104-1116
- Pittman JK, Edmond C, Sunderland PA, Bray CM** (2009) A cation-regulated and proton gradient-dependent cation transporter from *Chlamydomonas reinhardtii* has a role in calcium and sodium homeostasis. *J Biol Chem* **284**: 525-533
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES, Tester M** (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci* **11**: 372-374
- Poffenroth M, Green DB, Tallman G** (1992) Sugar Concentrations in Guard Cells of *Vicia faba* Illuminated with Red or Blue Light : Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol* **98**: 1460-1471
- Pouliquin P, Grouzis J, Gibrat R** (1999) Electrophysiological study with oxonol VI of passive  $\text{NO}_3^-$  transport by isolated plant root plasma membrane. *Biophys J* **76**: 360-373
- Qi Z, Spalding EP** (2004) Protection of plasma membrane  $\text{K}^+$  transport by the salt overly sensitive1  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter during salinity stress. *Plant Physiol* **136**: 2548-2555
- Quintero FJ, Blatt MR** (1997) A new family of  $\text{K}^+$  transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Letters* **415**: 206-211
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM** (2000) Functional conservation between yeast and plant endosomal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters. *FEBS Lett* **471**: 224-228
- Radchenko MV, Tanaka K, Waditee R, Oshimi S, Matsuzaki Y, Fukuhara M, Kobayashi H, Takabe T, Nakamura T** (2006) Potassium/proton antiport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 19822-19829
- Rains DW, Epstein E** (1965) Transport of Sodium in Plant Tissue. *Science* **148**: 1611
- Rains DW, Epstein E** (1967) Sodium Absorption by Barley Roots: Its Mediation by Mechanism 2 of Alkali Cation Transport. *Plant Physiol* **42**: 319-323
- Ramos J, Haro R, Rodrigueznavarro A** (1990) Regulation of Potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1029**: 211-217
- Reckmann U, Scheibe R, Raschke K** (1990) Rubisco Activity in Guard Cells Compared with the Solute Requirement for Stomatal Opening. *Plant Physiol* **92**: 246-253
- Reintanz B, Szyroki A, Ivashikina N, Ache P, Godde M, Becker D, Palme K, Hedrich R** (2002) AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha -

subunit modulates root hair K<sup>+</sup> influx. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 4079-4084

**Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX** (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nat Genet **37**: 1141-1146

**Rengel Z, Damon PM** (2008) Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. Physiologia Plantarum **133**: 624-636

**Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB** (1995) NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. FEBS Lett **370**: 264-268

**Rodriguez-Navarro A, Ramos J** (1984) Dual system for potassium transport in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol **159**: 940-945

**Rodriguez-Navarro A, Rubio F** (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. J Exp Bot **57**: 1149-1160

**Rodriguez-Rosales MP, Galvez FJ, Huertas R, Aranda MN, Baghour M, Cagnac O, Venema K** (2009) Plant NHX cation/proton antiporters. Plant Signal Behav **4**: 265-276

**Rodriguez-Rosales MP, Jiang X, Galvez FJ, Aranda MN, Cubero B, Venema K** (2008) Overexpression of the tomato K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytol **179**: 366-377

**Roosild TP, Castronovo S, Miller S, Li C, Rasmussen T, Bartlett W, Gunasekera B, Choe S, Booth IR** (2009) KTN (RCK) Domains Regulate K<sup>+</sup> Channels and Transporters by Controlling the Dimer-Hinge Conformation. Structure **17**: 893-903

**Roosild TP, Miller S, Booth IR, Choe S** (2002) A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. Cell **109**: 781-791

**Rossignol M, Thomas P, Grignon C** (1982) Proton permeability of liposomes from natural phospholipid mixtures. Biochim Biophys Acta **684**: 195-199

**Rubio F, Aleman F, Nieves-Cordones M, Martinez V** (2010) Studies on Arabidopsis atak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K uptake. Physiol Plant

**Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI** (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science **270**: 1660-1663

**Rubio F, Santa-Maria GE, Rodriguez-Navarro A** (2000) Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. Physiologia Plantarum **109**: 34-43

- Rubio F, Schwarz M, Gassmann W, Schroeder JI** (1999) Genetic selection of mutations in the high affinity K<sup>+</sup> transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na<sup>+</sup> permeability and increased Na<sup>+</sup> tolerance. *J Biol Chem* **274**: 6839-6847
- Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM** (2004) AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiol* **136**: 2500-2511
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM** (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14150-14155
- Rus AM, Bressan RA, Hasegawa PM** (2005) Unraveling salt tolerance in crops. *Nat Genet* **37**: 1029-1030
- Saier MH, Jr., Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, Jack DL, Lai EC, Liu HJ, Nusinew DP, Omar AM, Pao SS, Paulsen IT, Quan JA, Sliwinski M, Tseng TT, Wachi S, Young GB** (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 1-56
- Saint-Jore-Dupas C, Nebenfuhr A, Boulaflois A, Follet-Gueye ML, Plasson C, Hawes C, Driouich A, Faye L, Gomord V** (2006) Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell* **18**: 3182-3200
- Saint-Jore CM, Evins J, Batoko H, Brandizzi F, Moore I, Hawes C** (2002) Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant J* **29**: 661-678
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York
- Santa-María GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodriguez-Navarro A** (1997) The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* **9**: 2281-2289
- Satter RL, Morse MJ, Lee YS, Crain RC, Cote GG, Moran N** (1988) Light-controlled and clocks-controlled leaflet movements in samanea-saman-A physiological, biophysical and biochemical-analysis. *Botanica Acta* **101**: 205-213
- Schachtman DP, Schroeder JI** (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655-658



- Schachtman DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF** (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258**: 1654-1658
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**: 663-665
- Serrano R, Rodríguez-Navarro A** (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 399-404
- Shabala S, Cuin TA** (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 651-669
- Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, Davies JM, Newman IA** (2006) Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ameliorates NaCl-induced  $\text{K}^{+}$  loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane  $\text{K}^{+}$  - permeable channels. *Plant Physiol* **141**: 1653-1665
- Sheen J** (2001) Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* **127**: 1466-1475
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK** (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6896-6901
- Shi HZ, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK** (2003) Overexpression of a plasma membrane  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nature Biotechnology* **21**: 81-85
- Shin H, Shin HS, Dewbre GR, Harrison MJ** (2004) Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* **39**: 629-642
- Shin R, Schachtman DP** (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8827-8832
- Sikorski RS, Hieter P** (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27
- Silberbush M, Ben-Asher J** (2001) Simulation study of nutrient uptake by plants from soilless cultures as affected by salinity buildup and transpiration. *Plant and Soil* **233**: 59-69
- Song CP, Guo Y, Qiu Q, Lambert G, Galbraith DW, Jagendorf A, Zhu JK** (2004) A probable  $\text{Na}^{+}(\text{K}^{+})/\text{H}^{+}$  exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10211-10216
- Spalding EP, Hirsch RE, Lewis DR, Qi Z, Sussman MR, Lewis BD** (1999) Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel

- activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J Gen Physiol* **113**: 909-918
- Steingrobe B, Claassen N** (2000) Potassium Dynamics in the Rhizosphere and K Efficiency of Crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **163**: 101-106
- Su H, Gollmack D, Katsuhara M, Zhao C, Bohnert HJ** (2001) Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant Physiol* **125**: 604-614
- Su H, Gollmack D, Zhao C, Bohnert HJ** (2002) The expression of HAK-type K<sup>+</sup> transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol* **129**: 1482-1493
- Suelter CH** (1970) Enzymes activated by monovalent cations. *Science* **168**: 789-795
- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan WY, Leung HY, Hattori K, Konomi M, Osumi M, Yamagami M, Schroeder JI, Uozumi N** (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* **44**: 928-938
- Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M, Blatt MR** (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K<sup>+</sup> channel at the plasma membrane. *Plant Cell* **18**: 935-954
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ** (2006) The face value of ion fluxes: the challenge of determining influx in the low-affinity transport range. *J Exp Bot* **57**: 3293-3300
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ** (2009) K<sup>+</sup> transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology* **166**: 447-466
- Sze H, Padmanaban S, Cellier F, Honys D, Cheng NH, Bock KW, Conejero G, Li X, Twell D, Ward JM, Hirschi KD** (2004) Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiol* **136**: 2532-2547
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2917-2921
- Takahashi R, Nishio T, Ichizen N, Takano T** (2007) Cloning and functional analysis of the K<sup>+</sup> transporter, PhaHAK2, from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. *Biotechnol Lett* **29**: 501-506
- Talke IN, Blaudez D, Maathuis FJ, Sanders D** (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci* **8**: 286-293
- Tallman G, Zeiger E** (1988) Light Quality and Osmoregulation in Vicia Guard Cells : Evidence for Involvement of Three Metabolic Pathways. *Plant Physiol* **88**: 887-895

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599
- Tester M, Blatt MR** (1989) Direct Measurement of K Channels in Thylakoid Membranes by Incorporation of Vesicles into Planar Lipid Bilayers. *Plant Physiol* **91**: 249-252
- Tester M, Davenport R** (2003) Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann Bot* **91**: 503-527
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) 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
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
- Tuteja N** (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol* **428**: 419-438
- Ueda T, Uemura T, Sato MH, Nakano A** (2004) Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *Plant J* **40**: 783-789
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH** (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* **29**: 49-65
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI** (2000) The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in xenopus laevis oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in Saccharomyces cerevisiae. *Plant Physiol* **122**: 1249-1259
- Vallejo AJ, Peralta ML, Santa-María GE** (2005) Expression of potassium-transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal root axis. *Plant Cell and Environment* **28**: 850-862
- Venema K, Belver A, Marin-Manzano MC, Rodriguez-Rosales MP, Donaire JP** (2003) A novel intracellular K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter related to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters is important for K<sup>+</sup> ion homeostasis in plants. *J Biol Chem* **278**: 22453-22459
- Venema K, Gibrat R, Grouzis JP, Grignon C** (1993) Quantitative measurement of cationic fluxes, selectivity and membrane potential using liposomes multilabelled with fluorescent probes. *Biochim Biophys Acta* **1146**: 87-96
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP** (2002) The arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem* **277**: 2413-2418
- Very AA, Sentenac H** (2002) Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends Plant Sci* **7**: 168-175

- Very AA, Sentenac H** (2003) Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 575-603
- Villalba JM, Palmgren MG, Berberian GE, Ferguson C, Serrano R** (1992) Functional expression of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**: 12341-12349
- Wachter RM, Remington SJ** (1999) Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr Biol* **9**: R628-629
- Walker DJ, Leigh RA, Miller AJ** (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10510-10514
- Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R** (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419
- Wang W, Malcolm BA** (2002) Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol* **182**: 37-43
- Wang Y, Wu WH** (2010) Plant sensing and signaling in response to K<sup>+</sup>-deficiency. *Mol Plant* **3**: 280-287
- Wang YH, Garvin DF, Kochian LV** (2002) Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol* **130**: 1361-1370
- Ward JM, Maser P, Schroeder JI** (2009) Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annual Review of Physiology* **71**: 59-82
- Ward JM, Schroeder JI** (1994) Calcium-Activated K<sup>+</sup> Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure. *Plant Cell* **6**: 669-683
- Wee EG, Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P** (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* **10**: 1759-1768
- Xicluna J, Lacombe B, Dreyer I, Alcon C, Jeanguenin L, Sentenac H, Thibaud JB, Chereil I** (2007) Increased functional diversity of plant K<sup>+</sup> channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *J Biol Chem* **282**: 486-494
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH** (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**: 1347-1360
- Yamaguchi T, Apse MP, Shi H, Blumwald E** (2003) Topological analysis of a plant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12510-12515

- Yang XE, Liu JX, Wang WM, Ye ZQ, Luo AC** (2004) Potassium internal use efficiency relative to growth vigor, potassium distribution, and carbohydrate allocation in rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition* **27**: 837-852
- Yeo AR, Lee KS, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ** (1991) Short-Term and Long-Term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L). *Journal of Experimental Botany* **42**: 881-889
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM** (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant Journal* **30**: 529-539
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J** (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* **2**: 1565-1572
- Zhang HX, Blumwald E** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* **19**: 765-768
- Zhao DL, Oosterhuis DM, Bednarz CW** (2001) Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* **39**: 103-109
- Zhao J, Connorton JM, Guo Y, Li X, Shigaki T, Hirschi KD, Pittman JK** (2009) Functional studies of split *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Biol Chem* **284**: 34075-34083
- Zhao J, Cheng NH, Motes CM, Blancaflor EB, Moore M, Gonzales N, Padmanaban S, Sze H, Ward JM, Hirschi KD** (2008) AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiology* **148**: 796-807
- Zhao J, Shigaki T, Mei H, Guo YQ, Cheng NH, Hirschi KD** (2009) Interaction between *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers CAX1 and CAX3. *J Biol Chem* **284**: 4605-4615
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-273
- Zhu JK** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 441-445
- Zhu JK, Liu J, Xiong L** (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181-1191
- Zimmermann S, Sentenac H** (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 477-482
- Zuckerandl E, Pauling L** (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In V Bryson, HJ Vogel, eds, *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, pp 97-165

