

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



**Biología molecular de la regulación
de la homeostasis de pH en
*Arabidopsis thaliana***

Tesis Doctoral presentada por:

Regina Niños Rodenes

Directores:

Ramón Serrano Salom

Santiago Alejandro Martínez

Valencia, Julio 2011



D. **Ramón Serrano Salom**, Doctor Ingeniero Agrónomo y Catedrático del departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, y D. **Santiago Alejandro Martínez**, Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN:

Que Dña. **Regina Niñoles Rodenes**, Ingeniera Agrónoma por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de tesis doctoral que lleva por título: “*Biología molecular de la regulación de la homeostasis de pH en Arabidopsis thaliana*”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo, para optar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste, firman el presente certificado en Valencia, Julio 2011.

Dr. Ramón Serrano Salom

Dr. Santiago Alejandro Martínez

Agradecimientos:

Tras más de 5 años en el laboratorio, ya ha llegado el momento de redactar mi tesis doctoral, y con ello se me ofrece la oportunidad de echar la vista atrás, y recordar, y agradecer a todos los que me han acompañado en algún momento del camino.

Empiezo con mi familia, aunque suele dejarse para el final, porque nunca puedo olvidar la suerte que tengo de tener unos padres como los “que me han tocado”. Su amor hacia sus hijas es incondicional. Mi padre es la bondad en persona, y en mi madre me veo reflejada, cada día más. También tengo la suerte de tener una hermana a la que admiro. Laura siempre ha evitado que me sintiera sola. De pequeña jugaba con paciencia conmigo, y ahora somos grandes amigas. Mi familia no acaba ahí, somos muchos y estamos muy unidos: mis tíos y mis primos son, de verdad, estupendos. Quiero mandar un beso especial a mi abuela Consuelo, y otro a mi abuela Esther, que ya está en el cielo.

Como sabe todo el que me conoce, mi marido ha sido y es el amor de mi vida. Él está hecho de otra pasta, así que nunca se hubiera puesto guantes y bata, pero también sabe de qué pasta estoy hecha yo, y siempre me ha impulsado a seguir mis sueños. Gracias Jeremy, porque es cierto que entre dos las alegrías son dobles y las penas se reducen a la mitad.

Cuando yo me casé mi familia se amplió, por lo que quiero agradecer a toda la familia de Jeremy, y especialmente a sus padres (Jack y Christiane) y a su hermana Jessica, su cariño. Ellos, tal vez sin llegar a entender cuál era mi camino, siempre han tenido una sonrisa de aprobación cuando les explicaba “lo que hacía”.

Y ya llega el momento de la gran familia que ha sido este laboratorio. De nuevo he sido afortunada, porque he hecho la tesis en un lugar donde uno se siente como en casa, donde la gente con la que compartes el día a día, es también tu gente. Y gran parte del mérito de ese ambiente lo tienen Ramón y Mariche, “los cabeza de familia”. A nivel científico no hace falta hablar de la calidad de este grupo, y a nivel personal, quienes conozcan a Ramón y Mariche sabrán que, con ellos al frente, el laboratorio no podría ser de otra forma.

Ramón y Mariche son hospitalarios con todos, siempre tienen los brazos abiertos para recibir a quien venga al laboratorio. Les recuerdo haciendo de anfitriones, organizando comidas, cenas y reuniones (muchas veces en su casa, donde no sé cuántos nos hemos llegado a juntar... ¡y siempre sobra comida!). Tengo que daros las gracias primero que nada porque es un honor haber estado en el laboratorio con vosotros. A Ramón le admiro no sólo a nivel científico, sino también a nivel personal, especialmente por su disponibilidad y humildad. Pienso que hay que ser muy buen científico, muy buen profesor, y muy buena persona, para encontrar huecos para escuchar y responder siempre, por muy ocupado que estés, a cualquier alumno, becario, doctorando, post-doc, investigador, profesor, o director, de manera indistinta y con una sonrisa en los labios. A Mariche, que es todo amabilidad y dulzura, también quiero agradecerle sus palabras positivas y de ánimo, y su capacidad para organizar y controlar todo lo que pasa en el laboratorio.

En el laboratorio mis hermanos mayores fueron Santi y Edu. Ellos estaban cuando empecé, y eran el referente a seguir. Santiago ha sido codirector de esta tesis doctoral, y fue mi tutor durante mi TFC. A pesar de ello, hemos llegado a ser buenos amigos. Quiero agradecerle su ayuda en mis inicios, y las conversaciones, científicas o no, pero siempre interesantes, que hemos mantenido. A Edu, prometedor jugador de voley-playa, le admiro por la alegría y el positivismo que irradia allá donde va.

Gaetano ha sido mi compañero de batallas, empezó su tesis poco después que yo y acabaremos juntos. Los dos hemos luchado en el mismo frente y nos hemos cubierto las espaldas, cuando ha sido necesario. Quiero darle las gracias porque me ha demostrado que tiene un gran corazón. Lola es una persona inagotable, que ha respondido a mil y una de mis preguntas. Recordaré siempre con cariño el tiempo en que trabajamos juntas con el cultivo hidropónico y purificando la H⁺ ATPasa, gracias a eso nos conocimos y nos acercamos más.

Durante estos años, he tenido la oportunidad de dirigir el TFC de varios alumnos, y a todos ellos les tengo un cariño muy especial. Samuela fue la primera, y era y es, la alegría de la huerta. La recuerdo “bailando bajo la lluvia”. A Amelia, a quien yo llamaba “The hort’s alegry”, pronto volverá a estar “entre nosotros”. Alicia estuvo conmigo en un par de ocasiones, en las que intenté no dejar ninguna incógnita sin resolver...lo cual era realmente complicado. Gracias a nuestras largas conversaciones, hemos llegado a conocernos y a construir una sincera amistad. Quiero darle las gracias por creer en mí. Marcos, calladito, calladito, hace su trabajo y lo hace bien. A ver si ahora que ha empezado la tesis, empieza a venir un poco más a las fiestas y celebraciones (pero es que su pueblo “le tira” mucho...).

Aunque no han trabajado conmigo, este año hemos tenido otros compañeros de laboratorio haciendo TFC o prácticas: Pepe, Fede, Fernando y Laura. Todos ayudan a crear el buen ambiente que se respira en el laboratorio, por lo que también me encanta haberles conocido. Pepe fue mi primer

“nieto”, Fede me hacía cantar villancicos, Fernando nos ha hecho sonreír, y con Laura he compartido mi cole, aunque las dos hemos salido bastante bien paradas.

Enric demostró su hombría trabajando en un barco. Tal vez, todos debiéramos tener esa experiencia antes de “luchar contra viento y marea” (es decir, antes de hacer la tesis doctoral) ya que, sin duda, a él le está funcionando muy bien. Aunque parece que fue ayer, hace ya dos años que Enric está haciendo la tesis. Ese tiempo compartiendo bancada, con crisis y quebrantos, nos ha servido para conocernos bastante bien, lo que, por mi parte, ha sido un placer. (A día de hoy, aún me quedan dos comodines).

Las “nuevas generaciones” llegan pisando fuerte. A Félix nos costó un poco ficharle, aunque ahora parece poco en comparación con los papeleos de Gaetano. Además de hacer sus experimentos y el máster, Félix nos representa en la Junta, y no sabemos hasta donde llegará su carrera política. Jesús ha llegado, ha sido padre, lo ha comprado todo (hasta un par de “esclavas”), y siempre que puede, te ayuda. Así se ha hecho con el cariño de todos nosotros. Lo dicho, buenos fichajes.

Hubo un tiempo en que compartíamos laboratorio con Pedro Rodríguez y con Lynne, y posteriormente, con JM. Por eso, quiero darles las gracias a los tres, por su disponibilidad cuando he ido a hacerles alguna consulta, a pedir algún reactivo, o la propia máquina de PCR. Igualmente quiero agradecer a las personas que trabajan con ellos su amabilidad, especialmente a Lesia, que me ayudó a introducirme en el mundo de los protoplastos, y a Ana Cristina, que siempre que me la cruzo me saca una sonrisa. Con el resto de nuestros “vecinos” también hemos tenido siempre mucho contacto, especialmente con el laboratorio de Markus, Payo, Joserra y Pepe Gadea. Ellos también han estado siempre dispuestos a resolver cuestiones científicas con una sonrisa. Por eso, todas las personas que trabajan o trabajaron en estos laboratorios se merecen un gran GRACIAS. Aunque no los nombre uno por uno a todos, me quedo con los más veteranos: Guillem, Fernando, Julia y Miguel.

Y claro, con este clima, es normal que el laboratorio siempre esté lleno de gente. Las personas vienen y van, pero nuestro laboratorio siempre sigue lleno, aunque lo más curioso y destacable, es que siempre hay sitio para acoger a uno más. Sería infinito hablar de todas las personas que he conocido en este tiempo, por eso doy las gracias simplemente a todos ellos: Frank, Nacho, Balta, Huw, Vanesa, Ángela, Silvia, Stephanie, Mauricio, Jessica, Jorge, Mar, Américo, Silke, Andrea, Rosa, Rosi, Carol, Sandra, Víctor, Gema, David, Sukesh, Carlos (a quien se le ha conocido y se le conoce con el sobrenombre de “el alumno”, aunque ahora para mi es más bien “el okupa”)...y a los que me dejo.

No quiero olvidarme de agradecer a las personas que trabajan, o trabajaban, en los servicios de genómica (M^a Ángeles), bioinformática (Javier Forment), microscopía (Marisol), y secuenciación (Eugenio y Ana) del IBMCP, su participación en esta tesis. También quiero agradecer a M^a Jesús y Fanny del ITQ su ayuda en la medida de cationes, y a los miembros del laboratorio de J.A.Fernández, de la Universidad de Málaga, su colaboración realizando las medidas de electrofisiología.

También he de agradecer su aportación a los responsables de los diferentes laboratorios que me han suministrado semillas o contrucciones para realizar ensayos: Pedro Rodríguez, J.Manuel Pardo, E. Neuhaus, Karin Schumacher y Frans Maathuis.

Por último recordar a todos mis amigos: a la gente de mi cole, especialmente a Laura, Lorena, Eva y María, porque nuestras reuniones son únicas; a los del Mareny que formamos un grupo estupendo, somos muchos y buenos amigos; a los que conocí en agrónomos como Adriana, Alicia, Amaya, Bea, Carlos (de nuevo), Carmen, Enrique, Esther, Marta C., Marta A., Pepe, Sofía, Sonia, con los que no sólo hemos compartido apuntes y exámenes, sino también fiestas varias. A todos ellos les agradezco que siempre me hayan animado a seguir, y hayan confiado en mí, sobre todo este último año, en el que he estado un poco ausente. Bea, gracias.

Esta tesis ha sido financiada mayoritariamente con una beca JAE-CSIC.

Resumen:

En la presente tesis doctoral, se han empleado dos aproximaciones complementarias para abordar las bases moleculares de la homeostasis de pH en *A. thaliana*. Por un lado, se ha realizado un rastreo genético empleando ácido acético, en busca de mutantes tolerantes a la acidificación intracelular, y por otro, se ha estudiado la respuesta transcripcional al estrés por ácido acético en *Arabidopsis thaliana*.

El rastreo genético de una colección de mutantes “*activation tagging*”, ha permitido aislar el mutante *wat1-ID* (“*weak acid tolerant1*”-alelo1, Dominante), por ser más tolerante a la germinación y apertura de cotiledones en presencia de ácido acético. *wat1-ID*, es un mutante dominante negativo, cuya mutación se localiza en el locus At3g55480, que codifica para la adaptina $\beta 3$ de *A. thaliana*. Esta proteína está implicada en el transporte de proteínas al tonoplasto, y su pérdida de función puede provocar defectos en la localización de transportadores vacuolares. En ensayos de aparición de cotiledones, el mutante *wat1-ID* es más tolerante a ácidos débiles, ABA y estrés osmótico (NaCl, manitol), pero es más sensible a cationes tóxicos (Li^+ y norespermidina). En estadios posteriores, el mutante es capaz de mantener un pH más alcalino durante un tratamiento de perfusión con ácido acético. El análisis de los distintos mecanismos de regulación de la homeostasis de pH, ha indicado que el mutante expulsa una mayor cantidad de protones al medio, en condiciones de estrés por ácido acético, cosa que no ocurre en condiciones normales. La salida de H^+ no causa una hiperpolarización de la membrana del mutante, debido a que la toma de Rb^+ (análogo del K^+), se ve incrementada en estas condiciones. La mayor sensibilidad a LiCl y la tolerancia a NaCl observada en la apertura de los cotiledones, se mantiene en plantas adultas regadas con estos cationes tóxicos. El mutante *wat1-ID*, no muestra diferencias en la toma de Na^+ , Li^+ o Rb^+ (K^+) a tiempos cortos. Sin embargo, acumula más K^+ , en raíz y parte aérea, y menos Na^+ y Li^+ , en la raíz, tras 2 días de tratamiento.

A partir de estos resultados se propone un modelo por el cual, la mutación en la adaptina $\beta 3$, provocaría que un transportador de salida de potasio vacuolar se deslocalizara parcialmente a membrana plasmática. La falta del transportador en vacuola, dificultaría la salida de potasio, provocando una hiperpolarización del tonoplasto que reduciría la entrada de Li^+ . La menor toma de litio por la vacuola haría que su acumulación global fuera menor, pero se localizaría en el citoplasma, donde resulta más tóxico. Por otra parte, la hiperpolarización disminuiría la entrada de protones por la H^+ ATPasa vacuolar, lo que afectaría de forma indirecta a los antiportadores NHX, disminuyendo también la entrada de sodio en vacuola. Por último, en condiciones de estrés por ácido acético, el transportador de K^+ (ahora localizado en la membrana plasmática), se activaría, incrementando, de este modo, la toma de potasio. Esta entrada de potasio despolarizaría la membrana plasmática, favoreciendo la salida de protones que se observa en el mutante en estas condiciones.

El análisis transcripcional realizado en el presente trabajo, muestra que un tratamiento con ácido acético induce diversos genes implicados en respuestas a estreses abióticos, como calor, luz intensa y estrés oxidativo. La comparación de los genes inducidos por estos estreses, con los inducidos por ácido acético, indica que el estrés más semejante es el estrés por calor. De hecho, entre los genes con mayor nivel de inducción se encuentran varios HSF (“*Heat Shock Factors*”) y HSP (“*Heat Shock Proteins*”). Este resultado sugiere que el estrés por ácido acético causa desnaturalización de proteínas. Por otro lado, muchos simportadores de toma de nutrientes (P, S) se inducen por el tratamiento con ácido acético, lo que probablemente refleja que la acidificación intracelular dificulta la entrada de nutrientes mediante simporte con protones.

Resum:

En la present tesis doctoral s'han empleat dos aproximacions complementàries per a abordar les bases moleculars de l'homeòstasi de pH en *Arabidopsis thaliana*. Per un costat, s'ha realitzat un rastreig genètic utilitzant àcid acètic per a trobar mutants tolerants a l'acidificació intracel·lular, i per l'altre, s'ha estudiat la resposta transcripcional a l'estrès per àcid acètic en *A. thaliana*.

El rastreig genètic d'una col·lecció de mutants “*activation tagging*”, ha permès aïllar el mutant *wat1-ID*, per ser més tolerant a la germinació i obertura de cotiledons en presència d'àcid acètic. *wat1-ID* és un mutant dominant negatiu, aquesta mutació es localitza al locus At3g55480, que codifica l'adaptina $\beta 3$ de *A. thaliana*. Esta proteïna està implicada en el transport de proteïnes al tonoplast, i la seua pèrdua de funció pot provocar defectes en la localització de transportadors vacuolars. En experiments d'aparició de cotiledons, el mutant *wat1-ID* és més tolerant a àcids dèbils, ABA, i estrès osmòtic (NaCl, manitol), però és més sensible a cations tòxics (liti i norespermidina). En estadis posteriors, el mutant manté un pH més alt durant un tractament de perfusió amb àcid acètic. L'anàlisi dels distints mecanismes de regulació de l'homeòstasi de pH, ha indicat que el mutant expulsa una major quantitat de protons al medi, en condicions d'estrès per àcid acètic, cosa que no ocorre en condicions normals. L'eixida de protons no causa una hiperpolarització de la membrana del mutant, perquè la presa de rubidi (anàleg del potassi) s'incrementa en estes condicions. La major sensibilitat a LiCl i la tolerància a NaCl observada en l'obertura dels cotiledons, es manté en plantes adultes regades amb estos cations tòxics. El mutant *wat1-ID*, no mostra diferències en la presa de Na^+ , Li^+ o Rb^+ (K^+) a temps curts. No obstant això, acumula més K^+ a l'arrel i la part aèria, i menys Na^+ i Li^+ a l'arrel, després de dos dies de tractament.

A partir d'aquests resultats es proposa un model per el qual la mutació en la adaptina $\beta 3$, provocaria que un transportador de eixida de K^+ vacuolar es deslocalitzara parcialment a la membrana plasmàtica. La falta del transportador a la vacuola, dificultaria l'eixida de potassi, provocant una hiperpolarització del tonoplast que reduiria l'entrada de Li^+ . La menor presa de liti per la vacuola faria que la seua acumulació global fora menor, però es localitzaria en el citosol, on és més tòxic. Per altra banda, l'hiperpolarització disminuiria l'entrada de protons per la H^+ -ATPasa vacuolar, el que afectaria de forma indirecta als antiportadors NHX, disminuint també l'entrada de Na^+ a la vacuola. Per últim, en condicions d'estrès per àcid acètic el transportador de potassi (ara localitzat a la membrana plasmàtica) s'activaria, incrementant així la presa de K^+ . Esta entrada de potassi despolaritzaria la membrana plasmàtica, afavorint l'eixida de protons que s'observa en el mutant en estes condicions.

L'anàlisi transcripcional realitzat en el present treball, mostra que un tractament amb àcid acètic indueix diversos gens implicats en respostes a estressos abiòtics com calor, llum intensa, i estrès oxidatiu. La comparació del gens induïts per estos estressos amb els induïts per àcid acètic indica que l'estrès més semblant és l'estrès per calor. En efecte, entre els gens amb major nivell d'inducció, es troben alguns HSF (“*Heat Shock Factors*”) i HSP (“*Heat Shock Proteins*”). Aquest resultat suggereix que l'estrès per àcid acètic causa desnaturalització de proteïnes. Per altra banda, molts simportadors de presa de nutrients (P,S) s'indueixen pel tractament amb àcid acètic, el que probablement reflectix que l'acidificació intracel·lular dificulta l'entrada de nutrients mitjançant el simport amb protons.

Abstract:

In this doctoral thesis we have used two complementary approaches to study the molecular basis of *A. thaliana* pH homeostasis. On the one hand, we have performed a genetic screening using acetic acid to look for intracellular acidification tolerant mutants. On the other hand, we have studied acetic acid transcriptional response in *Arabidopsis thaliana*.

The genetic screening of an activation tagging mutant seed collection has led to the isolation of the mutant *wat1-ID* ("weak acid tolerant1-allele1 dominant), which is able to germinate and establish its seedlings faster than the wild type in the presence of acetic acid. *Wat1-ID* is a negative dominant mutant, whose mutation is localized in the At3g55480 locus that codifies for a $\beta 3$ adaptin. This protein is involved in protein transport to the tonoplast, and its loss of function can cause vacuolar transporters mislocalization. Cotyledon emergence experiments showed that *wat1-ID* mutant is more tolerant to weak acids, ABA and osmotic stress (NaCl, mannitol), but it's more sensitive to toxic cations such as lithium and norspermidine. In later stages, the mutant is able to maintain a higher pH during an acetic acid perfusion experiment. The analysis of the different mechanisms of pH homeostasis regulation indicated that in the presence of acetic acid, the mutant extrudes more protons to the extracellular media than the wild type, but this doesn't happen in normal conditions. This proton extrusion doesn't induce plasma membrane hyperpolarization, because in the presence of acetic acid, the mutant shows enhanced rubidium uptake (potassium analogous). The lithium sensitivity and the sodium tolerance observed during the first physiological stages, is maintained in adult plants irrigated with these toxic cations. Sodium, lithium and rubidium uptake (short-time treatments) are similar in the wild type and the *wat1-ID* mutant. However, after a two day treatment, the mutant accumulates more potassium in roots and shoots, and less sodium and lithium in the roots.

Based in these results, we postulate a model in which the mutation in the $\beta 3$ adaptin would cause a partial mislocalization of a vacuolar potassium transporter to the plasma membrane. The lack of this transporter in the vacuole, would impair potassium exit, causing tonoplast hyperpolarization that would reduce lithium entry into the vacuole. This decrease in vacuolar lithium uptake would reduce the global lithium accumulation, but it would accumulate in the cytosol where it's more toxic. Furthermore, the tonoplast hyperpolarization would reduce vacuolar H^+ -ATPase activity, and this would indirectly affect NHX antiporters, reducing also sodium entry into the vacuole. Finally, under acetic acid stress, the potassium transporter (now localized in the plasma membrane), would become more active, increasing potassium uptake. This would depolarize the plasma membrane, and would favour the proton extrusion observed in the mutant under these conditions.

The transcriptional analysis that has been done in this doctoral thesis shows that acetic acid treatment induces several genes involved in abiotic stress (heat, high light, oxidative stress) responses. The comparison between the genes induced by these stresses and those induced by acetic acid, shows that heat stress is the most similar to acetic acid stress. In fact, there are several HSF (Heat Shock Factors) and HSP (Heat Shock Proteins) among the most induced genes. This result suggests that acetic acid stress causes protein denaturation. Furthermore, many nutrient uptake symporters (P, S) are induced in the presence of acetic acid. This probably indicates that intracellular acidification impairs nutrient uptake through proton symporters.

Siglas y abreviaturas:

- a2a3:** Se refiere al doble mutante *vha-a2 vha-a3*
- AAO:** “*Ab*scisic *Al*dehyde *O*xidase” (Abscisico aldehido oxidasa)
- aa-RNA:** “*A*minoallyl-*R*NA” (aminoalil-RNA)
- ABA:** “*AB*scisic *A*cid” (Ácido Abscisico)
- aba:** “*Ab*scisic *a*cid *d*eficient” (Deficiente en ABA)
- ABC:** “*ATP* *B*inding *C*assette” (Cassette de unión a ATP)
- ABI:** “*ABA* *I*nsensitive” (Insensible a Abscisico)
- ABRC :** “*A*rabidopsis *B*iological *R*esource *C*entre” (Centro de recursos biológicos de *Arabidopsis*)
- ACC:** Ácido 1-*A*mino*C*iclopropano 1-*C*arboxílico
- AcNa:** *A*cetato de *Na*⁺
- ADP:** “*A*denosine *D*i*P*hosphate” (Adenosina difosfato)
- AHA:** “*A*rabidopsis *H*⁺-*ATP*ase” (*H*⁺-ATPasa de *Arabidopsis*)
- AHG:** “*ABA* *H*ipersensitive at *G*ermination *I*” (Hipersensible a ABA durante la germinación)
- AHL:** “*A*rabidopsis *H*AL2-*L*ike” (Similar a HAL2, en *Arabidopsis*)
- AIP:** “*AKT1* *I*nteracting *PP2C1*” (PP2C1 que interacciona con AKT1)
- AKT:** “*A*rabidopsis *K*⁺ *T*ransporter” (Transportador de potasio de *Arabidopsis*)
- ALMT1:** “*AL*uminium activated *M*alate *T*ransporter” (Transportador de malato activado por aluminio).
- ALP:** “*AL*kaline *P*hosphatase” (Fosfatasa alcalina)
- Amp^R:** Resistente a ampicilina
- AMT1.2:** “*AM*monium *T*ransporter *1.2*” (Transportador de amonio 1.2)
- AP:** “*A*daptor *P*rotein complex” (Complejo proteico adaptador)
- APC:** “*A*mino acid, *P*olyamine and *C*holine transporter superfamily” (Superfamilia de transportadores de aminoácidos, poliaminas y colina.
- apl6:** “*Cl*athrin *a*daptor *p*rotein complex *l*arge chain *6*” (Cadena grande del complejo proteico adaptador de clatrina 6)
- apm3:** “*Cl*athrin *a*daptor *p*rotein complex *m*edium chain *3*” (cadena mediana del complejo proteico adaptador de clatrina 3)
- aps3 :** “*Cl*athrin *a*ssociated *p*rotein complex *s*mall subunit *3*” (Subunidad pequeña del complejo proteico asociado a clatrina 3)
- ARF:** “*ADP*- *R*ibosilation *F*actors” (Factores de ribosilación de ADP)
- ARH:** “*A*utosomal *R*ecessive *H*ipercolesterolemia” (Hipercolesterolemia recesiva autosómica)
- Arl:** “*ADP*-*r*ibosylation factor-*l*ike” (Similar al factor de ribosilación de ADP)
- At:** *Arabidopsis thaliana*
- AT:** *A*spartato *T*ransaminasa
- ATF:** “*A*mino acid *T*ransporter *F*amily” (Familia de transportadores de aminoácidos)
- ATP:** “*A*denosine 5' *T*ri*P*hosphate” (Adenosina 5' trifosfato)
- AVP:** “*A*rabidopsis *V*-*PP*asa” (V-PPasa de *Arabidopsis*)
- A_{λ=660}:** Absorbancia a 660 nanometros
- BAC:** “*B*acterial *A*rtificial *C*hromosome” (Cromosoma bacteriano artificial)
- BAR:** “*B*ASTA *R*esistance gene” (Gen de resistencia a BASTA)
- BHT:** “*B*utylated *H*idroxi*T*oluene” (Hidroxitolueno butilado)
- BIG:** “*BFA*-*I*nhibited *G*EF” (GEF inhibido por BFA)
- BSA:** “*B*ovine *S*erum *A*lbumin” (Albúmina de Suero Bovino)
- BY-2:** “*C*ultivar *B*right *Y*ellow – 2” (Cultivar amarillo brillante-2)
- C¹⁴:** Isótopo carbono-14
- CaCA:** “*Ca*²⁺/*C*ation antiporters” (Antiportadores calcio/catión)
- CaMBD:** “*Ca*lmodulin *b*inding *d*omain” (Dominio de unión a calmodulina)
- CaMV:** “*C*auliflower *M*osaic *V*irus” (Virus del mosaico de la coliflor)
- CAX:** “*C*ation *e*Xchangers” (Antiportadores de cationes)
- CBL:** “*C*alcineurin *B*-*L*ike Protein” (Proteína similar a calcineurina B)
- CCV:** “*C*lathrin *C*oated *V*esicles” (Vesículas con cubierta de clatrina)
- CDPK:** “*C*alcium *D*ependent Protein *K*inase” (Proteína quinasa dependiente de calcio)
- CHX:** “*C*ation *H*⁺ *e*Xchangers” (Antiportadores catión-protón)
- CIPK:** *C*BL-*I*nteracting *P*rotein *K*inase
- CLC:** “*Ch*loride *C*hannel” (Canal de cloruro)
- CMK1:** “*Ca*lmodulin dependent protein *K*inase *1*” (Proteína quinasa dependiente de calmodulina)
- CML/CaM:** “*Ca*lmodulin-*L*ike protein/ *Ca*lmodulin-like protein” (Proteína similar a calmodulina)
- CNBD:** “*C*yclic *N*ucleotide *B*inding *D*omain” (Dominio de unión a nucleótidos cíclicos)

Col.: *Columbia*
COP: “*COat Protein*” (Proteína de cubierta)
CPA: “*Monovalent Cation-Proton Antiporters*” (Antiportadores catión monovalente-protón)
CPK: “*Calcium dependent Protein Kinase*” (Proteína quinasa dependiente de calcio)
CPS: CarboxiPeptidasa S
CPY: CarboxiPeptidasa Y
CS: Control Silvestre
CTAB: “*Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*” (Bromuro de cetil trimetilamonio)
C-terminal: Carboxi-terminal
CTR: “*Constitutive Triple Response*” (Triple respuesta constitutiva)
CWP: “*Cell Wall Protein*” (Proteína de pared celular).
Cyt.: “*Cytosol*” (Zona citosólica)
Dab2: “*Disabled-2*” (Discapitado 2)
DMSO: DiMetilSulfOxido
DNA: “*DeoxyriboNucleic Acid*” (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs: “*DeoxyriboNucleotide TrihosPhate*” (Desoxirribonucleótido trifosfato)
DTT: DiTioTreitol
ECM: “*ExtraCellularMatrix*” (Matriz extracelular)
EDTA: Ácido Etilen Diamin TetraAcético
EE: “*Early Endosomes*” (Endosomas Tempranos)
EF: “*EF hand domain*” (Dominio tipo *EF hand*)
eFP browser : “*electronic Fluorescent Pictograph Browser*”
ELISA: “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*” (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
ELP: “*Epidermal growth factor receptor Like Protein*” (Proteína similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico)
E_m: Potencial de membrana
EMS: Etil Metano Sulfonato
ER: “*Endoplasmic Reticulum*” (Reticulo endoplasmático)
ESCRT: “*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*” (Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte)
EtAcNa: Etanol Acetato de sodio (Na⁺)
Ext.: Exterior celular
FES1: “*ortolog to Fes1p*” (ortólogo a la proteína Fes1p de levadura) siendo Fes1: “*Factor Exchange for Ssalp*”
FPR: “*FK506-sensitive Proline Rotamase*” (Rotamasa sensible a FK506)
FPS: “*fdp1 Suppressor*” (Supresor del mutante *fdp1*) siendo *fdp*: “*fructose diphosphate*”
GAP: “*GTPasa Activation Proteins*” (Proteínas de activación de GTPasa)
GAs: Giberelinas
GBF: “*Golgi BFA- resistance Factor 1*” (Factor de resistencia a BFA de Golgi 1) siendo BFA: “*Brefeldin A*”
GDP: “*Guanosine DiPhosphate*” (Guanosina difosfato)
GEA: “*Guanine nucleotide Exchange factor for ADP ribosylation factors 1*” (Factor de intercambio del nucleótido guanina para los factores de ribosilación de ADP)
GEF: “*Guanine nucleotide-Exchange Factor*” (Factor de intercambio del nucleótido guanina)
GFP: “*Green Fluorescence Protein*” (Proteína verde fluorescente)
GGA: “*Golgi localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding proteins*”
GLR: “*GLutamate Receptors*” (Receptores de glutamato)
GNGC: “*Cyclic-Nucleotide-Gated Channels*” (Canales activados por nucleótidos cíclicos)
GNL: “*GNom-Like*” (Similar a GNOM)
GORK: “*Guard cell Outward Rectifying K⁺ channel*” (Canal de potasio rectificador de salida de las células oclusivas)
GSC: “*Riken Genomic Science Center*” (Centro de ciencia genómica de Riken)
GTED: Tampón formado por: Glicerol, Tris, EDTA y DTT
GTP: “*Guanosine Tri-Phosphate*” (Guanosina trifosfato)
GTPasa: “*Guanosine TriPhosphatase*” (Guanosina trifosfatasa)
GUS: “*β-Glucuronidase*” (β-glucuronidasa)
H⁺-PPasa: “*H⁺-PyroPhosphatase*” (H⁺-Pirofosfatasa)
HAA1: “*Homolog of Ace1 Activator*” (Homólogo del activador ACE1, activador de la expresión de CUP1) siendo ACE: “*Activation Protein of CUP1 Expression*”
HAB: “*Hypersensitive to ABA*” (Hipersensible a ABA)

HAK: “*High-Affinity K⁺ transporters*” (Transportadores de potasio de alta afinidad)
Hal: “*Halotolerance protein*” (Proteína de halotolerancia)
HeLa: Henrietta Lacks
HKT: “*High-affinity K⁺ Transporters*” (Transportadores de potasio de alta afinidad)
HOG: “*High Osmolarity Glycerol*” (Osmolaridad alta-glicerol)
HPS: “*Hermansky-Pudlak Syndrome*” (Síndrome Hermansky-Pudlak)
HRK1: “*Hygromycin Resistance Kinase 1*” (Quinasa resistente a higromicina)
HRS: “*Hepatocyte growth factor Receptor tyrosine kinase Substrate*”
HSF: “*Heat Shock Factor*” (Factor de transcripción de respuesta a choque térmico)
HSP: “*Heat Shock Protein*” (Proteína de respuesta a choque térmico)
In.: Interior celular
IPP: “*IsoPentenyl diPhosphate*” (Isopentenil difosfato)
IRKs: “*Inward Rectifying K⁺ channels*” (Canales de potasio rectificadores de entrada)
IRNASE: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla
It: *Ipomoea tricolor*
ITQ: Instituto de Tecnología Química
KAT: “*K⁺ channel in Arabidopsis Thaliana*” (Canal de potasio de *Arabidopsis thaliana*)
KC1: “*Arabidopsis thaliana K⁺ rectifying Channel 1*” (Canal rectificador de potasio de *Arabidopsis thaliana*)
KCO: “*K⁺ channel Ca²⁺-activated, Outward rectifying*” (Canal de potasio rectificador de salida activado por calcio)
KEA: “*K⁺ Exchange Antiporters*” (Antiportadores de potasio)
K_{HA}: “*Domain rich in hydrophobic and acidic residues*” (Dominio rico en residuos hidrofóbicos y ácidos)
KHA: “*K⁺/H⁺ Antiporter*” (Antiportador potasio/protón)
KIR: “*K⁺ Inward Rectifier channels*” (Canales de potasio rectificadores de entrada)
K_m: Constante de Michaelis-Menten
KNH: “*Kre9 (Nine) Homolog*” (Homólogo de Kre9) siendo Kre9: “*Killer toxin REsistant*”
KT: “*K⁺ Transporters*” (Transportadores de potasio)
KUP: “*K⁺ Uptake Permeases*” (Permeasas de toma de K⁺)
LAMP: “*Lysosomal-Associated Membrane Protein*” (Proteína de membrana asociada a lisosoma)
LB: “*Left Border*” (Borde izquierdo del T-DNA)
LB: “*Lysogeny Broth*” (Bertani, 2004) (Caldo lisogénico), comúnmente conocido como “*Luria-Bertani*”
LE: “*Late Endosome*” (Endosoma Tardío)
LEA: “*Late-Embryogenesis-Abundant*” (Abundante en el final de la embriogénesis)
LIMP: “*Lysosomal Integral Membrane Protein*” (Proteína integral de membrana de lisosoma)
LOWESS: “*Locally Weighted Scatter plot Smoother*”
M.: Mutación
M: Marcador de tamaño de bandas
MAE: Tampón compuesto por: MOPS, Acetato de sodio y EDTA
MAPK: “*Mitogen Activated Protein Kinase*” (Proteína quinasa activada por mitosis).
Mb: Membrana
MCS: “*Multi Cloning Site*” (Sitio de clonaje múltiple)
MD: Malato Deshidrogenasa
MDCK: “*Madin-Darby Canine Kidney*”
MEP: “*2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate*” (2-C-metil-D-eritriol-4-fosfato)
MES: Ácido 2-(N-Morfolino) EtanoSulfónico
MOPS: Ácido 2-(N-Morfolino) PropanoSulfónico
MPR: “*Mannose 6- Phosphate Receptors*” (Receptores de manosa 6-fosfato)
MS: Murashige & Skoog
MSN: “*Multicopy Suppressor of SNF1 mutation*” (Supresor multicopia de la mutación SNF (no fermentadora de sacarosa) siendo SNF: “*Sucrose NonFermenting*”
MVB: “*MultiVesicular Body*” (Cuerpo multivesicular)
NAD: “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*” (Nicotinamina Adenina Dinucleótido)
NADP: “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*” (Nicotinamina Adenina Dinucleótido fosfato)
NASC: “*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*” (Centro de almacén de *Arabidopsis* en Nottingham)
NCED: “*9(Nine)-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase*” (9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa)
NE: Norespermidina
Nha: “*Na⁺/H⁺ Antiporter*” (Antiportador sodio/protón)
NHX: “*Na⁺/H⁺ exchanger*” (Antiportador sodio/protón)

NPTII: “*Neomycin PhosphoTransferase II*” (Neomicina fosfotransferasa II)
NSCC: “*Non Selective Cation Channels*” (Canales de cationes no selectivos)
NSY: “*Neoxanthin Synthase*” (Neoxantina sintasa)
N-Terminal: Amino-terminal
NTR: “*Nitrate TRansporter*” (Transportador de nitrato)
NYVI: “*New Yeast V-SNARE*”
OAA: “*OxALAcetate*” (Oxalacetato)
°C: Grados Celsius o centígrados
OLB: “*Oligo Labeling Buffer*” (Tampón de marcaje de sondas con cebadores de oligonucleótidos)
ORKs: “*Outward Rectifying K⁺ channels*” (Canales de potasio rectificadores de salida)
Os: *Oryza sativa*
OST1: “*Open STomata I*” (Estomas abiertos)
p/p: peso/peso
p/v: peso/volumen
P: “*Pore domain*” (Dominio Poro)
PAT2: *Protein Affected Trafficking 2*” (Tráfico de proteínas alterado)
PCI: “*Phenol Chloroform Isoamyl alcohol*” (Fenol cloroformo alcohol isoamílico)
PCR: “*Polymerase Chain Reaction*” (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pd.: “*primer*” directo
PDR12: “*Pleiotropic Drug Resistance 12*” (Resistencia pleiotrópica a drogas)
PEP: “*PhosphoEnolPyruvate*” (Fosfoenolpiruvato)
Pex.: Peroxisomas
pf.: Peso Fresco
PFK: “*PhosphoFructoKinase*” (Fosfofructoquinasa)
PGP12: “*P-Glycoprotein 12*” (Glicoproteína-P 12)
pHc: pH citosólico
PHT: “*PHosphate TRansporter*” (Transportador de fosfato)
Pi: “*Inorganic Phosphate*” (Fosfato inorgánico)
PIN “*PIN-formed*” (con forma de alfiler)
Pipes: “*Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulphonic acid]*”
pKa: Logaritmo negativo de la constante de acidez de un ácido
PKS: “*Protein Kinase SOS2-like*” (Proteína quinasa similar a SOS2)
PM: “*Plasma Membrane*” (Membrana plasmática)
PMA: “*Plasma Membrane H⁺-ATPase*” (H⁺-ATPasa de membrana plasmática)
PP2A: “*Protein Phosphatase 2A*” (Proteína fosfatasa 2A)
PP2C: “*Protein Phosphatase 2C*” (Proteína fosfatasa 2C)
Ppz: “*Protein phosphatase z*” (Proteína fosfatasa Z)
Pr.: “*primer*” reverso
PS.: Peso Seco
PSE: Tampón compuesto por: Na₂HPO₄, SDS y EDTA
PVC: “*PreVacuolar Compartment*” (Compartimento prevacuolar)
PYL: *Pyrabactin resistant 1-Like*” (Similar a resistente a pirabactina)
PYR: “*Pyrabactin Resistance 1*” (Resistencia a pirabactina)
RALF: “*RIKEN Arabidopsis Full-Length*”
RAS : “*RAt Sarcoma*” (Sarcoma de rata)
RB: “*Right Border*” (Borde derecho del T-DNA)
RCAR: “*Regulatory Component of ABA Receptor*” (Componente regulador del receptor de ABA)
RGL2: “*RGA- Like 2*” (Similar a RGA) siendo RGA: “*Repressor of GA*”
RIKEN: “*Rikagaku KENkyūsho*”
RIM101: “*Regulator of IME2 101*” (Regulador del inductor de meiosis2) siendo IME: “*Inducer of MEiosis*”
RNA: “*RiboNucleic Acid*” (Ácido ribonucleico)
RNAr: RNA ribosómico
ROF: “*ROtamase FKBP*” (FKBP con actividad rotamasa) siendo FKBP: “*FK506 binding protein*”
ROS: “*Reactive Oxygen Species*” (Especies reactivas de oxígeno)
SAIL: “*Syngenta Arabidopsis Insertion Library*” (Biblioteca de mutantes de inserción en el genoma de *Arabidopsis* de Syngenta)
SAM: “*Significant Analysis of Microarrays*” (Análisis de la significación de las micromatrices)
SAP30: “*SIT4 protein phosphatase Associated Protein 30*” (Proteína asociada a la proteína fosfatasa SIT4, supresor de: inicio de la transcripción 4) siendo SIT4: “*Suppressor of Initiation of Transcription*”

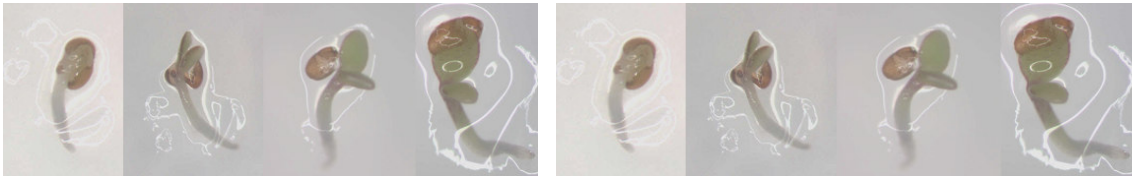
SARA: "*Secretion-Associated RAs superfamily 1*" (Superfamilia Ras asociada a secreción)
ScaBP: "*SOS3-like calcium Binding Protein*" (Proteína de unión a calcio similar a SOS3)
SDS: "*Sodium Dodecil Sulphate*" (Dodecil sulfato sódico)
SEC7: "*SECretory 7*" (Secretor 7)
SEL1: "*SELenate Resistant 1*" (Resistente a selenato)
SHY3: "*Short HYpocotyl*" (Hipocotilo corto)
SKOR: "*Stelar K⁺ Outward Rectifier*" (Canal de potasio rectificador de salida de la estela)
SN: Solución Nutritiva
SNARE: "*N-Ethylmaleimide-SeNsitive factor Attachement protein Receptor*" (Receptor de la proteína de fijación del factor sensible a N-Etilmaleimida)
SnRK: "*SNF1-Related protein Kinase*" (Proteína quinasa relacionada con SNF1) siendo SNF: "*sucrose nonfermenting*"
SOB: "*Super Optimal Broth*" (Caldo super óptimo)
SOC: "*Super Optimal broth with Catabolite repression*" (Caldo super óptimo con represión por catabolito)
SOS: "*Salt Overly Sensitive*" (Hipersensible a sal)
SPI: "*Stationary Phase Induced*" (Inducido en fase estacionaria)
SPIK: "*Shaker Pollen Inward K⁺ channel*" (Canal de entrada potasio tipo *shaker* de polen)
SSC: "*Saline Sodium Citrate*" (Tampón salino de citrato de sodio)
START: "*STERoidogenic Acute Regulatory protein (StAR)-related lipid Transfer*"
STET: Tampón compuesto por: Sacarosa, Tris, EDTA y Tritón
STOP1: "*Sensitive TO Proton rhizotoxicity 1*" (Sensible a la rizotoxicidad por protones)
SUC/SUT: "*SUCrose transporters/SUCrose Transporters*" (Transportador de sacarosa)
SULTR: "*SULphate TRansporter*" (Transportador de sulfato)
SWI3B: "*SWItch subunit 3 B*" (Subunidad interruptor 3)
TAE: Tampón compuesto por: Tris base, acido Acético y EDTA
Taq: *Thermus aquaticus*
TB: "*Transformation Buffer*" (Tampón de transformación)
TBE: Tampón compuesto por: Tris base, ácido Bórico y EDTA
TCES: Tampón compuesto por: Tris, NaCl, EDTA y SDS
T-DNA: DNA transferido
TDT: "*Tonoplast Dicarboxylate Transporter*" (Transportador de dicarboxilatos del tonoplasto)
TE: Tampón formado por: Tris y EDTA
TFL1: "*Terminal Flower 1*" (Flor terminal 1)
TFP: "*TriFluoPerazine*" (Trifluoperazina)
TGN: "*Trans-Golgi Network*" (Red trans-Golgi)
Ti: Plantas transgénicas, generación i
T_m: "*Melting Temperature*"
TMS: "*TransMembrane Segment*" (Segmento transmembrana)
TPC: "*Two Pore Channel*" (Canal de dos poros)
TPK: "*Tandem Pore K⁺ channel*" (Canal de potasio con poros en tandem)
TPO: "*Transporter of POLyamines*" (Transportador de Poliaminas)
TRH1: "*Tiny Root Hair 1*" (Pelo radicular fino)
TRK: "*TRansport of K⁺*" (Transporte de potasio)
tRNA: "*Transfer RNA*" (RNA de transferencia)
UTR: "*UnTranslated Region*" (Región no traducida)
v/v: volumen/volumen
VAM3: "*VACuolar MORphogenesis*"
V-ATPasa: "*Vacuolar H⁺-ATPase*" (H⁺-ATPasa vacuolar)
VDE: "*Violaxanthin De-Epoxidase*" (Violaxantina de-epoxidasa)
VHA: "*Vacuolar H⁺-ATPase*" (H⁺-ATPasa vacuolar)
VHP: "*Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase*" (H⁺-pirofosfatasa vacuolar)
VMA: "*Vacuolar Membrane ATPase*" (ATPasa de membrana vacuolar)
Vmax: Velocidad máxima
VPH: "*Vacuolar pH*" (pH vacuolar)
VPS: "*Vacuolar Protein Sorting*" (Clasificación de proteínas vacuolares)
VSR: "*Vacuolar Sorting Receptors*" (Receptores de clasificación vacuolar)
VTI11: "*Vps10 (Ten) Interacting 11*" (Interacciona con Vps 11) siendo Vps: "*Vacuolar protein sorting*"
WARI: "*Weak Acid Resistance 1*" (Resistencia a ácidos débiles)
WAT: "*Weak Acid Tolerant*" (Tolerante a ácidos débiles)

WIRKS: “*Weakly Inward Rectifier K⁺ channels*” (Canales de potasio débilmente rectificadores)
WS.: *WaSsilewskija*
Yck3: “*Yeast casein kinase 3*” (Caseína quinasa 3 de levadura)
ZEP: “*ZEaxanthin ePoxidase*” (Zeaxantina epoxidasa)
ZIG1: “*Zigzag1*”

Unidades:

Ci/mol: Curios/mol
cm: centímetros
cm²: centímetros cuadrados
g.: gramos
h.: horas
kb.: kilobases
kDa: kilodalton
kV: kilovoltios
kΩ: kiloohmios
μE: microeinsteins
μF: microfaradios
μg: microgramos
μl: microlitros
μm: micrómetros
μM: micromolar
m: metros
Mb: Megabases
mg: miligramos
min: minutos
ml: mililitros
mM: milimolar
nM: nanomolar
nmol: nanomoles
rpm: revoluciones por minuto
s: segundos
U/μl: Unidades/microlitro

ÍNDICE



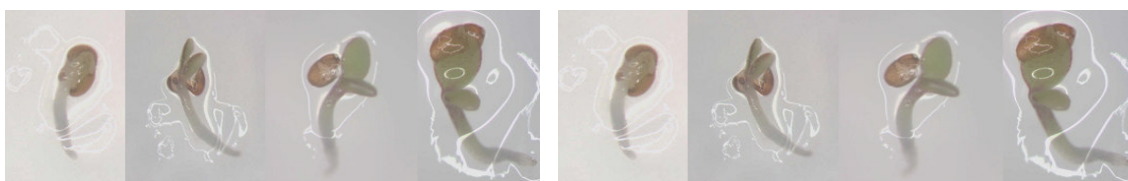
ÍNDICE	1
1-INTRODUCCIÓN	7
1.1 Homeostasis de pH en la célula vegetal	9
1.1.1 Importancia del mantenimiento de la homeostasis de pH	9
1.1.2 Regulación del pH en plantas	13
1.2 Trabajos previos relacionados con la homeostasis de pH	24
1.2.1 Trabajos empleando ácidos débiles	24
1.2.2 Otros trabajos relacionados con la homeostasis de pH	37
1.3 Homeostasis de otros cationes monovalentes.....	38
1.3.1 Homeostasis de potasio en <i>A. thaliana</i>	39
1.3.2 Homeostasis de sodio en <i>A. thaliana</i>	51
1.4 Tráfico de vesículas en plantas.....	54
1.4.1 Sistema de endomembranas y tráfico de vesículas.....	54
1.4.2 Proceso de formación de vesículas.....	57
1.4.3 Principales tipos de cubierta	59
1.4.4 Complejos adaptadores (APs)	64
1.4.5 El complejo AP3.....	68
1.5 El ácido abscísico en la célula vegetal.....	74
1.5.1 Funciones fisiológicas del ácido abscísico	74
1.5.2 Biosíntesis del ABA	76
1.5.3 Cascadas de señalización del ácido abscísico.....	78
1.6 Biología molecular en <i>A. thaliana</i>	82
1.6.1 Empleo de <i>A. thaliana</i> como sistema modelo	82
1.6.2 Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés	83
1.6.3 Activación transcripcional en <i>A. thaliana</i>	84
2- OBJETIVOS	87
3- MATERIALES Y MÉTODOS	91
3.1 Material biológico	93
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	95
3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	96
3.1.4 Vectores de clonación y transformación	96
3.2 Medios de cultivo y solución nutritiva	98
3.2.1 Medios para crecimiento de <i>A. thaliana</i>	98
3.2.2 Medios para el crecimiento de bacterias.....	99
3.2.3 Solución nutritiva	99
3.3 Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i>	100
3.3.1 Esterilización de semillas	100
3.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> en medio sólido	100
3.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> en medio líquido	100
3.3.4 Cultivo en invernadero	101
3.3.5 Cultivo hidropónico.....	101
3.4 Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	101
3.4.1 Preparación de células competentes	101
3.4.2 Transformación de células competentes.....	102
3.5 Manipulación y crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	102
3.5.1 Preparación de células competentes	103
3.5.2 Transformación mediante electroporación	103

3.6	Purificación y manipulación de ácidos nucleicos.....	103
3.6.1	Aislamiento de DNA plasmídico.....	103
3.6.2	Aislamiento de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	104
3.6.3	Electroforesis de DNA.....	105
3.6.4	Aislamiento de RNA de <i>A. thaliana</i>	105
3.6.5	Electroforesis de RNA.....	106
3.6.6	Marcaje radioactivo de sondas.....	106
3.6.7	Análisis “ <i>Southern blot</i> ”.....	107
3.6.8	Análisis “ <i>Northern blot</i> ”.....	108
3.6.9	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	108
3.7	Búsqueda y caracterización genética de mutantes.....	110
3.7.1	Rastreo de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
3.7.2	Comprobación de la presencia de T-DNA.....	111
3.7.3	Análisis genético.....	111
3.7.4	Análisis de cosegregación.....	111
3.7.5	Rescate plasmídico.....	112
3.8	Ensayo de aparición de cotiledones en diferentes medios.....	113
3.9	Ensayo de sensibilidad a etileno.....	113
3.10	Ensayos de crecimiento de plántulas en vertical.....	113
3.11	Ensayo de respuesta gravitópica.....	114
3.12	Medida simultánea del potencial de membrana y pH citosólico.....	114
3.13	Ensayos de crecimiento en invernadero.....	115
3.14	Ensayo de pérdida de peso por transpiración.....	115
3.15	Construcción de plantas transgénicas.....	115
3.15.1	Obtención de las construcciones para transformar <i>A. thaliana</i>	115
3.15.2	Transformación de <i>A. thaliana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	116
3.15.3	Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos.....	117
3.16	Ensayo de toma de acetato radiactivo.....	117
3.16.1	Preparación de las muestras.....	117
3.16.2	Extracción y medida de acetato radiactivo.....	118
3.17	Ensayo de medida del contenido en malato.....	118
3.17.1	Preparación de las muestras.....	118
3.17.2	Extracción y medida de malato.....	118
3.18	Medida de la actividad H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática (MP) <i>in vitro</i>	119
3.18.1	Aislamiento de proteínas de PM en gradiente de sacarosa.....	119
3.18.2	Ensayo de medida actividad H ⁺ -ATPasa <i>in vitro</i>	120
3.19	Ensayos de acidificación del medio externo.....	121
3.19.1	Medida empleando bromocresol.....	121
3.19.2	Medida directa de la acidificación del medio externo.....	121
3.20	Ensayos de toma y acumulación de cationes.....	122
3.20.1	Ensayo de toma de sodio y litio.....	122
3.20.2	Ensayo de toma de rubidio.....	122
3.20.3	Ensayos de acumulación de cationes.....	123
3.21	Extracción y medida de cationes.....	124
3.22	Medida del contenido en ácido abscísico (ABA).....	124
3.22.1	Obtención de las muestras.....	124
3.22.2	Extracción y medida de ácido abscísico.....	124
3.23	Análisis de la expresión génica en condiciones de estrés por ácido acético mediante micromatrices de oligos:.....	125
3.23.1	Características de las micromatrices empleadas.....	125

3.23.2 Preparación de las muestras.....	125
3.23.3 Preparación de la sonda de RNA para la hibridación.....	126
3.23.4 Preparación de las micromatrices para la hibridación.....	127
3.23.5 Prehibridación e hibridación de las micromatrices.....	127
3.23.6 Lavado y escaneado de las micromatrices.....	127
3.23.7 Preprocesamiento de los datos con genepix	128
3.23.8 Procesamiento de los datos con Accuity y análisis estadístico	128
4-RESULTADOS	129
4.1 Rastreo de líneas mutantes “ <i>activation tagging</i> ”	131
4.1.1 Aislamiento de mutantes resistentes a ácido acético	131
4.1.2 Confirmación de la presencia de T-DNA en los mutantes y determinación del número de inserciones	132
4.2 Caracterización fenotípica del mutante <i>wat1-1</i>	133
4.2.1 Caracterización fenotípica en germinación y aparición de cotiledones	133
4.2.2 Caracterización fenotípica en plántulas de 15-20 días de edad.....	138
4.2.3 Caracterización fenotípica en plantas adultas.....	144
4.3 Caracterización genética del mutante <i>wat1-1</i>	150
4.3.1 <i>wat1-1</i> presenta una mutación dominante (<i>wat1-ID</i>)	150
4.3.2 La tolerancia a acético del mutante correlaciona con la inserción de T-DNA	151
4.3.3 Localización de la inserción de T-DNA en el mutante <i>wat1-ID</i>	152
4.3.4 Análisis de expresión de los genes adyacentes al T-DNA	152
4.4 Los fenotipos del mutante <i>wat1-ID</i> no se deben a la sobreexpresión del gen At3g55470	154
4.4.1 Fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes de pérdida de función del gen At3g55470	154
4.4.2 Fenotipo en presencia de ácido acético de plantas transgénicas sobreexpresando el gen At3g55470.....	155
4.5 Los fenotipos del mutante <i>wat1-ID</i> se deben a la sobreexpresión de una adaptina truncada	156
4.5.1 Fenotipos de plantas sobreexpresando una versión truncada de At3g55480	156
4.5.2 Fenotipos de plantas transgénicas antisentido para el gen At3g55480	158
4.5.3 El mutante <i>wat1-ID</i> presenta fenotipos similares al mutante <i>pat2</i>	159
4.6 Análisis bioinformático del locus At3g55480.....	161
4.6.1 Análisis de expresión del gen <i>WAT</i>	162
4.6.2 Análisis de la proteína WAT1 de Arabidopsis	164
4.7 La toma de acético del mutante <i>wat1-ID</i> es similar a la del control.....	168
4.8 El consumo de malato es similar en el mutante y el control	168
4.9 La sobreexpresión de la pirofosfatasa vacuolar comparte fenotipos con el mutante <i>wat1-ID</i>	170
4.9.1 Fenotipo en presencia de ácido acético	171
4.9.2 Fenotipo en presencia de litio, bajo potasio y estrés osmótico.....	171
4.10 La pérdida de función de la H ⁺ -ATPasa vacuolar tiene fenotipos contrarios al mutante <i>wat1-ID</i>	172
4.10.1 Fenotipo en presencia de ácido acético	172
4.10.2 Fenotipo en presencia de litio, bajo potasio y estrés osmótico.....	173
4.11 La pérdida de función del antiportador NHX es sensible a ácido acético.....	174
4.12 Estudio de la expulsión de protones a nivel de membrana plasmática.....	175
4.12.1 Medida de la actividad de la H ⁺ -ATPasa <i>in vitro</i>	175

4.12.2 Medida de la acidificación del medio externo <i>in vivo</i>	176
4.13 Medida del potencial de membrana del mutante y el control.....	178
4.14 Toma de rubidio en condiciones normales y en condiciones de estrés por ácido acético.....	179
4.15 Toma y acumulación de cationes en el mutante <i>wat1-ID</i>	181
4.15.1 Ensayos realizados en plántulas completas	181
4.15.2 Ensayos de acumulación de cationes en raíz y parte aérea.....	184
4.16 Estudio de la relación entre ácido acético y abscísico.....	186
4.16.1 Fenotipos en presencia de acético de mutantes en biosíntesis o ruta de señalización por ABA.....	186
4.16.2 El ácido acético promueve la síntesis de ABA.....	187
4.17 Respuesta transcripcional al estrés por ácido acético	189
5- DISCUSIÓN	195
5.1 Aislamiento y caracterización genética del mutante <i>wat1-ID</i>	197
5.1.1 Rastros en germinación y establecimiento de la plántula.....	197
5.1.2 Empleo de líneas “ <i>activation tagging</i> ”.....	197
5.1.3 <i>wat1-ID</i> es un mutante dominante negativo	199
5.2 <i>WAT1</i> codifica para la adaptina β del complejo AP-3.....	200
5.2.1 Análisis de la expresión del gen <i>WAT1</i>	200
5.2.2 Análisis bioinformático de la proteína WAT1	200
5.2.3 Efectos de la pérdida de función de subunidades del complejo AP3	201
5.3 Homeostasis de pH en el mutante <i>wat1-ID</i>	201
5.3.1 “ <i>Biochemical pH stat</i> ” en el mutante <i>wat1-ID</i>	203
5.3.2 “ <i>Biophysical pH stat</i> ” en el mutante <i>wat1-ID</i>	204
5.3.3 Modelo propuesto (primera parte).....	209
5.4 Homeostasis de otros cationes monovalentes.....	210
5.4.1 Homeostasis de sodio, litio, y potasio en el mutante <i>wat1-ID</i>	210
5.4.2 Modelo propuesto (segunda parte)	212
5.5 El ácido abscísico y la homeostasis de cationes monovalentes.....	216
5.5.1 Comportamiento en presencia de ABA del mutante <i>wat1-ID</i>	216
5.5.2 El ácido acético induce la síntesis de ABA	217
5.5.3 Modelo para la inhibición de la germinación y crecimiento mediado por ABA.....	218
5.6 Respuesta transcripcional al ácido acético	220
6-CONCLUSIONES	225
7- BIBLIOGRAFÍA	231
8-ANEJOS	257

1-INTRODUCCIÓN



1.1 Homeostasis de pH en la célula vegetal

La homeostasis (del griego *homos* que significa “similar”, y *estasis* “posición”, “estabilidad”) es la tendencia de un organismo vivo, a regular el ambiente interno para mantener una condición estable y constante. El concepto fue introducido por Walter Cannon (Cannon, 1928).

En la célula vegetal existe una homeostasis de pH, ya que su valor se mantiene dentro de un estrecho rango, a pesar de que numerosos procesos tienden a romper ese equilibrio, como la toma y el metabolismo de nutrientes por las plantas, que implica la producción o el consumo de protones (H^+). Sin embargo, el valor del pH varía según el compartimento celular: el pH en el apoplasto es aproximadamente 5, el pH vacuolar oscila entre 5 y 5,5 (apropiado para la acción de las hidrolasas ácidas) y, aunque es una simplificación referirse al citoplasma como una fase uniforme, puede considerarse que en conjunto el pH citoplasmático varía entre 7 y 7,5.

Por lo tanto, la homeostasis de pH en la célula vegetal consiste en el mantenimiento de un pH determinado en cada compartimento, que resulte adecuado a los requerimientos celulares.

1.1.1 Importancia del mantenimiento de la homeostasis de pH

La homeostasis de protones en la célula vegetal requiere de una estricta regulación, porque el pH juega un papel esencial en numerosos procesos celulares, tal y como se detalla a continuación:

A) Efecto sobre los enzimas intracelulares:

La mayoría de enzimas celulares se ven afectados por cambios en el pH, principalmente por dos motivos:

Por un lado, muchos de los aminoácidos que forman parte de las proteínas tienen grupos ionizables, por lo que variaciones de pH alterarán el estado de ionización de estos grupos, lo que puede afectar a la función del enzima.

Por otro parte, la actividad de los enzimas es sensible al pH, variando alrededor de un pH óptimo, propio de cada enzima. Por ejemplo, el pH óptimo de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática es ligeramente ácido (6,5). Este efecto del pH sobre las enzimas metabólicas, hace que numerosos procesos como la glucólisis o la síntesis de RNA, DNA y proteínas, se vean afectados por variaciones de pH. De hecho, la actividad

de la fosfofructoquinasa, principal enzima reguladora de la glucólisis, se incrementa a medida que aumenta el valor del pH, en un pequeño intervalo dentro del rango fisiológico (Fiedelman *et al.*, 1982), y se inhibe al bajar el pH por añadir benzoato en levadura (Francois *et al.*, 1986). Del mismo modo, el pH óptimo de la DNA polimerasa es bastante alto, por lo que la actividad aumenta al incrementar el pH de 7 a 8 (Gerson, 1982).

B) Importancia en el transporte de solutos:

El transporte de solutos a través de las membranas biológicas puede ocurrir mediante transporte activo o pasivo, según si se acumula el soluto en contra de su gradiente de concentración o no.

En el caso del transporte activo, esta acumulación lleva consigo un aporte de energía. Cuando este aporte energético proviene de una reacción exergónica, se habla de transporte activo primario (Serrano, 1985). Como se explicará en detalle más adelante, en las membranas de las células vegetales, existen bombas de protones que emplean la energía de la hidrólisis de ATP (o del pirofosfato), para bombear protones en contra de su gradiente. El potencial electroquímico resultante, representa energía almacenada que se emplea en el transporte de otros solutos en contra de su gradiente de concentración (transporte activo secundario), ya sea mediante cotransporte con protones (simporte o antiporte), o simplemente a favor de su potencial eléctrico. Debe resaltarse la confusión existente en el campo sobre la naturaleza activa o pasiva de la toma de cationes, como el K^+ , mediada por canales y energizada por el potencial eléctrico. Este transporte está energizado indirectamente por ATP (o pirofosfato), que al hidrolizarse bombea cationes (H^+ en el caso de las plantas) creando el potencial de membrana que posibilita la acumulación de potasio.

El transporte activo secundario es fundamental para la toma de nutrientes como el nitrato, el fosfato o el sulfato que se introducen en la célula en contra de su gradiente eléctrico y de concentración, mediante el simporte con protones. Asimismo, como ya se ha explicado, el potencial de membrana es también la fuerza motriz para la toma de potasio, elemento que la célula acumula en contra de su gradiente de concentración. Por otro lado, estos mismos mecanismos son necesarios para el transporte de compuestos orgánicos, como azúcares o aminoácidos, desde los tejidos fuente hasta los sumideros, como raíces o flores.

Por lo tanto, la correcta regulación de la homeostasis de pH es necesaria para la formación de los gradientes de protones que se requieren en cada tipo y compartimento celular, y que posibilitan el transporte de iones necesario para procesos como la nutrición mineral o el transporte de nutrientes entre los diferentes órganos vegetales.

C) pH como señal o como mensajero celular:

En algunos casos se considera el pH como señal o como mensajero celular, ya que sus variaciones pueden transmitir información y provocar respuestas a nivel celular. Al igual que el calcio (conocido mensajero celular), las concentraciones de protones en el citosol son del orden de 100 nM. Estos bajos niveles son necesarios para que un catión actúe como mensajero, ya que posibilitan los cambios de concentración rápidos y detectables (Felle, 2001). Sin embargo, en comparación con el calcio, los cambios de pH son menos localizados (pues la movilidad de este catión en el citosol es mayor), y más lentos (ya que la acción de los transportadores que provocan los cambios de concentración de protones es más lenta que la de los canales responsables de los cambios de concentración de calcio). A continuación se enumeran algunos casos en que el pH puede actuar como señal o como mensajero celular (Felle, 2001):

El pH actúa como señal indicando cambios en la intensidad lumínica. El paso de luz a oscuridad acidifica el citosol (Felle y Bertl, 1986), mientras que las células adaptadas a oscuridad responden a la luz incrementando de forma rápida su pH.

Las células vegetales también presentan variaciones en su pH citosólico en respuesta a estreses. Por ejemplo, en células de tabaco se produce una acidificación del citosol como parte de la respuesta a elicitores de patógenos (Mathieu *et al.*, 1996). Se ha demostrado, que esa acumulación de protones en el citoplasma juega un papel en la activación a nivel transcripcional de genes de defensa, por lo que los protones pueden considerarse como uno de los segundos mensajeros involucrados en la transducción de la señal de las moléculas de elicitores en tabaco (Mathieu, 1994; Lapous *et al.*, 1998).

Por otro lado, variaciones en el pH pueden modificar la conductividad de algunos canales de potasio, como los canales AKT2 (“*Arabidopsis K⁺ Transporter*”) o TPK4 (“*Tandem Pore K⁺ channels*”), que son sensibles a bajo pH (Latz *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2004). Asimismo, como se explicará más adelante, en el caso de las células de levadura, se ha establecido que la regulación del principal transportador de toma de potasio Trk1p, depende del pH intracelular (Yenush, 2005).

El pH también se considera como mensajero en el gravitropismo, ya que los cambios en el pH de las células receptoras del estímulo gravitacional, y los gradientes de pH resultantes de estos cambios, son importantes en la cascada de señalización que lleva a la respuesta gravitropica (Scott y Allen, 1999).

Finalmente, se baraja la hipótesis de que los protones actúen como mensajeros secundarios de hormonas, como la auxina en el crecimiento celular (Kurkdjian y Guern, 1989) o el ácido salicílico. De acuerdo a la hipótesis del crecimiento ácido, las auxinas favorecen la expulsión de protones al apoplasto, lo que incrementa la extensibilidad de la pared celular (Rayle y Cleland, 1992). Concretamente, se ha demostrado que las auxinas aumentan la actividad y la cantidad de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Felle *et al.*, 1991; Frías *et al.*, 1996). Asimismo, se ha descrito que la acidificación del apoplasto favorece la acción de las expansinas, enzimas que debilitan la pared celular facilitando la expansión celular (revisado en Cosgrove, 2000). Por otro lado el pH también parece tener un papel relevante en la respuesta a patógenos mediada por ácido salicílico (Sakano, 2001). De hecho, se ha visto que el ácido salicílico provoca la acidificación del citosol, lo que parece necesario para sintetizar genes de defensa.

D) Papel del pH en el tráfico vesicular:

El mantenimiento de un pH apropiado en cada compartimento del sistema de endomembranas resulta crucial para el correcto funcionamiento del tráfico de vesículas tanto en mamíferos como en levadura (revisado en Pardo *et al.*, 2006). De hecho, el pH del lumen de estos compartimentos puede dirigir el tráfico de vesículas. Si el pH del endosoma es elevado se promueve el transporte del endosoma a Golgi, mientras que la acidificación del endosoma generaría vesículas más ácidas que serían dirigidas a vacuola (Van Weert *et al.*, 1997).

En *Sacharomyces cerevisiae*, se ha identificado el antiportador Nhx1p como responsable del mantenimiento de un pH apropiado en el lumen de los endosomas, para controlar el tráfico de vesículas desde el endosoma (Brett *et al.*, 2005). Probablemente, genes homólogos a este transportador en plantas estén involucrados en la misma función, ya que el transcriptoma de un mutante *nhx1* de *Arabidopsis thaliana*, muestra diferencias significativas con el control en genes relacionados con procesamiento de proteínas y tráfico vesicular (Sottosanto *et al.*, 2004). Por otra parte, la H⁺-ATPasa vacuolar (enzima clave para el mantenimiento de un pH apropiado en compartimentos

del sistema de endomembranas) también parece ser necesaria para un correcto tráfico de vesículas en *A. thaliana* (Dettmer *et al.*, 2006).

1.1.2 Regulación del pH en plantas

Las plantas tienen que hacer frente a numerosos procesos que perturban su pH intracelular, como el transporte activo secundario, factores ambientales o estreses, e incluso su propio metabolismo.

El transporte activo secundario, que permite la toma de nutrientes como el nitrato, el fosfato o el sulfato, tiende a acidificar el citosol, ya que ocurre mediante el simporte con protones (ver apartado 1.1.1 B). En relación a los estreses o factores ambientales, numerosos estímulos externos provocan variaciones en el pH citoplasmático, como la anaerobiosis, la transición de luz a oscuridad, cambios en la temperatura, o cambios en el pH externo (ver apartado 1.1.1 C), (Revisado en Felle 2001). Finalmente, determinadas rutas metabólicas consumen o generan protones. Por ejemplo, en la nutrición con nitrógeno, el empleo de nitrato como fuente de nitrógeno alcaliniza el citosol (ya que consume protones para ser reducido a amonio), mientras que la utilización de amonio disminuye el pH citoplasmático (Revisado en Smith y Raven, 1979).

A pesar de todos estos factores perturbadores, el pH propio de cada compartimento celular se mantiene dentro de un rango ajustado a sus funciones, gracias a la acción de varios mecanismos reguladores.

A) Tampones citoplasmáticos:

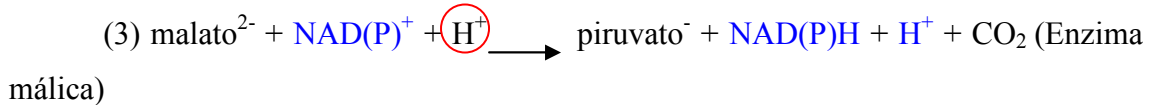
El primer sistema por el que la célula vegetal es capaz de regular los cambios en el pH intracelular es por la presencia de tampones (Smith y Raven, 1979; Felle, 2001). En el citosol, existen varios tampones útiles en un rango de pH entre 6 y 8, como el bicarbonato ($pK_a=6,38$), compuestos de fosfato ($pK_a=6,8-7$) y algunos aminoácidos (como el grupo imidazol de la histidina, $pK_a=6,5$). Este mecanismo de regulación resulta útil para afrontar cambios repentinos de pH, evitando que éste se aleje demasiado del óptimo. Sin embargo, la capacidad reguladora de los tampones no siempre resulta suficiente para los cambios de pH que la célula ha de afrontar. Además, este sistema no tiene sentido para una regulación a largo plazo, ya que la síntesis de los componentes de los tampones requiere de la generación o del consumo de protones. Por

lo tanto existen sistemas más poderosos de regulación del pH citosólico, que incluyen las reacciones metabólicas que producen o consumen protones, y el transporte de protones a través de las membranas. Clásicamente se han denominado “*biochemical pH stat*” y “*biophysical pH stat*” respectivamente.

B) “Biochemical pH stat”:

El término “*biochemical pH stat*” fue introducido por Davies (1986) quien propuso que para regular el pH citoplasmático, se coordinaban en la célula una serie de reacciones de carboxilación-descarboxilación cuyas enzimas tenían diferentes pHs óptimos. De los modelos propuestos por Davies, el más aceptado fue aquel según el cual la regulación del pH citoplasmático viene dada por la síntesis y degradación de malato, gracias a la acción coordinada de la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa y el enzima málico.

Concretamente, las reacciones que tienen lugar son:



En la primera reacción, catalizada por la PEP carboxilasa, se produce una carboxilación del fosfoenolpiruvato, para producir oxalacetato (OAA). Para que esta reacción ocurra, es necesaria la hidratación del CO_2 para dar ácido carbónico (H_2CO_3), un ácido débil que se convertirá en carboxilato (ácido fuerte). El OAA producido se transformará en malato por acción de la malato deshidrogenasa, empleando el coenzima NADH como poder reductor (reacción 2). En la tercera reacción, tiene lugar una descarboxilación oxidativa. Para que se produzca la descarboxilación, el grupo carboxilato del malato tiene que protonarse y formar R-COOH, antes de liberar CO_2 , por lo que se consume un protón. Los protones que se muestran en azul, son necesarios para la actuación de los coenzimas, y no se incluyen en el balance, ya que los coenzimas serán regenerados oxidando o reduciendo un sustrato (normalmente oxidando un alcohol a cetona, y viceversa), según si el coenzima se encuentra en su estado oxidado o reducido.

Dado que el pH óptimo de la PEP carboxilasa es mayor que el pH neutro, cuando el pH del citosol aumenta, la enzima es más activa y produce más protones, ayudando así a disminuir el pH citosólico. Por otro lado, cuando el pH disminuye, la

enzima málica, cuyo pH óptimo es menor que 7, descarboxila el malato, consumiendo protones y corrigiendo así la bajada de pH (Figura 1.1).

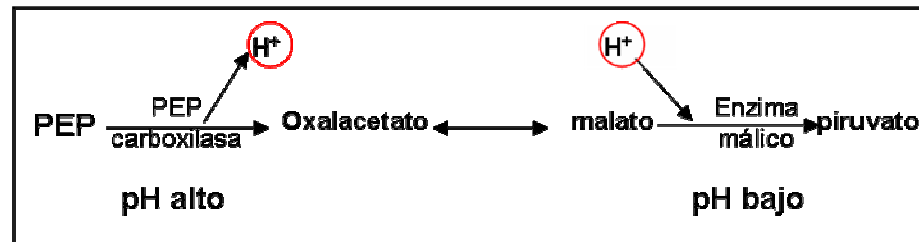


Figura 1.1: Esquema del clásico “*biochemical pH stat*” propuesto por Davies, 1986.

Esta hipótesis ha sido bien aceptada porque explica los cambios en el contenido de malato en respuesta a condiciones ambientales que provocan variaciones en el pH (revisado en Smith y Raven, 1979). Por lo tanto, la teoría de Davies, así como datos experimentales, otorgan al malato un papel fundamental en la homeostasis de pH. Considerando que la mayoría del malato presente en la célula se almacena en la vacuola, los canales y transportadores involucrados en los flujos de malato entre el citosol y el lumen vacuolar, y viceversa, también estarán implicados en el mantenimiento de la homeostasis de pH (Martinoia *et al.*, 2007).

C) “Biophysical pH stat”:

La célula vegetal puede controlar el pH de sus distintos compartimentos regulando la acción de los diversos transportadores de protones localizados en las membranas celulares. Los principales transportadores involucrados en la homeostasis de pH son las bombas de protones.

C-1: Bombas de protones:

Estas bombas emplean la energía de la hidrólisis del ATP, (H^+ -ATPasas) o del pirofosfato (pirofosfatasas, H^+ -PPasas) para transportar protones en contra de su gradiente.

C-1.1 H^+ -ATPasas de membrana plasmática:

Las H^+ -ATPasas de la membrana plasmática (PM) son bombas de protones que emplean la energía de la hidrólisis de ATP para transportar protones hacia el exterior celular, en contra de su gradiente electroquímico. Estas H^+ -ATPasas se encuentran exclusivamente en la membrana plasmática de hongos y plantas. Pertenecen a la familia de ATPasas de tipo P, ya que forman un intermediario enzima-fosfato como paso de transición durante su ciclo catalítico y son inhibidas por vanadato (revisado en DUBY y

Boutry, 2009). Dentro de los 46 genes que codifican para bombas de tipo P en *A. thaliana*, la subfamilia de H⁺-ATPasas de PM está formada por 11 genes que se denominan *AHA1-11*, y se expresan diferencialmente en las distintas células y tejidos (Gaxiola *et al.*, 2007).

Estructura

La H⁺-ATPasa de PM de plantas está formada por un único polipéptido de unos 100 kDa que es funcional (Goormaghtigh *et al.*, 1986), si bien puede formar dímeros y hexámeros (Ottman *et al.*, 2007, Kanczewska *et al.*, 2005). La estructura primaria de la H⁺-ATPasa de PM se muestra en la Figura 1.2, donde es posible observar que el enzima posee 10 segmentos transmembrana (“*TransMembrane Segments*”) denominados TMS1-TMS10, y sus colas N- y C-terminal se incluyen en el citosol.

En la Figura 1.2 se representan los diferentes dominios propios del enzima en distintos colores. El dominio P se localiza en el gran bucle citosólico y es el dominio de fosforilación, donde se incluye el residuo de aspartato catalítico conservado dentro de la secuencia DKTGTLT. El dominio R se corresponde con la parte C-terminal de la proteína y actúa como un dominio autoinhibitorio. De hecho, expresando la H⁺-ATPasa *AHA2* de *A. thaliana* en levadura, Palmgreen y colaboradores mostraron que la delección de algunos residuos del extremo C-terminal de la proteína, generaba una H⁺-ATPasa más activa (Palmgreen *et al.*, 1993; Regenber *et al.*, 1995).

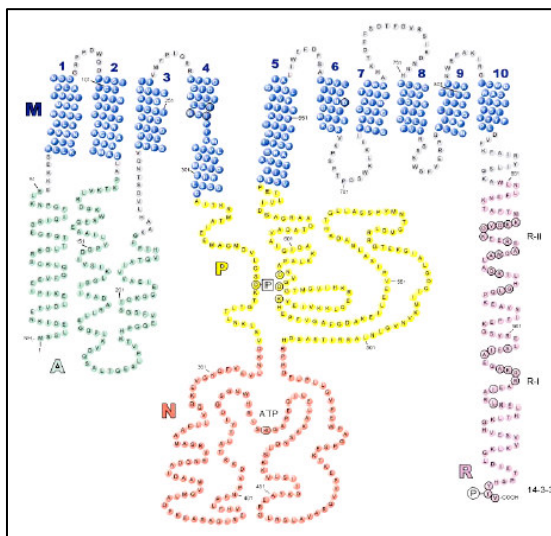


Figura 1.2: Representación esquemática de la bomba de protones de PM AHA2. A: “dominio actuador”, M: dominio en membrana, P: dominio de fosforilación, N: dominio de unión a nucleótido y R: dominio auto-inhibitorio (Extraída de Palmgreen, 2001).

Principales funciones:

La H⁺-ATPasa de PM es un enzima electrogénico ya que expulsa protones (cargas positivas) al exterior celular. Por lo tanto, su acción genera un potencial de membrana (negativo en el citosol), de entre -100 y -200 mV. Por otro lado, la actuación

de esta bomba provoca una acumulación de protones en el apoplasto, y por tanto una diferencia en la concentración de los mismos entre el interior y el exterior celular. Es decir, la bomba de protones de la membrana plasmática es la responsable de la existencia de un gradiente electroquímico de carga y pH, que constituye la fuerza motriz para la entrada de solutos al interior celular mediante sistemas de cotransporte con protones.

Por este motivo, como se comentó en el apartado 1.1.1 B, este enzima controla procesos de transporte muy importantes en la planta como la toma de nutrientes por la raíz o la carga del floema con azúcares. De hecho, en las células acompañantes que cargan el floema con sacarosa (mediante un simporte sacarosa/protones), la expresión de la bomba de protones es muy alta y una disminución de la expresión de la H⁺-ATPasa provoca un claro descenso en el transporte de azúcares desde los órganos fuente fotosintéticos a los sumideros (Zhao *et al.*, 2000).

En la raíz, la acción de la bomba de protones, no sólo facilita la toma de nutrientes sino que también posibilita la salida de cationes tóxicos como el sodio, mediante el antiportador Na⁺/H⁺ SOS1 (“Salt Over Sensitive”). Por ello su acción es importante para la tolerancia del estrés salino y su expresión y actividad se incrementa en estas condiciones de estrés (Niu *et al.*, 1993; Binzel, 1995; Janicka-Russak y Klobus, 2007).

Además de su implicación en el transporte de solutos, esta bomba ha sido implicada en otros procesos fisiológicos importantes como la apertura de estomas (Merlot *et al.*, 2007), la elongación celular o la regulación del pH citoplasmático.

Dado que la bomba de protones de la PM es el mecanismo más eficiente de las plantas para expulsar protones del interior celular, su papel es fundamental en el control de la homeostasis de pH. De hecho, como se comentó anteriormente, el pH óptimo de este enzima está en torno a 6,5, mucho menor que el pH propio del citosol (pH_c=7,5). Por lo tanto, una bajada del pH_c aumentará la actividad de esta bomba, y la consecuente expulsión del exceso de protones (Michelet y Boutry, 1995).

Sin embargo, la acción de esta bomba por sí sola no es capaz de regular una importante bajada del pH interno, ya que provocaría una hiperpolarización de la membrana que disminuye la actividad de la bomba de protones. Por lo tanto, para que la H⁺-ATPasa pueda regular el pH_c, es necesario un balance de cargas, que puede producirse gracias a la entrada de potasio. La toma de este catión, al contrario que el bombeo de protones, se activa al aumentar el potencial de membrana por lo que la

acción conjunta de ambos transportes (expulsión de H^+ y toma de K^+) sí resulta eficiente para contrarrestar el estrés ácido intracelular: se expulsan protones, pero se evita la hiperpolarización de la membrana y por tanto la inhibición de la bomba de protones (Thibaud *et al.*, 1986). Aunque éste es el modo más común, un mecanismo alternativo para mantener la electroneutralidad es mediante la salida de aniones al mismo tiempo que se expulsan los protones (de Angeli *et al.*, 2007), si bien el flujo de potasio suele ser más rápido que el de aniones.

Mecanismos de regulación

Debido a la importancia de la acción de la H^+ -ATPasa de la PM en numerosos procesos fisiológicos, su actividad está regulada por varios mecanismos diferentes. Sin embargo, el modo más común de regulación de la H^+ -ATPasa de la PM, es la regulación a nivel post-traducciona.

Como se ha comentado anteriormente, el dominio R de la H^+ -ATPasa de la PM, es un dominio autoinhibitorio. Se ha comprobado que la fosforilación del penúltimo residuo (Thr), Thr-947 en el gen *AHA2* de *A. thaliana* (Fuglsang *et al.*, 1999), promueve la unión de la proteína reguladora 14-3-3, que desplaza el dominio R inhibitorio, activando el enzima. La alta conservación de este dominio en la mayoría de las H^+ -ATPasas conocidas, muestra la importancia de este mecanismo de regulación, si bien todavía se trabaja en dilucidar la identidad de las quinasas y fosfatasa involucradas. Por lo que respecta a la fosforilación, tan sólo se ha encontrado una quinasa, asociada a la PM, capaz de fosforilar el penúltimo residuo (Thr948) de PMA2, una H^+ -ATPasa de *Nicotiana tabacum* (Svennelid *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha sugerido que la defosforilación de *AHA2* en *A. thaliana* podría depender de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), ya que su subunidad reguladora interacciona con extremo C-terminal de la H^+ -ATPasa en un ensayo de doble híbrido (Fuglsang *et al.*, 2006).

Existen muchos otros residuos en este enzima que son fosforilados, y la mayoría de ellos se localizan en el segmento C-terminal. Se ha observado que según la enzima y el residuo concreto, la fosforilación puede provocar activación o inhibición del enzima. Por ejemplo, la fosforilación de *AHA2* en Ser931, mediada por PKS5, inhibe la acción la H^+ -ATPasa por evitar su interacción con la proteína reguladora 14-3-3 (Fuglsang *et al.*, 2007).

C-1.2 H^+ -ATPasa de tipo V:

La H^+ -ATPasa de tipo V se localiza en la vacuola central así como en los diferentes compartimentos del sistema de endomembranas (retículo endoplásmico,

aparato de Golgi, vesículas de endocitosis o de secreción). Este enzima emplea la energía de la hidrólisis del ATP para bombear protones hacia el interior de estos compartimentos, haciendo posible el carácter ácido que éstos requieren.

Funciones

De modo similar a la H^+ -ATPasa de la PM, este enzima genera en la vacuola el gradiente electroquímico capaz de energizar el transporte activo secundario a través del tonoplasto. Por lo tanto, sus principales funciones serían mantener la homeostasis de protones, contribuyendo al mantenimiento de un pH apropiado en cada compartimento celular, y posibilitar la homeostasis de otros iones y metabolitos, cuya entrada en el lumen vacuolar depende del potencial de membrana (Krebs, *et al.*, 2010).

Además de estas funciones, la H^+ -ATPasa de tipo V también es necesaria para un correcto funcionamiento del aparato de Golgi durante la embriogénesis (Strompen *et al.*, 2005) y para el tráfico vesicular, como se indicó en el apartado 1.1.1 D (Dettmer *et al.*, 2006).

Estructura

Las ATPasas de tipo V están formados por múltiples subunidades, que se ensamblan formando dos complejos principales: V_1 y V_0 . El complejo citosólico V_1 (400-600kDa), es el complejo catalítico, responsable de la hidrólisis del ATP y está formado por 8 subunidades (A-H). El complejo V_0 (150-350 kDa), es hidrofóbico, está incluido en la membrana, y se encarga del transporte de los protones (subunidades a, c, c', c'', d y e) (revisado en Beyenbach y Wiczorec, 2006).

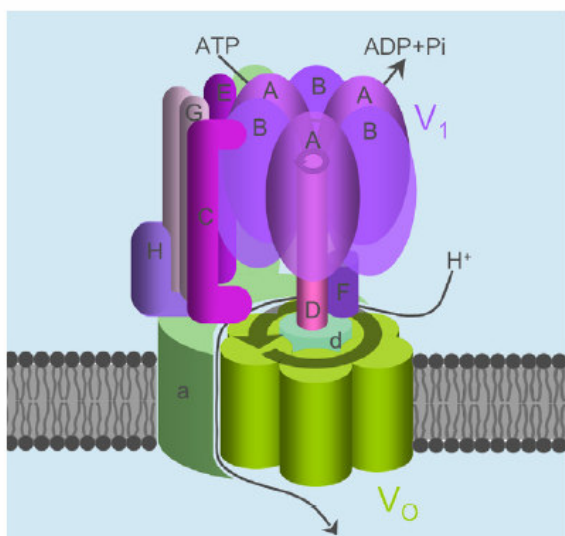


Figura 1.3: Representación esquemática de la bomba de protones de tipo V. El complejo V_1 periférico se muestra en morado, y el complejo V_0 de membrana en color verde. (Extraída de Gaxiola *et al.*, 2007).

Genes en A. thaliana

En plantas, muchas de las subunidades de la H⁺-ATPasa de tipo V, están codificadas por familias génicas. Concretamente, en *A. thaliana* existen un total de 27 genes *VHA* que codifican para las 13 subunidades de la H⁺-ATPasa (Sze *et al.*, 2002). Las diferentes isoformas deben de mostrar localizaciones diferentes a nivel celular o de tejido.

Regulación

Por lo que respecta a la regulación de estos enzimas, podría llevarse a cabo de forma similar a la de las bombas de protones de PM, de hecho, se ha comprobado que las proteínas 14-3-3 son capaces de interactuar con VHA-A de cebada, siendo la interacción dependiente de una fosforilación (Klychnikov *et al.*, 2007).

C-1.3 Pirofosfatasa vacuolar:

La pirofosfatasa vacuolar es una proteína altamente hidrofóbica formada por una única subunidad de unos 80kDa. Este enzima transporta protones al interior de la vacuola, u otros compartimentos celulares, empleando el pirofosfato como sustrato (ya que tiene un enlace fosfoanhídrido ricoenergético). De este modo contribuye, junto con la H⁺-ATPasa de tipo V, a generar el potencial electroquímico del tonoplasto, y a regular el pH de los distintos compartimentos celulares.

En plantas existen dos tipos principales de H⁺-PPasas: las de tipo I, que dependen de la presencia de K⁺ para su actividad y son moderadamente sensibles a inhibición por Ca²⁺, y las de tipo II, que no requieren K⁺ para su funcionamiento pero son extremadamente sensibles a Ca²⁺. En *A. thaliana*, existen 3 genes que codifican para H⁺-PPasas: un único gen para el enzima de tipo I (*VHP1;1/AVP1*), y dos genes para el enzima de tipo II (*VHP2;1* y *VHP2;2*). Las H⁺-PPasas de tipo II de *A. thaliana* se localizan en el aparato de Golgi de la mayoría de tejidos, si bien su presencia es mayor en tejidos jóvenes. Sin embargo, los niveles de proteína total de las H⁺-PPasas de tipo II representan menos del 0,2% de los de VHP1 (Segami, *et al.*, 2010). El papel fisiológico de este tipo de H⁺-PPasas todavía está por determinar.

La H⁺-PPasa de tipo I (*VHP1;1/AVP1*) se localiza en el tonoplasto y, además de su implicación en la homeostasis de pH, se le atribuyen otras funciones de gran relevancia. Por ejemplo, numerosos trabajos indican que la sobreexpresión de la H⁺-PPasa vacuolar incrementa la tolerancia a sequía y salinidad, ya que aumenta la acumulación de solutos en vacuola, lo que facilita la toma de agua. Asimismo, estas plantas también acumulan más sodio en vacuola, donde no resulta citotóxico (Gaxiola *et*

al., 2001, Pasapula *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que VHP1;1 contribuye a la regulación del pH apoplástico y al transporte de auxinas probablemente mediando el tráfico de la H^+ -ATPasa de PM y otras proteínas como PIN1 a la membrana plasmática (Li *et al.*, 2005).

C-2 Otros sistemas de transporte de protones:

A pesar de que las bombas de protones son los principales transportadores implicados en la homeostasis de pH, existen otros sistemas en la célula vegetal que transportan protones, y por tanto pueden influir en el pH de los compartimentos celulares, aunque esta no sea su principal función. Estos sistemas participan en el transporte activo secundario moviendo iones u otros solutos en contra de gradiente, al mismo tiempo que transportan protones a favor de gradiente. Se distingue entre simportadores o antiportadores, según si la sustancia a transportar se mueve en el mismo sentido que los protones (simporte) o en sentido contrario (antiporte).

C-2.1 Antiportadores catión/protón:

Estos antiportadores pueden localizarse en la membrana plasmática o en membranas intracelulares, como el tonoplasto. En el primer caso, se encargan de expulsar cationes del citosol al apoplasto, introduciendo protones. Si actúan en compartimentos intracelulares, introducen en ellos los cationes, sacando protones.

Existen numerosas familias de antiportadores catión/protón. Los principales cationes que se transportan de este modo son el calcio, el sodio y el potasio, aunque otros cationes como el manganeso, el zinc o el cadmio también se pueden transportar mediante antiporte con protones. El transporte de calcio lo lleva a cabo la familia de transportadores CAX (“*C*ation *eX*changers”) perteneciente a la subfamilia CaCA, (“*Ca*²⁺/*C*ation antiporters”). Los transportadores de sodio y potasio pertenecen a la subfamilia CPA (“*Monovalent C*ation-*P*roton *A*ntiporters”) (Figura 1.12), que incluye los genes *NHX* (revisado en Pardo *et al.*, 2006). Algunos de estos transportadores se comentarán con más detalle en el apartado 1.3.

Varios estudios relacionan alguno de estos transportadores con la homeostasis de pH. En relación a los transportadores CAX, se ha visto que el mutante de pérdida de función *cax3* muestra una reducción en la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar (Cheng *et al.*, 2005) y una sensibilidad a pH ácido (Zhao *et al.*, 2008).

Por otro lado, la importancia del transportador *NHX* en la regulación del pH vacuolar, queda patente analizando el cambio de color de las flores de la especie *Ipomea*

spp (Yamaguchi *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2005). Este transportador, se localiza en el tonoplasto y es capaz de introducir K^+ o Na^+ en la vacuola, sacando protones. Las flores de la especie *Ipomea* varían el color de sus pétalos de rojo púrpura a azul, al subir el pH vacuolar desde 6,6 a 7,7, ya que el pH determina la coloración de las antocianinas acumuladas en la vacuola. Se ha visto que una planta de la especie *Ipomea* mutada en el gen NHX, no es capaz de subir el pH de la vacuola, por lo que sus flores son siempre de color rojo púrpura, y no del color azul correspondiente (Fukada-Tanaka *et al.*, 2000). Por otro lado, el mutante de *S. cerevisiae* en este gen, muestra una acidificación del lumen vacuolar y del citoplasma, sensibilidad al crecimiento a pH ácido y defectos en el tráfico de vesículas (Brett *et al.*, 2005).

C-2.2 Antiportadores anión/proton:

Dentro de este grupo se incluyen los antiportadores pertenecientes a la familia CLC (“*Chloride Channel*”). En esta familia, identificada por primera vez en los peces torpedo, existen tanto canales de cloro como antiportadores Cl^-/H^+ . En *A. thaliana* existe una familia de 7 genes que codifican para este tipo de transportadores, denominados *CLCa-CLCg*. Los análisis de las secuencias aminoacídicas de los genes de esta familia sugieren que 4 de los 7 genes codifican para antiportadores anión/protón, y sólo 3 de ellos codifican para canales de aniones. La proteína CLCa de *A. thaliana* se localiza en el tonoplasto y se ha demostrado que actúa como un antiportador NO_3^-/H^+ . Otros transportadores de la familia se localizan en membranas intracelulares del aparato de Golgi (CLCd y CLCf) o los cloroplastos (CLCe) (revisado en de Angeli *et al.*, 2007)

C-2.3 Simportadores anión/protón:

Como se ha comentado en apartados anteriores, en la membrana plasmática existen simportadores anión/protón que median la entrada en la célula de nutrientes como el nitrato, el fosfato o el sulfato.

En plantas se han identificado dos tipos de transportadores de nitrato: NTR1 y NTR2, que difieren filogenéticamente, aunque ambos poseen 12 dominios transmembrana. Además, las dos familias introducen protones al mismo tiempo que el anión nitrato. En *A. thaliana*, existen 53 genes *NTR1*, que en general, son transportadores de baja afinidad, y 7 genes *NTR2*, que son transportadores de alta afinidad.

En el caso del fosfato, se conocen 4 familias de transportadores en *A. thaliana*, denominadas PHT1-PHT4 (Revisado en Poirier and Bucher, 2002). Dentro de la familia PHT1, se encuentran 9 genes (*PHT1;1-PHT1;9*) cuyas proteínas se localizan en la

membrana plasmática. De la familia PHT2, sólo se conoce un gen, que codifica un simportador fosfato/protón de baja afinidad, localizado en el cloroplasto. Los tres miembros de la familia PHT3 se localizan en mitocondrias, y la mayoría de los miembros de la familia PHT4 (*PHT4;1-PHT4;6*) se encuentran en cloroplastos, a excepción de la proteína PHT4;6 que se ha localizado en el aparato de Golgi.

Al igual que en el caso del nitrato y el fosfato, el mecanismo propuesto para el transporte de sulfato a través de las membranas es el cotransporte con protones. El análisis del genoma de *A. thaliana* ha identificado una familia de 14 genes candidatos a transportar sulfato, que pueden dividirse en 5 grupos: SULTR1-SULTR5. Sólo existe evidencia funcional de cotransporte sulfato/H⁺ para los grupos 1 y 2. Las proteínas pertenecientes al grupo 1 son transportadores de alta afinidad (rango micromolar) involucrados en la toma de sulfato por la raíz (SULTR1;1 y SULTR1;2) y en el transporte a nivel de planta, desde tejidos fuente a los sumidero (SULTR1;3). Los transportadores del grupo 2 se expresan preferentemente en tejidos vasculares y median el transporte de sulfato de baja afinidad (revisado en Buchner *et al.*, 2004).

C-2.4 Simporte azúcares /protones y aminoácidos/protones:

En plantas, los azúcares son sintetizados en las hojas (fuente), por lo que el resto de la planta (sumideros) depende de un constante aporte de carbohidratos, que se realiza a través del floema. En la mayoría de las plantas (incluyendo *A. thaliana*), la principal forma de transporte de carbono en el floema es la sacarosa, por lo que en los tejidos fuente existen simportadores protón/sacarosa (SUT o SUC: “*Sucrose Transporters*”) que se encargan de la carga del azúcar al floema (revisado en Sauer, 2007).

El nitrógeno es otro nutriente esencial en las células vegetales, que puede transportarse en forma de aminoácidos tanto por el xilema como por el floema. La mayoría de transportadores de aminoácidos descritos en plantas actúan también como simportadores protón/aminoácido. En base a la similitud de secuencias, se han definido dos superfamilias de transportadores de aminoácidos: APC (“*Amino acid, Polyamine and Choline transporter superfamily*”) y ATF: (“*Amino acid Transporter Family*”) (Fischer *et al.*, 1998).

1.2 Trabajos previos relacionados con la homeostasis de pH

1.2.1 Trabajos empleando ácidos débiles

Los ácidos débiles son aquellos que en solución acuosa se encuentran en equilibrio entre su forma no disociada o protonada (HA) y su forma disociada (A^-). La constante de dicho equilibrio es la constante de acidez del ácido débil (K_a).



Despejando la concentración de protones: $[H^+] = K_a [HA] / [A^-]$ y sacando logaritmos, se obtiene $pH = pK_a + \log ([A^-]/[HA])$, expresión que relaciona la concentración de las formas protonada y no protonada del ácido con el pH y el pKa del ácido débil.

Por lo tanto, el equilibrio entre la forma protonada y disociada del ácido, depende del pH, y del pKa del ácido débil, de manera que cuando el pH es igual al pKa del ácido, la concentración de la forma protonada (HA) es igual a la de la forma disociada (A^-). Una bajada de pH desplazaría el equilibrio hacia la forma protonada, mientras que un aumento en el pH desplazaría el equilibrio hacia la forma disociada.

A) Inhibición del crecimiento microbiano por ácidos débiles:

Los ácidos débiles orgánicos (Figura 1.4) como el ácido acético ($pK_a=4,75$), propiónico ($pK_a=4,88$), benzoico ($pK_a=4,19$) y sórbico ($pK_a=4,75$), inhiben el crecimiento de hongos y de bacterias. Por este motivo, estas moléculas se han empleado tradicionalmente como conservantes alimentarios, principalmente en la industria panadera (Brul y Coote, 1999).

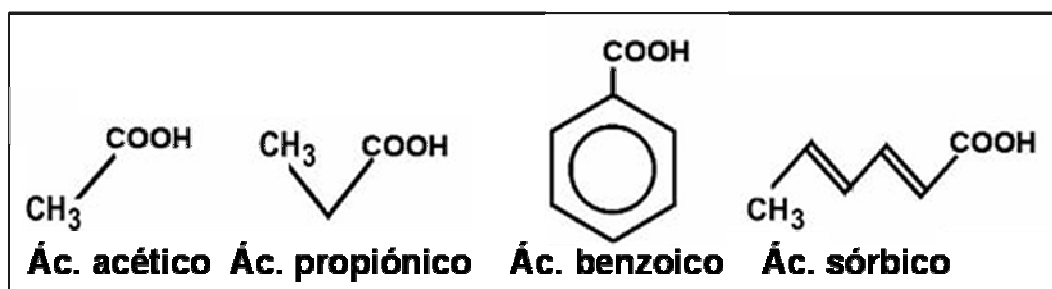


Figura 1.4: Estructura química de cuatro de los principales ácidos débiles utilizados como conservantes alimentarios.

La actividad antimicrobiana de estos ácidos débiles se debe a diversos factores, como su efecto en la homeostasis de pH o alterando la estructura de las membranas celulares. Además, la acumulación en el citosol de los aniones de los ácidos débiles a

altos niveles puede resultar tóxica por sí misma. Estos efectos primarios inducen efectos secundarios como alteración del metabolismo celular, la disminución del contenido en adenosín trifosfato (ATP), y la inducción de estrés oxidativo. A continuación se describen con más detalle los principales efectos de los ácidos débiles sobre los microorganismos.

En primer lugar, los ácidos débiles alteran la homeostasis de pH de las células microbianas. La forma protonada (HA) de estos ácidos es lipofílica (aunque el grado de lipofílicidad varía de un ácido a otro), por lo que es capaz de difundir a través de las membranas celulares y llegar al interior celular. Dado que el pH del citosol es prácticamente neutro, el ácido se disocia pasando a su forma A^- y liberando protones, que no pueden atravesar la membrana plasmática por difusión (Figura 1.5). Por lo tanto, el empleo de ácidos débiles provoca, por un lado, la acumulación del anión del ácido, y por otro, la acidificación del citosol. En relación a este último aspecto, es importante considerar, que cuanto menor sea el pH del medio, más tóxico resultará el ácido débil, ya que habrá más cantidad del ácido débil en su forma protonada, que atravesará la membrana y acidificará el citosol (Beales, 2004).

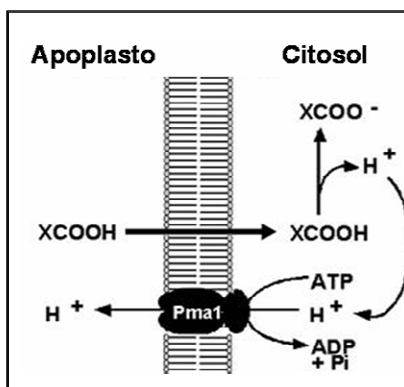


Figura 1.5: Esquema general del modo de acción de los ácidos débiles en las células. El ácido protonado (XCOOH) atraviesa la membrana plasmática y se disocia al llegar al citosol (donde el pH es más alcalino), liberando protones y el anión (XCOO⁻). Los protones pueden ser expulsados por la H⁺-ATPasa de membrana, denominada Pma1p en *S. cerevisiae*. Modificada a partir de Mollapour *et al.*, 2008.

Como se comentó en el apartado 1.1.1 A, la acidificación intracelular puede inhibir importantes **rutas metabólicas**, como la glucólisis, ya que la fosfofructoquinasa de levadura es sensible a la bajada del pH. En el caso concreto del ácido benzoico, se ha observado que el empleo de este ácido (10 mM de ácido benzoico, pH ext 2,5) puede provocar una bajada de 1 unidad en el pH citosólico. Como consecuencia de ello, baja la actividad de la fosfofructoquinasa (Pfk: “*Phosphofructokinase*”), y se reduce la glucólisis. En último término, se observa una **reducción del contenido en ATP** de las levaduras tratadas, lo que va asociado a una reducción del crecimiento (Krebs *et al.*, 1983).

Asimismo, el uso de ácidos débiles lleva a la acumulación del anión A^- en el citosol. Esta acumulación del anión a altos niveles aumenta la osmolaridad del citoplasma, por lo que se incrementa la entrada de agua, lo que puede provocar un aumento excesivo en la presión de turgencia de la célula. Por otro lado, la acumulación del anión puede provocar la producción de radicales libres que lleva al **estrés oxidativo**, considerado un componente esencial del estrés por ácidos débiles en *S. cerevisiae* (Piper *et al.*, 2001). Finalmente, los aniones de los ácidos débiles pueden afectar a determinados **enzimas metabólicos**. En este sentido se ha sugerido que el acetato afecta a la biosíntesis de metionina en *Escherichia coli* (Roe *et al.*, 2002).

Los ácidos débiles más lipofílicos, como el ácido sórbico o el benzoico, pueden afectar a la membrana plasmática, desordenando su estructura y alterando su fluidez (Stratford y Anslow, 1998). Al afectar a la estructura de las membranas, se alteran de un modo indirecto los procesos de transporte. Concretamente, se ha visto que los ácidos más lipofílicos, afectan al proceso de transporte electrónico acoplado a la síntesis de ATP. El mal funcionamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lleva a la producción de radicales libres. Por lo tanto, células de levadura tratadas con ácido benzoico o sórbico sufren una producción excesiva de radicales superóxido (Piper, 1999). Es decir, un tratamiento con ácidos débiles lipofílicos puede provocar por un lado **estrés oxidativo**, y por otro una **disminución en el contenido de ATP** de las células tratadas. La disminución del contenido en ATP ocurriría por dos motivos: en primer lugar, como se ha comentado, la bajada de pH intracelular disminuye la glucólisis, y en segundo lugar, se afecta a la cadena de transporte de electrones. Por estos motivos, las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento celular son menores a medida que aumenta la lipofílicidad del ácido, a pesar de que los pKas de los ácidos sean similares (y por tanto su disociación) (Stratford y Anslow, 1996).

En el caso concreto del ácido acético, se ha descrito que es la causa principal de “envejecimiento” de las células de levadura, es decir, que reduce el tiempo en que las células son capaces mantener su viabilidad en fase estacionaria (Burtner *et al.*, 2009). En relación a esto, se sabe que el ácido acético puede inducir dos tipos de muerte celular en levadura, en función de la concentración empleada. A bajas concentraciones (20-120 mM en *S. cerevisiae*, y 320-800 mM en *Zygosacharomyces bailii*, pH del medio=3) provoca muerte celular programada, con características propias de la apoptosis, y a concentraciones mayores causa necrosis (Ludovico *et al.*, 2001; Ludovico *et al.*, 2003). El proceso de muerte celular programada en respuesta a ácido acético se minimiza si las

células han sido previamente adaptadas a estrés ácido, y parece estar mediado por la producción de ROS (Giannattasio *et al.*, 2005). Sin embargo, más recientemente, se ha descrito que el acético puede provocar muerte celular programada de forma dependiente o independiente de ROS (Guaragnella *et al.*, 2010).

Otro efecto de los ácidos débiles en la célula de levadura es la inhibición de la toma de aminoácidos aromáticos del medio. Esto hace que mutantes con auxotrofias para aminoácidos aromáticos, como el triptófano, sean hipersensibles a ácido sórbico o acético (Bauer *et al.*, 2003).

Finalmente, es importante destacar que el tratamiento con ácidos débiles induce, una respuesta a estrés muy importante, mediante la cual la célula trata de recuperar su homeostasis. Esta respuesta incluye la activación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática y de vacuola (Holyoak *et al.*, 1996; Carmelo *et al.*, 1997), enzimas que consumen mucha energía. Esto, unido con la ya mencionada inhibición de la glucólisis y la alteración de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, hace que los ácidos débiles provoquen una bajada de las reservas de energía disponibles para el crecimiento y para las funciones metabólicas.

B) Respuesta de la levadura frente al estrés ácido:

A pesar de todos estos efectos adversos sobre el crecimiento microbiano, en ocasiones, algunos tipos de hongos (“*spoilage yeasts*”), entre los que se encuentran muchos del género *Zygosaccharomyces* y algunas cepas de *S. cerevisiae*, son capaces de crecer en presencia de los niveles máximos de conservantes (ácidos débiles) permitidos en alimentación, por lo que suponen una amenaza para los alimentos así conservados (Loureiro, 2000; Piper *et al.*, 2001). Para poder diseñar estrategias apropiadas para evitar que estos organismos dañen los alimentos, es necesario investigar sobre los mecanismos de tolerancia de estos microorganismos a los ácidos débiles. En este sentido, se han realizado numerosos trabajos empleando el organismo modelo *S. cerevisiae*, en los que se analiza la respuesta a nivel transcripcional a estos ácidos débiles. Por otro lado, se han realizado varios rastreos tratando de determinar los genes relevantes para la adaptación y tolerancia a ácidos débiles en levadura. Todos estos trabajos han permitido identificar los procesos y genes que forman parte de la respuesta, la adaptación o la resistencia de la levadura al estrés por ácidos débiles. A continuación se describen algunos de ellos:

B-1 Respuestas relacionadas con la homeostasis de pH:

Dado que los ácidos débiles alteran la homeostasis de pH, cualquier proceso que permita la restauración de dicha homeostasis, contribuirá a la tolerancia a estos ácidos.

B-1.1 Acción de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática: Pma1p

Como se ha comentado en relación a la célula vegetal, la bomba de protones de la membrana plasmática es un importante método de regulación de la homeostasis de pH. Por ello, en principio, la acidificación intracelular causada por los ácidos débiles podría ser contrarrestada por la acción de la H⁺-ATPasa, que actuaría expulsando el exceso de protones al exterior celular. De hecho, en células de *S. cerevisiae* tratadas con ácidos débiles se observa un incremento en la actividad de la H⁺-ATPasa (Piper *et al.*, 1997a). Asimismo, una menor expresión del gen *PMA1* de levadura (que codifica para la H⁺-ATPasa de membrana plasmática) aumenta la sensibilidad de las células a ácido sórbico (Holyoak *et al.*, 1996). Por último, se ha observado que el efecto antimicrobiano del ácido sórbico se incrementa en presencia de compuestos que inhiben la acción de la H⁺-ATPasa (Kubo y Lee, 1998).

Sin embargo, la expulsión de protones por la H⁺-ATPasa, consume gran cantidad de energía en forma de ATP. En condiciones normales de crecimiento, la actividad de este enzima consume entre el 10 y 15% del total de ATP producido. Sin embargo, cuando su actividad se incrementa para restaurar la homeostasis de pH, puede llegar a consumir entre el 40 y el 60% (Holyoak *et al.*, 1996). En relación a esto, se ha identificado una proteína de membrana (Hsp30p), inducida por ácidos débiles, que actúa regulando negativamente la actividad de la H⁺-ATPasa de membrana, inducida en condiciones de estrés por ácidos débiles. Probablemente, la célula trata de conservar así la energía que, de otro modo, consumiría la H⁺-ATPasa tratando de expulsar el exceso de protones que entran en la célula (Piper *et al.*, 1997a).

B-1.2 Toma y homeostasis de potasio:

Estudios realizados en levadura revelan la estrecha relación existente entre la homeostasis de protones y la homeostasis de potasio. Como se explicó anteriormente, el aumento de actividad de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática está limitado porque provoca una hiperpolarización de la membrana, que debe ser compensada bien por la entrada de cationes como el potasio o por la salida de aniones orgánicos. En el caso de levadura, se conoce que la actividad de los transportadores Trk1p y Trk2p (principales sistemas de toma de potasio), es necesaria para el control del pH intracelular (Yenush *et*

al., 2002), ya que la entrada de potasio compensa la salida de protones mediada por la H^+ -ATPasa de membrana Pma1p.

Por otro lado, la búsqueda de mutantes sensibles a ácidos débiles ha determinado que mutantes en genes relacionados con la toma de potasio como Trk1p, Nha1p o Arl1p, son susceptibles a ácido acético (Mira *et al.*, 2010b). Del mismo modo, la pérdida de función en el gen *TRK1*, confiere sensibilidad a ácido benzoico (Macpherson *et al.*, 2005). Estos trabajos indican que la toma de potasio tiene un papel fundamental en la tolerancia a ácidos débiles, probablemente por su papel en el control de la homeostasis de pH.

Por lo tanto, la homeostasis de potasio es esencial para mantener la homeostasis de pH, pero a su vez el pH es capaz de regular la homeostasis de potasio. De hecho, una de las señales que lleva a la célula de levadura a activar el transporte de potasio es la disminución del pH intracelular (Figura 1.6). Concretamente, esa bajada de pH es percibida por la subunidad reguladora Hal3p, que se une a la proteína fosfatasa Ppz1p, inhibiéndola. De este modo, la proteína Ppz1 no es capaz de defosforilar al transportador de potasio Trk1p, por lo que éste se activa, y se incrementa la toma de potasio. De modo contrario, si el pH intracelular aumenta, la subunidad reguladora Hal3p, liberará a la fosfatasa Ppz1p, que defosforilaría a Trk1p, reduciendo, por tanto, la toma de potasio (Yenush, 2005).

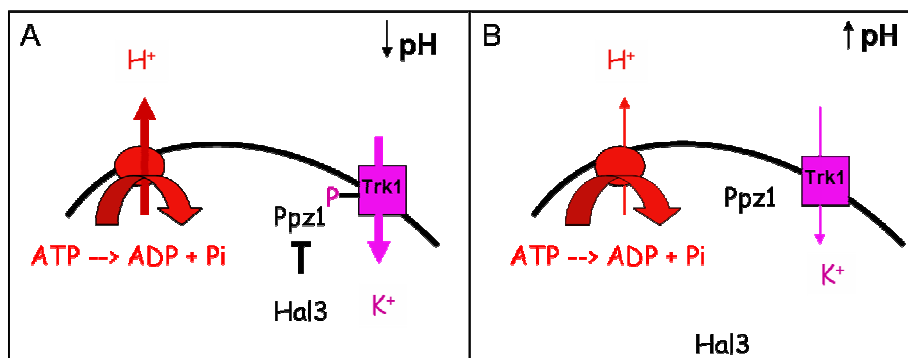


Figura 1.6: Modelo propuesto para la actuación de las proteínas Hal3p y Ppz1p regulando el transportador de toma de potasio Trk1p en respuesta a cambios en el pH citosólico. **A)** Actuación en condiciones de bajo pH intracelular. La subunidad Hal3p percibe la bajada de pH e inhibe a la proteína PPz1. El transportador Trk1 está fosforilado y activo. **B)** Actuación en condiciones de pH alcalino. La subunidad reguladora Hal3p percibe ese pH y libera a la fosfatasa Ppz1p, que defosforila al transportador Trk1 y disminuye su actividad.

Por lo tanto, la interacción entre las proteínas Hal3p y Ppz1p actúa como un sensor de pH que modula la homeostasis de potasio y de protones, a través de la regulación del transportador de potasio Trk1p.

B-1.3 Papel de la H⁺-ATPasa vacuolar:

Otra forma de controlar la acidificación del citosol causada por los ácidos débiles, es mediante la acción de la H⁺-ATPasa vacuolar (V-ATPasa), que podría introducir el exceso de protones en la vacuola.

En este sentido, se ha visto que la pérdida de función de genes que codifican para subunidades de la H⁺-ATPasa vacuolar o para proteínas necesarias para su biogénesis o ensamblaje provoca sensibilidad a ácidos débiles (Tabla I). Además, el mutante de pérdida de función *rim 101*, que es más sensible a ácido propiónico, no es capaz de acidificar la vacuola en respuesta a este ácido débil (Mira *et al.*, 2009).

Tabla I: Mutantes relacionados con la V-ATPasa que son sensibles a ácidos débiles

Gen	Codifica para/ función	Sensible a:	Referencia
<i>VMA2</i>	Subunidad B dominio V1	Acético, láctico clorhídrico,	Kawahata <i>et al</i> 2006.
<i>VMA4</i>	Subunidad E dominio V1	Acético, láctico clorhídrico, sórbico, propiónico	Kawahata <i>et al</i> 2006; Mollapour <i>et al.</i> 2004; Mira <i>et al</i> 2009.
<i>VMA5</i>	Subunidad C dominio V1	Acético, láctico clorhídrico, sórbico, propiónico	Kawahata <i>et al</i> 2006; Mollapour <i>et al.</i> 2004; Mira <i>et al</i> 2009.
<i>VMA6</i>	Subunidad d subcomplejo Vo	Acético, láctico clorhídrico	Kawahata <i>et al</i> 2006.
<i>VMA7</i>	Subunidad F dominio V1	Acético, láctico clorhídrico, sórbico	Kawahata <i>et al</i> 2006; Mollapour <i>et al.</i> 2004.
<i>VMA8</i>	Subunidad D dominio V1	Acético, láctico clorhídrico, sórbico	Kawahata <i>et al</i> 2006; Mollapour <i>et al.</i> 2004.
<i>VMA9</i>	Subunidad e subcomplejo Vo	Propiónico	Mira <i>et al</i> 2009
<i>VMA13</i>	Subunidad H dominio Vq	Acético, láctico clorhídrico, sórbico	Kawahata <i>et al</i> 2006; Mollapour <i>et al.</i> 2004.
<i>VMA21</i>	Ensamblaje V-ATPasa	Sórbico	Mollapour <i>et al.</i> 2004
<i>VMA22</i>	Ensamblaje V-ATPasa	Propiónico	Mira <i>et al</i> 2009
<i>VPH1</i>	Subunidad del dominio Vo	Propiónico	Mira <i>et al</i> 2009
<i>VPH2</i>	Ensamblaje V-ATPasa	Sórbico, propiónico	Mollapour <i>et al.</i> 2004; Mira <i>et al</i> 2009
<i>TFP1</i>	Subunidad A dominio V1	Propiónico	Mira <i>et al</i> 2009
<i>TFP3</i>	Subunidad e' subcomplejo Vo	Propiónico	Mira <i>et al</i> 2009

B-2 Respuestas relacionadas con la acumulación del anión:

Además de una eficaz expulsión de protones, la adaptación de *S. cerevisiae* a ácidos débiles, requiere de la existencia de un sistema de eliminación del anión del ácido orgánico, ya que, como se ha explicado anteriormente, la acumulación del anión en el citosol también puede resultar tóxica para la célula. Por lo tanto, los mecanismos

involucrados en la disminución de la concentración citosólica de los aniones de los ácidos débiles, son de gran relevancia en la tolerancia de la levadura a estos ácidos.

B-2.1 War1p y Pdr12: ácidos moderadamente lipofílicos:

En relación a la expulsión de los aniones de los ácidos moderadamente lipofílicos, se ha determinado que el transportador Pdr12p, perteneciente a la familia de transportadores ABC (“*ATP Binding Cassete*”), juega un papel fundamental (Figura 1.7).

Este transportador se expresa a niveles muy bajos en células no estresadas, pero su expresión se induce en condiciones de estrés por ácidos débiles (sorbico y benzoico pero no acético) (Piper *et al.*, 1998; Hatzixanthis *et al.*, 2003; Schüller *et al.*, 2004). Asimismo, un mutante de pérdida de función en este gen es sensible a ácidos débiles de cadena corta moderadamente lipofílicos como el sorbico y el benzoico (Piper *et al.*, 1998), pero no muestra mayor sensibilidad al ácido acético (Bauer *et al.*, 2003). *In vivo*, Pdr12p es capaz de expulsar ácido benzoico y sorbico de la célula (Piper *et al.*, 1998; Hatzixanthis *et al.*, 2003), lo que sugiere que este transportador confiere resistencia a estos ácidos por mediar la salida del anión del citosol de manera activa (en contra de su gradiente de concentración). De este modo, Pdr12p contribuye a la tolerancia al ácido por dos motivos: por un lado reduce los niveles intracelulares del ácido orgánico y, al mismo tiempo, favorece la acción de la H⁺-ATPasa, ya que transporta una carga negativa que ayuda a compensar las cargas positivas expulsadas por la bomba de protones.

El estudio de la regulación de este transportador indica que puede llevarse a cabo tanto a nivel transcripcional como a nivel post-traducciona. De hecho, el aumento en la expresión de *PDR12* en respuesta a estrés ácido es dependiente del factor de transcripción de la familia Zn₂Cys₆ War1p (Kren *et al.*, 2003), y *PDR12* es la diana principal de War1p en estas condiciones (Schüller *et al.*, 2004). A nivel post-traducciona, se ha descrito que la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina Cmk1p, es un regulador negativo de la actividad de Pdr12. Por ello, un mutante en el gen *cmk1* muestra resistencia a ácidos débiles, ya que tiene activado constitutivamente el transportador Pdr12p (Holyoak *et al.*, 2000).

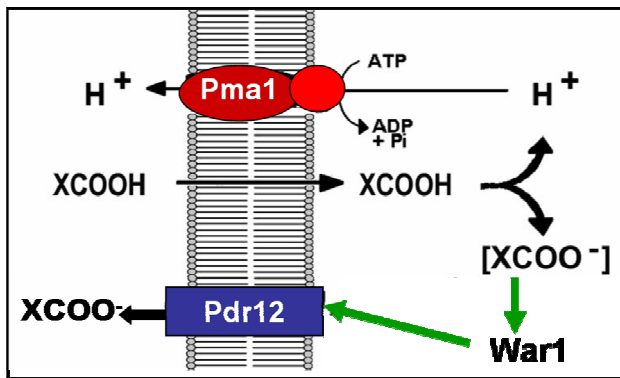


Figura 1.7: Principales elementos implicados en la salida de los aniones de ácidos moderadamente lipofílicos. Modificada a partir de Mollapour *et al.*, 2008.

B-2.2 HOG1 y FPS1: Ácido acético

En el caso del ácido acético, es necesario considerar que puede ser metabolizado por las células de levadura. Sin embargo, en presencia de glucosa (cultivo reprimido por glucosa), *S. cerevisiae* no utiliza el ácido acético como fuente de carbono. Por ello, éste se acumula en el citosol, como ocurre con otros ácidos débiles no metabolizables (ácido sórbico y benzoico), llegando a ser tóxico. Sin embargo, el mecanismo empleado por las células de levadura para minimizar la acumulación del anión en el citosol es diferente al empleado en el caso de los ácidos más lipofílicos.

Se ha descrito que el tratamiento de cultivos de levadura con 100 mM ácido acético (pH 4,5) induce la transcripción de la MAP-quinasa (MAPK) Hog1p (Mollapour y Piper, 2006). Asimismo, se ha visto que esta proteína es necesaria para adquirir resistencia al ácido acético (Mollapour y Piper, 2006). Por otro lado, se ha observado que este ácido, en su forma protonada, es suficientemente pequeño para atravesar la membrana por difusión pasiva a través de la acuagliceroporina Fsp1p, localizada en la membrana plasmática. De hecho, éste es el principal modo de entrada de acético a la célula de levadura, ya que un mutante en el gen *FPS1* no acumula ácido acético (Mollapour y Piper, 2007). Por último, se ha demostrado que la MAP-quinasa Hog1p fosforila al canal Fsp1, al ser activada por acético. Esta fosforilación es la señal para que Fps1p sea ubiquitinada y posteriormente se endocite y sea transportada a vacuola para su degradación (Mollapour y Piper, 2007), (Figura 1.8).

Por lo tanto, la eliminación del canal Fsp1p de la membrana plasmática, mediada por Hog1p, elimina la principal vía de entrada de acético a la célula, generando tolerancia a altos niveles de dicho ácido, que de otro modo resultarían tóxicos.

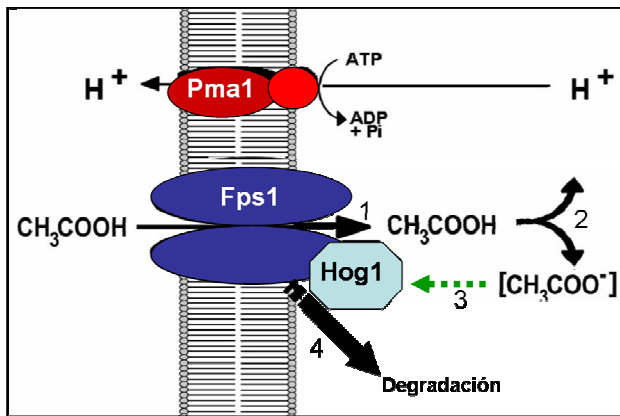


Figura 1.8: Principales elementos implicados en disminuir la entrada de ácido acético a la célula. El ácido entra en su forma protonada a través del canal Fps1p (1), una vez en el interior se disocia (2) y el anión del ácido activa a la proteína quinasa Hog1p (3), que fosforila al canal Fps1p. Esta fosforilación es la señal que desencadena la endocitosis de Fps1p para su degradación (4). (Modificada a partir de Mollapour *et al* 2008).

B-3 Respuesta transcripcional a ácidos débiles en levadura:

Se han realizado varios trabajos analizando los cambios que se producen en el transcriptoma de *S. cerevisiae* tras un tratamiento con diferentes ácidos débiles. Estos estudios transcriptómicos han demostrado que la adaptación y resistencia de *S. cerevisiae* a ácidos débiles incluye diversos sistemas reguladores que se indican a continuación. Algunos de ellos ya han sido comentados en apartados anteriores.

1-Los factores de transcripción Msn2p/Msn4p involucrados en la respuesta general a estrés, regulan también la expresión de muchos genes inducidos en respuesta a estrés por ácidos débiles (Schüller *et al.*, 2004).

2-El factor de transcripción War1p, cuya inducción es más específica en respuesta a ácidos débiles moderadamente lipofílicos y que es necesario para la activación de *PDR12* (Piper *et al.*, 2001; Schüller *et al.*, 2004)

3- El factor de transcripción Haa1p involucrado en la respuesta a estrés por ácidos débiles poco lipofílicos (Fernandes *et al.*, 2005).

4- La ruta RIM101, ya que la expresión de *RIM101* se requiere para la acidificación de la vacuola, y la estructura de la pared celular, procesos que afectan positivamente a la tolerancia a ácido propiónico (Mira *et al.*, 2009).

3- Ruta independiente de Msn2p/Msn4p y de War1p, que incluye el gen *HSP30*.

A continuación se describen con más detalle los procesos controlados por el factor de transcripción Haap1p, al que no se ha hecho referencia hasta ahora.

El factor de transcripción Haa1p está involucrado principalmente en la respuesta a los ácidos débiles menos lipofílicos: acético, propiónico y láctico (Fernández *et al.*, 2005; Abbott *et al.*, 2008; Mira *et al.*, 2010a). En el caso del ácido acético, se ha descrito que este factor de transcripción regula de manera directa o indirecta, aproximadamente el 85% de los genes de respuesta a este ácido (Mira *et al.*, 2010a).

En respuesta a estrés con ácidos débiles Haap1 controla la rápida inducción de diversos genes, que incluyen quinasas, transportadores de resistencia a múltiples drogas “*multidrug resistance transporters*”, proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos, en el procesamiento de ácidos nucleicos, y proteínas de función desconocida (Fernandes *et al.*, 2005; Mira *et al.*, 2010a). Sin embargo, de todos estos genes, sólo se ha demostrado la implicación de unos pocos en la tolerancia a ácidos débiles. Entre ellos se encuentran, los genes *TPO2* y *TPO3*, *SPH1*, *SAP30* y *HRK1*.

TPO2 y *TPO3* codifican para dos “*multidrug transporters*”, transportadores de la familia “*major facilitator superfamily*” requeridos para la resistencia de *S. cerevisiae* a la poliamina espermidina, ya que median su expulsión de la célula (Albertsen *et al.*, 2003). Mutantes de levadura en el gen *TPO3* muestran una mayor sensibilidad acético, lo que correlaciona con una mayor acumulación del ácido en las células tratadas (Fernandes *et al.*, 2005).

SPH1 codifica para una proteína de pared celular anclada a glicosilfosfatidilinositol que, en respuesta a ácidos, parece llevar a cabo una remodelación de la pared celular, disminuyendo su porosidad y reduciendo de este modo el acceso del ácido a la membrana plasmática. Así se minimiza tanto el daño a esta membrana como la acidificación intracelular. La expresión de *SPH1* confiere resistencia especialmente a ácidos más lipofílicos como el ácido benzoico (Simoes *et al.*, 2006).

SAP30 codifica para una subunidad de un complejo histona deacetilasa. La expresión de este gen confiere protección frente al ácido acético (Mira *et al.*, 2010b). Dado que la acetilación/desacetilación de histonas modula la accesibilidad para los factores de transcripción de sus promotores diana, es uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción. Mira y colaboradores proponen que Sap30p modula la respuesta transcripcional a ácido acético afectando la actividad de factores de transcripción involucrados en dicha respuesta, como Msn2p o Msn4p.

Hrk1p es una proteína perteneciente a la familia de proteína quinasas que regulan transportadores de membrana plasmática. La expresión de *HRK1* confiere tolerancia a ácido acético, y la pérdida de función de este gen provoca la acumulación de ácido acético en las células de levadura estresadas. Esto sugiere que la tolerancia que otorga la expresión de este gen se debe, al menos parcialmente, a su participación en la expulsión del acetato intracelular, probablemente activando, por fosforilación, a un

transportador de acetato localizado en la membrana plasmática, que de momento no ha sido identificado (Mira *et al.*, 2010a).

B-4 Otras respuestas relevantes:

Los estudios del transcriptoma de levadura en respuesta a ácidos débiles, así como el rastreo de mutantes sensibles a estos ácidos han permitido conocer procesos celulares que resultan importantes en la respuesta a ácidos débiles.

En este sentido, se ha visto que genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol (determinante de la fluidez de la membrana plasmática) se inducen en respuesta a estrés por ácido sórbico (Schüller *et al.*, 2004) y se requieren para tolerar a ácido acético (Mira *et al.*, 2010b), y propiónico (Mira *et al.*, 2009).

Asimismo, mutantes en genes necesarios para la generación de energía y ATP son sensibles a ácido sórbico (Schüller *et al.*, 2004) y propiónico (Mira *et al.*, 2010b). Esto es lógico considerando que uno de los efectos de los tratamientos con ácidos débiles es la reducción del contenido energético de la célula.

Igualmente, se ha visto que mutantes en genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos son sensibles a ácido sórbico (Schüller *et al.*, 2004), probablemente porque la toma de aminoácidos en condiciones de estrés ácido se ve afectada (Bauer *et al.*, 2003).

Finalmente, las células de levadura pueden responder al estrés modificando la organización de la pared celular, probablemente reduciendo su porosidad. De este modo se limita el tamaño y el tipo de moléculas que entran en contacto con la membrana plasmática. Los rastreos de la colección de mutantes de levadura en presencia de diversos ácidos débiles, indican que en estas condiciones, la arquitectura de la pared celular juega también un importante papel. De hecho, mutantes en genes relacionados con la síntesis de β -1,3 glucano, β -1,6 glucano y quitina (polisacáridos de la pared celular), así como en genes involucrados en el ensamblaje y remodelación de la pared muestran mayor sensibilidad a ácido acético (Mira *et al.*, 2010b). Asimismo, mutantes con deficiencias en las manosiltransferasas, que catalizan la manosilación de proteínas para ser incorporadas a la pared celular, son más sensibles tanto a ácido sórbico (Mollapour *et al.*, 2004), como a ácido acético (Mira *et al.*, 2010b). Del mismo modo, la expresión de *KNHI* (codifica para una proteína involucrada en la síntesis de β -1,6 glucano) y *CWPI* (codifica para una manoproteína de la pared celular), cuya función está relacionada con el ensamblaje y la estructura de la pared celular, es necesaria para

la tolerancia a ácido propiónico (Mira *et al.*, 2009). Ambos genes son dianas del factor de transcripción Rim101p, por lo que la ruta de Rim101p no sólo tiene un papel en el ensamblaje de la pared celular (Castrejon *et al.*, 2006), sino que su expresión es necesaria para la remodelación de la pared celular en condiciones de estrés por ácido propiónico (Mira *et al.*, 2009).

C- Ácidos débiles en plantas:

Hasta el momento, no existe mucha información disponible relacionada con el estudio de la toxicidad de los ácidos débiles o con los mecanismos implicados en la tolerancia a estos ácidos en células vegetales.

Sin embargo, sí se ha comprobado que el tratamiento con ácidos débiles (acético y cítrico) de células vegetales provoca una bajada en el pH intracelular, y una hiperpolarización de la membrana plasmática (Brummer *et al.*, 1984), probablemente como consecuencia de la activación de la bomba de protones H⁺-ATPasa. Por ello, se asume que, al igual que en el caso de las células de levadura, en las plantas los ácidos también atraviesan la membrana plasmática en su forma protonada y se disocian en el citosol, provocando la bajada del pH citosólico.

Por este motivo, algunos trabajos han utilizado previamente tratamientos con ácidos débiles como herramienta para estudiar los mecanismos de regulación de la homeostasis de pH en células vegetales. Concretamente, Mathieu y colaboradores establecieron en 1986 que en células de *Acer pseudoplatanus* los principales métodos de control de la homeostasis de pH tras el tratamiento con ácido son los comentados al inicio: el consumo de protones (“*biochemical pH stat*”) y la expulsión de éstos al exterior celular (“*biophysical pH stat*”) (Mathieu, *et al.*, 1986).

Por otro lado, en un trabajo reciente se ha tratado de demostrar, de forma directa, la implicación de la bomba de protones de membrana plasmática (H⁺-ATPasa) en la regulación del pH citosólico en células vegetales. Para ello, se estudió la activación a nivel posttraduccional de este enzima en respuesta a diferentes ácidos débiles. Concretamente, se observó la fosforilación de la penúltima treonina en la bomba de protones PMA2 de células BY2 de tabaco (*N. tabacum*). Los resultados del trabajo indican que la adición de ácido propiónico y cítrico provoca un incremento fuerte y estable de la fosforilación de la penúltima treonina de la proteína PMA2 de tabaco (Bobik *et al.*, 2010).

Todos estos estudios indican, en primer lugar, que los ácidos débiles tienen efectos similares en la célula vegetal a los observados en microorganismos (al menos a nivel de alteración de la homeostasis de pH). Asimismo, apoyan la hipótesis ampliamente aceptada de que la bomba de protones de la membrana plasmática tiene un papel crucial en la homeostasis de pH de la célula vegetal.

1.2.2 Otros trabajos relacionados con la homeostasis de pH

El pH es un factor variable en los suelos, que condiciona el crecimiento vegetal. Concretamente, los suelos ácidos ocasionan importantes pérdidas en los cultivos. Además de causar problemas de fitotoxicidad por exceso de iones como el aluminio, o de deficiencia de algunos nutrientes, los protones de la rizosfera inhiben el crecimiento radicular. Por este motivo, se han realizado varios trabajos dirigidos a comprender la respuesta de la planta a la acidificación del medio externo.

Aunque bajada de pH del medio exterior no siempre va acompañada de una acidificación del citosol, los resultados de algunos de estos trabajos apuntan a genes implicados en la regulación del pH intracelular, como la bomba de protones. Por ejemplo, se ha visto que la expresión en plantas de *A. thaliana* de transgenes con una disrupción en el extremo C-terminal de la proteína AHA3, permite un mejor crecimiento de las plántulas en medio con pH ácido (Young *et al.*, 1998). De modo similar a lo indicado para *A. thaliana*, se ha comprobado la mutación de determinados residuos de la proteína PMA2 de *Nicotiana plumbaginifolia*, genera proteínas activas constitutivamente, y la expresión en levadura de estas versiones mutadas, permite su crecimiento en bajo pH (Morsomme *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha empleado un abordaje de genética directa para encontrar mutantes de *A. thaliana* hipersensibles a la acidificación de la rizodermis. De este modo, se ha aislado el mutante recesivo *stop1* (“*sensitive to proton rhizotoxicity*”), cuya mutación inactiva un factor de transcripción de la familia “*zinc finger*”. Además de ser hipersensible a bajo pH externo, *stop1* es más sensible a Al^{+3} , (pero no a otros cationes tóxicos como cadmio, cobre, manganeso o sodio). Esta sensibilidad a aluminio se explica porque en el mutante *stop1*, la liberación de malato al medio externo, que favorece la tolerancia en presencia de Al^{+3} , es mínima, ya que no se induce la expresión del gen *ALMT1*, responsable de su expulsión. Esto señala al factor de transcripción STOP1 como regulador de la expresión de ALMT1, si bien esta proteína debe regular

otros genes implicados en la sensibilidad a protones, ya que el mutante *almt1* no muestra sensibilidad a bajo pH. De modo que STOP1, es un factor de transcripción con un papel en la respuesta al exceso de Al^{+3} , así como a la bajada de pH externo, estreses que suelen coexistir en la naturaleza (Iuchi *et al.*, 2007).

Finalmente, se ha llevado a cabo una aproximación transcriptómica para estudiar los cambios en la expresión génica producidos en respuesta a un bajo pH externo (Lager *et al.*, 2010). En este trabajo se ha observado, en primer lugar, que los genes que alteran su expresión en condiciones de bajo pH son similares a los afectados por auxinas o elicitores de patógenos, y muestran menos parecido con genes alterados en respuesta a estrés abiótico. Asimismo, muchos de los genes alterados, están involucrados en la modificación de la pared celular, y en la señalización por calcio. De hecho, en los promotores de los genes con expresión alterada han encontrado una sobrerrepresentación de motivos asociados con calcio y calmodulina. Eso apunta a que existe una evidente relación entre la percepción del pH y el calcio intracelular.

Por lo tanto, aunque algunos de los mecanismos implicados en la homeostasis pH intracelular (especialmente la bomba de protones) ayudan a tolerar pH externo bajo, el empleo de un medio externo ácido no parece el mejor abordaje para estudiar la regulación de la homeostasis de pH citosólico. De hecho, los resultados de los estudios transcriptómicos en plantas, muestran que los efectos de la bajada de pH externo son diferentes a los provocados por la acidificación intracelular (estudios en levadura). Sin embargo, sería necesario realizar ensayos de transcriptómica empleando ácidos débiles en un sistema vegetal, para poder comparar de forma directa si los efectos de la acidificación externa, se asemejan o no a los obtenidos mediante tratamientos con ácidos débiles (acidificación interna).

1.3 Homeostasis de otros cationes monovalentes

Al igual que en el caso de los protones, las células vegetales deben mantener una homeostasis para otros iones. Por ello, en condiciones normales en la célula existe un flujo continuo de entrada y salida de iones, regulado de manera que la concentración para cada ion, resultante del flujo neto, se ajusta a los requerimientos celulares. En estas condiciones el pH en el citosol se mantiene en torno a la neutralidad, las concentraciones de Na^+ y Cl^- varían entre 1 y 10 mM, las de K^+ entre 100 y 200 mM y las de Ca^{2+} entre 100 y 200 nM (Niu *et al.*, 1995). Por lo tanto, de forma general, las células vegetales tienden a acumular principalmente K^+ en el citosol, mientras que otros

iones como el Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} y el H^+ son expulsados al apoplasto o compartimentados en la vacuola.

Las proteínas encargadas del transporte de iones a través de la membrana plasmática o del tonoplasto y su regulación, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de esta homeostasis iónica. Estas proteínas integrales de membrana pueden funcionar como canales o como transportadores (Figura 1.9). Los canales (“*channels*”) forman poros hidrofílicos a través de la membrana lipídica, que cuando están abiertos permiten el paso de solutos específicos (iones inorgánicos de tamaño y carga apropiados) a través de ellos, de forma rápida. Los transportadores (“*carriers*”) unen previamente el soluto específico que va a ser transportado y sufren una serie de cambios conformacionales que posibilitan la transferencia de dicho soluto a través de la membrana (Alberts *et al.*, 2000).

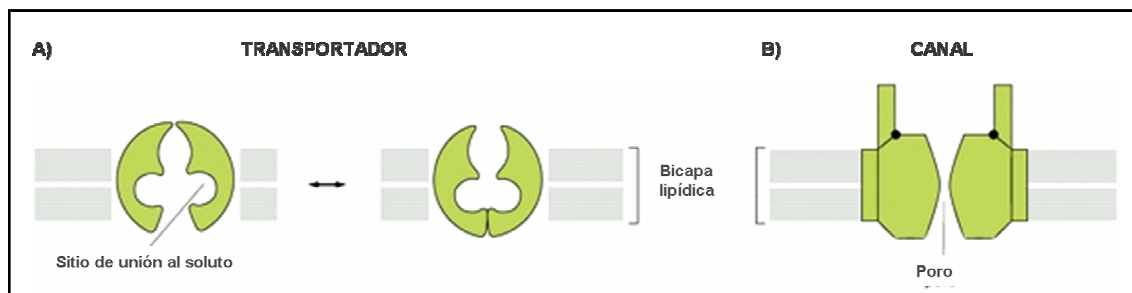


Figura 1.9: Canales y transportadores. Modificada a partir de Alberts *et al.*, 2000.

Dado que este trabajo se centra en la homeostasis de protones, y considerando la estrecha relación existente entre la homeostasis de protones y la de otros cationes, resulta necesario considerar algunos aspectos de la homeostasis de otros dos cationes monovalentes como el Na^+ y el K^+ .

1.3.1 Homeostasis de potasio en *A. thaliana*

Aunque las concentraciones de potasio en la solución del suelo oscilan entre 0,2 y 10 mM, el potasio es el catión más abundante en el citosol, por lo que constituye entre el 2 y el 10% del peso seco de la planta. En el interior celular, el potasio cumple funciones básicas como la neutralización de la carga eléctrica negativa (aniones orgánicos e inorgánicos), el mantenimiento de la turgencia, necesaria para el crecimiento celular, y el control de la polarización de la membrana (Lebaudy *et al.*, 2007). En relación a este último aspecto, ya se comentó en apartados anteriores, que el potencial de membrana existente en las células vegetales se mantiene en un rango

determinado principalmente por la acción opuesta de la H⁺-ATPasa y de los mecanismos de toma del ión potasio.

A continuación se describen los principales mecanismos de toma de potasio en la célula vegetal:

Epstein y colaboradores propusieron la existencia de dos mecanismos de toma de potasio que trabajan en la membrana plasmática de forma simultánea (Epstein *et al.*, 1963) y que son responsables del patrón bifásico de toma de potasio por las raíces de cebada. En ese modelo se distinguen el sistema de alta afinidad o mecanismo I, que actuaría en un rango de concentraciones de K⁺ extracelular del orden micromolar, y el sistema de baja afinidad o mecanismo II, que funcionaría cuando las concentraciones de potasio son del orden milimolar. El sistema de alta afinidad se ha asociado tradicionalmente con la toma de potasio a través de transportadores y de forma activa, mientras que el sistema de baja afinidad se ha asociado con los canales de potasio. Sin embargo, varios trabajos posteriores indican que un único transportador puede ser responsable de la incorporación bifásica del potasio (Dalton, 1984; Fu y Luan 1998). Por ejemplo, se ha comprobado en *A. thaliana*, la implicación de un canal de potasio (AKT1) en el transporte de alta afinidad en raíces (Hirsch *et al.*, 1998). Por otro lado, la sobreexpresión del transportador de potasio KUP1 (“*K⁺ Uptake Permease 1*”) en células de *A. thaliana* indicó que KUP1 está implicado principalmente en el transporte de potasio de alta afinidad, aunque también se detectó cierto transporte de potasio en el rango de la baja afinidad (Kim *et al.*, 1998). Por lo tanto, afirmar que los transportadores de potasio median la toma de alta afinidad mientras que los canales transportan potasio en el rango de baja afinidad, es una simplificación, que no se ajusta a lo observado experimentalmente. Lo que ocurre realmente, es que los transportadores de alta afinidad pueden funcionar, saturados, a altas concentraciones de potasio, y los transportadores de baja afinidad pueden funcionar a bajas concentraciones de potasio, y contribuir significativamente al transporte, siempre que el cociente V_{max}/K_m tenga un valor elevado.

A nivel molecular, al menos 35 genes de *A. thaliana* codifican para sistemas de transporte de potasio. Estos genes pueden agruparse en 3 familias de canales altamente selectivos, 3 familias de canales poco selectivos y tres familias de transportadores. A continuación se describe brevemente cada una de ellas.

A) Canales de potasio:

Los canales de potasio median el transporte de este catión a favor de su gradiente electroquímico. Estos canales pueden clasificarse en canales muy selectivos para potasio y canales poco selectivos (revisado en Very y Sentenac, 2002).

A-1 Los canales altamente selectivos son proteínas multiméricas formadas por subunidades denominadas subunidades α que se caracterizan por presentar uno o varios poros (P). En la proteína funcional, se asocian 4 dominios P para formar la vía de paso del catión a través del canal. En los dominios P, estos canales incluyen un motivo conservado GYGD/E, que actúa como “filtro de selección” haciendo que los canales sean capaces de discriminar claramente el K^+ frente al Na^+ . Se conocen 3 familias de canales de potasio altamente selectivos: “*Shaker*”, *TPK* y “*KIR*” (*K⁺ Inward Rectifier channels*) (revisado en Lebaudy *et al.*, 2007).

A-1.1 Canales tipo “Shaker”:

Los canales pertenecientes a esta familia muestran similitud con los canales de potasio de animales controlados por voltaje. Miembros de esta familia fueron los primeros canales de potasio identificados a nivel molecular en plantas. Hasta el momento, todos los canales estudiados de *A. thaliana* pertenecientes a esta familia se localizan en el plasmalema.

Estructura

Los canales tipo “*Shaker*” están formados por 4 subunidades α que se organizan alrededor de un poro central. Cada subunidad posee una zona hidrofóbica formada por 6 segmentos transmembrana TMS. El cuarto segmento transmembrana posee residuos cargados positivamente que actúan como un sensor del voltaje (Figura 1.10). Entre el 5° y el 6° TMS, existe un lazo altamente conservado denominado “dominio P” (Poro) donde se encuentra el motivo GYGD que determina la selectividad del poro conductor de iones. La zona C-terminal de los canales “*Shaker*” posee dominios reguladores, como un sitio putativo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) y una región K_{HA} (rica en residuos hidrofóbicos y ácidos), que debe estar involucrada en la formación de los tetrámeros y/o en la agrupación de los canales en la membrana. En 6 de los 9 canales “*Shaker*” de *A. thaliana* entre estos dos dominios se encuentra el dominio ankirina (Anky), posible sitio de interacción con proteínas reguladoras.

Clasificación

Los canales tipo “*Shaker*” se regulan por voltaje, de modo que es posible agruparlos en tres subfamilias de acuerdo al rango de voltaje en el que son activos y a sus propiedades de rectificación. Estas familias son: canales rectificadores de entrada “*Inward Rectifying K⁺ channels*” (IRKs), canales de entrada débilmente rectificadores “*Weakly Inward Rectifier K⁺ channels*” (WIRKs) y canales rectificadores de salida “*Outward Rectifying K⁺ channels*” (ORKs).

En el genoma de *A. thaliana* existen 9 genes que codifican para subunidades α de canales tipo “*Shaker*”. Basándose en la similitud de secuencia, la estructura de los genes y en los análisis funcionales, estos genes pueden dividirse en 5 grupos (Pilot *et al.*, 2003). En el grupo I y II se agrupan las subunidades que forman canales rectificadores de entrada (IRKs). En el grupo III las subunidades que forman canales débilmente rectificadores (WIRKs). En el grupo IV se localizan las subunidades reguladoras de los canales de entrada, y en el grupo V las subunidades que forman canales rectificadores de salida (ORKs).

Como se ha comentado anteriormente, las subunidades se ensamblan formando tetrámeros, que generalmente son homotetrámeros. Sin embargo, se ha demostrado que los canales tipo “*Shaker*” pueden existir como heterotetrámeros formados por la unión de subunidades α codificadas por diferentes genes. Esto ocurre, generalmente entre canales de la misma subfamilia y aporta versatilidad a estos canales (Reintanz *et al.*, 2002; Xicluna *et al.*, 2007; Duby *et al.*, 2008).

Canales rectificadores de entrada (IRKs) Grupo I y grupo II:

Estos canales, involucrados en la entrada de potasio, se activan por hiperpolarización de la membrana, y se cierran cuando ésta se despolariza. En esta subfamilia, que posee 5 miembros, se incluyen los primeros transportadores de potasio tipo “*Shaker*” identificados en *A. thaliana*: AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) y KAT1 (Anderson *et al.*, 1992).

KAT1 y *KAT2* se expresan en las células oclusivas de los estomas y participan en la toma de potasio necesaria para el aumento de la turgencia que lleva a la apertura de los estomas. *KAT1* es capaz de interactuar con *KAT2*, formando canales heteromultiméricos (Pilot *et al.*, 2001).

AKT1 se expresa en el córtex y la epidermis radicular, participa en la toma de potasio del suelo. Como se comentó anteriormente, este canal es capaz de mediar el

transporte de potasio de alta afinidad, ya que toma potasio de soluciones con concentraciones del orden de 10 μM (Hirsch *et al.*, 1998).

SPIK (también conocido como AKT6) está involucrado en la toma de potasio por el polen, siendo necesario para el desarrollo apropiado del tubo polínico y para la capacidad competitiva del polen (Mouline *et al.*, 2002).

Canales débilmente rectificadores (WIRKs) Grupo III:

Esta familia de canales también se activa por hiperpolarización de la membrana, pero nunca presentan una capacidad de transporte nula dentro del rango de potencial de membrana fisiológico, por lo que potencialmente podrían mediar tanto la entrada como la salida de potasio (Very y Sentenac, 2003).

Dentro de esta familia se ha incluido un único gen *AKT2* que codifica para el canal AKT2, y para una versión truncada denominada AKT3. Este gen se expresa principalmente en el floema, tanto de órganos fuente como de órganos sumidero (Lacombe *et al.*, 2000). Al ser expresados en *Xenopus Laevis*, AKT2 y AKT3 actúan como WIRKs (Marten *et al.*, 1999; Lacombe *et al.*, 2000). Sin embargo, expresado de manera transitoria en células del mesófilo de tabaco, AKT2 actúa como un IRK (Latz *et al.*, 2007). Por lo tanto, existe cierta controversia con respecto a la clasificación de este canal.

Canales rectificadores de salida (ORKs) Grupo V:

Los canales pertenecientes a esta familia, se abren por despolarización de la membrana plasmática, por lo que actúan expulsando potasio al exterior celular. Se han descrito dos canales pertenecientes a esta familia: SKOR “*Stelar K⁺ Outward Rectifier*” (Gaymard *et al.*, 1998) y GORK “*Guard cell Outward Rectifying K⁺ channel*” (Ache *et al.*, 2000). SKOR se expresa en el cilindro vascular de la raíz y está involucrado en la carga de potasio al xilema para su transporte desde a las raíces a la parte aérea. De hecho, se ha descrito que el mutante *skor* tiene menos K^+ en el xilema (Gaymard *et al.*, 1998). GORK se expresa principalmente en las células oclusivas, donde contribuye a salida de potasio que lleva a la pérdida de agua necesaria para el cierre de los estomas. Un mutante con inserción de T-DNA en el gen *GORK* presenta, por lo tanto, alteraciones en el cierre estomático (Hosy *et al.*, 2003).

Subunidades α reguladoras: Grupo IV:

Un último miembro de esta familia “*Shaker*” es *KCI* (también denominado *KAT3*). Este gen tiene un patrón de expresión similar a *AKT1*. Se ha propuesto que este gen pertenece a un cuarto grupo de subunidades α “silenciosas”, ya que se ha

demostrado que no forma canales funcionales al expresarlo de forma aislada en *Xenopus*. Debido a su participación formando canales heterotetraméricos con otras subunidades α , podría considerarse que *KC1* codifica para una subunidad α con función reguladora (Reintanz *et al.*, 2002; Duby *et al.*, 2008).

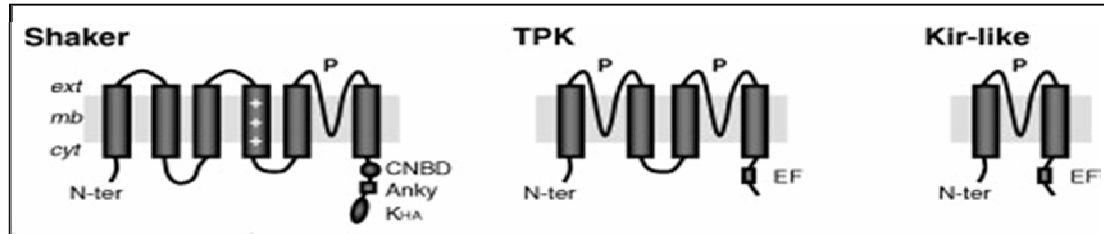


Figura 1.10: Estructura de las subunidades α de los canales selectivos de potasio. Canales tipo “Shaker”, TPK (“*Tandem Pore K⁺ channels*”) y KIR-like (“*K⁺ Inward Rectifier channels*”). Abreviaturas: Ext: Exterior celular, mb: membrana; cyt: zona citosólica; CNBD: sitio putativo de unión a nucleótidos cíclicos; Anky: dominio ankirina; K_{HA}: dominio rico en residuos hidrofóbicos y ácidos; P: dominio poro; EF: dominios tipo “EF hand” (Figura modificada a partir de Lebaudy *et al.*, 2007).

A-1.2 TPK (“*Tandem Pore K⁺ channels*”)/ (KCO-2P)

Esta familia fue inicialmente denominada KCO-2P (“*K⁺ channel Ca²⁺-activated, Outward rectifying*”) por considerarse canales de salida de potasio con 2 poros (Czempinski *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha observado que los canales de esta familia no siempre actúan como rectificadores de salida y, en principio, son independientes de voltaje, por lo que actualmente se denominan familia TPK (Becker *et al.*, 2004), tal y como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Nomenclatura de los canales TPK de *A. thaliana*

Nueva nomenclatura	Locus	Nomenclatura anterior
<i>TPK1</i>	AT5G55630	<i>KCO1</i>
<i>TPK2</i>	AT5G46370	<i>KCO2</i>
<i>TPK3</i>	AT4G18160	<i>KCO6</i>
<i>TPK4</i>	AT1G02510	<i>KCO4</i>
<i>TPK5</i>	AT4G01840	<i>KCO5</i>
<i>KCO3</i> (Familia <i>KIR</i>)	AT5G46360	<i>KCO3</i>

Como se observa en la Figura 1.10, las subunidades α de estos canales poseen un núcleo hidrofóbico formado por 4 segmentos transmembrana (TMS), y dos dominios P (poro) en tandem. Esta familia de canales no posee ningún dominio con función de sensor de voltaje. En *A. thaliana*, la familia está formada por 5 genes (Tabla II). TPK1, TPK2 y TPK3, poseen uno o dos dominios putativos de unión a calcio (tipo “EF hand”) en la región C-terminal citosólica. TPK4 carece de estos dominios, y TPK5 posee una secuencia con una débil homología con los dominios consenso “EF hand”. Todos los

miembros de esta familia, excepto TPK4, se localizan, a nivel subcelular, en el tonoplasto (Voelker *et al.*, 2006).

TPK1, se expresa en varios tejidos y tipos celulares de *A. thaliana* (raíz, tejido vascular, células del mesófilo, células oclusivas y granos de polen) se localiza en el tonoplasto, y forma canales homoméricos (Czempinski *et al.*, 2002). Estos canales son independientes de voltaje, y muestran una alta selectividad por potasio (Bihler *et al.*, 2005). En cuanto a su regulación, se ha comprobado que dependen de la presencia de calcio para funcionar, y que un pH ligeramente ácido (pH=6,7) maximiza la probabilidad de apertura del canal (Gobert *et al.*, 2007).

TPK4 se expresa predominantemente en polen, y se localiza en la membrana plasmática. El canal TPK4 tampoco muestra dependencia del voltaje, es selectivo para potasio y se ha sugerido que participa en el control de la homeostasis de potasio y del potencial de membrana del tubo polínico en crecimiento. En relación a su regulación por pH, TPK4 no es sensible a cambios en pH extracelular pero su funcionamiento se inhibe por acidificación intracelular (Becker *et al.*, 2004).

A-1.3 KIR: (K^+ Inward Rectifier channels)

En *A. thaliana* esta familia está representada por un único gen *KCO3*. Las subunidades α de estos canales poseen dos dominios transmembrana y un único poro (Mäser *et al.*, 2001). En *KCO3*, se ha predicho la existencia de sitios de unión a proteínas 14-3-3 y de dos dominios tipo “*EF hand*” en el dominio N-terminal y en el C-terminal respectivamente (Figura 1.10). Como la mayoría de los miembros de la familia de TPKs, este canal se localiza en el tonoplasto (Voelker *et al.*, 2006).

A-2 Canales de potasio poco selectivos (NSCC: “Non Selective Cation Channels”):

Estos canales son permeables a diferentes cationes y se agrupan en tres familias, cuyas estructuras básicas se representan en la Figura 1.11.

A-2.1 La familia TPC “Two Pore Channel”, con un único miembro en *A. thaliana* (TPC1), que es un transportador homólogo a los canales de calcio dependientes de voltaje (revisado en Pottosin y Schönknecht, 2007). Estructuralmente posee un total de 12 TMS y 2 poros (Peiter *et al.*, 2005). Este canal se localiza en el tonoplasto y es permeable a K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .

A-2.2 La familia GLR (“Glutamate Receptors”), contiene 3 TMS en su zona hidrofóbica. Asimismo existen 2 regiones extracelulares que actúan como sitio de unión

del ligando. En *A. thaliana* existe una familia de 20 genes que codifican para GLRs y todos ellos se expresan en raíz (Chiu *et al.*, 2002). Estos canales son permeables a cationes monovalentes mayoritariamente, aunque algunos de ellos pueden también transportar calcio. A nivel funcional, se ha involucrado a estos genes en la transducción de señal de luz (Lam *et al.*, 1998) y en la homeostasis de calcio tanto en condiciones normales como durante la adaptación a estrés iónico (Kim *et al.*, 2001).

A-2.3 La familia de los CNGC (“Cyclic-Nucleotide-Gated Channels”), está formada por canales débilmente regulados por voltaje, y permeables a cationes mono- y divalentes. Esta familia está estructuralmente relacionada con la familia de canales tipo “Shaker”, ya que cada subunidad posee 6 TMS y un dominio P (aunque este dominio carece del motivo que determina la alta selectividad por potasio presente en los canales tipo “Shaker”) (Finn *et al.*, 1996). En la región C-terminal citoplasmática, se encuentra un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y un dominio de unión a calmodulina, localizado justo tras el dominio anterior o incluso de manera solapante con dicho dominio (Köhler *et al.*, 1999). En *A. thaliana* existen 20 genes en esta familia, que parecen codificar a canales permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , involucrados en la adaptación y respuesta a estreses bióticos y abióticos (Clough *et al.*, 2000; Sunkar *et al.*, 2000; Yoshioka *et al.*, 2006).

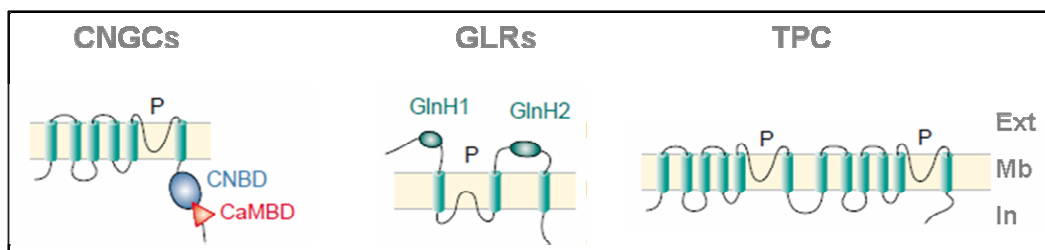


Figura 1.11: Estructura de las subunidades de los canales no selectivos. GNGCs= “Cyclic-Nucleotide-Gated Channels”, GLRs= “Glutamate Receptors” TPC= “Two Pore Channel”. CNBD= “Cyclic Nucleotide Binding Domain”; CaMBD= “Calmodulin Binding Domain”, GlnH1 y GlnH2=sitios putativos de union al ligando. P= dominio poro. Ext= exterior celular. Mb=Membrana. In= interior celular. (Modificada a partir de Very y Sentenac, 2002).

B) Transportadores de potasio:

Los transportadores de potasio median el transporte activo de este catión y, tradicionalmente, se han relacionado con el transporte de alta afinidad. En *A. thaliana*, se han identificado transportadores de potasio pertenecientes a diferentes familias: familia KUP/HAK/KT (donde KUP proviene de “K⁺ Uptake Permeases”; HAK de

“*High-Affinity K⁺ transporters*”; y KT de “*K⁺ Transporters*”), superfamilia CPA y familia HKT (“*High affinity K⁺ Transporters*”) de plantas (Mäser *et al.*, 2001).

B-1 Familia KUP/HAK/KT:

Esta familia se ha identificado en plantas por homología con las KUP de bacterias, y los HAK de hongos. Los miembros identificados en plantas se han nombrado, según el autor, como KUP (Fu *et al.*, 1998), HAK (Gierth *et al.*, 2005) o KT (Quintero y Blatt 1997). La base de datos ARAMEMNON predice que estos canales poseen entre 10 y 13 dominios transmembrana (Schwacke *et al.*, 2003).

Tabla III: Nomenclatura de los genes de *A. thaliana* pertenecientes a la familia KUP/HAK/KT. Modificada a partir de Ahn *et al.*, 2004.

Gene	Code	Gene	Code
<i>AtKT/KUP1</i>	At2g30070	<i>AtKT/KUP7</i>	At5g09400
<i>AtKT/KUP2</i>	At2g40540	<i>AtKT/KUP8</i>	At5g14880
<i>AtKT4/KUP3</i>	At3g02050	<i>AtKT/KUP9</i>	At4g19960
<i>AtKT3/KUP4</i>	At4g23640	<i>AtKT/KUP10</i>	At1g31120
<i>AtKT/KUP5</i>	At4g33530	<i>AtKT/KUP11</i>	At2g35060
<i>AtKT/KUP6</i>	At1g70300	<i>AtKT/KUP12</i>	At1g60160
		<i>AtHAK5</i>	At4g13420

En *A. thaliana*, existe una familia de 13 miembros (Tabla III) que codifica para transportadores tipo KUP/HAK/KT, de los cuales sólo 3 se han caracterizado en planta: *KUP2*, *KUP4* y *HAK5*.

El análisis de mutantes en los genes *KUP2* y *KUP4* sugiere la participación de transportadores de esta familia en la expansión celular. Un mutante en el transportador *KUP4*, denominado *trh1* (“*tiny root hair 1*”), presenta una elongación de los pelos radiculares muy reducida (Rigas *et al.*, 2001). Otros estudios han indicado que este transportador resulta esencial para el correcto transporte de auxinas en la raíz (Vicente-Agullo *et al.*, 2004). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual el transportador de potasio KUP (TRH1) interactúa con el transporte de auxinas en la raíz.

Por otro lado, una mutación en *KUP2* provoca fenotipos de acortamiento del hipocotilo (“*short hypocotyl*”: *shy3*) y de la inflorescencia y un menor tamaño de las hojas, debidos a una expansión celular reducida (Elumalai *et al.*, 2002).

El transportador *HAK5* se expresa en la epidermis y los tejidos vasculares de la raíz, y su expresión aumenta en respuesta a ayuno de potasio. Los mutantes de inserción de T-DNA en el gen *HAK5*, no muestran un fenotipo aparente, sin embargo sí presentan

un claro defecto en la toma de potasio de alta afinidad. (Gierth *et al.*, 2005). Este transportador, junto con el canal AKT1, son los dos mecanismos principales que contribuyen a la toma de potasio de alta afinidad por la raíz (Gierth *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 1998; Pyo *et al.*, 2010).

B-2 Superfamilia CPA: (Transportadores protón-cación monovalente)

Los antiportadores catión-protón trabajan de forma electroneutra, acoplando el transporte de cationes monovalentes con el de protones, por lo que no afectan al potencial de membrana. Como se comentó en apartados anteriores, su acción influye tanto en la homeostasis de los cationes monovalentes que tienen como sustrato, como en la regulación del pH.

La Figura 1.12 muestra las dos familias de CPAs (CPA1, y CPA2), con sus correspondientes subfamilias.

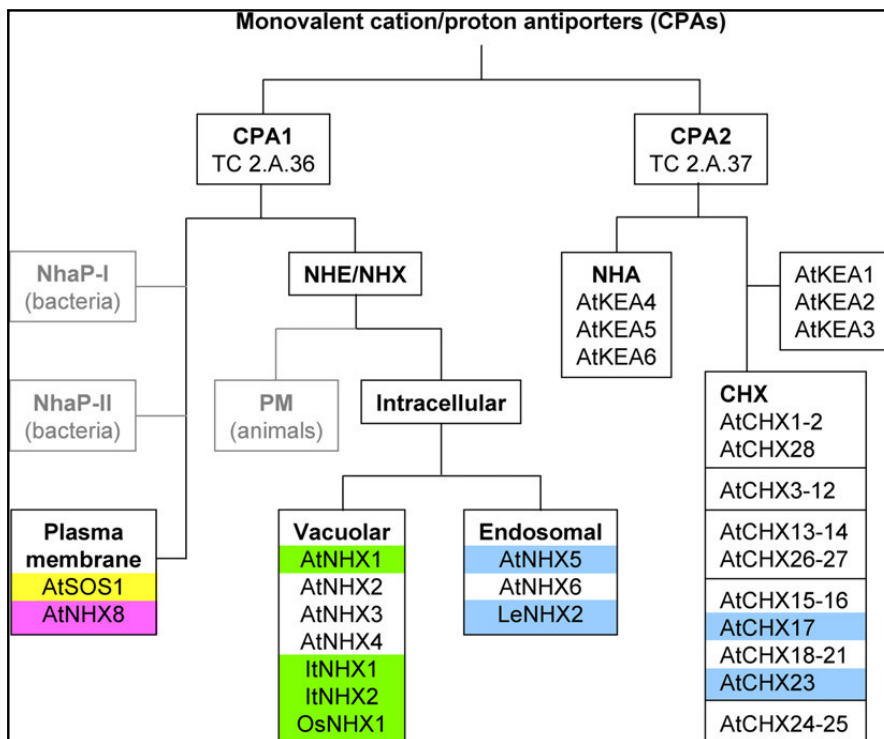


Figura 1.12: Familias de CPAs y sus subfamilias. Las proteínas para las que se tiene evidencia sobre su sustrato preferente se muestran coloreadas. Amarillo= sodio. Verde= igual afinidad a sodio que a potasio. Azul= potasio. Rosa= litio. Las subfamilias mostradas en gris no están presentes en plantas. PM= membrana plasmática. At= *Arabidopsis thaliana*. It= *Ipomoea tricolor*; Os= *Oryza sativa* (Modificada a partir de Gierth y Mäser 2007).

Dentro de la familia CPA1 de *A. thaliana*, encontramos transportadores localizados en membrana plasmática (NHX7/SOS1 y NHX8) o en compartimentos intracelulares. Los primeros transportan sodio (SOS1) y litio (NHX8) (An *et al.*, 2007).

Los localizados en endosomas transportan potasio preferentemente, mientras que los localizados en tonoplasto pueden transportar sodio y potasio con igual afinidad.

En relación a los transportadores pertenecientes a la familia CPA1 localizados en el tonoplasto, los genes que presentan un mayor nivel de expresión son *NHX1* y *NHX2*, que se expresan tanto en raíz como en parte aérea. *NHX4* tiene unos bajos niveles de expresión, pero parece tener un importante papel en la respuesta a estrés salino (Li *et al.*, 2009). *NHX1* es el transportador mejor caracterizado de este grupo. Inicialmente se consideró como un antiportador Na^+/H^+ (Gaxiola *et al.*, 1999), por lo que se comentará en mayor detalle en el siguiente apartado. *NHX3* se localiza principalmente en la membrana vacuolar aunque también en menor medida en retículo endoplásmico y compartimento prevacuolar. El análisis funcional de este gen indica que *NHX3* codifica para un antiportador K^+/H^+ necesario para la tolerancia a bajo potasio durante la germinación y el establecimiento de la plántula (Liu *et al.*, 2010). Según Pardo y colaboradores (2006), probablemente este tipo de transportadores, localizados en vacuola, utilizan el gradiente de protones para cargar sodio o potasio, en la vacuola, como almacén (en el caso del potasio), como mecanismo de detoxificación (en el caso del sodio), y para generar turgencia (en ambos casos).

Con respecto a las proteínas de la familia CPA1 localizadas en membranas internas del sistema de endomembranas, se cree que juegan un importante papel en la regulación del pH de estos compartimentos internos. Por lo que respecta a sus niveles de expresión, *NHX5* tiene unos niveles de expresión más altos que *NHX6* (Yokoi *et al.*, 2002). *NHX5*, expresado en levadura parece transportar preferentemente potasio frente a sodio (Yokoi *et al.*, 2002), lo que resulta lógico ya que una acumulación excesiva de sodio en estos compartimentos intracelulares podría resultar dañino para las plantas.

Por lo que respecta a la familia CPA2, en *A. thaliana* es posible diferenciar dos subfamilias: los transportadores de tipo KEA y la subfamilia CHX.

Los transportadores tipo KEA (“*K⁺ Exchange Antiporters*”) son homólogos a los antiportadores K^+/H^+ bacterianos, por lo que son buenos candidatos para transportar potasio. En *A. thaliana* se han identificado 6 posibles miembros pertenecientes a esta familia: *KEA1-KEA6* (Mäser *et al.*, 2001). Sin embargo, de momento se carece de información experimental que confirme su función.

La subfamilia CHX (“*Cation H⁺ exchangers*”) está formada por 28 miembros en *A. thaliana*. De estos genes, 18 se expresan específicamente durante el desarrollo del gametofito masculino, lo que sugiere que las proteínas CHX están implicadas en la

regulación de la homeostasis de pH durante la germinación y desarrollo del tubo polínico (Sze *et al.*, 2004). Esta familia de transportadores actúa como antiportadores K^+ (y/o Na^+)/ H^+). A continuación, se comenta brevemente el análisis funcional realizado para tres genes pertenecientes a esta familia que transportan potasio: *CHX17*, *CHX20* y *CHX23*.

CHX17 se expresa principalmente en raíz, en condiciones de estrés (salinidad, ácido abscísico, bajo potasio, o bajo pH externo). La expresión de este gen en levadura complementa la sensibilidad a pH alcalino del mutante *kha1* (con pérdida de función de un antiportador K^+/H^+) de *S. cerevisiae* (Maresova y Sychrova 2006). Asimismo las raíces de mutantes de *A. thaliana* en este gen acumulan menos potasio que el control en condiciones de estrés salino o de bajo potasio (Cellier *et al.*, 2004). Estos datos sugieren la implicación de *CHX17* en la homeostasis de pH y de potasio, al menos en determinadas condiciones (revisado en Pardo *et al.*, 2006; Gierth y Mäser, 2007).

CHX20 se expresa preferentemente en células oclusivas, concretamente en endomembranas. Mutantes en este gen muestran una menor apertura estomática inducida por luz. Se ha sugerido que *CHX20* actúa como un antiportador K^+/H^+ , (introduciendo potasio en vesículas del sistema endomembrana y liberando protones al citosol), que tiene un importante papel en la apertura estomática y, posiblemente, en la modulación del pH citosólico de las células oclusivas (Padmanaban *et al.*, 2007).

CHX23 se expresa en las membranas del cloroplasto. Un mutante en este gen muestra cloroplastos anormales, y un pH citoplasmático más alto que el control. El crecimiento del mutante mejora con concentraciones altas de potasio, pero se ve muy reducido en presencia de NaCl (Song *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que *CHX23* puede actuar como antiportador K^+/H^+ o Na^+/H^+ , y que está implicado en la homeostasis de potasio y en la regulación del pH en el estroma.

B-3 Familia HKT:

La familia de transportadores HKT comprende un grupo de proteínas con cierta diversidad, por lo que los análisis filogenéticos muestran que es posible agruparlas en dos subfamilias: subfamilia1 y subfamilia2. En la subfamilia 1 se encuentran los genes *HKT* de dicotiledóneas (y algunos *HKT* de arroz), mientras que la subfamilia 2 contiene genes *HKT* de gramíneas (Platten *et al.*, 2006).

Los transportadores de plantas de tipo HKT son estructuralmente similares a los canales de potasio. Poseen 4 repeticiones de una unidad estructural formada por dos dominios transmembrana entre los que existe un dominio poro. Por ello se piensa que

los monómeros de estos transportadores (con 8 TMS y 4 dominios P) se asemejan a los tetrámeros formados por los canales de potasio. Al igual que estos canales, los transportadores de tipo HKT poseen un filtro que determina la selectividad del transportador. Concretamente se ha comprobado que existe un residuo en el primer dominio P (“*P-loop A*”) que determina permeabilidad a potasio, en el caso de ser una glicina (subfamilia 2), o permeabilidad a sodio, si es una serina (subfamilia 1) (Mäser *et al.*, 2002a). Por lo tanto, los miembros de la familia HKT pueden actuar como transportadores de sodio y potasio (Garcia-deblas *et al.*, 2003) o únicamente como transportadores de sodio (Laurie *et al.*, 2002; Davenport *et al.*, 2007).

En *A. thaliana* existe un único representante para esta familia de transportadores, pertenece a la subfamilia 1, por lo que posee una serina en el dominio P, indicando que es un transportador de sodio (Platten *et al.*, 2006). Por ello se tratará de este transportador en el apartado siguiente.

1.3.2 Homeostasis de sodio en A. thaliana

Al contrario que en el caso del potasio, el sodio no es un elemento esencial, y a altas concentraciones resulta tóxico para muchas especies vegetales. En primer lugar, el estrés salino provoca un estrés osmótico en la célula vegetal, dificultando la toma de agua por las plantas (efecto osmótico). Por otro lado, este estrés causa muchas veces deficiencia de potasio (desórdenes nutricionales) ya que, debido a la similitud fisicoquímica entre sodio y potasio, la toma de K^+ por transportadores de tipo KUP/HAK/KT o por canales, como AKT1, se ve inhibida por Na^+ (Santa-María *et al.*, 1997; Qi y Spalding, 2004). Asimismo, la acumulación de sodio en el citosol es perjudicial para muchos procesos fisiológicos (toxicidad iónica). Por un lado, un exceso de sodio en el citosol puede causar que éste reemplace al potasio o al magnesio en sus sitios de unión a enzimas, alterando el metabolismo celular. Por ejemplo, el sodio reemplaza al magnesio del sitio activo de las fosfoadenosín fosfatasas Hal2p de levadura (Murguía *et al.*, 1996) y AHL de *A. thaliana* (Gil-Mascarell *et al.*, 1999), necesarias para la síntesis de metionina y cisteína. Asimismo, inhibe a las inositolmonofosfatasas de levadura, necesarias para la síntesis de inositol (López *et al.*, 1999). Por otro lado, las interacciones existentes entre el Ca^{2+} y componentes celulares como las pectinas de la pared celular o los fosfolípidos de membrana, se ven afectadas a altas concentraciones de sodio, lo que finalmente altera la integridad de la pared celular

y las membranas celulares (Maathuis, 2006). Finalmente, existen evidencias de que el estrés salino puede generar estrés oxidativo en plantas (Shalata y Neumann 2001). Por lo tanto, considerando la toxicidad del sodio, es lógico que las plantas posean sistemas de transporte de este catión, que permitan minimizar su efecto perjudicial. En este sentido se han descrito transportadores encargados de expulsar el sodio a nivel de raíz, de compartimentarlo en vacuola, y de su transporte a nivel de planta desde la raíz a la parte aérea.

Sin embargo, en condiciones de baja disponibilidad de potasio, el sodio puede promover el crecimiento ya que se acumula en la vacuola, como haría el potasio, y posibilita el mantenimiento de la turgencia celular (Rodríguez-Navarro, 2000). Por lo tanto, cabe esperar que las plantas puedan tomar sodio del suelo, ya que en ocasiones puede resultar beneficiosa su incorporación y posterior compartimentación en vacuola, como ocurre en el caso de baja disponibilidad de potasio

A continuación se describen los principales mecanismos de transporte de sodio conocidos en *A. thaliana*.

A) Toma de sodio por la raíz:

Dado que la concentración de sodio en el citosol en condiciones normales no es alta (1-10 mM), y que en la membrana plasmática existe un potencial de membrana de aproximadamente -120 mV, un aumento en la concentración de sodio extracelular establece un gradiente de sodio que favorece el transporte pasivo de este catión del exterior al interior celular. Por lo tanto, la entrada de sodio a las células es pasiva, y probablemente tiene lugar principalmente a través de canales no selectivos de iones (NSCC), que incluyen los CNGCs y GLRs introducidos en el apartado anterior.

En relación a los CNGCs, estudios electrofisiológicos sugieren que CNGC1 y CNGC4 son igualmente permeables a K^+ y a Na^+ , al ser expresados en oocitos de *Xenopus* (Leng *et al.*, 2002; Balague *et al.*, 2003). CNGC3 ha sido caracterizado en mayor profundidad y se ha visto que se expresa principalmente en la membrana plasmática de células del córtex y de la epidermis radicular, y puede mediar la toma tanto de K^+ como de Na^+ (Gobert *et al.*, 2006).

B) Salida de sodio en la raíz:

Como se ha comentado anteriormente, en presencia de altas concentraciones de sodio extracelular la toma de este catión resulta pasiva, por lo que su salida debe ser un

proceso activo. Por ello, la expulsión del sodio en plantas se lleva a cabo a través de antiportadores Na^+/H^+ (transporte activo secundario).

En *A. thaliana*, el antiportador más conocido implicado en este proceso es SOS1 (NHX7) (Shi *et al.*, 2000), que pertenece a la familia CPA1 de antiportadores catión/protón (Figura 1.12). Este transportador se expresa en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la punta de la raíz, donde contribuye a la salida de sodio al apoplasto. La actividad de SOS1 está regulada por SOS2 y SOS3. SOS3 es una proteína de unión a calcio que recluta a SOS2 a la membrana plasmática. Una vez allí, SOS2, una serina/treonina proteína quinasa, fosforila a SOS1, activándola (Qiu *et al.*, 2002).

C) Compartimentación en vacuola:

Como se ha comentado anteriormente, la compartimentación de sodio en la vacuola es un eficiente mecanismo para disminuir el efecto tóxico de su acumulación en el citosol. Para ello, las plantas emplean antiportadores Na^+/H^+ que se localizan en el tonoplasto y median la entrada de sodio en vacuola gracias al gradiente de protones generado por las bombas de protones H^+ -ATPasa vacuolar y pirofosfatasa.

En *A. thaliana* existen 4 antiportadores $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ localizados en la membrana vacuolar: NHX1-4 (Figura 1.12). El más estudiado de estos antiportadores es NHX1, cuya expresión en el mutante *nhx1* de levadura complementa su fenotipo de sensibilidad a sodio. (Gaxiola *et al.*, 1999). Asimismo, la sobreexpresión de este transportador mejora la tolerancia a salinidad en *A. thaliana* (Apse *et al.*, 1999), y otras muchas especies como tomate (Zhang y Blumwald, 2001) o trigo (Xue *et al.*, 2004). Del mismo modo, la sobreexpresión del gen homólogo identificado en arroz: *OsNHX1* también confiere mayor tolerancia a sal (Fukuda *et al.*, 2004). Estos trabajos muestran el importante papel de este transportador secuestrando el sodio en vacuola en condiciones de alta salinidad.

Sin embargo, se ha demostrado que, en liposomas reconstituidos, NHX1 es capaz de transportar sodio y potasio con una afinidad similar (Venema *et al.*, 2002). En relación a su selectividad por estos cationes, se ha descrito que la delección del dominio C-terminal de este transportador (localizado en el lumen vacuolar), dobla la selectividad Na^+/K^+ (Yamaguchi *et al.*, 2003). Asimismo, se ha visto que una proteína similar a calmodulina (“*Calmodulin-Like protein 18*”) CML18 (también denominada CaM15) se une a este dominio de forma dependiente de calcio y de pH, y modifica su selectividad a cationes (Yamaguchi *et al.*, 2005).

D) Transporte a larga distancia:

Una vez absorbido el sodio por la planta, puede ser expulsado, acumularse en vacuola y/o ser transportado a la parte aérea por el xilema gracias a la corriente de transpiración. Hasta el momento en *A. thaliana* se ha sugerido la implicación de dos transportadores en el proceso de carga y descarga de sodio al xilema: NHX7 (SOS1) y HKT1.

El antiportador de membrana plasmática Na^+/H^+ NHX7 (SOS1), además de expresarse en la parte final de la raíz, también se expresa de forma específica en células que rodean el xilema. Shi y colaboradores (2002) observaron que en condiciones de estrés salino suave (25 mM NaCl) el mutante *sos1* acumulaba menos sodio en la parte aérea que el control. Por ello postularon que en estas condiciones, SOS1 media la carga al xilema, de modo que el sodio sube y se acumula en las vacuolas de las células del mesófilo de las hojas. Actualmente se admite que, además de mediar la expulsión de sodio a nivel de la epidermis radicular, SOS1 actúa cargando sodio al xilema (Apse y Blumwald, 2007; Munns y Tester, 2008).

Por otro lado, el único miembro de la familia de transportadores HKT de *A. thaliana*, HKT1;1, parece estar involucrado en la salida de sodio del xilema, antes de que éste alcance la parte aérea. De hecho, este transportador se localiza en la membrana plasmática de las células del parénquima del xilema (Hattori *et al.*, 2005). Al ser expresado en levadura y en oocitos de *Xenopus*, HKT1;1 actúa como un uniportador selectivo de sodio (Uozumi *et al.*, 2000) y el mutante de pérdida de función *hkt1;1* acumula mayor cantidad de este catión tóxico en la parte aérea y menos en la raíz, en comparación con el control silvestre (Mäser *et al.*, 2002b). Estos datos, junto con los experimentos realizados por Davenport (2007) empleando isótopos radiactivos para estudiar el transporte de sodio y potasio, corroboran la función de este transportador en la descarga de sodio del xilema.

1.4 Tráfico de vesículas en plantas

1.4.1 Sistema de endomembranas y tráfico de vesículas

Las células eucariotas poseen un sistema de endomembranas formado por aquellos organelos membranosos que intercambian lípidos y proteínas (carga), mediante el tráfico de vesículas (Figura 1.13). A pesar del constante intercambio de vesículas,

cada compartimento mantiene una composición única de proteínas en su membrana y en su lumen que le otorgan su identidad y posibilitan su función (Bassham *et al.*, 2008).

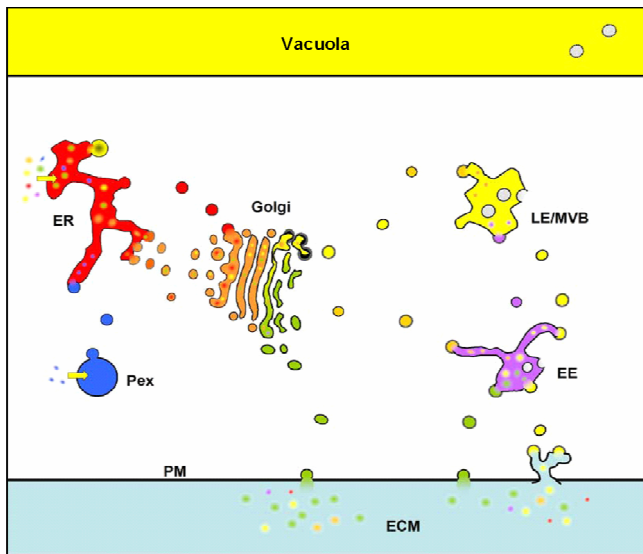


Figura 1.13: Principales componentes del sistema de endomembranas de *A. thaliana*. En la figura, las proteínas propias del retículo endoplasmático (ER) son rojas, las del aparato de Golgi naranjas, las de la vacuola amarillas, las de los endosomas tempranos (EE) violeta, y las de los peroxisomas (Pex) azules. Las proteínas secretadas (verde) terminan en la membrana plasmática (PM) o en la matriz extracelular (ECM). LE/MVB: “*Late Endosome/MultiVesicular Body*” (Extraída de Bassham *et al.*, 2008).

Los principales organelos que forman parte del sistema de endomembranas en células vegetales son (Jürgens, 2004): el retículo endoplasmático, que supone el punto de entrada al sistema de endomembranas de las proteínas recién sintetizadas, el aparato de Golgi, que es la principal estación de clasificación y envío de las proteínas (carga) a los diferentes destinos, los endosomas tempranos “*early endosomes*” involucrados tanto en la clasificación como en el reciclaje de proteínas, el endosoma tardío “*late endosome*”, también llamado compartimento prevacuolar (PVC) o “*MultiVesicular Body*” (MVB), que antecede a la vacuola, y la vacuola, que tiene una forma, tamaño, contenido y función diferente según el tejido y la especie estudiada. Concretamente hay dos tipos principales de vacuola, la vacuola lítica y la de almacén de proteínas.

Los diferentes compartimentos del sistema de endomembranas están interconectados bien de forma directa o bien mediante el tráfico de vesículas que existe entre ellos. Este tráfico vesicular puede ocurrir siguiendo diferentes rutas. Dos de ellas se encuentran activas de forma constante (“por defecto”): la ruta secretora y la endocítica (Figura 1.14).

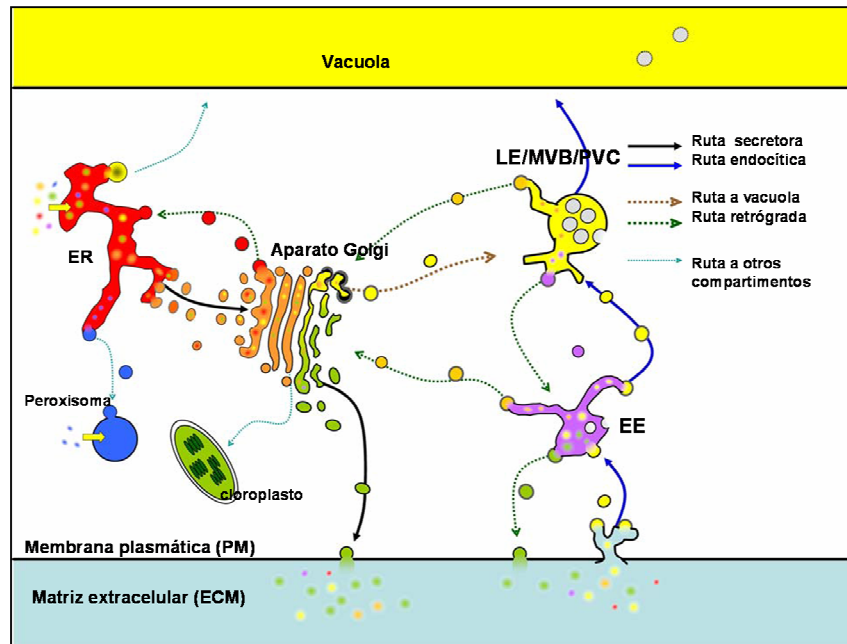


Figura 1.14: Tráfico vesicular en *A. thaliana*. Se muestra la ruta secretora (flecha continua negra), y la endocítica (flecha continua azul). Las proteínas de vacuola se dirigen a través del PVC desde el aparato de Golgi hasta la vacuola (flecha discontinua marrón). Las rutas retrógradas (flechas discontinuas verdes) reciclan determinadas proteínas cargo a partir de cualquier compartimento. EE: Endosoma temprano. LE/MVB/PVC: Endosoma tardío/ “*MultiVesicular Body*”/Compartimento prevacuolar. ER: Retículo endoplasmático. (Modificada a partir de Bassham *et al.*, 2008).

La ruta secretora (dirección anterógrada) es la principal ruta biosintética. Empieza con las proteínas recién sintetizadas que, una vez que se han plegado correctamente, se dirigen a la membrana del retículo endoplasmático (ER), desde ahí se transportan hacia el Golgi, y finalmente a la membrana plasmática (PM) o la matriz extracelular (ECM).

La ruta endocítica representa la ruta de degradación de proteínas. El flujo empieza con la endocitosis de proteínas de membrana plasmática o de la matriz extracelular. Tras la endocitosis, las proteínas (carga) viajan en vesículas a través de los endosomas (tempranos y tardíos) hasta la vacuola, donde son degradadas.

Por otra parte, las proteínas vacuolares se dirigen a partir del aparato de Golgi, generalmente a través del endosoma tardío o compartimento prevacuolar, hacia la vacuola (ruta a vacuola).

Además de estas rutas, existen otras denominadas “retrógradas”, que se activan en respuesta a determinadas señales, y que redirigen proteínas específicas de cada una

de las vías activas “por defecto”. De este modo, actúan como mecanismo de reciclaje para llevar de vuelta materiales de los últimos pasos de cada ruta.

Finalmente, existen rutas que transportan proteínas del retículo endoplásmático (ER) a otros compartimentos como los peroxisomas o los plastos (Titorenko & Mullen 2006; Nanjo *et al.*, 2006).

Para que sea posible este tráfico de vesículas entre diferentes organelos, es necesario que ocurran 3 procesos estrictamente regulados, en los que intervienen un gran número de proteínas: formación de la vesícula en el compartimento donador, transporte, con ayuda del citoesqueleto, a través del citosol hasta el compartimento diana o receptor, y fusión de la vesícula con la membrana del orgánulo receptor.

En el proceso de formación de la vesícula, participa un complejo y ordenado sistema de proteínas que se acumulan en el lugar de formación de la vesícula y se encargan de la selección del cargo y de la deformación de la membrana hasta que se libera la vesícula. Algunas de ellas (proteínas de cubierta) realizan su función ensamblándose, y formando una cubierta que rodea la vesícula en formación.

Por otro lado, en el compartimento diana intervienen factores de acoplamiento, así como proteínas de la familia SNARE (“*N-Ethylmaleimide-Sensitive factor Attachment protein Receptor*”), para posibilitar el reconocimiento del orgánulo receptor, y la fusión de la vesícula a la membrana del orgánulo diana (revisado en Bassham *et al.*, 2008). Parece que las proteínas SNARE apropiadas para cada organelo receptor son transportadas en las mismas vesículas que llevan el cargo, es decir, se seleccionan e incluyen en la vesícula durante el proceso de formación de las mismas. A continuación se explica con más detalle el proceso de formación de vesículas.

1.4.2 Proceso de formación de vesículas

Como se ha comentado anteriormente, para que se formen las vesículas, es necesaria la actuación coordinada de diversas proteínas que se encargan de la señalización del lugar en el que se formará la vesícula, la selección y concentración del cargo a incluir en la vesícula, y la deformación de la membrana y liberación de la vesícula del compartimento donador. A continuación se describe brevemente el proceso de formación de las vesículas (Figura 1.15), señalando el papel de las principales proteínas que intervienen en él (revisado en Bassham *et al.*, 2008).

En primer lugar, el cargo debe concentrarse en un lugar concreto de la membrana del organelo donante. Los detalles de este paso todavía no están claros, aunque probablemente intervengan las colas citoplasmáticas de proteínas integrales de membrana, que podrían ser el propio cargo, receptores de cargo, o cualquier otra proteína con la función de señalar el lugar de formación de la vesícula.

Al mismo tiempo, un GEF (“*Guanine nucleotide-Exchange Factor*”), se localiza en el sitio de formación de la vesícula y activa a una pequeña proteína con actividad guanosina trifosfatasa (“*Guanosine TriPhosphatase*”: GTPasa) denominada GTPasa de cubierta. Esta proteína regula el ensamblaje y desensamblaje de la cubierta de las vesículas gracias al ciclo que se establece entre su forma inactiva y soluble, unida a guanosín difosfato (“*Guanosine DiPhosphate*”: GDP) y su forma activa, unida a GTP (“*Guanosine Tri-Phosphate*”). La GTPasa de cubierta unida a GTP, se ancla a membrana y es capaz de reclutar del citoplasma diversas proteínas, como las que formarán la cubierta de la vesícula: subunidades selectivas de cargo y proteínas jaula o “*cage proteins*”.

Las subunidades selectivas de cargo colaboran con la GTPasa de cubierta para reclutar el cargo. Concretamente, forman la capa interna de la cubierta, que une el cargo (o los receptores del cargo) con la capa externa de la cubierta (proteínas jaula o “*cage*”).

Las proteínas jaula o “*cage proteins*” forman la capa externa de la cubierta e intervienen en la deformación física de la membrana necesaria para la formación y escisión de la vesícula (Stagg *et al.*, 2007).

Además de los componentes que formarán la cubierta, la GTPasa recluta a las denominadas proteínas efectoras, que alteran las características lipídicas del sitio de formación de la vesícula o reclutan otros factores que ayuden a la formación de la vesícula.

Una vez que todas las proteínas se han localizado en el lugar de formación de la vesícula, y se ha reclutado el cargo, se ensambla la cubierta y se empieza a deformar la membrana formando una vesícula donde se incluye el cargo. Finalmente, la vesícula se separa de la membrana y se libera. El proceso de liberación de la vesícula se debe probablemente a la combinación de tres factores: actuación de las proteínas de la cubierta, la acción de otras maquinarias moleculares y la especial composición lipídica del cuello de la vesícula.

Normalmente tras la liberación de la vesícula, actúan las proteínas GAP (“*GTPasa Activation Proteins*”), que hacen que la GTPasa hidrolice el GTP a GDP.

Una vez la GTPasa pasa a su forma unida a GDP, se desensambla la cubierta, y la vesícula, ya desnuda, puede iniciar el transporte hasta el orgánulo diana.

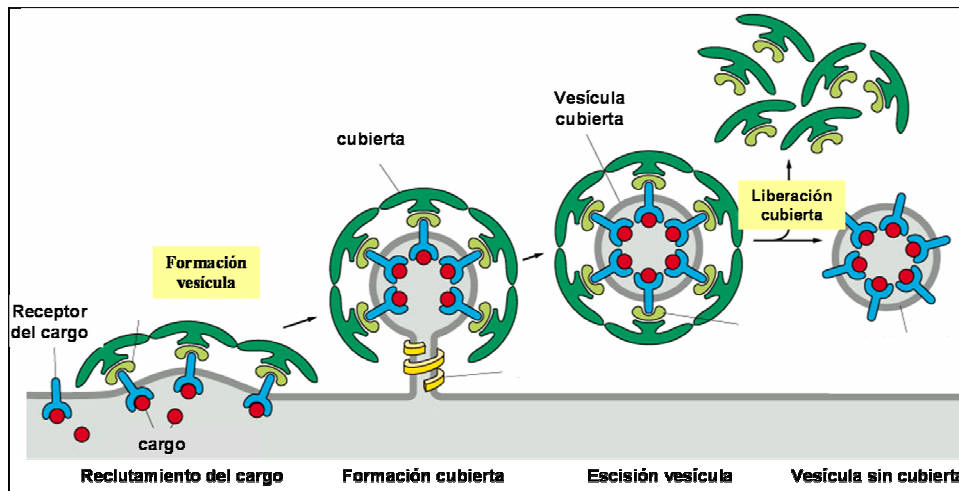


Figura 1.15: Esquema indicando los principales pasos del proceso de formación de vesículas. En rojo se muestran las proteínas cargo. En azul, los receptores del cargo. En verde claro las subunidades selectivas de carga, y en verde oscuro las proteínas jaula o “*cage proteins*”.

1.4.3 Principales tipos de cubierta

En función del organelo en el que se forma la vesícula, la cubierta que se ensambla es diferente. Existen tres tipos principales de cubierta: COPI, COPII y cubiertas de clatrina, aunque también se conocen otras, como las formadas por el complejo ESCRT (“*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*”) y por el complejo retrómero “*retromer complex*”. Todos estos tipos de cubierta están conservados en plantas. El complejo ESCRT está involucrado en la formación de las vesículas internas del MVB, que posteriormente serán dirigidas al lumen vacuolar donde se hidrolizará su contenido. El complejo retrómero en *A. thaliana* está involucrado en el reciclaje de los receptores vacuolares VSR (“*Vacuolar Sorting Receptors*”) desde los endosomas hacia el Golgi, y en la localización de los transportadores de auxinas de tipo PIN (Oliviusson *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007).

A continuación se describen con más detalle los tres tipos principales de cubierta: COPI, COPII y cubiertas de clatrina. Todos ellos, comparten una estructura común formada por proteínas que recluta la GTPasa: subunidades selectivas de carga y proteínas jaula o “*cage*” (Figura 1.16).

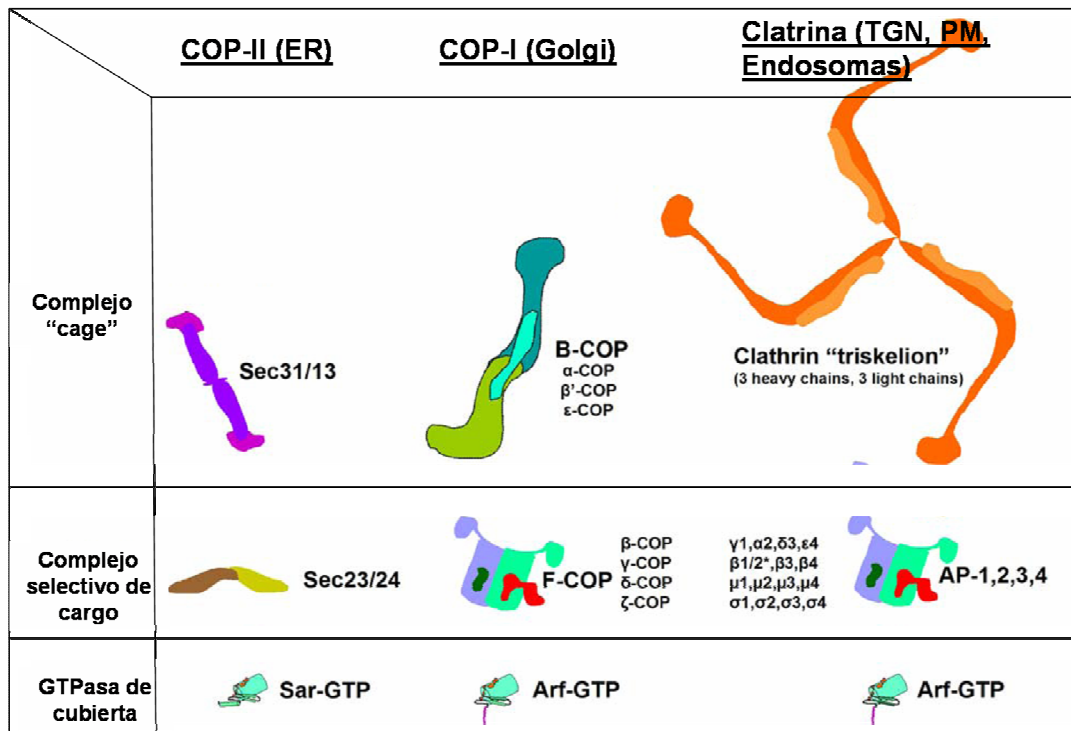


Figura 1.16: Subcomplejos de los tres tipos principales de cubierta. Cada sistema de cubierta requiere de una GTPasa, de un complejo jaula o "cage" y de un complejo selectivo de carga. ER: Retículo endoplasmático. TGN: Red trans-Golgi, PM: Membrana plasmática. (Modificada a partir de Bassham *et al.*, 2008).

A) Cubiertas tipo COPI:

Las cubiertas de tipo COPI rodean principalmente las vesículas formadas en el aparato de Golgi, que formarán parte de la ruta retrógrada. En plantas, tienen un importante papel en el transporte de Golgi al ER y también dentro del Golgi (Pimpl *et al.*, 2000).

La GTPasa de cubierta encargada de controlar el proceso de formación de vesículas con cubiertas COPI de levaduras y mamíferos, pertenece a la familia de proteínas tipo ARF ("ADP- Ribosilation Factors") dentro de la superfamilia Ras (Figura 1.16). En *A. thaliana* existe una familia multigénica que codifica este tipo de proteínas (Vernoud *et al.*, 2003; Bassham *et al.*, 2008).

Como se ha explicado anteriormente, un GEF induce el intercambio de GDP por GTP en la proteína tipo ARF, activándola. Los GEFs poseen típicamente un dominio catalítico para el intercambio del nucleótido denominado Sec7, en base a su homología al GEF de la proteína Arf de levadura: sec7p (Jackson & Casanova 2000; Casanova, 2007). En *A. thaliana*, se conocen 8 GEFs que se reparten en dos familias. La familia (Gea/GNOM/GBF: "Guanine nucleotide Exchange factor for ADP ribosylation factors")

1/GNOM (“*Golgi BFA (BreFeldin A)- resistance Factor 1*”) contiene las proteínas GNOM (Geldner *et al.*, 2003), GNL1 (“*GNom-Like1*”) y GNL-2 (“*GNom-Like2*”). Las otras cinco proteínas, pertenecen a la familia Sec7p/BIG (“*BFA-Inhibited GEF*”) y se denominan (BIG1-5) (Jürgens & Geldner 2002).

Una vez unida a GTP, la GTPasa de la familia ARF1, sufre un cambio conformacional que facilita su anclaje en membrana (Antonny *et al.*, 1997), y recluta las subunidades que formarán la cubierta COPI.

Estudios realizados en levadura y en mamíferos han establecido que estas cubiertas son complejos heptaméricos, cuyas subunidades interaccionan y se organizan formando dos subcomplejos (Eugster *et al.*, 2000). El subcomplejo F-COP, está constituido 4 proteínas (γ -COP, β -COP, δ -COP y ζ -COP) y actúa como la subunidad selectiva de carga. El subcomplejo B-COP, formado por 3 proteínas (α -COP, β' -COP y ϵ -COP), actúa como “cage” o jaula. Estos subcomplejos F-COP y B-COP están conservados en todos los eucariotas y las proteínas que los forman están codificadas generalmente por familias génicas. La Tabla IV muestra los genes que codifican para las diferentes proteínas en el caso de *A. thaliana* (Bassham *et al.*, 2008).

Tabla IV: Genes que codifican para las proteínas de las cubiertas de COPI, COP-II y clatrina en *A. thaliana* (modificada a partir de Bassham *et al.*, 2008).

COP-I		
B-COP (cage):	α	At1g62020, At2g21390
	β'	At1g52360, At3g15980, At1g79990
F-COP (C. Selectivo cargo)	ϵ	At2g34840, At1g30630
	β	At4g31480, At4g31490
	γ	At4g34450
	δ	At5g05010
	ζ	At1g60970, At3g09800, At1g08520
COP-II		
Sec13/31 (cage):	Sec13	At3g01340, At2g30050
	Sec31	At1g18830, At3g63460
Sec23/24 (C. Selectivo cargo)	Sec23	At5g43670, At3g23660, At4g14160, At1g05520, At2g21630
	Sec24	At3g07100, At3g44340, At4g32640, At2g27460
Clathrin		
Triskelion (cage):	Cadena pesada	At3g11130, At3g08530
	Cadena ligera	At2g40060, At3g51890
AP1 (C. Selectivo cargo)	γ	At1g60070, At1g23900
	$\beta 1/2^1$	At4g11380, At4g23460
	$\mu 1$	At1g60780, At1g10730
AP2 (C. Selectivo cargo)	$\sigma 1$	At2g17380, At4g35410
	α	At5g22770, At5g22780
	$\beta 1/2^1$	see above
AP3 (C. Selectivo cargo)	$\mu 2$	At5g46630
	$\sigma 2$	At1g47830
	δ	At1g48760
AP4 (C. Selectivo cargo)	$\beta 3$	At3g55480
	$\mu 3$	At1g56590
	$\sigma 3$	At3g50860
AP4 (C. Selectivo cargo)	ϵ	At1g31730
	$\beta 4$	At5g11490
	$\mu 4$	At4g24550
	$\sigma 4$	At4g24550

Tras la formación de la vesícula, se desensambla la cubierta, tal y como se explicó anteriormente, gracias a la intervención de proteínas GAPs. En *A. thaliana* se conocen 15 GAPs (Vernoud *et al.*, 2003).

B) Cubiertas tipo COPII:

Este tipo de cubierta está conservada en todos los eucariotas, y participa en el primer paso de la ruta de secreción biosintética: la formación de vesículas en el retículo endoplasmático para exportar proteínas y lípidos hacia el aparato de Golgi. A lo largo de la membrana del ER existen puntos de salida “*exit sites*” en los que se concentra la maquinaria de COPII y se recluta el cargo para la ruta anterógrada. Generalmente estos puntos se localizan de forma discreta en la membrana, aunque en algunos organismos como en levadura toda la membrana parece capaz de actuar como sitio de salida (revisado en Glick, 2001; Budnik & Stephens 2009).

La GTPasa implicada en la formación de este tipo de cubiertas en mamíferos y levadura es Sar1p. En levadura existe un único gen que codifica para Sar1p, pero en mamíferos y plantas existen varios homólogos. Concretamente en *A. thaliana* se han identificado tres genes denominados *SARA1a-c* (Vernoud *et al.* 2003; revisado en Hanton *et al.*, 2005). La GTPasa Sar1p se activa por acción del GEF Sec12p. El intercambio GTP/GDP, hace que la proteína Sar1p sea capaz de insertarse en la membrana plasmática del ER (Bi *et al.*, 2002) y reclutar la subunidad selectiva de cargo.

En las cubiertas de tipo COPII de levadura, la subunidad selectiva de cargo está formada por dos proteínas altamente conservadas: Sec23p y Sec24p. Esta subunidad Sec23/Sec24p dirige a las proteínas que actúan como jaula o “*cage*” (Sec13p y Sec31p) al lugar de producción de la vesícula (revisado en Hughes & Stephens 2008). Las proteínas que forman la cubierta de tipo COPII en *A. thaliana* están codificadas por múltiples genes (Tabla IV): SEC23 (5 genes), SEC24 (4 genes), SEC13 (2 genes) y SEC31 (2 genes) (Bassham *et al.*, 2008).

Las vesículas con cubierta COPII son bastante inestables, ya que la GAP de Sar1p forma parte de la propia cubierta (es la proteína Sec23p), por lo que las vesículas pierden su cubierta rápidamente tras su formación. Tras la destrucción de la cubierta, Sar1p y las demás proteínas se liberan al citoplasma hasta que se forme la siguiente vesícula.

C) Cubiertas de clatrina:

Las vesículas con cubiertas de clatrina (CCVs: “*Clathrin Coated Vesicles*”) fueron las primeras en ser descubiertas, y se encuentran en todos los eucariotas. Su nombre se debe a la proteína clatrina, que actúa como subunidad jaula o “*cage*”. Este tipo de vesículas se forman en varios compartimentos celulares de la denominada “red post-Golgi” (“*post-Golgi network*”) como la membrana plasmática, los endosomas y la red trans-Golgi (TGN: “*Trans-Golgi Network*”) (Nakatsu & Ohno 2003). Por lo tanto, están implicadas tanto en la ruta endocítica, (proceso de reciclaje de proteínas de membrana a través de endosomas), como en la clasificación del cargo a partir del TGN.

Al igual que en el caso de las cubiertas de tipo COPI, la GTPasa involucrada en la formación de las cubiertas de clatrina pertenece a la familia de proteínas tipo ARF, que como ya se ha comentado, tiene numerosos miembros en *A. thaliana*.

La capa externa de las cubiertas de clatrina (subunidad jaula o “*cage*”) se forma gracias al ensamblaje de la proteína clatrina. Esta proteína está formada por tres cadenas peptídicas ligeras y tres cadenas pesadas, que generan una estructura con “tres piernas” denominada trisquelion (Fotin *et al.*, 2004) (Figura 1.16). Cada una de las piernas termina en un dominio “ *β -propeller*”/WD40 (ter haar, 2000) que posibilita la interacción con los complejos adaptadores cargo y con proteínas de anclaje a membrana (revisado en McMahon y Mills, 2004).

El entramado formado por la polimerización/ ensamblaje de la clatrina no puede unirse de forma directa a las membranas, por lo que la unión de los trisqueliones con el cargo la llevan a cabo los complejos adaptadores (subunidad selectiva de cargo). Los principales complejos adaptadores conocidos pertenecen a la familia de las proteínas adaptadoras clásicas (AP: “*Adaptor Protein*”), sin embargo, existen adaptadores “alternativos”, como los GGAs (“*Golgi localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding proteins*”, los Hrs (“*Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase substrate*”), y los adaptadores específicos de cargo como las arrestinas, las epsinas o las proteínas Dab2 (“*Disabled-2*”) y ARH (“*Autosomal Recessive Hipercolesterolemia*”) que también unen el cargo y la membrana a la clatrina (Owen *et al.*, 2004; McMahon y Mills, 2004). Estos adaptadores alternativos pueden trabajar de forma independiente de los AP o junto a ellos, para reclutar el cargo en las vesículas en formación (Motley *et al.*, 2003). Por lo tanto, como pueden encontrarse varios adaptadores en cada vesícula en formación, no es necesario que todos ellos tengan una interacción directa con clatrina.

En principio no existen en *A. thaliana* homólogos claros de los genes que codifican para GGAs, por lo que los principales adaptadores son los APs (Bassham, 2008).

1.4.4 Complejos adaptadores (APs)

En organismos eucariotas se conocen 4 tipos de complejos adaptadores: AP-1, AP-2, AP-3 y AP-4. En vertebrados y plantas están presentes los cuatro tipos, sin embargo, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *S. cerevisiae* y *S. pombe* poseen únicamente los complejos AP-1, AP-2 y AP-3 (Boehm & Bonifacino 2001). Los primeros complejos identificados fueron AP-1 y AP-2, por su interacción con clatrina, y posteriormente se identificaron AP-3 y AP-4 por homología de secuencia.

A) Estructura de los complejos adaptadores:

Los complejos adaptadores están formados por 4 subunidades, denominadas adaptinas: una pequeña, de unos 20 kDa (σ 1-4), una mediana de unos 50 kDa (μ 1-4) y dos grandes, con un tamaño comprendido entre los 90 y los 130 kDa (Boehm & Bonifacino 2001). Una de las subunidades grandes se denomina α , γ , δ ó ϵ , según el complejo, y la otra β 1-4, en los respectivos complejos (Figura 1.17).

La mayoría de las adaptinas se expresan de forma ubicua, pero algunas aparecen únicamente en determinados tejidos como las adaptinas μ 3B y β 3B de animales, que se expresan únicamente en el cerebro (Pevsner *et al.*, 1994), o la adaptina μ 1B de animales, cuya expresión se limita a las células epiteliales polarizadas (Ohno *et al.*, 1999). Por ello, en estos organismos se diferencia entre los complejos AP-1A y AP3A (presentes de forma ubicua) y los complejos AP-1B y AP-3B (presentes únicamente en los tejidos arriba mencionados).

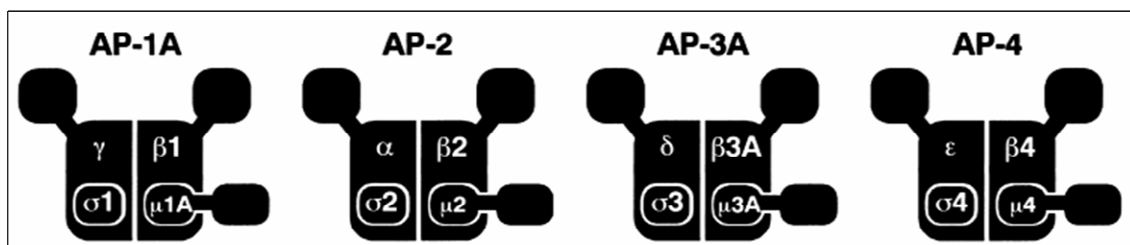


Figura 1.17: Representación de los complejos adaptadores. Esquema mostrando las distintas subunidades de los principales complejos AP (Extraída de Nakatsu & Ohno 2003).

Las diferentes subunidades de los complejos (adaptinas) se ensamblan formando una estructura en la que dos regiones apéndice (“appendage” o “ears”) están conectados

con el núcleo central (“*core*”, “*head*” o “*trunk*”) por una región bisagra (“*hinge*” o “*stalk*”). La mayoría de los estudios estructurales se han llevado a cabo con el complejo AP2, ya que es el más abundante (Figura 1.18). De este modo, se ha visto que los apéndices están formados por los dominios C-terminal de las subunidades grandes (α y $\beta 2$ para el complejo AP-2), mientras que el núcleo central está formado por las subunidades pequeña y mediana ($\sigma 2$ y $\mu 2$ en AP-2) unidas estrechamente a los extremos N-terminal de las subunidades grandes (Collins *et al.*, 2002; revisado en Kirchhausen 2002). Por lo tanto, las subunidades grandes quedan divididas en tres dominios: “*trunk*”, “*hinge*” y “*ear*”.

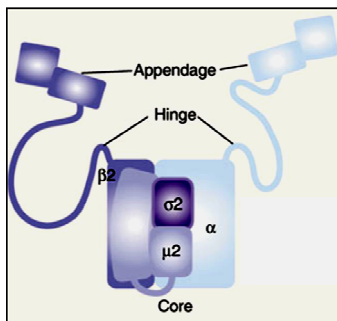


Figura 1.18: Esquema indicando las diferentes regiones que conforman los complejos AP (“*Appendage*”, “*hinge*” y “*core*”). La Figura muestra el caso concreto del complejo AP2. (Extraída de Ohno, 2006a).

Cada una de las subunidades del complejo, e incluso cada región dentro de una subunidad, tiene un papel específico en la formación de la vesícula (revisado en Ohno, 2006a), tal y como se explica a continuación.

Una de las subunidades grandes, (α , γ , δ o ϵ) participa en la unión del complejo adaptador a la membrana del compartimento donador. Concretamente, se ha visto que la adaptina $\alpha 2$ del complejo AP-2 es capaz de unir fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato y/o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato, lípidos que predominan en la membrana plasmática (Gaidarov y Keen 1999; Collins *et al.*, 2002). Asimismo, se ha descrito que la subunidad mediana de este complejo, $\mu 2$, también es capaz de interactuar con estos fosfolípidos (Collins *et al.*, 2002). Por otro lado, también se conoce que el complejo AP1 es capaz de unir *in vitro* fosfatidilinositol (4)-monofosfato, lípido presente principalmente en las membranas del trans-Golgi (Wang *et al.*, 2003). Por lo tanto, además de la acción de la GTPasa Arf1, la interacción con los fosfolípidos de membrana (plasmática o intracelular) resulta esencial para el reclutamiento de los complejos adaptadores a la membrana del orgánulo apropiado en cada caso (PM para el complejo AP2 y Golgi para el complejo AP1).

La otra subunidad grande ($\beta 1-4$) participa en la unión a clatrina, ya que en su dominio “*hinge*” se encuentra una secuencia consenso de 5 aminoácidos con la forma

L Φ x Φ D/E (siendo Φ un residuo hidrofóbico y x cualquier aminoácido) denominada “caja clatrina”, que se encarga de la unión con esta proteína (revisado en Owen *et al.*, 2004). En relación a la interacción con clatrina, se ha demostrado que los complejos AP-1 y AP-2 se unen a esta proteína durante la formación de las vesículas. Sin embargo, existe cierta controversia en relación a si los complejos caracterizados más recientemente (AP-3 y AP-4) también unen clatrina (Barois y Bakke, 2005).

Los apéndices de las adaptinas grandes de los complejos AP, interaccionan con varias proteínas adaptadoras o accesorias que participan en la regulación de la formación y desensamblaje de la vesícula, así como en la selección del cargo (revisado en Owen, 2004). Asimismo, se ha visto que el apéndice de la adaptina β 2 tiene un sitio de unión a clatrina adicional al existente en el dominio “hinge” (Owen *et al.*, 2000).

Las subunidades medianas (μ) tienen 2 dominios: el extremo N-terminal (aproximadamente un tercio de la proteína total), que forma parte del “core” del complejo, y el extremo C-terminal (dos tercios de la proteína total). Este último determina la selección del cargo, ya que reconoce el motivo tirosina Yxx Φ (siendo x cualquier aminoácido y Φ un residuo hidrofóbico), una de las señales más comunes presentes en los dominios citosólicos de las proteínas cargo. El mecanismo por el cual ocurre este reconocimiento se ha caracterizado en el caso del complejo AP2 e implica un cambio conformacional de dicho complejo (Collins *et al.*, 2002), que probablemente es inducido por la fosforilación de la subunidad μ 2 (Ricotta *et al.*, 2002).

En relación al reconocimiento del cargo, existe otro motivo comúnmente reconocido por los complejos adaptadores AP: el motivo dileucina, que consiste en un par de residuos de leucina (o isoleucina) precedidos por uno o varios residuos ácidos. La secuencia consenso de esta señal de reconocimiento es: [DE]xxxL[IL] (siendo x cualquier aminoácido). El lugar exacto de unión a este motivo dentro de los complejos AP se desconoce, pero se encuentra en el núcleo o centro del complejo (revisado en Owen *et al.*, 2004; Robinson, 2004).

Finalmente, las subunidades pequeñas σ , que también forman parte del centro o núcleo del complejo, parecen estar involucradas en su estabilización (Collins *et al.*, 2002).

B) Funciones de los diferentes complejos AP:

Cada complejo AP interviene en un proceso de transporte diferente bien de la ruta endocítica o del post-Golgi.

El complejo AP1-A regula el transporte vesicular entre la red trans-Golgi TGN y los endosomas, aunque la dirección del transporte no está clara. De hecho parece que participa en la formación de vesículas en ambos organelos. En levadura, AP-1 está involucrado en la formación de vesículas en el trans-Golgi, siendo los posibles organelos destino el compartimento prevacuolar o la vacuola. En mamíferos, AP-1A se requiere para el desarrollo embrionario y está implicado en el transporte bidireccional de dos MPRs (“*Mannose 6- Phosphate Receptors*”) entre el TGN y los endosomas (revisado en Boehm & Bonifacino 2002). En *A. thaliana* existen dos genes que codifican para cada una de las subunidades del complejo (Tabla IV). La subunidad β se ha denominado $\beta 1/2$, ya que puede pertenecer tanto al complejo AP-1, como al AP-2 (Boehm & Bonifacino, 2001). Se ha descrito, que el complejo AP1 en *A. thaliana* interacciona con la cola citoplasmática del receptor ELP (“*Epidermal growth factor receptor Like Protein*”) implicado en la selección de proteínas que van a ser dirigidas a vacuola, por lo que AP1 puede tener un papel en clasificar el cargo dirigido a este compartimento (revisado en Bassham *et al.*, 2008).

Como se ha indicado anteriormente, AP-1B se encuentra únicamente en células epiteliales polarizadas, y media la selección de varias proteínas cargo para su transporte a la membrana basolateral de estas células (Fölsch *et al.*, 1999).

El complejo AP-2 fue el primero en ser caracterizado y está implicado principalmente en la formación de vesículas en la PM por endocitosis, cuyo destino es la fusión con los endosomas tempranos (Owen & Lucio, 2000; Collins *et al.*, 2002). En *C. elegans* y *D. melanogaster*, este complejo juega un papel esencial en el desarrollo embrionario (revisado en Boehm & Bonifacino 2002), al igual que ocurre en ratón (Ohno, 2006b).

AP-3A está involucrado en el tráfico de vesículas que transportan proteínas transmembrana desde el TGN y/o endosomas tempranos a los a los lisosomas o orgánulos relacionados con lisosomas (en animales), o a la vacuola (en plantas y levadura).

El complejo AP-3B, expresado en células neuronales, está implicado en la clasificación y tráfico de proteínas de membrana de las vesículas sinápticas (Newell-Litwa *et al.*, 2007).

Por último, el complejo AP-4 ha sido descrito en células de mamíferos, pero no se encuentra en hongos (Boehm & Bonifacino 2001). El análisis de la secuencia de la subunidad β de este complejo muestra que AP4 no posee la “caja clatrina” (Lundmark

& Carlsson 2002), sin embargo un estudio indica que el complejo sí es capaz de interactuar con clatrina (Barois & Bakke 2005). El complejo AP4 se localiza en Golgi y en endosomas (Barois & Bakke 2005). En células HeLa, la subunidad μ 4 interactúa con proteínas cargo y media su transporte directo a lisosomas sin pasar por la membrana plasmática (Aguilar *et al.*, 2001). Por otro lado, en células epiteliales MDCK (“*Madin-Darby Canine Kidney*”) la subunidad μ 4 interactúa con proteínas cargo destinadas a la membrana basolateral de las células epiteliales (Simmen *et al.*, 2002). Como muestra la Tabla IV en *A. thaliana* existe un gen homólogo para cada una de las subunidades del complejo, si bien su función en este organismo se desconoce hasta el momento.

1.4.5 El complejo AP3

A) El complejo AP-3 en mamíferos:

Como se ha comentado anteriormente, los mamíferos poseen dos complejos AP-3, uno de ellos se expresa de forma ubicua (AP-3A), y el otro en células neuronales (AP-3B).

Tal y como se observa en la Figura 1.19A, en mamíferos existen 3 adaptinas (β 3, σ 3 y μ 3) que son codificadas por dos genes, dando lugar a las isoformas A y B. Mientras que las subunidades σ 3A y σ 3B, se expresan de forma ubicua y parecen ser funcionalmente equivalentes, las subunidades β 3B y μ 3B se expresan exclusivamente en cerebro, por lo que forman parte del complejo AP-3B (revisado en Newell-Litwa *et al.*, 2007; Dell’Angelica, 2009) (Figura 1.19B).

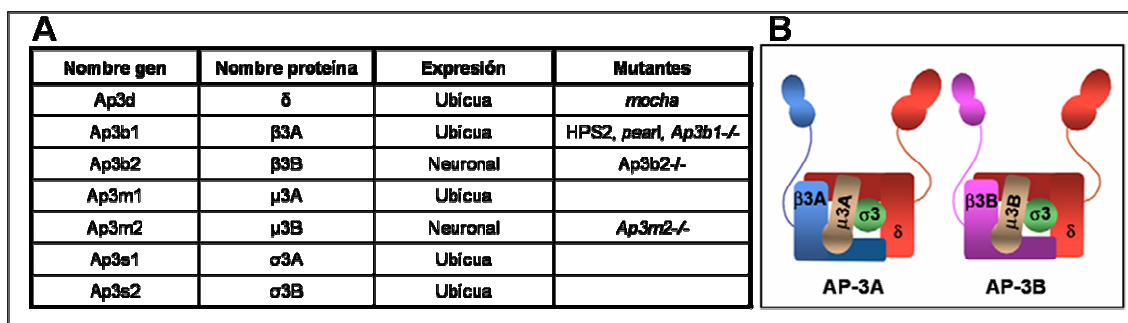


Figura 1.19: Subunidades de los complejos AP-3 en mamíferos. A) Genes, proteínas y mutantes de las diferentes subunidades. B) Modelo de las subunidades que componen los complejos AP-3A y AP-3B (Modificada a partir de Newell-Litwa *et al.*, 2007).

Gran parte del conocimiento de la función de los complejos AP-3 en humanos y ratones, proviene del estudio de mutantes en subunidades de estos complejos.

En humanos, mutaciones en la adaptina $\beta 3A$ provocan un subtipo del síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS de “*Hermansky-Pudlak Síndrome*”) denominado HPS-2. El síndrome de Hermansky-Pudlak consiste en un grupo de diferentes desórdenes genéticos autosómicos y recesivos, que comparten síntomas como albinismo parcial ocular y cutáneo y anormalidades en las plaquetas que provocan hemorragias (Huizing *et al.*, 2002). Estos síntomas aparecen porque la función o la biogénesis de los lisosomas u organelos relacionados con los lisosomas (como los melanosomas o los gránulos densos (o delta) de las plaquetas) está alterada. Estudios realizados con fibroblastos de pacientes de HPS2, muestran que estos pacientes presentan una deslocalización parcial de proteínas lisosomales LAMPs (“*Lysosomal-Associated Membrane Protein*”), que se sitúan en la membrana plasmática (revisado en Ohno, 2006b).

En ratón se conocen también varias mutaciones que provocan HPS. Entre ellas se encuentran las mutaciones “*pearl*” (Feng *et al.*, 1999) y *mocha* (Kantheti *et al.*, 1998), que afectan a los genes codificantes de las adaptinas $\beta 3A$ y δ respectivamente (Figura 1.19A). Los fibroblastos aislados de estos ratones también contienen cantidades anormales de LAMPs en la membrana plasmática. Como se observa en la Figura 1.19, la subunidad δ , se comparte en los complejos AP-3A y AP-3B. Por lo tanto, el mutante “*mocha*”, carece de ambos complejos, lo que hace que sufra de anormalidades neurológicas adicionales a los síntomas ya comentados para los HPS (revisado en Nakatsu y Ohno, 2003).

Al igual que en el caso de mamíferos, las mutaciones en subunidades del complejo AP-3 de *D. melanogaster* provocan alteraciones en la pigmentación de los ojos, ya que afectan al tráfico de proteínas a los gránulos de los pigmentos (revisado en Odorizzi *et al.*, 1998).

Todos estos estudios muestran la relevancia del complejo AP-3 para la correcta localización de proteínas de membrana en lisosomas u orgánulos relacionados con los lisosomas. De hecho, además de las proteínas LAMP I y LAMP II, se ha visto que otras proteínas integrales de membrana del lisosoma como LIMP-2 (“*Lysosomal Integral Membrane Protein*”) y CD63, muestran un mayor tráfico hacia la membrana plasmática en mutantes en el complejo AP-3 (Le Borgne *et al.*, 1998; Dell’Angelica *et al.*, 1999).

En relación a la localización subcelular del complejo AP-3, varios trabajos muestran que se encuentra tanto en TGN como en endosomas (Dell’Angelica *et al.*, 1997), aunque en estudios más recientes sólo se ha localizado en los endosomas (Peden *et al.*, 2004).

Otro aspecto que genera controversia es si el complejo AP-3 interactúa con clatrina. Aunque tanto la subunidad $\beta 3A$ como la $\beta 3B$ poseen el dominio de interacción con clatrina, existen trabajos que apoyan ambas teorías. Probablemente el complejo AP-3 pueda generar vesículas con diferentes composiciones (con o sin clatrina) (revisado en Newell-Litwa *et al.*, 2007).

Por lo tanto, este complejo en mamíferos mediaría el tráfico de proteínas integrales de membrana del TGN y/o endosomas tempranos a los lisosomas u orgánulos relacionados con lisosomas, de forma dependiente o independiente de clatrina (Figura 1.20).

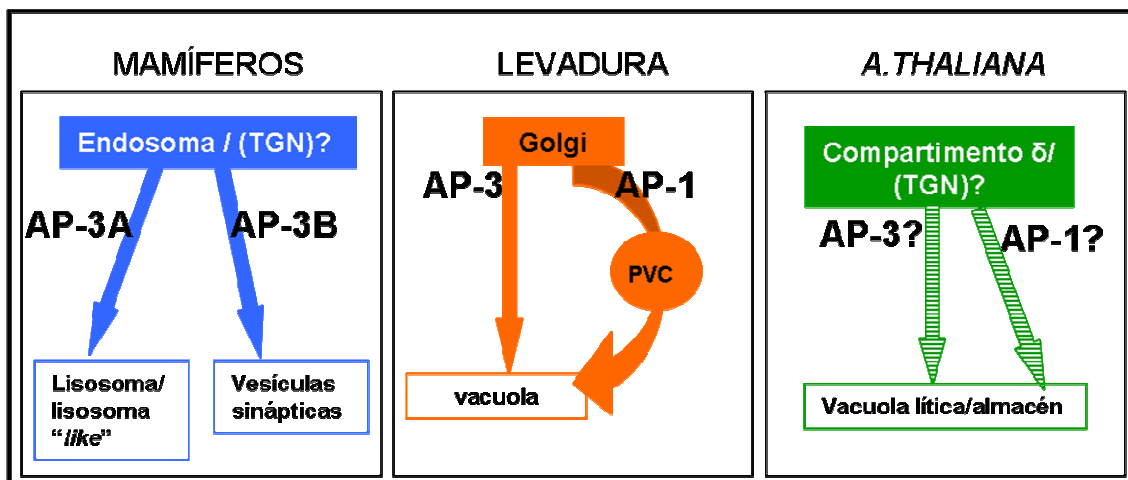


Figura 1.20: Esquema de la función sugerida para los complejos AP3 de mamíferos, levadura y *A. thaliana*. En el caso de levadura y *A. thaliana* se muestra también la ruta a vacuola en la que participa el complejo AP-1. Las flechas discontinuas en el caso de *A. thaliana* indican el desconocimiento todavía existente.

B) AP-3 en levadura:

En levadura, el complejo AP-3 se identificó de forma independiente mediante dos rastreos genéticos, uno de ellos buscando factores requeridos para el tráfico a vacuola de la fosfatasa alcalina (ALP) (Cowles *et al.*, 1997), y el otro buscando supresores de la letalidad causada por la falta de dos homólogos de la caseína quinasa de tipo I (Panek *et al.*, 1997).

El transporte a vacuola de la mayoría de proteínas cargo estudiadas, incluyendo la hidrolasa soluble carboxipeptidasa Y (CPY) y la carboxipeptidasa S (CPS), sigue la denominada “ruta CPY”, que implica el paso previo por un compartimento prevacuolar. En esta ruta interviene el complejo AP-1, además de varios genes VPS (“*Vacuolar Protein Sorting*”) (Figura 1.20). Sin embargo, se ha visto que esta “ruta CPY” no es la única vía para el transporte de proteínas desde Golgi a vacuola, ya que la fosfatasa

alcalina de vacuola (ALP) y el t-SNARE Vam3p, siguen una ruta paralela, independiente de los genes *vps* arriba mencionados (Piper *et al.*, 1997b; revisado en Odorizzi *et al.*, 1998).

Se ha comprobado que mutaciones en las diferentes subunidades del complejo AP-3 de levadura, provocan la deslocalización de la proteína ALP, que en lugar de situarse en la vacuola, se acumula en pequeñas vesículas en el citoplasma (Stepp *et al.*, 1997; Cowles *et al.*, 1997). Sin embargo, las mutaciones en subunidades del complejo AP-3 no afectan al tráfico de otras proteínas vacuolares como la CPY o la CPS (Carboxipeptidasa S), que siguen la ruta clásica de transporte a vacuola: “ruta VPS o ruta CPY”. Asimismo, deleciones en los complejos AP-1 y AP-2 no afectan al tráfico de la fosfatasa ALP. Por otro lado, los mutantes en las subunidades del complejo AP-3 también muestran una deslocalización de Vam3p, SNARE que actúa en el transporte a vacuola (Cowles *et al.*, 1997).

Por lo tanto, mediante estos trabajos se ha establecido que en levadura existen dos rutas principales para el transporte de hidrolasas a vacuola: la “ruta CPY”, y la “ruta ALP”. El complejo AP-3 es necesario para el transporte de proteínas a través de la “ruta ALP” (Piper *et al.*, 1997b), que se ha sugerido que transporta el cargo desde el TGN de forma directa a la vacuola, sin pasar por un compartimento prevacuolar (Figura 1.20).

En levadura se han identificado otras proteínas que siguen la ruta ALP para ser transportadas a vacuola, como la proteína Yck3p (“*Yeast casein kinase 3*”) (Panek *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2004) y la proteína SNARE Nyv1p (Wen *et al.*, 2006). En relación a la Yck3p, se sabe que es transportada a la cara citosólica de la membrana vacuolar. Sin embargo, mutaciones en subunidades del complejo AP-3 provocan la deslocalización de la quinasa a la membrana plasmática (Sun *et al.*, 2004). La proteína Yck3p, es similar a las proteínas Yck1p y Yck2p, caseína quinasas de tipo I que se localizan en la membrana plasmática. Como se ha dicho anteriormente, las mutaciones en el complejo AP-3 se descubrieron inicialmente por ser supresoras de las mutaciones *yck1Δ yck2-ts*, ya que posibilitaban el crecimiento de este doble mutante termosensible a 37° (Panek *et al.*, 1997). Esta supresión del fenotipo mutante ocurre porque en los mutantes en subunidades del complejo AP-3, la Yck3p se localiza en membrana plasmática, en vez de en vacuola, por lo que es capaz de suplir parcialmente la función de Yck1p y Yck2p (Sun *et al.*, 2004).

Finalmente, en relación a las señales que reconoce el complejo AP-3 de levadura para seleccionar el cargo a transportar, se sabe que las proteínas ALP y Vam3p poseen

un dominio dileucina o similar a dileucina (Vowels y Payne 1998; Darsow *et al.*, 1998), mientras que las proteínas Yck3p y Nyv1p poseen una señal de tipo tirosina (Sun *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2006). Estos dominios son los responsables del correcto reconocimiento por parte del complejo AP-3. De hecho, la eliminación de estas señales en la ALP y Vam3p, hace que las proteínas sigan la ruta CPY a vacuola (Vowels & Payne 1998; Darsow *et al.*, 1998). En el caso de la Yck3p y el SNARE Nyv1p, la mutación del dominio que actúa como señal de reconocimiento provoca su deslocalización a membrana plasmática y lumen vacuolar respectivamente (Sun *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2006).

C) AP3 en *A. thaliana*:

En el genoma de *A. thaliana*, existe un único gen que codifica para cada una de las adaptinas del complejo AP-3 (δ , $\beta 3$, $\mu 3$ y $\sigma 3$) (Tabla IV). Diversos trabajos empiezan a arrojar luz sobre la función de este complejo en *A. thaliana*.

En primer lugar, en un trabajo investigando la función biológica de la epsina reguladora del tráfico de vesículas (EpsinR2) de *A. thaliana*, se demostró que esta proteína interacciona, entre otros, con clatrina, con la adaptina δ y con fosfatidilinositol 3-fosfato. Asimismo se determinó que EpsinR2 colocaliza con clatrina y con la adaptina δ en un nuevo compartimento endomembrana que se denominó “compartimento δ ” (Lee *et al.* 2007a). Por tanto, este estudio establece que el complejo AP-3, o al menos la adaptina δ , se localiza mayoritariamente en un compartimento rico en fosfatidilinositol 3 fosfato, distinto del aparato de Golgi, distinto del PVC, y distinto de los endosomas involucrados en la endocitosis, que se ha denominado “compartimento δ ” (Lee *et al.*, 2007A).

Por otro lado, un estudio posterior demuestra que la proteína TFL1 (“*Terminal Flower 1*”), esencial para un correcto tráfico hacia las vacuolas de almacén (PSVs), también colocaliza con la adaptina δ del complejo AP-3. De forma consistente con el estudio anterior, se indica que el complejo se encuentra en un compartimento diferente al PVC, y se muestra que tampoco se asocia a las vacuolas de almacén o las vacuolas líticas. Este dato indica un posible “rol” del complejo AP-3 en el tráfico de vesículas a las vacuolas de almacén. Esta función estaría relacionada con la función establecida en animales, ya que estas vacuolas podrían asemejarse a los orgánulos relacionados con lisosomas en los que los animales acumulan pigmentos (Sohn *et al.*, 2007).

Más recientemente, se ha identificado un mutante de pérdida de función en la adaptina $\mu 3$, como supresor del mutante *zig1* (*zigzag1/vti11*), alterado en el gravitropismo de la parte aérea y cuya mutación afecta a la SNARE VTI11. Esta SNARE participa en el tráfico de vesículas entre TGN y la vacuola / PVC. Asimismo, se ha demostrado que mutaciones en otras subunidades del complejo (δ y $\beta 3$), también son capaces de suprimir los fenotipos del mutante *zig1*. Este trabajo indica que el complejo AP-3 es funcional en *A. thaliana*, y sugiere que participa en el tráfico de vesículas entre compartimentos del TGN y la vacuola (Niihama *et al.*, 2009).

Por último, un rastreo buscando reguladores de las rutas de tráfico de proteínas, ha permitido identificar un mutante en la adaptina $\beta 3$ del complejo AP-3 de *A. thaliana* que se ha denominado *pat2* (“*protein affected trafficking 2*”). El rastreo se realizó sobre una población mutagenizada de plantas expresando el transportador PIN1 unido a GFP, seleccionando los mutantes que mostraban una distribución de PIN1 alterada en la raíz primaria (Feraru *et al.*, 2010). *pat2* es un mutante recesivo de pérdida de función que no posee fenotipos morfológicos fuertes, pero sí presenta claros defectos en el tráfico de proteínas, así como en la morfología y función de la vacuola lítica. Por este motivo, los autores proponen que el complejo AP-3 tiene un importante papel en la biogénesis de la vacuola lítica y en la transición de vacuola de almacén a vacuola lítica (Feraru *et al.*, 2010).

En el mismo trabajo, se analiza la localización subcelular de la adaptina $\beta 3$ de *A. thaliana*, mostrando que es una proteína principalmente citosólica, pero que se encuentra también asociada a algún compartimento endomembrana, de identidad desconocida, que no coincide con el aparato de Golgi, ni el TGN, ni el PVC (Feraru *et al.*, 2010). Este resultado es consistente con el dato comentado anteriormente de que la adaptina δ se localiza en un compartimento endomembrana desconocido hasta el momento (Lee *et al.*, 2007a).

Por otro lado, se demuestra que la proteína de *A. thaliana* es capaz de complementar al mutante de levadura en la adaptina $\beta 3$, ya que revierte en gran medida el fenotipo de deslocalización de la proteína ALP propio de este mutante (Feraru *et al.*, 2010). Considerando que la función de esta proteína está parcialmente conservada, se mantiene la importancia de este complejo en el tráfico a vacuola, probablemente desde el Post-Golgi.

Por lo tanto, en este último trabajo se propone un nuevo papel de esta proteína en la biogénesis de la vacuola, sin descartar la participación de este complejo en el tráfico a vacuola lítica o vacuola de almacén sugerida por otros autores (Figura 1.20).

1.5 El ácido abscísico en la célula vegetal

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona implicada en el control de procesos vegetales esenciales. Desde el punto de vista químico, el ABA es un sesquiterpeno de 15 carbonos ($C_{15}H_{20}O_4$), que posee un carbono asimétrico ópticamente activo en posición C-1' (Figura 1.21). El enantiómero natural es la forma S-(+)-ABA, mientras que la forma R-(-)-ABA no se produce normalmente. Como se observa en la Figura 1.21, en la cadena lateral del ABA existe un grupo carboxilo ($pK_a=4,8$), que hace que el ABA se comporte como un ácido débil. Asimismo, en dicha cadena hay dos dobles enlaces, que, por definición, tienen una configuración 2-cis,4-trans, siendo biológicamente inactiva la isoforma con la cadena lateral 2-trans,4-trans.

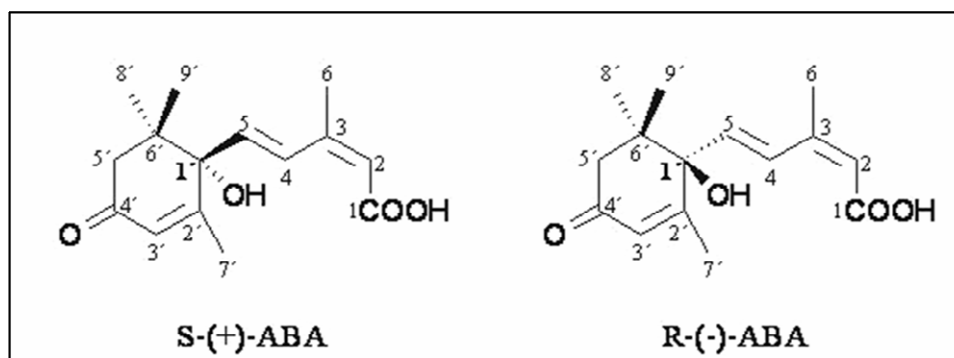


Figura 1.21 Estructura química de los enantiómeros del ácido abscísico. La forma natural es el enantiómero S-(+)-ABA mientras que el enantiómero R-(-)-ABA no es natural. Se incluye la numeración de los carbonos de ambos enantiómeros y se destaca el carbono ópticamente activo C1'. La cadena lateral de ambos enantiómeros es 2-cis,4-trans.

1.5.1 Funciones fisiológicas del ácido abscísico

El ABA tiene un importante papel en muchos procesos del desarrollo vegetal, así como en la respuesta a estreses abióticos y bióticos.

A) El ácido abscísico en el desarrollo vegetal:

El ABA está implicado en diferentes etapas del desarrollo de la planta:

Durante el desarrollo y maduración de la semillas, el ABA promueve la síntesis de lípidos y proteínas de almacenamiento. Por otro lado, es esencial para la adquisición

de tolerancia a la desecación, así como para el establecimiento de la dormancia (Filkenstein *et al.*, 2002).

En el estadio de germinación y establecimiento de la plántula, también juega un papel crucial, ya que la germinación de la semilla está regulada de forma antagónica por la relación ABA-giberelinas (GAs), entre otros factores (factores ambientales como la imbibición con agua, y factores hormonales como el etileno o los brasinoesteroides). En efecto, se ha descrito que cuando las condiciones ambientales favorecen la germinación, aumentan los niveles de GAs (Olszewski *et al.*, 2002) y se reducen los de ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). Las GAs promueven la germinación facilitando la degradación por el proteosoma de proteínas tipo DELLA que actúan como represores de la germinación (especialmente RGL2: “*RGA- Like 2*”, siendo RGA: “*Represor of GAI-3*”), concretamente del proceso de ruptura de la testa. El ABA inhibe la germinación promoviendo la expresión (y activación) de factores de transcripción como ABI5 (“*ABA Insensitive 5*”), que actúa como represor de la germinación, especialmente en el proceso de ruptura del endospermo (Piskurewicz *et al.*, 2008; Piskurewicz *et al.*, 2009). Por otro lado, la relación ABA-GAs también juega un papel en la salida de la latencia de la semilla y la movilización de reservas para la germinación. Por ejemplo, durante la germinación en granos de cereales, se ha caracterizado el efecto antagonista del ABA frente a GA, por inhibir la síntesis de α -amilasa (revisado en Lovegrove y Hooley, 2000).

Finalmente, se le atribuye al ABA un efecto en el crecimiento general y en la reproducción, ya que mutantes insensibles o deficientes en ABA, muestran defectos en el crecimiento y tienen afectada la producción de semillas en condiciones normales de riego y humedad (Barrero *et al.*, 2005; Fujii y Zhu, 2009).

B) El ácido abscísico en respuesta a estrés:

El ácido abscísico tiene un importante papel en la regulación del estado hídrico de la planta. Diversos estreses como la sequía, la salinidad o el frío, pueden provocar estrés hídrico en la planta, estimulando la biosíntesis de ABA (Xiong *et al.*, 2002; Verslues *et al.*, 2006). En respuesta a estrés hídrico, el ABA actúa a tres niveles: evitar la pérdida de agua, incrementar al máximo la toma de agua, e inducir la expresión de genes que ayuden a tolerar la situación de estrés.

En primer lugar, para minimizar la pérdida de agua por transpiración, la planta disminuye la apertura estomática. El ABA es el principal regulador de este proceso, ya

que puede promover el cierre de los estomas así como inhibir su apertura (Schroeder *et al.*, 2001; Sirichandra *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2010). Por otra parte, la planta necesita desarrollar su sistema radicular para maximizar la toma de agua. En relación a este aspecto, se ha visto que el ABA es esencial para mantener el crecimiento de la raíz en condiciones de estrés hídrico (Sharp *et al.*, 2004). Por último, el ABA induce la transcripción de un gran número de genes involucrados en la respuesta a estrés. De este modo promueve la acumulación de osmolitos compatibles como la prolina, que favorecen la retención de agua, así como la acumulación de proteínas LEA (“*Late-Embryogenesis-Abundant*”) que protegen las proteínas y membranas celulares frente a la desecación (Ingram & Bartels, 1996).

Finalmente, es importante destacar que, aunque el ABA siempre se ha relacionado con la tolerancia a estreses abióticos, también se le ha atribuido, más recientemente, un papel en la respuesta a patógenos (Ton *et al.*, 2009).

1.5.2 Biosíntesis del ABA

A) Pasos que tienen lugar en los cloroplastos:

El ácido abscísico es un isoprenoide (o terpenoide), que deriva del isopentenil difosfato (IPP), producido por la ruta MEP (“*2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate*”) a partir de gliceraldehído 3-fosfato y piruvato. Una vez sintetizado el IPP, en varios pasos, se forma licopeno, que se circulariza a β -caroteno y se hidroxila para formar la zeaxantina, el primer carotenoide oxigenado.

A partir de la zeaxantina, los siguientes pasos, llevan a la formación de los isómeros *cis* de la violaxantina y noexantina, que se romperán para formar un precursor de ABA de 15 carbonos: la xantoxina (Figura 1.22).

La conversión de zeaxantina en *trans*-violaxantina, está catalizada por la zeaxantina epoxidasa (ZEP), y ocurre a través de un intermediario: la anteraxantina. En *A. thaliana*, el gen que codifica para esta enzima es *ABAI*, y se han aislado mutantes en este gen, que muestran, una drástica reducción del contenido en ABA (Koornneef *et al.*, 1982). La síntesis de *trans*-neoxantina a partir de la *trans*-violaxantina la lleva a cabo una neoxantina sintetasa (NSY), que parece estar codificada por el gen *ABA4* en *A. thaliana* (North *et al.*, 2007). Dado que, en esta especie, la xantoxina se forma a partir de isómeros *cis*, tanto de la violaxantina como de la neoxantina, es necesaria la acción de isomerasas, que de momento no han sido identificadas, para formar *cis*-violaxantina y *cis*-neoxantina. Ambos sustratos pueden ser empleados por la 9-epoxicarotenoide

dioxigenasa (NCED), para producir xantoxina, que entrará en el citosol. En *A. thaliana* se han identificado 9 genes que codifican para NCEDs, y análisis funcionales indican que 5 de ellos están involucrados en la biosíntesis de ABA (revisado en Nambara y Marion-Poll, 2005).

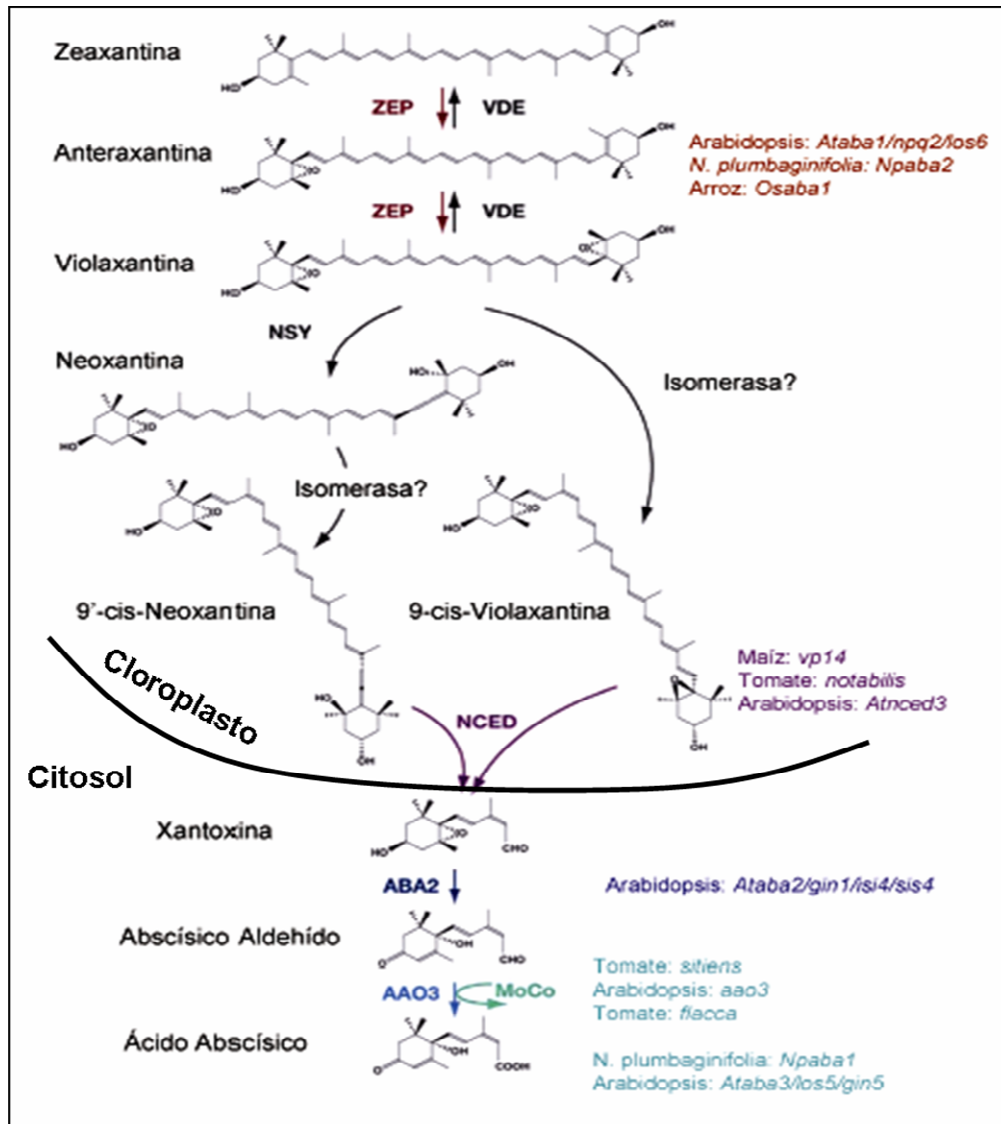


Figura 1.22: Ruta de biosíntesis de ácido abscísico. ZEP: Zeaxantina epoxidasa; VDE: Violaxantina de-epoxidasa; NSY: neoxantina sintasa; NCED: 9'-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa. AAO: Abscísico aldehído oxidasa. A la derecha se muestra una lista de mutantes en cada paso enzimático. Modificada a partir de Nambara y Marion-Poll (2005).

B) Pasos que tienen lugar en el citosol:

Una vez formada la xantoxina, será transportada al citosol, donde tienen lugar los dos últimos pasos de la ruta de biosíntesis de ABA (Figura 1.22).

En primer lugar la xantoxina se transforma en aldehído abscísico mediante una alcohol deshidrogenasa. En *A. thaliana*, esta enzima está codificada por un único gen: *ABA2*, cuya pérdida de función provoca una severa deficiencia en ABA (González-Guzmán *et al.*, 2002). El último paso en la biosíntesis de ABA consiste en la oxidación del aldehído abscísico a ácido abscísico, reacción que, en *A. thaliana*, es catabolizada por la abscísico aldehído oxidasa AAO3 (Seo *et al.*, 2000), enzima que requiere un cofactor de molibdeno (MoCo).

1.5.3 Cascadas de señalización del ácido abscísico

A) Receptores de ácido abscísico:

Hasta el momento, se han descrito varios receptores de ABA, aunque la función de muchos de ellos es confusa, y la de algunos no se ha confirmado (Razem *et al.*, 2006; Risk *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2009).

Sin embargo, recientemente, se ha identificado, por 4 grupos de investigación independientes, una nueva familia de proteínas que actúan como receptores de ABA, denominada familia PYR/PYL/RCAR, siendo PYR: “*Pyrabactin Resistance 1*”; PYL: “*Pyrabactin resistant 1-Like*” y RCAR “*Regulatory Component of ABA Receptor*”. Esta familia de proteínas, pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a ligandos solubles con dominio START, que se caracteriza por tener una región conservada que forma un bolsillo central hidrofóbico de unión a ligando (revisado en Cutler *et al.*, 2010).

En *A. thaliana*, esta familia está formada por 14 miembros. Estudios bioquímicos y estructurales, han demostrado que varios miembros de esa familia unen ABA (Santiago *et al.*, 2009a; Santiago *et al.*, 2009b; Ma *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009). Asimismo, empleando protoplastos, se ha visto que todos los miembros de la familia (salvo PYL13), son capaces de activar la señalización por abscísico en respuesta a ABA (Fujii *et al.*, 2009). Por último, existe un gran número de evidencias genéticas que demuestran el papel de estas proteínas en la señalización por abscísico. Por ejemplo, la sobreexpresión y la pérdida de función de PYL9 provocan hiper- e hiposensibilidad a ABA, respectivamente (Ma *et al.*, 2009). Del mismo modo, la sobreexpresión de PYL5, confiere resistencia a sequía en *A. thaliana* (Santiago *et al.*, 2009b). Finalmente, se ha obtenido el cuádruple mutante *pyr1;pyl1;pyl2;pyl4* que muestra una sensibilidad a ABA reducida en germinación y crecimiento radicular,

menor inducción de genes de respuesta a ABA, y menor activación de las proteínas quinasas activadas por ABA SnRK2s (“*SNF1-Related protein Kinase 2*”) (Park *et al.*, 2009). Todos estos trabajos señalan a esta familia de proteínas como receptores de abscísico intracelulares, capaces de regular muchos aspectos de la fisiología y la señalización de ácido abscísico.

Es importante destacar que los receptores de tipo PYR/PYL/RCAR, unen proteínas fosfatasas de tipo 2C (PP2Cs), que, como se comentará posteriormente, son reguladores negativos de la respuesta a ABA. De hecho, los receptores PYL9/RCAR1 y PYL8 fueron aislados por su interacción con la proteína fosfatasa ABI2 en un ensayo de doble híbrido (Szostkiewicz *et al.*, 2010) y, el receptor PYL5 se aisló por su interacción con la proteína fosfatasa HAB1 (Santiago *et al.*, 2009b). Asimismo, Nishimura y colaboradores (2010), demostraron que 9 de los 14 receptores de la familia interaccionan con la proteína fosfatasa ABI1.

A pesar de que algunas PP2C son capaces de interaccionar con los receptores de forma independiente de ABA en ensayos de doble híbrido, estudios estructurales indican que la unión de los receptores a ABA provoca un cambio conformacional en el receptor, que posibilita su interacción con residuos del sitio catalítico de las PP2Cs. Por lo tanto, la interacción entre los receptores de tipo PYR/PYL/RCAR, y las PP2Cs inactiva a las proteínas fosfatasas, ya que bloquea residuos de su sitio catalítico (revisado en Santiago *et al.*, 2010).

B) Proteínas fosfatasas en la señalización por ABA

Las proteínas fosfatasas involucradas en la señalización por abscísico, son serina-treonina fosfatasas. En plantas, este tipo de fosfatasas se subdivide en tres grupos: PP1, PP2A y PP2C. Aunque las proteínas fosfatasas de tipo 2A también están involucradas en la respuesta a ABA, las fosfatasas mejor caracterizadas pertenecen al grupo PP2C.

Las fosfatasas PP2Cs son enzimas monoméricas dependientes de Mg^{+2}/Mn^{+2} localizadas tanto en el núcleo como en el citosol. Este tipo de proteínas, se subdivide en 10 grupos (A-J). Las proteínas fosfatasas implicadas en la respuesta a abscísico pertenecen al grupo A (Tabla V). De hecho, al menos 6 de las proteínas de este grupo actúan como reguladores negativos de la señalización por ABA (Gosti *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001; Saez *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2006). De hecho, se ha descrito que la

inactivación simultánea de tres de ellas (HAB, ABI1 y PP2CA), provoca una respuesta a ABA parcialmente constitutiva (Rubio *et al.*, 2009).

Tabla V: Genes y nomenclatura de las proteínas fosfatasa PP2C pertenecientes al grupo A.

Locus	Nombre
At5g51760	AHG1 (“ <i>ABA Hypersensitive at Germination 1</i> ”)
At3g11410	PP2CA/AHG3
At5g59220	
At1g07430	AIP (“ <i>AKT1 Interacting PP2C1</i> ”)
At2g29380	
At1g17550	HAB2 (“ <i>Hypersensitive to ABA 2</i> ”)
At1g72770	HAB1
At4g26080	ABI1 (“ <i>ABA Insensitive 1</i> ”)
At5g57050	ABI2

Diversos trabajos han tratado de identificar las dianas de las PP2Cs. Mediante ensayos de doble híbrido, se ha establecido, que existen proteínas quinasas de la familia SnRK2s (subclase III), consideradas reguladores positivos de la señalización por ABA, capaces de interactuar con proteínas PP2Cs (Yoshida *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009). De hecho, se ha visto que en ausencia de ABA, las PP2Cs defosforilan e inactivan a las quinasas de tipo SnRK2s (Umezawa *et al.*, 2009).

El descubrimiento de que los receptores de tipo PYR/PYL/RCAR, son reguladores negativos de las PP2Cs, que a su vez, regulan negativamente a las SnRK2s, es la base de un modelo de señalización por ABA, mediado por una doble señalización negativa. Según este modelo, en condiciones normales las PP2Cs defosforilarían a las SnRK2s inactivándolas, por lo que la señal de ABA no se transmitiría. En presencia de ABA, el complejo formado por el ABA y el receptor PYR/PYL/RCAR, interactúa con la PP2C y la inhibe. De este modo, las SnRK2s se liberan de su inhibición y son capaces de transmitir la señal de ABA. Esta ruta de señalización se ha reconstituido *in vitro* (Fujii *et al.* 2009). Por lo tanto, el funcionamiento de estas proteína fosfatasa como reguladores negativos de la respuesta a ABA, es similar al descrito para otros represores de la respuesta hormonal, como las proteína DELLA o CTR en la señalización por auxinas y etileno, respectivamente. En todos estos casos, la respuesta a la hormona se haya reprimida de forma constitutiva, y la presencia de la hormona inhibe al represor, induciendo así la respuesta (revisado en Cutler *et al.*, 2010).

Además de las quinasas SnRK2s, se han identificado otras dianas de las PP2Cs, que sugieren una implicación de la señalización por ABA en la homeostasis de cationes

en respuesta a estrés. Por ejemplo, se ha descrito que ABI2 interacciona con SOS2, una quinasa de la familia SnRK3 implicada en la tolerancia a sal en *A. thaliana* (Ohta *et al.*, 2003, y que PP2CA es capaz de interaccionar con el canal de potasio AKT2 (Chérel *et al.*, 2002). Por último, se ha visto que la regulación del canal de potasio AKT1 está mediada por proteínas quinasas de la familia SnRK3s/CIPKs (“*CBL-Interacting Protein Kinase*”) y por la proteína fosfatasa de tipo 2C AIP1 (Lee *et al.*, 2007b).

Finalmente, el descubrimiento de que las proteínas SWI3B y una pre-proteína de fibrina son también dianas de proteínas PP2Cs, sugiere una posible relación entre la señalización por ABA y la remodelación de la cromatina, o la fotoinhibición por exceso de luz, respectivamente (revisado en Cutler *et al.*, 2010).

C) Proteína quinasas implicadas en la señalización por ABA

Se conocen diversas proteína quinasas implicadas en la señalización por abscísico. Algunas de ellas, como las SnRK2s nombradas anteriormente, actúan de manera independiente de calcio, mientras que otras como las SnRK3s/CIPKs y las CDPKs/CPKs (“*Calcium Dependent Protein Kinase*”) son dependientes de calcio.

Como se ha comentado anteriormente, las SnRK2s actúan como reguladores positivos de la respuesta a ABA. En *A. thaliana* existen 10 SnRK2s y 3 de ellas, se han caracterizado funcionalmente: SnRK2.6/OST1 (“*Open STomata 1*”) (Mustilli *et al.*, 2002; Sirichandra *et al.*, 2009b), SnRK2.2 y SnRK2.3 (Fujii *et al.*, 2007). El triple mutante *snrk2.2 snrk2.3 snrk2.6* es casi totalmente insensible a todas las respuestas mediadas ABA: inhibición de la germinación y crecimiento de la plántula, expresión génica y apertura-cierre de estomas, lo que demuestra la importancia de estas tres quinasas en la señalización por abscísico (Fujii y Zhu 2009). De acuerdo a los fenotipos del mutante simple *ost1* y del doble mutante *snrk2.2 snrk2.*, parece que las quinasas SnRK2.2 y SnRK2.3 tendrían una mayor importancia en la germinación y crecimiento de la raíz, y en la activación transcripcional de genes de respuesta a ABA, mientras que la quinasa OST1 tendría un papel más relevante en la apertura-cierre de estomas. Sin embargo, las tres quinasas funcionan de forma redundante en estos procesos, ya que el triple mutante muestra defectos más severos en la señalización (Fujii y Zhu 2009). Otras proteínas de esta familia como SnRK2.7 y SnRK2.8 también son activadas por ABA, aunque tendrían un papel menos relevante en la señalización.

Las proteínas de la familia SnRK3s interaccionan con proteínas de unión a calcio, del tipo SOS3/ScaBPs/CBLs (“*SOS3/SOS3-like calcium Binding*”).

Protein/Calcineurin B-Like Protein”). Al contrario que las SnRK2s, estas quinasas actúan como reguladores negativos de la respuesta a ABA. Concretamente la quinasa CIPK3/PKS12 parece regular la señalización de ABA en semillas (Kim *et al.*, 2003), mientras que la quinasa CIPK23 tendría una mayor relevancia en la señalización por ABA en los estomas (Cheong *et al.*, 2007). Por último, la quinasa CIPK15/PKS3 actuaría como regulador negativo tanto en semilla como en estomas (Guo *et al.*, 2002).

Finalmente, las quinasas de tipo CDPKs/CPKs poseen en un mismo péptido el dominio quinasa y el dominio sensor de calcio. Estas quinasas, al igual que las SnRK2s, actúan como reguladores positivos de la respuesta a ABA. La caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función en las proteínas CPK3, CPK6 indica que actúan como reguladores positivos de la señalización por ABA en estomas. Sin embargo, las mutaciones de pérdida de función en CPK4 y CPK11 otorgan un fenotipo pleiotrópico de insensibilidad a ABA tanto en apertura y cierre de estomas como en crecimiento temprano (revisado en Cutler *et al.*, 2010).

Por lo tanto, existen numerosas quinasas implicadas en la señalización por ABA, que pueden actuar bien como reguladores positivos, o como reguladores negativos de la señalización. Con este gran número de proteínas implicadas, parte de la señalización es redundante, si bien parece que existen componentes de la señalización cuyo papel es más relevante para alguna de los procesos regulados por ABA (como la germinación y crecimiento temprano, o la regulación de la apertura-cierre de estomas).

1.6 Biología molecular en *A. thaliana*

1.6.1 Empleo de *A. thaliana* como sistema modelo

En la investigación biológica siempre ha sido necesario el empleo de sistemas modelo para comprobar o refutar modelos teóricos. Al principio, se empleaban los organismos más accesibles o manejables y, con el tiempo, la investigación en un área determinada tiende a concentrarse en una especie en concreto (especie modelo), que posee un conjunto de características apropiadas para dilucidar procesos biológicos.

Arabidopsis thaliana es una planta autógena, perteneciente a la familia de las brasicáceas o crucíferas. Aunque carece de importancia agronómica reúne una serie de características que hacen que actualmente sea el modelo vegetal más ampliamente empleado en estudios de biología celular y molecular de plantas (Meyerowitz 1989).

En primer lugar, es un organismo eucariota y pluricelular, por lo que permite abordar estudios de respuesta integrada frente a un estrés. Además, posee un pequeño tamaño (30-40 cm de altura), un ciclo de vida corto (2-3 meses), una elevada producción de semillas (>10.000 semillas/planta), y un genoma pequeño (125 Mb), y completamente secuenciado.

Por otro lado, las herramientas de biología molecular como la mutagénesis, etiquetado de genes, rastreo de mutantes, clonaje posicional o la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*, pueden llevarse a cabo en *A. thaliana*.

Por todo ello, la comunidad científica emplea este organismo vegetal, y se han obtenido colecciones de líneas mutantes que se encuentran disponibles en centros como el “*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*” (NASC) o el “*Arabidopsis Biological Resource Centre*” (ABRC), que pueden resultar muy útiles en trabajos de genómica funcional (www.arabidopsis.info).

1.6.2 Estrategias para la identificación de genes involucrados en la tolerancia a estrés

Existen diversas estrategias para identificar genes involucrados en la tolerancia a estrés en plantas, que podrían clasificarse en: estrategias de genética directa, de genética reversa, o las “ómicas”.

En las estrategias de genética directa, se selecciona de una población el individuo que posee el fenotipo deseado, para luego determinar el gen o ruta causante de dicho fenotipo. En este tipo de estrategias se emplea la variación natural, o la inducida mediante agentes mutagénicos, como el EMS (Etil Metano Sulfonato), los rayos ultravioleta, los transposones, o el T-DNA. En el caso de emplear la variación inducida por agentes mutagénicos, se genera una colección de mutantes, sobre los cuales se realizará un rastreo en busca del fenotipo de interés. Una vez identificado el mutante, se procederá al análisis genético y funcional que determine el gen responsable del fenotipo observado.

Las estrategias de genética reversa, se basan en una hipótesis previa según la cual un determinado gen (candidato) puede tener una función relevante en un proceso de interés, como la tolerancia a estrés. Partiendo de esta suposición, se realiza un análisis funcional del gen, por ejemplo obteniendo mutantes de pérdida de función, o sobreexpresándolo, y estudiando los fenotipos de estas plantas. Esta estrategia puede

indicar cuál es el papel concreto que desempeña un gen en la tolerancia al estrés estudiado.

Actualmente, se emplean cada vez más estrategias de transcriptómica, proteómica, o metabolómica (“ómicas”), que analizan desde una perspectiva global, el perfil de expresión genética, de proteínas traducidas, o de metabolitos presentes en una situación de estrés. Este tipo de estrategias, aportan mucha información, señalando a procesos o genes que pueden ser relevantes para la tolerancia al estrés. Las hipótesis realizadas en base a esta información, deberán ser contrastadas mediante posteriores estudios aplicando, por ejemplo, estrategias de genética reversa.

Existen, por tanto, numerosas estrategias para abordar un tema de interés como la tolerancia a estrés. De cada una de ellas se obtienen resultados diferentes y complementarios, por lo que resulta siempre enriquecedor emplear varias de ellas para abordar un mismo fenómeno. Por ello, en este trabajo se ha utilizado, por un lado, una estrategia de transcriptómica, y por otro lado, una estrategia de genética directa, para tratar de abordar la homeostasis de pH en *A. thaliana*.

1.6.3 Activación transcripcional en A. thaliana

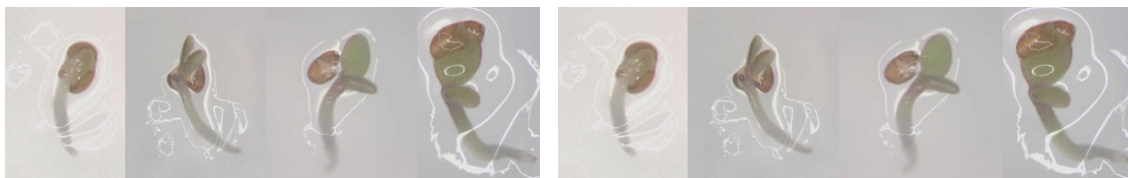
Como se ha indicado en el apartado anterior, el T-DNA puede emplearse como agente mutagénico (mutagénesis insercional). Las mutaciones así obtenidas son, generalmente, de pérdida de función y recesivas. Este tipo de mutaciones tiene limitaciones a la hora de realizar un rastreo. Por ejemplo, si existe redundancia génica puede ocurrir que una mutación en un gen de interés no sea identificada. Por otra parte, pueden existir genes cuya pérdida de función resulte letal, por lo que no sea posible estudiar el mutante en dicho gen para determinar su función.

Para tratar de solventar estos problemas, es posible emplear otras técnicas de mutagénesis insercional como la activación transcripcional. Esta técnica se basa en la inserción en el genoma de *A. thaliana*, de un T-DNA que contiene un activador transcripcional, generalmente el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Para ello, se emplea como vector un plásmido de características similares al de la Figura 3.1 (Weigel *et al.*, 2000), con el que se transformará *A. tumefaciens* y luego *A. thaliana*. Mediante esta técnica se pretende que los activadores transcripcionales incrementen la expresión de los genes adyacentes a la inserción de T-DNA, obteniendo así mutantes

dominantes. Sin embargo, también es posible que la inserción ocurra interrumpiendo un gen, provocando una mutación de pérdida de función (generalmente recesiva).

Entre las colecciones de mutantes disponibles en el NASC, se encuentran algunas que emplean esta técnica como las donadas por el Dr. Weigel, o por los Drs. Sheible y Sommerville (www.arabidopsis.info). Parte de esta última colección ha sido empleada en la presente tesis doctoral para aislar mutantes tolerantes a la acidificación intracelular causada por el ácido acético.

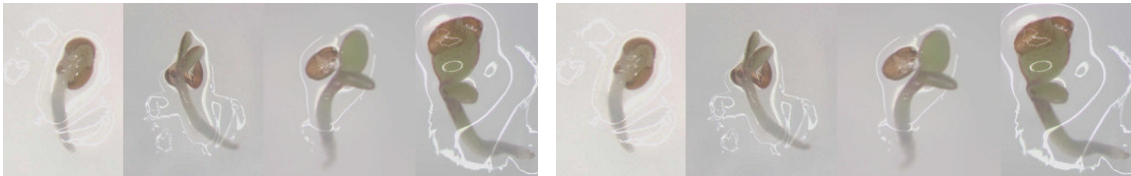
2- OBJETIVOS



El **objetivo general** de la presente tesis doctoral es determinar y estudiar los mecanismos implicados en la homeostasis de pH en *A. thaliana*, mediante el uso simultáneo de una aproximación genética y una transcriptómica. Para la consecución de este objetivo, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento de líneas mutantes de *A. thaliana* tolerantes a ácido acético, durante la germinación y establecimiento de la plántula, a partir de una colección de líneas transgénicas “*activation tagging*”.
2. Caracterización fenotípica de una línea mutante seleccionada, en diferentes estadios de desarrollo, tanto en condiciones normales como en presencia de estrés abiótico.
3. Caracterización genética del mutante que determine la localización de la inserción del T-DNA y su correlación con el fenotipo del mutante, el carácter dominante o recesivo de la mutación estudiada, y el gen responsable de los fenotipos observados.
4. Análisis bioinformático del gen y de la proteína objeto de estudio.
5. Estudio de posibles mecanismos que expliquen los fenotipos que presenta el mutante seleccionado.
6. Estudio de la respuesta transcripcional al estrés por ácido acético en *A. thaliana*.

3- MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Material biológico

3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Las líneas utilizadas para el rastreo con ácido acético pertenecen a la colección de semillas donada por W. Sheible y C. Somerville al NASC. Esta colección, que se distribuye como generación T4, está formada por 63.000 líneas obtenidas por transformación del ecotipo silvestre (*Columbia*, *Col-2*) con el vector pSKI15 de D. Weigel (Weigel *et al.*, 2000). Los principales componentes del vector pSKI15 desde el borde izquierdo (LB) hasta el borde derecho (RB) del T-DNA son los siguientes (Figura 3.1):

- El gen de resistencia al herbicida glufosinato (gen *BAR*), que permite la selección en tierra y en cultivo *in vitro* de las líneas transgénicas.
- El plásmido pBluescriptKS(+) (Stratagene) que contiene el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina. Este plásmido permite realizar la técnica de rescate plasmídico para la localización de la inserción de T-DNA dentro del genoma de la planta.
- Cuatro copias del activador de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), cuya función es aumentar la expresión de los genes adyacentes a la inserción de T-DNA, desde su propia caja TATA.

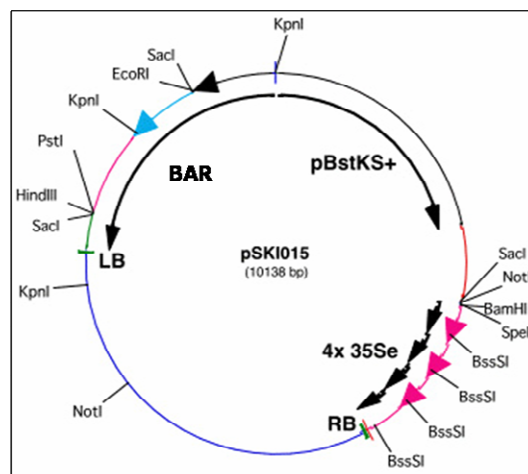


Figura 3.1: Esquema del vector pSKI15. Empleado en la generación de las líneas mutantes de T-DNA (modificada de Weigel *et al.*, 2000)

Durante el desarrollo del presente trabajo se han empleado, además de estas líneas transgénicas, diversos ecotipos, mutantes y líneas transgénicas de *A. thaliana*, que se describen a continuación:

A) Ecotipos silvestres:

Columbia 2 (Col-2): Fue suministrado por el NASC (N907) y se ha empleado como ecotipo silvestre de las líneas transgénicas anteriormente descritas.

Columbia 0 (Col-0): Fue suministrado por el NASC (N1092) y se ha empleado como control de los mutantes *nhx*.

Wassilewskija (WS): Proviene del ABRC con número de lote CS1601. Se ha empleado como ecotipo silvestre del mutante *tdt*.

B) Mutantes:

Mutante *m470-1*: Alelo mutante del *locus* At3g55470, suministrado por el NASC, perteneciente a la colección SALK de líneas mutantes, cuyo código de identificación es el número N661310. Se encuentra en el fondo genético *Columbia* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

Mutante *m470-2*: Alelo mutante del *locus* At3g55470, perteneciente a la colección SAIL de líneas mutantes, suministrado por el NASC cuyo código de identificación es el número N878773. Se encuentra en el fondo *Columbia* y fue obtenido por inserción de T-DNA.

Mutante *tdt*: Mutante en el transportador de malato vacuolar TDT (“*Tonoplast Dicarboxylate Transporter*”). Suministrado por el Dr. Ekkehard Neuhaus (Hurth *et al.*, 2005).

Doble mutante *vha-a2 vha-a3 (a2a3)*: Doble mutante de las dos isoformas de la subunidad “a” (subunidad integral de membrana) de la H⁺-ATPasa vacuolar (V-ATPasa). Suministrado por la Dra. Karin Schumacher (Krebs *et al.*, 2010).

Mutantes *nhx1.1* y *nhx1.3*: Mutantes de inserción de T-DNA en el gen *NHX1* (At5g27150), suministrados por el laboratorio del Dr. Jose Manuel Pardo del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNASE).

Mutante *nhx2.1*: Mutante nulo en el gen *NHX2* (At3g05030). Suministrado por el laboratorio del Dr. J. Manuel Pardo (IRNASE).

Doble mutante *nhx2.1 nhx1.3*: Doble mutante obtenido a partir de los dos genotipos anteriores. Suministrado por el laboratorio del Dr. J. Manuel Pardo

(IRNASE).

Mutante *aba 2-11* (“*ABA deficient*”): Alelo mutante por inserción de T-DNA en el gen At1g52340 que codifica para la enzima ABA2, deshidrogenasa requerida en la biosíntesis de ácido abscísico (González-Guzmán *et al.*, 2002). Suministrado por el laboratorio del Dr. Pedro Rodríguez.

Mutante *abi 1-2* (“*ABA insensitive 1*”): Alelo mutante de pérdida de función por inserción de T-DNA (SALK_72009) en el gen *ABI1* (At4g26080.1), que codifica para una fosfatasa que actúa como regulador negativo en la ruta de transducción de señal de ácido abscísico (ABA) (Saez *et al.*, 2006). Suministrado por el laboratorio del Dr. Pedro Rodríguez.

Mutante *hab1-1* (“*Hypersensitive to ABA*”): Mutante de pérdida de función por inserción de T-DNA en el gen At1g72770 que codifica para una proteína fosfatasa 2C implicada en la señalización por ABA (Saez *et al.*, 2004). Suministrado por el laboratorio del Dr. Pedro Rodríguez.

Doble Mutante *hab1-1 abi1-2*. Doble mutante obtenido a partir de las dos líneas anteriores (Saez *et al.*, 2006). Suministrado por el laboratorio del Dr. Pedro Rodríguez.

C) Líneas transgénicas:

Transgénicas AVP: Plantas transgénicas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar (AVP1), suministradas por el Dr. Gaxiola (Gaxiola *et al.*, 2001).

Transgénicas 35S:HAB1: Plantas transgénicas sobreexpresando la fosfatasa 2C HAB1 (Saez *et al.*, 2004). Suministrado por el laboratorio del Dr. Pedro Rodríguez.

3.1.2 *Escherichia coli*

Las distintas cepas empleadas en este trabajo se describen a continuación.

XL1-Blue MRF’: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F’ *proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)*]. Empleada como cepa de transformación (electroporación) en el rescate plasmídico, ya que las mutaciones *mcrA*, *mcrB* y *mrr* que contiene le impiden digerir DNA de organismos superiores con metilación GC^{met}.

DH5α: F’ $\Phi80dlacZΔM15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* thi-1 *gyrA96 relA1*. Empleada como cepa convencional de transformación (choque térmico) con plásmidos recombinantes.

3.1.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Se ha empleado la cepa CV2260 que contiene el plásmido Ti desarmado pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA) (Amp^r) como cepa para transformar *A. thaliana*.

3.1.4 Vectores de clonación y transformación

pBluescriptSK(+)(Stratagene): Plásmido multicopia empleado como vector convencional de clonación (Figura 3.2 A). Posee un sitio de clonación múltiple (MCS), el gen marcador de resistencia al antibiótico ampicilina y el fragmento *lacZα* para confirmar la introducción del inserto en el sitio de clonación.

pBI121: Plásmido binario derivado de pBIN19 (Bevan, 1984), utilizado para la transformación de *A. thaliana*. En la región comprendida entre las zonas LB y RB (T-DNA) contiene el gen delator *GUS* y el gen *NPT II* que confiere resistencia a kanamicina (Figura 3.2 B).

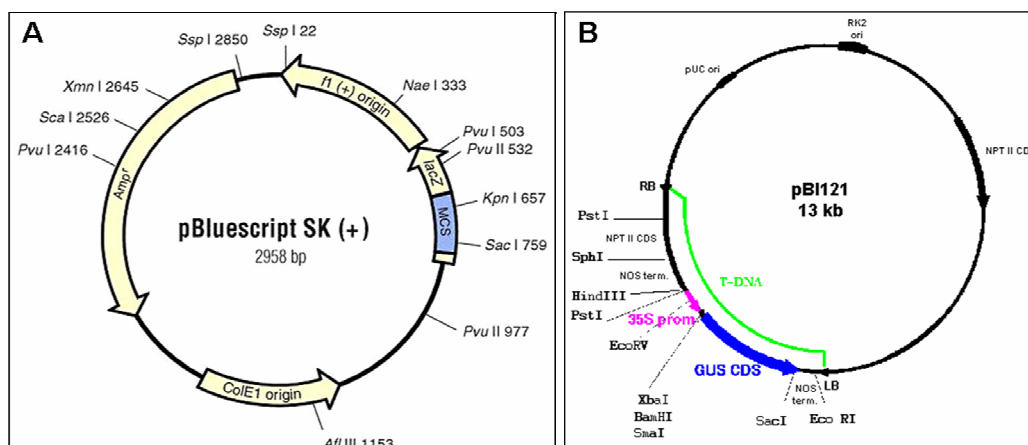


Figura 3.2: Esquema de los plásmidos pBluescriptSK(+) (A) y del plásmido pBI121 (B).

pCR®8/GW/TOPO®: Plásmido que incorpora la tecnología Gateway® de la empresa Invitrogen. Se comercializa linealizado y en ambos extremos se ha añadido un residuo deoxitimidina (T) al que se une covalentemente la enzima topoisomerasa. Este plásmido se ha empleado para clonar de forma rápida productos de PCR, que posteriormente pueden ser transferidos a otro plásmido destino con la tecnología Gateway® (Figura 3.3 A).

pEarleyGate100: Plásmido binario que incorpora la tecnología Gateway® de la empresa Invitrogen y que fue donado por Craig Pikaard y Keith Earley (Universidad de Washington, St. Louis) al ABRC (Earley *et al.*, 2006). En la región comprendida entre el LB y RB el plásmido contiene el gen *BAR* que otorga resistencia al herbicida

glufosinato (BASTA) (Figura 3.3 B). El vector posibilita la sobreexpresión de un gen de interés en *A. thaliana*, al incorporar su secuencia tras el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

pEarleyGate103: Plásmido binario que incorpora la tecnología Gateway® de la empresa Invitrogen y que fue donado por Craig Pikaard y Keith Earley (Universidad de Washington, St. Louis) al ABRC (Earley *et al.*, 2006). Este plásmido permite clonar, mediante la tecnología Gateway, un gen de interés en pauta de lectura con la proteína GFP y con 6 histidinas. Asimismo, contiene entre el LB y el RB el gen *BAR* de resistencia al herbicida glufosinato (BASTA), (Figura 3.3 B).

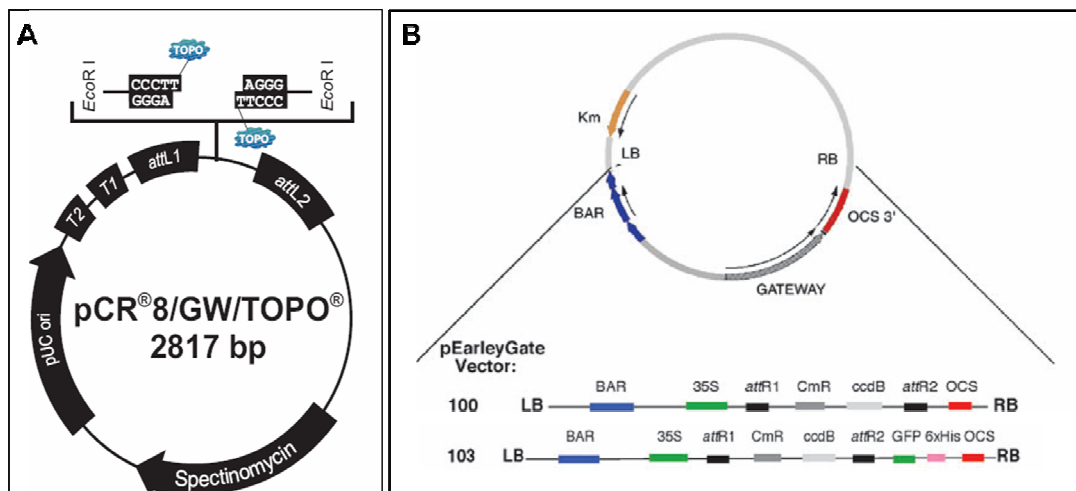


Figura 3.3: Esquema de los plásmidos PCR8 (A), pEarleyGate100 y pEarleyGate 103 (B).

RAFL16-68-C06: Plásmido que forma parte de los clones “RIKEN *Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA clones*” del “Riken *Genomic Science Center*” (GSC) de Yokohama, Japón. El plásmido deriva del pBluescript y su principal característica es que contiene el cDNA del gen At3g55470 (Figura 3.4).

RAFL07-10-F22: Plásmido que forma parte de los clones “RIKEN *Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA clones*” del GSC de Yokohama, Japón. El plásmido deriva del pBluescript y su principal característica es que contiene el cDNA del gen At3g55480 (*WATI*) (Figura 3.4)

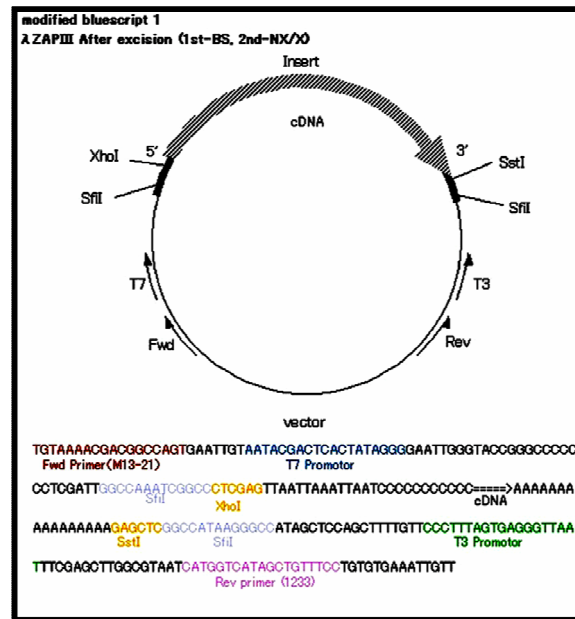


Figura 3.4: Esquema general de los plásmidos RAFL. Bajo el vector se muestra la secuencia que flanquea el inserto.

3.2 Medios de cultivo y solución nutritiva

Todos los medios detallados a continuación se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión. Las sustancias termolábiles, o susceptibles de evaporación a altas temperaturas, como la norespermidina, el ácido abscísico, el herbicida glufosinato (BASTA), los antibióticos (ampicilina, kanamicina, espectinomicina) y el ácido acético, propiónico y sórbico, se añaden al medio ya estéril y enfriado por debajo de los 50 °C.

3.2.1 Medios para crecimiento de *A. thaliana*

A) Medio Murashige-Skoog (MS):

Medio empleado de forma rutinaria para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*. Está compuesto por sales MS (Sigma-Aldrich) al 0,4 %, sacarosa al 1% (p/v) y 10 mM de MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico). Para todos los experimentos en los que se añaden ácidos débiles al medio, y para sus controles, el pH se ajusta a 5,5. Asimismo, en estos casos, el ácido a añadir se ajusta previamente a pH 5,5 con tris. En los demás casos, el pH se lleva a 5,7. Para el medio sólido, se agrega agar al 0,8 % (p/v) (Pronadisa). En algunos experimentos se ha empleado este mismo medio, pero eliminando la sacarosa.

B) Medio con K⁺ limitante:

Medio utilizado para el crecimiento de *A. thaliana* a bajas concentraciones de K⁺ y para los ensayos de toma de rubidio. El medio se compone de sacarosa al 1%, 2,5 mM de MES, 2 mM de NH₄H₂PO₄ y la siguiente solución de micronutrientes: 2,5 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM NaFeEDTA, 80 μM Ca(H₂PO₄)₂, 25 μM CaCl₂, 25 μM H₃BO₃, 2 μM ZnSO₄, 2 μM MnSO₄, 0,5 μM CuSO₄, 0,5 μM Na₂MoO₄, 0,01 μM CoCl₂. El pH se ajusta a 5,7 con CaOH. El potasio se añade como KCl hasta alcanzar las concentraciones indicadas en cada caso. Para los medios sólidos se agrega agarosa al 0,8% (p/v) (Pronadisa).

3.2.2 Medios para el crecimiento de bacterias**A) Medio LB:**

Medio empleado para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Está compuesto por 1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl. El pH se ajusta a 7 con NaOH. Para los medios sólidos, se agrega 2% (p/v) de agar. Cuando se requiere, se agregan antibióticos al medio con las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l) y espectinomicina (50 mg/l).

B) Medio SOC:

Medio empleado para crecer las células de *E. coli* y *A. tumefaciens* después de ser transformadas por electroporación. Está compuesto por 2% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl, el pH se ajusto a 7 con NaOH. Después de autoclavar se agregan soluciones estériles de MgCl₂ y glucosa a una concentración final de 10 y 20 mM, respectivamente.

C) Medio SOB:

Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* previo a la preparación de células competentes para choque térmico. La composición del medio es la siguiente: 2% p/v triptona, 0,5% p/v extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MgSO₄.

3.2.3 Solución nutritiva

Solución de minerales usada para regar las plantas de *A. thaliana* crecidas en

cultivo hidropónico y para los experimentos de estrés por NaCl y LiCl en invernadero. Está compuesta por los siguientes macro y micronutrientes: 4 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂, 1,5 mM MgSO₄, 0,75 mM KH₂PO₄, 0,035% (p/v) EDTA-FeSO₄, 70 μM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 0,5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0,2 μM Na₂MoO₄, 10 μM NaCl, 0,01 μM CoCl₂. El pH de la solución es 6,5.

3.3 Manipulación y crecimiento de *A. thaliana*

3.3.1 Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizan en su superficie tratándolas en primer lugar con una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos. A continuación se elimina el etanol y se añade una segunda solución compuesta de lejía al 2,5% (v/v) y Tritón X-100 0,05% (v/v). Finalmente, las semillas se lavan 3 veces con agua destilada. La estratificación de las semillas se lleva a cabo dejándolas en agua estéril a 4 °C durante 3 días.

3.3.2 Cultivo *in vitro* en medio sólido

Para el cultivo *in vitro* en horizontal se utilizan placas petri de 9 cm de diámetro con 25 ml de medio cada una. Para el cultivo en vertical se emplean placas cuadradas de 12 cm de lado con unos 50 ml de medio cada una. En ambos casos, las placas se sellan con cinta porosa (Micropore) y se incuban en una cámara con condiciones controladas de 23°C de temperatura, fotoperiodo de día largo y una intensidad de luz de 100 μE·m⁻² s⁻¹.

3.3.3 Cultivo *in vitro* en medio líquido

El cultivo de *A. thaliana* en medio líquido se realiza en placas de cultivo en suspensión de 6 pocillos CELLSTAR (Greiner). En cada uno de los pocillos se colocan 7 ml de medio y se depositan 3 plántulas de 6 días (plántulas que han sido cultivadas durante 6 días en medio MS sólido). Las placas se mantienen en agitación (90-110 rpm) en una cámara con las condiciones descritas en el apartado 3.3.2, hasta obtener la cantidad deseada de material vegetal (al menos 10 días).

3.3.4 Cultivo en invernadero

Las plantas de *A. thaliana*, se cultivan en una mezcla 2:1 de turba (Biolan): vermiculita exfoliada (Asfaltex). Las macetas se colocan en bandejas que se irrigan 2 veces por semana. Las condiciones de crecimiento en el invernadero son de día largo, 23 °C de temperatura, 70% de humedad relativa y una intensidad de luz aproximada de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.3.5 Cultivo hidropónico

Ésta es la forma de cultivo empleada para experimentos en los que es necesario obtener una cantidad considerable de raíz de *A. thaliana*. El sistema empleado es el descrito por Tocquin *et al.*, en 2003 y comercializado por la empresa ARAPONICS. En resumen, se compone de un recipiente inferior donde se coloca la solución nutritiva y una tapa superior con agujeros a los que se acoplan pequeños microtubos con el fondo abierto. Estos microtubos se rellenan de 0,7 % de agar y sobre ese agar se siembran las semillas, previamente esterilizadas. De ese modo la raíz en crecimiento atraviesa el agar y crece libremente en la solución de la bandeja inferior. Las plantas se cultivan en una cámara con las condiciones descritas en el apartado 3.3.4, pero en día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad).

3.4 Manipulación y crecimiento de *Escherichia coli*

Para el crecimiento en medio líquido de *E. coli*, se utilizan tubos de 15 ml o matraces estériles, que se colocan en un incubador orbital a 37 °C con una velocidad de agitación de entre 200 y 250 rpm. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se depositan invertidas en una estufa a 37 °C.

3.4.1 Preparación de células competentes

A) Células competentes para choque térmico:

Se añaden 400 μl de un cultivo saturado de *E. coli* (cepa DH5 α) a 200 ml de medio SOB y se incuba a temperatura ambiente hasta alcanzar una absorbancia ($A_{\lambda=660}$) de 0,5-0,7. Se recogen las células por centrifugación en frío a 5.000 rpm durante 5 minutos, y se resuspenden en 10 ml de TB (“*Transformation Buffer*”) frío (0,48% p/v Pipes (“*Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulphonic acid]*”), 16 mM CaCl, 170 mM KCl,

40 mM MnCl₂, ajustado a pH 6,7). Tras una incubación de 10 minutos en hielo, se realiza otra centrifugación en frío de 5 min a 5.000 rpm. Finalmente, las células se resuspenden en 10 ml de TB frío y se agregan 750 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubarse de nuevo 10 minutos en hielo, se distribuyen las células en alícuotas de 100 µl que se guardan a -80 °C.

B) Células competentes para electroporación:

Se inoculan 100 ml de medio LB con 1 ml de cultivo saturado de *E. coli* (cepa XL1-Blue MRF) y se incuban a 37°C hasta una A_{λ=660} de 0,8. Las células se recogen por centrifugación en frío a 4.000 rpm durante 10 minutos y se lavan 2 veces con agua estéril fría y 1 vez con glicerol frío al 10% (v/v). Finalmente las células se resuspenden en 0,6 ml de glicerol frío al 10%, se distribuyen en alícuotas de 100 µl y se guardan a -80 °C.

3.4.2 Transformación de células competentes

A) Choque térmico:

Se añade el plásmido, o mezcla de ligamiento, a una alícuota de células competentes y se coloca 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se realiza un choque térmico de 1 minuto a 42 °C, e inmediatamente se coloca en hielo durante 2 minutos. A continuación, se agregan 900 µl de medio LB y se incuban 1 hora a 37 °C en agitación. Finalmente, se extienden 150 µl en una placa de LB con el antibiótico adecuado, según el plásmido empleado.

B) Electroporación:

Se añade el plásmido o mezcla de ligamiento a una alícuota de células competentes y se transfiere a una cubeta para electroporación, previamente enfriada, de 0,1 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato “Gene Pulser” (Bio-Rad) a 200 Ω, 25 µF y 1,7 kV, y se aplica un pulso de unos 4 milisegundos. A continuación, se agregan 0,9 ml de medio SOC y se incuban durante 1 hora a 37 °C en agitación. Finalmente, se extienden 150 µl en una placa de LB con el antibiótico apropiado.

3.5 Manipulación y crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

Para el crecimiento en medio líquido de *A. tumefaciens* se utilizan tubos o

matraces estériles que se colocan en un incubador orbital a 28 °C, con una velocidad de agitación de entre 200 y 250 rpm. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se colocan invertidas en una estufa a 28 °C.

3.5.1 Preparación de células competentes

Se genera un cultivo saturado de *A. tumefaciens* de 10 ml de LB con ampicilina. Se inoculan 100 ml de medio LB sin antibiótico con 1 ml del cultivo saturado, y se incuba a 28 °C durante una noche. Las células de este cultivo se recogen por centrifugación en frío a 5.000 rpm durante 15 minutos y se lavan 2 veces con agua estéril fría. Finalmente se resuspenden las células en 4 ml de glicerol frío al 10% (v/v) y se dividen en alícuotas de 0,2 ml que se guardan a -80 °C.

3.5.2 Transformación mediante electroporación

Se agrega el plásmido a transformar a una alícuota de células competentes y la mezcla se coloca en una cubeta de electroporación, previamente enfriada, de 0,2 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad) a 1 k Ω , 25 μ F y 2 kV. Tras la electroporación, se agregan 0,9 ml de medio SOC y se incuba durante 2-3 horas a 28 °C en agitación. Finalmente se extienden las células en una placa de LB con el antibiótico de selección.

3.6 Purificación y manipulación de ácidos nucleicos

3.6.1 Aislamiento de DNA plasmídico

A) *Escherichia coli*:

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se emplea el método descrito por Holmes y Quigley (1981). Las células de 2 ml de cultivo crecidas en medio LB con el antibiótico selectivo se recogen por centrifugación y se resuspenden en 0,5 ml de STET (10% p/v sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA y 1% v/v Triton X-100), se añaden 5 μ l de lisozima 5% (p/v) y se calienta a 95 °C durante 2 minutos para lisar las células. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se elimina el sedimento (restos celulares y DNA cromosómico). Al sobrenadante se le agregan 400 μ l de isopropanol y se deja precipitar a -20 °C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se resuspende

el precipitado en 200 μ l de agua estéril, se añaden 700 μ l de etanol absoluto:acetato de amonio (6:1) y se deja a -20 °C durante 20 minutos. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se lava el precipitado con etanol 70% (v/v). Finalmente el precipitado se resuspende en 15 μ l de agua estéril.

En caso de que sea necesario secuenciar el plásmido aislado, se realiza previamente un tratamiento con RNAasa y fenol:cloroformo:isoamílico (PCI) en proporción 25:24:1, del siguiente modo: Se añade agua estéril hasta un volumen final de 100 μ l, y se agrega 1,5 μ l RNAasa 1% (p/v). La mezcla se incuba a 37 °C durante 40 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añaden 100 μ l de PCI, se mezcla y se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos. Después se toma la fase acuosa superior, se coloca en un tubo nuevo, se añade el doble de volumen de etanol acetato sódico (1 ml acetato sódico 3 M en 20 ml de etanol absoluto: EtAcNa) y se incuba a -20 °C un mínimo de 2 h. Finalmente, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos, se lava el precipitado con etanol 70%, se deja secar el precipitado para eliminar el etanol y se resuspende en 15 μ l de agua estéril.

B) *Agrobacterium tumefaciens*:

Las células de 2 ml de cultivo saturado crecido en medio LB con el antibiótico apropiado, se recogen por centrifugación y se resuspenden en 100 μ l de tampón de lisis a 4°C (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA y 0,4% p/v lisozima). La suspensión se agita con el vórtex y se incuba en primer lugar a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente 5 minutos en hielo. A continuación, se añaden 200 μ l de solución de lisis (0,2 M NaOH y 1% p/v SDS), se mezcla suavemente y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de lisis se neutraliza con 150 μ l de acetato de potasio 3 M pH 4,8, se mezcla y se incuba en hielo durante 10 minutos. Tras una centrifugación de 5 minutos a 12.000 rpm, al sobrenadante se le añade un volumen igual de PCI, se mezcla con vórtex y se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos. Finalmente, a la fase acuosa superior se le agrega 1 ml de etanol absoluto frío y se centrifuga de nuevo. El precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en 20 μ l de agua estéril.

3.6.2 *Aislamiento de DNA genómico de A. thaliana*

Se ha empleado una adaptación del método del CTAB descrito en McKinney

(1995). Aproximadamente un gramo de tejido vegetal se homogeneiza con mortero usando nitrógeno líquido. Este homogeneizado se coloca en un tubo falcon, se le añaden 2 ml de tampón de extracción CTAB 2% (2% p/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 1% p/v PVP Mr 40.000) y se incuba a 60 °C durante 15 minutos. A continuación se agregan 2 ml de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), se mezcla usando vórtex y se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se toma la fase acuosa superior y se añaden 0,1 volúmenes de la solución CTAB 10% (10% p/v CTAB y 0,7 M NaCl) y se calienta a 60 °C durante 2 minutos. A continuación, se añaden dos volúmenes de agua estéril fría para inducir la precipitación del complejo CTAB/DNA-RNA. Los tubos se incuban en hielo durante 3 horas y se recoge el precipitado mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 0,4 ml de NaCl 1 M, se añaden 0,8 ml de etanol absoluto frío para inducir la precipitación del DNA y se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el DNA precipitado se lava dos veces con etanol 70% y el precipitado final se resuspende en 20 µl de agua estéril.

3.6.3 Electroforesis de DNA

Para comprobar la integridad y concentración del DNA plasmídico y genómico extraído se emplean geles de agarosa 0,7% (p/v) fundida en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM TrisBase, 45mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contienen 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realiza iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda.

Como tampones de carga se utilizan: Tampón 6X naranja (50% v/v glicerol, 60 mM Tris-HCl pH 8, 6 mM EDTA y 0,35% p/v Orange G) y tampón 6X azul (40% p/v sacarosa, 0,1 M EDTA y 0,25% p/v azul de bromofenol). Como marcadores de tamaño y peso molecular se utilizan los patrones comerciales 1Kb y λ /HindIII de Invitrogen.

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se emplea el kit “*Rapid Gel Extraction System*” (Marligen).

3.6.4 Aislamiento de RNA de *A. thaliana*

Se homogeneiza con mortero 0,5-1 gramo de tejido vegetal congelado, se coloca en un tubo falcon y se agregan 1 ml de PCI y 1 ml de TCES (0,2 M Tris, 0,2 M NaCl,

50 mM EDTA, 2% p/v SDS, ajustado a pH 8 con HCl). El homogeneizado se incuba a 50 °C durante 15 minutos. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos, se toma la fase superior acuosa y se coloca en un nuevo tubo donde se añade un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcla en vórtex y se vuelve a centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se pasa la fase superior a un tubo nuevo y el RNA se precipita agregando un volumen de LiCl 6 M y colocándolo a -20 °C durante 4-5 horas. Finalmente, se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos, el precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en 20 µl de agua estéril. Para comprobar la integridad del RNA se emplean geles no desnaturizantes y para conocer la concentración se utiliza un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

3.6.5 *Electroforesis de RNA*

A) Condiciones no desnaturizantes:

Se emplean estas condiciones para observar la integridad del RNA aislado. Se preparan geles de agarosa 1% TAE 1X y las muestras se preparan con el tampón de carga 1,25X (55% v/v formamida, 20% v/v formaldehído, 12,5% v/v MAE 10X, 8% v/v glicerol, 0,05% p/v azul de bromofenol y 0,001% p/v de bromuro de etidio) y se calientan a 56 °C durante 10 minutos, antes de cargarlas en el gel. El gel se deja correr 1-2 horas a 50 voltios.

B) Condiciones desnaturizantes:

Estas condiciones se emplean en el análisis “*Northern blot*”. Se utilizan geles de agarosa 1% en tampón MAE 1X (10% v/v MAE 10X [200 mM MOPS, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA y ajustado a pH 7 con NaOH] y 2,2% v/v formaldehído 37%). Como tampón de electroforesis se emplea 10% (v/v) MAE 10X y 1,1% (v/v) formaldehído 37%. Las muestras de RNA se mezclan con el tampón de carga 1,25X con bromuro de etidio (200:1) y se calientan a 56 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel. Como marcador de tamaño se utiliza el “*RNA ladder*” (Invitrogen).

3.6.6 *Marcaje radioactivo de sondas*

El DNA empleado para la síntesis de sondas radioactivas en los experimentos de “*Southern blot*” se obtiene mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de DNA genómico. En el caso del análisis “*Northern blot*”, se realiza

una PCR a partir de cDNA (DNA copia). En ambos casos, el producto de PCR se visualiza en un gel TBE 1X y se purifica usando el kit “*Rapid Gel Extraction System*” (Marligen).

Para el marcaje radioactivo de las sondas se usa el método de marcaje por hexanucleótidos (“*random priming*”). Se parte de 120 ng de DNA molde en 15 μ l de agua estéril y se desnaturaliza incubando a 95 °C durante 10 minutos. A continuación, se coloca el microtubo en hielo y se agregan 5 μ l de OLB 5X (0,1 M MES pH 6,8, 5 mM DTT, 25 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml hexanucleotidos al azar “*hexanucleotides random primers*” (Boehringer), 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dTTP), 1 μ l del fragmento klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (10 U/ μ l), 2,5 μ l de BSA 10X (Albúmina de Suero Bovino) y 2,5 μ l de α -³²P dCTP (10 μ Ci/ μ l) como nucleótido radioactivo. Finalmente, la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 8-10 horas y, transcurrido ese tiempo, se añaden 200 μ l de TE 1X (1mM EDTA, 10 mM Tris pH 8) para detener la reacción. A continuación, se desnaturaliza el DNA nuevamente incubando a 95°C durante 10 minutos, y ya puede ser añadido al tubo de hibridación con la membrana a hibridar.

3.6.7 Análisis “*Southern blot*”

Se digiere 1 μ g de DNA con la enzima de restricción *EcoRI* durante 2 horas. Tras la digestión, se realiza una electroforesis en un gel TAE 1X (40 mM TrisBase, 20 mM ácido acético y 2 mM EDTA) a un voltaje de 10V durante toda la noche. Finalizada la electroforesis, el DNA se desnaturaliza sumergiendo el gel en una solución de NaOH 0,4 M durante 10 min. Posteriormente se transfiere el DNA a una membrana Hybond N⁺ (Amersham) mediante la técnica de transferencia de DNA en medio alcalino, descrita en Sambrook y Russell (2.000), durante toda la noche. Finalmente, el DNA se fija covalentemente a la membrana empleando radiación ultravioleta usando un aparato Stratalinker (Stratagene).

La membrana con el DNA fijado se coloca en un tubo de hibridación ThermoHybaid (Thermo). Se añaden 5 ml de tampón de hibridación PSE (0,4 M Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA y 7% p/v SDS) previamente calentado a 65 °C, y se deja durante 20 minutos en un horno con agitación circular a 65 °C. A continuación, se agrega la sonda radioactiva apropiada (según el fragmento de DNA que se pretende detectar en la membrana) al tampón de hibridación y se deja durante 16-18 horas a 65

°C en agitación. Posteriormente, se realizan 2 lavados de la membrana de 30 minutos a 65 °C con el tampón de lavado (40 mM Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA y 5% p/v SDS). Tras los lavados, la membrana se seca y se envuelve en plástico Saran Wrap. Finalmente, la membrana se expone con una película Hyperfilm (Amersham) a -80 °C en un casete de revelado Hypercassette (Amersham) con pantallas intensificadoras. Las películas son reveladas con el procesador automático X-omat 2000 (Kodak).

3.6.8 Análisis “Northern blot”

Se parte de 30 µg de RNA y se realiza una electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes usando un voltaje de 40-50 V durante 4-5 horas. Al terminar la electroforesis, el gel se lava 2 veces con una solución de SSC 10X (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato trisódico, ajustado a pH 7 con HCl) durante 20 minutos cada lavado para eliminar el formaldehído del gel. El RNA se transfiere a una membrana de nailon Hybond N (Amersham) por capilaridad durante toda la noche, empleando el tampón SSC 10X. Finalmente, el RNA se fija covalentemente a la membrana de nailon mediante radiación ultravioleta usando un aparato Stratalinker (Stratagene).

La membrana de nailon con el RNA fijado se coloca en un tubo de hibridación ThermoHybaid (Thermo), se añaden 5 ml de tampón de hibridación PSE y se deja durante 20 minutos en un horno con agitación circular a 65 °C. Después se agrega la sonda radioactiva, para detectar el RNA en la membrana, al tampón de hibridación y se deja durante 16-18 horas a 65 °C en agitación. Posteriormente, se realizan dos lavados de la membrana de 10 minutos a 65 °C con una solución SSC 4X, 0,1% (p/v) SDS y un lavado de 10 minutos con la solución SSC 0,4X, 0,1% (p/v) SDS. Terminados los lavados, la membrana se seca a temperatura ambiente y se envuelve en plástico tipo Saran Wrap. Finalmente, se realiza la autoradiografía del mismo modo que en el análisis “Southern blot”.

3.6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A) Oligonucleótidos cebadores:

Todos los cebadores utilizados en este trabajo han sido sintetizados por la empresa Isogen Life Science. En el anejo I se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR, PCR diagnóstica y RT-PCR semicuantitativa.

B) Condiciones de PCR:

Las reacciones de PCR se llevan a cabo de forma rutinaria en tubos estériles, donde se añaden los siguientes reactivos:

DNA molde	10 ng
Tampón PCR 10X	2 μ l
dNTPs 10 mM	2 μ l
Cebador sentido (0,1 μ g/ μ l)	1 μ l
Cebador antisentido (0,1 μ g/ μ l)	1 μ l
Polimerasa (<i>Taq</i>) 1U / μ l	1 μ l
H ₂ O MilliQ	volumen hasta 20 μ l

En las reacciones rutinarias se utiliza la enzima *Taq* polimerasa (Biotools), y en aquellas reacciones que requieren una amplificación del DNA de alta fidelidad se emplea la enzima “*Pwo DNA polimerase*” (Roche). Todas las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) con el siguiente programa de PCR:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 min.
- 30-35 ciclos de:
 - desnaturalización: 30s a 95°C
 - hibridación de los cebadores: 30s a una temperatura de anillamiento 2°C inferior a la T_m de los oligonucleótidos
 - extensión a 72 °C de 1 min por kb a amplificar, en el caso de la enzima *Taq* polimerasa, y de 2 min por kb a amplificar en el caso de la polimerasa Pwo.
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

C) PCR diagnóstica:

Para la identificación de mutantes homocigotos de inserción de T-DNA, de las líneas suministradas por el NASC (SALK o SAIL), se realizan PCR diagnósticas utilizando un par de oligonucleótidos (LP y RP) que hibridan en el DNA del genoma de *A. thaliana*, uno a cada lado del T-DNA, y un tercer oligonucleótido que hibrida en el T-DNA (BP). Tras la amplificación, las líneas homocigotas presentan tan sólo la banda correspondiente a la amplificación con LP y BP, mientras que las heterocigotas presentan además de esa banda la resultante de la amplificación con LP y RP. El diseño

de los oligonucleótidos LP y RP, se realiza con la aplicación “*T-DNA Primer Design*” de la página web: <http://signal.salk.edu/tDNAprimers.2.html>.

D) RT-PCR semicuantitativa:

En primer lugar, se realiza un tratamiento con DNasa al RNA previamente aislado. Para ello se parte de 2 µg de RNA en un volumen de 7 µl de agua estéril, y se añaden 2 µl de buffer RTX5 y 1 µl de DNasa (10 U/µl). La mezcla se mantiene a 37°C durante 15-30 minutos y, posteriormente, se incuba a 65°C durante 15 min, para inactivar la enzima.

Tras el tratamiento con DNasa se inicia la síntesis de cDNA. Para ello, se añaden al tubo anterior 10 µl de dNTPs (2,5 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato), 2 µl del cebador para RNA oligo p(dT)₁₅ (0,1 µg/µl), 6 µl de buffer RTX5, 4 µl de ditiotretitol (DTT; 0,1 M), 0,7 µl de transcriptasa inversa M-MuLV (20 U/µl) y 8 µl de agua. Tras mezclar bien, se incuba a 37 °C durante 75 minutos y transcurrido ese tiempo, se inactiva la enzima calentando a 65 °C durante 5 minutos y se coloca el tubo inmediatamente en hielo. La reacción de PCR y el programa del termociclador se establecen del modo descrito en el apartado 3.6.9.B, utilizando 1 µl de cDNA molde de partida.

3.7 Búsqueda y caracterización genética de mutantes

3.7.1 Rastreo de líneas de Arabidopsis thaliana

En el rastreo de líneas mutantes realizado en la presente tesis doctoral se han analizado aproximadamente 30.000 líneas diferentes, pertenecientes a la colección de semillas donada por W. Sheible y C. Somerville al NASC. El número total de semillas empleadas en el rastreo es de unas 400.000. A esta población inicial se le denomina S₀.

La población S₀ se analiza inicialmente mediante el rastreo primario, realizado con una alta densidad de semillas por placa (≈2.000 semillas/placa de 9 cm de diámetro) en medio MS pH 5,5 suplementado con 7 mM de ácido acético. Las semillas estériles se siembran sustituyendo el agua en que están inmersas por una solución de agarosa 0,1% (p/v) y distribuyéndolas homogéneamente por la placa, con ayuda de un asa de plástico estéril. Tras la siembra, las placas se depositan en una cámara de cultivo *in vitro*.

Tras 6 días en la cámara, se rescatan los posibles mutantes (población S₁), es decir, aquellos que presentan ambos cotiledones expandidos y verdes. Estos candidatos se trasplantan a medio MS pH 5,5 para prolongar la raíz, y posteriormente a tierra, para

obtener la descendencia (S_2) de cada uno de ellos.

La generación S_2 se analiza mediante un rastreo secundario con baja densidad de semillas (100-150 semillas por placa de 9 cm de diámetro) en medio MS pH 5,5 suplementado con 3,5 mM de ácido acético. Este rastreo secundario se realiza para confirmar el fenotipo de resistencia a acético observado en el rastreo primario. En este segundo rastreo, las semillas estériles se siembran en placa de forma individual utilizando una micropipeta de 1 ml.

3.7.2 Comprobación de la presencia de T-DNA

Para comprobar la presencia del T-DNA en el genoma de los mutantes, se realiza un análisis “*Southern blot*” a partir de DNA genómico de 3 plántulas de cada mutante, crecidas en medio MS líquido durante 12 días. El DNA extraído se digiere con la enzima de restricción EcoRI, y se hibrida empleando dos sondas específicas para el T-DNA:

- Sonda 35S: Identifica el extremo derecho del T-DNA. Obtenida por PCR al amplificar el intensificador de la transcripción 35S CaMV presente en el T-DNA con la pareja de cebadores 5'35S y 3'35S (Anejo I).
- Sonda BAR: Identifica el extremo izquierdo del T-DNA. Se obtiene por PCR, amplificando el gen *BAR* (Figura 3.1), con la pareja de cebadores 3'BAR / 5'BAR respectivamente (Anejo I).

3.7.3 Análisis genético

La línea mutante se cruza con el ecotipo silvestre *Columbia (Col-2)* mediante la polinización manual de flores emasculadas, y las semillas F_1 del cruce se cultivan en tierra para obtener la generación F_2 por autopolinización. Para determinar si la mutación tiene un carácter dominante o recesivo, se determina el porcentaje de plántulas con cotiledones verdes y expandidos a los 5 días en placas con medio MS pH 5,5 suplementadas con 3,5 mM de ácido acético.

3.7.4 Análisis de cosegregación

Este análisis permite conocer si existe correlación entre el fenotipo de resistencia a ácido acético y la inserción de T-DNA presente en el genoma. Para ello se

seleccionan, de la población F₂ del cruce entre el mutante y el control silvestre, plantas resistentes a medio MS pH 5,5 suplementado con 3,5 mM de acético, en un ensayo de aparición de cotiledones. Estas plántulas se pasan a medio MS líquido y se dejan crecer durante 12 días. Transcurrido ese tiempo, se extrae el DNA genómico de cada plántula individualmente y se realiza una PCR, para determinar la presencia o ausencia del T-DNA. En la PCR se emplean los cebadores 5'35S y 3'35S, que amplifican el activador transcripcional 35S presente en el T-DNA. Si el fenotipo de resistencia está ligado a la inserción de T-DNA, cualquier plántula seleccionada por tolerar acético presentará el T-DNA. Si el fenotipo se debe a cualquier otra mutación, tan sólo un 75% de las plántulas presentaran el T-DNA en su genoma.

3.7.5 *Rescate plasmídico*

Esta técnica se emplea para determinar el punto de inserción del T-DNA en el genoma de la planta mutante. Consiste en digerir el DNA genómico del mutante con una enzima de restricción y circularizar todos los fragmentos, siendo únicamente capaz de transformar y replicarse en *E. coli* el DNA circularizado que presente el plásmido pBluescriptKS, presente en el T-DNA (Figura 3.1). Este DNA circularizado contiene la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA, que es posible secuenciar utilizando cebadores específicos del T-DNA.

Concretamente, se digieren 2 µg de DNA genómico de la planta mutante con la enzima de restricción *Bam*HI incubando a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se limpia la digestión agregando un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 24:1) y centrifugando 10 minutos. Tras la centrifugación, el DNA presente en la fase acuosa se precipita con dos volúmenes de etanol acetato sódico (EtAcNa: 1 ml AcNa 3 M en 19 ml de etanol absoluto) dejándolo a -20 °C durante 24 horas y centrifugando 10 minutos posteriormente. Finalmente, el DNA se resuspende en 88 µl de agua estéril y se procede a su recircularización. Para ello, se agregan 2 µl de la enzima ligasa T4 (5 U/µl) y 10 µl de tampón de ligación y se incuban a 16 °C durante toda la noche. A continuación, el DNA circularizado se precipita de nuevo con dos volúmenes de EtAcNa dejándolo a -20 °C durante 5 horas y centrifugando 10 minutos. El precipitado se lava con etanol 70% (v/v) y se resuspende en 10 µl de agua estéril.

Con los productos resultantes de la circularización del DNA, se transforma *E. coli* (cepa XL1-Blue MRF'), utilizando 5 µl de DNA circularizado. Las condiciones de la electroporación están descritas en el apartado 3.4.2. Finalmente los plásmidos

aislados son secuenciados usando el cebador 5'LB (Anejo I).

3.8 Ensayo de aparición de cotiledones en diferentes medios

Este ensayo permite determinar la respuesta del mutante frente a distintos estreses en los primeros estadios de desarrollo. Para ello, se utilizan los medios descritos en el apartado 3.2.1 suplementados o no con diferentes sustancias a concentraciones tóxicas (sales de diversos cationes, manitol, norespermidina, ácidos débiles o ácido abscísico) y se observa el porcentaje de plántulas con cotiledones expandidos y verdes entre los 4 y 7 días (el tiempo es variable según el tratamiento). Se realizan tres repeticiones de cada condición, y se calcula la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas.

Para determinar si existen diferencias significativas entre el mutante y el control silvestre, se realiza la prueba estadística “t de *student*”. En los gráficos se marca con **, * o + cuando existen diferencias significativas con un grado de significación $\alpha=0,01$; 0,05 ó 0,1, respectivamente.

3.9 Ensayo de sensibilidad a etileno

Para observar la sensibilidad a etileno, se realizó un ensayo germinando las plantas en oscuridad en medio MS (control) o MS suplementado con 10 μM del precursor del etileno ACC (ácido 1-AminoCiclopropano 1-Carboxílico). Pasados 5 días, se observa el fenotipo de plántulas etioladas en condiciones control y la triple respuesta típica de la presencia de etileno, en el medio suplementado con ACC.

3.10 Ensayos de crecimiento de plántulas en vertical

En este experimento, plántulas crecidas en medio MS sólido durante 7 días, se trasplantan a distintos medios según el ensayo: medio con potasio limitante, medio MS sólido, MS sólido sin sacarosa, o MS sólido suplementado con ácido acético (0-2,5 mM) o 10 μM de ácido abscísico. Una vez en este medio, las placas se mantienen en vertical en la cámara de cultivo durante 10 días más. Transcurrido ese tiempo se observa el fenotipo de la parte aérea y/o se pesan las plántulas. Asimismo, se puede observar el fenotipo de la raíz y/o medir su longitud. Siempre que se mide un fenotipo de manera cuantitativa se realiza el análisis estadístico descrito en el apartado anterior.

3.11 Ensayo de respuesta gravitrópica

En este ensayo, las plántulas se hacen germinar en vertical y en oscuridad. Dos días tras la siembra, se giran las placas 90°C, y se mantienen durante 2 días más en esa posición. Transcurrido ese tiempo, se observa el fenotipo de las plántulas y se determina el ángulo que genera el hipocotilo con respecto a la horizontal. Para cada genotipo, se realizan 5 réplicas biológicas, cada una de ellas formada por 8 plántulas.

3.12 Medida simultánea del potencial de membrana y pH citosólico

Las medidas simultáneas del potencial de membrana y pH citosólico, las realizó la Dra. Lourdes Rubio en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga.

Las semillas se esterilizan con lejía al 30% (v/v) y Tritón X-100 (0,02% v/v) durante 2 minutos, posteriormente se realizan cinco lavados de 1 minutos con agua estéril. Las semillas se siembran en medio sólido MS pH 5,5, y tras 48 h de estratificación (4°C y oscuridad) las placas se transfieren a cámara de cultivo, donde se mantienen de 10 a 15 días hasta la realización de las medidas.

Las medidas se realizan en la epidermis radicular. Para ello, las raíces se montan sobre cámaras de Plexiglass de aproximadamente 1,1 ml de volumen, manteniéndose un flujo continuo de medio de ensayo de aproximadamente 10 ml/min. Se emplea un medio simplificado basado en el descrito por Felle (1987) y compuesto por: CaCl₂ 0,1 mM, KCl 0,1 mM, NaCl 0,1 mM y 12 mM MES-Bis tris propano (pH5,5). El efecto del ácido acético sobre el potencial de membrana se determina tras la adición al medio de ensayo de 1 mM de ácido acético.

Para realizar las medidas, se insertan en la epidermis radicular microelectrodos dobles, en los que una de las barras contiene un sensor específico de protones ETH1907 (Fluka n°95259). La fabricación de dichos electrodos se realizó según el protocolo descrito en Fernández *et al.*, (1999). La señal correspondiente a la barra del sensor de protones se calibra frente a diferentes soluciones tampón MES-Bis tris propano con pHs: 5,3; 6,3; 7,3 y 8,3, en presencia de 96 mM KCl.

3.13 Ensayos de crecimiento en invernadero

En condiciones de crecimiento en invernadero, se realizaron 2 tipos de ensayos para observar el fenotipo en presencia de NaCl o LiCl.

En el primer ensayo, plántulas crecidas durante 7 días en medio MS sólido se transfieren a tierra. Tras 5 días, se inicia el riego con solución nutritiva suplementada con 2,5 mM de LiCl o únicamente con solución nutritiva (plantas control). Se observa la evolución de las plantas durante un periodo de unos 15 días. Pasado ese tiempo se cuantifica el peso de la roseta y la longitud de los escapos florales de 6 plantas (replicas biológicas), y se realiza el análisis estadístico correspondiente.

Un segundo ensayo consiste en transplantar a macetas cinco plántulas, crecidas en medio MS sólido durante 7 días, y regarlas con agua hasta que se haya desarrollado completamente la roseta y aparezca la inflorescencia primaria. A partir de este momento, se riega con solución nutritiva únicamente (plantas control) o con solución suplementada con 150 mM NaCl o 10 mM LiCl. El fenotipo es observable tras 8 o 9 días de riego. Entonces se puede cuantificar el fenotipo y realizar el análisis estadístico correspondiente.

3.14 Ensayo de pérdida de peso por transpiración

Para realizar este ensayo, se utilizan plantas crecidas de 3 a 4 semanas en invernadero, hasta que la roseta está bien desarrollada. De cada línea en estudio se analizan 6 plantas (repeticiones biológicas). Se cortan 3 hojas de cada planta (una muestra) y se tapa el corte del peciolo con vaselina, para evitar la pérdida de agua. Cada muestra se pesa (tiempo cero), y se dejan todas ellas en una campana de flujo laminar. Cada hora se vuelven a pesar todas las muestras, hasta las 6 horas. Finalmente, se expresa el peso de las hojas en porcentaje con respecto al tiempo cero, y se calcula la media y error estándar de las diferentes repeticiones.

3.15 Construcción de plantas transgénicas

3.15.1 Obtención de las construcciones para transformar *A. thaliana*

Para la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen At3g55470, se ha partido del cDNA de “RIKEN BRC Experimental Plant Division” (<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/>), que se encontraba en el clon RAFL16-68-C06. El cDNA se ha clonado en el sitio *Not* I del plásmido pBlueScripSK(+) obteniendo la

construcción pBS-470. Para la transformación de plantas de *A. thaliana* se ha subclonado el fragmento Xba I — Sac I de la construcción pBS-470 en el plásmido binario pBI121 (pBI121-470). Con esta construcción, se ha transformado la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* y posteriormente *A. thaliana*.

Para la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan una versión truncada del gen At3g55480 (aproximadamente las primeras 2,3 Kb) “*in sense*” o “*antisense*”, se ha amplificado por PCR el fragmento de interés a partir del DNA genómico de una planta control, y se ha clonado en el vector PCR8®/GW/TOPO® (PCR8) siguiendo las instrucciones del “*PCR8®/GW/TOPO® TA cloning Kit*” (Invitrogen). Brevemente, para la clonación se mezclan 3 µl del producto de PCR, 1 µl de la solución de sales incluida en el kit, 0,8 µl del vector PCR8 y 1 µl de agua. La mezcla se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se transforma *E. coli*. Posteriormente, se ha determinado la orientación del DNA y se ha realizado una “*LR reaction*”, gracias a la cual se ha transferido por recombinación el fragmento de interés desde el vector PCR8-480*sense* o PCR8-480*antisense* al vector binario de destino: pEarleyGate100. Para la “*LR reaction*” se mezclan 150 ng del vector PCR8 con el inserto, 150 ng del vector pEarleyGate100, TE buffer pH 8 hasta un volumen final de 4 µl y 1 µl del “*Gateway LR Clonase II Enzime Mix*” (Invitrogen). La mezcla se incuba a 25°C durante 4-5 horas y tras la incubación se añaden 0,5 µl de proteinasa K (Invitrogen), y se incuba a 37°C durante 10 min. Con la construcción resultante, se transforma la cepa pGV2260 de *A. tumefaciens* y posteriormente *A. thaliana*

3.15.2 Transformación de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*

Se emplean 5-8 plantas de *A. thaliana* crecidas en tierra con una inflorescencia primaria de alrededor de 10 centímetros de longitud. A estas plantas se les corta el ápice de la inflorescencia primaria para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. Unos 4 ó 5 días después se realiza la transformación de las plantas tal y como se describe en Bent (2000).

Inicialmente se agrega 1 ml de cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector de interés, a 200 ml de medio LB con el antibiótico apropiado, y se incuba en agitación a 28 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se recogen por centrifugación en frío a 4.000 rpm durante 10 minutos, y se resuspenden en 400 ml de solución de transformación compuesta por 5% (p/v) sacarosa y 0,02% (v/v) detergente

Silwet L-77 (Lehle Seeds).

La solución de transformación se coloca en un recipiente donde se introduce la parte aérea de las plantas durante 10-15 segundos. Luego, se cubren las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación. Después de 2 días se retiran las bolsas y se mantienen las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T₁.

3.15.3 Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos

Las semillas transgénicas T₁ se siembran en placas Petri de 14 cm de diámetro con medio MS suplementado con el compuesto apropiado para la selección (BASTA [pEarleyGate100] o kanamicina [pBI121]). Después de 7-10 días, las plántulas resistentes al compuesto (T₁) se rescatan y se transplantan a macetas para obtener la generación T₂. Las semillas T₂ se cultivan en medio MS sólido con el compuesto de selección para observar la segregación de la línea. De aquellas líneas transgénicas cuyas semillas muestran una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) para el compuesto selectivo, se pasan las plántulas resistentes a tierra para obtener la generación T₃. La segregación 3:1 es la que se espera cuando existe una sola integración del T-DNA en el genoma. Las semillas T₃ se siembran en medio MS sólido con el compuesto de selección para identificar los individuos homocigotos.

3.16 Ensayo de toma de acetato radiactivo

3.16.1 Preparación de las muestras

En este ensayo, plántulas crecidas durante 5 días en medio MS sólido pH 5,5 en vertical, se traspasan a medio líquido MS pH 5,5 y se mantienen durante 7 días más. Transcurrido ese tiempo, se pasan las plántulas a un nuevo medio MS líquido pH 5,5 suplementado con 0,1 mM acetato sódico marcado radiactivamente con C¹⁴ de actividad específica: 56,2 Ci/mol (Perkin Elmer), donde se mantienen durante 15, 30, 60 y 120 minutos. A continuación, se realizan dos lavados con agua fría, y las muestras se congelan en nitrógeno líquido. Para cada tiempo se realizan 3 réplicas biológicas. Se realiza un blanco de lavado, introduciendo las plántulas en el medio con acético, extrayéndolas inmediatamente y realizando los lavados indicados.

3.16.2 Extracción y medida de acetato radiactivo

Para la extracción de acetato, se muelen las muestras congeladas dentro de un microtubo con una varilla de vidrio, y se añaden 500 microlitros de agua. Se coloca el microtubo a 95°C durante 15 min, y transcurrido ese tiempo, se realiza una centrifugación de 5 minutos a 12.000 rpm. Se toma el sobrenadante y si está turbio se repite la centrifugación.

Finalizada la extracción, se procede a la medida del acetato incorporado por la planta. Para ello, se mezclan 400 microlitros del extracto con 1 ml de líquido de centelleo. Una vez estabilizada la mezcla se realiza la medida mediante el contador de centelleo “*Liquid scintillation counter*” (Wallac 1410).

3.17 Ensayo de medida del contenido en malato

3.17.1 Preparación de las muestras

En este ensayo, plántulas crecidas durante 7 días en medio MS, son transferidas a medio MS en vertical, donde se mantienen durante 9 días más. Transcurrido ese tiempo, se realizan los tratamientos con acético. Para ello, se toman 3 muestras (4 plantas cada una), y se transfieren a medio MS pH 5,5 (control) o medio MS pH 5,5 suplementado con 3,5 mM de ácido acético durante 5, 10 y 15 minutos. Tras el tratamiento, las muestras se congelan en nitrógeno líquido y se mantienen a -80°C hasta la extracción de malato.

3.17.2 Extracción y medida de malato

La extracción y medida de malato se realiza mediante una adaptación del método descrito por Hurth *et al.*, (2005). Concretamente, se muele el material vegetal en un microtubo, y se agrega 1 ml de agua por cada 100 mg de peso fresco. A continuación, se mantienen los microtubos a 95°C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifuga, y se toma el sobrenadante, para realizar la medida de malato.

El malato se cuantifica espectrofotométricamente, mediante un ensayo enzimático descrito por Passonneau y Lowry (1993). El ensayo se basa en la transformación de malato en oxalacetato por la malato deshidrogenasa, liberando NADH (Figura 3.5). Dado que esta reacción es reversible, el oxalacetato producido se consume mediante la aspartato transaminasa, que transforma oxalacetato y glutamato en

aspartato y α -cetoglutarato. De este modo, se desplaza el equilibrio consumiendo todo el malato y produciéndose oxalacetato y NADH, que es capaz de absorber a una $\lambda=340$ nm.

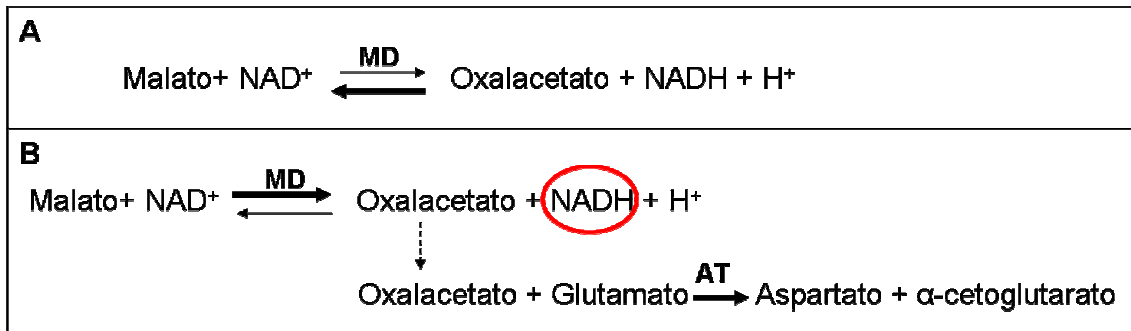


Figura 3.5: Reacciones que tienen lugar en la medida de malato. A) Transformación de malato en oxalacetato por la malato deshidrogenasa (MD). Esta reacción está poco desplazada hacia la derecha (reacción 1). B) La reacción anterior, se ve favorecida al consumir el oxalacetato formado por acción de la aspartato transaminasa (AT) en presencia de glutamato. El NADH se señala en rojo porque es el analito que absorbe a 340 nm, permitiendo la determinación de la concentración de malato.

En el ensayo, se añaden 200 μl de muestra a la mezcla de reacción (100 mM 2-amino-2-metilpropanol a pH 9,9; 2 mM NAD^+ ; 40 mM glutamato pH 9,9; 3,5 U/ml de malato deshidrogenasa (MD); 0,9 U/ml de AT). Tras 10 minutos, se mide la absorbancia a 340 nm. Para restar cualquier absorción de la muestra que no se deba al NADH producido, cada muestra se mide antes y después de añadir el enzima MD, y se considera el valor de absorción como la resta entre el valor final y el obtenido previamente a la adición del enzima MD. Finalmente, mediante una recta patrón, se determina la concentración de malato en cada muestra.

3.18 Medida de la actividad H^+ -ATPasa de membrana plasmática (MP) *in vitro*

3.18.1 Aislamiento de proteínas de PM en gradiente de sacarosa

Para realizar el aislamiento de proteínas de membrana plasmática, se parte de 2 g de raíz de plantas crecidas durante un mes y medio en cultivo hidropónico. Se muele el material vegetal en 0,4 ml de tampón de extracción de plantas 5x (250 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 M KCl, 25 mM EDTA, 5 mM DTT, 30% p/v sacarosa y una pastilla de inhibidores de proteasas, “Complete Mini EDTA-free” (Roche) por cada 5 ml de tampón). Una vez homogeneizado el tejido, se añaden 4 ml de GTED 20 (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 20% v/v glicerol) y se termina de moler.

A continuación se filtra el homogeneizado y se centrifuga a 4 °C durante 5 min a 3.400 rpm, para eliminar la fracción nuclear o debris. Se toma el sobrenadante y se centrifuga también en frío, 1h a 15.000 rpm. El precipitado representa la fracción mitocondrial, donde se incluyen las mitocondrias y fragmentos de membrana plasmática. Este precipitado se resuspende en 500 µl de GTED 20, con ayuda de un homogeneizador Dounce.

Una vez resuspendido, se realiza un gradiente discontinuo de sacarosa con dos soluciones: STED 33 ó STED 41 compuestas por 10mM Tris HCl pH 7,6, 1mM EDTA, 1mM DTT y 33 y 41% (p/p) de sacarosa, respectivamente. Sobre el gradiente se coloca la muestra, y se centrifuga en frío a 30.000 durante 20h, utilizando el rotor vasculante SW 60Ti y una ultracentrífuga Beckman.

Tras la centrifugación, se toma la fracción de proteínas que queda en la interfase entre las dos concentraciones de sacarosa (aproximadamente 1 ml), se diluye con 4 ml de agua fría y se centrifuga en frío durante 1h a 15.000 rpm. Inmediatamente tras la centrifugación, se decanta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 100 µl de GTED 20, empleando un homogeneizador Dounce. La cantidad de proteínas se cuantifica utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976, Kruger, 1994).

3.18.2 Ensayo de medida actividad H^+ -ATPasa *in vitro*

La medida de la actividad H^+ -ATPasa de la membrana plasmática se basa en la determinación del P_i (fósforo inorgánico) liberado por la hidrólisis del ATP, tal y como se describe en Serrano (1978).

En el ensayo, se emplean placas de 96 pocillos (Greiner) donde se colocan 65 µl de una solución de tampón ATPasa (50 mM Mes-Tris pH 6,5, 5 mM $MgSO_4$, 50 mM KNO_3 y 5 mM azida de sodio, 0.2 mM molibdato de amonio) y ATP 0,1 M pH 6,5 en las proporciones 50:1, respectivamente, y 15-20 µg del extracto de proteínas. Se realizan los siguientes controles: control 1, se colocan las proteínas y 65 µl de tampón ATPasa sin ATP, y control 2, se colocan las proteínas y 65 µl de una solución con tampón ATPasa, ATP y 0,1 mM de vanadato. La placa se incuba a 30 °C durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo se añaden 130 µl de una solución de reactivo P_i (2% v/v H_2SO_4 , 0,5% p/v molibdato de amonio, 0,5% p/v SDS) y ácido ascórbico 10% en las proporciones 100:1, respectivamente. Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se mide la absorbancia en un lector de placas Model 550 (Bio-Rad) a 690 nm. A los datos de absorbancia de cada muestra se restan los

valores de los controles. El control 1 representa el P_i que estaba presente en el extracto de proteínas antes de empezar el ensayo, y el control 2, con vanadato, muestra la liberación de P_i que no se debe a la ATPasa de membrana (cuya actividad se inhibe por ese compuesto), sino a otras fosfatasas, así como el P_i presente inicialmente en el ATP.

3.19 Ensayos de acidificación del medio externo

3.19.1 Medida empleando bromocresol

Este ensayo se realiza para observar *in vivo* la acidificación del medio externo provocada por la expulsión de protones por las raíces. Para ello, plantas crecidas en vertical durante 14 días en medio MS sólido sin tamponar, se transfieren a medio MS sólido pH 5,5 (sin tampón) suplementado con 0,003% (p/v) de bromocresol púrpura (Sigma-Aldrich), en presencia o ausencia de 3,5 mM de ácido acético. El bromocresol es un colorante cuya coloración depende del pH, de modo que una acidificación del medio hace variar su color de morado a amarillo. Las plántulas se mantienen de 6 a 12 horas en el medio con bromocresol, hasta observar el cambio de color del mismo.

3.19.2 Medida directa de la acidificación del medio externo

Para la medida directa de la acidificación del medio externo por las raíces de las plántulas, se emplearon plántulas de 7 días. Las plántulas se cultivan durante 6 días en medio MS sólido en horizontal, y al sexto día se transfieren aproximadamente 100 plántulas (1 muestra) a placas con agua estéril, donde se mantienen en oscuridad hasta el día siguiente. Este tratamiento provoca un ayuno en las células vegetales, por el cual las raíces tienden a perder el potasio y a tomar protones del agua, acidificando el interior celular. Asimismo, se minimiza la cantidad de ATP disponible en la célula, ya que se mantienen en ayuno y sin luz. Estas condiciones favorecerán posteriormente la salida de protones que se pretende medir.

Tras el tratamiento de ayuno, se mide la acidificación del medio que provoca cada muestra (formada por 100 plántulas aproximadamente). Para ello, se transfieren las plántulas a un recipiente con 10 ml de medio MS líquido sin sacarosa y sin tamponar (control) o al mismo medio suplementado con 1 mM de ácido acético. El medio se lleva a pH 5,7 con KOH. En ese momento, se añade la sacarosa y se empieza a medir el pH del medio, que se encuentra en continua agitación. Al entrar en contacto con el medio rico en nutrientes y con sacarosa, la célula trata de compensar la acidificación sufrida

durante el ayuno anterior, expulsando protones al medio extracelular y provocando su acidificación.

La medida del pH del medio se realiza de forma continua cada minuto hasta 45 minutos después de la adición de sacarosa al medio. Para ello se emplea el pHmetro GLP22 (Crison), con el electrodo de pH con número de referencia 52.08 de Crison. A los 40 minutos se agregan 5 μ l de HCl 10 mM para medir la bajada de pH provocada por esa concentración de protones. Esto permite transformar las unidades de pH en cantidad de protones expulsados.

A partir de estos datos, se calcula el incremento en la concentración de protones del medio por unidad de peso fresco de raíz, y por minuto, en diferentes intervalos de tiempo: los primeros 10, 20, 30 y 45 minutos. En el ensayo se realizaron 4 repeticiones biológicas para cada condición (control y acético), se calculó la media y error estándar de estas repeticiones y se realizó el correspondiente análisis estadístico.

3.20 Ensayos de toma y acumulación de cationes

3.20.1 Ensayo de toma de sodio y litio

El ensayo de toma de Na^+ y Li^+ en plantas de *A. thaliana* se realiza a partir de plantas crecidas durante 13 días en medio MS líquido. Transcurrido ese tiempo, se traspasan a un nuevo medio MS líquido suplementado con 125 mM de NaCl o 25 mM de LiCl, y se hacen tratamientos a diferentes tiempos, comprendidos entre 0 y 2 horas. Tras el tratamiento, las plántulas se lavan 2 veces en una solución fría de 20 mM de MgCl_2 y 2 veces en agua estéril fría. Finalmente, las muestras se dejan secar en estufa a 50 °C durante 2-3 días, envueltas en papel filtro. Se realizan tres repeticiones biológicas del experimento, y se calcula la media y el error estándar para cada línea de *A. thaliana* estudiada. La extracción de los cationes del tejido seco, se describe más adelante.

3.20.2 Ensayo de toma de rubidio

El rubidio se usa en fisiología como análogo del potasio. El ensayo de toma de Rb^+ en plántulas de *A. thaliana* se ha realizado tanto en presencia como en ausencia de ácido acético. En ambos casos, se parte de plántulas crecidas durante 13 días en medio MS líquido. Transcurrido ese tiempo, las plántulas se lavan 2 veces con agua estéril, para eliminar el potasio y se traspasan a medio líquido sin K^+ , suplementado con la concentración indicada de RbCl en cada caso (con o sin 3,5 mM de ácido acético). Se

mantienen en dicho medio durante diferentes tiempos, comprendidos entre 0 y 2 h. Finalmente, las muestras se lavan y se almacenan tal y como se describe en el apartado anterior.

3.20.3 Ensayos de acumulación de cationes

Este tipo de ensayo se realizó tanto en plántulas enteras como en la raíz y la parte aérea de forma separada.

Para el ensayo de acumulación de sodio, litio y rubidio en plántulas de *A. thaliana*, se parte de plántulas crecidas en medio líquido durante 11 días. Transcurrido ese tiempo, se traspasan a nuevo medio MS líquido suplementado con 125 mM NaCl o 25 mM LiCl, donde se mantienen por 2 días. En el caso del rubidio las plántulas se traspasan a medio sin K^+ suplementado con 10 μ M de RbCl. Finalmente, se realizan los mismos lavados y se almacenan del mismo modo que las muestras del ensayo de toma de cationes. En el caso del K^+ , se utilizan plántulas crecidas durante 13 días en medio MS líquido que directamente se lavan y se almacenan a 50°C durante 2-3 días.

Para el ensayo de acumulación de sodio y litio en raíz y parte aérea por separado, se utilizan plantas crecidas en cultivo hidropónico durante 6 semanas. Transcurrido ese tiempo las plantas se transfieren a una cubeta con 25 mM de LiCl o 125 mM NaCl, y se mantienen durante 2 días. Al finalizar el tratamiento, se corta por un lado la roseta y por otro la raíz de las plántulas, se realizan los lavados descritos previamente con $MgCl_2$ y agua, se envuelven en papel de filtro las muestras y se almacenan en estufa a 50°C durante 2-3 días. En el caso del K^+ , se utilizan plantas crecidas en cultivo hidropónico durante 6 semanas, de las que se separa la raíz y la parte aérea, se lavan por separado y se almacenan en estufa, como en el caso anterior. Las muestras de la roseta están formadas por una única planta, mientras que para la raíz se juntan cinco plantas para obtener una muestra.

En todos los experimentos de acumulación de cationes en plántula completa, se realizan 3 repeticiones biológicas para cada línea y se calcula la media y el error estándar. En los experimentos de medida de cationes en raíz y parte aérea por separado, se realizan 4 repeticiones biológicas.

3.21 Extracción y medida de cationes

Se parte de muestras secadas en estufa, tal y como se ha explicado anteriormente. Se trituran con una varilla de vidrio y se colocan 10 mg de muestra en un microtubo. Se añade 1 ml HNO₃ 0,1 M y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se centrifuga 5 minutos a 12.000 y se toma el sobrenadante, que se pasa a un tubo nuevo. Si no queda totalmente limpio se repite la centrifugación. Finalmente el sobrenadante se guarda a 4 °C. La medida de la cantidad de Rb⁺, Li⁺, Na⁺ y K⁺ en las muestras se realizó por personal del ITQ (Instituto de Tecnología Química), mediante un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (Varian-715-ES “*ICP Optical Emisión Spectrometer*”).

3.22 Medida del contenido en ácido abscísico (ABA)

3.22.1 Obtención de las muestras

Se realizaron dos ensayos diferentes de medida del contenido de ABA tras un tratamiento con acético. En el primer ensayo el acético se aplica desde el primer momento, mientras que en el segundo ensayo el ácido acético se añade a plántulas ya de 6 días.

Para el primer ensayo se pesan 30 mg de semillas del control silvestre para cada muestra, y se dejan crecer en medio MS líquido o medio MS líquido suplementado con 3,5 mM de ácido acético durante 6 días. A los 6 días se realiza la extracción de ácido abscísico de 3 muestras control y 3 muestras tratadas con acético (que poseen un menor tamaño debido al efecto del acético). A los 8 días, se realiza la extracción de ABA de otras 3 muestras tratadas con acético (que poseen un tamaño bastante similar al de las plántulas crecidas en MS a los 6 días).

En el segundo ensayo, plántulas crecidas durante 6 días en medio MS se transfieren a medio MS líquido suplementado con 3,5 mM de ácido acético, donde se mantienen durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se realiza la extracción y medida de abscísico.

3.22.2. Extracción y medida de ácido abscísico

Se parte de 100 mg de material vegetal congelado y se tritura con mortero. Se añaden 2,5 ml de tampón de extracción (acetona 80% (v/v), BHT (“*Butylated*

Hidroxitoluene”) 100 mg/l y ácido cítrico 500 mg/l) y se incuba toda la noche a 4°C, en oscuridad. Al día siguiente, se centrifuga 10 min a 12.000 rpm y se toman 0,5 ml del sobrenadante. A continuación, se evapora en “*speedvac*”, y se resuspende el residuo en 100 µl de TBS (Tris 50 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM ajustado a pH 7,8 con HCl).

El ABA presente en cada muestra se cuantifica mediante el método indirecto ELISA, proporcionado por el estuche de medición “Phytodetek ABA” (Agdia), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

3.23 Análisis de la expresión génica en condiciones de estrés por ácido acético mediante micromatrices de oligos:

3.23.1 Características de las micromatrices empleadas

En este trabajo se han empleado micromatrices provenientes de la Universidad de Arizona: “*Arabidopsis Genome Oligo Set version 3.0*” (www.ag.arizona.edu/microarray). Cada micromatriz contiene 29.110 oligonucleótidos de 70 pares de bases, que representan 26.173 genes que codifican proteínas, 28.964 transcritos codificantes de proteínas y 87 microRNAs. El diseño de las micromatrices se ha realizado en base a la información de la base de datos “*TIGR Arabidopsis genome*” (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) y al registro de microRNAs del “*Sanger Institute*” (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfan/mirna/index.shtml>).

3.23.2 Preparación de las muestras

Plantas crecidas durante 5 días en medio MS sólido se transfieren a medio MS líquido y se dejan crecer durante 13 días más. Transcurrido ese tiempo se toman 4 muestras (3 plantas cada una) y se les somete a un tratamiento de 2 horas con 3,5 mM de ácido acético, mientras que otras 4 muestras se transfieren a medio MS sin acético y se mantienen durante 2 horas (muestras control). Para el análisis de la expresión génica en condiciones de estrés ácido, se extrae RNA de estas muestras, y se realizan 4 réplicas biológicas enfrentando en cada micromatriz una muestra tratada con acético frente a una muestra control.

3.23.3 Preparación de la sonda de RNA para la hibridación

Tras la extracción y purificación del RNA (mediante el kit “*RNeasy Mini Kit*” de Quiagen), se lleva a cabo el marcaje del mismo con fluoróforos. Se emplea un método de marcaje indirecto, de modo que en primer lugar se obtiene el “*aminoallyl-RNA*” (aa-RNA), y a continuación se acoplan los fluoróforos. Para ello se emplea el kit “*Aminoallyl MessageAmpTM II RNAA kit*” de Ambion. Finalmente se fragmenta el RNA para favorecer su hibridación a la micromatriz.

A) Amplificación del RNA y síntesis del aa-RNA:

En primer lugar se sintetiza cDNA de doble cadena a partir del RNA. Tras la purificación del cDNA (kit “*DNA clear*” de Ambion), se realiza una transcripción *in vitro* incorporando el nucleótido modificado “*5-(3-aminoallyl)-UTP*” (Ambion), obteniendo así el aa-RNA. Finalmente, se efectúa otra purificación empleando el kit “*MegaclearTM*” (Ambion).

B) Acoplamiento con los fluoróforos:

Una vez purificado el aa-RNA, se lleva a cabo la reacción de acoplamiento con los fluoróforos Cy3 y Cy5 (“*N-hydroxyl succinimidyl dyes*”) de *GE Healthcare*. En dos de las réplicas, se empleó el fluoróforo Cy3 para las muestras control y el Cy5 para las muestras tratadas. En las otras 2 réplicas se marcaron de forma contraria, para eliminar la variabilidad debida a la mayor o menor hibridación de los fluoróforos.

Para el marcaje, 7,5 µg de aa-RNA se disuelven en 10 µl de “*coupling buffer*”, y se mezcla con 18 µl del fluoróforo apropiado disuelto en DMSO. El acoplamiento se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, el aa-RNA acoplado al fluoróforo se purifica usando el kit “*MegaClear*” (Ambion). Finalmente, se mezclan 250 pmoles de cada aa-RNA (muestra tratada y control), marcados con diferentes fluoróforos, se secan en “*speedvac*” y se realiza la fragmentación.

C) Fragmentación del aa-RNA:

Para llevar a cabo la fragmentación, se emplea el kit “*RNA fragmentation reagent*” (Ambion). Concretamente, se añaden al aa-RNA, 20 µg de tRNA y 20 µg de poli(A), usando un tampón de fragmentación de RNA (Ambion) en un volumen final de

5 µl. La mezcla se incuba 15 minutos a 70°C, y transcurrido ese tiempo se detiene la reacción (“*stop solution*”) y la sonda está preparada para la hibridación.

3.23.4 Preparación de las micromatrices para la hibridación

Previamente a su uso, los cristales deben ser rehidratados, empleando vapor de agua a 60°C durante 10 segundos, y secándose en un termobloque a 65°C durante 5 segundos. La hidratación de los cristales se realiza 3 veces consecutivas. Tras la hidratación, se fija el DNA exponiendo los cristales a 65mj empleando un “*UV cross-linker*” (Stratagene).

A continuación, los cristales se lavan dos veces con una solución de 0,1 % SDS y 4 veces en agua. Cada lavado se realiza durante 2 minutos. Finalmente, se introduce el cristal en etanol absoluto durante 30 segundos, y se seca por centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

3.23.5 Prehibridación e hibridación de las micromatrices

Los cristales se prehibridan 30-45 minutos a 42 °C con 50 ml de solución de prehibridación (SSC 3X, 0,01% BSA y 0,1% SDS) en un tubo de 50 ml. Transcurrido ese tiempo, los cristales se lavan a temperatura ambiente, 2 veces en agua (lavados de 2 min cada uno) y una vez en propanol (30 segundos), y se secan por centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto. Inmediatamente después se realiza la hibridación.

La hibridación se lleva a cabo en una cámara de hibridación de micromatrices (“*ArrayIt Hybridization Cassete*”, TeleChem) y se tapa con una cubierta 60x22 mm “*LifterSlip*” (Erie Scientific).

Al aa-RNA ya fragmentado (sonda) se le añade la mezcla de hibridación, que contiene 50 µl de formamida desionizada, 30 µl de SSC 20X, 5 µl de solución “*Denhardt’s*” y 5 µl de SDS 10%. La mezcla de hibridación se desnaturaliza a 95 °C durante 5 minutos y se aplica al cristal. Los cristales se incuban a 37 °C durante 16 horas en la cámara de hibridación.

3.23.6 Lavado y escaneado de las micromatrices

Finalizada la hibridación, los cristales se lavan del siguiente modo: el primer lavado se realiza con SSC 1X y SDS 0,1% a 30 °C (5 minutos), el segundo con SSC

0,2X y SDS 0,1% a 30 °C (5 minutos), el tercero y el cuarto con SSC 0,1X a 28 °C (2 minutos) y finalmente con SSC 0,01X durante 2 minutos a temperatura ambiente. Los cristales se secan por centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Los “*microarrays*” hibridados se escanean a 532 nm para el fluoróforo Cy3 y a 635 nm para el fluoróforo Cy5, usando el escáner Genepix 4000B (Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA) a una resolución de 10 µm. Se ajusta manualmente la intensidad de señal para cada canal, con el propósito de incrementar la diferencia entre el fondo y la señal de cada punto, así como para reducir el número de puntos saturados.

3.23.7 Preprocesamiento de los datos con genepix

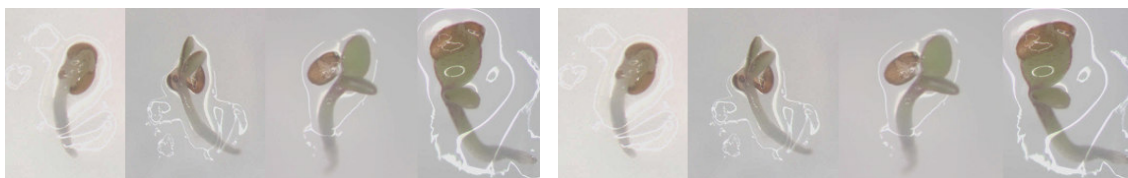
Mediante el programa “*GenePix 4.1 microarray-analysis*” (Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA) se cuantifica la intensidad de cada punto, se realiza una primera normalización de los datos (basada en que el cociente rojo/verde sea igual a 1), y se analizan las imágenes. Tras este análisis, los puntos con manchas, saturados en ambos canales, o una intensidad en alguno de los dos canales menor al doble de la intensidad del fondo en ese canal, se eliminan.

3.23.8 Procesamiento de los datos con Accuity y análisis estadístico

Mediante el programa “*Accuity*”, se realiza una nueva normalización de los datos (método LOWESS: “*Locally Weighted Scatter plot Smoother*”). Asimismo, se eliminan aquellos puntos (“*spots*”) que no estén representados al menos en 3 de las 4 réplicas, se invierte el cociente en las 2 réplicas cuyo marcaje se realizó con los fluoróforos invertidos, y se seleccionan los genes diferencialmente expresados. Como genes diferencialmente expresados se consideraron aquellos que al menos en 3 de los 4 arrays están más de 3 veces inducidos o más de 4 veces reprimidos.

El análisis estadístico se realiza con el test estadístico SAM (“*Significant Analysis of Microarrays*”), que permite determinar aquellos genes cuyo nivel de inducción o represión es estadísticamente significativo (considerando un error del 5%).

4-RESULTADOS



4.1 Rastreo de líneas mutantes “*activation tagging*”

4.1.1 Aislamiento de mutantes resistentes a ácido acético

En este trabajo se ha realizado un rastreo de 30.000 líneas mutantes (unas 400.000 semillas) pertenecientes a la colección de W. Sheible y C. Somerville (ver apartado 3.1.1) con el objetivo de identificar mutantes de *A. thaliana* tolerantes a ácido acético durante la germinación y el establecimiento de la plántula.

La búsqueda de mutantes se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.7.1. En primer lugar, se realiza un rastreo primario en el que se identifican los posibles mutantes, y posteriormente, un rastreo secundario, con el que se confirma la tolerancia de las líneas candidatas, analizando su descendencia. Tras el rastreo primario, se seleccionaron 170 posibles candidatos, que presentaban cotiledones abiertos y verdes tras 6 días en un medio MS suplementado con 7 mM ácido acético (Figura 4.1A).

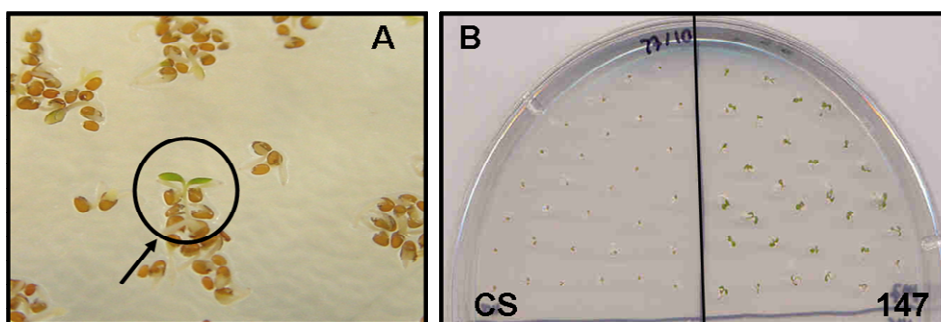


Figura 4.1: Rastreo de líneas mutantes. A) Detalle rastreo primario. La flecha muestra uno de los candidatos seleccionados tras 6 días en medio MS pH 5,5 + 7 mM ácido acético. B) Detalle rastreo secundario. Se muestra como uno de los candidatos confirmados (147) presenta cotiledones expandidos y verdes tras 5 días en medio MS pH 5,5 + 3,5 mM ácido acético. CS= Control silvestre.

Todos los posibles candidatos seleccionados en el rastreo, se pasaron a tierra para obtener su descendencia (población S_2), sobre la que se llevó a cabo el rastreo secundario. De los 170 candidatos analizados en este segundo rastreo, se seleccionaron los cinco mejores (*wat 1-5*: “*weak acid tolerant 1-5*”) de acuerdo a su resistencia a ácido acético. En la Figura 4.2, se muestra el fenotipo en presencia de ácido acético de tres de los cinco candidatos seleccionados. Se observa que los candidatos presentan un fenotipo similar en medio suplementado con 3,5 mM de ácido acético (Figura 4.2A). Sin embargo, al incrementar la concentración de ácido, es posible establecer los diferentes niveles de tolerancia frente al ácido (Figura 4.2B). Concretamente, puede

observarse que el candidato que muestra mayor tolerancia a acético es el 147 (*wat2*), seguido del mutante 125 (*wat1*) y, por último, el 106 (*wat3*).

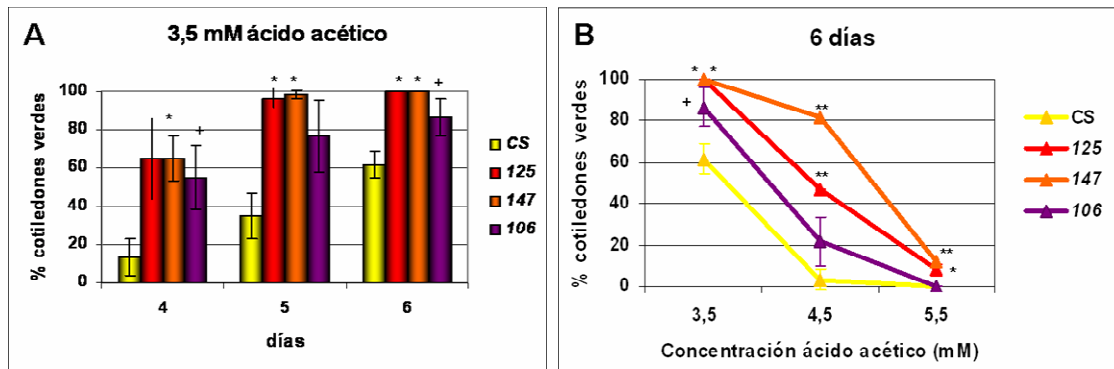


Figura 4.2: Fenotipo en presencia de ácido acético de tres de los cinco candidatos confirmados (*wat 1-3*). A) Porcentaje de cotiledones verdes entre los 4 y 6 días de crecimiento en medio MS suplementado con 3,5 mM ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. En esta Figura y en todas las siguientes: **, * y + indican que existen diferencias significativas entre el mutante indicado y su control, con un nivel de significación $\alpha=0,01$, $\alpha=0,05\%$, y $\alpha=0,1\%$, respectivamente. B) Porcentaje de cotiledones verdes a los 6 días de crecimiento en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido acético. Las barras de error muestran el error estándar de 3 repeticiones biológicas. CS: Control Silvestre.

4.1.2 Confirmación de la presencia de T-DNA en los mutantes y determinación del número de inserciones

Con el objetivo de comprobar la presencia de T-DNA en el genoma de los mutantes y conocer el número de inserciones introducidas con la mutagénesis, se realizaron análisis “*Southern blot*” con sondas específicas para el T-DNA. Concretamente, se empleó una sonda que hibrida en el gen *BAR*, de resistencia a BASTA y una sonda que hibrida en el activador transcripcional 35 S.

El resultado de ambos “*Southern*” se muestra en la Figura 4.3, donde se observa que el mutante número 39 (*wat 4*) no posee ninguna inserción de T-DNA, los mutantes 61 (*wat 5*) y 125 (*wat 1*) tienen una única inserción, y los mutantes 147 (*wat 2*) y 106 (*wat 3*) presentan varias inserciones en su genoma (cuatro o más). El hecho de que el mutante n° 39 (*wat 4*) no posea el T-DNA en su genoma, puede resultar sorprendente. Sin embargo, probablemente en esta línea se ha producido una mutación espontánea (o inducida por las condiciones de estrés a las que se someten las plantas en el proceso de mutagénesis), que es la responsable del fenotipo de tolerancia a ácido acético en germinación.

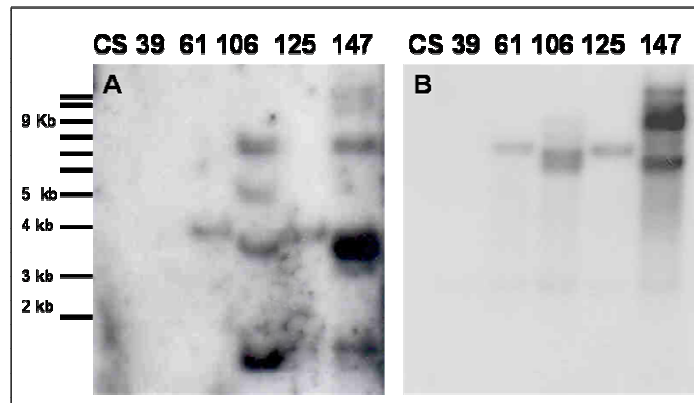


Figura 4.3: Análisis “Southern” de los candidatos seleccionados, empleando la sonda BAR (A) o la sonda 35S (B). CS: Control silvestre.

Considerando los resultados obtenidos en los “southern” y el grado de tolerancia a acético de los diferentes mutantes aislados en el rastreo, se decidió investigar en mayor profundidad el mutante 125, que presentaba una única inserción de T-DNA y mostraba uno de los mejores fenotipos de tolerancia a acético. A este mutante se le denominó *wat1-1* (“*w*ea*k* *a*ci*d* *t*olerant” *1*-alelo *1*). La posterior localización del T-DNA en el genoma de los mutantes, mostró que esta línea mutante se había aislado dos veces en el rastreo de forma independiente, ya que las líneas 61 y 125 correspondían al mismo mutante. Este resultado, da mayor consistencia rastreo y respalda la elección de este mutante para su análisis en mayor detalle.

4.2 Caracterización fenotípica del mutante *wat1-1*

4.2.1 Caracterización fenotípica en germinación y aparición de cotiledones

A) Fenotipo del mutante *wat1-1* en medio MS:

La caracterización fenotípica del mutante *wat1-1* se inició realizando ensayos de aparición de cotiledones en cultivo *in vitro*. En todos estos ensayos, se emplea un control que muestra la germinación y establecimiento de cotiledones de ambos genotipos en medio MS. De este modo, se asegura que las diferencias observadas en los distintos medios se deben al efecto de las sustancias incluidas en los medios a concentraciones tóxicas, y no a diferencias observables en condiciones normales.

La Figura 4.4, muestra el comportamiento del control silvestre y el mutante *wat1-1*, en medio MS. En el gráfico se observa como la aparición de cotiledones en el

mutante y el control ocurre de forma similar entre los 3 y 5 días. A los 4 días prácticamente se han expandido el 100% de los cotiledones, y a los 5 días todas las plántulas tienen los cotiledones abiertos. Por lo tanto, en medio MS, la germinación y establecimiento de las plántulas ocurren simultáneamente en el mutante y el control, por lo que cualquier diferencia observada en otro medio, será efecto de las sustancias tóxicas añadidas.

Por otra parte, la Figura 4.4A muestra el aspecto de las plántulas del mutante y el control, tras 5 días en medio MS. Se observa que todas ellas presentan cotiledones abiertos y verdes, y el aspecto de las plántulas de ambos genotipos es muy parecido. Para comprobar si el tamaño de las plántulas del mutante era igual al del control silvestre, se midió el área de los cotiledones empleando el programa “IMAGE J”. De este modo, se observa que las plántulas del mutante tienen un tamaño ligeramente menor que las del control silvestre, si bien esta pequeña diferencia resulta significativa (Figura 4.4C).

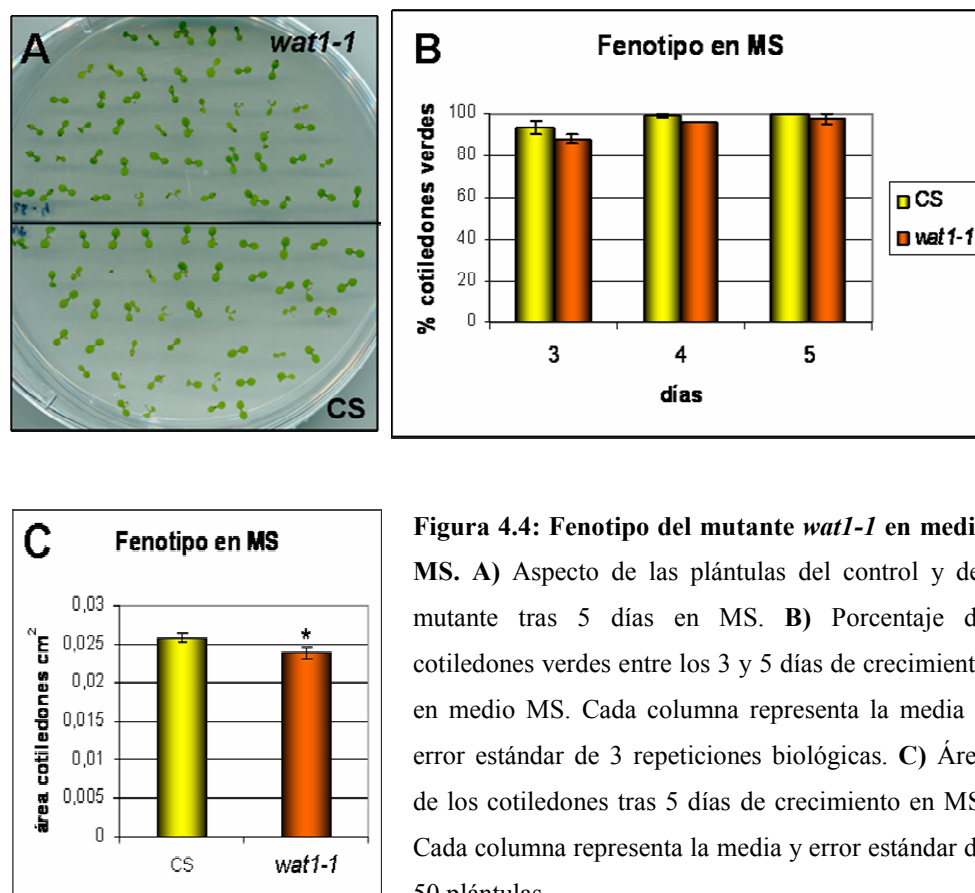


Figura 4.4: Fenotipo del mutante *wat1-1* en medio MS. A) Aspecto de las plántulas del control y del mutante tras 5 días en MS. B) Porcentaje de cotiledones verdes entre los 3 y 5 días de crecimiento en medio MS. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. C) Área de los cotiledones tras 5 días de crecimiento en MS. Cada columna representa la media y error estándar de 50 plántulas.

B) El mutante *wat1-1* tolera ácidos débiles:

Para iniciar la caracterización fenotípica del mutante *wat1-1*, se quiso comprobar si la tolerancia a estrés por ácido acético que mostraba el mutante durante la germinación y establecimiento de la plántula, era específica para éste ácido o si *wat1-1* era capaz de tolerar otros ácidos débiles con un pKa similar, como el ácido sórbico o el propiónico (Figura 4.5).

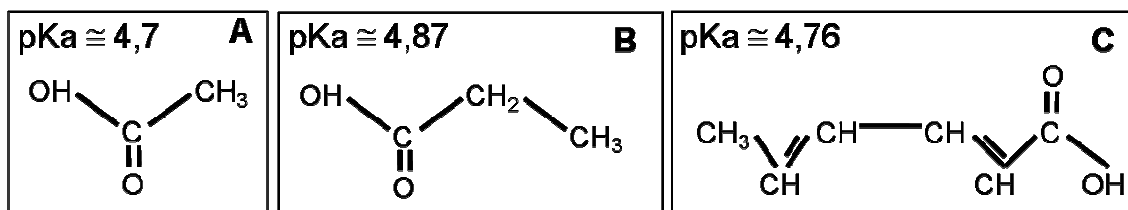


Figura 4.5: Estructura y pKa del ácido acético (A), propiónico (B) y sórbico (C).

Para ello, se realizó un ensayo de aparición de cotiledones en medio MS suplementado con la concentración apropiada de cada ácido. En la Figura 4.6 se observa como el mutante *wat1-1* presenta un mayor porcentaje de cotiledones verdes que el control, no sólo en presencia de ácido acético, sino también en medio suplementado con ácido propiónico o sórbico.

Por lo tanto, el mutante es resistente a la acidificación intracelular provocada por diferentes ácidos débiles.

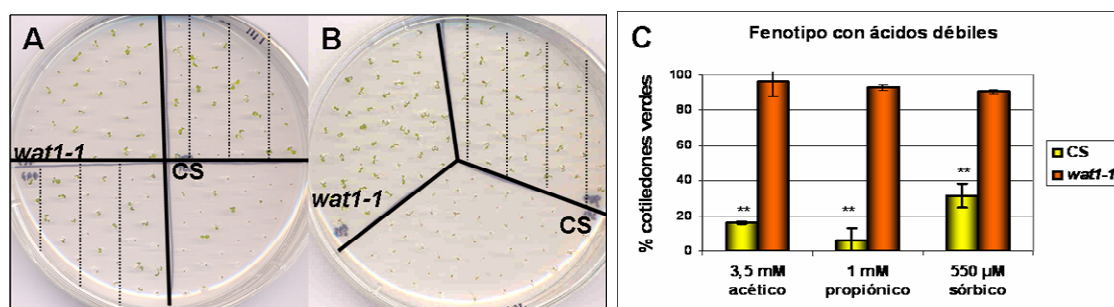


Figura 4.6. Fenotipo del mutante *wat1-1* en presencia de ácidos débiles. Aspecto de las plántulas tras 5 días de crecimiento en presencia de 550 µM de ácido sórbico (A) o 1 mM de ácido propiónico (B). C) Porcentaje de cotiledones verdes tras 5 días de crecimiento en presencia de ácidos débiles. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas.

C) El mutante *wat1-1* es sensible a cationes tóxicos:

Debido a la relación existente entre la homeostasis de los diferentes cationes, se continuó con la caracterización fenotípica del mutante, estudiando su fenotipo en presencia de cationes tóxicos, como el litio, o de policationes, como la norespermidina.

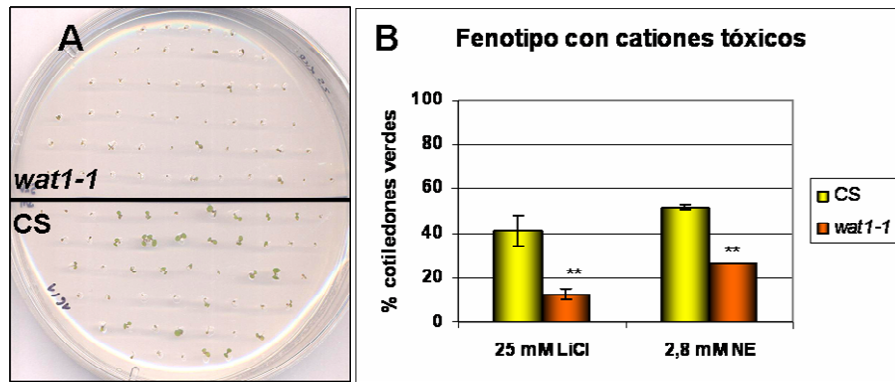


Figura 4.7: Fenotipo del mutante *wat1-1* tras 5 días en medio con cationes tóxicos. **A)** Fotografía mostrando el fenotipo del mutante y el control tras 5 días de crecimiento en medio MS suplementado con 25 mM de LiCl. **B)** Porcentaje de cotiledones verdes del control silvestre y el mutante tras 5 días en medio MS con 25 mM LiCl y MS con 2,8 μ M norespermidina (NE). Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas.

La Figura 4.7 muestra que el mutante es sensible a cationes tóxicas, ya que presenta un menor número de cotiledones verdes en comparación con el control (Figura 4.7A). La cuantificación del fenotipo representada en la Figura 4.7B, muestra que el porcentaje de cotiledones verdes en el mutante es aproximadamente un 30% y un 20% menor que el del control en medio suplementado con litio y norespermidina, respectivamente.

D) El mutante *wat1-1* tolera estrés osmótico:

Continuando con la caracterización fenotípica del mutante, se investigó su fenotipo en presencia de estrés osmótico. Para ello se realizaron ensayos de aparición de cotiledones en presencia de NaCl, ABA y manitol.

A los 5 días de crecimiento en los medios indicados, el mutante presentaba un porcentaje de cotiledones expandidos y verdes aproximadamente un 40% mayor que el control silvestre. Estos resultados indican que *wat1-1* es más resistente a estrés osmótico en los primeros estadios de desarrollo (Figura 4.8).

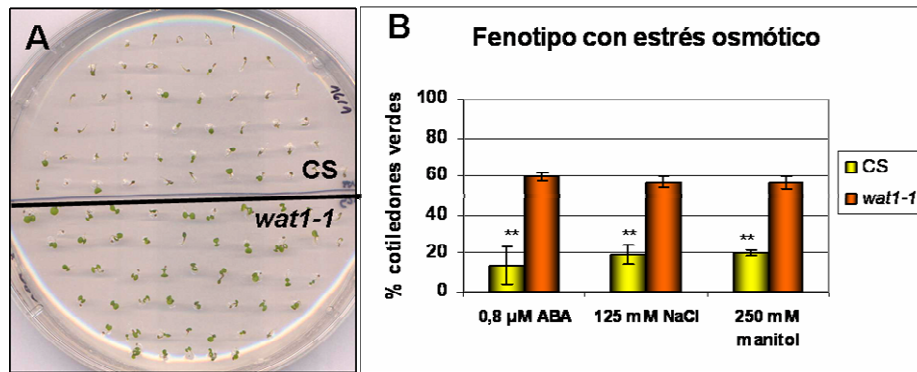


Figura 4.8: Fenotipo del mutante *wat1-1* en presencia de estrés osmótico. A) Fotografía mostrando el fenotipo del mutante y el control tras 8 días de crecimiento en medio MS suplementado con 0,8 µM ABA. B) Porcentaje de cotiledones verdes tras 6 días de crecimiento en presencia de 0,8 µM ABA, 125 mM NaCl y 250 mM manitol. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas.

E) El mutante *wat1-1* es sensible a crecimiento en presencia de bajo potasio:

Considerando la estrecha relación existente entre la salida de protones del interior celular y la entrada de potasio, se analizó el fenotipo del mutante en medio con bajo potasio.

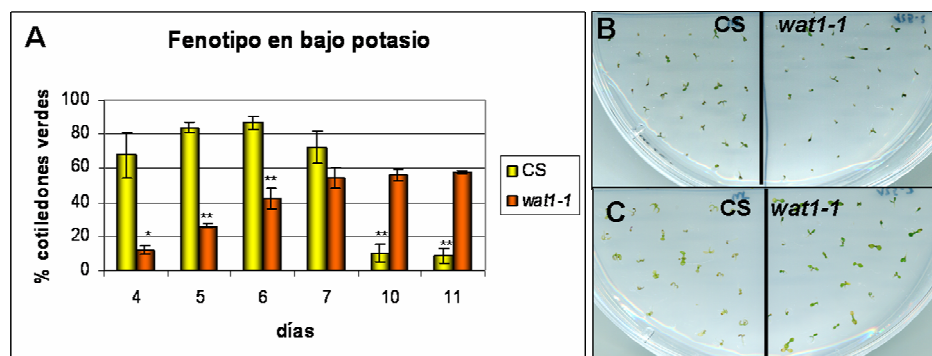


Figura 4.9: Fenotipo en presencia de bajo potasio. A) Porcentaje de cotiledones verdes entre los 4 y 11 días de crecimiento en medio MS sin potasio suplementado con 10 µM de KCl. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas. B) Detalle de las plántulas silvestres y del mutante *wat1-1* a los 5 días de crecimiento en medio sin potasio suplementado con 10 µM de KCl. C) Detalle de las mismas plántulas a los 11 días.

El ensayo de aparición de cotiledones, indica que el mutante abre los cotiledones con retraso en comparación con el control. Además, el número de plántulas totales que logra expandir los cotiledones (aproximadamente un 60%) es menor que en el control silvestre (aproximadamente un 80%). Es decir, el control expande los cotiledones más rápidamente que el mutante y alcanza un número mayor. Sin embargo, con el paso de

los días, los cotiledones de las plántulas control amarillean, mientras que las del mutante lo hacen más lentamente, probablemente debido al retraso en la aparición de los mismos (Figura 4.9).

F) La sensibilidad a litio del mutante *wat1-1* no se debe a una mayor sensibilidad a etileno:

Dado que el litio induce la síntesis de etileno en la célula vegetal (Bueso *et al.*, 2007), se quiso comprobar si la sensibilidad a litio del mutante se relacionaba con una mayor sensibilidad a etileno, una hormona inhibidora de la germinación y del crecimiento.

Para ello, se realizó un ensayo germinando las semillas en oscuridad en presencia o ausencia de ACC, precursor en la síntesis del etileno. En la Figura 4.10 se observa como las plántulas crecidas en oscuridad (MS) muestran un fenotipo etiolado, con un hipocotilo más alargado y hojas de color amarillento. Las plántulas crecidas en presencia de ACC, muestran el fenotipo propio de la triple respuesta a etileno, es decir, un hipocotilo más corto y grueso y un gancho apical. El comportamiento del mutante en ambos medios es similar al de las plantas silvestres, por lo que no parece que el mutante sea más sensible al etileno.

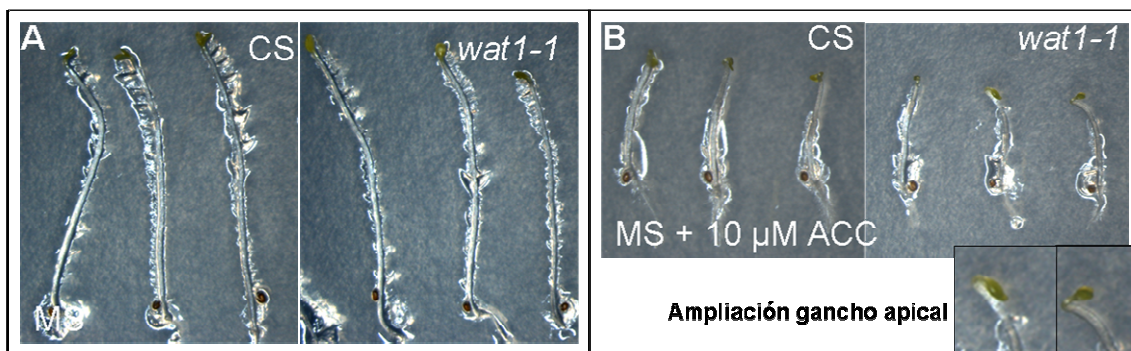


Figura 4.10: Crecimiento del mutante *wat1-1* en presencia de ACC. Plántulas del mutante *wat1-1* y del control silvestre crecidas durante 5 días en oscuridad en medio MS (A) o MS con 10 μ M de ACC (B).

4.2.2 Caracterización fenotípica en plántulas de 15-20 días de edad

A) Fenotipo en medio MS:

Al igual que se realizó en los primeros estadios del desarrollo, se quiso observar el fenotipo del mutante en estadios posteriores, para comprobar si las pequeñas diferencias de tamaño existentes al inicio del desarrollo, se mantienen posteriormente.

Para ello, se midió, en primer lugar, la longitud de la raíz de plántulas crecidas durante 7 días en medio MS en horizontal y transferidas a medio MS vertical durante 3 días. La Figura 4.11A muestra como la longitud de la raíz es significativamente mayor en las plántulas control que en el mutante *wat1-1*. Para determinar si la diferencia en la longitud total se debe a una diferencia inicial existente en la longitud radicular de las plántulas transferidas al medio vertical, o si el crecimiento en el nuevo medio se encuentra reducido en el mutante, se midió el incremento en la longitud de la raíz tras 3 días de crecimiento en vertical. La Figura 4.11B muestra como el incremento en la longitud de la raíz es significativamente mayor en el control silvestre que en el mutante.

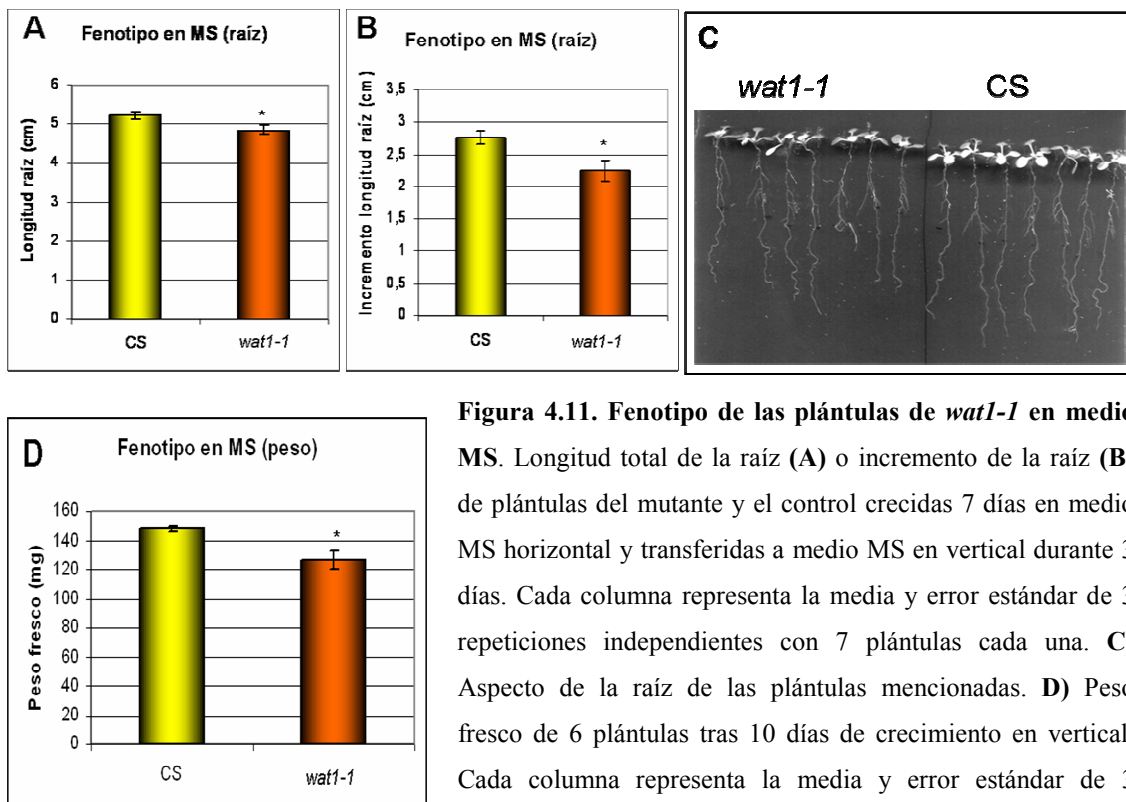


Figura 4.11. Fenotipo de las plántulas de *wat1-1* en medio MS. Longitud total de la raíz (A) o incremento de la raíz (B) de plántulas del mutante y el control crecidas 7 días en medio MS horizontal y transferidas a medio MS en vertical durante 3 días. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes con 7 plántulas cada una. C) Aspecto de la raíz de las plántulas mencionadas. D) Peso fresco de 6 plántulas tras 10 días de crecimiento en vertical. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

Por lo tanto, el crecimiento de la raíz del mutante en medio MS es algo menor que el del control silvestre. Por ello, para poder observar el efecto de las diferentes sustancias tóxicas en los experimentos de medida del crecimiento radicular en distintos medios, se expresarán los resultados en porcentaje, considerando 100% el crecimiento en medio MS control.

Por otra parte, para estudiar el crecimiento de la parte aérea, se pesaron plántulas del control y del mutante tras 10 días de crecimiento en medio MS en vertical. Como se observa en la Figura 4.11D, el peso de las plántulas del control es significativamente mayor que el de las plántulas del mutante. Por lo tanto, el crecimiento del mutante en

condiciones normales es algo menor que el del control. Por este motivo, en los experimentos posteriores en que se determina el peso de las plántulas crecidas en vertical en diferentes medios, los resultados se expresarán en porcentaje con respecto al crecimiento en medio MS, considerado 100%.

B) Las plántulas de *wat1-1* no muestran mejor fenotipo en presencia de ácido acético:

Como se ha descrito anteriormente, el mutante *wat1-1* se aisló por su tolerancia a ácido acético en un rastreo realizado en los primeros estadios de desarrollo. Posteriormente se comprobó que *wat1-1* también presentaba una mayor tolerancia a otros ácidos débiles en las mismas condiciones de ensayo.

Para estudiar en mayor profundidad el fenotipo de tolerancia a ácidos débiles del mutante, se quiso observar su comportamiento una vez superado el estadio de germinación y establecimiento de la plántula. Para ello, se germinaron las plántulas en medio MS y a los 7 días se transfirieron a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ácido acético y se analizó la inhibición del crecimiento provocada por el ácido.

La Figura 4.12A muestra el peso fresco de las plántulas del mutante y del control en los diferentes medios, expresado en porcentaje con respecto al peso fresco en medio MS. Como era esperable, el peso se reduce a medida que se incrementa la concentración de ácido acético, por lo que el ácido está inhibiendo el crecimiento. Esta reducción del crecimiento es similar en el mutante y el control, ya que no hay diferencias significativas entre los pesos de ambos genotipos. En la Figura 4.12B puede observarse como las plántulas crecidas en presencia de 1mM de ácido acético poseen una roseta de menor tamaño y sacan el escapo floral antes que en el medio control, como consecuencia del estrés al que están sometidas. Asimismo, se observa que el crecimiento radicular se inhibe incluso más drásticamente que el de la parte aérea. Los fenotipos son similares en el mutante y en el control silvestre.

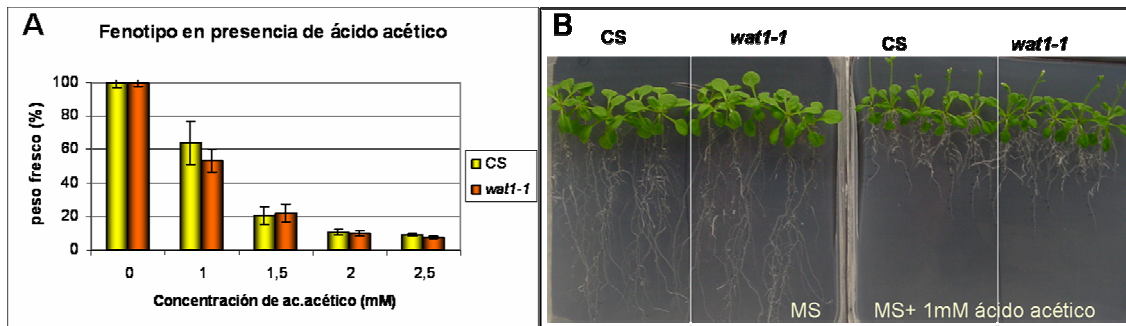


Figura 4.12: Fenotipo de plántulas del mutante *wat1-1* y del control silvestre en medio con ácido acético. A) Peso fresco (expresado en %) de plántulas crecidas en medio MS durante 7 días y pasadas a medio MS con diferentes concentraciones de acético durante 10 días. Cada columna representa la media y error estándar de 4 repeticiones biológicas independientes formadas por 5 plántulas cada una. B) Aspecto de las plántulas del mutante y el control tras 11 días en medio MS suplementado con 1 mM de ácido acético.

A continuación, se quiso analizar en mayor detalle la inhibición del crecimiento de la raíz provocada por el ácido acético (Figura 4.13). En primer lugar, se observa que las concentraciones de acético requeridas para inhibir el crecimiento radicular son mucho menores que las necesarias en la parte aérea. Concretamente, una concentración de 1 mM de ácido acético provoca una reducción del peso fresco de las plántulas menor del 50% (Figura 4.12), mientras que la disminución que causa en la longitud de la raíz es aproximadamente de un 80% (Figura 4.13). Por otro lado, se observa que no existen diferencias significativas entre el mutante y el control silvestre en la inhibición del crecimiento radicular provocada por concentraciones crecientes de ácido acético.

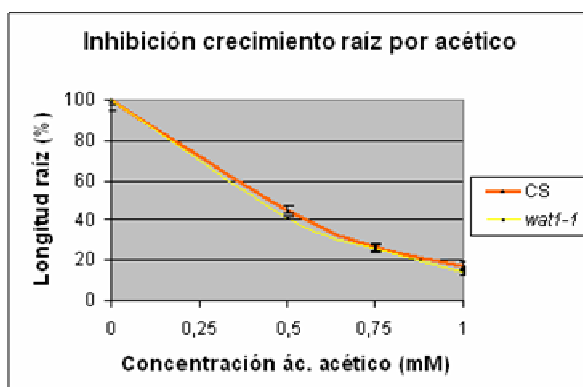


Figura 4.13: Inhibición del crecimiento de la raíz de plántulas del mutante *wat1-1* y del control silvestre en medio con ácido acético. Longitud de la raíz (expresado en % con respecto al medio MS) de plántulas crecidas en medio MS durante 7 días y pasadas a medio MS con diferentes concentraciones de acético durante 10 días. Cada columna representa la media y error estándar de 4 repeticiones biológicas formadas por 10 plántulas cada una.

Los resultados mostrados en las Figuras 4.12 y 4.13, indican que el mutante *wat1-1* no es capaz de mostrar un mejor fenotipo en presencia de ácido acético una vez superado el estadio de germinación y establecimiento de la plántula.

C) Las plántulas del mutante *wat1-1* mantienen un pH citosólico más alcalino en presencia de ácido acético:

Considerando que los ensayos de aparición de cotiledones indican un mejor comportamiento del mutante *wat1-1* en presencia de estrés por ácidos débiles, y que este fenotipo de tolerancia no se mantiene en ensayos realizados en estadios posteriores, se quiso analizar en mayor detalle la homeostasis de pH en el mutante *wat1-1* en respuesta a ácido acético en estadio de plántula. Para ello, se realizaron medidas del pH intracelular en el mutante y el control silvestre en un experimento de perfusión tratando con ácido acético. Este experimento fue realizado por la Dra. Lourdes Rubio en el laboratorio del Prof. Jose A. Fernández (Universidad de Málaga).

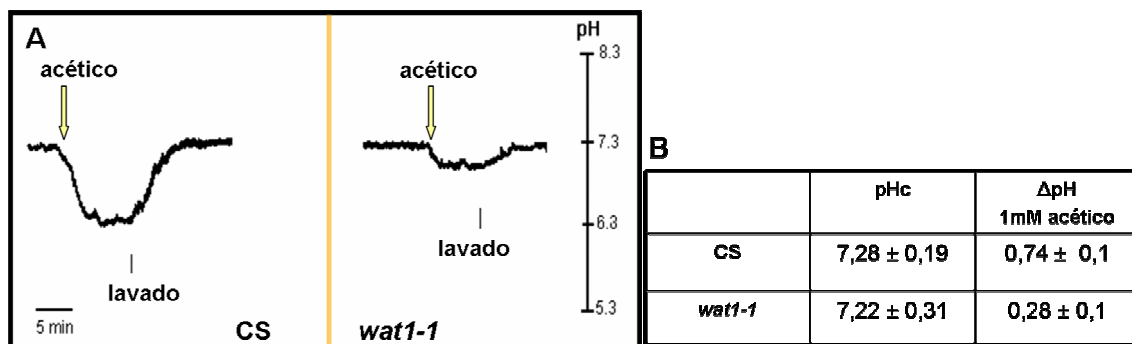


Figura 4.14: Medida del pH citosólico del mutante *wat1-1* y el control con microelectrodos de H⁺. A) La gráfica muestra la variación del pH citosólico de células epidérmicas de la raíz al tratar con 1 mM de ácido acético, y tras su lavado. Las plantas tratadas se cultivaron previamente en medio MS sólido en vertical durante 10-15 días. B) La Tabla muestra los valores de pH del mutante y el control previamente al tratamiento, y la disminución de pH producida al añadir 1 mM de ácido acético. Los datos representan la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

En la Figura 4.14 se observa que el pH inicial (previo al tratamiento con ácido) es similar en el mutante y el control (aproximadamente de 7,3). Al añadir el ácido acético, se observa una clara disminución del pH en el control silvestre, hasta alcanzar un valor aproximado de 6,5. Sin embargo, en el mutante *wat1-1* la reducción del pH tras el tratamiento con acético es mucho menor, aproximadamente un descenso de 0,3 unidades frente a la reducción de aproximadamente 0,75 unidades de pH que ocurre en el control. En ambas líneas, se recuperan los valores iniciales de pH al retirar el acético.

Por lo tanto, este ensayo indica, que el mutante *wat1-1* presenta una alteración en la homeostasis de pH, por la cual es capaz de mantener un pH intracelular más elevado tras un tratamiento breve con ácido acético (10 minutos).

D) Las plántulas de *wat1-1* son más sensibles a bajo potasio:

Para tratar de dilucidar mejor el fenotipo en presencia de bajo potasio observado en germinación y establecimiento de la plántula, se realizó un ensayo de crecimiento en vertical, transfiriendo plántulas previamente germinadas en MS, a medio con bajo potasio.

En la Figura 4.15 se observa como las plántulas del mutante *wat1-1* (tanto la parte aérea como la raíz) tienen un menor tamaño que el control en presencia de bajo potasio. Este fenotipo se cuantificó pesando las plántulas (Figura 4.15B), y expresando el peso en condiciones limitantes de potasio (10 μ M KCl) como porcentaje con respecto al peso en medio con una concentración suficiente de potasio (1 mM KCl). En la Figura 4.15 se observa como en medio con potasio limitante, la reducción en el peso del control es aproximadamente del 65%, mientras que en el caso del mutante, esta disminución supera el 75%. El análisis estadístico indica que estas diferencias resultan significativas con un nivel de confianza del 99,95%. Este ensayo indica, por tanto, que el mutante *wat1-1* es más sensible que el control silvestre al crecimiento en un medio con potasio limitante.

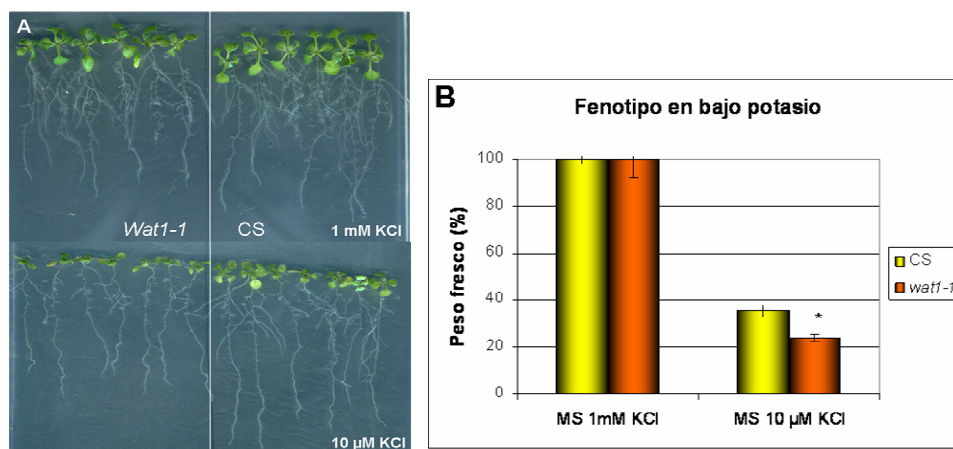


Figura 4.15: Fenotipo de plántulas trasferidas a medio con bajo potasio. A) Aspecto de las plántulas del control y del mutante tras 10 días de ser transferidas desde medio MS a medio sin potasio suplementado con 1 mM o 10 μ M de potasio. **B)** Peso fresco (expresado en %) de las plántulas mostradas en la fotografía anterior. Cada columna representa la media y error estándar de 4 repeticiones biológicas de 7 plántulas cada una.

E) Fenotipo en presencia de ácido abscísico:

Dado que el mutante *wat1-1D*, es menos sensible a la inhibición de la germinación provocada por el ABA, se quiso estudiar, si también muestra cierta insensibilidad a la inhibición del crecimiento en estadios más avanzados del desarrollo.

Para ello, plántulas crecidas en vertical durante 7 días, se transfieren a medio MS con ABA, y se observa la inhibición del crecimiento de la raíz, y de la parte aérea. En la Figura 4.16A, se observa que el crecimiento radicular en presencia de ABA se reduce en un 20% en el caso del mutante, y en un 30% en el caso del control. El análisis estadístico indica que las diferencias son significativas con un nivel de confianza del 99,5%. La Figura 4.16B muestra como las plántulas del control tienen un tamaño algo mayor que las del mutante en medio MS. Sin embargo, en presencia de ABA, el tamaño del mutante y el control es muy similar, e incluso es algo mayor el del mutante. Este fenotipo se cuantificó mediante el peso fresco de las plántulas, que se expresó en porcentaje con respecto al peso en medio MS (Figura 4.16C). Por lo tanto, la sensibilidad del mutante a la inhibición del crecimiento provocada por el ABA en estas condiciones, es menor que la del control.

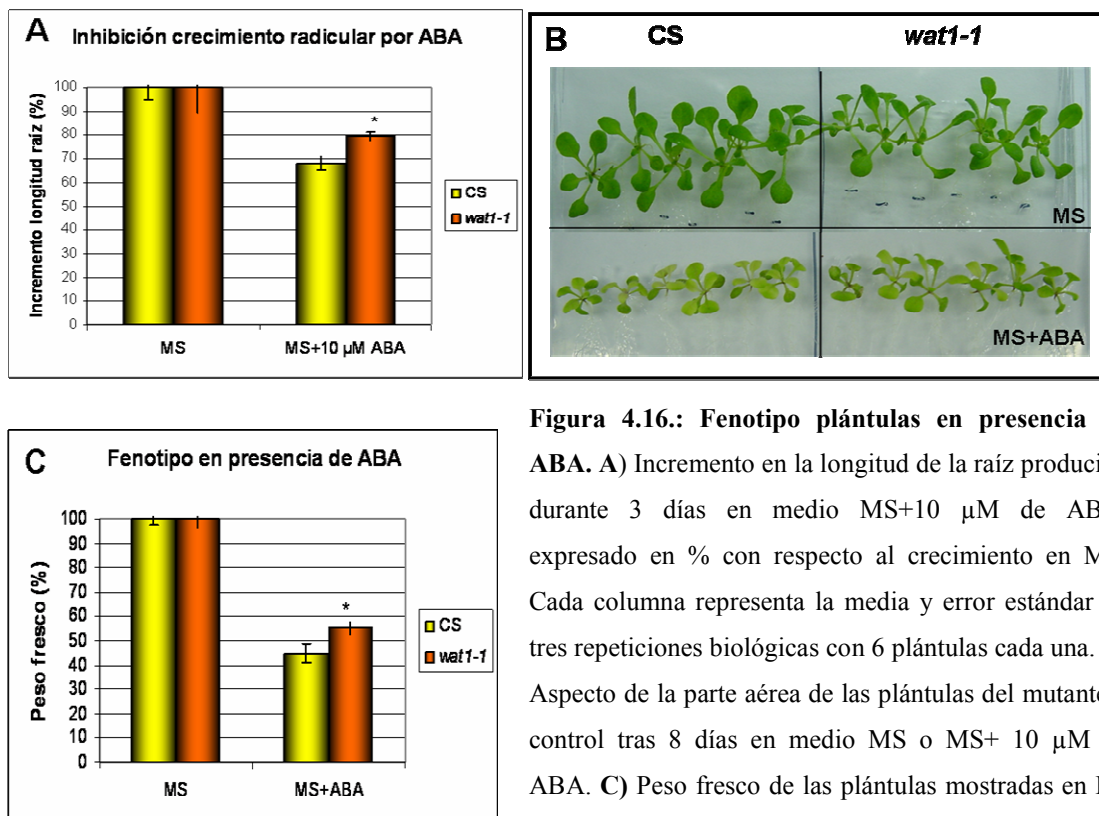


Figura 4.16.: Fenotipo plántulas en presencia de ABA. A) Incremento en la longitud de la raíz producido durante 3 días en medio MS+10 μM de ABA, expresado en % con respecto al crecimiento en MS. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas con 6 plántulas cada una. B) Aspecto de la parte aérea de las plántulas del mutante y control tras 8 días en medio MS o MS+ 10 μM de ABA. C) Peso fresco de las plántulas mostradas en B), expresado en porcentaje con respecto al peso en MS.

Cada columna representa la media y error estándar de 6 muestras formadas por dos plántulas cada una.

4.2.3 Caracterización fenotípica en plantas adultas

A) Fenotipo del mutante *wat1-1* en invernadero

Finalmente, algunos ensayos de caracterización fenotípica se han realizado con plantas crecidas en invernadero. A continuación, se muestra el fenotipo del mutante

wat1-1 al crecer en macetas en condiciones normales, hasta estadios más avanzados de desarrollo.

En la Figura 4.17A se muestra el fenotipo de la roseta del mutante en comparación con el control. Puede observarse que el tamaño de las rosetas del mutante es ligeramente menor que las del control. Este fenotipo se cuantificó mediante el peso fresco de la roseta, que resulta algo menor en el caso del mutante, pero esta diferencia no es significativa estadísticamente. En relación a la parte aérea, la Figura 4.17B muestra como el fenotipo de la inflorescencia del control y el mutante es muy similar. Por lo tanto, las pequeñas diferencias de tamaño observadas entre el mutante y el control creciendo en cultivo *in vitro*, se reducen al crecer las plantas en invernadero hasta completar su desarrollo.

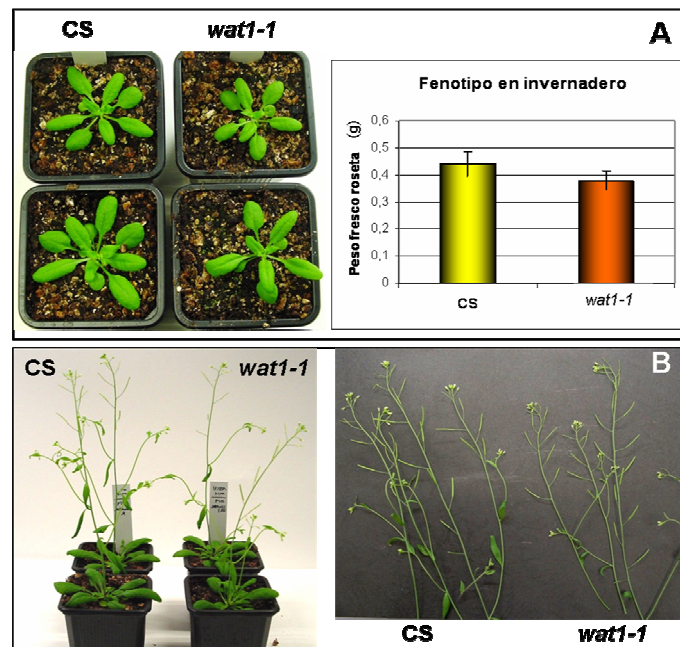


Figura 4.17: Fenotipo del mutante *wat1-1* en invernadero. A) Fenotipo de la roseta del control y del mutante tras 20 días de crecimiento en invernadero. La gráfica muestra el peso fresco de las rosetas. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. **B)** Aspecto de las plantas del mutante y el control (izquierda), y detalle de las inflorescencias (derecha), tras 30 días de crecimiento en invernadero.

B) Fenotipo de sensibilidad a LiCl:

Dado que el mutante *wat1-1* presenta mayor sensibilidad a cationes tóxicos en los primeros estadios de desarrollo, se quiso comprobar si este fenotipo se mantenía en estadios posteriores. Para ello, se regaron plantas del mutante y el control con solución

nutritiva suplementada con cloruro de litio. Concretamente se realizaron dos ensayos, en uno de ellos el riego con cloruro de litio se inició 5 días después del transplante de las plántulas a tierra (riego desde el inicio) y en el segundo tratamiento el riego se inició una vez desarrollada la roseta (riego desde roseta).

En la Figura 4.18A, se observa que en condiciones normales (riego con solución nutritiva), el tamaño de la roseta del mutante y del control es similar, siendo ligeramente menor el del mutante. Asimismo, se muestra que las rosetas de plantas regadas con litio desde el inicio, tienen un menor tamaño que las de plantas regadas con solución nutritiva, siendo esta reducción del crecimiento mayor en el caso del mutante *wat1-1* que en el caso del control silvestre. Para cuantificar este fenotipo, se pesaron las rosetas de cada genotipo y se expresó el peso, en condiciones de estrés por litio, en porcentaje con respecto al peso en condiciones normales. El resultado se muestra en la Figura 4.18B, donde se observa que la reducción del tamaño debida al riego con litio es menor del 20% en el caso del genotipo silvestre, mientras que en el mutante *wat1-1* esa reducción es aproximadamente del 70%. Este resultado indica que el crecimiento del mutante se ve más afectado por el tratamiento con litio que el del control.

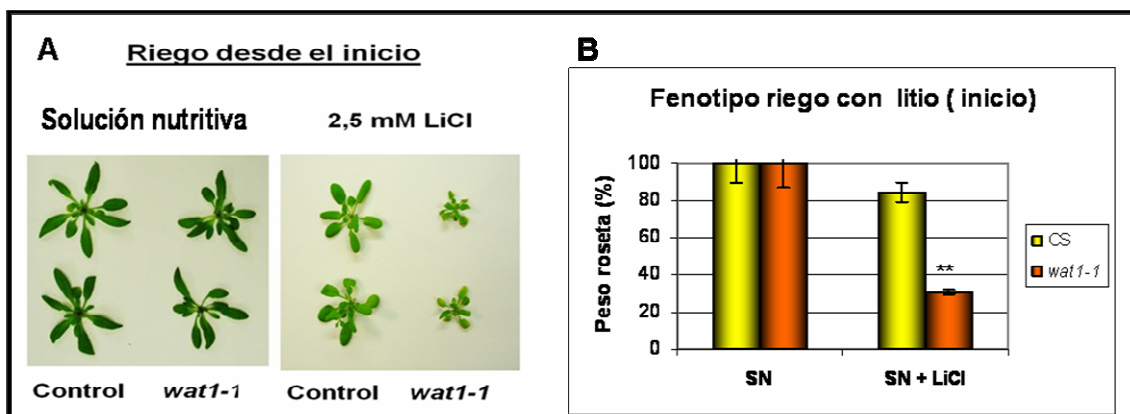


Figura 4.18: Fenotipo del mutante *wat 1-1* y del control silvestre tras el riego con litio iniciado 5 días después del transplante a tierra. Aspecto (A) y peso fresco expresado en % (B), de la roseta de plantas del control silvestre y del mutante *wat1-1* tras 16 días de riego con solución nutritiva (SN), o con solución nutritiva suplementada con 2,5 mM de LiCl (SN+LiCl). Cada columna representa la media y error estándar de 6 repeticiones biológicas.

La Figura 4.19, muestra los resultados del ensayo realizado iniciando el riego una vez desarrollada la roseta.

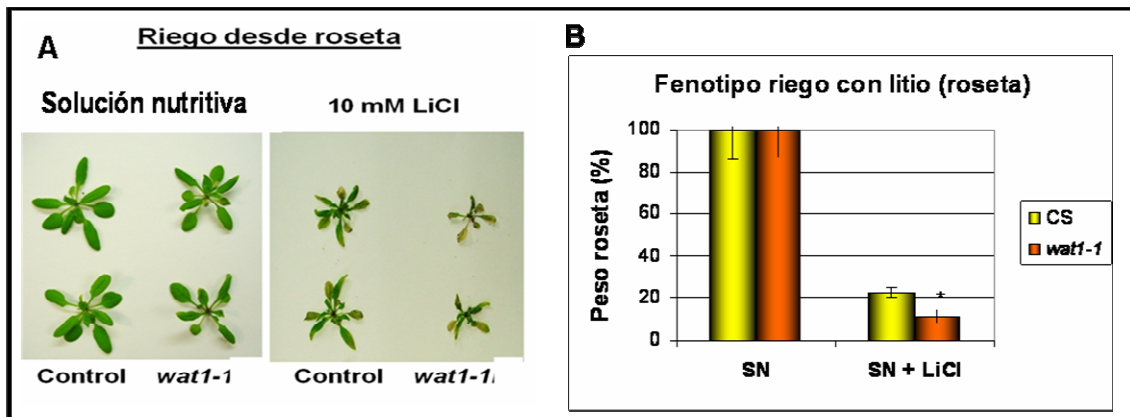


Figura 4.19: Fenotipo de la roseta del mutante *wat1-1* y del control silvestre tras el riego con litio iniciado una vez desarrollada la roseta. Aspecto (A) y peso fresco expresado en % (B), de la roseta de plantas del control silvestre y del mutante *wat1-1* tras 9 días de riego con solución nutritiva (SN), o con solución nutritiva suplementada con 10 mM de LiCl (SN+LiCl). Cada columna representa la media y error estándar de 6 repeticiones biológicas.

En la Figura 4.19A, se observa como las rosetas de las plantas regadas con litio muestran un amarilleamiento, que resulta más severo en el caso del mutante *wat1-1* que en el control. Con respecto al peso de la roseta, en este ensayo la reducción debida al tratamiento con litio resulta muy acusada para ambos genotipos, si bien sigue siendo significativamente mayor en el caso del mutante *wat1-1* (90% frente a 80%) (Figura 4.19B).

En relación a escapeo floral, el riego con litio hace disminuir la longitud del mismo, tanto en el mutante como en el control (Figura 4.20), si bien esta reducción es más acusada en el caso del mutante (60% frente al 40%). Asimismo, algunas de las inflorescencias del mutante presentan un aspecto marchito en condiciones de riego con litio, como se muestra en la Figura 4.20A.

Por lo tanto, estos ensayos indican que la sensibilidad a litio del mutante, observada en los primeros estadios del desarrollo, se mantiene en la planta adulta.

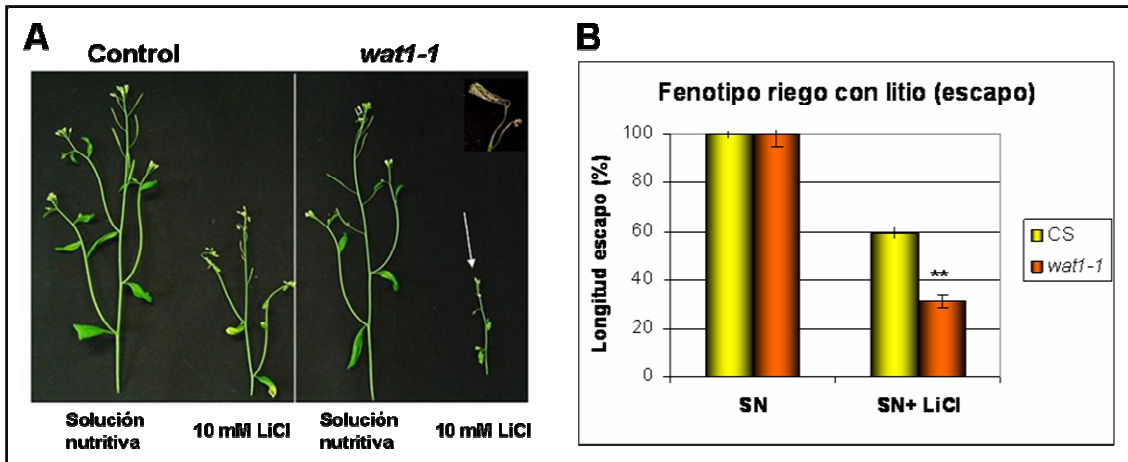


Figura 4.20: Fenotipo del escapo del mutante *wat1-1* y del control silvestre tras el riego con litio iniciado una vez desarrollada la roseta. Aspecto (A) y longitud expresada en % (B), del escapo floral de plantas del control silvestre y del mutante *wat1-1* tras 9 días de riego con solución nutritiva (SN), o con solución nutritiva suplementada con 10 mM de LiCl (SN+LiCl). Cada columna representa la media y error estándar de 6 repeticiones biológicas. La flecha de la Figura 4.20A, señala la inflorescencia del mutante y arriba a la derecha se amplía una inflorescencia marchita.

C) El mutante *wat1-1* es más tolerante al riego con cloruro sódico:

En medio suplementado con cloruro sódico, el mutante *wat1-1D* es capaz de germinar y abrir los cotiledones en mayor medida que el control. Por ello, se quiso comprobar si este fenotipo de tolerancia se mantenía en estadio de planta adulta.

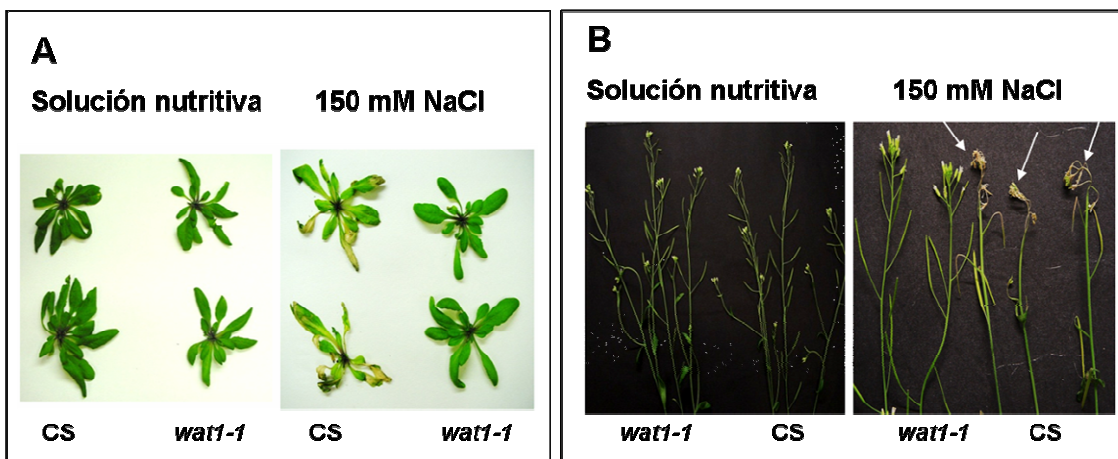


Figura 4.21: Fenotipo del mutante *wat1-1* y del control silvestre tras el riego con sodio iniciado una vez desarrollada la roseta. Aspecto de las rosetas (A) e inflorescencias (B) del mutante y del control tras 8 días de riego con solución nutritiva o con solución nutritiva suplementada con 150 mM de NaCl. Las flechas de la Figura 4.21B señalan las inflorescencias marchitas del control.

Para ello, se realizó un ensayo de riego con cloruro sódico, similar al realizado con litio, iniciando el tratamiento una vez desarrollada la roseta de las plantas. En la Figura 4.21A, se observa como el riego con sodio provoca, tras 8 días, un claro

amarilleamiento y pérdida de turgencia de la roseta de las plantas control, que no se manifiesta en las plantas del mutante. En el caso de la inflorescencia, el resultado es similar, ya que las inflorescencias del mutante se mantienen con un aspecto saludable, mientras que las del control se marchitan tras 8 días de riego con sodio (Figura 4.21B).

Por lo tanto, este ensayo indica que el mutante *wat1-1* es más tolerante al cloruro sódico no sólo durante la germinación y establecimiento de la plántula, sino también en estadios posteriores.

D) Ensayo de pérdida de peso por transpiración:

En ensayos realizados en cultivo *in vitro*, se observó que el mutante *wat1-1* es más tolerante a la germinación en presencia de ácido abscísico y manitol (Figura 4.8). Asimismo, se ha comprobado que las plántulas del mutante muestran cierta insensibilidad a la inhibición del crecimiento provocada por ABA (Figura 4.16).

Dado que el ABA es la principal hormona implicada en el cierre de estomas, la insensibilidad a ABA puede ir asociada a una mayor apertura estomática. Para comprobar si el mutante *wat1-1* presentaba un defecto en el cierre de estomas, se realizó un ensayo de transpiración midiendo pérdida de peso de hojas de roseta de plantas adultas tal y como se describe en el apartado 3.14 de Materiales y Métodos.

Como se muestra en la Figura 4.22A, la pérdida de agua por las hojas (a través de los estomas) queda reflejada en una pérdida de la turgencia de las mismas. Por ello tras las 6 horas de duración del experimento las hojas muestran un aspecto más arrugado. En la Figura 4.22B, se representa el peso fresco de las hojas en porcentaje con respecto al peso inicial, a lo largo de las 6 horas de duración del experimento. La figura muestra como la cinética de pérdida de peso es similar en el mutante y el control. Asimismo se observa que tras las 6 horas el peso de las hojas representa aproximadamente el 30% del peso inicial en ambos genotipos.

Por lo tanto, la insensibilidad parcial que muestra el mutante *wat1-1* a la reducción del crecimiento provocada por ácido abscísico, no correlaciona con una insensibilidad al cierre de estomas, mediado por ABA.

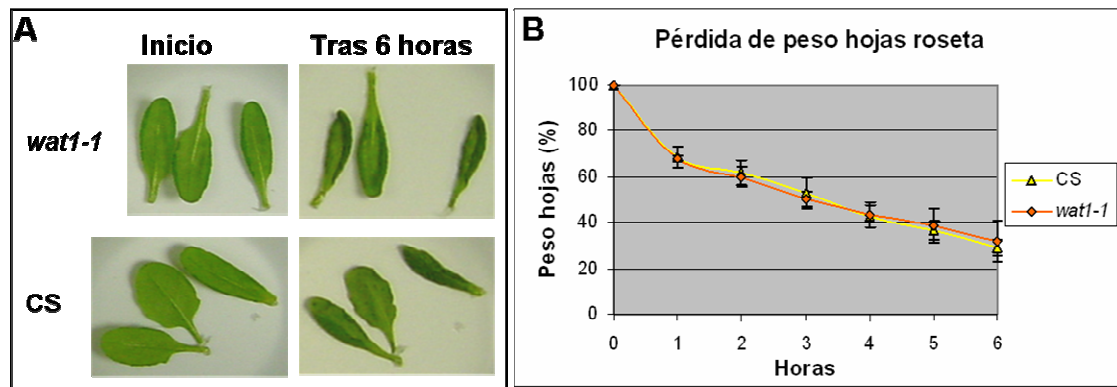


Figura 4.22: Ensayo de transpiración. A) Aspecto de las hojas de roseta al inicio y al finalizar el ensayo. B) Peso de las hojas de roseta, expresado en porcentaje, del mutante *wat1-1* y del control silvestre durante las 6 horas de duración del ensayo. Las barras de error representan el error estándar de 6 muestras independientes, formadas por tres hojas cada una.

4.3 Caracterización genética del mutante *wat1-1*

4.3.1 *wat1-1* presenta una mutación dominante (*wat1-1D*)

Para llevar a cabo la caracterización genética del mutante, en primer lugar se estudió la dominancia o recesividad de la mutación encontrada. Con este objetivo se realizó el cruce entre el genotipo mutante y el silvestre obteniendo la generación F_1 , que se autofecundó para obtener la F_2 . Esta generación, se ensayó en medio MS suplementado con 3,5 mM de ácido acético, comparando su comportamiento con el del mutante *wat1-1* y el del control silvestre.

En la Figura 4.23 se observa como tras 5 días en medio MS con acético, todas las plántulas del mutante ya presentan cotiledones abiertos y verdes, mientras que el control silvestre presenta aproximadamente un 30% de plántulas con cotiledones abiertos. En el caso de la generación F_2 el porcentaje de plántulas con cotiledones abiertos es aproximadamente de un 70%. A pesar de la dificultad que conlleva este análisis (por que la sensibilidad del control no es del 100%), este resultado parece indicar que el fenotipo de resistencia a ácido *wat1-1* se debe a una única mutación dominante, ya que la segregación en la F_2 se asemeja al modelo 3:1 (resistente: sensible). Por ello, a partir de aquí el mutante se denominará *wat1-1D*.

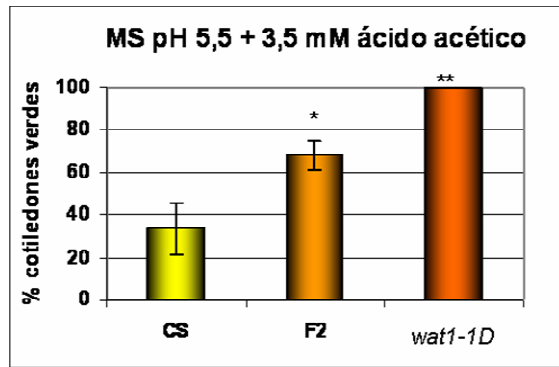


Figura 4.23: La mutación estudiada es dominante. La figura muestra el porcentaje de cotiledones verdes del control silvestre, el mutante *wat1-1* y la generación F₂, tras 5 días de crecimiento en medio MS suplementado con 3,5 mM de ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

4.3.2 La tolerancia a acético del mutante correlaciona con la inserción de T-DNA

Con este análisis de cosegregación, se pretende determinar si el fenotipo de tolerancia a ácido acético del mutante se debe a la presencia del T-DNA en su genoma, o si es el resultado de cualquier otra mutación ocurrida por azar.

Para ello, se seleccionaron plántulas de la generación F₂ tolerantes a ácido acético y se comprobó por PCR si todas ellas presentaban la inserción de T-DNA. De 24 individuos analizados, 23 de ellos presentaban el T-DNA, por lo que se concluyó que la mutación sí está ligada a la inserción de T-DNA (Figura 4.24). El individuo que no tenía la inserción fue un falso positivo, como consecuencia de no trabajar con un fenotipo cualitativo de resistencia o sensibilidad total.

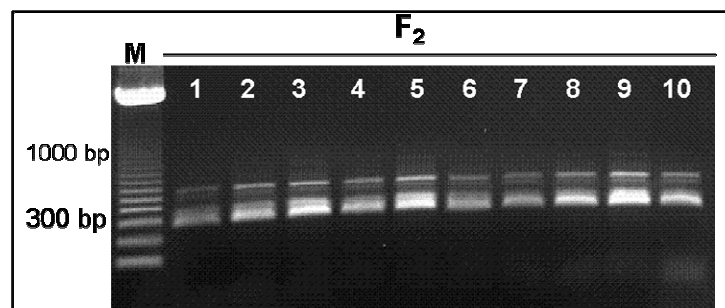


Figura 4.24: Análisis de cosegregación entre fenotipo y T-DNA. Se muestra una PCR con primers que amplifican el activador 35S del CaMV de 11 individuos de la generación F₂, seleccionados por su resistencia en medio con 4 mM de ácido acético. M=marcador de tamaño 100bp. Las dos bandas que aparecen corresponden a la amplificación de 1 copia (≈300bp) o dos copias en tandem (≈600bp) del activador 35S, presente en el T-DNA.

4.3.3 Localización de la inserción de T-DNA en el mutante *wat1-1D*

Con el objetivo de localizar la inserción del T-DNA en el genoma del mutante, se llevó a cabo el rescate plasmídico, tal y como se describe en el apartado 3.7.5 de Materiales y Métodos.

Como resultado del rescate plasmídico, se obtuvo la secuencia flanqueante a la inserción del T-DNA, y tras un análisis bioinformático, se determinó la posición exacta de la inserción en el genoma del mutante. Como se muestra en el esquema de la Figura 4.25, el T-DNA se localiza en la posición 51062 del BAC T22E16, perteneciente al cromosoma tres. Esta región, corresponde a un intrón del gen At3g55480. Este gen está anotado en el genoma de *A. thaliana* como un gen perteneciente a la familia de las adaptinas, y el gen más cercano (At3g55470), es una proteína con dominio C2 (dominio de unión a lípidos de forma dependiente de calcio), de función desconocida.

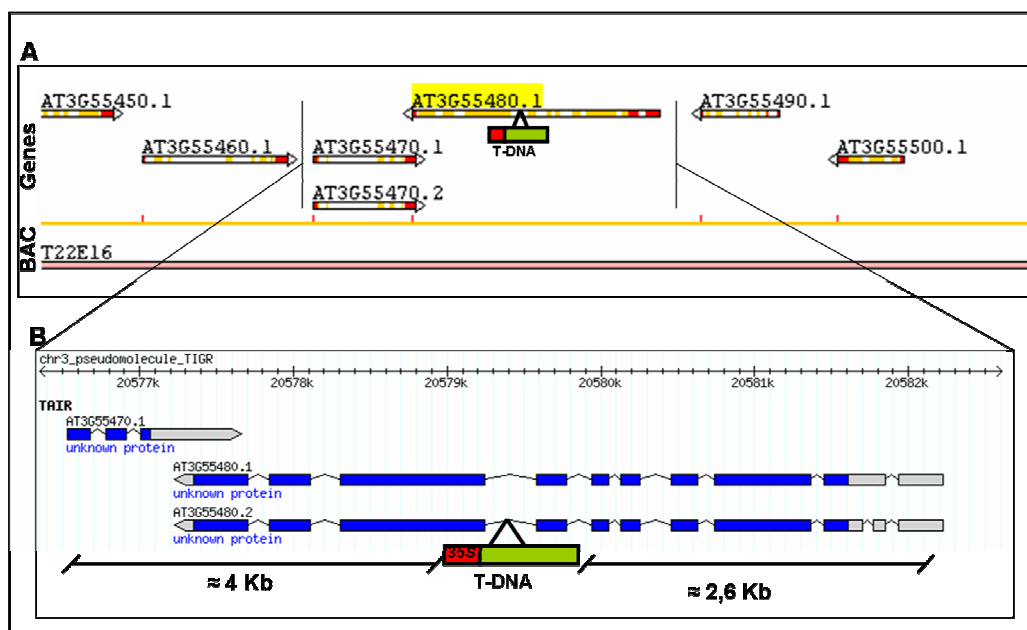


Figura 4.25: Localización de la inserción de T-DNA en el genoma de *A. thaliana*. A) El esquema indica la situación del T-DNA en el gen At3g55480 perteneciente al BAC T22E16. B) Ampliación de la región donde se inserta el T-DNA. Se muestra la posición del T-DNA en un intrón del gen At3g55480 y la distancia a los promotores de los genes adyacentes. El locus At3g55480 muestra presenta dos formas de “*splicing*” alternativo (ver apartado 4.6).

4.3.4 Análisis de expresión de los genes adyacentes al T-DNA

Una vez localizada la inserción del T-DNA en el genoma del mutante, se determinó cómo afectaba dicha inserción a la expresión de los genes más cercanos:

At3g55480 y At3g55470. Para ello se realizó un análisis “*Northern blot*” con una sonda para el gen At3g55470 y dos sondas (antes y después de la inserción de T-DNA) para el gen At3g55480.

En la Figura 4.26, se observa como el gen At3g55470 está sobreexpresado en el mutante *wat1-ID*. Por lo que respecta al gen At3g55480, el mutante sobreexpresa una versión truncada del mismo, ya que con la sonda localizada antes de la inserción (sonda 2) es posible ver una banda de menor tamaño y más intensa que en el control silvestre, mientras que con la sonda 1 (tras la inserción de T-DNA), no se observa expresión del gen en el mutante.

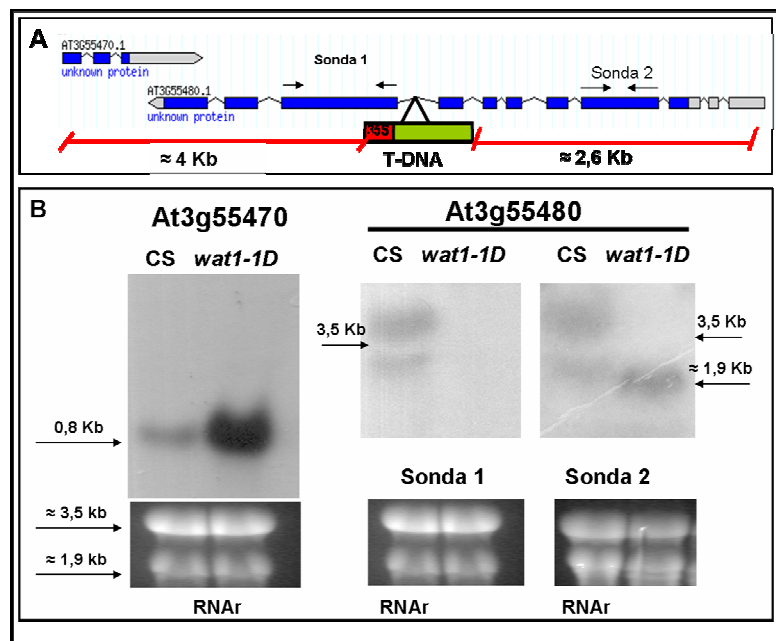


Figura 4.26: Análisis “*Northern blot*” de los genes adyacentes al T-DNA. A) Localización de la inserción del T-DNA y de las sondas empleadas para el análisis “*Northern blot*”. B) Análisis “*Northern blot*” de los genes At3g55470 y At3g55480 en el mutante *wat1-ID* y el control silvestre. En el caso del gen At3g55480, aparecen dos bandas en el control, porque el RNAr, debido a su abundancia, dificulta la hibridación de la sonda a 3,5 Kb. RNAr: RNA ribosómico.

Tras este análisis, fue necesario dilucidar si los fenotipos del mutante *wat1-ID* se deben a la ganancia de función del gen At3g55470, o a la expresión de una versión truncada del gen At3g55480.

4.4 Los fenotipos del mutante *wat1-1D* no se deben a la sobreexpresión del gen At3g55470

Dado que la mutación de *wat1-1D* tiene un carácter dominante, parecía muy posible que sus fenotipos se debieran al aumento de la expresión del gen At3g55470 (una proteína con dominio C2) observado en el mutante. Para comprobar si, en efecto, el incremento en la expresión de este gen era responsable la tolerancia a ácidos débiles que muestra *wat1-1D* durante la germinación y establecimiento de la plántula, se analizó el fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes de inserción de T-DNA en dicho gen (pérdida de función) y de plantas transgénicas sobreexpresándolo (ganancia de función).

4.4.1 Fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes de pérdida de función del gen At3g55470

En la Figura 4.27A se muestra la localización del T-DNA en los dos mutantes de inserción de T-DNA en el gen At3g55470 solicitados al NASC (descritos en el apartado 3.1.1 de materiales y métodos). Como puede observarse en la figura, en ambos casos el T-DNA se sitúa en un intrón de dicho gen. Esta inserción provoca una reducción parcial del nivel de expresión del gen en el mutante *m470-2* (Figura 4.27B) y una pérdida de función aparentemente total en el mutante *m470-1* (Figura 4.27C).

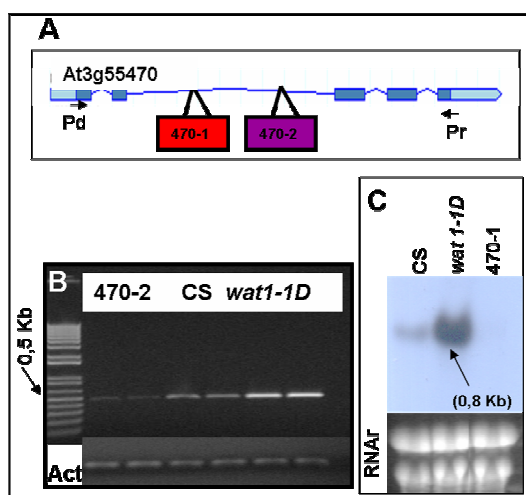


Figura 4.27: A) Localización de la inserción de T-DNA en los mutantes *m470-1* y *m470-2*. La figura muestra también la posición de los cebadores empleados para la RT-PCR (B) y para realizar la sonda del northern (C). Pd= “primer” directo; Pr= “primer” reverso. **B) RT-PCR para analizar la expresión del gen At3g55470 en el mutante *m470-2*.** Se realizaron 2 repeticiones para cada genotipo. Act=actina8 **C) Northern mostrando la expresión del gen At3g55470 en el mutante *m470-1*.** Entre paréntesis se indica el tamaño de la banda obtenida.

Una vez comprobada la pérdida de función (parcial o total) del gen At3g55470 en los mutantes de inserción de T-DNA, se analizó su fenotipo en presencia de ácido

acético mediante un ensayo de aparición de cotiledones. Si el fenotipo de tolerancia a ácido acético de *wat1-1D* era debido a la sobreexpresión del gen At3g55470, era de esperar que estos mutantes mostraran cierta sensibilidad a este ácido.

Sin embargo, en la Figura 4.28 se observa como el porcentaje de cotiledones verdes de los mutantes entre los 4 y 6 días es muy similar al del control silvestre, es decir, los mutantes no muestran una mayor sensibilidad a acético.

Este resultado podría significar que la tolerancia a acético del mutante no se debe a la sobreexpresión del gen At3g55470. Sin embargo, también podría ocurrir, que exista cierta redundancia génica, de modo que otro gen (similar a At3g55470) sea capaz de realizar la función del gen At3g55470 y reemplazarlo cuando este gen se encuentra mutado.

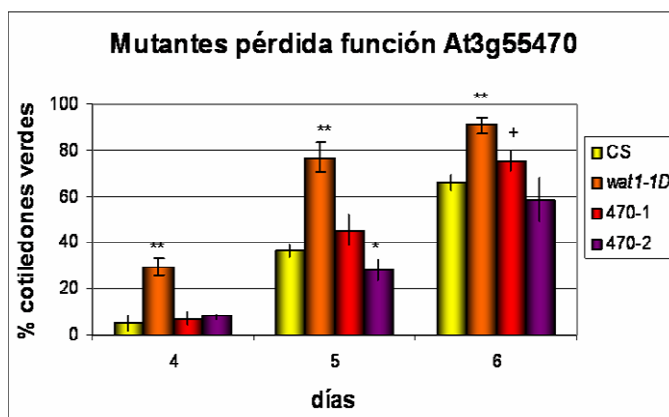


Figura 4.28: Fenotipo en acético de los mutantes de pérdida de función del gen At3g55470. Porcentaje de cotiledones verdes entre los 4 y 6 días de crecimiento en medio MS suplementado con 3,5 mM de ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones independientes.

4.4.2 Fenotipo en presencia de ácido acético de plantas transgénicas sobreexpresando el gen At3g55470

Para poder descartar con seguridad la implicación del gen At3g55470 en el fenotipo del mutante *wat1-1D*, fue necesario obtener plantas transgénicas que sobreexpresaran dicho gen y analizar si eran capaces de recapitular el fenotipo de tolerancia a ácido acético del mutante *wat1-1D*.

En la Figura 4.29A, se muestra cómo dos líneas transgénicas homocigotas (generación T4), efectivamente sobreexpresan el gen At3g44570. Sin embargo, en un ensayo de aparición de cotiledones no muestran mayor tolerancia a acético que el control silvestre (B). Del mismo modo, el comportamiento de las líneas transgénicas sobreexpresando el gen At3g55470 en otros medios (bajo potasio, cloruro de litio, ácido abscísico o cloruro sódico), es diferente al del mutante *wat1-1D* (datos no mostrados).

Estos resultados indican que los fenotipos del mutante aislado (*wat1-1D*) no son provocados por el aumento de expresión del gen At3g55470.

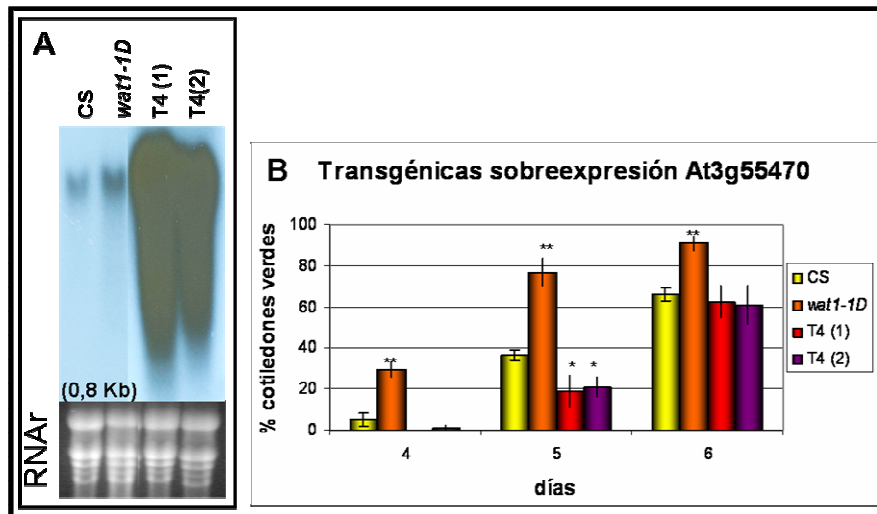


Figura 4.29: A) Northern indicando los niveles de expresión del gen At3g55470 en el mutante *wat1-1D*, el control silvestre y dos líneas transgénicas sobreexpresando dicho gen. B) Porcentaje de cotiledones verdes del control, el mutante *wat1-1D* y dos líneas transgénicas en medio MS suplementado con 3,5 mM de ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones independientes.

4.5 Los fenotipos del mutante *wat1-1D* se deben a la sobreexpresión de una adaptina truncada

Una vez descartada la implicación del gen At3g55470 en el fenotipo del mutante *wat1-1D*, se comprobó si era la expresión de una forma truncada de At3g55480 (una beta adaptina), lo que provocaba los fenotipos observados. Con este fin, se construyeron 2 tipos de plantas transgénicas: plantas sobreexpresando la versión truncada de At3g55480 y plantas antisentido para dicho gen.

4.5.1 Fenotipos de plantas sobreexpresando una versión truncada de At3g55480

Una vez obtenidas las plantas transgénicas (generación T3) sobreexpresando la versión truncada de At3g55480 (Figura 4.30A), se realizaron ensayos de aparición de cotiledones en diferentes medios, para observar si los fenotipos de estas plantas transgénicas coinciden con los del mutante *wat1-1D*.

En la Figura 4.30, se observa, en primer lugar, que las plantas transgénicas, en presencia de ácido acético, son capaces de abrir los cotiledones a los 5 días, en mayor medida que el control silvestre, al igual que ocurre en el caso del mutante *wat1-ID*. Asimismo, de forma similar al mutante, las transgénicas muestran mayor sensibilidad a litio y a medio con bajo potasio. Sin embargo, en presencia de NaCl o ABA en el medio, las líneas transgénicas muestran una mayor tolerancia, en este estadio.

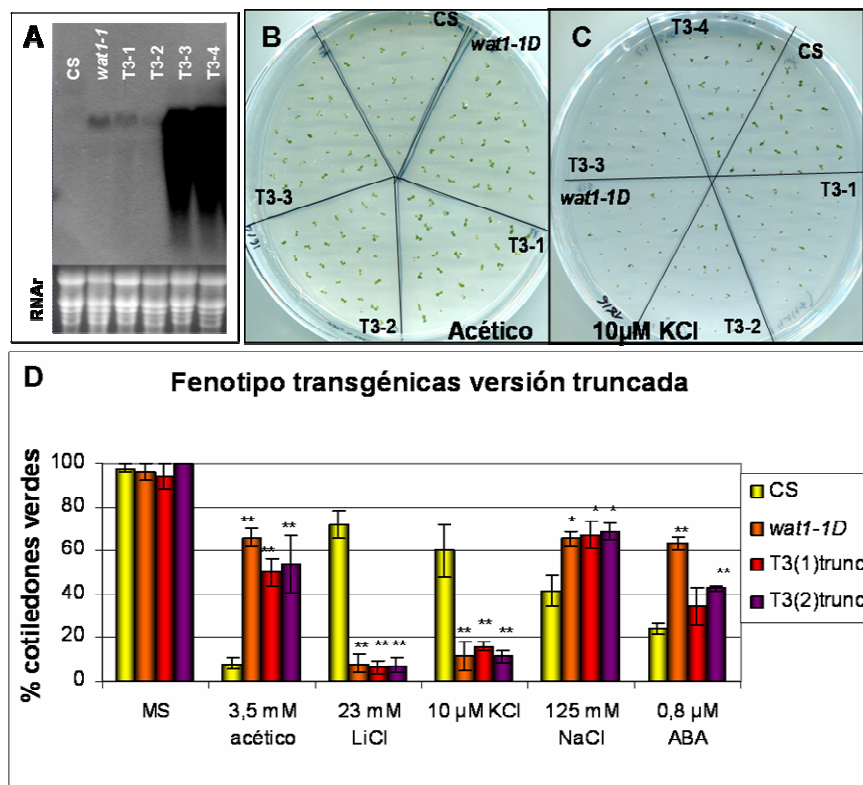


Figura 4.30: Fenotipos de líneas transgénicas sobreexpresando la versión truncada del gen *At3g55480*. A) Análisis “Northern blot” mostrando la expresión de la versión truncada en el mutante *wat1-D* y en diferentes líneas de sobreexpresión. B) Fenotipo del mutante *wat1-ID*, el control silvestre y 3 líneas transgénicas tras 5 días en medio MS+3,5mM ácido acético. C) Fenotipo del mutante, el control y 4 líneas transgénicas tras 5 días en medio con bajo potasio (10 μM). C) Porcentaje de cotiledones verdes del mutante, el control silvestre y 2 líneas transgénicas tras 5 días en medio MS, MS con acético, MS con litio, o medio con 10 μM KCl, y tras 7 días en medio MS con NaCl o ABA. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

Estos resultados indican que los fenotipos del mutante *wat1-ID* se deben a la expresión de una versión truncada de la beta adaptina 3 codificada por el gen *At3g55480* interrumpido.

4.5.2 Fenotipos de plantas transgénicas antisentido para el gen *At3g55480*

La expresión de una versión truncada de un gen, no siempre provoca una pérdida de función de dicho gen sino que también puede causar un incremento en la actividad de la proteína, por ejemplo si se elimina un dominio inhibidor (Palmgren & Christensen 1993; Gevaudant *et al.*, 2007). Para poder determinar si la versión truncada de gen *At3g55480* provocaba una ganancia de función, o una pérdida de función de la adaptina, se analizó el comportamiento de líneas transgénicas antisentido en el gen *At3g55480*.

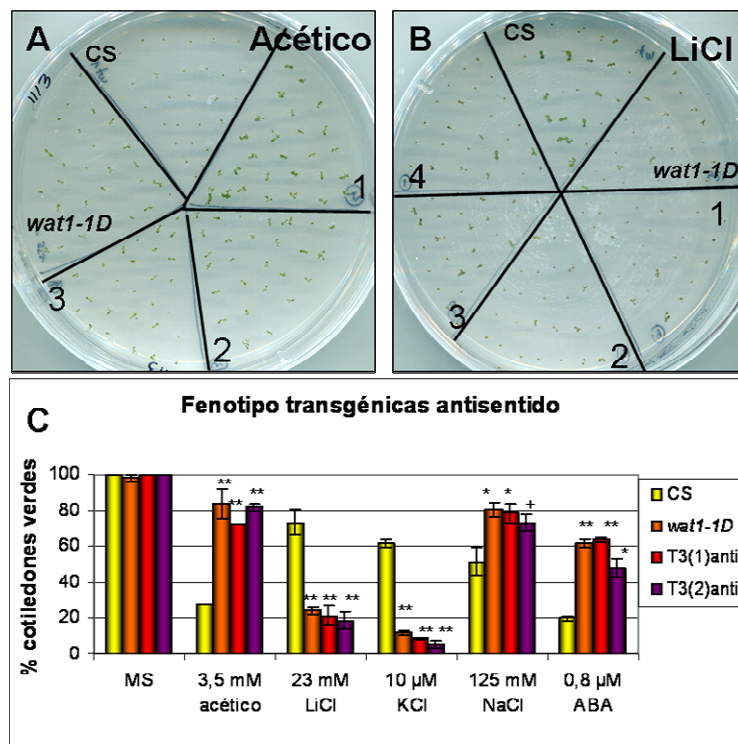


Figura 4.31: Fenotipos de líneas transgénicas antisentido para el gen *At3g55480*. A) Fenotipo del mutante *wat1-1D*, el control silvestre y tres líneas transgénicas tras 5 días en medio MS+3,5 mM ácido acético. B) Fenotipo del mutante, el control silvestre y 4 líneas transgénicas en medio MS+23 mM LiCl. C) Porcentaje de cotiledones verdes del mutante, el control silvestre y 2 líneas transgénicas tras 5 días en medio MS, MS con acético, MS con litio, o medio con 10 μM KCl, y tras 7 días en medio MS con NaCl o ABA. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

La Figura 4.31 muestra como, en ensayos de aparición de cotiledones, las líneas transgénicas tienen fenotipos muy similares al mutante *wat1-1D*, en presencia de ácidos

débiles, cationes tóxicos, bajo potasio y estrés osmótico. Estos resultados indican que los fenotipos del mutante *wat1-ID* se deben a la pérdida de función del gen At3g55480, provocada por expresar una versión truncada de dicho gen. Es decir, *wat 1-ID* es un mutante dominante negativo.

4.5.3 El mutante *wat1-ID* presenta fenotipos similares al mutante *pat2*

Como se comentó en la introducción, recientemente se ha caracterizado un mutante recesivo de pérdida de función en la adaptina $\beta 3$ de *A. thaliana* (At3g55480) que se ha denominado *pat2* (Feraru *et al.*, 2010). Los autores describen, que en condiciones normales de crecimiento, el mutante muestra un fenotipo prácticamente normal. Sin embargo, en medio sin sacarosa, el porcentaje de plántulas “arrestadas” (que germinan y presentan cotiledones pero quedan de color amarillento y con un tamaño muy reducido), que se incrementa con el tiempo de almacenamiento de las semillas, es mayor en el mutante *pat2* que en su control. Asimismo, si se dejan crecer las plántulas que han germinado normalmente, en medio sin sacarosa, el número de raíces secundarias que se forman en el mutante *pat2*, es menor al formado en el genotipo silvestre. Finalmente, indican que *pat2* posee un defecto en la respuesta gravitrópica de la parte aérea.

Para corroborar que los fenotipos del mutante *wat1-ID* se deben a la pérdida de función de la adaptina $\beta 3$, se comprobó, si este mutante se comportaba de forma similar al mutante *pat2* al crecerlo en medio sin sacarosa. La Figura 4.32 (A y B) muestra el aspecto de las plántulas del mutante *wat1-ID* y del control silvestre en medio MS (A) y medio MS sin sacarosa (B). Es posible observar como la germinación y establecimiento de las plántulas del mutante *wat1-ID* es muy similar al del control en medio con sacarosa. Al eliminar la sacarosa del medio (B), se observa que algunas de las plántulas del control quedan pequeñas y amarillentas (arrestadas). Sin embargo, la presencia de plántulas arrestadas es considerablemente mayor en el caso del mutante. En la Figura 4.32C, que muestra la cuantificación de este fenotipo, se muestra que el porcentaje de plántulas no arrestadas en el mutante es únicamente del 20%, mientras que en el control alcanza un 40%. Respecto al crecimiento radicular, la Figura 32D muestra como el número de raíces secundarias que forma el control silvestre tras 11 días en medio MS sin sacarosa es mayor que el que aparece en el mutante *wat1-ID*.

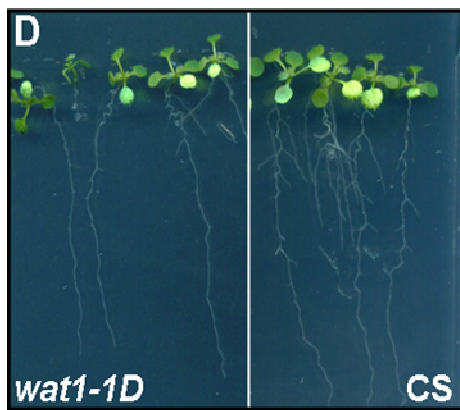
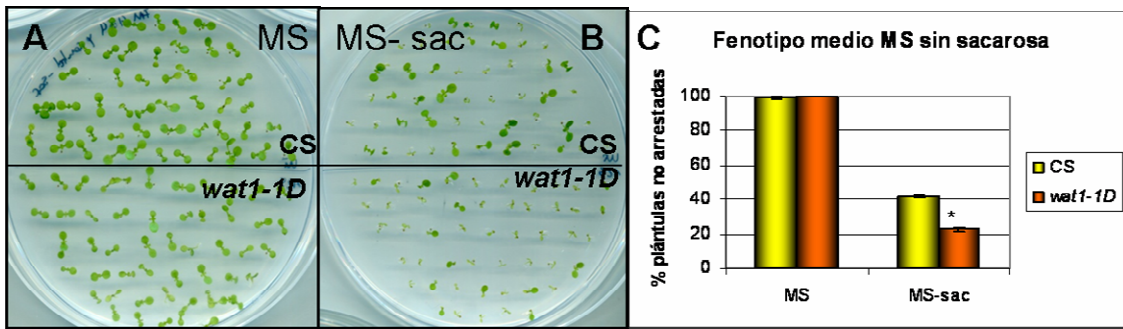


Figura 4.32: Fenotipo del mutante *wat1-1D* en medio sin sacarosa. Aspecto de plántulas del mutante y del control tras 7 días en medio MS (A) o medio MS sin sacarosa (B). C) Porcentaje de plántulas no arrestadas del mutante y del control tras 7 días en medio MS y medio MS sin sacarosa. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes. D) Aspecto de las raíces de las plántulas no arrestadas tras 10 días en medio MS sin sacarosa.

Por otro lado, se analizó la respuesta del mutante *wat1-1D* tras someterlo a un estímulo gravitópico, tal y como se especifica en el apartado.3.11 de materiales y métodos.

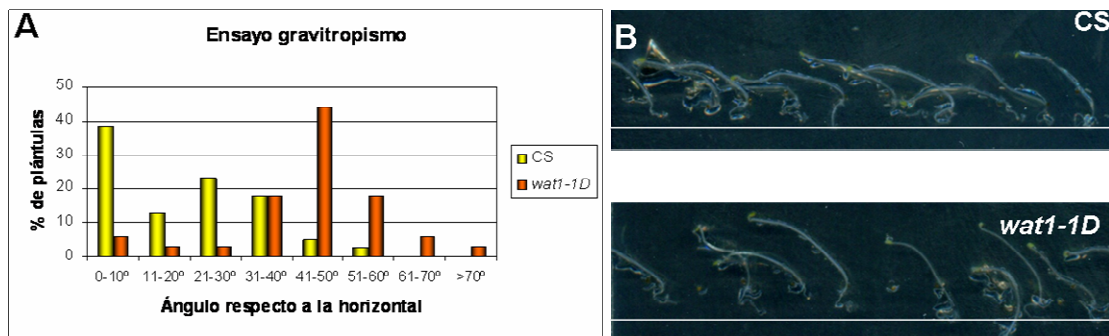


Figura 4.33: Respuesta gravitópica de la parte aérea del mutante *wat1-1D*. Las plántulas del mutante y el control se cultivaron en oscuridad en placas verticales durante 2 días antes de girarlas 90°. Posteriormente se mantuvieron 2 días más en esta posición. Tras esos 2 días, se observó y cuantificó el ángulo generado por el hipocotilo de cada plántula con respecto a la horizontal (n=40 plántulas). B) Aspecto de las plántulas del mutante y control silvestre tras ser sometidas al estímulo gravitópico.

En la Figura 4.33B, se muestra como la mayoría de las plántulas del control responden al estímulo gravitrópico, siendo el ángulo que forman con respecto a la horizontal menor que el que forman las plántulas del mutante. Concretamente, el 40% de las plántulas del control forman un ángulo de entre 0 y 10°. En el caso del mutante, la mayoría (aproximadamente el 45%) forman un ángulo de entre 41 y 50° con la horizontal. Estos datos indican que, efectivamente, el mutante *wat1-ID* presenta un defecto en la respuesta gravitrópica, de forma similar a lo observado para el mutante *pat2*.

Los resultados mostrados corroboran, por tanto, que el mutante *wat1-ID* presenta una pérdida de función de la adaptina $\beta 3$. Por eso, a partir de este punto, el gen At3g55480 se denominará *WAT1*.

4.6 Análisis bioinformático del locus At3g55480

Una vez comprobado que el fenotipo del mutante *wat1-ID* es debido a la pérdida de función del gen At3g55480, se estudió con más detalle el locus en cuestión.

En la base de datos TAIR de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org), este locus está anotado como una proteína de la familia de las adaptinas, involucrada en el transporte intracelular de proteínas mediado por vesículas. Concretamente, parece ser una beta adaptina que forma parte del complejo “*Adaptor Protein complex 3*” (AP3). Como se explicó en la introducción, este complejo parece estar involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola.

En la misma base de datos, indican que existen dos formas de “*splicing*” alternativo para este gen: At3g55480.1 y At3g55480.2. Estas dos formas de “*splicing*” se distinguen en la longitud del 5'UTR (más largo en la forma At3g55480.1), y en que la forma At3g55480.2 tiene un intrón más al principio del gen. Como se observa en la Figura 4.34, la forma At3g55480.2 dará lugar a un fragmento de proteína adicional en el extremo N-terminal, que podría llevar señales de localización.



Figura 4.34: Representación esquemática de los intrones y exones de las dos formas de “*splicing*” del gen At3g55480.

4.6.1 Análisis de expresión del gen *WAT*

Para determinar el patrón de expresión del gen *WAT*, se utilizó la base de datos GENEVESTIGATOR (www.genevestigator.ethz.ch/at/index.php) y se analizó la expresión del gen en los diferentes órganos de la planta, en los distintos estadios de desarrollo y en respuesta a diferentes estímulos.

En primer lugar, se observó que el gen se expresa en los diferentes órganos de la planta (inflorescencia, roseta, raíz) de forma bastante similar, si bien la expresión es algo mayor en raíz. (Figura 4.35).

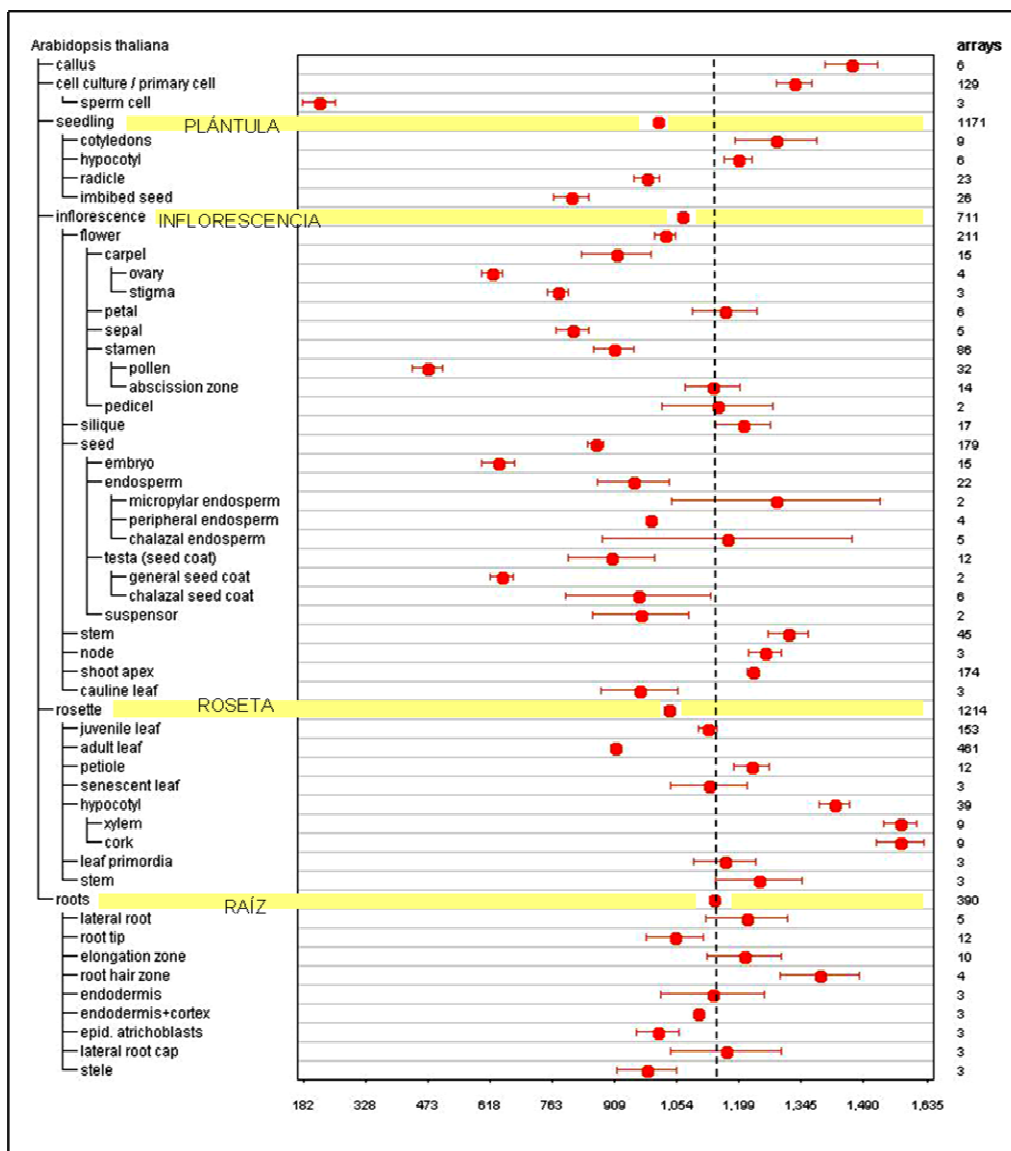


Figura 4.35: Nivel de expresión del gen *At3g55480* en los diferentes tejidos y órganos de la planta, de acuerdo a la base de datos del GENEVESTIGATOR. A la derecha se indican el número de micromatrices de los que proviene la información suministrada.

Por otro lado, la expresión del gen varía a lo largo del desarrollo de la planta, aumentando desde la germinación de la semilla hasta el estadio de roseta joven. Pasado este estadio, la expresión del gen disminuye y se mantiene a niveles más bajos (aunque con altibajos) en las restantes etapas del desarrollo de la planta (Figura 4.36).

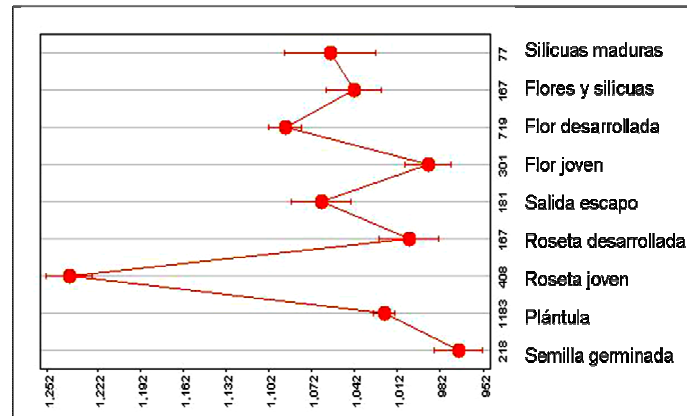


Figura 4.36: Niveles de expresión del gen At3g55480 en diferentes etapas del desarrollo de la planta, de acuerdo a la base de datos del GENEVESTIGATOR.

Finalmente, por lo que respecta a la respuesta a estímulos, únicamente destacar que el gen *WATI* no varía su expresión en respuesta a la mayoría de estímulos (Anejo II), y en los casos en que varía la expresión los cambios son reducidos. Es decir, este gen se expresa bastante constitutivamente y no en respuesta a un estímulo en concreto.

Por otro lado, se quiso profundizar en el patrón de expresión del gen At3g55480 en la raíz (órgano que se encuentra en contacto directo con el ácido). Para ello, se empleó la herramienta “*electronic Fluorescent Pictograph (eFP) Browser*” disponible en la página web <http://www.bar.utoronto>. Esta herramienta, parte de bases de datos de micromatrices y muestra los resultados de forma gráfica. En la Figura 4.37 se observa como la mayor expresión del gen *WATI* tiene lugar en la zona de maduración de la raíz, donde están los pelos radiculares, o en la zona meristemática, siendo menor en la zona de elongación radicular. A nivel de tejidos, la mayor expresión se observa en las células del xilema radicular.

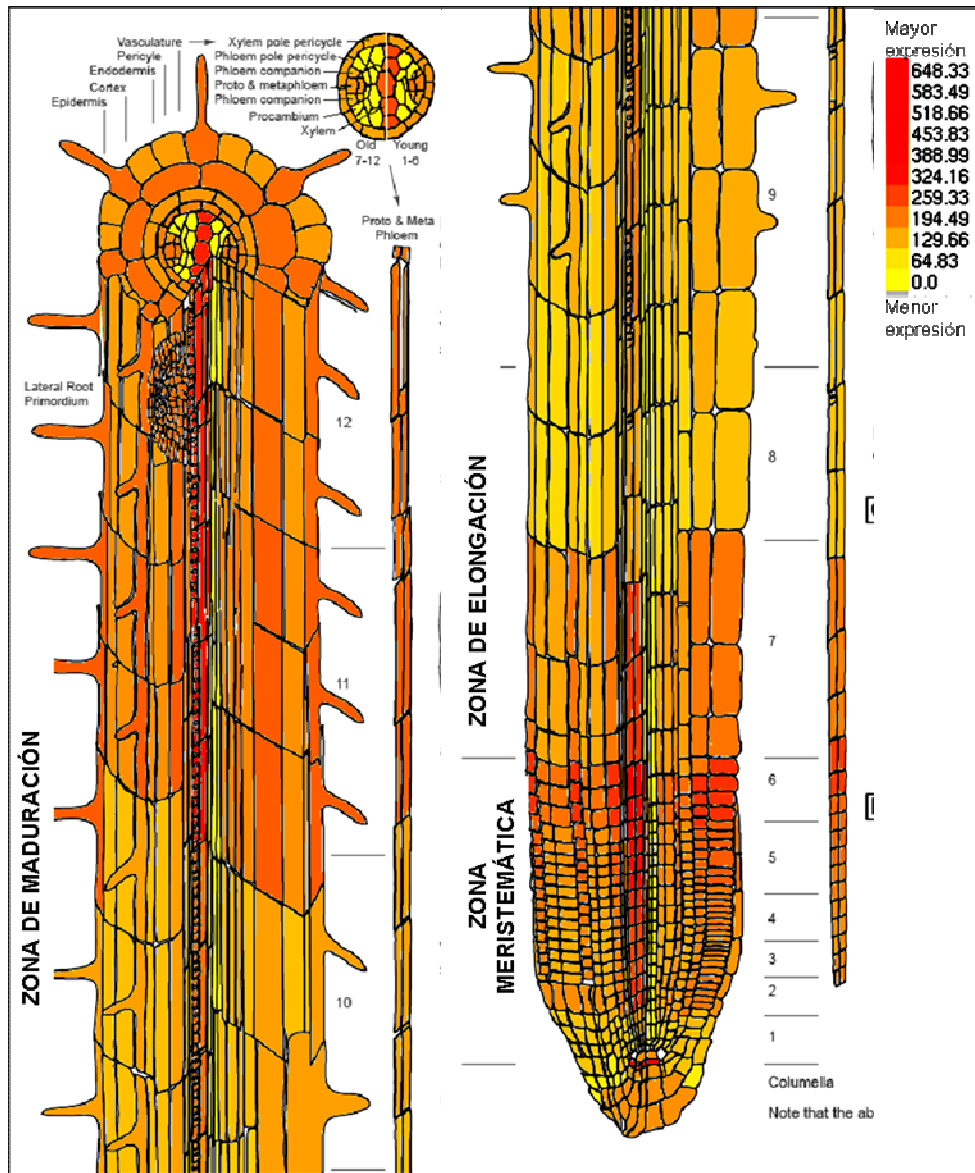


Figura 4.37: Imagen que ilustra la expresión del gen *WAT1* en la raíz de *A. thaliana*. El color rojo muestra la mayor expresión y el amarillo indica que la expresión es menor. En la parte superior central de la imagen se muestra detalle de la expresión en haces vasculares.

4.6.2 Análisis de la proteína *WAT1* de *Arabidopsis*

Mediante el programa BLAST (www.arabidopsis.org) y empleando la base de datos de proteínas del TAIR (TAIR 9) se buscaron las proteínas que poseían una mayor homología con la proteína *WAT1*. De este modo, se encontró que las 3 proteínas más similares en *A. thaliana* eran las beta adaptinas de los otros complejos “*adaptor protein complex*” (beta 1/2=At4g11380; beta 1/2= At4g23460 y beta 4= At5g11490).

Utilizando el programa CLUSTAW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/) se realizó el alineamiento de estas 4 proteínas (Figura 4.38).

At4g11380	--MSGHDSKYFSTTK--KGEIPELKEELNSQYK-----DKRKDAVKKVIAAMTVGKD	48
At4g23460	--MSGHDSKYFSTTK--KGEIPELKEELNSQYK-----DKRKDAVKKVIAAMTVGKD	48
At5g11490	MAPPAASQRYPSPSQPSGKSEVSDLKTQLRQLAGSRAPGVDDSKRDLYKKVSYMTIGID	60
At3g55480	-----MAGIRLHVIAPLALAAV	17
	. : ** : : : .	
At4g11380	VSSLFTDVVNCMQTENLELKKLVLYLYLINYAKSQPDLAILAVNTFVKDSQDPNPLIRALA	108
At4g23460	VSSLFTDVVNCMQTENLELKKLVLYLYLINYAKSQPDLAILAVNTFVKDSQDPNPLIRALA	108
At5g11490	VSSVFGEMVMCSATSDIVLKKMCYLYVGNVYAKGNPDLISLLTINFLQRDCDEDPMIRGLA	120
At3g55480	SKCARDPAVYVRRCAANALPKLHDLRLEEHASAIEELVGIILN-----DHSPGVVGAATA	72
	. . * * * * : : * : : * : *	
At4g11380	VRTMGCIRVDKITEYLCDPKQKCKLDDDPYVRKTA AICVAKLFDINAELVEDRGFLEALK	168
At4g23460	VRTMGCIRVDKITEYLCDPKQKCKLDDDPYVRKTA AICVAKLFDINAELVEDRGFLEALK	168
At5g11490	LRSLCCLRVPNLVEYLVGPLGSLKDNNSYVRTIAVTGVLKLYHISPTCIDADFPATLK	180
At3g55480	AFTSICPNNFKLIGKNYKLCQILPDEEWG-QILLIGTLLRYVVARHGLVRESLMSLH	131
	: . . : : * . * * : : . : : . : : :	
At4g11380	DLIS-DNNPMVVANAVAALAEIQENSSSPIFEIN-----STTLTKLLTALNECTEWG	219
At4g23460	DLIS-DNNPMVVANAVAALAEIQENSTSPIFEIN-----STILTLLTALNECTEWG	219
At5g11490	SLMLHSDAQVVANCLSAEQEISWLEASHSEEACREKESLSKPVIIYFNLRIKFEWEA	240
At3g55480	GTNS-NGFCEKDGRLDLDKEDGGKSDSFDVN-----LVSLVSKCYIQGPDEYLSRS	184
	. : . . . : . * : . : . * . .	
At4g11380	-----QVFILDALSKYKAADPREAENIVERVTPRLQHANC VVLSAVKMIQQOMELITST	274
At4g23460	-----QVFILDALSRKASDPREAENIVERVTPRLQHANC VVLSAVKMIQQOMELITST	274
At5g11490	-----QCLILELAVKYVPSDSNDFDIMNLEDRLQHANGAVVLATVKVFLQTLTSMT-293	
At3g55480	SCTDTVSSAFDTKETTSIAHNEDVKILLQCTSPLLWSNNSAVVLAAGVQWIMAPLED-242	
	: : : . . : : : * * * * * : : :	
At4g11380	DVIRNLCKKMAPPLVTLIS-AEPEIQYVALRNINLIVQKRPTILAHAIKVFVCKYNDPIY	333
At4g23460	DVIRNLCKKMAPPLVTLIS-AEPEIQYVALRNINLIVQKRPTILAHAIKVFVCKYNDPIY	333
At5g11490	DVHQQVYERIKSPLTLVSSGSPQSYAILSHLHLVVRAPFIFAADYKHFYCYNEPSY	353
At3g55480	-----VKKIVKPLFLLR-SSSASKYVVLNIVLFAKAVPSLFAHPHFENFFICSSDAYQ	295
	: : * * : * : . . * . * : : : . * : * . : * : . .	
At4g11380	VKMEKLEIMIKLASDRNIDQVLEFKEYATEVDVDFVRKAVRAIGRCAIKLERAARERCIS	393
At4g23460	VKMEKLEIMIKLASDRNIDQVLEFKEYATEVDVDFVRKAVRAIGRCAIKLERAARERCIS	393
At5g11490	VKKLLEMLTAVANESNTYEIVTEICEYAAVNDIAIARESIRAVGKIALQMY-DVNAIVD	412
At3g55480	VKAYKLEMLSLIATTSSIASILREFEDYIKDPDRRF AADTVAAIGLCAKRLMPTIPTCLD	355
	** * * * : : * . . . : : * : * : * . . : : * * * : . .	
At4g11380	VLLELIKIKVNY-----VVQEAIIVIKDIFRRYPN-TYESIIATLCESLDTLDE	441
At4g23460	VLLELIKIKVNY-----VVQEAIIVIKDIFRRYPN-TYESIIATLCESLDTLDE	441
At5g11490	RLQFLEMEKDY-----VTAETLVLVKDLLRKYQWVSHDCISVGGISSKNIQE	461
At3g55480	GLLALVRQESFAGDFESADGEAGVLVQAVMSIQTMIERDPL-RHEKVLIQLFRLSDSIKV	414
	* * : . . : * : : : : : * : : : * :	
At4g11380	PEAKASMIWIIGEYAERIDNADELLESFLENFPEEP----AQVQLQLLTATVKFLFKKPT	497
At4g23460	PEAKASMIWIIGEYAERIDNADELLESFLENFPEEP----AQVQLQLLTATVKFLFKKPT	497
At5g11490	PKAKAALIWMLGEYAQDMSDAPYVLENLIENWEEHHS---AEVRLHLLTAAAMKCFKRAP	518
At3g55480	AAARATI IWMVGVCYCSLGHIPRMLTITIKYLAWSFKSEASETKQLINTAKVLSAEAA	474
	. * : * * * * : * * . . : * : : . : : * * * * * : * : . .	
At4g11380	EGPQQMIQVVLNNA TVETDNP-DLRDRAYIYWRLLST---DPEAAKDVVLAEKPVISDD	552
At4g23460	EGPQQMIQVVLNNA TVETDNP-DLRDRAYIYWRLLST---DPEAAKDVVLAEKPVITDD	552
At5g11490	ETQKALGTALA-AGIADFHQ-DVHDRALFYRVLQY---DVHVAERVVSPPKQAVSVF	571
At3g55480	GDFHMLKRIVVYVFEELGEYDLSYDIRDRTFLKLLSCKLASHEPAEDSVASQENIAAHV	534
	: : : : : * * * * : : * . . . * : * . : :	
At4g11380	SNQLD-----PSLLELLTNISTLSSVYH	576
At4g23460	SNQLD-----PSLLELLANISTLSSVYH	576
At5g11490	ADTQS-----SEIKDRVDFEFNSLSVIYQ	595
At3g55480	VEHVFGRLKLSVSPITLHNRFLYLPGLSLSQIVLHAAPGYEPLPKPCSFVYEEQDQLSDLK	594
	: . . . : : * * : :	
At4g11380	KPPEAFVTRLKTTVQKTEDEDFAEAGSEAGY-SSSNPVDS AASP GNIPQPSGRQPAPAV	634
At4g23460	KPPEAFVTRLKTTVQKTEDEDFAEAGSEAGY-SSSNPVDS AASP GNIPQPSGRQPAPAV	633
At5g11490	KPSYMFDTK EHRGPF EFSDE VGN-----ISITPEASSDIVPAQQYEA N-----	638
At3g55480	QREAAADLDGSEESSETGDENGSSDYDSESSNGSDF SSEGDERTVSNANDPAAPIQIS	654
	: : : * *	
At4g11380	PAPVPDLLGDLMGLDNAAIVPVDPIITQSGPPLPVVVPASSGQLQISAQLSRKDGQ---	691
At4g23460	PAPVPDLLGDLMGSDNAAIVPVDPIITQSGRPLPVVLPASKGQQLQISAQLTRQDGQ---	690
At5g11490	-----DKDLLLGIDKDKENK-----VSNNGKS---	661
At3g55480	ETSVSADQEE LRSRRALDLWLDQ PSTSNQTPSALNSNQSSYAKISIGDVGSRVVKPKSYS	714
	: * :	

```

At4g11380 -----VFYSMLFENNSQSVLDGFMIQFNKNTFGLAAAG 724
At4g23460 -----VFYSMLLENNQSLLDGFMIQFNKNSFGLAAVG 723
At5g11490 -----AYTAPSLLESSN-----ITSQMQLAISG 685
At3g55480 LVDPGNGSGLKVDYAFLEVSNSVPLHVCVEVLFENSSAEPILEVNLEDEESMKVADSSE 774
                .           : * . . *           . .

At4g11380 SLQIPPLHPATS-----ARTMLPMVLFQNSAGPPSS 756
At4g23460 SLQVPPLQPGAS-----ARTMMPVLSQNMTSTGSS 755
At5g11490 PATSATTPQSGF-----FDDLFLGLGLSTAPAPTPSPP 717
At3g55480 QTLVGGKANASYNNIPTLIPMEIISCLEPHQSTKRLLIQVRFHHHLLPMRLTLHYNEKKVPV 834
                . .           : : : *           .

At4g11380 LLQVAVKNNQQPV----WYFTDKIILHALFGEDGRMERGTFLLETWRSLPDSNEVLKEFP 811
At4g23460 VLQVAVKNNQQPV----WYFEDKIVLNALFSEDGRMERGTFLLETWKSPLPDSNEVQKEFP 810
At5g11490 LLKLNARAALDPG----AFQQKWRQLPISLTQECVNP----QGIAALTVPQSLIKHMQ 768
At3g55480 KLRPDLGYLVKPFMSIEEFLATESRLPGMFEYSRRCTFDDHVKDSRTENGKDKFLSICE 894
                * :           . *           : *           : .           : :           : . . .

At4g11380 GIIITSVESTIELLTAFTNMFFIAKRKNGNQDVIYLSAKDPRDVPFLIELTAMVGQP---- 867
At4g23460 GIIITSVESTLDLLAASNMFIAKRKNGNQDVLVLSAKVPRGIPFLIELTAIVGQP---- 866
At5g11490 SHSIHCIAAGGQSPNFKFFFAQKE-----SEPSNYLTECIINTSSAKAQI---- 814
At3g55480 SITLKVLSNSNLHLVSVLDLPVANSLEDATGLRLRFSSKILSSEIPLLITITVEGKCTEVL 954
                . : : : .           : . .           *           : : : : .

At4g11380 GLKCAVKTPTEIAPLFFFEALELLFKA----- 894
At4g23460 GLKCAVKTPTEIAPLFFFEAVEILFKA----- 893
At5g11490 KVKADEQSTCQAFITVFEITALSKFGMP----- 841
At3g55480 NLTVKINCEETVFGNLLNRIANFMVEPSSSAT 987
                : .           :           :           :           :           :

```

Figura 4.38: Alineamiento de las proteínas beta adaptinas de *Arabidopsis*. El asterisco indica los aminoácidos idénticos para las 4 proteínas, los dos puntos indican las sustituciones de aminoácidos equivalentes, y el punto indica la presencia de aminoácidos con características similares. Las secuencias señaladas en gris siguen la secuencia consenso de la caja clatrina. La secuencia marcada en amarillo sigue el consenso de la caja clatrina y se encuentra en la región “hinge”.

El alineamiento de las proteínas muestra que la homología de secuencia no es muy alta, siendo mayor en la región N-terminal (0-500 aminoácidos aproximadamente) que forma parte del “core” o núcleo central del complejo AP3, que en la C-terminal, que constituye la región apéndice y que se muestra mucho más variable. También es posible observar en el alineamiento, como las proteínas de los locus At4g11380 y At4g23460 son las más parecidas entre ellas (de hecho, como se comentó en la introducción, son intercambiables y pueden formar parte o bien del complejo AP1 o del AP2, por eso se denominan beta 1/2).

Para determinar cuál de las restantes adaptinas era la más similar a la proteína WAT1, se empleó el programa “align”, disponible en la web (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>), y se alineó la secuencia de la proteína WAT1 con las demás beta adaptinas de *A. thaliana*. El resultado de este alineamiento se muestra en la Tabla VI, donde se muestra que la mayor similitud es con la proteína beta 1/2, y posteriormente con la beta 4. De todos modos, como se ha comentado anteriormente, la homología a nivel de secuencia no es muy alta.

Tabla VI: Porcentaje de identidad y de similitud entre la adaptina beta 3 (WAT1) y las restantes adaptinas.

	% identidad	% similitud
At4g11380 beta 1/2	19,1	32
At4g23460 beta 1/2	19,6	32,5
At5g11490 beta 4	13,8	25,5

Como se comentó en la Introducción, una de las funciones de la subunidad beta de los complejos adaptadores, es la interacción con clatrina. Esta interacción ocurre a través de la denominada caja clatrina, cuya secuencia consenso es: $L\Phi x\Phi D/E$ (siendo Φ un aminoácido hidrofóbico y x cualquier aminoácido) y que suele localizarse en la región “*hinge*”, que, en mamíferos, comprende los aminoácidos dentro del intervalo 600-870 aproximadamente (Boehm y Bonifacino, 2001). Por lo tanto, se quiso buscar esta caja a lo largo de la secuencia de la proteína WAT1. En la Figura 4.38, se han señalado en color gris los motivos que cumplen la secuencia consenso de la caja clatrina, y en amarillo el motivo que, además de seguir la secuencia consenso, se encuentra en la región “*hinge*” de la proteína, por lo que muy probablemente sea el motivo que actúa como sitio de unión a clatrina.

Finalmente, para conocer los dominios que poseía la proteína, se utilizó el programa InterProScan (www.ebi.ac.uk/InterProScan). Este análisis reveló la presencia de los siguientes dominios en la región N-terminal de la proteína: IPR002553 “*adaptin N-terminal region*”, según la base de datos pfam, (pfam01602); IPR016024 “*armadillo-type fold*”, según la base de datos superfam, (SSF48371) y IPR011989 “*armadillo like helical*” según la base de datos gene3d (G3DSA:1.25.10.10). Los tres dominios señalados son solapantes, y sus descripciones indican que se encuentran en la región N-terminal de proteínas adaptinas α , β y γ , involucradas en el tráfico vesicular. En esta región, estas proteínas adoptan una estructura de tipo “armadillo” formada por dos capas de hélices α organizadas formando una super-hélice. Estas estructuras de super-hélice, generan una superficie muy accesible, que suele emplearse para unir sustratos de tamaño considerable como proteínas.

4.7 La toma de acético del mutante *wat1-1D* es similar a la del control

Como se ha explicado anteriormente, el mutante *wat1-1D* es más tolerante a ácido acético durante la germinación y establecimiento de la plántula. En plántulas más desarrolladas el mutante no muestra un fenotipo observable en presencia de este ácido, pero es capaz de mantener un pH citosólico más alcalino en experimentos de perfusión con ácido acético durante tiempos cortos (10 minutos). Una posible explicación de estos fenotipos sería que la velocidad de toma de ácido acético del medio fuera menor en el mutante que en el control silvestre. Es decir, tal vez la mutación de *wat1-1D* afecte al algún transportador de toma de acético en la célula, de modo que su toma sería menor, y por lo tanto, la disminución del pH intracelular no sería tan severa. Para comprobar esta hipótesis se midió la toma de acético marcado radiactivamente con C^{14} en el mutante y en el control.

La Figura 4.39, muestra la cantidad de acético acumulado en las plantas tras diferentes tiempos de tratamiento. Como se puede observar, la incorporación de acético a lo largo del tiempo es similar en el mutante y el control silvestre. Es decir, el mutante no tiene ningún defecto en la toma de acético del medio externo.

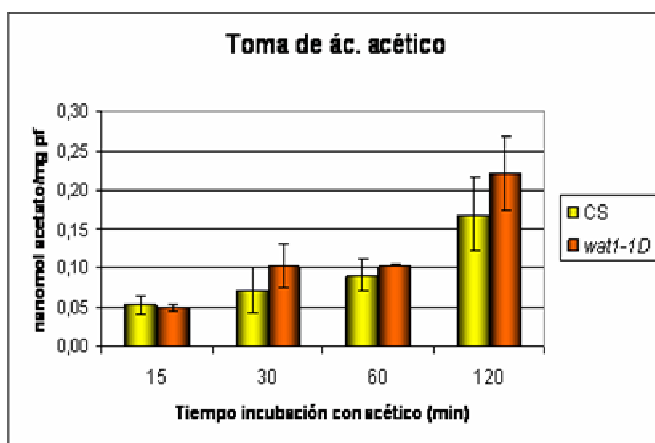


Figura 4.39: Toma de ácido acético radiactivo en el mutante *wat1-1D* y el control. Contenido en C^{14} -acetato de plántulas crecidas en medio líquido durante 13 días y tratadas con C^{14} -acetato (0,1mM), durante 15, 30, 60 y 120 minutos. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. Pf= Peso fresco.

4.8 El consumo de malato es similar en el mutante y el control

Considerando los fenotipos que presenta el mutante en presencia de ácido acético, y sabiendo que *wat1-1D* toma el ácido del medio del mismo modo que el control silvestre, parece lógico pensar que el mutante presenta una alteración en la

homeostasis de pH, al menos a tiempos cortos. Por ello, se empezaron a analizar los diferentes mecanismos de regulación de la homeostasis de pH.

En primer lugar, se quiso estudiar el “*biochemical pH stat*” que, como se explicó en la Introducción, incluye a las reacciones metabólicas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de pH, a corto plazo. De acuerdo con este modelo, la bajada de pH intracelular (provocada por el ácido acético) podría ser compensada la activación de la enzima málica, que transforma el malato en piruvato, consumiendo un protón.

Se planteó como hipótesis que el mutante *wat1-ID* fuera más eficaz a la hora de transformar el malato en piruvato, y por ello consumiera los protones más rápidamente que el control. La hipótesis sugería que la mutación en adaptina $\beta 3$, podría afectar a la localización del transportador de entrada de malato en vacuola (TDT). Por lo tanto, en el mutante *wat1-ID* habría más malato en el citosol, disponible para ser consumido, que en el caso del control silvestre, donde la mayoría del malato se encuentra almacenado en la vacuola.

Para comprobar esa hipótesis, se realizaron dos experimentos. En primer lugar, se midió el contenido en malato de las plántulas del mutante y el control sometidas a diferentes tratamientos con ácido acético, para comprobar si la reducción del contenido en malato era mayor o más rápida en el mutante *wat1-ID*. En segundo lugar, se analizó el fenotipo en presencia de acético de un mutante de pérdida de función del transportador TDT, que introduce menor cantidad de malato en vacuola, para ver si la mayor disponibilidad de malato en el citosol tiene como consecuencia una mayor tolerancia a acético.

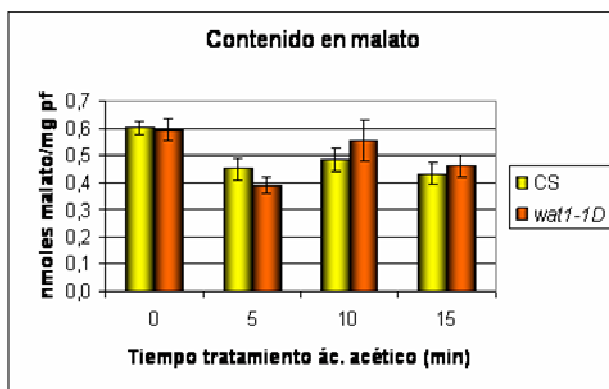


Figura 4.40: Contenido en malato tras tratamiento con acético. Plántulas crecidas durante 13 días en medio líquido se tratan con 3,5 mM ácido acético durante 5, 10 y 15 min. Posteriormente, se mide su contenido en malato mediante un ensayo enzimático. Cada columna representa la media y error estándar de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones biológicas cada uno: (n=6).

La Figura 4.40 muestra que, antes del tratamiento con ácido acético, el contenido en malato es similar en el mutante *wat1-ID* y el control silvestre. Asimismo, se observa que tras 5 minutos de tratamiento con acético, el contenido en malato de las plántulas

del mutante y del control silvestre, se reduce aproximadamente un 30%. A partir de los 5 minutos de tratamiento, los niveles de malato permanecen prácticamente constantes en ambos genotipos, con ciertas diferencias que no resultan significativas. Este resultado indica que la capacidad del mutante de mantener un pH citosólico más elevado en respuesta a acético, no se debe a que consume el malato de una forma más eficaz.

Por otro lado, la Figura 4.41 muestra como el mutante *tdt* no presenta un mejor comportamiento en presencia de ácido acético, durante la germinación y establecimiento de la plántula, que su control. De hecho, el mutante es más sensible en estas condiciones. Este resultado indica que, el mejor comportamiento del mutante *wat1-1D* en medio suplementado con ácido acético en estas condiciones no se debe a una menor entrada del malato en la vacuola (y la mayor disponibilidad en el citosol que ello conlleva).

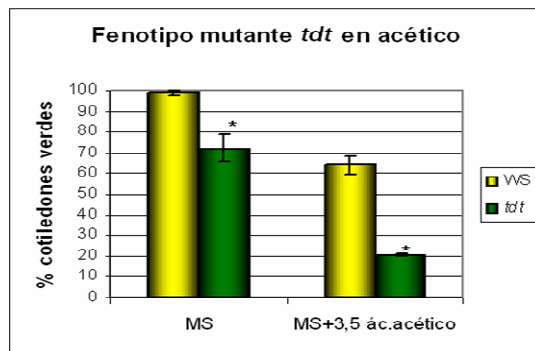


Figura 4.41: Fenotipo del mutante *tdt* en presencia de ácido acético. Porcentaje de cotiledones verdes tras 5 días de crecimiento en medio MS+3,5 mM ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones independientes. (WS: Control: ecotipo *Wassilewskija*).

4.9 La sobreexpresión de la pirofosfatasa vacuolar comparte fenotipos con el mutante *wat1-1D*

Una vez descartada la implicación de las reacciones metabólicas de consumo de malato en el fenotipo del mutante *wat1-1D*, se decidió investigar los mecanismos biofísicos de control del pH intracelular, consistentes en el transporte de protones entre los diferentes compartimentos celulares.

Dado que la adaptina WAT1 está implicada en el transporte a vacuola, se consideró, en primer lugar, que en condiciones de estrés por ácido acético, *wat1-1D* podría acumular exceso de protones en vacuola. Esto explicaría que el mutante mantenga un pH citosólico más alcalino en presencia de estrés ácido. Para comprobar esta hipótesis, se observaron los fenotipos de una línea de sobreexpresión de la pirofosfatasa vacuolar.

4.9.1 Fenotipo en presencia de ácido acético

En primer lugar, se determinó si las plantas sobreexpresando la pirofosfatasa (AVP1), eran más tolerantes a ácido acético. En un ensayo de aparición de cotiledones, se observó que las plantas transgénicas mostraban una mayor tolerancia que el control a la presencia de ácido acético, si bien el fenotipo era más débil que el del mutante *wat1-ID*. Concretamente, a los 6 días de crecimiento en medio suplementado con ácido acético, la diferencia en el porcentaje de cotiledones abiertos entre el control y las líneas transgénicas, es de aproximadamente un 20%, mientras que la diferencia entre el mutante *wat1-ID* y el control está en torno al 60%. Asimismo, se observa que el mutante inicia con anterioridad la aparición de sus cotiledones, de modo que a los 5 días el 90% de sus plántulas tiene cotiledones abiertos, mientras que en el caso de las transgénicas este porcentaje es del 20 % (Figura 4.42).

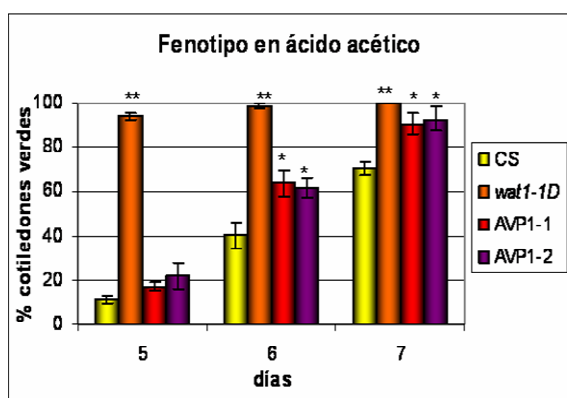


Figura 4.42: Fenotipo en presencia de ácido acético de plantas transgénicas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar. Porcentaje de cotiledones verdes entre los 5 y 7 días de crecimiento en medio MS+3,5mM de ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes. AVP1-1 y AVP1-2 son dos plantas de la línea transgénica AVP1.

4.9.2 Fenotipo en presencia de litio, bajo potasio y estrés osmótico

Una vez comprobado que las plantas transgénicas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar, eran más tolerantes a ácido acético que el control, se quiso observar si el comportamiento de estas plantas en presencia de LiCl y en medio con bajo potasio, también seguía la misma tendencia que el mutante de interés: *wat1-ID*. En la Figura 4.43A se observa, que al igual que el mutante *wat1-ID*, las plantas transgénicas AVP1, presentan sensibilidad a LiCl y bajo potasio.

A continuación, se observó el comportamiento de las transgénicas AVP1 en presencia de ABA, o de un estrés osmótico generado por cloruro sódico. Como se observa en la Figura 4.43B, las plantas transgénicas AVP1, presentan un mayor número de cotiledones verdes que el control, tanto en presencia de cloruro sódico como de ácido

abscísico. Es decir, en estas condiciones, las transgénicas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar se comportan de forma muy similar al mutante *wat1-ID*.

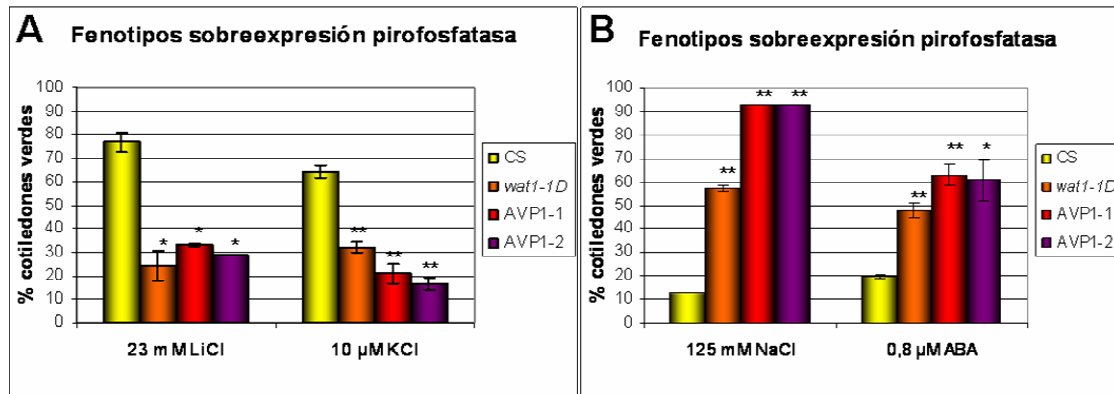


Figura 4.43 Fenotipo de plántulas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar, en presencia de LiCl y medio con bajo potasio (A) y en condiciones de estrés osmótico (B). Porcentaje de cotiledones verdes a los 5 días de crecimiento en medio MS+23mM LiCl o en medio con 10 μM de potasio (A), y a los 5 días de crecimiento en medio MS+125 mM NaCl o 6 días en medio con 0,8 μM ABA (B). Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

4.10 La pérdida de función de la H⁺-ATPasa vacuolar tiene fenotipos contrarios al mutante *wat1-ID*

Una vez comprobado que las transgénicas de sobreexpresión de la pirofosfatasa vacuolar se comportan de forma similar al mutante *wat1-ID*, se empleó un mutante de pérdida de función en la H⁺-ATPasa vacuolar (*a2a3*), para observar si, como cabría esperar, sus fenotipos eran opuestos a los de *wat1-ID*. Se decidió emplear este mutante porque el mutante nulo en la pirofosfatasa vacuolar tiene un importante defecto de crecimiento incluso en ausencia de estrés (Li *et al.*, 2005).

4.10.1 Fenotipo en presencia de ácido acético

En primer lugar, se realizó un ensayo de aparición de cotiledones en medio con ácido acético. Tal y como se observa en la Figura 4.44, el mutante *a2a3* muestra una ligera sensibilidad a acético en estas condiciones, que resulta significativa los días 6 y 7 con un nivel de significación $\alpha = 0,1\%$.

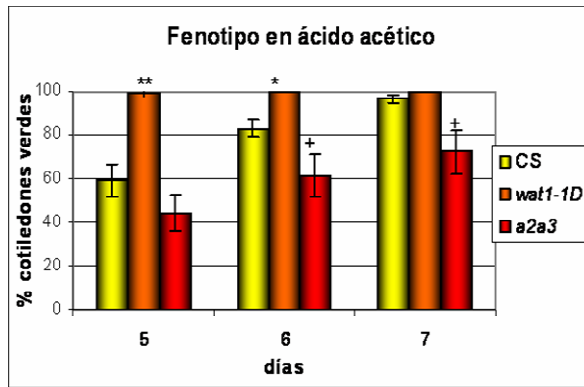


Figura 4.44: Fenotipo en presencia de ácido acético del mutante *a2a3*. Porcentaje de cotiledones verdes entre los 5 y 7 días de crecimiento en medio MS suplementado con 3 mM ácido acético. *a2a3* representa el mutante en la H⁺-ATPasa vacuolar. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

4.10.2 Fenotipo en presencia de litio, bajo potasio y estrés osmótico

A continuación, se observó el fenotipo en presencia de cloruro de litio y en medio con bajo potasio. En la Figura 4.45A, se ve como el mutante en la H⁺-ATPasa vacuolar (*a2a3*) muestra un mayor número de cotiledones verdes en presencia de cloruro de litio que el control silvestre, al contrario que el mutante *wat1-1D*. Sin embargo, en el medio con bajo potasio, se observa que el mutante *a2a3* muestra una mayor sensibilidad que el control, y que el mutante *wat1-1D*.

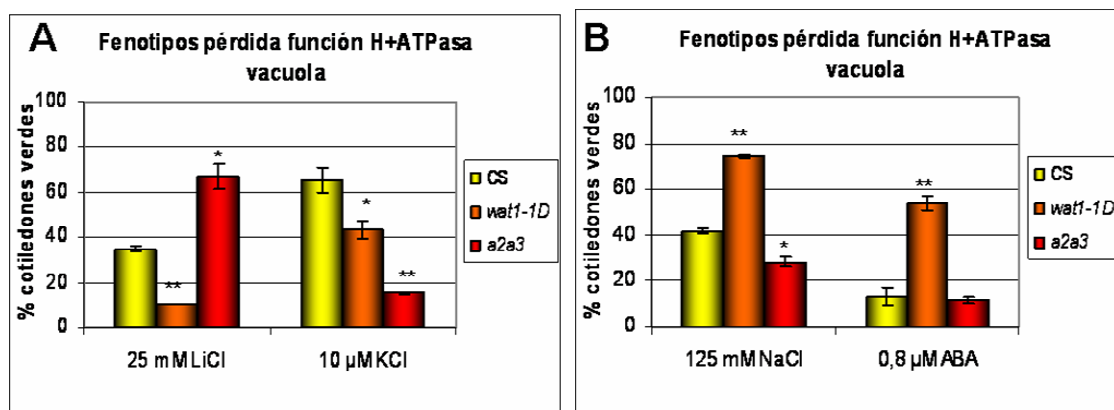


Figura 4.45: Fenotipo del mutante *a2a3* en presencia de LiCl y en medio con bajo potasio (A) y en condiciones de estrés osmótico (B). Porcentaje de cotiledones verdes a los 5 días de crecimiento en medio MS+ 25 mM LiCl o en medio con 10 μM de potasio (A), y a los 6 días de crecimiento en medio MS+125 mM NaCl o 0,8 μM ABA (B). Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones independientes.

Por último, se estudió el comportamiento de este mutante en presencia de cloruro sódico y ácido abscísico. La Figura 4.45B muestra como el mutante *a2a3* presenta un menor número de cotiledones verdes que el control en presencia de cloruro sódico, aunque no muestra diferencias con el control en presencia de ABA. Es decir, en

este caso, el mutante se comporta de modo contrario al mutante *wat1-ID* en presencia de sodio.

En base a estos resultados y los obtenidos en el apartado anterior, no es posible concluir con certeza que el mutante *wat1-ID* tolera acético por tener incrementada la entrada de protones en vacuola, ya que las plantas transgénicas con sobreexpresión de AVP1, no son tan tolerantes a ácido acético como el mutante *wat1-ID*, y el mutante *a2a3*, no sigue la tendencia que sería esperable en medio con bajo potasio y ABA.

4.11 La pérdida de función del antiportador NHX es sensible a ácido acético

Continuando con el estudio de transportadores vacuolares que pudieran estar implicados en la homeostasis de pH, se quiso analizar el fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes de pérdida de función de dos de los antiportadores NHX expresados en vacuola (NHX1 y NHX2). Estos antiportadores, introducen sodio o potasio en vacuola al mismo tiempo que sacan protones, de modo que su mutación provocaría una disminución en la salida de protones de la vacuola. Se planteó la hipótesis de que el mutante *wat1-ID*, tuviera un defecto en el transporte de la proteína NHX al tonoplasto, de modo que, en presencia de ácido acético, los protones entrarían rápidamente en vacuola y saldrían en menor medida que en el caso del control. De este modo, *wat1-ID* lograría mantener un pH citosólico más elevado que su control. Si esta hipótesis fuera correcta, los mutantes de pérdida de función en los genes *nhx*, deberían mostrar el mismo fenotipo de tolerancia a ácido acético que muestra el mutante *wat1-ID* en los primeros estadios de desarrollo.

La Figura 4.46, muestra que los mutantes *nhx* son más sensibles a ácido acético que el control. Es posible observar que la sensibilidad del mutante *nhx1.3* es mayor que la del mutante *nhx1.1*. Finalmente, el mutante simple *nhx2.1* y el doble mutante *nhx1.3 nhx2.1* son los que muestran mayor sensibilidad.

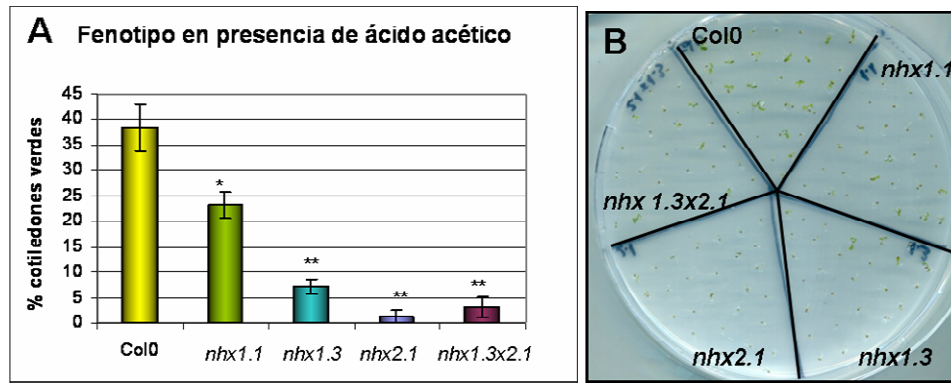


Figura 4.46: Fenotipo de mutantes *nhx* en presencia de ácido acético. A) Porcentaje de cotiledones verdes tras 6 días de crecimiento en medio MS+3,5 mM ácido acético. Cada columna representa la media y error estándar de 4 repeticiones biológicas. B) Aspecto de las plántulas control y de los mutantes *nhx* tras 6 días en medio MS+3,5 mM ácido acético.

En base a estos resultados, se descarta la hipótesis de que el mutante *wat1-1D* mantenga un pH citosólico más elevado por disminuir la salida de protones que entran en vacuola.

4.12 Estudio de la expulsión de protones a nivel de membrana plasmática

4.12.1 Medida de la actividad de la H^+ -ATPasa *in vitro*

Dejando a un lado la compartimentación de protones en vacuola, y continuando con el análisis de los mecanismos biofísicos de regulación del pH intracelular, se quiso estudiar la salida de protones a través de la membrana plasmática del mutante. Se consideró que, otro posible modo de mantener el pH alcalino en condiciones de estrés por ácido acético, es expulsar los protones de la célula de forma más eficiente. Para comprobar esta hipótesis, se midió, en primer lugar, la actividad H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (MP) del mutante y el control *in vitro*, tanto en condiciones normales, como en condiciones de estrés ácido.

En contra de lo esperado, la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática del mutante *in vitro* es significativamente menor que la del control silvestre, tal y como se observa en la Figura 4.47. Por otro lado, en el caso del control, puede observarse que la actividad de la bomba de protones aumenta en condiciones de estrés ácido de forma significativa. Este resultado indica que la entrada de protones provocada por el tratamiento ácido, tiene como consecuencia una activación de la H^+ -ATPasa, para

tratar de contrarrestar la bajada de pH. En el mutante, sin embargo, no se produce este incremento en la actividad de la H⁺-ATPasa PM.

Es importante destacar, que este experimento refleja únicamente la activación de la H⁺-ATPasa debida a modificaciones covalentes (como fosforilaciones o defosforilaciones de su dominio regulador C-terminal). Cualquier otra forma de regulación como la basada en el pH óptimo de actuación de la enzima (más ácido que el pH propio del citosol en condiciones normales) o en el potencial de membrana, no se muestran en este ensayo. Por lo tanto, se concluye que en respuesta a la acidificación intracelular, el control silvestre activa la H⁺-ATPasa mediante modificaciones de carácter covalente. Sin embargo, este tipo de activación no ocurre en el mutante.

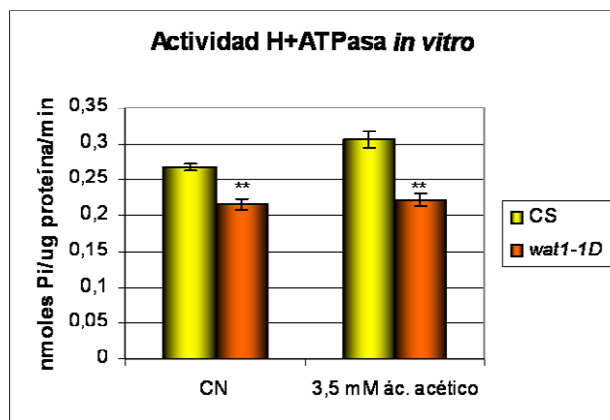


Figura 4.47. Actividad H⁺-ATPasa *in vitro* del mutante y el control silvestre. La H⁺-ATPasa se purificó a partir de la raíz de plantas crecidas durante 1 mes y medio en cultivo hidropónico. La actividad se determina como nanomoles de fosfato inorgánico (Pi) producido por µg de proteína por minuto. Cada columna representa la media y error estándar de 6 repeticiones biológicas.

4.12.2 Medida de la acidificación del medio externo *in vivo*

A pesar de que la actividad H⁺-ATPasa *in vitro* del mutante es menor que la del control, se quiso determinar si la expulsión de protones al medio externo del mutante era mayor *in vivo*. Esto sería posible considerando la existencia de factores que afectan a la regulación de la actividad de la H⁺-ATPasa, cuyo efecto no es observable en el experimento anterior, y teniendo en cuenta la posible implicación de otros transportadores (aparte de la H⁺-ATPasa PM) en la expulsión de protones al exterior celular.

Para ello se realizó, en primer lugar, un ensayo creciendo plantas en medio MS sin tamponar con bromocresol en presencia o ausencia de 3,5 mM de ácido acético. En la Figura 4.48, se observa como en condiciones normales no existen diferencias en la expulsión de protones del mutante y el control, ya que el color amarillento aparece alrededor de las raíces de ambos genotipos de forma similar. En presencia de ácido

acético, no fue posible observar acidificación del medio ni en el caso del mutante ni en el del control. Posiblemente, el acético ($pK_a=4,7$) a la concentración empleada, está actuando como tampón, y por este motivo, no disminuye el pH del medio ($pH=5,5$).

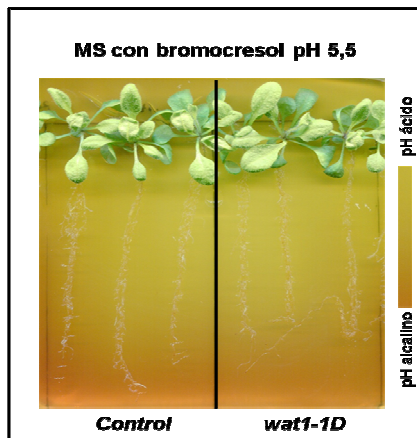


Figura 4.48. Ensayo de acidificación extracelular empleando bromocresol. Plantas crecidas durante 14 días en medio MS sólido en vertical se transfieren a medio MS sólido sin tamponar + 0,003% (p/v) de bromocresol púrpura, donde se mantienen entre 6 y 12 horas.

Finalmente, se empleó otro método para medir la expulsión de protones al medio externo. En este caso, se midió de forma directa la acidificación del medio externo, con un pHmetro, tal y como se describe en el apartado 3.19.2 de Materiales y Métodos. Las medidas se realizaron tanto en presencia como en ausencia de ácido acético, pero en este caso se disminuyó la concentración empleada de ácido (1 mM), para minimizar su efecto como tampón.

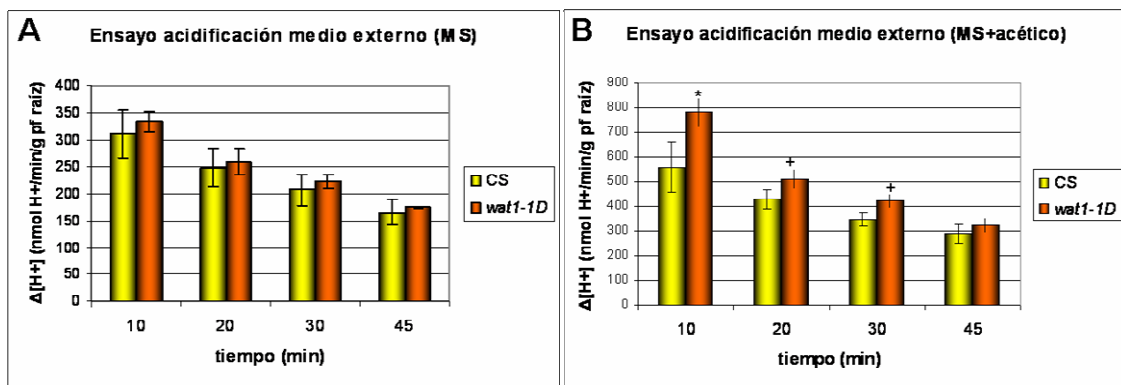


Figura 4.49 Ensayo de acidificación del medio externo en condiciones normales (A) y en presencia de 1 mM de ácido acético (B). Las gráficas muestran el incremento en la concentración de protones del medio por minuto y por gramo de peso fresco de raíz en los primeros 10, 20, 30 minutos o en los 45 minutos de duración del experimento. Cada columna representa la media y error estándar de 4 repeticiones biológicas.

En la Figura 4.49 se observa como el incremento de la concentración de protones en el medio por unidad de tiempo y de peso de la raíz, es mayor al inicio del experimento, y disminuye a medida que pasa el tiempo. Este dato indica que la

velocidad de salida de protones es muy alta al principio y se va reduciendo con el tiempo. Por otro lado, comparando la Figura 4.49A con la B, se observa que, como cabía esperar, la acidificación del medio externo es mayor en presencia de ácido acético, ya que en estas condiciones, la célula trata de evitar a la bajada de pH intracelular expulsando al medio protones en mayor medida que en condiciones normales.

Comparando el mutante con el control, en la Figura 4.49A se muestra que ambos genotipos se comportan de modo similar. Sin embargo, en condiciones de estrés ácido, la expulsión de protones al exterior es mayor en el mutante *wat1-ID*. Esta diferencia es mayor en los primeros minutos de duración del experimento, y se va reduciendo a medida que avanza el tiempo. En los primeros 10, 20 y 30 minutos la diferencia en el incremento de protones por unidad de tiempo es significativa con un nivel de significación $\alpha=0,05$ (10 minutos) y 0,1 (20 y 30 minutos), pero no es significativa al considerar los 45 minutos de duración del ensayo.

Por lo tanto, se concluye que el mutante *wat1-ID* es capaz de mantener un pH citosólico más elevado en respuesta a estrés ácido, porque en estas condiciones incrementa la expulsión de protones en mayor medida que el control silvestre. Esta activación en la expulsión de protones, no ocurre mediante una modificación covalente de la H^+ -ATPasa de PM.

4.13 Medida del potencial de membrana del mutante y el control

Dado que, en condiciones de estrés ácido, el mutante *wat1-ID* es capaz de expulsar los protones de forma más eficaz que el control silvestre, cabría esperar que, en estas condiciones, se observara una hiperpolarización de la membrana más pronunciada en el mutante que en el caso del control silvestre. Por ello, se midió el potencial de membrana de la epidermis radicular del mutante y el control en un experimento de perfusión con ácido acético

En la Figura 4.50 podemos observar como el potencial inicial (en condiciones normales) es similar en el control y el mutante. Este resultado era esperable, ya que el mutante no muestra mayor expulsión de protones en condiciones normales. Al añadir el ácido acético, el potencial de membrana del control aumenta de forma clara (valor más negativo). Este aumento es consecuencia de la mayor expulsión de protones observada.

En el caso del mutante, el comportamiento es diferente, ya que la hiperpolarización de la membrana observable al añadir acético es mucho menor (incremento de 6 mV frente a 23 mV en el caso del control) (Figura 4.50B).

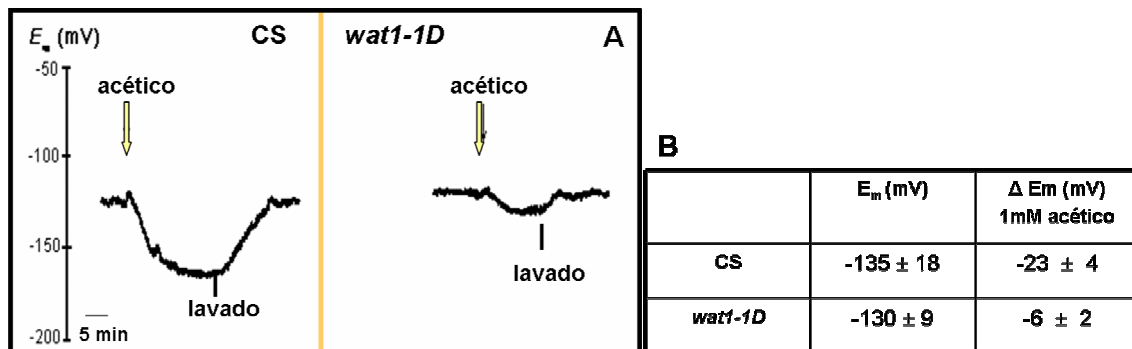


Figura 4.50: Medida del potencial de membrana del mutante $wat1-1D$ y el control tras añadir 1 mM de ácido acético, y después de su lavado. A) La gráfica muestra la variación del potencial de membrana (E_m) de células epidérmicas de la raíz al tratar con 1mM de ácido acético, y tras su lavado. Las plantas tratadas habían crecido previamente en medio MS sólido durante 10-15 días. **B)** La Tabla muestra los valores de E_m del mutante y el control previamente al tratamiento, y la variación de E_m producida al añadir 1mM de ácido acético. Los datos representan la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Estos resultados indican que, en condiciones de estrés ácido, el control silvestre responde activando su H^+ -ATPasa (y, tal vez, también otros transportadores de salida de protones), tratando de expulsar el exceso de protones al medio externo. Como consecuencia, se observa un incremento en su potencial de membrana. Como se ha demostrado en el apartado anterior, el mutante $wat1-1D$, expulsa más protones al exterior que el control en condiciones de estrés ácido, sin embargo, la variación del potencial de membrana que se observa en el mutante es muy pequeña. Este dato indica que la salida de protones al exterior celular se está compensando de algún modo, o bien mediante la entrada de cationes o mediante la salida de aniones.

4.14 Toma de rubidio en condiciones normales y en condiciones de estrés por ácido acético

Como se comentó en la introducción, el principal sistema empleado por las células para evitar una excesiva hiperpolarización de la membrana plasmática provocada por la salida de protones, es la toma de potasio del medio externo. Por este

motivo, se quiso determinar si la toma de este catión estaba incrementada en el mutante *wat1-ID* tanto en condiciones normales como en presencia de ácido acético.

Debido a su importancia fisiológica, las plantas acumulan potasio en el citosol hasta alcanzar concentraciones del orden de 100-200 mM. Por este motivo, la toma de potasio a tiempos cortos se realizó empleando rubidio como análogo estructural, que puede utilizar los mismos sistemas de entrada a la célula que el potasio.

En la Figura 4.51A se observa como la velocidad inicial de toma de rubidio es similar en el mutante *wat1-ID*, y el control silvestre. Este resultado es consistente con los datos anteriores que muestran que, en condiciones normales, el potencial de membrana, la salida de protones, y el pH es similar en el mutante y el control. En presencia de ácido acético, la toma de rubidio se incrementa tanto en el mutante como en el control. Sin embargo, el mutante *wat1-ID* presenta en estas condiciones, una velocidad de toma de rubidio significativamente mayor que el control silvestre (Figura 4.51B).

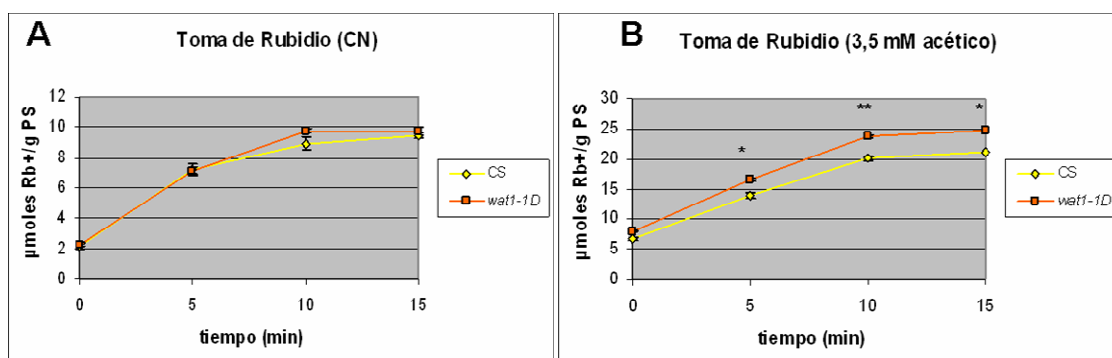


Figura 4.51: Toma de rubidio a tiempos cortos en presencia o ausencia de ácido acético. Contenido en rubidio de plantas crecidas durante 13 días en medio MS líquido y transferidas a medio sin potasio suplementado con 10 mM RbCl (A) y con 3,5 mM de ácido acético (B) durante 0-15 minutos. Las barras de error representan el error estándar de 3 repeticiones biológicas.

Por lo tanto, en condiciones de estrés ácido, la toma de potasio (Rb) es más eficaz en el mutante *wat1-ID*, y como consecuencia de la mayor entrada de potasio, se favorece la acción de la H^+ -ATPasa, u otros transportadores que expulsan protones, ya que se evita la excesiva hiperpolarización de la membrana plasmática. De este modo, *in vivo*, el mutante expulsa los protones en mayor medida y mantiene un pH más alcalino que el control. Sin embargo, esta activación de la expulsión de protones no es observable *in vitro* ya que no se debe a una modificación covalente.

Una vez comprobado que el mutante era capaz de tomar inicialmente Rb con mayor velocidad que el mutante en presencia de ácido acético, se quiso conocer la cinética de toma de rubidio a tiempos más largos. La Figura 4.52 muestra como la diferencia observada inicialmente en el contenido de rubidio entre el mutante y el control, se reduce a tiempo más largos, y no resulta significativa a partir de los 30 minutos.

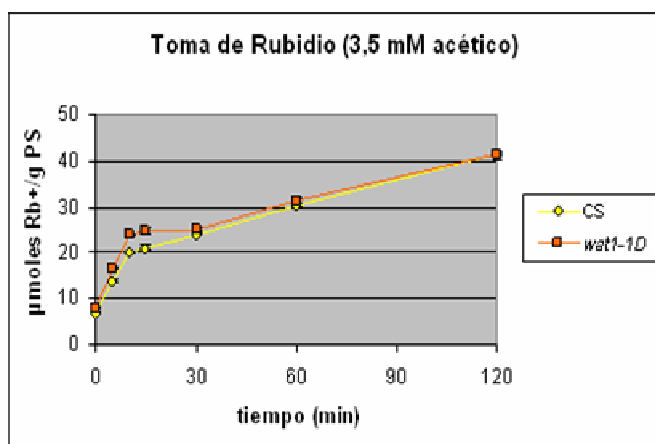


Figura 4.52: Toma de rubidio en condiciones de estrés por ácido acético. Contenido en rubidio de plantas crecidas durante 13 días en medio MS líquido y transferidas a medio sin potasio suplementado con 10 mM RbCl y con 3,5 mM de ácido acético durante 0-120 minutos. Las barras de error representan el error estándar de 3 repeticiones biológicas.

4.15 Toma y acumulación de cationes en el mutante *wat1-1D*

Dado que el mutante *wat1-1D* es más tolerante a cloruro sódico, y más sensible a cloruro de litio, resulta de interés analizar la toma y acumulación de estos cationes en el mutante en comparación con el control. Asimismo, se midió la toma de rubidio y la acumulación de potasio, debido a su importancia en la homeostasis de cationes en la célula vegetal.

4.15.1 Ensayos realizados en plántulas completas

A) Toma y acumulación de sodio:

En primer lugar se midió el contenido en sodio de plántulas crecidas durante 13 días en medio MS líquido y tratadas con 125 mM de sodio durante diferentes tiempos.

Como se observa en la Figura 4.53, a partir de los 30 minutos el contenido en sodio del mutante es estadísticamente menor que el del control (con un grado de significación del 0,1% a los 30 y 120 minutos y del 0,05% a los 60 minutos). Asimismo, la acumulación de sodio en el mutante, tras dos días de tratamiento, es significativamente menor en el mutante que en el control. Este resultado es coherente con el hecho de que el mutante *wat1-1D* tolera mejor el estrés por NaCl, tanto en el

estadio de germinación y establecimiento de la plántula, como en etapas posteriores del desarrollo.

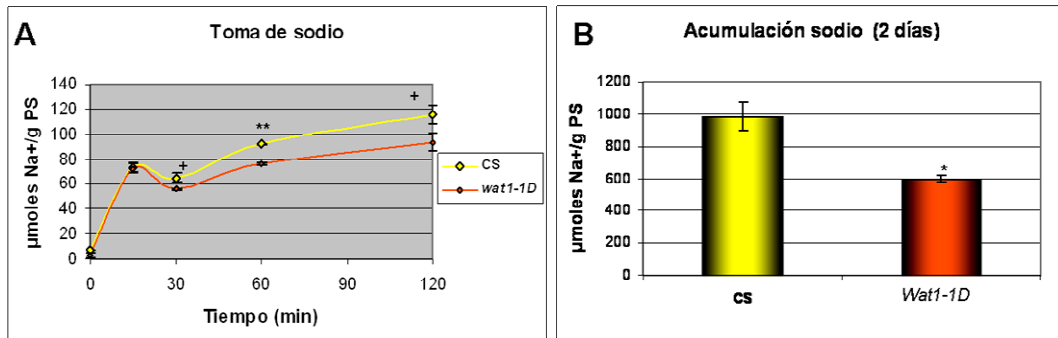


Figura 4.53: Toma y acumulación de sodio. Contenido en sodio de plantas crecidas durante 13 días (A) u 11 días (B) en medio MS líquido y transferidas a medio MS suplementado con 125 mM NaCl durante 0-120 minutos (A) o 2 días (B). Las barras de error representan el error estándar de tres repeticiones biológicas.

B) Toma y acumulación de litio:

En el caso de la toma de litio, no se observan diferencias significativas entre el mutante y el control a tiempos cortos. Sin embargo, de forma contraria a lo esperable, la acumulación de litio tras dos días de tratamiento es significativamente menor en el mutante que en el control silvestre. Por lo tanto, a pesar de tener una menor acumulación de litio, el mutante *wat1-ID* es más sensible a este catión tóxico, tanto en condiciones de cultivo *in vitro* como en invernadero.

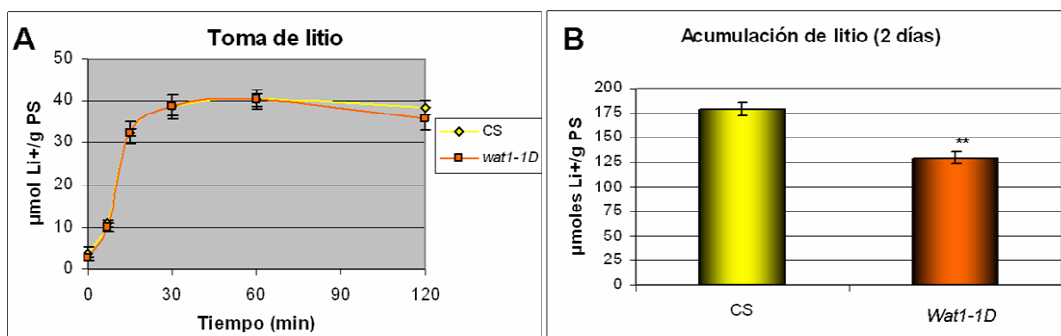


Figura 4.54: Toma y acumulación de litio. Contenido en litio de plantas crecidas durante 13 días (A) u 11 días (B) en medio MS líquido, y transferidas a medio MS suplementado con 25 mM LiCl durante 0-120 minutos (A) o 2 días (B). Las barras de error representan el error estándar de 3 repeticiones biológicas.

C) Toma y acumulación de potasio:

Para estudiar la toma de potasio, se empleó rubidio como análogo estructural, tal y como se explicó en el apartado 4.14. En la Figura 4.55A, se observa que no existen

diferencias significativas en la toma de rubidio entre los 0 y 120 minutos entre el mutante y el control.

El análisis de la acumulación de potasio se llevó a cabo tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés por NaCl. La Figura 4.55B, muestra que la acumulación de potasio tras 13 días de crecimiento en medio líquido es significativamente mayor en el mutante que en el control tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés salino. Es importante destacar, que la acumulación de potasio en condiciones de estrés salino es menor que en condiciones normales, tanto en el mutante como en el control. Este resultado es esperable, dado que, como se comentó en la introducción, la presencia de sodio puede inhibir la toma de K^+ .

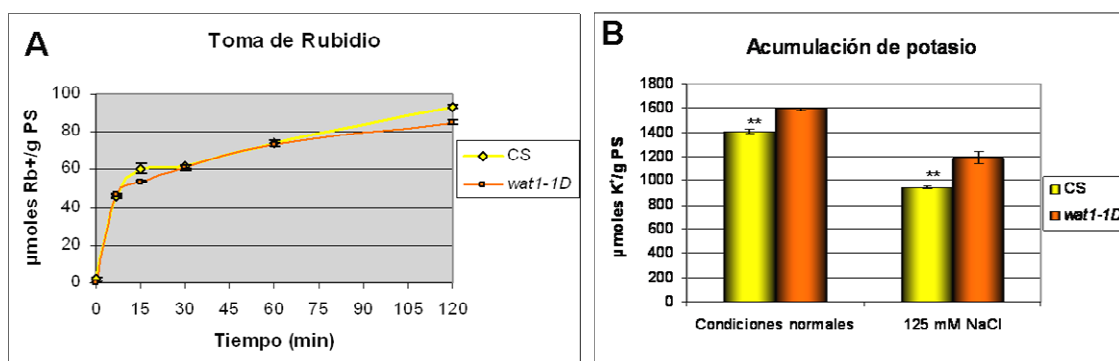


Figura 4.55: Toma de rubidio y acumulación de potasio. A) Contenido en rubidio de plantas crecidas durante 13 días en medio MS líquido y transferidas a medio sin potasio suplementado con 50 mM RbCl durante 0-120 minutos. B) Contenido en potasio de plántulas crecidas durante 11 días en medio MS líquido y transferidas a medio MS líquido (condiciones normales) o medio MS líquido suplementado con 125 mM NaCl (125 mM NaCl) durante 2 días. Las barras de error representan el error estándar de 3 repeticiones biológicas.

D) Acumulación de rubidio:

El hecho de que el mutante acumule más potasio que el control, contrasta con su sensibilidad al crecimiento en medio con potasio limitante (apartados 4.2.1 E y 4.2.2 D). Una posible explicación, es que el sistema que incrementa la acumulación de potasio en el mutante, funcione únicamente en el rango de baja afinidad, y no a las concentraciones de potasio empleadas en el medio limitante (10 μ M).

Para comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo de acumulación de rubidio (empleado como análogo del potasio), en medio sin potasio suplementado con 10 μ M RbCl. La Figura 4.56 muestra como en estas condiciones, el mutante *wat1-1D* también es capaz de acumular más rubidio (y por tanto potasio) que el control.

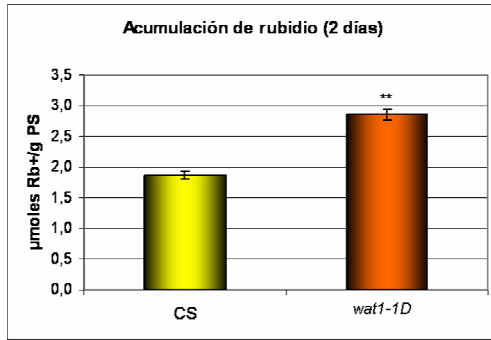


Figura 4.56: Acumulación de rubidio (alta afinidad).

Contenido en rubidio de plántulas crecidas durante 11 días en medio MS líquido y transferidas a medio sin potasio suplementado con 10 µM RbCl durante 2 días. Las barras de error representan el error estándar de 3 repeticiones biológicas.

Por lo tanto, se concluye que el mecanismo que favorece la acumulación de potasio en el mutante funciona tanto en el rango de baja afinidad como en el de alta afinidad, de modo que debe existir otra explicación para el fenotipo de sensibilidad del mutante en medio con bajo potasio.

4.15.2 Ensayos de acumulación de cationes en raíz y parte aérea

El hecho de que no existan diferencias, entre el mutante *wat1-1D* y el control, en las velocidades iniciales de toma de los diferentes cationes, parece indicar que las diferencias observadas en la acumulación de los mismos no se deben a una alteración en la toma a nivel de la epidermis radicular. Una explicación alternativa, es que el mutante presente una alteración en la carga de cationes en el xilema. Para comprobar esta hipótesis, se determinó si la diferente acumulación de cationes ocurre a nivel de raíz o a nivel de la parte aérea. Para ello, se cultivaron las plantas en cultivo hidropónico y se midió por separado el contenido de cationes en raíz y parte aérea.

A) Acumulación de sodio:

En el caso del sodio, se observó que no existen diferencias significativas entre el mutante y el control en la parte aérea (Figura 4.57B). Sin embargo, el contenido en NaCl de las raíces del mutante es significativamente menor que el del control.

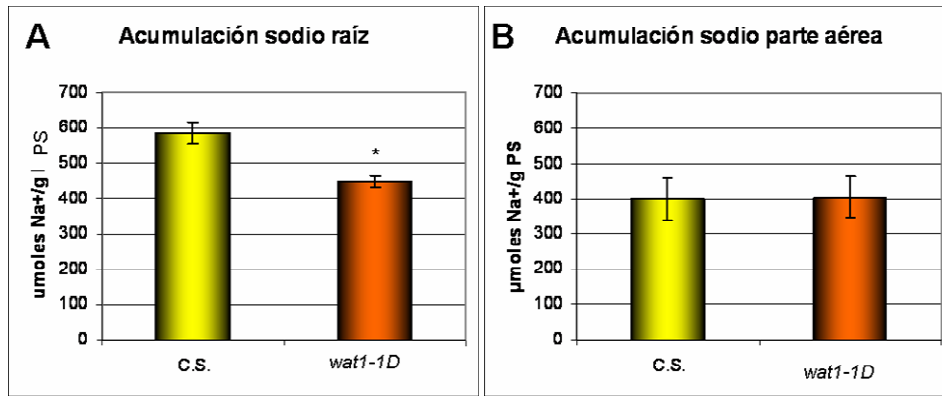


Figura 4.57: Acumulación de sodio en raíz y parte aérea. Contenido en sodio de la raíz (A) o la roseta (B) de plantas crecidas en cultivo hidropónico durante 6 semanas, y tratadas con 125 mM NaCl durante 2 días. Las barras de error representan el error estándar de 4 repeticiones biológicas.

B) Acumulación de litio:

El ensayo realizado con cloruro de litio, mostró que el mutante acumula una menor cantidad de este catión tanto en la parte aérea como en la raíz. Sin embargo, la mayor diferencia se observa en la raíz del mutante (Figura 4.58A). De hecho, las diferencias existentes en la raíz son significativas con un nivel de confianza del 99,99% (**), mientras que las diferencias observadas en la parte aérea resultan significativas únicamente con un nivel de confianza del 99,9 % (+).

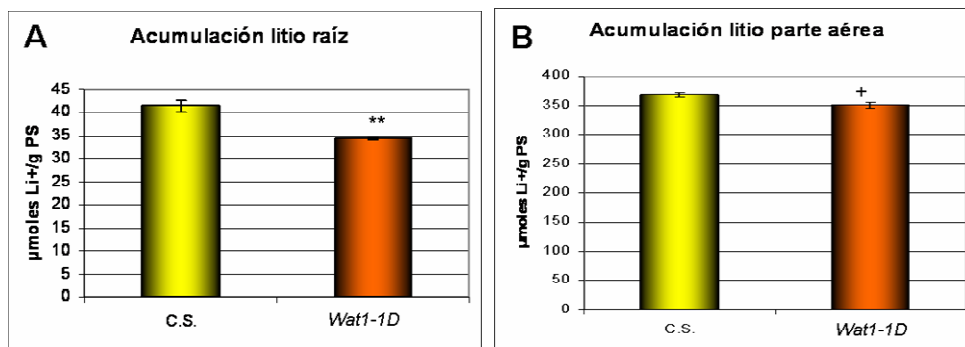


Figura 4.58: Acumulación de litio en raíz y parte aérea. Contenido en litio de la raíz (A) o la roseta (B) de plantas crecidas en cultivo hidropónico durante 6 semanas, y tratadas con 25 mM LiCl durante 2 días. Las barras de error representan el error estándar de 4 repeticiones biológicas.

C) Acumulación de potasio:

En el caso del potasio, se observó que el mutante acumulaba una mayor cantidad tanto en la raíz como en la parte aérea de la planta (Figura 4.59). Las diferencias son significativas con un nivel de confianza del 99,5% y del 99,9% respectivamente.

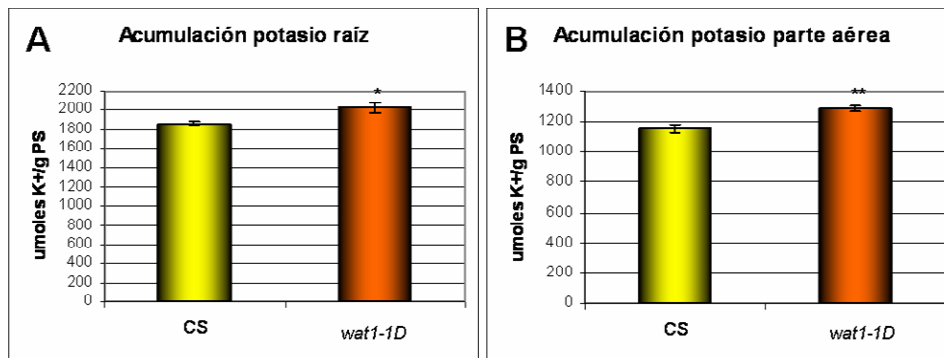


Figura 4.59: Acumulación de potasio en raíz y parte aérea. Contenido en potasio de la raíz (A) o la roseta (B) de plantas crecidas en cultivo hidropónico durante 6 semanas. Las barras de error representan el error estándar de 4 repeticiones biológicas.

En base a estos resultados, se concluye que la mayor toma de potasio puede deberse a una mayor carga en el xilema, pero el menor contenido en litio y sodio, no se explicaría por su menor transporte a la parte aérea.

4.16 Estudio de la relación entre ácido acético y abscísico

4.16.1 Fenotipos en presencia de acético de mutantes en biosíntesis o ruta de señalización por ABA

Considerando que el mutante *wat1-1D*, capaz de germinar mejor en presencia de ácido acético, muestra también cierta insensibilidad a la inhibición de la germinación y el crecimiento provocado por ABA, se quiso comprobar el fenotipo de algunos mutantes y líneas transgénicas afectadas, bien en su contenido o en su sensibilidad a ABA.

En la Figura 4.60 se muestra como la línea que sobreexpresa la proteína fosfatasa 2: HAB1, cuya sensibilidad a ABA es menor (Saez *et al.*, 2004), muestra también insensibilidad a acético en el estadio de germinación y establecimiento de la plántula. Del mismo modo, el mutante en la alcohol deshidrogenasa *aba2-11*, deficiente en la biosíntesis de ABA, también es capaz tolerar mejor ácido acético en este estadio.

Con respecto a los mutantes hipersensibles a abscísico *abil-2* y *hab1-1*, el fenotipo observado es el contrario. Concretamente, el mutante *abil-2* muestra un menor porcentaje de cotiledones verdes que el control en estas condiciones. En el caso del mutantes simple *hab1-1*, esta diferencia no resulta significativa, pero el doble mutante *abil-2 hab1-1*, muestra una sensibilidad incluso mayor que la presentada por el mutante simple *abil-2*.

Estos resultados parecen indicar que los mutantes insensibles a ABA, o deficientes en su síntesis, son capaces de tolerar mejor el ácido acético en el estadio de germinación y establecimiento de la plántula. Por el contrario, mutantes hipersensibles a ABA, muestran una mayor sensibilidad a acético en estas condiciones.

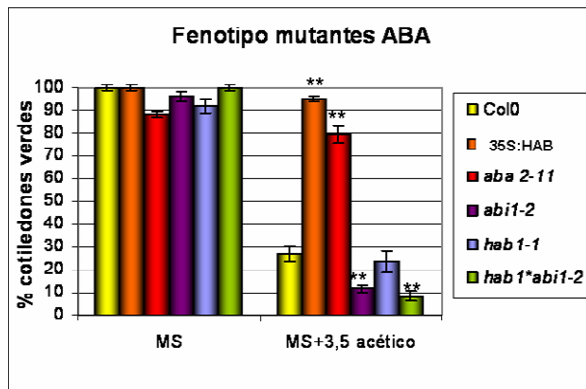


Figura 4.60: Fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes afectados en la biosíntesis o sensibilidad a ABA. Porcentaje de cotiledones verdes tras 5 días de crecimiento en medio MS y MS suplementado con 3,5 mM ácido acético. Las columnas representan la media y error estándar de 4 repeticiones independientes.

4.16.2 El ácido acético promueve la síntesis de ABA

En base a los resultados anteriores, se quiso comprobar si la inhibición del crecimiento que provoca el ácido acético, ocurre a través de la síntesis de ABA. Para ello, se hicieron dos tipos de ensayos de medida de ABA tras tratar con ácido acético.

En primer lugar, se hicieron germinar semillas en presencia de 3,5 mM de ácido acético, y a los 6 días se midió su contenido en ABA, en comparación con el de las plántulas crecidas en medio MS control. Como se observa en la Figura 4.61B, el contenido en ABA de las plántulas germinadas en presencia de ácido acético, es significativamente mayor que el del control. En este mismo ensayo, se dejaron crecer las plántulas en presencia de acético dos días más, hasta tener un tamaño semejante al que mostraban las plántulas crecidas en MS a los 6 días (Figura 4.61A). Entonces, se midió el contenido en ABA, observándose que era similar al contenido de las plántulas crecidas en presencia de MS durante 6 días.

Este resultado podría indicar que el acético inhibe el crecimiento promoviendo la síntesis de ABA, por lo que las plantas con su crecimiento retrasado (MS + acético; 6 días), tienen un contenido en ABA mayor que las control (MS 6 días), pero las plantas con un fenotipo similar al del control a los 6 días (MS + acético; 8 días), no poseen un contenido mayor. Sin embargo, este resultado también podría significar, que el contenido en ABA de las plántulas depende del estado fisiológico de las mismas, siendo mayor en los primeros días tras la germinación y decreciendo a medida que avanza el tiempo. De este modo, las plántulas germinadas en presencia de ácido acético, que

muestran un retraso en el desarrollo, poseen un mayor contenido en ABA a los 6 días que el control, pero no a los 8 días, cuando el estadio de desarrollo se asemeja al de las plántulas control a los 6 días.

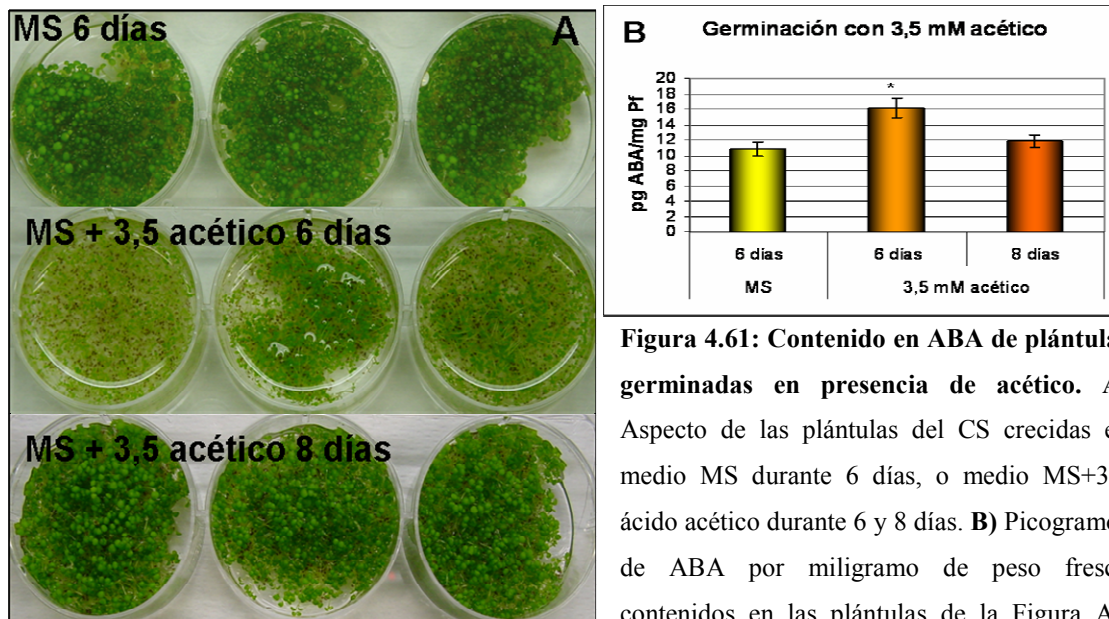


Figura 4.61: Contenido en ABA de plántulas germinadas en presencia de acético. A) Aspecto de las plántulas del CS crecidas en medio MS durante 6 días, o medio MS+3,5 ácido acético durante 6 y 8 días. **B)** Picogramos de ABA por miligramo de peso fresco contenidos en las plántulas de la Figura A).

Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas independientes.

Para comprobar si el ácido acético, induce efectivamente la síntesis de ABA, o el resultado observado, era debido al diferente estadio fisiológico de plántulas estudiadas, se realizó un ensayo germinando las plántulas en MS, y transfiriéndolas a MS suplementado con ácido acético durante 24 horas. Tras el tratamiento, se midió el contenido en ABA. De este modo, al realizar el tratamiento, las plántulas se encuentran en un estadio equivalente, y este tratamiento es suficiente para provocar una detención del crecimiento.

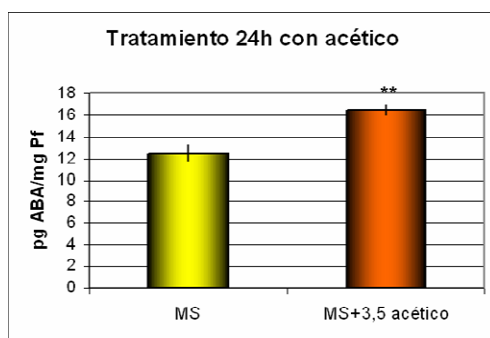


Figura 4.62: Contenido en ABA de plántulas germinadas en MS y tratadas con ácido acético durante 24 horas. Picogramos de ABA por miligramo de peso fresco de plántulas crecidas 6 días en MS y transferidas a medio MS o MS+ 3,5 mM ácido acético durante 24 horas. Cada columna representa la media y error estándar de tres repeticiones biológicas independientes.

En la Figura 4.62, se observa que el contenido en ABA de las plántulas tratadas con ácido acético durante 24 horas, es significativamente mayor que el de las plántulas sin tratar. Es decir, el ácido acético induce, efectivamente, la síntesis de ABA.

4.17 Respuesta transcripcional al estrés por ácido acético

Con el objetivo de determinar cuál es la respuesta de una célula a la bajada de pH intracelular provocada por el ácido acético, se realizó un análisis transcriptómico, comparando la expresión génica en muestras tratadas con ácido acético (3,5 mM durante 2 horas) y muestras sin tratar. Se realizaron 4 réplicas biológicas, y tras el procesamiento de los datos y el análisis estadístico se determinó que 1241 genes variaban significativamente su expresión: 392 genes se inducían por el estrés ácido y 849 se reprimían.

Con estos resultados, en primer lugar, se quiso determinar si alguna categoría funcional estaba sobre-representada en la lista de genes inducidos o reprimidos en comparación con el genoma completo de la *A. thaliana*. Para ello, se empleó la aplicación FatiGO que se encuentra disponible en la siguiente página web <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/functional.html>. De este modo, se pretendía tener una visión global de las respuestas provocadas en la célula, por el tratamiento con ácido acético. Los anejos III y IV muestran el resultado de este análisis.

En relación a los genes inducidos, se observa que categorías funcionales relacionadas con la respuesta a estreses abióticos (concretamente luz, calor, hipoxia y estrés oxidativo), se encuentran sobre-representadas. Asimismo, existe un enriquecimiento en genes involucrados en el plegamiento de proteínas. Este enriquecimiento tiene una estrecha relación con el del estrés por calor, que provoca desnaturalización de proteínas. Por otro lado, se observa un enriquecimiento en la categoría “*drug transport*”, que incluye transportadores que pueden estar implicados en la expulsión de sustancias tóxicas. Concretamente se ha encontrado sobre-representada la categoría de transporte de antibióticos. Por lo tanto, la célula parece activar una respuesta a estrés, y probablemente, active determinados transportadores para expulsar el acetato del interior celular. En cuanto a los genes reprimidos, las categorías sobre-representadas se relacionan con el metabolismo (de compuestos aromáticos, biosíntesis de enterobactina, y péptidos) y con la respuesta a estímulos como el ácido jasmónico o la herida.

Por otro lado, se quiso conocer la función de los genes que variaban su expresión en mayor medida. Para ello, se escogieron aquellos genes con variación estadísticamente significativa, y que se encontraban, al menos en 3 de las 4 micromatrices, más de 3 veces inducidos o más de 4 veces reprimidos. De los 392 genes

inducidos, 64 cumplían estos requisitos. En el caso de los genes reprimidos, de los 849 se seleccionaron 107. En los anejos V y VI se detallan estos genes agrupados por categorías funcionales.

Es interesante destacar, que entre los genes más inducidos se encuentran varios antiportadores con protones implicados en la toma de nutrientes del medio como PHT1, PHT2 y SEL1/SULTR1;2, que muestran niveles de inducción mayores de 3,5 veces. Por otra parte, entre los genes inducidos, se encuentran dos HSF “*Heat Shock Factors*” (HSFA2 y HSFA5) y varias HSP “*Heat Shock Proteins*”, proteínas con actividad “chaperona” (protección, desagregación y plegamiento de proteínas) típicamente inducidas por tratamientos con calor. Este resultado es coherente con el análisis anterior que mostraba que la categoría funcional de respuesta a calor se encontraba sobre-representada en los genes inducidos.

En base a estos resultados, se quiso comparar la respuesta transcripcional obtenida con el tratamiento con ácido acético, con la propia del estrés por alta temperatura. Para ello se emplearon datos de micromatrices disponibles en la base de datos NASCArrays (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>), y se dibujaron diagramas de Venn que representan los genes específicos de cada experimento y aquellos comunes para ambos ensayos, empleando la página web: <http://www.bioinformatics.org/gvenn/index.htm>.

Mediante este análisis, se observó que aproximadamente el 30% de los genes inducidos en la micromatriz con acético, se inducen por un tratamiento de 1 hora de calor (Figura 4.63A). Sin embargo, sólo el 10% de los genes inducidos por acético se inducen tras un tratamiento de calor de 3 horas de duración. Considerado ambos tratamientos (1 y 3 horas de calor), el 32% de los genes inducidos por acético se inducen por calor. Por lo tanto, existe una coincidencia importante en la respuesta inducida por ambos estreses.

Como se comentó en la introducción, algunos trabajos previos han estudiado la respuesta de las plantas a la acidificación del medio exterior. Entre ellos, se ha llevado a cabo una aproximación transcriptómica para estudiar los cambios en la expresión génica producidos en respuesta a un bajo pH externo (Lager *et al.*, 2010).

Para conocer si los efectos de la acidificación externa, se asemejan o no a los obtenidos mediante tratamientos con ácidos débiles (acidificación interna), se realizó el mismo análisis explicado anteriormente, comparando los datos obtenidos por Lager y colaboradores, con los obtenidos en la presente tesis doctoral.

El resultado de este análisis se muestra en la Figura 4.63B. De esta figura se concluye que, de los genes inducidos por ácido acético, tan sólo el 8,7% y el 6,4% se inducen tras 1 y 8 horas, respectivamente, de tratamiento con bajo pH externo. Esta baja coincidencia es esperable considerando que la mayoría de genes inducidos en respuesta a bajo pH externo están implicados en la respuesta a estreses bióticos o auxinas (Lager *et al.*, 2010), categorías funcionales que no aparecen representadas en los genes inducidos por acético.

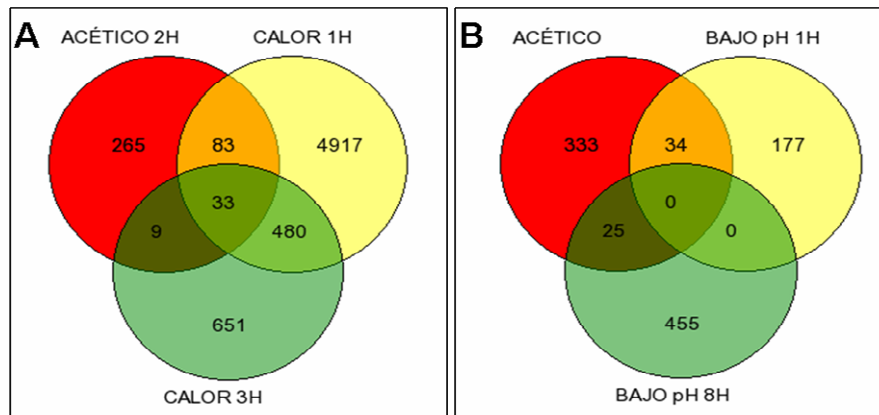


Figura 4.63. Diagramas de Venn comparando los genes inducidos en respuesta a estrés por ácido acético, con los inducidos por calor (1 y 3 horas a 38°C) (A) o por bajo pH externo (pH=4,5) (B). En el anejo VII se indican las condiciones concretas de cada experimento.

Para corroborar este dato, se realizó una comparación de los genes inducidos por acético con los inducidos tras un tratamiento con auxinas y tras una infección con *Pseudomonas syringae* (Figura 4.64).

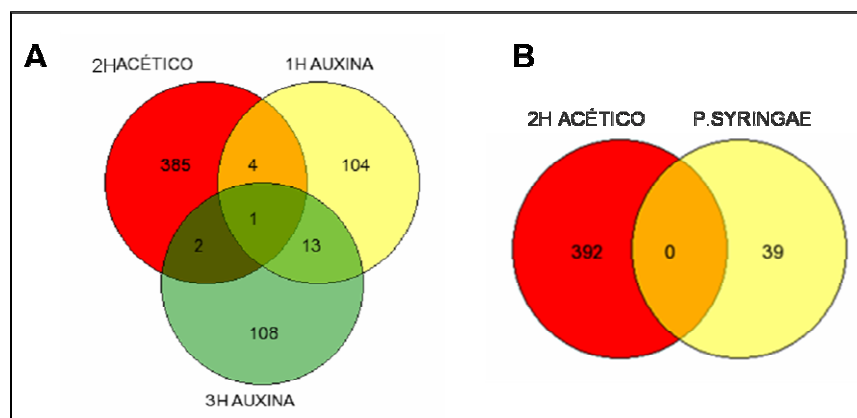


Figura 4.64. Diagramas de Venn comparando los genes inducidos en respuesta a estrés por ácido acético, con los inducidos al tratar con ácido indolacético (1 µM durante 1 y 3 horas) (A) o tras 4 horas de infectar con *P. syringae* (B). En el anejo VII se indican las condiciones concretas de cada experimento. IAA: ácido indolacético.

La Figura 4.64 muestra como la coincidencia entre la respuesta transcripcional a ácido acético y a la auxina o al estrés biótico es prácticamente inexistente. Concretamente, de los genes inducidos por acético, menos del 2% se inducen por auxina (1 ó 3 horas), y ninguno se induce por *P. syringae*.

Por último, se quiso comparar los genes inducidos en respuesta a acético con los inducidos en respuesta a otros estreses abióticos, como el estrés osmótico o el estrés oxidativo. De los datos de la Figura 4.65A se extrae que del total de genes inducidos un 10,7% y un 5,6% se inducen en respuesta a 1 y 3 horas, respectivamente, de tratamiento con estrés osmótico. En el caso del estrés oxidativo, la coincidencia es prácticamente inexistente (Figura 4.65B), la pesar de que el análisis realizado con FATIGO incluía esta categoría como una de las sobre-representadas. Esta incongruencia puede deberse a que en el experimento de estrés oxidativo relativamente pocos genes variaban su expresión.

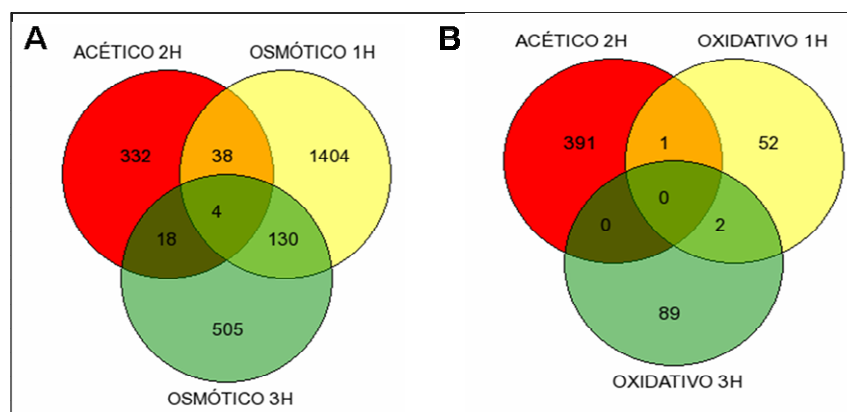


Figura 4.65. Diagramas de Venn comparando los genes inducidos en respuesta a estrés por ácido acético, con los inducidos por estrés osmótico (300 mM manitol durante 1 y 3 horas) (A) o por estrés oxidativo (B). En el anejo VII se indican las condiciones concretas de cada experimento. IAA: ácido indolacético.

En cuanto a los genes reprimidos, como se ha comentado anteriormente, de los 1241 genes cuya expresión varía significativamente, 392 genes se induce por el estrés ácido y 849 se reprime. Es decir, casi un 70% de los genes que varían su expresión, se reprime en respuesta a acético. Asimismo, como se muestra en el anejo IV, gran parte de estos genes están implicados en el metabolismo celular.

En base a los resultados obtenidos con los genes inducidos, se quiso comparar los genes reprimidos en respuesta a acético con los reprimidos frente al estrés por un

bajo pH externo, así como frente a los estreses abióticos que se mostraban más similares: calor y estrés osmótico.

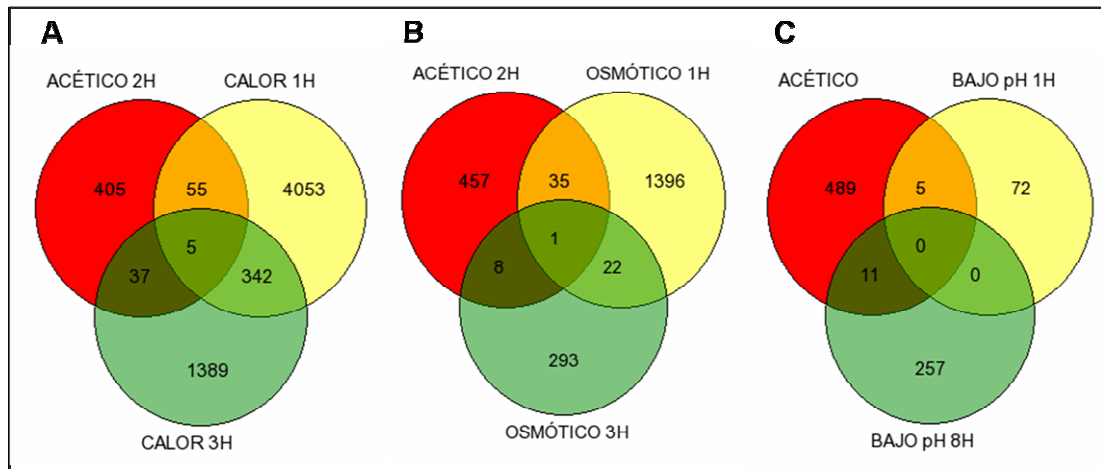
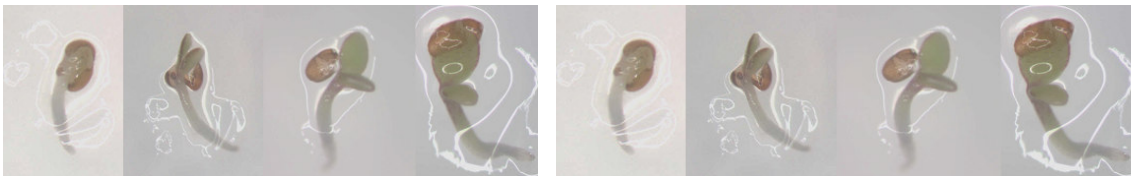


Figura 4.66. Diagramas de Venn comparando los genes reprimidos en respuesta a estrés por ácido acético, con los reprimidos por calor (1 y 3 horas a 38°C) (A) por estrés osmótico (300 mM manitol durante 1 y 3 horas) (B) o por bajo pH externo (pH=4,5) (C). En el anejo VII se indican las condiciones concretas de cada experimento.

La Figura 4.66 muestra como, en el caso de los genes reprimidos, la coincidencia es, en general, menor que al considerar los genes inducidos. Concretamente, del total de genes reprimidos por acético un 11,95% y un 8,36% se reprimen por calor (1 y 3 horas respectivamente), un 7,18% y un 1,8% se reprimen por estrés osmótico (1 y 3 horas respectivamente) y un 1% y un 2,2% se reprimen por estrés con bajo pH externo (1 y 8 horas respectivamente). Es decir, la represión génica que ocurre en respuesta a los diferentes estreses es más variable que la inducción de los genes.

Por último, como dato curioso, destacar que, en todas las comparaciones realizadas, se observa que los genes cuya expresión varía tras 2 horas de tratamiento con acético, siempre se asemejan más a los que varían tras 1 hora con el resto de estreses que a los modificados tras 3 horas. Es decir, los resultados sugieren que un tratamiento de 2 horas causa cambios en la expresión génica más similares a un tratamiento de 1 hora que a un tratamiento de 3 horas.

5- DISCUSIÓN



5.1 Aislamiento y caracterización genética del mutante *wat1-1D*

En la presente tesis doctoral se han empleado ácidos débiles para provocar una bajada del pH citosólico con el objetivo de aislar y caracterizar mutantes resistentes a acidificación intracelular, y por tanto, con alteraciones en la homeostasis de pH. Con este abordaje de genética directa, se pretende abrir un nuevo campo de estudio de mecanismos moleculares implicados en la homeostasis de pH intracelular en plantas.

5.1.1 Rastreo en germinación y establecimiento de la plántula

El rastreo llevado a cabo en este trabajo se ha realizado en el estadio de germinación y establecimiento de la plántula, ya que los ensayos de aparición de cotiledones en placas Petri permiten el rastreo de cientos de miles de semillas, en muy poco espacio. Esta decisión puede ser criticada ya que existen claras diferencias en el desarrollo vegetal durante la germinación y establecimiento de las plántulas en comparación con estadios posteriores, por lo que fenotipos observados en germinación, podrían no mantenerse en la planta adulta. Sin embargo, el rastreo realizado en este trabajo, ha resultado útil para encontrar un mutante con una alteración en la homeostasis de pH, y de otros cationes, en diferentes etapas del desarrollo.

5.1.2 Empleo de líneas “*activation tagging*”

En nuestro trabajo se ha empleado una colección de mutantes con sobreexpresión al azar de genes, por inserción de un activador transcripcional “*activation tagging*”. El empleo de este tipo de líneas mutantes pretende obtener mutaciones dominantes por ganancia de función de genes adyacentes al T-DNA. Sin embargo, trabajos previos empleando esta técnica, indican que los resultados obtenidos pueden ser muy diversos.

En algunos estudios el fenotipo objeto de estudio no se debe a la inserción del T-DNA (González-Guzmán *et al.*, 2002), por lo que resulta necesario realizar un mapeo posicional para encontrar la mutación de interés. En otros trabajos en los que la inserción correlaciona con el fenotipo, se han aislado tanto mutantes dominantes por ganancia de función (Xu *et al.*, 2005; Alejandro *et al.*, 2007), como mutantes recesivos,

por pérdida de función del gen en el que se inserta el T-DNA (González-Guzmán *et al.*, 2004).

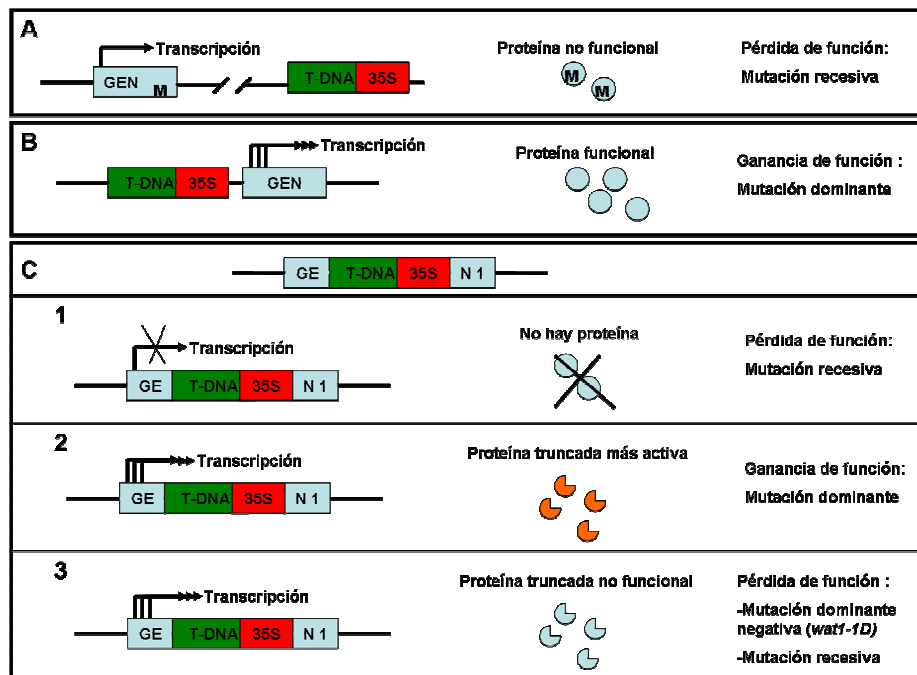


Figura 5.1: Algunos de los posibles efectos de la inserción de T-DNA con activador transcripcional. A) Ausencia de correlación entre fenotipo y T-DNA. El fenotipo se debe a otra mutación (M), normalmente recesiva, independiente de la inserción de T-DNA. La proteína mutada no es funcional. **B) Inserción del T-DNA en una región intergénica.** El fenotipo del mutante podría deberse a la sobreexpresión del gen aguas abajo de la inserción, o del gen aguas arriba de la inserción (Nakazawa *et al.*, 2003). **C) Inserción de un T-DNA en la región codificante de un gen. 1-** El gen interrumpido no se expresa o disminuye su expresión (mutación recesiva por pérdida de función). **2-** El gen interrumpido (sobre)expresa una versión truncada, y la proteína resultante es más activa, por haber eliminado un dominio inhibidor (mutación dominante por ganancia de función). **3-** El gen interrumpido sobreexpresa una proteína truncada que no es funcional y que puede inhibir la función de otra copia normal del gen (mutación dominante negativa) o simplemente reducir la función del gen (mutación recesiva).

En este trabajo, la caracterización genética del mutante *wat1-ID* ha determinado que sobreexpresa una versión truncada del gen At3g55480. La expresión de una versión truncada de un gen no siempre provoca una pérdida de función de dicho gen, sino que también puede causar un incremento en la actividad de la proteína, por ejemplo si se elimina un dominio inhibidor (Palmgren & Christensen 1993; Gevaudant *et al.*, 2007). Por lo tanto, la proteína resultante, podría ser más activa (mutación dominante por ganancia de función). Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que *wat1-ID* es un mutante dominante negativo. Este resultado, muestra una vez más, la

versatilidad de las colecciones de mutantes “*activation tagging*”, y la variedad de efectos que puede provocar, a nivel genético, la inserción de un T-DNA con activador transcripcional en el genoma (Figura 5.1).

5.1.3 *wat1-1D* es un mutante dominante negativo

Los resultados del análisis genético indican que en el mutante *wat1-1D* se sobreexpresa una versión truncada de la adaptina β_3 , que provoca la pérdida de función del gen *WATI*. Considerando que la adaptina β_3 funciona formando parte de complejos con cuatro subunidades (complejos adaptadores), se concluye que el complejo formado con la adaptina truncada no es funcional.

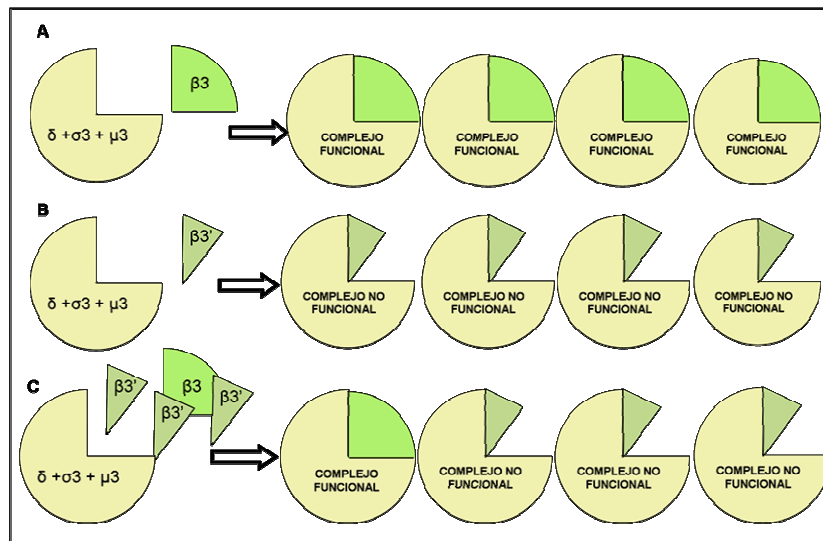


Figura 5.2. Modelo explicativo del carácter dominante negativo de la mutación de *wat1-1D*. Formación del complejo adaptador 3 (AP-3) en el control silvestre (A), el mutante *wat1-1D* (B), y las plantas hemizigotas (C). En las plantas control (A), la adaptina completa (β_3) se une al resto de subunidades, para formar un complejo funcional. En el mutante *wat1-1D* (B), el complejo formado con la adaptina truncada (β_3'), no es funcional. En las plantas hemizigotas (C), la adaptina β_3' , cuya expresión es mayor que la de la adaptina completa, compete con la adaptina β_3 por los sitios de unión al complejo, por lo que predomina el complejo no funcional.

Teniendo esto en cuenta, es posible explicar el carácter dominante negativo de la mutación estudiada en el presente trabajo. Probablemente, en las plantas hemizigotas, la forma truncada de la adaptina β_3 compete con la forma completa por su unión al resto de subunidades del complejo. Dado que la forma truncada se expresaría en mayor medida que la completa, predominarían los complejos cuya adaptina está truncada, que

no son funcionales (Figura 5.2). Por este motivo, las plantas hemizigotas mostrarían un fenotipo semejante al del mutante, y no al del control silvestre.

5.2 *WATI* codifica para la adaptina β del complejo AP-3

5.2.1 *Análisis de la expresión del gen WATI*

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo un análisis bioinformático de la expresión del gen *WATI* en respuesta a estímulos, en diferentes etapas del desarrollo, y en distintos órganos y tejidos. Previamente, Feraru y colaboradores (2010), estudiaron la expresión de la adaptina β 3 en el embrión y en plántulas de 7 días, mediante la expresión del gen reportero GUS fusionado al promotor de la adaptina. Los resultados mostraron una expresión ubicua por el embrión y en toda la plántula (raíz, cotiledones e hipocotilo). Sin embargo, la mayor expresión se localiza en los tejidos meristemáticos de la raíz primaria, en el meristemo apical, así como en las raíces secundarias emergentes, y los cotiledones (Feraru *et al.*, 2010).

Por lo tanto, los datos del análisis bioinformático realizado en la presente tesis doctoral, junto con los trabajos previos, indican que el gen *WATI* se expresa de forma ubicua en diferentes partes y tejidos de la planta, así como en diversos estadios del desarrollo.

5.2.2 *Análisis bioinformático de la proteína WATI*

El análisis bioinformático realizado en el presente trabajo, muestra que en los residuos 790-795 de la adaptina β 3 de *A. thaliana*, se localiza un motivo que corresponde a la secuencia de la “caja clatrina” (Figura 4.38), por lo que podría estar implicado en su interacción con clatrina. A pesar de este resultado, no puede asegurarse que el complejo AP-3 de *A. thaliana* interaccione con clatrina. De hecho, aunque la subunidad β 3A de mamíferos posee el dominio de unión a clatrina, existen resultados contradictorios en relación a la interacción del complejo con esa proteína (revisado en Newell-Litwa *et al.*, 2007), y se ha sugerido que, probablemente, sea capaz de actuar tanto de forma dependiente como independiente de clatrina. Por lo tanto, serán necesarios estudios posteriores para confirmar si el complejo AP-3 de *A. thaliana* actúa interaccionando con clatrina o no.

5.2.3 Efectos de la pérdida de función de subunidades del complejo AP3

Como se comentó en la introducción, las mutaciones en diferentes subunidades del complejo AP-3 en levadura, alteran la distribución de las proteínas que son transportadas a vacuola por la ruta ALP, como la ALP o la Yck3p. En el caso de la fosfatasa alcalina vacuolar (ALP), los mutantes *apm3Δ* y *apl6* (mutados en la adaptina μ y β del complejo AP-3, respectivamente) muestran una acumulación de la proteína ALP en pequeñas vesículas en el citoplasma (Stepp *et al.*, 1997; Cowles *et al.*, 1997). Sin embargo, en los mutantes de levadura *aps3Δ* y *apm3Δ* (con mutaciones en la adaptina σ y μ del complejo AP-3, respectivamente), la Yck3p se localiza en membrana plasmática, en vez de dirigirse a vacuola (Sun *et al.*, 2004). Estudios realizados en mamíferos, corroboran que mutaciones en componentes del complejo AP-3 pueden provocar la deslocalización de proteínas de la membrana del lisosoma a la membrana plasmática, como ocurre con las proteínas LAMP1, LAMP II, y CD63 en mutantes en la adaptina β 3A (Dell'Angelica *et al.*, 1999).

En *A. thaliana*, todavía se desconocen las proteínas que son transportadas a vacuola mediante la ruta en la que interviene el complejo AP-3. Sin embargo, como ya se ha comentado, se ha aislado un mutante de pérdida de función en la adaptina β 3. Este mutante se aisló por poseer un defecto en la distribución del transportador de membrana plasmática PIN1 (Feraru *et al.*, 2010). En este mismo trabajo, se ha demostrado que la adaptina β 3 de *A. thaliana*, es capaz de complementar el defecto en la localización de la proteína ALP existente en mutantes *alp6Δ* de levadura. Este resultado indica que la función de la adaptina β 3 en el transporte de proteínas a vacuola, está conservada en *A. thaliana*.

En base a estos estudios previos, en todas las hipótesis de trabajo planteadas en la presente tesis doctoral, se ha considerado que el complejo AP-3 en *A. thaliana* está implicado en el transporte a vacuola. Por ello, una mutación en la adaptina β 3, podría provocar o bien la falta de algún transportador situado normalmente en el tonoplasto, o la deslocalización a membrana plasmática de dicho transportador, tal y como se ha descrito para mutantes en el complejo AP-3 de levadura y mamíferos.

5.3 Homeostasis de pH en el mutante *wat1-1D*

El mutante *wat1-1D*, se aisló por presentar un mejor fenotipo en presencia de ácido acético, durante la germinación y establecimiento de la plántula. La posterior

caracterización fenotípica del mutante, mostró que es más tolerante a la acidificación intracelular causada por diversos ácidos débiles en los primeros estadios de desarrollo, ya que es capaz de germinar y abrir antes los cotiledones que el control silvestre (Figura 4.6). Sorprendentemente, una vez superado el estadio de germinación y establecimiento de la plántula, el mutante no muestra un mejor fenotipo en presencia de ácido acético (Figuras 4.12 y 4.13). Sin embargo, la medida del pH intracelular en plantas más desarrolladas del mutante durante un tratamiento de perfusión con ácido acético de 10 minutos de duración, muestra que las células de la epidermis radicular mantienen un pH más alcalino que el control silvestre en estas condiciones (Figura 4.14). Mediante ensayos de toma de acetato radiactivo, se comprobó que la velocidad de toma del ácido era la misma en el mutante y el control (Figura 4.39), lo que era esperable, ya que las plántulas, ya germinadas, no muestran un mejor fenotipo en presencia del ácido acético.

Considerando todos estos resultados, se concluye que el mutante *wat1-ID* presenta una alteración en la homeostasis de pH intracelular, por la cual, a pesar de tomar el ácido acético normalmente, no sufre una acidificación significativa del citoplasma. Curiosamente, esta alteración de la homeostasis de pH resulta suficiente para posibilitar la germinación del mutante en presencia de ácidos débiles, pero no aporta un mejor fenotipo a las plántulas más desarrolladas. Esto podría ser debido a que, en plántulas ya germinadas, lo que determina el crecimiento son los meristemos apical y radicular, cuya sensibilidad a ácido acético es mucho más acusada que la mostrada por las semillas y plántulas durante la germinación. De hecho, una concentración de 1 mM de ácido acético, provoca una reducción de aproximadamente un 40% en el peso fresco de las plántulas (Figura 4.12), y del 80% en la elongación de la raíz (Figura 4.13). Sin embargo, la concentración empleada en los ensayos de apertura de cotiledones es mucho mayor (3,5 mM de ácido acético), y sólo genera un retraso en la germinación del control silvestre, que con el paso de los días es capaz de abrir los cotiledones (Figura 4.2). De estos resultados se concluye que, los tejidos de la plántula durante la germinación y apertura de los cotiledones, poseen una mayor protección frente al efecto inhibitorio del ácido acético. Por lo tanto, si en los primeros estadios de desarrollo los tejidos son más tolerantes al ácido, y todos ellos participan en el crecimiento, el mantenimiento de un pH más alcalino en el citosol del mutante, permite la emergencia de la radícula y aparición de cotiledones. Sin embargo, en estadios posteriores, donde únicamente los meristemos (tejidos extremadamente sensibles al ácido) contribuyen al crecimiento, no es suficiente con mantener un pH citosólico más alcalino en la

epidermis de la raíz para mostrar un mejor fenotipo. El motivo por el cual los meristemas muestran una mayor sensibilidad al estrés ácido, podría ser que la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, está muy poco expresada en estos tejidos (Parets-Soler *et al.*, 1990).

A continuación se discuten los distintos ensayos realizados en el presente trabajo, para tratar de determinar el mecanismo por el cual el mutante *wat1-ID* mantiene un pH más elevado en presencia de ácido acético.

5.3.1 “Biochemical pH stat” en el mutante *wat1-ID*

En primer lugar, se quiso estudiar uno de los principales mecanismos que se ha calificado como regulador de la homeostasis de pH a tiempos cortos (Smith y Raven, 1979): la producción y consumo de ácidos carboxílicos o “biochemical pH stat” (Davies, 1986). La carboxilación convierte un ácido débil en fuerte (al contrario que la descarboxilación), ya que el ácido carbónico (pKa 6.4) es más débil que los ácidos carboxílicos (pKa de 4 a 5).

Concretamente, se estudió si el mutante *wat1-ID*, en presencia de ácido acético, consumía sus reservas de malato (normalmente acumulado en vacuola) más eficazmente que el control silvestre, y por ello mantenía un pH citosólico más elevado. La hipótesis planteada, consideraba que la mutación en la adaptina β3, podría provocar un defecto en el transporte al tonoplasto de la proteína TDT, que media la entrada de malato en vacuola. En ese caso, en el mutante *wat1-ID*, la entrada de malato en vacuola estaría reducida, por lo que se acumularía mayoritariamente en el citoplasma, donde está más disponible para ser consumido en caso de producirse una acidificación intracelular.

Sin embargo, las medidas del contenido en malato, tras tratar con ácido acético durante diferentes tiempos, mostraron que la reducción del consumo en malato tras el tratamiento con acético era similar en el mutante y el control silvestre (Figura 4.40). En consonancia con este resultado, el mutante en el transportador de malato *tdt*, no resultó ser más tolerante a la germinación en presencia de ácido acético. De hecho, el mutante muestra sensibilidad a la germinación en presencia de ácido acético (Figura 4.41). Este resultado es coherente con estudios previos realizados en protoplastos con este mutante, que mostraban que la acidificación del citosol causada por ácido benzoico, provoca una reducción de la fotosíntesis mayor en el mutante *tdt* que en el control (Hurth *et al.*, 2005). Aunque es cierto que la mayoría del malato que posee el mutante se encuentra

disponible en el citosol, el contenido total en malato es mucho menor en el mutante *tdt* que en el control silvestre. Probablemente por este motivo, el mutante muestra una mayor susceptibilidad frente a la acidificación intracelular.

5.3.2 “*Biophysical pH stat*” en el mutante *wat1-ID*

Una vez descartado el consumo de malato como mecanismo para mantener un pH más alcalino en presencia de ácido acético, se decidió estudiar los mecanismos de regulación del pH intracelular basados en el transporte de protones “*Biophysical pH stat*”.

A) Compartimentación de protones en vacuola:

Dado que la mutación encontrada en la adaptina $\beta 3$ afecta al transporte de proteínas al tonoplasto, se quiso comprobar, en primer lugar, la posible implicación de este compartimento en el fenotipo del mutante. Se planteó como hipótesis, que en condiciones de estrés por ácido acético, *wat1-ID* acumulara el exceso de protones en la vacuola, manteniendo, de esta forma, el pH citosólico más elevado. La mayor acumulación de protones en vacuola podría ser consecuencia de un aumento en la entrada de protones, o de una reducción en la salida.

A-1: Entrada de protones en vacuola: pirofosfatasa y H^+ -ATPasa vacuolar

Como se explicó en la introducción, los principales transportadores implicados en la entrada de protones en la vacuola son las bombas de protones pirofosfatasa (H^+ -PPasa, AVP1 en *A. thaliana*) y H^+ -ATPasa vacuolar. Por ello, se planteó como hipótesis que la mutación en la adaptina $\beta 3$, afectara al transporte de un inhibidor de alguna de estas dos bombas, de modo que en el mutante *wat1-ID*, la bomba estaría más activa (por la ausencia de su inhibidor), y los protones en exceso se acumularían en la vacuola más eficazmente que en el control.

Para comprobar esta hipótesis, se analizaron los fenotipos de líneas transgénicas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar (AVP1). Si el mutante *wat1-ID*, acumula más protones en vacuola, los fenotipos de estas líneas transgénicas, deberían ser similares a los del mutante. La Figura 4.42 muestra que estas plantas son capaces de germinar y abrir los cotiledones antes que el control en presencia de ácido acético si bien su tolerancia es menor que la mostrada por el mutante *wat1-ID*. Este resultado era esperable, considerando que estas líneas transgénicas no sólo introducen más protones

en vacuola, sino que presentan un incremento en la cantidad de H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Li *et al.*, 2005).

Con respecto a los demás fenotipos, esta línea transgénica, al igual que el mutante *wat1-ID*, muestra mayor tolerancia a sodio, pero es más sensible a litio y medio con potasio limitante (Figura 4.43). Probablemente, la mayor entrada de protones en vacuola, provoque una cierta hiperpolarización de la membrana vacuolar, disminuyendo la toma de cationes tóxicos como el litio. Este catión, se acumularía en el citosol, donde su toxicidad es mayor, por este motivo las líneas transgénicas muestran sensibilidad a litio. El sodio, sin embargo, entra en vacuola mediante los antiportadores NHX, que sacan protones e introducen sodio (o potasio). Por lo tanto, una mayor entrada de protones en vacuola activaría de manera indirecta al antiportador, de modo que se acumularía más sodio en vacuola, donde resulta menos tóxico. Este resultado es consistente con la mayor tolerancia a sodio de estas líneas transgénicas, descrita previamente por Gaxiola y colaboradores (2001). En relación al potasio, la activación de la bomba de protones tiene efectos contrapuestos: por un lado se favorecería la salida por un canal (para tratar de compensar la excesiva hiperpolarización del tonoplasto), y por otro, la acidificación del lumen vacuolar favorecería la toma de potasio a través de los antiportadores NHX. Dado que la línea de sobreexpresión de la pirofosfatasa es más sensible que el control en medio con potasio limitante, parece que el efecto que prevalece es el de la entrada de potasio en vacuola, de forma que no está disponible en el citosol cuando se requiere, por la limitación de potasio en el medio. De forma consistente, se ha descrito que las líneas que sobreexpresan la pirofosfatasa vacuolar AVP1, poseen un incremento en la toma de cationes (sodio y potasio) en vesículas de membrana vacuolar y, consecuentemente, acumulan una mayor cantidad de sodio y potasio (Gaxiola *et al.*, 2001).

Por otro lado, se estudiaron los fenotipos de un mutante de pérdida de función en la H⁺-ATPasa vacuolar (*vha-a2 vha-a3 (a2a3)*), pero no en las H⁺-ATPasas de otros compartimentos endomembrana (TGN, endosomas). En base a la hipótesis propuesta, este mutante debería presentar fenotipos contrarios a los del mutante *wat1-ID*. En presencia de ácido acético, el mutante presenta una ligera sensibilidad (Figura 4.44). Probablemente, el fenotipo no es más claro debido a la presencia de la pirofosfatasa, que es capaz de introducir los protones en vacuola en ausencia de la H⁺-ATPasa. En presencia de litio y sodio, los fenotipos son contrarios a los observados en el mutante *wat1-ID* (Figura 4.45). En principio, la explicación de estos fenotipos sería, la opuesta a

la comentada para la sobreexpresión de la pirofosfatasa. Sin embargo, en medio con potasio limitante, el mutante *a2a3*, al igual que la sobreexpresión de la pirofosfatasa, muestra una gran sensibilidad. La reducción de la actividad de la bomba de protones reduciría la salida de potasio por un canal y reduciría su entrada en vacuola a través de los antiportadores NHX. Como se ha comentado anteriormente, el efecto predominante parece ser el de los antiportadores, de modo que en este mutante la sensibilidad a la limitación de potasio se explicaría por su menor acumulación en vacuola. Es decir, el mutante carece de las reservas de potasio vacuolares que requeriría para afrontar la situación de deficiencia de potasio. Finalmente, la ligera sensibilidad de este mutante observada en presencia de NaCl, contrasta con la bibliografía, donde se describe que este mutante no presenta diferencias con respecto al control en su tolerancia a sodio. Esto podría deberse a que los experimentos realizados por Krebs y colaboradores (2010), se basan en el crecimiento radicular, aspecto que no se ha considerado en este trabajo.

Estos resultados indican, en primer lugar, que la entrada de protones en vacuola es un buen mecanismo para hacer frente a la acidificación intracelular causada por ácidos débiles, ya que la sobreexpresión de la pirofosfatasa resulta más tolerante a ácido acético, y la pérdida de función de la H⁺-ATPasa vacuolar presenta cierta sensibilidad. A pesar de ello, éste no parece ser el mecanismo de tolerancia empleado por el mutante *wat1-ID*, ya que su resistencia a ácido acético en estas condiciones es mayor que la mostrada al sobreexpresar la pirofosfatasa vacuolar. Asimismo, la acumulación de cationes en el mutante *wat1-ID*, muestra que es capaz de acumular más potasio, al igual que se ha descrito para las líneas que sobreexpresan AVP1 (Gaxiola *et al.*, 2001), pero reduce la acumulación de cloruro sódico, al contrario que lo que sucede en estas líneas (Figuras 4.53 y 4.55). Por último, no todos los fenotipos del mutante *a2a3* son opuestos a los de *wat1-ID*, por ejemplo, la sensibilidad a bajo potasio observada en el mutante *wat1-ID*, no se reduce en el mutante en la H⁺-ATPasa vacuolar, sino que se ve incrementada y el mutante *a2a3* no muestra diferencias significativas con el control en presencia de ABA.

A-2: Salida de protones de la vacuola: antiportadores NHX

Considerando todavía la posibilidad de que *wat1-ID*, mantenga un pH más elevado en condiciones de estrés por ácido acético por acumular el exceso de protones en vacuola, se quiso comprobar el efecto de reducir la salida de protones del interior vacuolar. El principal sistema, implicado en la salida de protones de la vacuola, son los

antiportadores NHX. Como ya se ha comentado, estos antiportadores, son capaces de introducir tanto sodio como potasio en la vacuola, al mismo tiempo que expulsan protones al citosol. En *A. thaliana*, NHX1, NHX2, NHX3 y NHX4 se localizan en vacuola (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009), y los que tienen un mayor nivel de expresión son NHX1 y NHX2 (Yokoi *et al.*, 2002).

Por tanto, se planteó la hipótesis de que la adaptina $\beta 3$, afectara al transporte de un antiportador NHX a vacuola, de modo que los protones liberados en el citosol por el tratamiento con ácido acético, entrarían rápidamente en vacuola, pero verían dificultada su salida, acumulándose en ese compartimento. Para comprobar esta hipótesis, se analizó el fenotipo de mutantes simples y el doble mutante en los transportadores NHX1 y NHX2. El ensayo de aparición de cotiledones en presencia de ácido acético, indicó que los mutantes simples y, especialmente, el doble mutante *nhx1.3 nhx2.1*, son más sensibles a la presencia del ácido (Figura 4.46). De forma consistente con este resultado, en trabajos previos realizados en levadura, se observó que mutantes en el antiportador Nhx1p, eran más sensibles a la bajada de pH externo y a la acidificación intracelular causada por ácidos débiles (Brett *et al.*, 2005). El mutante *nhx1* de levadura no sólo posee un pH vacuolar reducido, sino que también presenta una acidificación del citosol. Según Brett y colaboradores, este defecto en la homeostasis de pH es lo que provoca la mayor sensibilidad a la acidificación que muestra el mutante. Por lo tanto, se descartó la implicación de estos antiportadores en el fenotipo del mutante *wat1-ID*.

B) Expulsión de protones a nivel de la membrana plasmática:

Una vez descartada la implicación en el fenotipo del mutante de los principales transportadores del tonoplasto implicados en la homeostasis de pH, y considerando que, como se explicó anteriormente, una mutación en la adaptina $\beta 3$ puede causar la deslocalización de un transportador vacuolar a membrana plasmática, se quiso comprobar si el mutante *wat1-ID*, era capaz de expulsar los protones de forma más eficaz a nivel de membrana plasmática, manteniendo, de este modo, un pH más elevado en condiciones de estrés por ácido acético.

Para ello, en primer lugar, se midió la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (MP) *in vitro*. En este ensayo se observó que, sorprendentemente, en condiciones normales, la actividad de la bomba era menor en el mutante que en el control (Figura 4.47). En condiciones de estrés por ácido acético, se observaba un incremento en la actividad de la bomba del control, que no se detectaba en el mutante

wat1-ID. Este experimento indica que el ácido acético provoca, en el control silvestre, un incremento en la actividad de la H⁺-ATPasa de PM, debido a una modificación covalente de la misma (como una fosforilación). Este resultado es consistente con un estudio realizado recientemente en el que se demuestra cómo un tratamiento con ácidos débiles (propiónico y cítrico) provoca un incremento en la fosforilación de la penúltima treonina de la H⁺-ATPasa de tabaco PMA2 (Bobik *et al.*, 2010), que activa a la bomba.

Dado que este ensayo *in vitro* sólo refleja incrementos en la actividad de la bomba debidos a modificaciones covalentes, se quiso realizar la medida de la expulsión de protones *in vivo*, mediante dos experimentos: un ensayo con bromocresol púrpura, y un ensayo de medida directa de la acidificación del medio externo. Ambos experimentos, mostraron que en condiciones normales no hay diferencia en la actividad H⁺-ATPasa del mutante y el control silvestre (Figuras 4.48 y 4.49A). Por lo tanto, la menor actividad de la H⁺-ATPasa del mutante observada mediante el ensayo *in vitro*, es compensada por algún mecanismo *in vivo*. Por otro lado, el ensayo de medida de pH externo, indicó que, en presencia de 1 mM de ácido acético, tanto el mutante como el control aumentan la expulsión de protones, y esta salida de protones es más eficaz en el mutante que en el control silvestre (Figura 4.49B). Este resultado indica, que el mutante *wat1-ID* tiene activada la expulsión de protones, y que esta activación no se debe a una modificación covalente de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática.

La mayor expulsión de protones a través de la membrana plasmática del mutante, debería provocar una hiperpolarización de la membrana. Por este motivo, se realizaron medidas del potencial de membrana del mutante y el control, en condiciones normales, y en presencia de ácido acético. Estas medidas mostraron que ambos genotipos poseen un potencial de membrana similar en condiciones normales (Figura 4.50). En presencia de ácido acético (1 mM), se observa una clara hiperpolarización de la membrana en el caso del control silvestre, como consecuencia de la activación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Figuras 4.47 y 4.49) que provoca el tratamiento con ácido acético (Bobik *et al.*, 2010). Sin embargo, esta hiperpolarización es mucho menor en el caso del mutante *wat1-ID*. Este resultado indica que en condiciones de estrés ácido el mutante es capaz de compensar, de algún modo, la mayor salida de protones.

Las medidas de la toma de rubidio (empleado como análogo del potasio) en condiciones normales, mostraron que el mutante y el control tomaban rubidio de forma similar en estas condiciones. Sin embargo, en presencia de ácido acético, el mutante

tomaba rubidio más rápidamente que el control silvestre (Figura 4.51). Por lo tanto, este ensayo demuestra que la mayor expulsión de protones por el mutante *wat1-ID* en presencia de ácido acético, es compensada con una mayor toma de rubidio (potasio) en estas condiciones, por lo que no se refleja en una hiperpolarización de la membrana plasmática.

5.3.3 Modelo propuesto (primera parte)

En base a los resultados anteriores, se propone un posible modelo para explicar la alteración de la homeostasis de pH en el mutante *wat1-ID*. Según el modelo, la mutación en la adaptina $\beta 3$ de *A. thaliana*, provocaría una deslocalización de un transportador de potasio de la vacuola, a membrana plasmática.

Este transportador tendría una actividad relativamente baja en condiciones normales, que no sería suficiente para despolarizar la membrana. Sin embargo, se activaría en condiciones de bajo pH intracelular (tratamiento con ácido acético), incrementando la toma de potasio, y provocando una consiguiente despolarización de la membrana plasmática. Como consecuencia de esta despolarización, se ve favorecida la acción de la H^+ -ATPasa de la PM, que incrementaría la salida de protones, permitiendo que el pH citosólico se mantenga más elevado en el mutante que en el control silvestre.

Como se comentó en la introducción, trabajos previos en levadura han determinado que la toma de potasio tiene un papel fundamental en la tolerancia a ácidos débiles. De hecho, en *S. cerevisiae*, se ha visto que el pH intracelular activa la toma de potasio a través de Trk1p (Figura 1.6) (Yenush, 2005 *et al.*, 2005). Aunque en plantas no se conocen los mecanismos moleculares implicados, sí se ha visto que varios canales de potasio se regulan por pH, como el canal de potasio AKT2 expresado en floema, que es sensible a bajo pH (Latz *et al.*, 2007), el canal TPK4 presente en el polen (MP), cuya acción también es inhibida por protones (Becker *et al.*, 2004), o el canal vacuolar TPK1, cuya apertura se maximiza a un pH ligeramente ácido (Gobert *et al.*, 2007).

Concretamente, la apertura del canal TPK1 a pH citosólico (7,5), representa únicamente un 20 y 30% de su apertura máxima, que se produce a un pH más ácido (6,7) (Gobert *et al.*, 2007). Por lo tanto, si en el mutante *wat1-ID*, se produjera la deslocalización de este canal a la membrana plasmática, su acción en la toma de rubidio (potasio) no sería muy evidente en condiciones normales, pero se incrementaría en condiciones de estrés ácido, tal y como ocurre en el mutante *wat1-ID*. Por este motivo,

se sugiere que este transportador podría ser el que se encuentra deslocalizado en el mutante estudiado.

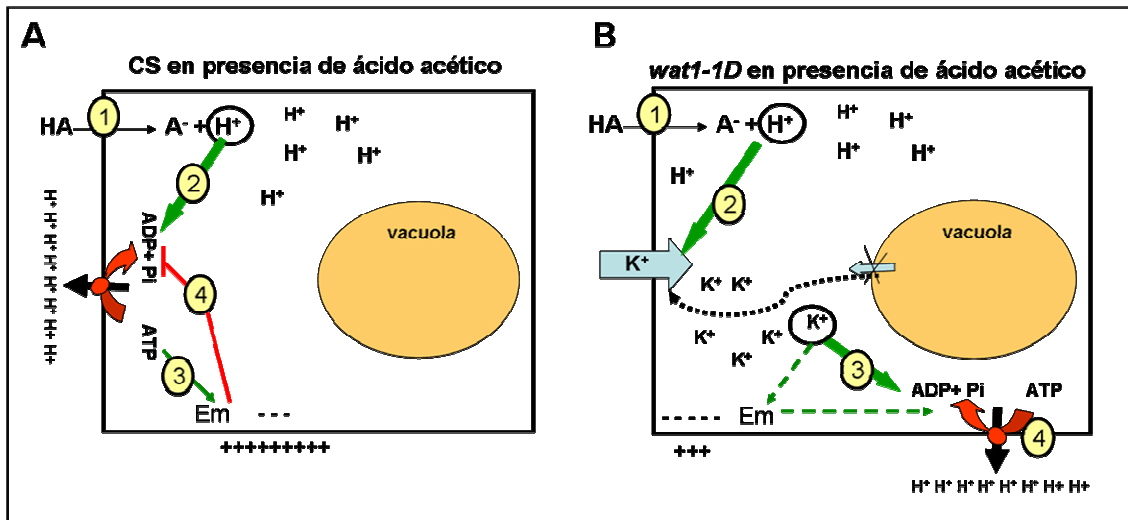


Figura 5.1 Modelo del mantenimiento de la homeostasis de pH en presencia de ácido acético en el control silvestre (A), y el mutante *wat1-1D*. **A)** Un tratamiento con ácido acético provoca, en plántulas del control silvestre, una bajada del pH citosólico (1). Esta reducción del pH activa a la H⁺-ATPasa (2), que expulsa los protones al exterior celular, provocando la hiperpolarización de la membrana plasmática (3), que inhibe la acción de la H⁺-ATPasa (4). **B)** En el mutante *wat1-1D*, se ha producido la deslocalización de un canal de potasio (activado por pH ácido) a membrana plasmática. Un tratamiento con ácido acético provoca, en plántulas del mutante, la entrada de protones al citosol (1). Estos protones activan, por un lado a la H⁺-ATPasa de membrana, y por otro al canal de potasio (2), por lo que se despolariza la membrana, activando a la H⁺-ATPasa (4). De este modo, en el mutante, es posible la salida continuada de protones sin que se produzca una hiperpolarización excesiva de la PM.

5.4 Homeostasis de otros cationes monovalentes

5.4.1 Homeostasis de sodio, litio, y potasio en el mutante *wat1-1D*

Dada la relación existente entre la homeostasis de pH, y la homeostasis de otros cationes monovalentes, en el presente trabajo, se quiso analizar el fenotipo del mutante *wat1-1D*, en medio con potasio limitante, así como en presencia de litio y sodio. Asimismo, se midió la toma y acumulación de estos cationes en el mutante y el control silvestre. La entrada de cationes en la planta, puede interpretarse asumiendo tres etapas. En la primera etapa ($\approx 0-30$ min), el componente principal sería la entrada de los cationes en el citoplasma de las raíces. Aproximadamente a partir de los 30 minutos hasta las 2 horas, predominaría la entrada de cationes en vacuola. Por último, las medidas de acumulación tras dos días de tratamiento, mostrarían principalmente la salida de los cationes al xilema y su subida a la parte aérea.

Los resultados de esos ensayos muestran que el mutante es más sensible a la germinación y crecimiento en presencia de cloruro de litio (Figuras 4.7, 4.18-4.20), a pesar de que la acumulación de este catión es menor en el mutante que en el control silvestre (Figura 4.54). Bueso y colaboradores (2007), determinaron que el litio induce la síntesis de etileno. Sin embargo, se ha comprobado, que la mayor sensibilidad al cloruro de litio de *wat1-ID*, no se debe a una mayor sensibilidad a esta hormona inhibidora del crecimiento (Figura 4.10). En relación al sodio, el mutante es más tolerante a la germinación y crecimiento en presencia de cloruro sódico (Figuras 4.8 y 4.21), y acumula una menor cantidad de este catión tóxico. Por último, el mutante muestra mayor sensibilidad a la germinación y crecimiento en medio con bajo potasio (Figuras 4.9 y 4.15). La toma de rubidio en condiciones normales, es similar en el mutante y el control. Sin embargo, la acumulación de potasio es mayor en el mutante (Figura 4.55).

La mayor acumulación de potasio por el mutante *wat1-ID*, podría explicar la reducción en la acumulación de cationes tóxicos, por diferentes motivos, que se detallan a continuación.

En primer lugar, el mutante podría tener activada la toma de potasio en la PM, lo que provocaría una despolarización de la misma y una reducción en la toma de cationes tóxicos. Sin embargo, la medida del potencial de membrana del mutante y control mostraron que el potencial en condiciones normales es similar en ambos genotipos (Figura 4.50). Además, la toma de rubidio a tiempos cortos (1-30 min) no es mayor en el mutante, y tampoco se observa una reducción de la velocidad de toma a tiempos cortos, de sodio o litio.

Una segunda opción es que el mutante tuviera incrementada la salida de potasio de las células del parénquima del xilema y, por tanto, la carga de potasio en el xilema. En ese caso, el potasio tomado por la raíz, se translocaría a la parte aérea muy eficazmente, promoviendo de nuevo la toma de potasio por la raíz y provocando, finalmente, una mayor acumulación de potasio en la planta, y especialmente en la parte aérea. Por otra parte, tal y como describen en Alejandro y colaboradores (2007), el aumento de la salida de potasio de las células del parénquima del xilema, provocaría una hiperpolarización de la membrana plasmática de estas células, que dificultaría la salida de cationes tóxicos como sodio o litio, y su consecuente carga en el xilema. Al reducir la carga al xilema de los cationes tóxicos, se vería también reducida su toma y

acumulación global. De este modo, se explicaría que la acumulación de potasio fuera mayor, pero la de litio y sodio estuviera reducida.

Las medidas de acumulación de potasio por separado en raíz y parte aérea, muestran que el mutante *wat1-ID* posee un mayor contenido en potasio tanto en la raíz como en la parte aérea (Figura 4.59). El hecho de que el mutante posea un mayor contenido en potasio que el control en la parte aérea, indica que la carga de potasio al xilema está incrementada en el mutante, lo que explica que *wat1-ID* acumule más potasio de forma global, a pesar de que la toma de rubidio (potasio) a tiempos cortos sea similar. Sin embargo, la mayor carga de potasio al xilema, no es el único motivo de la mayor acumulación de potasio, ya que el contenido en este catión también es mayor en la raíz.

En el caso del litio y sodio, contrariamente a lo esperado, el contenido en estos cationes no se ve reducido en la parte aérea de la planta (o muy ligeramente en el caso del litio), y la menor acumulación de estos cationes se produce principalmente a nivel de la raíz (Figuras 4.57 y 4.58). Estos resultados indican que, aunque la carga de potasio al xilema esté incrementada, este no es el motivo principal por el que se reduce la toma de otros cationes tóxicos.

5.4.2 Modelo propuesto (segunda parte)

En base a los resultados anteriores, y considerando el modelo propuesto en relación a la homeostasis de pH en el mutante *wat1-ID*, se propone el siguiente “modelo ampliado” para explicar los distintos fenotipos del mutante.

Según el modelo, la mutación en la adaptina $\beta 3$ en el mutante *wat1-ID*, provocaría la deslocalización de un transportador vacuolar de salida de potasio que pasaría a estar en la membrana plasmática. Esta deslocalización ocurriría tanto en las células de la epidermis radicular como en las células del parénquima del xilema (células de la estela). El transportador afectado debería ser un canal con regulación (“gating”) independiente de voltaje, para poder actuar con valores de potencial de membrana diferentes. De este modo, en las células de la epidermis donde la diferencia de potencial es elevada (aproximadamente 120 mV), el canal actuaría introduciendo potasio, mientras que en las células de la estela, donde el potencial es más reducido (unos 60 mV), actuaría sacando el potasio al apoplasto, donde su concentración es menor. Una vez en el apoplasto, el potasio se cargaría por difusión en el xilema.

En condiciones normales, la actividad del transportador en la PM de la epidermis no sería suficientemente como para causar una despolarización de la PM. Sin embargo, en las células del parénquima del xilema, la actividad sería suficiente para producir un incremento en la carga de potasio al xilema. Esto hace que se demande constantemente potasio, y la acumulación del mutante sea, finalmente, mayor en el mutante que en el control, aunque la toma a tiempos cortos no se vea afectada (Figura 5.2).

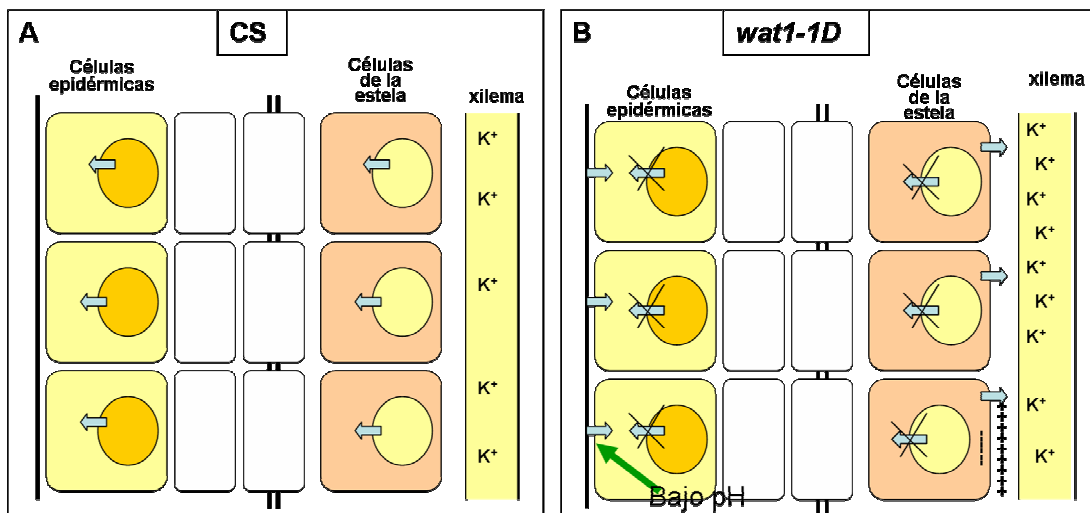


Figura 5.2: Esquema mostrando la deslocalización de un transportador de potasio vacuolar a la PM de células epidérmicas y células de la estela. **A)** La flecha azul representa el transportador de potasio vacuolar. **B)** Un pH bajo activa al transportador deslocalizado e incrementa la toma de potasio a nivel de la epidermis. En las células de la estela, la presencia del transportador de potasio hiperpolariza la membrana, e incrementa la subida de potasio a la parte aérea por el xilema. (La subida de cationes tóxicos se vería reducida).

En relación a la homeostasis de pH, como se ha discutido en el apartado anterior, en condiciones de estrés por ácido acético, el transportador de potasio localizado en la membrana plasmática de la epidermis radicular, se activaría, incrementando la toma de potasio y la expulsión de protones. Por este motivo, el mutante *wat1-1D* es capaz de mantener un pH más elevado en estas condiciones (Figura 5.2).

Por otro lado, la deslocalización de este canal a membrana plasmática haría que disminuyera su presencia en el tonoplasto, por lo que se dificultaría la salida de potasio de la vacuola. Este hecho contribuiría a la mayor acumulación de potasio que se observa en el mutante. Asimismo, explicaría por qué el mutante es más sensible al crecimiento en bajo potasio que el control silvestre (Figuras 4.9 y 4.15), a pesar de acumular más potasio. Posiblemente, cuando el medio tiene una cantidad de potasio limitante, las plantas son capaces de crecer no sólo por tomar el potasio del medio externo (Pyo *et al.*,

2010), sino también porque emplean las reservas de potasio almacenadas en vacuola. De modo que, en el mutante *wat1-ID*, en el que se dificulta la salida de potasio de la vacuola, el crecimiento en estas condiciones se ve afectado. En este sentido, se ha visto que el crecimiento de un mutante de pérdida de función en el canal vacuolar TPK se reduce tanto en condiciones de alto potasio externo, como en condiciones de potasio limitante (10 μ M) (Gobert *et al.*, 2007).

Por otra parte, la reducción en la salida de potasio vacuolar, provocaría una cierta hiperpolarización del tonoplasto, que dificultaría la entrada de cationes tóxicos como el litio (o la norespermidina). Al entrar menos cationes tóxicos en vacuola, se acumulan en el citosol, y se reduce la toma de los mismos. De este modo, la acumulación de cationes tóxicos sería menor, pero estarían localizados en el citosol, donde su toxicidad es mayor (Figura 5.3). Por este motivo, el mutante es más sensible a cationes tóxicos como norespermidina y litio, a pesar de acumular una menor cantidad de LiCl. En relación a este aspecto, se ha visto que líneas transgénicas sobreexpresando el antiportador vacuolar NHX1, son más tolerantes a sodio, por compartimentalizarlo en vacuola, a pesar de acumular una mayor cantidad de este catión (Apse *et al.*, 1999), al igual que se ha descrito para las líneas transgénicas de sobreexpresión de AVP1 (Gaxiola *et al.*, 2001). Con respecto a la sensibilidad a litio mostrada por el mutante *wat1-ID*, también es importante considerar que mutantes de levadura implicados en el tráfico vesicular, son sensibles a litio. Concretamente los mutantes de pérdida de función de proteínas Vps (“*Vacuolar Protein Sorting*”) de levadura, muestran mayor sensibilidad a este catión tóxico (Bowers *et al.*, 2004). Teniendo esto en cuenta, puede ser que la mutación en la adaptina β 3 de *A. thaliana* que presenta el mutante *wat1-ID*, le confiera, en parte, su especial sensibilidad a litio.

Por otro lado, la hiperpolarización de la membrana vacuolar, también podría afectar, de un modo indirecto a la toma de sodio a través de los antiportadores NHX. Un aumento en el potencial de membrana, reduciría la actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar, por lo que disminuiría la entrada de protones en la vacuola. Esto podría afectar de forma indirecta a los antiportadores NHX, que reducirían la expulsión de protones, y, por tanto, también la toma de sodio. De este modo, el sodio quedaría en el citosol y se reduciría su acumulación, al igual que ocurría en el caso del litio. Sin embargo, a diferencia del litio, el sodio presente en el citosol no resulta más tóxico para el mutante.

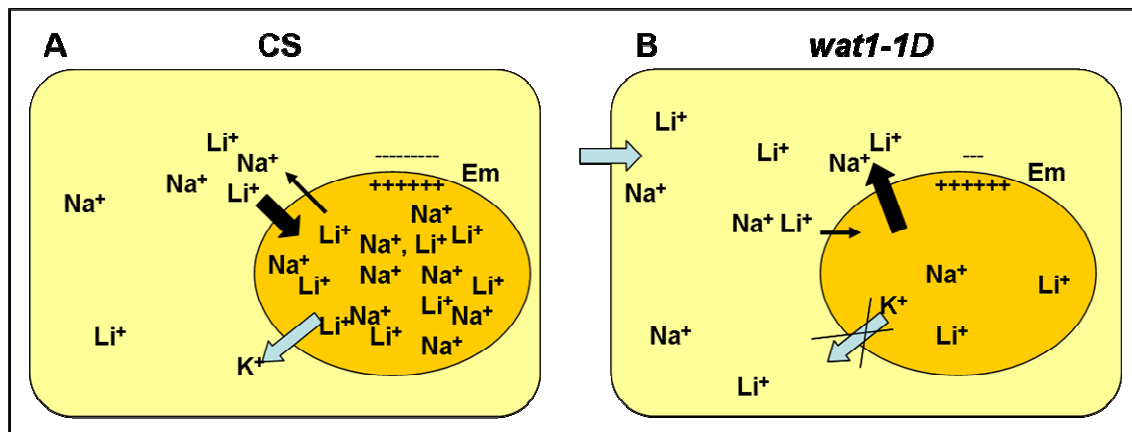


Figura 5.3. Efectos de la deslocalización del transportador vacuolar sobre la acumulación de cationes tóxicos en vacuola. Las flechas azules muestran el transportador de potasio. Las flechas negras representan los diferentes transportadores de cationes tóxicos. A mayor grosor de estas flechas, mayor cantidad de cationes transportados. **A)** En condiciones de estrés por cationes tóxicos, estos se acumulan principalmente en la vacuola, reduciendo la cantidad presente en el citosol, por lo que la toma de los cationes tóxicos continúa. **B)** La falta del transportador de salida de potasio en la vacuola, provoca cierta hiperpolarización de la membrana, que dificulta la entrada de cationes tóxicos a la vacuola (ver texto), y favorece su salida. La menor acumulación de Li^+ . A pesar de acumular una menor cantidad, estos cationes resultan más tóxicos en el citosol que en la vacuola.

La tolerancia a cloruro sódico que muestra el mutante se explicaría, por su mayor tolerancia al estrés osmótico, que podría deberse a dos factores: En primer lugar a la insensibilidad parcial que muestra el mutante a la inhibición del crecimiento mediada por ABA durante la germinación y crecimiento de la plántula (Figuras 4.8, 4.16). Por otro lado, la mayor acumulación de potasio en la planta, podría facilitar la toma de agua por el mutante *wat1-1D* en condiciones de estrés osmótico, actuando como un osmolito. Ambos factores contribuirían a incrementar la tolerancia del mutante frente al estrés osmótico, y por tanto, frente a cloruro sódico.

En base a lo explicado, el transportador de potasio que se encuentra deslocalizado en el mutante *wat1-1D*, debe ser un canal vacuolar, con regulación insensible a voltaje, y que se exprese tanto en la epidermis como en las células de la estela. El canal podría mediar la toma de potasio tanto en el rango de baja afinidad, como en el rango de alta afinidad (Figura 4.56), y su actividad debe ser estimulada por una bajada del pH intracelular. Un posible candidato sería el canal de potasio independiente de voltaje TPK1. Como ya se ha indicado, este canal se activa por una bajada del pH intracelular y es capaz de mediar la salida de potasio de la vacuola (Gobert *et al.*, 2007). TPK1 se expresa en diferentes tejidos celulares, incluyendo el

embrión, la raíz y los hipocotilos de plántulas jóvenes, los tejidos vasculares de hojas y raíz, las células del mesófilo y células oclusivas en las hojas y las anteras (Czempinski *et al.*, 2002). Al igual que el canal TPK1, existen otros canales de la misma familia localizados en vacuola: TPK2, TPK3 y TPK5 (Voelker *et al.*, 2006) que podrían considerarse candidatos, aunque de todos los miembros de la familia, TPK1 posee el mayor nivel de expresión. Por otro lado, el canal TPC1, también se localiza en vacuola y puede mediar el transporte de potasio, pero es un canal poco selectivo que también es capaz de transportar sodio, amonio, calcio y magnesio. Por lo tanto, es más probable que el canal deslocalizado pertenezca a la familia de canales TPKs.

Finalmente, conviene recordar que la sobreexpresión de la pirofosfatasa vacuolar, tenía fenotipos muy parecidos a los del mutante *wat1-ID*, probablemente porque el efecto de una mayor acumulación de protones es causar una hiperpolarización de la membrana, algo similar a lo que ocurre si se evita la salida de potasio de la vacuola.

5.5 El ácido abscísico y la homeostasis de cationes monovalentes

5.5.1 Comportamiento en presencia de ABA del mutante *wat1-ID*

Además de una alteración en la homeostasis de pH y de otros cationes monovalentes, el mutante *wat1-ID* aislado en el presente trabajo, muestra una respuesta a ABA alterada.

Por un lado, el mutante es capaz de germinar y desarrollar cotiledones de forma más eficaz en presencia de ABA (Figura 4.8). Del mismo modo, las plántulas del mutante muestran cierta insensibilidad a la inhibición del crecimiento mediada por esta hormona (Figuras 4.16). Sin embargo, la pérdida de peso por transpiración, es semejante en el mutante y el control silvestre (Figura 4.22). Por lo tanto, *wat1-ID* muestra cierta insensibilidad a los efectos del ABA relacionados con la inhibición del crecimiento, pero no se ve afectado en la regulación de la apertura y cierre de estomas. Este resultado no es sorprendente, considerando la complejidad de la ruta de señalización por ABA, en la que intervienen numerosas proteínas quinasas y fosfatasa, con funciones sólo parcialmente redundantes. De hecho, se han descrito mutantes alterados fuertemente en la respuesta a abscísico en germinación, pero no en la apertura

y cierre de estomas ni en la regulación de la expresión génica mediada por ABA, como el doble mutante en las quinasas SnRK2.2 SnRK2.3, reguladores positivos de la respuesta a ABA (Fujii *et al.*, 2007).

El motivo por el cual el mutante *wat1-ID* es parcialmente insensible a la inhibición del crecimiento y la germinación mediada por ácido abscísico se discutirá más adelante. Sin embargo, es interesante destacar que varios mutantes afectados en la homeostasis de cationes muestran también alteraciones en su sensibilidad al ácido abscísico. Por ejemplo, el mutante *par3-ID* tolerante a norespermidina, es más sensible a la germinación en presencia de ácido abscísico (Alejandro y colaboradores, resultados no publicados). Por otro lado, algunos trabajos relacionan proteínas implicadas en la señalización por abscísico, con la regulación de la homeostasis de cationes. En primer lugar, se ha visto que la proteína fosfatasa 2C ABI2, interacciona con SOS2 (Ohta *et al.*, 2003), lo que podría significar que ABA regula la homeostasis de cationes a través de la ruta SOS. Asimismo, se ha descrito que la proteínas fosfatasa PP2CA, interacciona con el canal de potasio, presente mayoritariamente en floema, AKT2 (Chérel *et al.*, 2002). Por último, se ha establecido que la regulación del canal de toma de potasio AKT1 está mediada por proteínas quinasas de la familia SnRK3s/CIPKs y por la proteína fosfatasa de tipo 2C AIP1. En respuesta a bajo potasio, las quinasas CIPK23, CIPK6 y CIPK16 son capaces de activar el canal AKT1, mientras que la fosfatasa AIP reduce su actividad (Lee *et al.*, 2007b). Todos estos trabajos indican que sería posible la existencia de una conexión entre la señalización por ABA y la homeostasis de cationes.

5.5.2 El ácido acético induce la síntesis de ABA

Para tratar de profundizar más en la relación existente entre el ABA, la homeostasis de pH, y la homeostasis de cationes, se quiso estudiar el fenotipo en presencia de ácido acético de mutantes alterados en la biosíntesis o señalización de ABA. En ensayos de aparición de cotiledones en medio con ácido acético, se observó que el mutante *aba2-11*, deficiente en la síntesis de ABA, muestra un mejor fenotipo que el control silvestre. Del mismo modo, la línea transgénica insensible a ABA que sobreexpresa la proteína fosfatasa 2C HAB1, es más tolerante al ácido acético en estas condiciones. Sin embargo, los mutantes en las PP2Cs *hab1-1*, *abil-2* y el doble mutante *hab1-1 abil-2* son más sensibles al estrés por ácido acético (Figura 4.60).

En base a estos resultados, se quiso comprobar, si el ácido acético provoca un incremento en el ABA endógeno. En la Figuras 4.61 y 4.62 se observa como, efectivamente, la presencia de ácido acético (durante la germinación, o en un tratamiento de 24 horas), produce un incremento en la síntesis de ABA. Estos resultados, sugieren que la inhibición de la germinación y el crecimiento inducida por ácido acético, está mediada, al menos parcialmente, por la síntesis de ABA.

5.5.3 Modelo para la inhibición de la germinación y crecimiento mediado por ABA

Los mecanismos moleculares de acción del ABA, han sido muy bien estudiados en las células oclusivas de los estomas. En estas células, el ABA promueve el cierre de estomas, e inhibe su apertura (Sirichandra *et al.*, 2009a). Aunque intervienen muchos otros factores reguladores como el H₂O₂ o las variaciones en el calcio intracelular, de forma muy simplificada puede considerarse que en el cierre de estomas, el ABA actúa activando los canales de salida de aniones de tipo R y de tipo S (como el canal SLAC). De este modo, se produce una despolarización de la membrana plasmática que activa la salida de potasio de la célula a través de canales, como GORK. Por otra parte, la apertura de estomas ocurre como consecuencia de una activación de las H⁺-ATPasas de PM. Como consecuencia de esta activación, se produce una hiperpolarización de la PM, que promueve la toma de potasio a través de los IRKs, como KAT1 o KAT2. El ABA es capaz de evitar la apertura estomática inhibiendo la activación de la bomba de protones, y la entrada de potasio a través de los IRKs (revisado en Kim *et al.*, 2010). De hecho, el ABA provoca aproximadamente una reducción del 60-65% en la inducción de la actividad de la bomba de protones H⁺-ATPasa inducida por luz azul en células oclusivas de *Vicia faba* (Zhang *et al.*, 2004) y *A. thaliana* (Roelfsema *et al.*, 1998). Además, dos mutantes dominantes en el locus *ost 2*, que presentan una activación constitutiva de la bomba de protones AHA1, mantienen sus estomas abiertos en presencia de ABA (Merlot *et al.*, 2007).

Considerando, el papel del ácido abscísico regulando la bomba de protones de PM y los canales de iones durante la apertura y cierre de estomas, sería posible que esta hormona participara también en la regulación del transporte de iones en otros tejidos celulares. Por lo tanto, se propone un modelo para la inhibición de la germinación y crecimiento mediado por ABA, basado en la regulación del transporte de cationes. Por

supuesto, este modelo es adicional a los mecanismos ya conocidos de actuación del ABA, como su efecto como antagonista de las GAs (Lovegrove y Hooley, 2000; Piskurewicz *et al.*, 2008; Piskurewicz *et al.*, 2009).

Según el modelo propuesto, el ABA sintetizado en respuesta a estrés osmótico (sequía, salinidad, frío), inhibiría la toma de potasio (por ejemplo por el canal AKT1) por la raíz, y la actividad de la bomba de protones H^+ -ATPasa de PM (genes AHA). La inhibición de estos dos sistemas de transporte, provocaría una acidificación intracelular. Considerando los datos obtenidos en el presente trabajo que indican que el ácido acético induce la síntesis de abscísico, se propone que esta acidificación, similar a la provocada por el ácido acético, sería capaz de inducir la síntesis de ABA, retroalimentando así el sistema (Figura 5.4). Dado que tanto la acidificación del apoplasto, mediada por la expulsión de protones, como la entrada de potasio son esenciales para el crecimiento celular (Cosgrove 1997), la inhibición, mediada por ABA, de ambos procesos de transporte, dificultaría la germinación y/o el crecimiento de las plántulas. Por otro lado, sería posible que la bajada del pH intracelular causada por el ABA, activara los mecanismos de inhibición del crecimiento conocidos del ABA (como evitar la movilización de reservas de las semillas). Es decir, el pH podría actuar también como segundo mensajero del ABA en estas circunstancias.

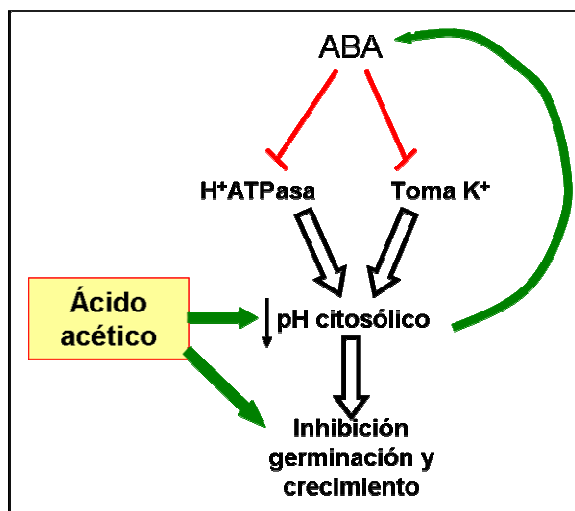


Figura 5.4: Modelo propuesto para la inhibición del crecimiento mediada por ABA.

El ABA inhibiría la toma de potasio y la salida de protones. Esto provoca una reducción del pH intracelular que inhibe la germinación y el crecimiento. La bajada de pH intracelular induce la síntesis de ABA. El ácido acético inhibe el crecimiento de forma directa y por provocar una bajada del pH citosólico (induciendo la síntesis de ABA).

De acuerdo con este modelo, trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Serrano, demuestran que la sequía provoca una reducción en la actividad de la bomba de protones H^+ -ATPasa de la raíz. Además, esta reducción está mediada por ABA, ya que no se observa en el mutante *aba2-11*, deficiente en la síntesis de abscísico, ni en las líneas insensibles a abscísico 35S:HAB1 (Planes y colaboradores, resultados no

publicados). Asimismo, se ha comprobado que el mutante *ost2-1* (con activación constitutiva de la H⁺-ATPasa de membrana AHA1) es más insensible a ácido abscísico que el control, en ensayos de aparición de cotiledones (Niños y colaboradores, resultados no publicados).

En base a este modelo, podría explicarse la insensibilidad a ABA que muestra el mutante *wat1-1D*. Si el ABA induce la acidificación del citosol, el mutante *wat1-1D*, responderá del mismo modo que en presencia de acético. Se activará el canal de potasio deslocalizado a membrana plasmática, lo que incrementará la toma de potasio y, consecuentemente, la salida de protones. De este modo la acidificación, y por tanto la inhibición de la germinación y el crecimiento, será menor.

Las líneas transgénicas sobreexpresando la pirofosfatasa vacuolar, también mostraban una mayor insensibilidad al ABA. En base a este modelo, podríamos asumir que esta insensibilidad es consecuencia de la capacidad de estas líneas transgénicas para mantener un pH citosólico más elevado, por introducir el exceso de protones en la vacuola y tener una mayor cantidad de H⁺-ATPasa de membrana (Li *et al.*, 2005).

Por lo tanto, aunque serán necesarios trabajos futuros para establecer este posible modelo, no hay duda de que la presente tesis doctoral abre un amplio campo de investigación sobre la posible interacción entre la señalización por ABA y la homeostasis de pH y de otros cationes.

5.6 Respuesta transcripcional al ácido acético

El análisis transcripcional realizado en la presente tesis doctoral, determinó que 1241 genes de *A. thaliana* varían su expresión de forma significativa en respuesta a ácido acético. De estos genes, 392 incrementan su expresión y 849 se reprimen. Este resultado indica que el ácido acético provoca una importante represión de la expresión génica, ya que los genes reprimidos son más del doble que los inducidos. Dado que este es el primer estudio de la variación de la expresión génica en respuesta a ácidos débiles realizado en células vegetales, a continuación se compararán, los resultados de este trabajo con los resultados de estudios similares realizados en levadura.

El análisis de las categorías sobre-representadas en la lista de genes inducidos en comparación con el resto del genoma (Anejo III), muestra que el tratamiento con ácido acético induce genes relacionados con la respuesta a diversos estreses abióticos, como alta intensidad lumínica, alta temperatura, hipoxia, o estrés oxidativo. Este resultado

sugiere que una bajada de pH intracelular está provocando una respuesta general a estrés abiótico. De forma similar, en células de levadura se ha observado que el tratamiento con diferentes ácidos débiles, induce, entre otros, la expresión de los factores de transcripción Msn2/Msn4 implicados en la respuesta general a estrés (Schüller *et al.*, 2004).

Por otra parte, los diagramas de Venn realizados comparando los genes de *A. thaliana* que varían su expresión en respuesta a diferentes estreses abióticos, con los afectados por ácido acético (Figuras 4.63, 4.65, 4.66), muestran que el tratamiento con altas temperaturas provoca la respuesta más similar al tratamiento con ácido acético. De hecho, en el anejo V se observa que entre los genes más inducidos por ácido acético, se encuentran dos factores de transcripción de respuesta a estrés por calor (HSFA2 y HSFA5), y varias proteínas con actividad chaperona, típicas de la respuesta a altas temperaturas (HSP90.1; HSP23.5-M; HSP101; HSP17.8-CI). Asimismo, se incluye la proteína FES1A, co-chaperona necesaria para la acción de las HSP70. De forma consistente con estos resultados, se ha visto que un tratamiento con ácido acético induce varias proteínas del tipo HSF y HSP en levadura (Bissoli y colaboradores., resultados pendientes de publicación). Estos resultados sugieren que el estrés por ácido acético, al igual que el estrés por alta temperatura y el estrés por alta intensidad lumínica, está provocando la desnaturalización de proteínas, o un problema en el plegamiento de las mismas. Por ello, se inducen gran número de chaperonas del tipo HSP, y los factores de transcripción que inducen la expresión de las mismas (HSF). Asimismo, se induce la expresión de genes que codifican para proteínas chaperonas pertenecientes a otras familias génicas como ROF2 (peptidil-prolil cis-trans-isomerasa). En relación a este aspecto, se ha comprobado que la sobreexpresión en *A. thaliana*, de este gen y de su homólogo de levadura (*FPRI*) incrementa la tolerancia de las plantas a ácido acético (Bissoli y colaboradores, resultados pendientes de publicación).

En trabajos previos realizados en levadura, se ha visto que el tratamiento con ácidos débiles hidrofóbicos como sórbico o benzoico, alteran la cadena de transporte electrónico generando radicales superóxido (Piper, 1999). En el caso concreto del ácido acético, se ha descrito que puede inducir muerte celular programada, de forma dependiente de agua oxigenada (Giannattasio *et al.*, 2005). De forma consistente con este resultado, la respuesta a estrés oxidativo aparece sobre-representada en la lista de genes inducidos por ácido acético en este trabajo (Anejo III). Asimismo, entre los genes más inducidos se incluyen genes relacionados con la respuesta antioxidante (Anejo V),

aunque también aparecen tres tioeredoxinas entre los genes reprimidos (Anejo VI). Además, el resultado del diagrama de Venn realizado comparando los genes inducidos en respuesta a ácido acético, con los inducidos por metil-viologén (estrés oxidativo), indica que la coincidencia entre la respuesta a ambos estreses es prácticamente inexistente. Este resultado puede deberse a que en el trabajo con metil-viologen se obtuvieron relativamente pocos genes con variación en su expresión. Por otro lado, el tratamiento realizado en el presente trabajo, probablemente no sea suficiente como para inducir muerte celular programada. En cualquier caso, dado que algunos de los resultados obtenidos son contradictorios, serán necesarios estudios posteriores para determinar si, al igual que en levadura, el tratamiento con ácido acético provoca estrés oxidativo en *A. thaliana*.

Entre los genes que muestran mayor inducción en este trabajo (Anejo V), se encuentran varios transportadores. Concretamente, se inducen genes que codifican para simportadores de toma de nutrientes con protones (*SEL1*, *PHT1* y *PHT2*), un canal de amonio (*AMT1.2*), y dos transportadores de tipo ABC (*ABCG22* y *PGP12*). En células de levadura, la acidificación intracelular inhibe los simportadores de entrada de un sustrato con protones, y los antiportadores que median la salida de un sustrato de forma simultánea a la entrada de protones (Serrano, 1991). En base a los resultados obtenidos en este trabajo, cabe esperar que de forma similar a lo que ocurre en levadura, una bajada del pH citosólico inhiba la entrada de nutrientes mediada por co-transporte con protones en *A. thaliana*. Por este motivo, varios simportadores de toma de nutrientes ven incrementada su expresión en respuesta a ácido acético.

Por otro lado, las categorías de “transporte de antibióticos” y “transporte de tetraciclina” (dentro de la categoría “*drug transport*”) aparecen sobre-representadas entre los genes inducidos de este trabajo (Anejo III). Asimismo, trabajos previos en levadura, han demostrado la importancia de varios transportadores “*multidrug resistance*” (de tipo ABC o antiportadores droga/protón) en la tolerancia a ácido acético. Concretamente, un tratamiento con ácidos débiles, aumenta la expresión de antiportadores “*multidrug resistance*” como TPO2 y TPO3, mediada por el factor de transcripción Haa1p (Fernandes *et al.*, 2005). La mutación del gen *TPO3*, incrementa la sensibilidad de la levadura a acético, lo que correlaciona con una mayor acumulación del ácido en las células tratadas (Fernandes *et al.*, 2005). De forma similar, el transportador de tipo ABC Pdr12p, regulado por el factor de transcripción War1p (Schüller *et al.*, 2004), media la salida de ácidos orgánicos de las células de levadura y

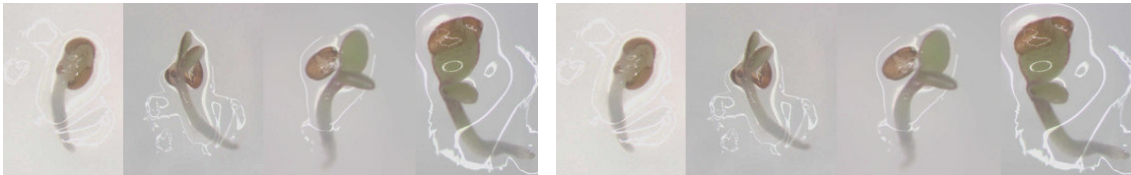
se requiere para la tolerancia a la acidificación intracelular causada por estos ácidos (Piper *et al.*, 1998). Los transportadores de *A. thaliana* cuyos genes se inducen por ácido acético (*ABCG22* y *PGP12*) (Anejo V) podrían tener funciones similares a los transportadores señalados para el caso de levadura. Por lo tanto, los resultados de este trabajo, señalan a estos transportadores como posibles candidatos responsables de la salida del acetato de la célula vegetal.

Por otro lado, en el presente trabajo, se ha comparado la respuesta transcripcional a ácido acético, con la respuesta a una bajada del pH externo (Lager *et al.*, 2010). Los resultados muestran que la coincidencia entre los genes que varían su expresión por ambos tratamientos, es menor del 10% para los genes inducidos, y menor del 3% para los reprimidos. Esta baja coincidencia es comprensible, ya que la respuesta a bajo pH externo se asemeja a la respuesta a auxina y a elicitores de patógenos, cosa que no ocurre con el ácido acético (Figura 4.64), que, como se mostró anteriormente, provoca una respuesta más similar a otros estreses abióticos.

En relación a los genes reprimidos, el análisis de las categorías sobre-representadas (Anejo IV) y, especialmente, la clasificación en categorías funcionales de los genes reprimidos más de 4 veces (Anejo VI), muestra que gran parte de estos genes participan en el metabolismo celular. Este resultado y el hecho de que la mayoría de genes que varían la expresión en presencia de ácido acético se repriman, sugiere que el tratamiento con ácido acético provoca una reducción del metabolismo celular, que podría ser la causa de la inhibición del crecimiento observada en presencia del ácido. Esta parada del metabolismo ocurre, probablemente, para permitir la adaptación de la célula a la nueva situación de estrés. Prueba de que la célula está remodelando su programa de crecimiento en respuesta al estrés, es la cantidad de factores de transcripción cuya expresión se ve afectada por el tratamiento, tanto inducidos (Anejo V) como reprimidos (Anejo VI).

Por último, la comparación realizada entre los genes reprimidos por ácido acético y los reprimidos por otros estreses abióticos en *A. thaliana* (Figura 4.66), muestra que la represión génica que se produce en respuesta a diferentes estreses, es más variable que la inducción. Sin embargo, este análisis sigue la misma tendencia que el de los genes inducidos, mostrando que el estrés más semejante al tratamiento con ácido acético sería el estrés por alta temperatura, seguido del estrés osmótico, y finalmente el estrés por bajo pH externo.

6-CONCLUSIONES



1-El rastreo genético realizado ha permitido aislar y caracterizar un mutante tolerante a ácidos débiles durante la germinación y el establecimiento de la plántula, que se ha denominado *wat1-ID* (“*weak acid tolerant1*” alelo 1-Dominante).

2-La caracterización fenotípica del mutante indicó que las plántulas de *wat1-ID* no muestran un mejor fenotipo en presencia de ácido acético, una vez germinadas. Sin embargo, son capaces de mantener un pH citosólico más elevado que el control durante un tratamiento con ácido acético. Por otro lado, se ha determinado que el mutante es sensible a cationes tóxicos, como el litio, pero es más tolerante al estrés osmótico. Por último, el crecimiento del mutante se ve reducido en medio con potasio limitante.

3-La caracterización genética estableció que *wat1-ID*, es un mutante dominante negativo, cuyos fenotipos se deben a la expresión de una versión truncada del gen At3g55480 (*WAT1*) que codifica para la adaptina β del complejo adaptador AP-3 (*WAT1*). Líneas transgénicas antisentido para dicho gen muestran los mismos fenotipos que el mutante *wat1-ID*.

4-El gen *WAT1* presenta dos formas de “*splicing*” alternativo y se expresa de forma ubicua en diferentes partes y tejidos de la planta, así como en diversos estadios del desarrollo. Su expresión no sufre grandes variaciones en respuesta a estímulos externos.

5-El análisis bioinformático de la proteína *WAT1* indica que las proteínas de *A. thaliana* más similares, son las adaptinas β del resto de complejos adaptadores. Sin embargo, la identidad de secuencia con la más semejante no supera el 20%. Por otra parte, se ha identificado una posible “caja clatrina” en la región “*hinge*” de la adaptina $\beta 3$, que podría ser responsable de su interacción con clatrina.

6-En condiciones normales, el pH y el potencial de membrana del mutante *wat1-ID* es similar al del control, pero en condiciones de estrés por ácido acético la bajada del pH citosólico y la hiperpolarización de la PM, es mucho menor en el caso del mutante. El mutante *wat1-ID* es capaz de mantener un pH citosólico más elevado, en presencia de ácido acético, porque expulsa el exceso de protones al exterior celular de forma más eficaz que el control silvestre. Su mayor eficacia radica en su capacidad para evitar la hiperpolarización de la PM, ya que en condiciones de estrés ácido, el mutante activa la toma de potasio, provocando la despolarización de la membrana necesaria para una mejor actuación de la bomba.

7-El mutante *wat1-ID* presenta no sólo una alteración en la homeostasis de pH, sino también en la homeostasis de otros cationes monovalentes, ya que acumula más

potasio, pero menos litio y menos sodio. La mayor acumulación de potasio ocurre tanto en raíz como en parte aérea, pero el menor contenido en sodio y litio se observa, principalmente, a nivel de la raíz.

8-Se plantea un posible modelo para explicar la alteración de la homeostasis de cationes monovalentes del mutante *wat1-ID*. Según este modelo, la mutación en la adaptina $\beta 3$, provocaría una deslocalización a membrana plasmática de un canal vacuolar de potasio, tanto en células de la epidermis como en células de la estela.

El canal de potasio deslocalizado a la PM de células epidérmicas se activaría por una reducción del pH intracelular (tratamiento con ácido acético), incrementando la toma de potasio, lo que activaría la salida de protones, tal y como se ha explicado anteriormente.

La deslocalización de este canal, causaría la mayor acumulación de potasio en el mutante, ya que por un lado, se aumentaría la subida de potasio a la parte aérea, y por otro se reduciría la salida de potasio de la vacuola. En medio con potasio limitante, el crecimiento del mutante se inhibe, probablemente porque no es capaz de utilizar las reservas de potasio de la vacuola eficazmente.

La reducción en la salida de potasio de la vacuola incrementaría el potencial de membrana del tonoplasto, reduciendo la toma de litio, y de forma indirecta la toma de sodio (e incrementando su salida). La menor acumulación de estos cationes en vacuola, hace que se reduzca su contenido global. Sin embargo, estos cationes resultan más tóxicos en el citosol.

La acumulación de litio en el citosol, contribuye a la sensibilidad que muestra el mutante a este catión. Asimismo, esta sensibilidad a litio se ha observado en mutantes de levadura afectados en el tráfico vesicular, por lo que la mutación en la adaptina $\beta 3$, también puede contribuir a este fenotipo.

La tolerancia a sodio del mutante, se explicaría por su mayor resistencia a estrés osmótico debida, en primer lugar, a su insensibilidad parcial a la inhibición del crecimiento provocada por el ácido abscísico, y en segundo lugar, porque *wat1-ID* acumula más potasio, lo que facilita la toma de agua por la raíz, y el mantenimiento de la turgencia.

9-La inhibición del crecimiento provocada por el ácido acético ocurre, al menos parcialmente, a través de la síntesis de ABA. De hecho, mutantes deficientes en la síntesis de ABA o insensibles a ABA son más tolerantes a la germinación en presencia

de ácido acético, mientras que los mutantes hipersensibles resultan más sensibles a ácido acético.

10-Se plantea un modelo para la actuación del ABA inhibiendo el crecimiento celular, basado en su acción conocida en las células oclusivas. Según este modelo, el ABA inhibiría a toma de potasio (canal AKT1) y la salida de protones a través de la PM (H^+ -ATPasas; genes AHAs). Esto provocaría una bajada del pH intracelular, que causaría la inhibición del crecimiento. Este mecanismo se retroalimentaría, ya que la reducción del pH intracelular activa la síntesis de ABA.

12-Los resultados del rastreo genético llevado a cabo en la presente tesis doctoral, ponen de manifiesto que la estrecha relación existente entre la homeostasis de pH y la de potasio en células de levadura, se mantiene en organismos vegetales. De hecho, se establece que la toma de potasio es un proceso esencial, para la tolerancia a la bajada de pH intracelular en células de *A. thaliana*. Asimismo, queda patente que la alteración de la homeostasis de un catión (en este caso H^+) afecta a la homeostasis de otros cationes monovalentes como litio, sodio o potasio. Por último, abre un campo novedoso de investigación sobre la posible implicación de los transportadores de potasio y protones en la inhibición del crecimiento mediada por ABA.

13-La respuesta transcripcional al ácido acético se basa principalmente en una represión de la expresión génica, más que en una inducción.

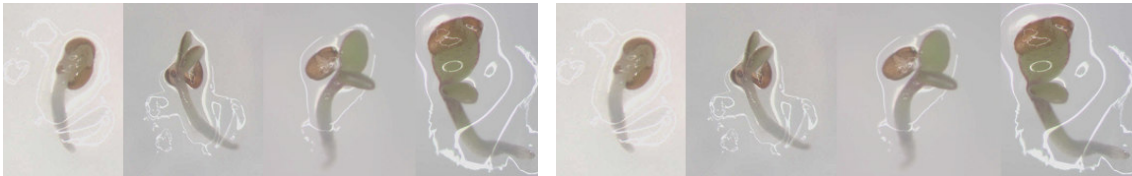
14-El estrés por ácido acético se asemeja al provocado por otros estreses abióticos, a diferencia de un tratamiento con bajo pH externo, que induce genes de respuesta a auxinas y a elicitores de patógenos.

14- Entre los genes inducidos por ácido acético se encuentran varios implicados en el plegamiento de proteínas (*HSPs*, *HSFs* y peptidil prolil cis-trans-isomerasas), lo que sugiere que este ácido débil provoca una alteración de la estructura de las proteínas.

15- Varios simportadores de toma de nutrientes (SEL1, PHT1, PHT2) se inducen en presencia de ácido acético, lo que sugiere que, al igual que en el caso de levadura, una bajada del pH citosólico inhibe a estos simportadores.

16- Los transportadores de tipo ABC-ATPasas ABCG22 y ABCB12/PGP12, cuyos genes se inducen por ácido acético, podrían ser posibles candidatos a expulsar el acetato del interior celular.

7- BIBLIOGRAFÍA



- Abbott, D. A., Suir, E., van Maris, A. J. & Pronk, J. T. 2008, "Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl Environ Microbiol*, vol. 74, no. 18, p. 5759.
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. & Hedrich, R. 2000, "GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel", *FEBS letters*, vol. 486, no. 2, p. 93.
- Aguilar, R. C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H. & Bonifacino, J. S. 2001, "Signal-binding specificity of the μ 4 subunit of the adaptor protein complex AP-4", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 16, p. 13145.
- Ahn, S. J., Shin, R. & Schachtman, D. P. 2004, "Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake", *Plant Physiology*, vol. 134, no. 3, p. 1135.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter., P. "Molecular Biology of the Cell". 4th edition. Garland Science: New York, 2000.
- Albertsen, M., Bellahn, I., Kramer, R. & Waffenschmidt, S. 2003, "Localization and function of the yeast multidrug transporter Tpo1p", *J Biol Chem*, vol. 278, no. 15, p. 12820.
- Alejandro S, Rodríguez P. L., Bellés J.M., Yenush L, García-Sánchez M. J., Fernández J.A. & Serrano R. 2007 "An *Arabidopsis* quiescin-sulfhydryl oxidase regulates cation homeostasis at the root symplast–xylem interface", *The EMBO Journal*, vol 26, p 3203.
- An, R., Chen, Q. J., Chai, M. F., Lu, P. L., Su, Z., Qin, Z. X., Chen, J. & Wang, X. C. 2007, "AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li⁺/H⁺ antiporter", *The Plant Journal*, vol. 49, no. 4, p. 718.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. & Gaber, R. F. 1992, "Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 9, p. 3736.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M. 1997, "N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange", *Biochemistry*, vol. 36, no. 15, p. 4675.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. & Blumwald, E. 1999, "Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*", *Science*, vol. 285, no. 5431, p. 1256
- Apse, M. P. & Blumwald, E. 2007, "Na transport in plants", *FEBS Letters*, vol. 581, p. 2247.
- 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", *The Plant Cell Online*, vol. 15, no. 2, p. 365.
- Barois, N. & Bakke, O. 2005, "The adaptor protein AP-4 as a component of the clathrin coat machinery: a morphological study", *Biochemical journal*, vol. 385, no. 2, p. 503.
- Barrero, J. M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P. L., Ponce, M. R. & Micol, J. L. 2005, "A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development", *Journal of experimental botany*, vol. 56, no. 418, p. 2071.
- Bassham, D. C., Brandizzi, F., Otegui, M. S. & Sanderfoot, A. A. 2008, "The secretory system of *Arabidopsis*", *The Arabidopsis Book*, edited by: Somerville CR, Meyerowitz EM, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, p. 1.

- Bauer, B. E., Rossington, D., Mollapour, M., Mamnun, Y., Kuchler, K. & Piper, P. W. 2003, "Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants", *European Journal of Biochemistry*, vol. 270, no. 15, p. 3189.
- Beales, N. 2004, "Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 3, no. 1, p. 1.
- Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M., Voelker, C. & others. 2004, "AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 44, p. 15621
- Bent A. F. 2000, "*Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species". *Plant Physiol.*, vol.124, p.1540.
- Bertani, G., 2004, "Lysogeny at mid twentieth century: P1, P2 and other experimental systems", *Journal of Bacteriology*, vol. 186, n°3, p. 595.
- Bevan, M. 1984, "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucleic Acids Research*, vol. 12, no. 22, p. 8711.
- Beyenbach, K. W. & Wiczorek, H. 2006, "The V-type H⁺-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation", *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, no. 4, p. 577.
- Bi, X., Corpina, R. A. & Goldberg, J. 2002, "Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat", *Nature*, vol. 419, no. 6904, p. 271.
- Bihler, H., Eing, C., Hebeisen, S., Roller, A., Czempinski, K. & Bertl, A. 2005, "TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel", *Plant physiology*, vol. 139, no. 1, p. 417.
- Binzel, M. L. 1995, "NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato", *Physiologia Plantarum*, vol. 94, no. 4, p. 722.
- Bobik, K., Boutry, M. & Duby, G. 2010, "Activation of the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase by acid stress: antibodies as a tool to follow the phosphorylation status of the penultimate activating Thr", *Plant Signal Behav*, vol. 5, no. 6, p. 681.
- Boehm, M. & Bonifacino, J. S. 2001, "Adaptins: the final recount", *Mol Biol Cell*, vol. 12, no. 10, p. 2907.
- Boehm, M. & Bonifacino, J. S. 2002, "Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals", *Gene*, vol. 286, no. 2, p. 175.
- Bowers, K., Lottridge, J., Helliwell, S. B., Goldthwaite, L. M., Luzio, J. P. & Stevens, T. H. 2004, "Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Traffic*, vol. 5, no. 3, p. 194.
- 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.*, vol 72., p 248.
- Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. & Rao, R. 2005, "The yeast endosomal Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking", *Molecular biology of the cell*, vol. 16, no. 3, p. 1396.
- Brul, S. & Coote, P. 1999, "Preservative agents in foods:: Mode of action and microbial resistance mechanisms", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, no. 1-2, p. 1.

- Brummer, B., Felle, H. & Parish, R. W. 1984, "Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump", *FEBS letters*, vol. 174, no. 2, p. 223.
- Buchner, P., Takahashi, H. & Hawkesford, M. J. 2004, "Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport", *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, no. 404, p. 1765.
- Budnik, A. & Stephens, D. J. 2009, "ER exit sites: localization and control of COPII vesicle formation", *FEBS Lett*, vol. 583, no. 23, p. 3796.
- Bueso, E., Alejandro, S., Carbonell, P., Perez-Amador, M. A., Fayos, J., Bellés, J. M., Rodriguez, P. L. & Serrano, R. 2007, 'The lithium tolerance of the *Arabidopsis cat2* mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene', *The Plant Journal*, vol. 52, no. 6, pp. 1052-1065.
- Burtner, C. R., Murakami, C. J., Kennedy, B. K. & Kaeberlein, M. 2009, "A molecular mechanism of chronological aging in yeast", *Cell Cycle*, vol. 8, no. 8, p. 1256.
- Cannon, W. 1928, "Organization for Physiological Homeostasis". *Physiological Reviews*. vol. 9, p- 399.
- Carmelo, V., Santos, H. & Sa-Correia, I. 1997, "Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochim Biophys Acta*, vol. 1325, no. 1, p. 63.
- Casanova, J. E. 2007, "Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors", *Traffic*, vol. 8, no. 11, p. 1476.
- Castrejon, F., Gomez, A., Sanz, M., Duran, A. & Roncero, C. 2006, "The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p", *Eukaryot Cell*, vol. 5, no. 3, p. 507.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D. T., Lepetit, M., Gosti, F. & Casse, F. 2004, "Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis", *The Plant Journal*, vol. 39, p.834.
- Chen, J. G., Pandey, S., Huang, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Assmann, S. M. & Jones, A. M. 2004, "GCR1 can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis* seed germination", *Plant physiology*, vol. 135, no. 2, p. 907.
- Cheng, N. H., Pittman, J. K., Shigaki, T., Lachmansingh, J., LeClere, S., Lahner, B., Salt, D. E. & Hirschi, K. D. 2005, "Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis", *Plant Physiology*, vol. 138, no. 4, p. 2048.
- Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Grant, J. J., Batistic, O., Li, L., Kim, B. G., Lee, S. C., 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*", *The Plant Journal*, vol. 52, no. 2, p. 223.
- Cherel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H. & Thibaud, J. B. 2002, "Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁽⁺⁾ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA", *Plant Cell*, vol. 14, no. 5, p. 1133.
- Chiu, J. C., Brenner, E. D., DeSalle, R., Nitabach, M. N., Holmes, T. C. & Coruzzi, G. M. 2002, "Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor--Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*", *Molecular Biology and Evolution*, vol. 19, no. 7, p. 1066.

- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I. & others. 2000, "The Arabidopsis dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 16, p. 9323.
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R. & Owen, D. J. 2002, "Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex", *Cell*, vol. 109, no. 4, p. 523.
- Cosgrove, D. J. 1997, "Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement", *The Plant Cell*, vol. 9, no. 7, p. 1031.
- Cosgrove, D. J. 2000, "Loosening of cell walls by expansins". *Nature*, vol.407 n° 6802, p321.
- Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S. & Emr, S. D. 1997, "The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole", *Cell*, vol. 91, no. 1, p. 109.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. & Abrams, S. R. 2010, "Abscisic acid: emergence of a core signaling network", *Annual Review of Plant Biology*, vol. 61, p. 651.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. & Müller-Rber, B. 1997, "New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency", *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 10, p. 2565.
- Czempinski, K., Frachisse, J. M., Maurel, C., Barbier-Brygoo, H. & Mueller-Roeber, B. 2002, "Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis "two-pore"K⁺ channel KCO1", *The Plant Journal*, vol. 29, no. 6, p. 809.
- Dalton, F. N. 1984, "Dual pattern of potassium transport in plant cells: a physical artifact of a single uptake mechanism", *Journal of Experimental Botany*, vol. 35, no. 12, p. 1723.
- Darsow, T., Burd, C. G. & Emr, S. D. 1998, "Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE", *The Journal of cell biology*, vol. 142, no. 4, p. 913.
- Davenport, R. J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. & Tester, M. 2007, "The Na⁺ transporter AtHKT1; 1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis", *Plant, cell & environment*, vol. 30, no. 4, p. 497.
- Davies, D. D. 1986, "The fine control of cytosolic pH", *Physiologia Plantarum*, vol. 67, no. 4, p. 702.
- de Angeli, A., Thomine, S., Frachisse, J. M., Ephritikhine, G., Gambale, F. & Barbier-Brygoo, H. 2007, "Anion channels and transporters in plant cell membranes", *FEBS letters*, vol. 581, no. 12, p. 2367.
- Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W. & Bonifacino, J. S. 1997, "AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression", *EMBO J*, vol. 16, no. 5, p. 917.
- Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A. & Bonifacino, J. S. 1999, "Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the [beta] 3A subunit of the AP-3 adaptor", *Molecular Cell*, vol. 3, no. 1, p. 11.
- Dell'Angelica, E. C. 2009, "AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade", *Current opinion in cell biology*, vol. 21, no. 4, p. 552.
- Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y. D. & Schumacher, K. 2006, "Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis", *The Plant Cell Online*, vol. 18, no. 3, p. 715.

- Duby, G., Hosal, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H. & Thibaud, J. B. 2008, "AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels", *The Plant Journal*, vol. 53, no. 1, p. 115.
- Duby, G. & Boutry, M. 2009, "The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles", *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, vol. 457, no. 3, p. 645.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. & Pikaard, C. S. 2006, "Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics", *The Plant Journal*, vol. 45, no. 4, p. 616.
- Elumalai, R. P., Nagpal, P. & Reed, J. W. 2002, "A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion", *The Plant Cell Online*, vol. 14, no. 1, p. 119.
- Epstein, E., Rains, D. W., Elzam, O. E. & others. 1963, "Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 49, no. 5, p. 684.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. & Duden, R. 2000, "COP I domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP", *The EMBO journal*, vol. 19, no. 15, p. 3905.
- Felle, H. & Bertl, A. 1986, "Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 848, no. 2, p. 176.
- Felle, H. 1987. "Proton Transport and pH Control in *Sinapis alba* Root Hairs: A Study carried out with Double-Barrelled pH Micro-electrodes". *J. Exp. Bot.*, vol 38, p. 340.
- Felle, H., Peters, W. and Palme, K. 1991. "The electrical response of maize to auxins", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol 1064, n°2, p. 199.
- Felle, H. H. 2001, "pH: signal and messenger in plant cells", *Plant biol (Stuttg)*, vol. 3, p. 577.
- Feng, L., Seymour, A. B., Jiang, S., To, A., Peden, A. A., Novak, E. K., Zhen, L., Rusiniak, M. E., Eicher, E. M., Robinson, M. S. & others. 1999, "The β 3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness", *Human molecular genetics*, vol. 8, no. 2, p. 323.
- Feraru, E., Paciorek, T., Feraru, M. I., Zwiewka, M., De Groodt, R., De Rycke, R., Kleine-Vehn, J. & Friml, J. 2010, "The AP-3 β Adaptin Mediates the Biogenesis and Function of Lytic Vacuoles in Arabidopsis", *The Plant Cell Online*, vol. 22, no. 8, p. 2812.
- Fernandes, A. R., Mira, N. P., Vargas, R. C., Canelhas, I. & Sa-Correia, I. 2005, "Saccharomyces cerevisiae adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes", *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 337, no. 1, p. 95.
- Fernandez J, Garcia-Sanchez M, Felle, H., 1999. "Physiological evidence for a proton pump and sodium exclusion mechanisms at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L." *J. Exp. Bot.*, vol. 50, p.1763.
- Fiedelman, M. L., Seeholzer, S. H., Walsh, K. B. & Moore, R. D. 1982 "Intracellular pH mediates action of insulin upon glycolysis in frog skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, vol. 242, p. 87.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. & Rock, C. D. 2002, "Abscisic acid signaling in seeds and seedlings", *The Plant Cell Online*, vol. 14, no. Supplement 1, p. S15.

- Finn, J. T., Grunwald, M. E. & Yau, K. W. 1996, "Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions", *Annual review of physiology*, vol. 58, no. 1, p. 395.
- Fischer, W.N., André.B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitzkreuz, K. and Frommer, W.B. 1998, "Plant amino acid transport". *Trends Plant Sci.* n° 29, p. 188.
- Frías, I., Caldeira, M.T., Pérez-Castiñeira, J.R., Navarro-Aviñó J.P., Culiañez-Maciá, F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pagés, M., Hager, A. and Serrano, R. 1996. "A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles". *The Plant Cell*, vol 8. p 1533.
- Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. & Mellman, I. 1999, "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells", *Cell*, vol. 99, no. 2, p. 189.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T. & Walz, T. 2004, "Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy", *Nature*, vol. 432, no. 7017, p. 573.
- Francois, J., Schaftingen, E. & Hers, H. G. 1986, "Effect of benzoate on the metabolism of fructose 2, 6-bisphosphate in yeast", *European Journal of Biochemistry*, vol. 154, no. 1, p. 141.
- Fu, H. H. & Luan, S. 1998, "AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*", *The Plant Cell Online*, vol. 10, no. 1, p. 63
- Fuglsang, A. T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O. N., Aducci, P. & Palmgren, M. G. 1999, "Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 51, p. 36774.
- Fuglsang, A. T., Tulinius, G., Cui, N. & Palmgren, M. G. 2006, "Protein phosphatase 2A scaffolding subunit A interacts with plasma membrane H⁺-ATPase C-terminus in the same region as 14-3-3 protein", *Physiologia Plantarum*, vol. 128, no. 2, p. 334.
- Fuglsang, A. T., Guo, Y., Cuin, T. A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K. A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K. S. & others. 2007, "*Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein", *The Plant Cell Online*, vol. 19, no. 5, p. 1617.
- Fujii, H., Verslues, P. E. & Zhu, J. K. 2007, "Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*", *The Plant Cell Online*, vol. 19, no. 2, p. 485.
- Fujii, H. & Zhu, J. K. 2009, "Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 20, p. 8380.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S. Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L. & Zhu, J. K. 2009, "In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway", *Nature*, vol. 462, no. 7273, p. 660.
- Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Yamaguchi, T., Saito, N. & Iida, S. 2000, "Colour-enhancing protein in blue petals", *Nature*, vol. 407, no. 6804, p. 581.
- 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⁺/H⁺ antiporter from rice", *Plant and Cell Physiology*, vol. 45, no. 2, p. 146.
- Gaidarov, I. & Keen, J. H. 1999, "Phosphoinositide--AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits", *The Journal of cell biology*, vol. 146, no. 4, p. 755.

- Garciadeblas B, Senn ME, Banuelos MA, Rodriguez-Navarro A, 2003. "Sodium transport and HKT transporters: the rice model". *Plant J.* vol 34 p. 788.
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L. & Fink, G. R. 1999, "The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 4, p. 1480.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L. & Fink, G. R. 2001, "Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 20, p. 11444.
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G. & Schumacher, K. 2007, "Plant proton pumps", *FEBS letters*, vol. 581, no. 12, p. 2204.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J. B. & Sentenac, H. 1998, "Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap", *Cell*, vol. 94, no. 5, p. 647.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. & Jürgens, G. 2003, "The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth", *Cell*, vol. 112, no. 2, p. 219.
- Gerson, D.F. 1982 in *Intracellular pH: Its measurement, regulation and utilization in cellular functions* (Nuccitelli, R. & Deamer, O.W., eds) p. 375, Alan R. Liss, New York.
- Gevaudant, F., Duby, G., von Stedingk, E., Zhao, R., Morsomme, P. & Boutry, M. 2007, "Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance", *Plant Physiol*, vol. 144, no. 4, pp. 1763-1776.
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Corte-Real, M., Passarella, S. & Marra, E. 2005, "Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death", *Gene*, vol. 354, p. 93.
- Gierth, M., Maser, P. & Schroeder, J. I. 2005, "The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots", *Plant Physiology*, vol. 137, no. 3, p. 1105.
- Gierth, & Mäser, P. 2007, "Potassium transporters in plants--involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis", *FEBS letters*, vol. 581, no. 12, p. 2348.
- Gil-Mascarell, R., Lopez-Coronado, J. M., Belles, J. M., Serrano, R. & Rodriguez, P. L. 1999, "The *Arabidopsis* HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase", *Plant J.* vol. 17, no. 4, p. 373.
- Glick, B. S. 2001, "ER export: more than one way out", *Curr Biol*, vol. 11, no. 9, p. R361.
- Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D. & Maathuis, F. J. 2006, "*Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport", *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 4, p. 791.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K. & Maathuis, F. J. 2007, "The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 25, p. 10726.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R. & Rodriguez, P. L. 2002, "The short-chain alcohol

- dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde”, *The Plant Cell Online*, vol. 14, no. 8, p. 1833.
- Gonzalez-Guzman, M., Abia, D., Salinas, J., Serrano, R. & Rodriguez, P. L. 2004, “Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds”, *Plant Physiol*, vol. 135, no. 1, p. 325.
- Goormaghtigh E, Chadwick C, Scarborough GA. 1986. “Monomers of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase catalyze efficient proton translocation”. *J. Biol. Chem*, vol. 1 261 p. 7466.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A., Vartanian, N. & Giraudat, J. 1999, “ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling”, *The Plant Cell Online*, vol. 11, no. 10, p. 1897.
- Guaragnella, N., Passarella, S., Marra, E. & Giannattasio, S. 2010, “Knock-out of metacaspase and/or cytochrome c results in the activation of a ROS-independent acetic acid-induced programmed cell death pathway in yeast”, *FEBS letters*, vol. 584, no. 16, p. 3655.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C. P., Gong, D., Halfter, U. & Zhu, J. K. 2002, “A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis”, *Developmental Cell*, vol. 3, no. 2, p. 233.
- Hanton, S. L., Bortolotti, L. E., Renna, L., Stefano, G. & Brandizzi, F. 2005, “Crossing the divide-transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants”, *Traffic*, vol. 6, no. 4, p. 267.
- Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I. & Uozumi, N. 2005, “Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells”, *The Plant Journal*, vol. 44, no. 6, p. 928.
- Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Seymour, I., Bauer, B. E., Krapf, G., Schuller, C., Kuchler, K. & Piper, P. W. 2003, “Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter”, *Yeast*, vol. 20, no. 7, p. 575.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. & Sussman, M. R. 1998, “A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition”, *Science*, vol. 280, no. 5365, p. 918.
- Holmes, DS and Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, vol.114, p. 193.
- Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J. & Coote, P. J. 1996, “Activity of the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid”, *Applied and environmental microbiology*, vol. 62, no. 9, p. 3158.
- Holyoak, C. D., Thompson, S., Ortiz Calderon, C., Hatzixanthis, K., Bauer, B., Kuchler, K., Piper, P. W. & Coote, P. J. 2000, “Loss of Cmk1 Ca⁽²⁺⁾calmodulin-dependent protein kinase in yeast results in constitutive weak organic acid resistance, associated with a post-transcriptional activation of the Pdr12 ATP-binding cassette transporter”, *Mol Microbiol*, vol. 37, no. 3, p. 595.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Pore, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A. A. & others.2003, “The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 9, p. 5549
- Hughes, H. & Stephens, D. J. 2008, “Assembly, organization, and function of the COPII coat”, *Histochem Cell Biol*, vol. 129, no. 2, p. 129.

- Huizing, M., Boissy, R. E. & Gahl, W. A. 2002, "Hermansky-Pudlak syndrome: vesicle formation from yeast to man", *Pigment cell research*, vol. 15, no. 6, p. 405.
- Hurth, M. A., Suh, S. J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E. & Neuhaus, H. E. 2005, "Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast", *Plant physiology*, vol. 137, no. 3, p. 901.
- Ingram, J. & Bartels, D. 1996, "The molecular basis of dehydration tolerance in plants", *Annual Review of Plant Biology*, vol. 47, no. 1, p. 377.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. & Kobayashi, M. 2007, "Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 23, p. 9900.
- Jackson, C. L. & Casanova, J. E. 2000, "Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors", *Trends in Cell Biology*, vol. 10, p. 61.
- Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miege, C. & Gaude, T. 2007, "The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants", *Cell*, vol. 130, no. 6, p. 1057.
- Janicka-Russak, M. & Klobus, G. 2007, "Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPases in response to NaCl and ABA", *Journal of plant physiology*, vol. 164, no. 3, p. 295.
- Jürgens, G. & Geldner, N. 2002, "Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space", *Traffic*, vol. 3, no. 9, p. 605.
- Jürgens, G. 2004, "Membrane trafficking in plants", *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 20, no. 1, p. 481.
- Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J. L. & Boutry, M. 2005, "Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 33, p. 11675.
- Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M. E., Peden, A. A., Meyer, G. E., Carskadon, S. L., Kapfhamer, D., Sufalko, D., Robinson, M. S., Noebels, J. L. & others. 1998, "Mutation in AP-3 δ in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles", *Neuron*, vol. 21, no. 1, p. 111.
- Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N. & Schroeder, J. I. 1998, "AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity", *The Plant Cell*, vol. 10, no. 1, p. 51.
- Kim, S. A., Kwak, J. M., Jae, S. K., Wang, M. H. & Nam, H. G. 2001, "Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an Arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants", *Plant and Cell Physiology*, vol. 42, no. 1, p. 74.
- Kim, K. N., Cheong, Y. H., Grant, J. J., Pandey, G. K. & Luan, S. 2003, "CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis", *The Plant Cell Online*, vol. 15, no. 2, p. 411.
- Kim, T. H., Bhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. & Schroeder, J. I. 2010, "Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling", *Annual review of plant biology*, vol. 61, p. 561.
- Kirchhausen, T. 2002, "Clathrin adaptors really adapt", *Cell*, vol. 109, no. 4, p. 413.

- Klychnikov, O. I., Li, K. W., Lill, H. & De Boer, A. H. 2007, "The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins", *Journal of experimental botany*, vol. 58, no. 5, p. 1013.
- Köhler, C., Merkle, T. & Neuhaus, G. 1999, "Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide-and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*", *The Plant Journal*, vol. 18, no. 1, p. 97.
- Koornneef, M., Jorna, M. L., Brinkhorst-Van der Swan, D. & Karssen, C. M. 1982, "The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh", *TAG Theoretical and Applied Genetics*, vol. 61, no. 4, p. 385.
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. & Bedoya, F. 1983, "Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate", *Biochemical Journal*, vol. 214, no. 3, p. 657.
- Krebs, M., Beyhl, D., Grlich, E., Al-Rasheid, K. A., Marten, I., Stierhof, Y. D., Hedrich, R. & Schumacher, K. 2010, "*Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 7, p. 3251.
- Kren, A., Mamnun, Y. M., Bauer, B. E., Schuller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Gregori, C., Piper, P. & Kuchler, K. 2003, "War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast", *Molecular and cellular biology*, vol. 23, no. 5, p. 1775.
- Kruger NJ. 1994. "The Bradford method for protein quantitation", *Methods. Mol. Biol.*, vol. 32, p.9.
- Kubo, I. & Lee, S. H. 1998, "Potentiation of antifungal activity of sorbic acid", *J. Agric. Food Chem*, vol. 46, no. 10, p. 4052.
- Kuhn, J. M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M. B., Maktabi, M. H. & Schroeder, J. I. 2006, "The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA", *Plant physiology*, vol. 140, no. 1, p. 127.
- Kurkdjian, A. & Guern, J. 1989, "Intracellular pH: measurement and importance in cell activity", *Annual Review of Plant Biology*, vol. 40, no. 1, p. 271.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. & Thibaud, J. B. 2000, "A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*", *The Plant Cell Online*, vol. 12, no. 6, p. 837.
- Lager, I., Andreasson, O., Dunbar, T. L., Andreasson, E., Escobar, M. A. & Rasmusson, A. G. 2010, "Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses", *Plant Cell Environ*, vol. 33, no. 9, p. 1513.
- Lam, H. M., Chiu, J., Hsieh, M. H., Meisel, L., Oliveira, I. C., Shin, M. & Coruzzi, G. 1998, "Glutamate-receptor genes in plants", *Nature*, vol. 396, no. 6707, p. 125.
- Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J. & Lauriere, C. 1998, "Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions", *Planta*, vol. 205, no. 3, p. 452.
- Latz, A., Ivashikina, N., Fischer, S., Ache, P., Sano, T., Becker, D., Deeken, R. & Hedrich, R. 2007, "In planta AKT2 subunits constitute a pH-and Ca²⁺-sensitive inward rectifying K⁺ channel", *Planta*, vol. 225, no. 5, p. 1179.
- Laurie, S., Feeney, K. A., Maathuis, F. J., Heard, P. J., Brown, S. J. & Leigh, R. A. 2002, "A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots", *The Plant Journal*, vol. 32, no. 2, p. 139.

- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. & Hoflack, B. 1998, "The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 45, p. 29451.
- Lebaudy, A., Very, A. A. & Sentenac, H. 2007, "K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions", *FEBS letters*, vol.581, no.12, p.2357.
- Lee, G. J., Kim, H., Kang, H., Jang, M., Lee, D. W., Lee, S. & Hwang, I. 2007a, "EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein-3, AtVTI12, and phosphatidylinositol-3-phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells", *Plant physiology*, vol. 143, no. 4, p. 1561.
- Lee, S. C., Lan, W. Z., Kim, B. G., Li, L., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Lu, G., Buchanan, B. B. & Luan, S. 2007b, "A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 40, p. 15959.
- Leng, Q., Mercier, R. W., Hua, B. G., Fromm, H. & Berkowitz, G. A. 2002, "Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels", *Plant Physiology*, vol. 128, no. 2, p. 400.
- Li, H. T., Liu, H., Gao, X. S. & Zhang, H. 2009, "Knock-out of Arabidopsis AtNHX4 gene enhances tolerance to salt stress", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 382, no. 3, p. 637.
- Li, J., Yang, H., Ann Peer, W., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E. L. & others. 2005, "Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development", *Science*, vol. 310, no. 5745, p. 121.
- Li, Z., Baldwin, C. M., Hu, Q., Liu, H. & Luo, H. 2010, "Heterologous expression of Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.)", *Plant, Cell & Environment*, vol. 33, no. 2, p. 272.
- Liu, H., Tang, R., Zhang, Y., Wang, C., Lv, Q., Gao, X., Li, W. & Zhang, H. , 2010, "AtNHX3 is a vacuolar K⁺/H⁺ antiporter required for low-potassium tolerance in Arabidopsis thaliana", *Plant, Cell & Environment* vol. 33, no. 11, p. 1989.
- Lopez, F., Leube, M., Gil-Mascarell, R., Navarro-Avino, J. P. & Serrano, R. 1999, "The yeast inositol monophosphatase is a lithium- and sodium-sensitive enzyme encoded by a non-essential gene pair", *Mol Microbiol*, vol. 31, no. 4, p. 1255.
- Loureiro, V. 2000, "Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control", *Food Research International*, vol. 33, no. 3-4, p. 247.
- Lovegrove, A. and Hooley, R. (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.*, vol. 5, p.102.
- Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leao, C. & Corte-Real, M. 2001, "Saccharomyces cerevisiae commits to a programmed cell death process in response to acetic acid", *Microbiology*, vol. 147, no. 9, p. 2409.
- Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M. T. & Corte-Real, M. 2003, "Acetic acid induces a programmed cell death process in the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*", *FEMS yeast research*, vol. 3, no. 1, p. 91.
- Lundmark, R. & Carlsson, S. R. 2002, "The beta-appendages of the four adaptor-protein (AP) complexes: structure and binding properties, and identification of sorting nexin 9 as an accessory protein to AP-2", *Biochemical Journal*, vol. 362, p. 597.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. & Grill, E. 2009, "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors", *Science*, vol. 324, no. 5930, p. 1064.

- Maathuis, F. J. 2006, "The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity", *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 5, p. 1137.
- Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M. G. & Davies, J. M. 2005, "Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts", *Microbiology*, vol. 151, no. 6, p. 1995.
- Maresova, L. & Sychrova, H. 2006, "Arabidopsis thaliana CHX17 gene complements the khal deletion phenotypes in Saccharomyces cerevisiae", *Yeast*, vol. 23, no. 16, p. 1167.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K. A., Hoshi, T. & Hedrich, R. 1999, "AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 13, p. 7581.
- Martinoia, E., Maeshima, M. & Neuhaus, H. E. 2007, "Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism", *Journal of experimental botany*, vol. 58, no. 1, p. 83.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J., Sanders, D. & others. 2001, "Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis", *Plant Physiology*, vol. 126, no. 4, p. 1646.
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E. P., Shinmyo, A., Oiki, S. & others. 2002a, "Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 9, p. 6428.
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D. J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N. & others. 2002b, "Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1", *FEBS letters*, vol. 531, no. 2, p. 157.
- Mathieu, Y., Guern, J., Pean, M., Pasquier, C., Beloeil, J. C. & Lallemand, J. Y. 1986, "Cytoplasmic pH regulation in Acer pseudoplatanus cells: II. Possible mechanisms involved in pH regulation during acid-load", *Plant physiology*, vol. 82, no. 3, p. 846.
- Mathieu, Y., Jouanneau, J. P., Thomine, S., Lapous, D. & Guern, J. 1994, "Cytosolic protons as secondary messengers in elicitor-induced defence responses", *Biochem Soc Symp*, vol. 60, p. 113.
- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Lauriere, C. & Guern, J. 1996, "Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors", *Planta*, vol. 199, no. 3, p. 416.
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM and Meegher RB. 1995. "Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants *act2-1* and *act4-1*". *The Plant Journal* vol. 8, p. 613.
- McMahon, H. T. & Mills, I. G. 2004, "COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches", *Current opinion in cell biology*, vol. 16, no. 4, p. 379.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. & Giraudat, J. 2001, "The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway", *The Plant Journal*, vol. 25, no. 3, p. 295.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Müller, A. & others. 2007, "Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure", *The EMBO Journal*, vol. 26, no. 13, p. 3216.
- Meyerowitz, E. M. 1989, "Arabidopsis, a useful weed", *Cell*, vol. 56, no. 2, p. 263.

- Michelet, B. & Boutry, M. 1995, "The Plasma Membrane H⁺-ATPase (A Highly Regulated Enzyme with Multiple Physiological Functions)", *Plant Physiology*, vol. 108, no. 1, p. 1.
- Mira, N. P., Lourenco, A. B., Fernandes, A. R., Becker, J. D. & Sa-Correia, I. 2009, "The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids", *FEMS Yeast Res*, vol. 9, no. 2, p. 202.
- Mira, N. P., Becker, J. D. & Sa-Correia, I. 2010a, "Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid", *OMICS*, vol. 14, no. 5, p. 587.
- Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F. & Sa-Correia, I. 2010b, "Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid", *Microb Cell Fact*, vol. 9, no. 1, p. 79.
- Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schuller, C., Kuchler, K. & Piper, P. W. 2004, "Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative", *Yeast*, vol. 21, no. 11, p. 927.
- Mollapour, M. & Piper, P. W. 2006, "Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*", *FEMS Yeast Res*, vol. 6, no. 8, p. 1274.
- Mollapour, M. & Piper, P. W. 2007, "Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid", *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 18, p. 6446.
- Mollapour, M., Shepherd, A. & Piper, P. W. 2008, "Novel stress responses facilitate *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of the monocarboxylate preservatives", *Yeast*, vol. 25, no. 3, p. 169.
- Morsomme, P., de Kerchove, d. "A., De Meester, S., Thines, D., Goffeau, A. & Boutry, M. 1996, "Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H⁽⁺⁾-pumping and permit yeast growth at low pH", *EMBO J*, vol. 15, no. 20, p. 5513.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. & Robinson, M. S. 2003, "Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells", *The Journal of cell biology*, vol. 162, no. 5, p. 909.
- Mouline, K., Very, A. A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J. B. & Sentenac, H. 2002, "Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*", *Genes & development*, vol. 16, no.3, p. 339.
- Munns, R. & Tester, M. 2008, "Mechanisms of salinity tolerance", *Plant Biology*, vol. 59, no. 1, p. 651.
- Murguia, J. R., Belles, J. M. & Serrano, R. 1996, "The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity", *J Biol Chem*, vol. 271, no. 46, p. 29029.
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. & Giraudat, J. 2002, "Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production", *Plant Cell*, vol. 14, no. 12, p. 3089.
- Nakatsu, F. & Ohno, H. 2003, "Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network", *Cell structure and function*, vol. 28, no. 5, p. 419.
- Nambara, E. & Marion-Poll, A. 2005, "Abscisic acid biosynthesis and catabolism", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 56, p. 165.

- Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., Munoz, F. J., Rodriguez-Lopez, M., Baroja-Fernandez, E. & Pozueta-Romero, J. 2006, "Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-Golgi to the chloroplast through the secretory pathway", *The Plant Cell Online*, vol. 18, no. 10, p. 2582.
- Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M. & Faundez, V. 2007, "Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery", *Journal of cell science*, vol. 120, no. 4, p. 531.
- Niihama, M., Takemoto, N., Hashiguchi, Y., Tasaka, M. & Morita, M. T. 2009, "ZIP Genes Encode Proteins Involved in Membrane Trafficking of the TGN--PVC/Vacuoles", *Plant and Cell Physiology*, vol. 50, no. 12, p. 2057
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., Schroeder, J. I. & Getzoff, E. D. 2009, "Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1", *Science*, vol. 326, no. 5958, p. 1373.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S. Y., Wang, A., Carvalho, P. C., Lee, S., Caddell, D. F., Cutler, S. R., Chory, J. & others. 2010, "PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis", *The Plant Journal*, vol. 61, no. 2, p. 290.
- Niu, X., Narasimhan, M. L., Salzman, R. A., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. 1993, "NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte", *Plant physiology*, vol. 103, no. 3, p. 713.
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. & Pardo, J. M. 1995, "Ion homeostasis in NaCl stress environments", *Plant Physiology*, vol. 109, no. 3, p. 735.
- North, H. M., Almeida, A. D., Boutin, J. P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B. & Marion-Poll, A. 2007, "The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers", *The Plant Journal*, vol. 50, no. 5, p. 810.
- Odorizzi, G., Cowles, C. R. & Emr, S. D. 1998, "The AP-3 complex: a coat of many colours", *Trends in Cell Biology*, vol. 8, p. 283.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. & Bonifacino, J. S. 1999, "μ1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells1", *FEBS letters*, vol. 449, no. 2-3, p. 215.
- Ohno, H. 2006a, "Clathrin-associated adaptor protein complexes", *J Cell Sci*, vol. 119, no. 18, p. 3719.
- Ohno, H. 2006b, "Physiological roles of clathrin adaptor AP complexes: lessons from mutant animals", *Journal of biochemistry*, vol. 139, no. 6, p. 943.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. & Zhu, J. K. 2003, "A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 20, p. 11771.
- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y. C., Jiang, L. & Robinson, D. G. 2006, "Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors", *The Plant Cell Online*, vol. 18, no. 5, p. 1239.
- Olszewski, N., Sun, T. P. & Gubler, F. 2002, "Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways", *Plant Cell*, vol. 14 Suppl, p. S61.
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A. & others. 2007, "Structure of a 14-3-3

- coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy”, *Molecular cell*, vol. 25, no. 3, p. 427.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B., McMahon, H. T. & Evans, P. R. 2000, “The structure and function of the β 2-adaptin appendage domain”, *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 16, p. 4216.
- Owen, D.J. & Luzio, J. P. 2000, “Structural insights into clathrin-mediated endocytosis”, *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 12, no. 4, p. 467.
- Owen, D. J., Collins, B. M. & Evans, P. R. 2004, “Adaptors for clathrin coats: structure and function”, *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 20, p. 153.
- Padmanaban, S., Chanroj, S., Kwak, J. M., Li, X., Ward, J. M. & Sze, H. 2007, “Participation of endomembrane cation/H⁺ exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells”, *Plant physiology*, vol. 144, no. 1, p. 82.
- Palmgren, M. G. & Christensen, G. 1993, “Complementation in situ of the yeast plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase gene *pma1* by an H⁽⁺⁾-ATPase gene from a heterologous species”, *FEBS Lett*, vol. 317, no. 3, p. 216.
- Palmgren, M. G. 2001, “Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient”, *Annual Review of Plant Biology*, vol. 52, no. 1, p. 817.
- Pandey, S., Nelson, D. C. & Assmann, S. M. 2009, “Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*”, *Cell*, vol. 136, no. 1, p. 136.
- Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K. & Robinson, L. C. 1997, “Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex”, *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 14, p. 4194.
- Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O. & Quintero, F. J. 2006, “Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance”, *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 5, p. 1181.
- Parets-Soler, A., Pardo, J. M. & Serrano, R. 1990, “Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase”, *Plant physiology*, vol. 93, no. 4, p. 1654.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F. & others. 2009, “Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins”, *Science*, vol. 324, no. 5930, p. 1068.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X. & others. 2010, “Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought-and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions”, *Plant Biotechnology Journal*, vol. 9, n°1, p.88.
- Passoneau, J. A. & Lowry, O. H. 1993, “Enzymatic Analysis: A Practical Guide” (Humana, Totawa, NJ, USA)
- Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H. & Klumperman, J. 2004, “Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins”, *The Journal of cell biology*, vol. 164, no. 7, p. 1065.
- Peiter, E., Maathuis, F. J., Mills, L. N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A. M. & Sanders, D. 2005, “The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement”, *Nature*, vol. 434, no. 7031, p. 404.
- Pevsner, J., Volkandt, W., Wong, B. R. & Scheller, R. H. 1994, “Two rat homologs of clathrin-associated adaptor proteins”, *Gene*, vol. 146, no. 2, p. 279.

- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J. B. & Sentenac, H. 2001, "Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity in *Arabidopsis* Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 5, p. 3215.
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. & Sentenac, H. 2003, "Five-group distribution of the Shaker-like K⁺ channel family in higher plants", *Journal of molecular evolution*, vol. 56, no. 4, p. 418.
- Pimpl, P., Movafeghi, A., Coughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S. & Robinson, D. G. 2000, "In situ localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles", *The Plant Cell Online*, vol. 12, no. 11, p. 2219.
- Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P. & Cole, M. 1997a, "Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase", *Cell Stress & Chaperones*, vol. 2, no. 1, p. 12.
- Piper, R. C., Bryant, N. J. & Stevens, T. H. 1997b, "The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway", *The Journal of cell biology*, vol. 138, no. 3, p. 531.
- Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P. & Kuchler, K. 1998, "The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast", *EMBO J*, vol. 17, no. 15, p. 4257.
- Piper, P. W. 1999, "Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no. 11-12, p. 1219.
- Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K. & Mollapour, M. 2001, "Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives", *Microbiology*, vol. 147, no. 10, p. 2635.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y. & Lopez-Molina, L. 2008, "The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity", *Plant Cell*, vol. 20, no. 10, p. 2729.
- Piskurewicz, U., Tureckova, V., Lacombe, E. & Lopez-Molina, L. 2009, "Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity", *EMBO J*, vol. 28, no. 15, p. 2259.
- Platten, J. D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R. J., Fairbairn, D. J., Horie, T., Leigh, R. A., Lin, H. X., Luan, S. & others. 2006, "Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance", *Trends in plant science*, vol. 11, no. 8, p. 372.
- Poirier, Y. & Bucher, M. 2002, "Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*", *The Arabidopsis Book*, edited by: Somerville CR, Meyerowitz EM, *American Society of Plant Biologists*, Rockville.
- Pottosin, I. I. & Schonknecht, G. 2007, "Vacuolar calcium channels", *Journal of experimental botany*, vol. 58, no. 7, p. 1559.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I. & Cho, M. H. 2010, "High-Affinity K⁺ Transport in *Arabidopsis*: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions", *Plant physiology*, vol. 153, no. 2, p. 863.

- Qi, Z. & Spalding, E. P. 2004, "Protection of plasma membrane K⁺ transport by the salt overly sensitive1 Na⁺-H⁺ antiporter during salinity stress", *Plant Physiology*, vol. 136, no. 1, p. 2548.
- Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. & Zhu, J. K. 2002, "Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 12, p. 8436.
- Quintero, F. J. & Blatt, M. R. 1997, "A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla", *FEBS letters*, vol. 415, no. 2, p. 206.
- Rayle DL. & Cleland RE. 1992, "The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well", *Plant Physiology*, vol 99, n°4, p. 1271.
- Razem, F. A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R. & Hill, R. D. 2006, "The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor", *Nature*, vol. 439, no. 7074, p. 290.
- Regenberg, B., Villalba, J. M., Lanfermeijer, F. C. & Palmgren, M. G. 1995, "C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane", *Plant Cell*, vol. 7, no. 10, p. 1655.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. & Hedrich, R. 2002, "AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 6, p. 4079.
- Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. L., Von Figura, K. & Hning, S. 2002, "Phosphorylation of the AP2 μ subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals", *The Journal of cell biology*, vol. 156, no. 5, p. 791.
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K. A., Grabov, A., Dolan, L. & Hatzopoulos, P. 2001, "TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs", *The Plant Cell Online*, vol. 13, no. 1, p. 139.
- Risk, J. M., Macknight, R. C. & Day, C. L. 2008, "FCA does not bind abscisic acid", *Nature*, vol. 456, no. 7223, p. E5.
- Robinson, M. S. 2004, "Adaptable adaptors for coated vesicles", *Trends in cell biology*, vol. 14, no. 4, p. 167.
- Rodríguez-Navarro, A. 2000, "Potassium transport in fungi and plants", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1469, no. 1, p. 1.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda M. N., Baghour M., Cagnac O., Venema, K. 2009, "Plant NHX cation/proton antiporters", *Plant Signalling and Behavior*, vol. 4, no. 4, p. 256.
- Roe, A. J., O'Byrne, C., McLaggan, D. & Booth, I. R. 2002, "Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity", *Microbiology*, vol. 148, no. 7, p. 2215.
- Roelfsema, M. R., Staal, M. & Prins, H. 1998, "Blue light-induced apoplastic acidification of *Arabidopsis thaliana* guard cells: Inhibition by ABA is mediated through protein phosphatases", *Physiologia Plantarum*, vol. 103, no. 4, p. 466.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M. B., Galle, A., Kim, T. H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J. I. & Rodriguez, P. L. 2009, "Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid", *Plant physiology*, vol. 150, no. 3, p. 1345.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M. P., Nicolas, C., Lorenzo, O. & Rodriguez, P. L. 2004, "Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the

- protein phosphatase 2C HABI reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling”, *The Plant Journal*, vol. 37, no. 3, p. 354.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J. I., Serrano, R. & Rodriguez, P. L. 2006, “Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HABI”, *Plant physiology*, vol. 141, no. 4, p. 1389.
- Sakano, K. 2001, “Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism”, *International Review of Cytology*, vol. 206, p. 1.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2000. “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santa-María, G. E., 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”, *The Plant Cell Online*, vol. 9, no. 12, p. 2281.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L. & Márquez, J. A. 2009a, “The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid”, *Nature*, vol. 462, no. 7273, p.665.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S. Y., Márquez, J. A., Cutler, S. R. & Rodriguez, P. L. 2009b, “Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs”, *The Plant Journal*, vol. 60, no. 4, p.575.
- Santiago, J., Dupeux, F., Betz, K., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Marquez, J. A. & Rodriguez, P. L. 2010, “Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs”, *Plant Science. in Press*.
- Sauer, N. 2007, “Molecular physiology of higher plant sucrose transporters”, *FEBS letters*, vol. 581, no. 12, p. 2309.
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M. & Waner, D. 2001, “Guard cell signal transduction”, *Annual Review of Plant Biology*, vol. 52, no. 1, p. 627.
- Schüller, C., Mamnun, Y. M., Mollapour, M., Krapf, G., Schuster, M., Bauer, B. E., Piper, P. W. & Kuchler, K. 2004, “Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Mol Biol Cell*, vol. 15, no. 2, p. 706.
- Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flugge, U. I. & Kunze, R. 2003, “ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins”, *Plant Physiology*, vol. 131, no. 1, p. 16
- Scott, A. C. & Allen, N. S. 1999, “Changes in cytosolic pH within Arabidopsis root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism”, *Plant Physiology*, vol. 121, no. 4, p. 1291.
- Segami, S., Nakanishi, Y., Sato, M. H. & Maeshima, M. 2010, “Quantification, Organ-Specific Accumulation and Intracellular Localization of Type II H⁺-Pyrophosphatase in Arabidopsis thaliana”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 51, no. 8, p. 1350.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J. M., Gaymard, F. & Grignon, C. 1992, “Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system”, *Science*, vol. 256, no. 5057, p. 663.
- Seo, M., Peeters, A. J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A., Koornneef, M., Kamiya, Y. & Koshiba, T. 2000, “The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 23, p. 12908.

- Serrano R. 1978. "Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biochem.*, vol. 22, p.51.
- Serrano, R. 1985. Membrane potentials and active transport in Plants and Fungi". In: "*Plasma membrane ATPase of Plants and Fungi*". Edited by: CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Serrano, R 1991 "Transport across yeast vacuolar and plasma membranes". In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*, Broach JR, Pringle JR, Jones EW (eds) p 523, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Shalata, A. & Neumann, P. M. 2001, "Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation", *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, no. 364, p. 2207.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J. & Nguyen, H. T. 2004, "Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics", *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, no. 407, p. 2343.
- Shen, Y. Y., Wang, X. F., Wu, F. Q., Du, S. Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X. L., Peng, C. C., Yu, X. C., Zhu, S. Y. & others. 2006, "The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor", *Nature*, vol. 443, no. 7113, p. 823.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. & Zhu, J. K. 2000, "The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 12, p. 6896.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. & Zhu, J. K. 2002, "The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants", *The Plant Cell Online*, vol. 14, no. 2, p. 465.
- Simmen, T., Hning, S., Icking, A., Tikkanen, R. & Hunziker, W. 2002, "AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells", *Nature cell biology*, vol. 4, no. 2, p. 154.
- Simoës, T., Mira, N. P., Fernandes, A. R. & Sa-Correia, I. 2006, "The SPI1 gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, plays a prominent role in the development of yeast resistance to lipophilic weak-acid food preservatives", *Appl Environ Microbiol*, vol. 72, no. 11, p. 7168.
- Sirichandra, C., Wasilewska, A., Vlad, F., Valon, C. & Leung, J. 2009a, "The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action", *Journal of experimental botany*, vol. 60, no. 5, p. 1439.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H. C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S. & Kwak, J. M. 2009b, "Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase", *FEBS Lett*, vol. 583, no. 18, p. 2982.
- Smith, F. A. & Raven, J. A. 1979, "Intracellular pH and its regulation", *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 30, no. 1, p. 289.
- Sohn, E. J., Rojas-Pierce, M., Pan, S., Carter, C., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Rojo, E., Surpin, M. & Raikhel, N. V. 2007, "The shoot meristem identity gene TFL1 is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 47, p. 18801.
- Song, C. P., Guo, Y., Qiu, Q., Lambert, G., Galbraith, D. W., Jagendorf, A. & Zhu, J. K. 2004, "A probable Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast development in Arabidopsis thaliana", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 27, p. 10211.

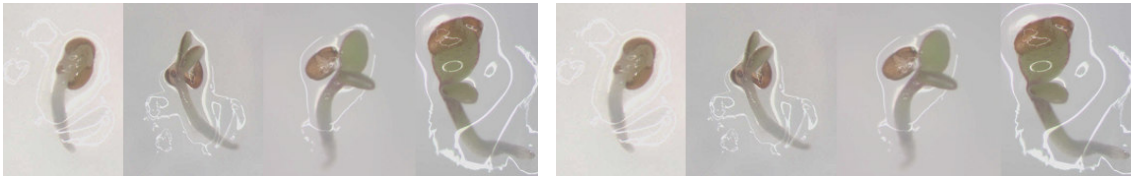
- Sottosanto, J. B., Gelli, A. & Blumwald, E. 2004, "DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression", *The Plant Journal*, vol. 40, no. 5, p. 752.
- Stagg, S. M., LaPointe, P. & Balch, W. E. 2007, "Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic", *Current opinion in structural biology*, vol. 17, no. 2, p. 221.
- Stepp, J. D., Huang, K. & Lemmon, S. K. 1997, "The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole", *The Journal of cell biology*, vol. 139, no. 7, p. 1761.
- Stratford, M. & Anslow, P. A. 1996, "Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids", *FEMS microbiology letters*, vol. 142, no. 1, p. 53.
- Stratford, M. & Anslow, P. A. 1998, "Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid preservative"", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 27, no. 4, p. 203.
- Strompen, G., Dettmer, J., Stierhof, Y. D., Schumacher, K., Jürgens, G. & Mayer, U. 2005, "*Arabidopsis* vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis", *The Plant Journal*, vol. 41, no. 1, p. 125.
- Sun, B., Chen, L., Cao, W., Roth, A. F. & Davis, N. G. 2004, "The yeast casein kinase Yck3p is palmitoylated, then sorted to the vacuolar membrane with AP-3-dependent recognition of a YXXΦ adaptin sorting signal", *Molecular biology of the cell*, vol. 15, no. 3, p. 1397.
- Sunkar, R., Kaplan, B. & Bouche. 2000, "Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance", *The Plant Journal*, vol.24, no. 4, p.533.
- Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oecking, C. & Sommarin, M. 1999, "Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein", *The Plant Cell Online*, vol. 11, no. 12, p. 2379.
- Sze, H., Schumacher, K., Müller, M. L., Padmanaban, S. & Taiz, L. 2002, "A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase", *Trends in plant science*, vol. 7, no. 4, p. 157.
- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N. H., Bock, K. W., Conejero, G., Li, X., Twell, D., Ward, J. M. & others. 2004, "Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development", *Plant physiology*, vol. 136, no. 1, p. 2532.
- Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F. F., Christmann, A. & Grill, E. 2010, "Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity", *The Plant Journal*, vol. 61, no. 1, p. 25.
- ter Haar, E., Harrison, S. C. & Kirchhausen, T. 2000, "Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 3, p. 1096.
- Thibaud, J. B., Soler, A. & Grignon, C. 1986, "H⁺ and K⁺ electrogenic exchanges in corn roots", *Plant physiology*, vol. 81, no. 3, p. 847.
- Titorenko, V. I. & Mullen, R. T. 2006, "Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER", *The Journal of cell biology*, vol. 174, no. 1, p. 11.

- Tocquin P, Corbesier L, Havelange A, Pieltain A, Kurtem E, Bernier G, Périlleux C. 2003. "A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *A. thaliana*". *BMC Plant Biology*, vol. 3, p. 2.
- Ton, J., Flors, V. & Mauch-Mani, B. 2009, "The multifaceted role of ABA in disease resistance", *Trends in plant science*, vol. 14, no. 6, p. 310.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. & Shinozaki, K. 2009, "Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 41, p. 17588.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E. P., Nakamura, T. & Schroeder, J. I. 2000, "The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*", *Plant Physiology*, vol. 122, no. 4, p. 1249.
- Van Weert, A. W., Geuze, H. J. & Stoorvogel, W. 1997, "Heterogeneous behavior of cells with respect to induction of retrograde transport from the trans-Golgi network to the Golgi upon inhibition of the vacuolar proton pump", *European journal of cell biology*, vol. 74, no. 4, p. 417.
- Venema, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M. & Donaire, J. P. 2002, "The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 4, p. 2413.
- Vernoud, V., Horton, A. C., Yang, Z. & Nielsen, E. 2003, "Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis", *Plant Physiology*, vol. 131, no. 3, p. 1191.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. & Zhu, J. K. 2006, "Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status", *Plant J*, vol. 45, no. 4, p. 523.
- Very, A. A. & Sentenac, H. 2002, "Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane", *Trends in Plant Science*, vol. 7, no. 4, p. 168.
- Very, A. A. & Sentenac, H. 2003, "Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants", *Plant Biology*, vol. 54, p.575.
- Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P. & Grabov, A. 2004, "Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots", *The Plant Journal*, vol. 40, no. 4, p. 523.
- Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B. & Czempinski, K. 2006, "Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta", *The Plant Journal*, vol. 48, no. 2, p. 296.
- Vowels, J. J. & Payne, G. S. 1998, "A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole", *The EMBO Journal*, vol. 17, no. 9, p. 2482.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. & Yin, H. L. 2003, "Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi", *Cell*, vol. 114, no. 3, p. 299.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M. & others. 2000, "Activation tagging in Arabidopsis", *Plant Physiology*, vol. 122, no. 4, p. 1003.
- Wen, W., Chen, L., Wu, H., Sun, X., Zhang, M. & Banfield, D. K. 2006, "Identification of the yeast R-SNARE Nyv1p as a novel longin domain-containing protein", *Molecular biology of the cell*, vol. 17, no. 10, p. 4282.

- Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J. B. & Cherel, I. 2007, "Increased functional diversity of plant K⁺ channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no.1, p. 486.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* vol., 14 Suppl., p S165.
- Xu, Y. Y., Wang, X. M., Li, J., Li, J. H., Wu, J. S., Walker, J. C., Xu, Z. H. & Chong, K. 2005, "Activation of the WUS gene induces ectopic initiation of floral meristems on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana*", *Plant molecular biology*, vol. 57, no. 6, p. 773.
- Xue, Z. Y., Zhi, D. Y., Xue, G. P., Zhang, H., Zhao, Y. X. & Xia, G. M. 2004, "Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺", *Plant Science*, vol. 167, no. 4, p. 849.
- Yamaguchi, T., Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Saito, N., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Kusumi, T. & Iida, S. 2001, "Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration", *Plant Cell Physiol*, vol. 42, no. 5, p. 451.
- Yamaguchi, T., Apse, M. P., Shi, H. & Blumwald, E. 2003, "Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 21, p. 12510.
- Yamaguchi, T., Aharon, G. S., Sottosanto, J. B. & Blumwald, E. 2005, "Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺-and pH-dependent manner", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 44, p. 16107.
- Yenush, L., Mulet, J. M., Arino, J. & Serrano, R. 2002, "The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression", *EMBO J*, vol. 21, no. 5, p. 920.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J. & Serrano, R. 2005, "pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase", *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 19, p. 8683.
- Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. & Pardo, J. M. 2002, "Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response", *The Plant Journal*, vol. 30, no. 5, p. 529.
- Yoshida, K., Kawachi, M., Mori, M., Maeshima, M., Kondo, M., Nishimura, M. & Kondo, T. 2005, "The involvement of tonoplast proton pumps and Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue", *Plant and Cell Physiology*, vol. 46, no. 3, p. 407
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F. & Shinozaki, K. 2006, "The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*", *J Biol Chem*, vol. 281, no. 8, p. 5310.
- Yoshioka, K., Moeder, W., Kang, H. G., Kachroo, P., Masmoudi, K., Berkowitz, G. & Klessig, D. F. 2006, "The chimeric *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses", *The Plant Cell Online*, vol. 18, no. 3, p. 747.
- Young, J. C., DeWitt, N. D. & Sussman, M. R. 1998, "A transgene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings", *Genetics*, vol. 149, no. 2, p. 501.

-
- Zhang, H. X. & Blumwald, E. 2001, "Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit", *Nature biotechnology*, vol. 19, no. 8, p. 765.
- Zhang, X., Wang, H., Takemiya, A., Song, C., Kinoshita, T. & Shimazaki, K. 2004, "Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts", *Plant Physiology*, vol. 136, no. 4, p. 4150.
- Zhao, R., Dielen, V., Kinet, J. M. & Boutry, M. 2000, "Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility", *The Plant Cell Online*, vol. 12, no. 4, p. 535.
- Zhao, J., Barkla, B. J., Marshall, J., Pittman, J. K. & Hirschi, K. D. 2008, "The *Arabidopsis* *cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H⁺-ATPase activity", *Planta*, vol. 227, no. 3, p. 659.

8-ANEJOS



Anejo I: Secuencia de los cebadores empleados en el trabajo.

Cebadores empleados para comprobar la inserción del T-DNA

5'35S ("forward"): 5'CAACATGGTGGAGCACGACA3'

3'35S ("reverse"): 5'GGGATCTAGATATCACATCA3'

3'BAR ("forward"): 5'GGATCTACCATGAGCCCAGA3'

5'BAR ("reverse"): 5'GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC3'

Cebador para localizar el T-DNA tras el rescate plasmídico

5'LB: 5'AGATTTCCGAATTAGAATAA3'

Cebadores empleados para la construcción de sondas

At3g55470F: 5'TGGCTGTTGGAATCCTTGAGG3'

At3g55470R: 5'TTGGCTATGCTTCCATCCTCC3'

Sonda 1

At3g55480F1: 5'GTGCAGAGGCTGGTGA CTTTC3'

At3g55480R1: 5'CAGCGGAAACAGAA GTC TCTG3'

Sonda 2

At3g55480F2: 5'CTCCAGGAGTAGTTGGAGCTG3'

At3g55480R2: 5'GCTGCTAGTACAACCGCACTG3'

Cebadores empleados para las PCR diagnósticas

m470-1 LP: 5'AAGTCTGCGTGTTCCTTGCTTC3'

m470-1 RP: 5'GCCGTGCAATCAATATCTCAC3'

m470-2LP: 5'CTGATCAGTGGCAAAGGTCTC3'

m470-2RP: 5'TTTGATTAAAGCCGTGCAATC3'

SAIL_LB2: 5' GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA3'

SALK_LBb1.3: 5'ATTTTGCCGATTTTCGGAAC3'

Cebadores empleados en las RT-PCR semicuantitativa

Actina 8F: 5'AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT3'

Actina8R: 5'GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA3'

At3g55470F y At3g55470R (igual que para las sondas)

Cebadores para las construcciones 35S:At3g55480 truncado (sentido y antisentido)

480truncado for: 5' ATATCTAGAATGTGGCGTCACAGTCATCG3'

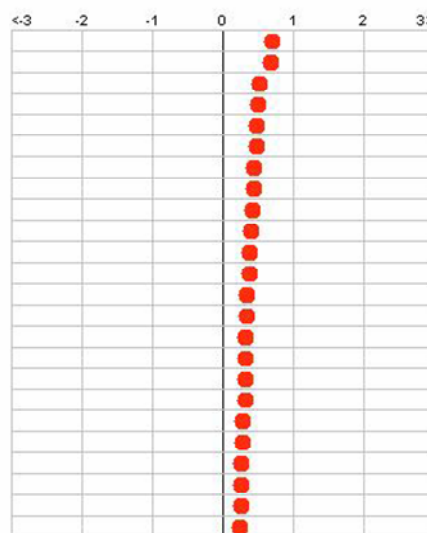
480truncado-STOP rev: 5'TATGAGCTCTCAGCCCAAGCTATATAC3'

Anejo II: Variación en la expresión del gen At3g55480 en respuesta a diferentes estreses, de acuerdo a la base de datos GENEVESTIGATOR.

- La parte superior muestra los tratamientos que provocan inducción del gen.
- La parte inferior muestra los tratamientos que reprimen el gen.

Arabidopsis thaliana (experimental)

- Cs study 2 (shoot)
- BLH3B03
- night extension (intermediate)
- night extension (early)
- nitrate(45mM) / sucrose(90mM)
- cold study 7 (Te)
- cold study 7 (Rsch)
- light study 6 (csn5)
- heat (green)
- norflurazon
- benzothiadiazole (mil4)
- hypoxia study 5 (2h)
- cold study 7 (Nd)
- cold study 6 (8°C)
- M. incognita (early)
- iron deficiency (LZ3)
- night extension (late)
- cold study 7 (Ler)
- cold study 7 (Coi)
- cold study 7 (C24)
- osmotic study 2 (late)
- CO2 high
- CaCl2/MgCl2 (1h)
- lincomycin

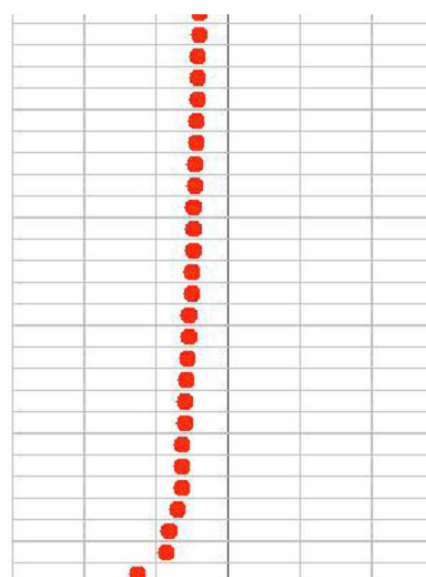


Arabidopsis thaliana (control)

- untreated shoot samples
- untreated cell culture samples
- untreated rosette samples
- untreated rosette samples
- nitrate(0mM) / sucrose(90mM)
- 20°C/18°C treated rosette samples (Te)
- 20°C/18°C treated rosette samples (Rsch)
- dark grown csn5 seedlings
- untreated green tissue samples (early)
- untreated seedlings
- mock treated rosette tissue samples (mil4)
- 21% O2 treated root samples (2h)
- 20°C/18°C treated rosette samples (Nd)
- 20°C treated rosette samples (78h)
- non-infected root samples (early)
- untreated root tip samples (LZ3)
- untreated rosette samples
- 20°C/18°C treated rosette samples (Ler)
- 20°C/18°C treated rosette samples (Coi)
- 20°C/18°C treated rosette samples (C24)
- untreated root samples (late)
- untreated leaf samples
- H2O treated leaf samples (1h)
- untreated seedlings

Arabidopsis thaliana (control)

- ozone
- nitrate(0mM) / sucrose(90mM)
- light study 5 (AS-hyg)
- EF-Tu (elf18)
- drought (wt)
- P. syringae study 4
- hypoxia study 2 (early)
- FLG22 (4h)
- light study 4 (cli186)
- light / low CO2
- drought (dor)
- UV unfiltered max-310nm (6h)
- FLG22 (1h)
- B. graminis (ataf1-1)
- blue study 2
- heat study 2 (ws)
- light/drought (aox1a(salk))
- HrpZ (4h)
- cold study 8 (Col-0)
- heat study 2 (hsf1/3)
- hypoxia study 2 (late)
- light/drought (aox1a(sail))
- P. syringae study 5 (avrRps4)
- zeatin study 2 (Col-0)
- zeatin study 2 (arr10-5:arr12-1)
- P. syringae study 5 (avrRpm1)



Arabidopsis thaliana (control)

- solvent treated aerial parts (Col-0)
- air treated seedlings
- root samples (N-free/suc-free)
- dark grown ASN1::HPT2 seedlings
- untreated seedlings (fis2-17)
- untreated leaf samples (Col)
- non-infected leaf samples
- untreated seedlings (early)
- H2O treated leaf samples (4h)
- dark grown cli186 seedlings
- dark grown low CO2 treated rosette samples
- untreated leaf samples (dor)
- seedlings irradiated with 327nm cut-off (6h)
- H2O treated leaf samples (1h)
- non-infected rosette leaf samples
- low light grown seedlings (Col-0)
- untreated leaf samples (ws)
- untreated leaf samples (aox1a(salk))
- H2O treated leaf samples (4h)
- untreated all aerial tissue samples (Col-0)
- untreated leaf samples (hsf1/3)
- untreated seedlings (late)
- untreated leaf samples (aox1a(sail))
- MgCl2 treated leaf samples
- solvent treated aerial parts (Col-0)
- solvent treated aerial parts (arr10-5:arr12-1)
- MgCl2 treated leaf samples

Anejo III: Resultado del análisis FATIGO para los genes inducidos.

Tabla que muestra el porcentaje de genes perteneciente a cada categoría funcional (GO), “*Biological process*” en la lista de genes inducidos, y en el resto del genoma. Se incluye el p-value, que indica que los genes de estas categorías se hayan sobre-representados de forma significativa en la lista de genes inducidos. Los colores representan categorías muy relacionadas y/o pertenecientes a diferentes niveles de GO.

Categoría funcional	% en genes inducidos	% en resto del genoma	p-value ajustado
Respuesta a radiación (GO 0009314)	3,97	1,49	0,03857
Respuesta a estímulo lumínico (GO 0009416)	3,97	1,45	0,03532
Respuesta a intensidad lumínica (GO 0009642)	2,12	0,2	0,0005061
Respuesta a alta intensidad lumínica (GO 0009644)	1,85	0,12	0,0002301
Respuesta a estímulo de temperatura (GO 0009266)	6,61	1,28	3,684e-8
Respuesta a calor (GO 0009408)	5,56	0,32	1,262e-15
Respuesta a un estímulo de carbohidrato (GO 0009743)	2,65	0,6	0,01548
Respuesta a quitina (GO 0010200)	1,85	0,39	0,04472
Respuesta a hipoxia (GO 0001668)	0,79	0,04	0,03857
Respuesta a estrés oxidativo (GO 0006979)	3,17	0,88	0,0197
Respuesta a ROS (GO 0000302)	2,38	0,42	0,006771
Respuesta a peróxido de hidrógeno (GO 0042542)	2,38	0,34	0,00199
Respuesta a un estímulo hormonal (GO 0009725)	6,88	2,86	0,006771
Respuesta a toxina (GO0009636)	1,59	0,25	0,03532
Transporte de tetraciclina (GO 0015904)	1,06	0,07	0,02224
Transporte de antibióticos (GO 0042891)	1,06	0,07	0,02351
Metabolismo de la D-ribosa (GO 0006014)	0,79	0,04	0,03857
Plegamiento de proteínas (GO 0006457)	2,91	0,85	0,03532

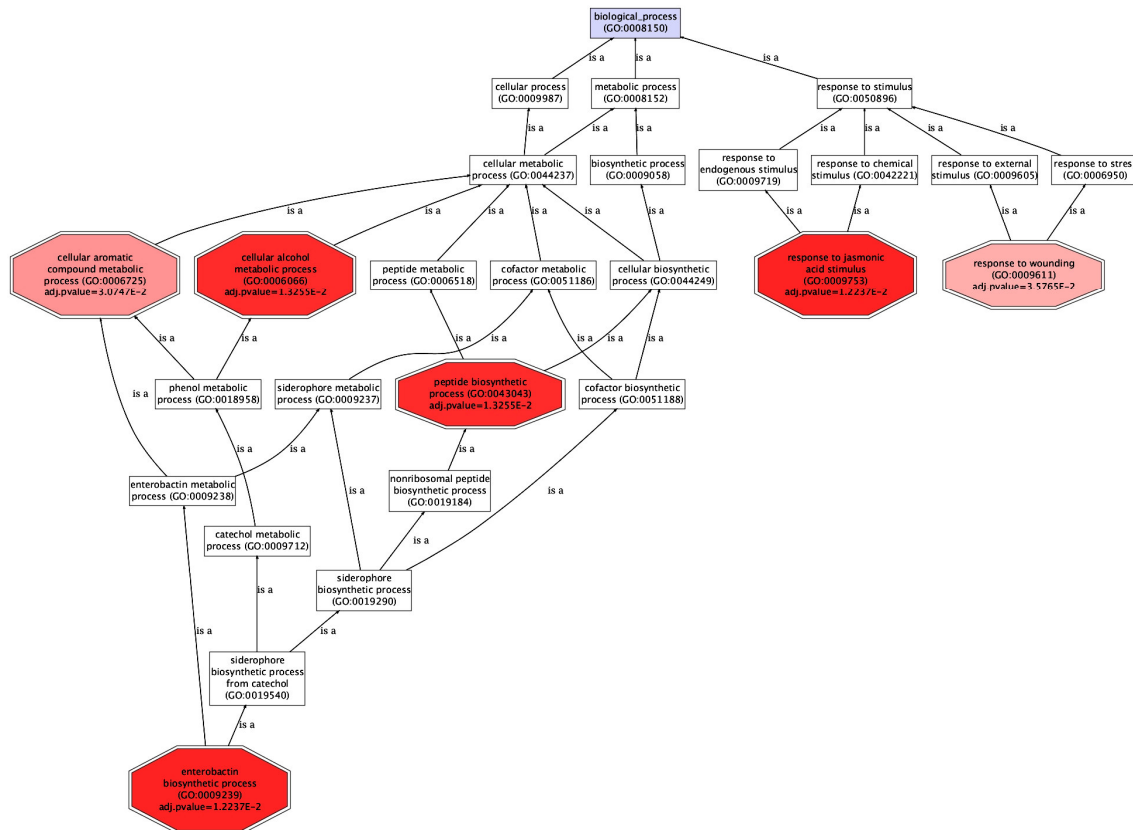
A continuación, se incluye un diagrama donde se muestran las categorías funcionales del “*Gene Ontology*” (GO), “*Biological process*”, sobre-representadas en la lista de genes inducidos, y el p-value de las que resultan significativas. Las categorías se muestran en diferentes niveles, de más general (arriba), a más concreto (abajo).

Anejo IV: Resultado del análisis FATIGO para los genes reprimidos.

Tabla que muestra el porcentaje de genes perteneciente a cada categoría funcional (GO), “*Biological process*” en la lista de genes reprimidos, y en el resto del genoma. Se incluye el p-value que indica que los genes de estas categorías se hayan sobre-representados de forma significativa en la lista de genes reprimidos.

Categoría funcional	% en lista de genes inducidos	% en el resto del genoma	p-value ajustado
Metabolismo de compuestos aromáticos	3,87	1,41	0,03075
Metabolismo de alcoholes (GO:0006066)	3,87	1,29	0,01325
Biosíntesis de enterobactina	1,72	0,24	0,01224
Biosíntesis de péptidos	1,72	0,26	0,01325
Respuesta a ácido jasmónico (GO:0009753)	2,37	0,46	0,01224
Respuesta a herida	2,15	0,52	0,03577

A continuación, se incluye un diagrama donde se muestran las categorías funcionales del “Gene Ontology” (GO), “Biological process”, sobre-representadas en la lista de genes reprimidos, y el p-value de las que resultan significativas. Las categorías se muestran en los diferentes niveles, de más general (arriba), a más concreto (abajo).



Anejo V: Tabla genes inducidos por ácido acético.

Locus	Factor inducción	Nombre
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN		
At2g26150	5,5	<i>Heat shock transcription factor family (HSFA2)</i>
At1g77570	3,3	<i>Heat shock transcription factor family (HSFA5)</i>
At2g37430	5,7	<i>Zinc finger transcription factor (ZAT11)</i>
At4g01540	3,5	<i>No apical meristem (NAM) family protein (NTM1)</i>
At2g47520	6,7	<i>ERF/AP2 family (B-2 subfamily; HRE2)</i>
At1g72360	5,3	<i>ERF/AP2 family (B-2 subfamily; HRE1)</i>
At2g40340	4,2	<i>ERF/AP2 family (A2 subfamily; DREB2C)</i>
PLEGAMIENTO O DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS		
At5g52640	6,1	<i>Heat shock protein, cytosolic (HSP90.1)</i>
At5g51440	4,1	<i>Small heat shock protein, mitochondrial (HSP23.5-M)</i>
At1g74310	3,8	<i>Heat shock protein 101 (HSP101)</i>
At1g07400	4,1	<i>Heat shock protein, class I (HSP17.8-CI)</i>
At5g48570	5,9	<i>Peptidyl-prolil cis-trans isomerasa/FK506 binding protein (ROF2)</i>
At3g09350	3,5	<i>Hsp70-binding protein; nucleotide exchanger factor (FES1A)</i>
At4g34210	7,4	<i>ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 11E3 (ASK11) Subunit of ubiquitin ligase SCF complex</i>
At5g65450	3,4	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein</i>
TRANSPORTADORES		
At1g78000	5,2	<i>Sulphate transporter (SEL1)</i>
At5g43370	4	<i>Inorganic phosphate transporter (PHT2)</i>
At1g61800	3,7	<i>Glucose-6-phosphate/phosphate translocator , chloroplast (GPT2)</i>
At5g43350	3,7	<i>Inorganic phosphate transporter (PHT1)</i>
At1g64780	3,5	<i>Ammonium transporter 1, member 2 (AMT1.2)</i>
At5g06530	3,2	<i>ABC transporter family protein (ABCG22)</i>
At1g02530	3,2	<i>ABC transporter, P-glycoprotein 12 (ABCB12/PGP12)</i>
METABOLISMO		
At1g05680	7,2	<i>UDP-glucosyl transferasa (F3F20.13)</i>
At4g34131	3,2	<i>UDP-glucosyl transferase (UGT73B3)</i>
At4g34135	3,9	<i>UDP-glucosyl transferase (UGT73B2)</i>
At1g43800	3,5	<i>Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase</i>
At4g37370	3,2	<i>Cytochrome P450 monooxygenase, member of CYP81D</i>
At5g22460	4,5	<i>Esterase/lipase/thioesterase family protein</i>
At3g15650	4,1	<i>Phospholipase/carboxylesterase family protein</i>
DETOXIFICACIÓN Y DEFENSA ANTIOXIDANTE		
At1g17180	4,4	<i>Glutati3n S-Transferasa (GSTU25)</i>
At3g22370	4	<i>Alternative oxidase 1a, mitochondrial (AOX1A)</i>

At4g29670	5,2	<i>Thioredoxin family protein</i>
At5g22140	3,4	<i>Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family</i>
At2g46740	3,6	<i>FAD-binding domain-containing protein</i>
QUINASAS		
At2g26290	4,8	<i>Root specific kinase 1 (ARSK1)</i>
At4g21410	3,6	<i>Receptor like protein kinase (RLK29)</i>
At1g51850	3,5	<i>Leucine-rich repeat protein kinase</i>
SENESENCIA		
At2g17850	5,9	<i>Senescence associated protein</i>
At5g47060	4,7	<i>Senescence-associated protein-related</i>
At4g17670	4,4	<i>Senescence-associated protein-related</i>
MISCELANEO		
At5g48430	7,4	<i>Low similarity to EDGP (extracellular dermal glycoprotein)</i>
At2g18190	5,2	<i>AAA-type ATPase family protein</i>
At3g28210	4,8	<i>Putative zinc finger protein (PMZ/SAP12)</i>
At3g03270	4,3	<i>Universal stress protein (USP)</i>
At3g11370	4,1	<i>DC1, divergent C1 domain-containing protein</i>
At2g18193	4	<i>AAA-type ATPase family protein</i>
At5g10830	3,8	<i>Embryo-abundant protein</i>
At5g20150	3,7	<i>SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein</i>
At2g43120	3,5	<i>Pirin calmodulin binding protein</i>
At4g00080	3,4	<i>Unfertilized embryo sac 11 (UNE11)</i>
At1g56150	3,2	<i>Auxin-responsive family protein</i>
At4g08950	3,3	<i>Exordium, response to brassinosteroid stimulus (EXO)</i>
DESCONOCIDO		
At4g08555	4,9	
At2g41730	4,7	
At5g66985	4,6	
At1g23550	2,2	
At2g38823	12,9	
At4g22280	11,5	
At5g40590	8,3	
At5g10040	7,6	
At4g12735	5,4	
At1g74870	4,1	
At2g32190	4	
At5g24660	3,8	

Anejo VI: Tabla genes reprimidos por ácido acético.

Locus	Factor inducción	Nombre
METABOLISMO		
Metabolismo de azúcares		
At4g26530	13,8	<i>Fructose-bisphosphate aldolase (chloroplast)</i>
At5g56870	5,2	<i>β-galactosidase 4 (BGAL4)</i>
At3g52840	4,3	<i>β-galactosidase 2 (BGAL2)</i>
At5g49360	4,6	<i>β-xylosidase (BXL1)</i>
At3g52790	4,2	<i>Peptidoglycan-binding, LysM domain-containing protein</i>
At1g23870	6,0	<i>Trehalose-phosphatase/synthase 9 (TPS9)</i>
At2g18700	4,8	<i>Trehalose-phosphatase/synthase 11 (TPS11)</i>
At5g65690	4,2	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK2)</i>
At1g66870	7,7	<i>Glycosyl hydrolase family protein 17</i>
At5g20250	4,2	<i>Glycosyl hydrolase family protein 36 (DIN10)</i>
Citocromos P450		
At2g42850	5,5	<i>Cytochrome P450 family protein (CYP718)</i>
At5g25120	4,3	<i>Cytochrome P450 family protein (CYP71B11)</i>
At4g36380	4,7	<i>Cytochrome P450 (CYP90C1/ROT3)</i>
Transferasas		
At1g16880	4,4	<i>Uridyltransferase-related protein</i>
At5g39080	4,3	<i>Transferase family protein</i>
At3g50280	4,3	<i>Transferase family protein</i>
At3g21260	4,1	<i>Glycolipid transfer protein 3 (GLTP3)</i>
At1g34520	4,1	<i>Long-chain-alcohol O-fatty-acyltransferase family protein</i>
Familia de las terpeno sintasas/ciclasas		
At3g29410	8,9	<i>Terpene synthase/cyclase family protein</i>
At5g48110	4,3	<i>Terpene synthase/cyclase family protein</i>
Biosíntesis de esteroides		
At5g24155	4,0	<i>Squalene monooxygenase</i>
Metabolismo de lípidos		
At2g03980	4,0	<i>GDSL-motif lipase family protein</i>
Metabolismo de aminoácidos		
At5g18170	6,6	<i>Glutamate dehydrogenase 1 (GDH1)</i>
Biosíntesis de triterpenoides		
At3g45130	4,7	<i>Lanosterol synthase 1 (LAS1)</i>
Otros		
At1g21400	4,7	<i>2-oxoisovalerate dehydrogenase</i>
At2g29310	4,4	<i>Tropinone reductase</i>
At2g38240	5,1	<i>Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein</i>
At1g18020	4,9	<i>12-oxophytodienoate reductase</i>
DEFENSA ANTIOXIDANTE		
At5g61440	4,7	<i>Atypical cys his rich thioredoxin 5 (ACHT5)</i>
At5g06690	4,7	<i>WCRKC thioredoxin 1 (WCRKC1)</i>

At1g08570	4,1	<i>Thioredoxin family protein</i>
REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN		
At5g44260	6,8	<i>Zinc finger (CCCH-type) family protein</i>
At2g25900	4,8	<i>Zinc finger (CCCH-type) family protein</i>
At2g18300	5,1	<i>Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein</i>
At1g26945	5,0	<i>Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein</i>
At4g01460	4,6	<i>Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein</i>
At2g43010	4,2	<i>Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4)</i>
At5g37260	4,6	<i>MYB family transcription factor Circadian 1 (CIR1)</i>
At2g03470	4,4	<i>MYB family transcription factor</i>
At1g26580	4,2	<i>MYB family transcription factor</i>
At3g25790	4,1	<i>MYB family transcription factor</i>
At5g49450	4,4	<i>Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 1 (BZIP1)</i>
At5g28770	4,4	<i>Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 63 (BZIP63)</i>
At5g63160	5,6	<i>BTB and TAZ domain protein 1 (BT1)</i>
At3g48360	6,4	<i>BTB and TAZ domain protein 2 (BT2)</i>
At4g37610	4,4	<i>BTB and TAZ domain protein 5 (BT5)</i>
PROTEIN QUINASAS		
At4g38470	5,5	<i>Protein kinase (cytosolic)</i>
At2g15080	6,5	<i>Receptor like protein 19 (RLP19)</i>
At2g25090	4,7	<i>Sucrose non fermenting-related protein kinase (SnRK3.18)/ CBL-interacting protein kinase 16 (CIPK16)</i>
At2g23030	4,3	<i>Sucrose non fermenting-related protein kinase (SnRK2.9)</i>
CRECIMIENTO Y TRÁFICO INTRA E INTERCELULAR		
At1g70210	4,2	<i>Cyclin delta-1 (CYCD1)</i>
At1g52240	7,3	<i>Phytochrome interacting RopGEF 1 (PIRF1)/Rho guanyl-nucleotide exchange factor 11 (ROPGEF11)</i>
At1g70690	5,3	<i>Plasmodesmata-located protein 5 (PDLP5)</i>
DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS		
At1g80440	6,0	<i>Kelch repeat-containing F-box family protein</i>
At1g23390	5,3	<i>Kelch repeat-containing F-box family protein</i>
At3g59940	4,5	<i>Kelch repeat-containing F-box family protein</i>
At5g22920	5,7	<i>Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein</i>
At1g02610	4,2	<i>Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein</i>
At1g80920	4,3	<i>Plastid HSP40 /DnaJ (J8)</i>
HORMONAS		
At1g56220	4,8	<i>Dormancy-associated and auxin repressed family protein</i>
At1g28330	4,7	<i>Dormancy-associated and auxin repressed family protein (DRM1)</i>
At2g33830	4,1	<i>Dormancy-associated and auxin repressed family protein</i>
At1g74670	4,1	<i>Gibberellin-responsive protein</i>
OTRAS		
At2g26695	4,6	<i>Zinc finger (Ran-binding) family protein</i>
At5g48490	4,9	<i>Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)</i>
At2g14080	4,2	<i>Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)</i>

At4g24800	4,2	<i>MA3 domain-containing protein</i>
At2g40900	4,9	<i>Nodulin MtN21 family protein</i>
FUNCIÓN DESCONOCIDA		
At4g29905	4,93	
At4g36850	4,2	
At2g20670	5,8	
At2g14560	5,7	
At2g04790	6,3	
At5g02090	6,2	
At5g59080	6,2	
At1g77145	4,6	
At2g42870	4,6	
At1g27990	4,6	
At3g26510	4,6	
At2g40000	4,4	
At2g22790	4,4	
At3g15630	4,4	
At2g38820	4,3	
At3g50640	4,3	
At2g20515	4,2	
At1g75190	4,2	
At5g60680	4,2	
At2g37750	4,2	
At4g21920	4,1	
At1g18010	4,1	
At5g49525	4,0	
At5g51390	4,0	
At1g18010	4,0	
At5g57780	4,0	
At4g29285	12,1	
At3g49790	10,7	
At5g56550	7,7	
At5g52900	7,3	
At5g22545	4,87	
At1g53890	4,86	
At4g16000	4,81	
At5g57785	4,80	
At5g21940	4,79	
At2g15890	4,77	
At5g35480	4,9	
At5g02020	4,9	
At1g53890	5,3	
At1g53890	5,6	
At3g15450	4,5	

Anejo VII: Experimentos de NASCarray empleados en los diagramas de Venn.

Número referencia*	Tratamiento	Duración tratamiento	Tejido y estado desarrollo	Control
146	Calor (38°C)	1h; 3h	Raíz y parte aérea Plantas de 16 días	NASCarray 137
175	Ácido indolacético (IAA), 1 µM	1h; 3h	Plántulas de 7 días	Infección con solución MgCl ₂
168	<i>Pseudomonas syringae</i>	4 h	Hojas Plantas 4 semanas	NASCarray 137
139	Estrés osmótico (300mM manitol)	1h; 3h	Raíz y parte aérea Plantas de 16 días	NASCarray 137
143	Estrés oxidativo (metil viologen), 10 µM	1h; 3h	Raíz y parte aérea Plantas de 16 días	NASCarray 137
470	Bajo pH externo (pH=4,5 con HCl)	1h, 8h	Raíz Antes de salida escapo	pH=6

*<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>