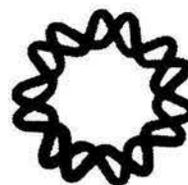


2005

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL
INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ *AtNHX5* EN
ENDOMEMBRANAS DE *Arabidopsis thaliana*

TESIS PRESENTADA POR:
BIOL. ANA RUTH PASTOR FLORES

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BRONWYN BARKLA COADY

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2005

PASTOR FLORES, ANA RUTH

m346550



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	6
1.1 Salinidad en los suelos.....	6
1.2 Tolerancia a la salinidad.....	6
1.3 Efectos de la salinidad.....	7
1.4 Estrés iónico y osmótico provocado por la salinidad.....	7
2. Transporte de Na⁺ en las plantas	8
2.1 Transporte de Na ⁺ en el xilema.....	8
2.1.1 Regulación del transporte de Na ⁺ hacia la parte aérea.....	9
2.2 Transporte de Na ⁺ en el floema.....	9
2.3 Exclusión de Na ⁺ hacia tejidos particulares.....	10
2.3.1 Raíz.....	10
2.3.2 Hojas.....	10
3. Mecanismos involucrados en el transporte de Na⁺ a nivel celular	11
3.1 Transporte intracelular de Na ⁺	11
3.2 Proteínas involucradas en la toma de Na ⁺	11
3.2.1 Canales catiónicos no selectivos (NSCC).....	11
3.2.2 Transportador tipo HKT.....	12
3.2.3 Transportadores tipo LCT1.....	13
3.3 Ajustes osmóticos intracelulares.....	13
3.3.1 Síntesis de osmoprotectores.....	13
3.3.2 Compartimentación intracelular.....	14
3.4 Proteínas Intercambiadoras Na ⁺ /H ⁺	14
3.4.1 Estructura y mecanismo de acción.....	15
3.4.2 Localización de los intercambiadores Na ⁺ /H ⁺	16
3.4.3 Inducción de la actividad intercambiadora Na ⁺ /H ⁺ por NaCl caracterizada en membrana plasmática y tonoplasto.....	16
4. Identificación de los genes involucrados en la actividad intercambiadora Na⁺/H⁺	18
4.1 NHX1.....	18
4.2 SOS1 o AtNHX7.....	20
4.3 Familia de Intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ : AtNHX en <i>A. thaliana</i>	21
4.4 Localización de los intercambiadores Na ⁺ /H ⁺	22
4.4.1 Localización de los intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ a nivel de transcrito en diferentes tejidos celulares.....	23
4.4.2 Localización de los intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ a nivel celular.....	23
5. Antecedentes: Intercambiador AtNHX5	24
5.1 Actividad y localización de AtNHX5.....	24
5.2 Antecedentes de AtNHX5.....	24
6. Justificación	26
7. Objetivos	26
8. Materiales y Métodos	27
9. Resultados	37
10. Discusión	68
11. Conclusiones	77
12. Perspectivas	78
13. Bibliografía	79
Apéndices	84

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1.1	Ruta de entrada de Na ⁺	8
3.2.1	Representación esquemática de los transportadores de membrana plasmática y tonoplasto.	12
4.3.1	Relaciones filogenéticas entre los distintos miembros de la familia AtNHX de <i>A. thaliana</i>	22
5.2.1	Rutas de señalización bajo estrés hiperosmótico y iónico	25
9.1	Análisis de PCR de DNA genómico de las líneas transgénicas AtNHX5::GFP1, AtNHX5::GFP2 y AtNHX5::GFP3	38
9.2	Expresión de AtNHX5::GFP1 y colocalización con marcadores proteicos de las distintas endomembranas de <i>A. thaliana</i>	42
9.2.1	Expresión de AtNHX5::GFP2 y colocalización con marcadores proteicos de las distintas endomembranas de <i>A. thaliana</i>	43
9.2.1.1	Expresión de AtNHX5::GFP3 y colocalización con marcadores proteicos de las distintas endomembranas de <i>A. thaliana</i>	44
9.3	Secuencia de aminoácidos de la región carboxilo de AtNHX5, AtNHX6 y AtNHX6A	45
9.3.1	Expresión de AtNHX5 en <i>A. thaliana</i> ecotipo Columbia y colocalización con marcadores proteicos de las distintas endomembranas	46
9.3.2	Inmunodetección en la línea AtNHX5::GFP3 utilizando el anticuerpo específico anti-AtNHX5	47
9.4.1	Análisis de fluorescencia de células en suspensión de la línea transgénica AtNHX5::GFP3 utilizando microscopía confocal.	49
9.4.2	Análisis de doble marcaje con microscopio confocal en cultivo de células en suspensión de la línea transgénica AtNHX5::GFP3	49
9.5.1	Actividad del transporte de H ⁺ de la V-ATPasa y el intercambio Na ⁺ /H ⁺ en vesículas aisladas de la fracción 0/12% de sacarosa	53
9.5.2	Tasa iniciales de la actividad de transporte de protones de la V-ATPasa y el intercambiador Na ⁺ /H ⁺ .	54
9.5.3	Actividad del transporte de H ⁺ de la V-ATPasa y el intercambio K ⁺ /H ⁺ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 0/12% de sacarosa.	55
9.5.4	Actividad del transporte de H ⁺ de la V-ATPasa y el intercambio Na ⁺ /H ⁺ y K ⁺ /H ⁺ en vesículas endomembranales de tejido de raíz colectadas en la interfase 0/12% de sacarosa.	56
9.5.5	Análisis cinético del intercambio catión/H ⁺ en vesículas endomembranales de la interfase 0/12% de sacarosa en la línea transgénica AtNHX5::GFP1 de tejido de hojas.	58
9.6.1	Actividad del transporte de H ⁺ de la V-ATPasa y el intercambio Na ⁺ /H ⁺ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 12/22% de sacarosa.	60
9.6.2	Tasas iniciales de la actividad de transporte de protones de la V-ATPasa en vesículas endomembranales pertenecientes a la interfase 12/22% de sacarosa aisladas de tejido de hojas y raíz (tipo silvestre).	61

9.6.3	Actividad del transporte de H ⁺ de la V-ATPasa y el intercambio Na ⁺ /H ⁺ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 12/22% de sacarosa.	62
9.6.4	Tasas iniciales de transporte de Na ⁺ dependiente de H ⁺ en vesículas pertenecientes a la fracción 12/22% de sacarosa aisladas de tejido de hojas.	63
9.6.5	Actividad del transporte de H ⁺ de la V-ATPasa y el intercambio K ⁺ /H ⁺ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 12/22% de sacarosa.	63
9.6.6	Tasas iniciales del transporte de K ⁺ dependiente de H ⁺ en vesículas pertenecientes a la fracción 12/22% de sacarosa aisladas de tejido de hoja.	64
9.7.1	Inducción de la expresión de <i>AtNHX5</i> por estrés salino (NaCl).	66
9.7.2	Inducción de la expresión de <i>AtNHX5</i> por estrés con K ⁺ .	67

ÍNDICE DE TABLAS

4.3.1	Tabla de identidad entre la secuencia de aminoácidos de los siete miembros de la familia de intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
-------	---	----

RESUMEN

La salinidad de los suelos debida a la presencia de NaCl es uno de los factores abióticos que reduce la productividad agrícola. Se sabe que el Na⁺ es un ión tóxico para la célula vegetal. A concentraciones mayores de 100 mM altera el metabolismo celular, modifica la proporción Na⁺/K⁺ e induce un estrés iónico y osmótico, disparando con ello mecanismos como la síntesis de osmolitos protectores, la compartimentación celular y la activación de proteínas intercambiadoras Na⁺/H⁺. Estas proteínas mueven iones Na⁺ utilizando como fuerza motora el gradiente electroquímico de H⁺ creado por bombas primarias: P-ATPasa, V-ATPasa y PPasa. Dependiendo de dónde se localicen estas proteínas intercambiadoras, expulsan el Na⁺ hacia el apoplasto o lo almacenan en organelos como la vacuola. En *Arabidopsis thaliana* se ha descrito una familia de 7 proteínas intercambiadoras Na⁺/H⁺. Las más estudiadas son AtNHX1 y AtNHX7 o AtSOS1 presentes en tonoplasto y membrana plasmática, respectivamente. La sobreexpresión y la localización de estas proteínas confieren a la planta tolerancia a la salinidad. Las 5 proteínas restantes se han caracterizado parcialmente. AtNHX5 responde de manera específica al estrés causado por NaCl y está presente en todos los tejidos celulares. Sin embargo, a nivel de proteína no se conoce su localización y funcionamiento. En este trabajo se planteó la caracterización de la proteína AtNHX5 determinando su localización, así como sus propiedades de transporte.

Nuestros resultados mostraron que en un gradiente de sacarosa la proteína AtNHX5, muestra dos niveles máximos de expresión, uno que colocaliza parcialmente con AtBP80 y otro que se extiende a lo largo del gradiente, se observó que la densidad de la membrana plasmática y tonoplasto se alteraron. A nivel celular observamos que AtNHX5 se encuentra en vesículas de 4 µm dispersas en el citoplasma. Con el anticuerpo específico anti-AtNHX5 se obtuvo la señal endógena de la proteína e identificamos dos bandas: una de 45 kDa y otra de 50 kDa en plantas tipo silvestre de *A. thaliana*.

La actividad intercambiadora de AtNHX5 está presente en vesículas endomembranales provenientes de hojas y no de raíz. Su actividad es de baja afinidad para Na⁺ (K_m=61.5 mM) y de mayor afinidad por K⁺ (K_m=16 mM). Su capacidad de intercambio es poco eficiente para ambos iones. A nivel de transcrito AtNHX5 responde al estrés ocasionado por NaCl y KNO₃. AtNHX5 es un intercambiador Na⁺/H⁺ y K⁺/H⁺ que responde en las primeras etapas del estrés salino; sin embargo es poco eficiente en la tolerancia de las plantas hacia la salinidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Salinidad de los suelos

La salinidad de los suelos se define como una alta acumulación de sales, como los cloruros. Esta acumulación de sales provoca una baja productividad de los suelos y hasta un 30% la producción agrícola mundial (Ward et al., 2003). La salinidad afecta el 7 % de la superficie del planeta, lo cual representa cerca de 930 millones de hectáreas (Munns, 2002; basado en Szabolcs, 1994). De las tierras cultivables, (1.5 billones de hectáreas), 5 % de ellas (77 millones de hectáreas) están afectadas por la salinidad. (Munns, 1999).

Considerando el territorio nacional es inexistente una evaluación precisa de las superficies de los suelos con problemas de salinidad, sobre todo en las áreas no agrícolas; sin embargo, puede señalarse, de manera aproximada, la existencia de 3.5 millones de hectáreas afectadas en las zonas áridas y semiáridas, 1 millón en otras zonas no agrícolas, 800 000 en las áreas costeras, 1 millón en áreas agrícolas de temporal y 500 000 en zonas agrícolas de riego, lo cual totaliza unos 6.8 millones de hectáreas de suelos afectados por sales en todo el país (Tester y Davenport, 2003). Estimaciones de la SEMARNAP (2002) reportan que la salinización afecta a 3.2% de los suelos del país.

1.2 Tolerancia a la salinidad

A nivel de la planta, los efectos causados por la salinidad, principalmente por el ión Na^+ , se ven reflejados en la tasa de acumulación y en la efectividad de la compartimentación de Na^+ dentro de los tejidos de las hojas y de las células (Munns, 2002). Estas dos características definen la tolerancia a la salinidad que pueden presentar las plantas.

Las plantas se pueden dividir en dos grupos dependiendo de su tolerancia al estrés salino. Existen plantas glicófitas que no poseen los mecanismos adaptativos que les permitan sobrevivir en suelos con concentraciones salinas mayores a 150 mM de NaCl, presentando una inhibición en el crecimiento y muerte por necrosis celular (Glenn et al., 1999). El grupo de las plantas tolerantes a la salinidad es el de las halófitas que cuentan con mecanismos que regulan la expresión de genes que les confiere la capacidad de vivir y desarrollarse óptimamente en suelos con un contenido de sales entre 200 mM y 300 mM de NaCl (Tester y Davenport, 2003).

1.3 Efectos de la salinidad

Todas las sales pueden afectar el crecimiento de las plantas debido a un desbalance iónico a nivel celular que afecta el metabolismo y la actividad enzimática (Ward et al., 2003).

A nivel celular, el Na^+ puede competir con otros iones por los sitios de unión a diferentes proteínas de transporte en la membrana plasmática de las células vegetales, provocando una deficiencia de nutrientes como el K^+ . Así, altos niveles de Na^+ , o una alta relación $\text{Na}^+:\text{K}^+$ puede interrumpir diversos procesos enzimáticos en el citoplasma afectando la síntesis de proteínas, por ejemplo. En algunos casos, los carbonatos pueden modificar el pH del suelo afectando los mecanismos de transporte en la raíz de la planta. Los efectos osmóticos del Na^+ inhiben el crecimiento de la raíz, limitando la absorción de nutrientes como el fósforo, hierro o zinc. Además, el Na^+ limita la toma de agua, ya que al aumentar los solutos en la solución del suelo, la diferencia entre los potenciales osmóticos de las células de la raíz y la solución del suelo se hace mínima, dificultando la entrada de agua hacia la planta (Tester y Davenport, 2003)

1.4 Estrés iónico y osmótico provocados por la salinidad

La salinidad es un factor ambiental que presenta dos componentes: osmótico y iónico. El estrés iónico asociado a la salinidad se refiere a las concentraciones de iones que se encuentran dentro y fuera de la célula y que la afectan directamente. Este factor está ligado a la acumulación de iones a concentraciones tóxicas, principalmente Na^+ y Cl^- , las cuales decrementan la absorción de elementos esenciales tales como el K^+ y Ca^{2+} (Lefèvre et al., 2001). La célula debe mantener una homeostasis iónica, la cual depende del flujo de iones a través de las proteínas transmembranales de membrana plasmática y tonoplasto (membrana vacuolar), principalmente.

El estrés osmótico es debido a un aumento en el potencial osmótico externo de la solución del suelo (Lefèvre et al., 2001). Esto está ligado con la dificultad que tiene la planta de absorber agua cuando se encuentra en un suelo salino, ya que no hay suficiente agua disponible para que sea aprovechada por la planta. El efecto más importante del déficit hídrico es la disminución del crecimiento, debido a que hay una pérdida en la turgencia de la célula y con ello una disminución en la expansión celular, proceso que resulta indispensable para el crecimiento de la planta (Yokoi et al., 2002).

2. TRANSPORTE DE Na⁺ EN LAS PLANTAS

Dentro de la planta debe existir un control en el transporte del Na⁺ a diferentes niveles: en la entrada y en el movimiento de Na⁺ hacia la parte aérea y en el interior de la célula para evitar los efectos citotóxicos (Tester y Davenport, 2003).

2.1 Transporte de Na⁺ en el xilema

El xilema constituye un sistema transportador de agua con movimiento en una sola dirección y la descarga de solutos hacia él debe ser un punto de control para mantener bajas las concentraciones de Na⁺ en la parte aérea (Blumwald, 2000). El control de la toma de Na⁺ involucra diversos mecanismos tales como: 1) la regulación de la liberación de Na⁺ en la parte aérea, proceso que comprende varios pasos: entrada inicial en las células de la epidermis y células corticales de la raíz, el balance entre influjo y eflujo en la raíz, la descarga en el xilema, recuperación de fluidos del xilema antes de que lleguen a la parte aérea. 2) Recirculación de la parte aérea hacia el floema. 3) Almacenamiento en zonas particulares de la parte aérea. 4) Secreción en la superficie de la hoja y 5) Control de la transpiración (Tester y Davenport., 2003). En la figura 2.1.1 se ilustra la ruta de entrada y salida de Na⁺ en el sistema vascular de la planta.



Figura 2.1.1 Ruta de entrada de Na⁺. El Na⁺ entra en las células de la raíz por vía simplástica atravesando membrana plasmática y dirigiéndose hacia xilema para ser transportado hacia la parte aérea donde puede ser almacenado en la vacuola de células de mesófilo. El Na⁺ puede redirigirse hacia células de raíz

mediante el flujo en floema, lo que permite su posible salida hacia la solución del suelo.

2.1.1 Regulación del transporte de Na^+ hacia la parte aérea

La entrada de Na^+ hacia la parte aérea puede llevarse a cabo vía simplástica o apoplástica. El movimiento de iones por vía simplástica comienza cuando los solutos son tomados selectivamente por las células del parénquima esponjoso en la hoja y pueden acumularse en la vacuola de dichas células o en la vacuola de células del mesófilo adyacentes al tejido vascular. La transferencia de solutos a partir de estos tipos celulares puede dirigirse hacia el xilema. El movimiento de solutos vía simplasto requiere proteínas que transloquen al ión dentro de la célula (Karley et al., 2000). Es posible que la vía simplástica sea la ruta principal por la cual se está moviendo Na^+ intracelularmente y cuyo destino final sea la solución presente en el xilema.

Debido a que la membrana plasmática resulta impermeable para ciertos solutos existe una ruta alternativa, la vía apoplástica. Las concentraciones de cationes en el apoplasto de las células de mesófilo se ven influenciadas principalmente, por el flujo que procede de la raíz, el importe existente en xilema, el exporte en floema y la toma dentro del simplasto (Mühling and Läuchli, 2002), lo cual determina el movimiento y el aporte neto de solutos o cationes que hay por parte de la vía apoplástica. El flujo de transpiración existente en la parte aérea también afecta el movimiento apoplástico, ya que la pérdida de agua aumenta las concentraciones de solutos en la parte aérea requiriendo un mayor aporte de solución desde la raíz hacia las hojas (Karley et al., 2000). El Na^+ junto con otros iones tales como K^+ , Cl^- y NO_3^- pueden moverse tanto por vía simplástica como apoplástica, distribuyéndose en la epidermis y en el mesófilo (Karley et al., 2000).

2.2 Transporte de Na^+ en el floema

La estructura del floema es mucho más compleja que la del xilema. El movimiento de solutos a lo largo del floema se da a través de un mecanismo conocido como flujo en masa. El floema representa un mecanismo por el cual los niveles de Na^+ pueden ser influenciados en beneficio del metabolismo de la planta. Esto se debe principalmente, a que la recirculación por este tejido permite el secuestro de Na^+ en la parte aérea conduciéndolo hacia la raíz, disminuyendo las concentraciones de este ión en el interior de la planta e impidiendo su acumulación en la parte aérea (Russ et al., 2001).

2.3 Exclusión de Na⁺ hacia tejidos particulares

La planta para mantener los niveles no tóxicos del Na⁺ es capaz de redirigir los flujos de Na⁺ hacia tejidos particulares entre ellos: la raíz y las hojas

2.3.1 Raíz

Como se señaló anteriormente, la entrada de Na⁺ en la raíz se da de manera pasiva, movimiento favorecido por las diferencias de concentración y voltaje en las células de la epidermis de la raíz. La salida de Na⁺ de estas células debe darse de manera activa, ya que se actúa en contra de un gradiente de concentración y del potencial eléctrico. Como se describirá más adelante existen proteínas que utilizan el gradiente de pH creado por bombas ATPasas que consumen ATP como fuente energética para favorecer el movimiento activo de Na⁺ y expulsarlo al exterior de la raíz y éste parece ser el mecanismo que actúa en condiciones de salinidad.

2.3.2 Hojas

Para que una planta sea considerada como tolerante a la salinidad debe mantener tejidos jóvenes y su capacidad de seguir creciendo. El Na⁺ puede moverse a lo largo del xilema y del floema, alcanzando las hojas jóvenes o en su defecto regresar a la raíz. Sin embargo, la planta tiende a redirigir el flujo de Na⁺ hacia órganos que pueden almacenarlo o hacia partes de la planta que pueden sacrificarse, tales como hojas viejas. Esta redirección del flujo de Na⁺ puede llevarse hacia la raíz a lo largo del floema y/o moverse hacia las partes aéreas por el xilema (Tester and Davenport, 2003).

Existe controversia acerca de los patrones de acumulación o depósito de iones dentro de las hojas. Estos patrones dependen del tipo celular y de los requerimientos específicos de cada tejido, ya que se ha observado que el Na⁺ se acumula preferencialmente en células de epidermis en las hojas, debido a que son células con un mayor número de vacuolas y metabólicamente menos activas (Karley et al., 2000).

3. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL TRANSPORTE DE Na⁺

3.1 Transporte intracelular de Na⁺

Las concentraciones de Na⁺ en el interior celular no deben rebasar el valor de 100 mM, ya que a esta concentración se ha visto una inhibición del crecimiento en la mayoría de los cultivos de importancia económica, así como la disminución de la actividad enzimática en el citoplasma de las células vegetales (White, 1999; Blumwald, 2000).

La entrada de Na⁺ altera las proporciones iónicas y osmóticas en el interior celular, por ello existen mecanismos que ayudan a la planta a sobrevivir en condiciones de estrés salino. La salinidad impone dos tipos de estreses: 1) un déficit de agua resultado de una alta concentración de solutos en la solución del suelo; y 2) un estrés iónico consecuencia de la alteración de la proporción K⁺/Na⁺. La alteración de esta proporción es debida al influjo de Na⁺ a través de rutas que funcionan en la toma de K⁺ (Blumwald et al., 2000).

3.2 Proteínas involucradas en la toma de Na⁺

Algunas de las proteínas responsables de la toma de Na⁺ están presentes en membrana plasmática y tonoplasto (para su revisión, ver Barkla y Pantoja, 1996). Se han identificado canales catiónicos no selectivos (NSCC), y transportadores de alta y baja afinidad para K⁺, que pueden ser los responsables potenciales de la entrada inicial de Na⁺ en la célula (Amtmann y Sanders, 1999; Amtmann et al., 2001; Schachtman y Schroeder, 1994; Schachtman et al., 1997) (figura 3.2.1).

3.2.1 Canales catiónicos no selectivos

Los canales catiónicos no selectivos (NSCC) muestran una alta selectividad por los cationes y discriminan a los aniones, pero tienen una baja selectividad entre los cationes monovalentes bajo un rango amplio de condiciones iónicas. Tienen una permeabilidad similar entre los diferentes cationes monovalentes, muchos de los cuales son impermeables o pobremente permeables a través de los canales selectivos para K⁺ y Na⁺ (Demidchik y Tester, 2002).

Se ha propuesto que estos canales son parte de la ruta de entrada para el Na⁺ de la solución del suelo hacia la raíz, siendo parcialmente sensibles a Ca²⁺ y Mg²⁺. Sin embargo, su papel fisiológico y su mecanismo de transporte es poco conocido

(Davenport y Tester, 2000). NSCC que transportan Na^+ suelen ser insensibles al voltaje, y son regulados negativamente por Ca^{2+} , algunos parecen ser activados por glutamato estimulando con ello el influjo unidireccional de Na^+ en raíz (Demidchik y Tester, 2002).

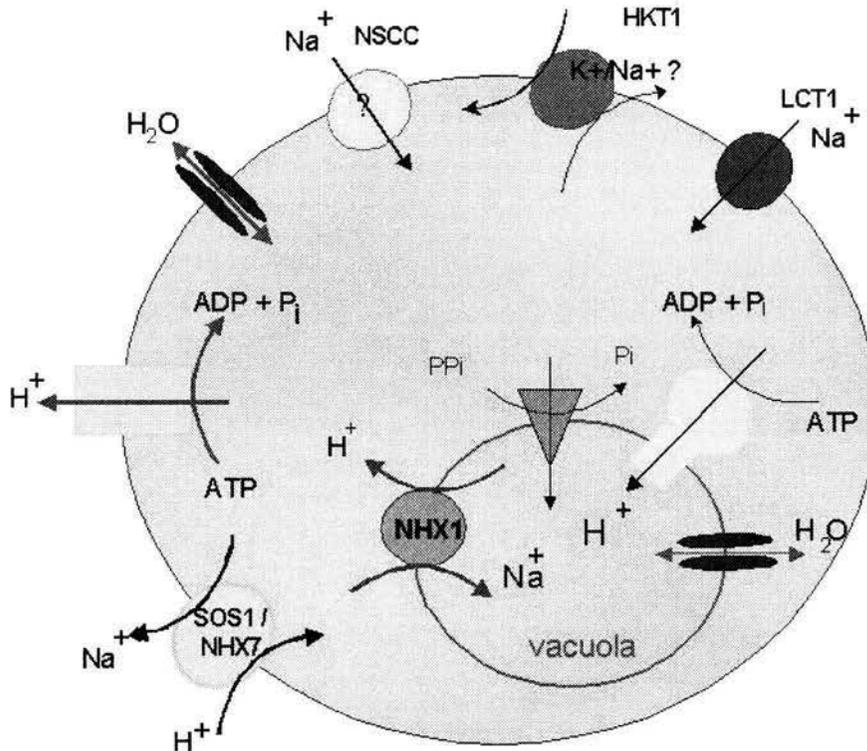


Figura 3.2.1 Representación esquemática de los transportadores existentes en membrana plasmática y tonoplasto.

3.2.2 Transportador tipo HKT

HKT1 (High affinity K^+ Transporter) fue inicialmente reportado como un transportador de K^+ de alta afinidad (Schachtman y Schoroeder, 1994). Estudios posteriores en levaduras y ovocitos de ranas caracterizaron una actividad de simportador Na^+/K^+ en HKT1 de trigo (*TaHKT1*), donde observaron que a bajas concentraciones de Na^+ (1 mM) se estimula la absorción de K^+ a través de este transportador (Rubio et al., 1995). Sin embargo, al aumentar la concentración de Na^+ a 10 mM este ión compite y ocupa el sitio de unión de K^+ en la proteína provocando que funcione como un transportador de Na^+ de baja afinidad (Rubio et al., 1995; Gassmann et al., 1996).

En *Arabidopsis thaliana* se caracterizó un gen homólogo a *TaHKT1*, *AtHKT1* descrito como un transportador selectivo a Na^+ , ya que no media el transporte de K^+ (Uozumi et al., 2000). Russ y colaboradores (2001) propusieron a *AtHKT1* como un

transportador responsable de la entrada de Na^+ en la raíz. Sin embargo, Berthomieu y colaboradores (2003) pusieron en controversia el papel de *AtHKT1*. Ellos aseguran que debido a que su expresión está restringida a las células del floema, su actividad está más relacionada con la recirculación de Na^+ desde la parte aérea hacia la raíz, protegiendo con ello los tejidos aéreos, más que estar involucrado en la entrada de Na^+ en la raíz. Este modelo en donde se resalta la importancia de la recirculación de Na^+ en el floema es apoyado por los reportes previos de Laurie et al., (2002) y Máser et al., (2002) donde la reducción de la expresión de *TaHKT1* de trigo y *AtHKT1* en *Arabidopsis* resultó en un decremento en el contenido de Na^+ en la estela de la raíz.

3.2.3 Transportadores tipo *LCT1*

LCT1 es un Transportador de Baja Afinidad para cationes (**L**ow affinity **c**ation **t**ransporter). *LCT1* participa en la toma de cationes como Rb^+ , Na^+ y K^+ (Schachtman et al., 1997). Se demostró que la actividad de *LCT1* influye en la proporción K^+/Na^+ , ya que permite el paso de Na^+ y disminuye el contenido de K^+ intracelular. Además, se observó que también es responsable de la entrada de iones como Li^+ y Cs^+ (Amtmann et al., 2001). En este mismo estudio se demostró, de manera interesante que *LCT1* tiene un dominio de unión a Ca^{2+} en el extremo carboxilo y que es el responsable de mediar la entrada de Na^+ en la célula, lo cual indica que puede responder a una ruta de señalización mediada por Ca^{2+} .

3.3 Ajustes osmóticos intracelulares

El potencial osmótico de la célula se ve afectado cuando una gran cantidad de iones comienzan a entrar hacia el citoplasma. Por ello, la célula debe mantener una homeostasis iónica y balancear el potencial osmótico junto con el de la vacuola.

3.3.1 Síntesis de osmoprotectores

Los osmoprotectores o solutos compatibles son compuestos altamente solubles sin carga neta a pH fisiológico y no son tóxicos a altas concentraciones. Estos compuestos sirven para aumentar la presión osmótica en el citoplasma y también estabilizan proteínas y membranas cuando los niveles de sales o temperatura son desfavorables. Químicamente, hay tres tipos de osmoprotectores: betaínas y compuestos relacionados, polioles y azúcares (manitol y trehalosa), y aminoácidos como prolina (McNeil et al., 1999).

Dentro de los osmoprotectores, la glicina betaína parece ser un compuesto determinante en la tolerancia al estrés. Su papel está relacionado con la estabilización de estructuras cuaternarias de enzimas y complejos proteicos, además contribuye a mantener la organización de las membranas biológicas en altas concentraciones salinas o en temperaturas extremas (Chen y Murata, 2002).

Existen muchos osmoprotectores que han sido estudiados por su posible participación en distintos estreses abióticos, como el fructano, manitol, D-ononitol, prolina, sorbitol y trehalosa. Este último es otro osmoprotector capaz de estabilizar biomoléculas bajo condiciones de estrés. La trehalosa es un disacárido no reductor de glucosa que estabiliza enzimas deshidratadas, proteínas y lípidos de membranas, además de proteger estructuras biológicas del daño por desecación (Garg et al., 2002).

3.3.2 Compartimentación intracelular

En plantas expuestas a condiciones salinas, es común observar la acumulación de Na^+ dentro de la vacuola, en donde es aislado para prevenir sus efectos tóxicos en el citoplasma y donde además funciona como un osmolito para reducir el potencial de agua de la células, creando así un gradiente que mantiene el flujo de agua hacia el interior de las células de la planta, manteniendo la homeostasis celular.

El NaCl puede ser un factor osmótico que la planta utiliza para la internalización de agua en la célula. La compartimentación de Na^+ (y Cl^-) dentro de la vacuola ayuda al mantenimiento del potencial osmótico favorable para el metabolismo celular (Blumwald et al., 2000).

3.4 Proteínas intercambiadoras Na^+/H^+

El Na^+ generalmente se encuentra en concentraciones muy elevadas en el exterior celular y tiende a entrar mediante transporte pasivo o utilizando los transportadores anteriormente descritos. Debido a que el Na^+ resulta tóxico para la célula vegetal a concentraciones mayores de 10 mM (Blumwald, 2000) es necesario mantener sus niveles por debajo de esa concentración en el interior celular. Esto se logra mediante dos posibles mecanismos, uno es moviéndolo hacia el exterior celular y otro es almacenándolo en organelos intracelulares.

La actividad intercambiadora Na^+/H^+ fue descrita por primera vez en procariontas (West y Mitchell, 1974) y ha sido caracterizada en animales, algas y levaduras (Aronson, 1985; Katz et al. 1989; Jia et al., 1992) donde se ha observado que su

actividad interviene en los procesos de regulación del pH intracelular y el volumen celular entre otras funciones (Wiebe et al., 2001; Putney et al., 2002). Tanto en mamíferos como en plantas ha sido descrita una familia de estos intercambiadores. La familia NHE presente en mamíferos incluye seis isoformas que funcionan como intercambiadores Na^+/H^+ (Putney et al. 2002), en plantas han sido encontradas al menos 18 posibles secuencias genéticas que codifican para dicha actividad, siendo descritos al menos 8 genes pertenecientes a la familia NHX, la cual será discutida posteriormente (Yokoi et al, 2002).

3.4.1 Estructura y Mecanismo de acción

Los intercambiadores Na^+/H^+ son proteínas integrales de membrana constan de 10 a 12 dominios transmembranales con los extremos carboxilo y amino expuestos hacia la región citosólica (Putney et al. 2002). En *A. thaliana*, recientemente fue reportado que la región carboxilo de *AtNHX1* se encuentra orientada hacia el lumen vacuolar (Yamaguchi et al., 2003), lo cual es poco probable debido a que esta región puede funcionar como secuencia reguladora o servir de epítipo para el reconocimiento de anticuerpos diseñados contra dicha proteína. En la secuencia de aminoácidos de estos intercambiadores se ha determinado que ciertas histidinas son candidatos ideales en percibir el pH y que las cadenas laterales de los aminoácidos polares como el aspartato participan en la actividad de transporte de los cationes (Wiebe et al., 2001). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene un modelo cristalográfico de la proteína que ayude a determinar si existen zonas de regulación o las regiones que probablemente funcionen en la unión de los iones.

Los intercambiadores Na^+/H^+ catalizan el intercambio de Na^+ por H^+ a través de las membranas de un modo electroneutro con una estequiometría de 1:1 controlando con ello el nivel de Na^+ o H^+ en el citoplasma, o en un modo electrogénico intercambiando uno o más H^+ por un Na^+ dependiendo del organismo (Fukuda et al., 1998, Weibe et al., 2001), por lo cual es posible que estas proteínas, además de participar en diversos procesos celulares intervengan en el transporte de Na^+ moviéndolo hacia el exterior celular o hacia el interior de organelos acoplado al flujo de protones (Blumwald et al., 2000; Padan et al., 2001), siendo determinantes en condiciones de estrés salino.

Estos intercambiadores son transportadores activos secundarios, ya que mueven al Na^+ en contra de su gradiente electroquímico y dependen de un gradiente

electroquímico de protones. Inicialmente debe establecerse una diferencia de pH para que ocurra el intercambio entre Na^+ y H^+ . Esto es creado por el bombeo de H^+ de diferentes bombas primarias de H^+ , tales como: la H^+ -ATPasa en la membrana plasmática, la H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa (pirofosfatasa bombeadora de H^+ ; Sze et al., 1992) presentes en tonoplasto. La diferencia creada en las concentraciones de H^+ y la diferencia de potencial eléctrico en la membrana plasmática, activa a los intercambiadores Na^+/H^+ .

3.4.2 Localización de los intercambiadores Na^+/H^+

En la levadura se ha demostrado que estos intercambiadores se localizan en compartimentos de tipo prevacuolar y en membrana vacuolar, almacenando el Na^+ y ayudan a regular el volumen celular, pH y posiblemente contribuyen al proceso de biogénesis de la vacuola (Nass y Rao, 1998; Quintero et al., 2000).

En plantas, los intercambiadores Na^+/H^+ han sido identificados en dos tipos de membranas: membrana vacuolar (tonoplasto) y membrana plasmática, cuya principal función es la de remover el Na^+ del citoplasma almacenándolo en la vacuola o llevándolo hacia fuera de la célula (Blumwald, 2000; Blumwald et al., 2000; Hasegawa et al., 2000). Con ello se cree que su presencia en dichas membranas es el mecanismo principal por el cual las plantas pueden ser tolerantes o no en condiciones de estrés salino. Otras evidencias indican la presencia de este tipo de intercambiadores Na^+/H^+ en organelos como el Aparato de Golgi; sin embargo, funcionalmente no se han caracterizado (Venema et al., 2003).

3.4.3 Inducción de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ por NaCl caracterizada en membrana plasmática y tonoplasto.

La actividad intercambiadora Na^+/H^+ ha sido identificada en una amplia variedad de especies incluyendo plantas glicófitas y halófitas (Barkla y Pantoja, 1996). En *Beta vulgaris* esta actividad fue medida directamente en vesículas aisladas de tonoplasto (Blumwald y Poole, 1985). En *Arabidopsis* ha sido caracterizada tanto en tonoplasto como en membrana plasmática (Apse et al., 1999 y Qiu et al., 2003). Por otro lado, en la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* la actividad se ha detectado en tonoplasto (Barkla et al., 1995).

Se ha reportado que existe una inducción específica de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ mediada por NaCl. En cultivos de células en suspensión y

plantas completas de betabel (*Beta vulgaris*) se demostró su tolerancia a la salinidad un hasta 200 mM NaCl y un incremento en la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en respuesta al aumento de la concentración salina externa (Blumwald y Poole, 1987; Xia et al., 2002).

En plantas halófitas como *Salicornia bigelovii* se ha demostrado que la actividad intercambiadora Na^+/H^+ en tonoplasto es dependiente de la concentración de Na^+ , sugiriendo que este es el mecanismo principal que le permite a la planta secuestrar Na^+ en la vacuola y eventualmente su adaptación en ambientes salinos (Parks et al., 2002). En *Mesembryanthemum crystallinum*, el incremento de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ es estimulada por tratamientos salinos que además está asociada con el tipo celular, ya que se encontró una alta acumulación de Na^+ en células epidérmicas (Barkla et al., 1995; Barkla et al., 2002).

El almacenamiento de Na^+ en la vacuola y su salida a través de la membrana plasmática son mecanismos que generan tolerancia al estrés salino en algunas especies. Se piensa que la localización de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ es determinante en condiciones de estrés salino. La inducción específica de esta actividad en respuesta a NaCl es, en parte, una herramienta que nos permite analizar los posibles mecanismos que las plantas poseen para sobrevivir en un ambiente salino.

4. IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA Na^+/H^+ .

Debido a que la actividad intercambiadora Na^+/H^+ es un mecanismo que evita los efectos deletéreos del Na^+ dentro de la célula, estudios recientes se han enfocado en la caracterización a nivel molecular del gen o los genes que codifican para dicha actividad, así como en los sistemas de regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional que ayudan a la planta a sobrevivir en un ambiente altamente salino.

El modelo empleado para la caracterización e identificación de los diferentes transportadores de plantas ha sido la levadura, gracias a la homología que se conserva entre diferentes genes de plantas y levaduras, así como por los detalles genéticos que se conocen de dicho organismo (Blumwald et al., 2000).

4.1 NHX1

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha identificado un antiportador Na^+/H^+ denominado *ScNHX1* homólogo a la familia NHE de mamíferos. Este antiportador media la tolerancia a la salinidad a través del secuestro de los iones Na^+ dentro de compartimentos prevacuolares presentes en la levadura (Nass et al., 1997). *NHX1* es un miembro de un grupo de intercambiadores homólogos entre distintos grupos: levaduras, plantas y humanos, en donde podrían compartir una localización intracelular en común (Nass y Rao, 1998). *NHX1* en levaduras parece estar involucrado en la biogénesis de la vacuola debido a que se ha encontrado en compartimentos endosomales tardíos y compartimentos prevacuolares (Nass y Rao, 1998).

En años recientes, gracias al proyecto de secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*, se identificó un gen homólogo a *ScNHX1*: *AtNHX1* (Gaxiola et al., 1999; Apse et al., 1999). Se determinó que *AtNHX1* suprime el fenotipo sensible a salinidad, comprobando su capacidad de mover Na^+ hacia compartimentos intracelulares, en este caso la vacuola. *AtNHX1*, además responde a diferentes concentraciones salinas, ya que aumenta su expresión a nivel de transcrito (Gaxiola et al., 1999). Ambos genes se localizan en membranas de tipo vacuolar y son intercambiadores electroneutros Na^+/H^+ energéticamente dependientes del gradiente de pH. La principal diferencia entre los dos genes se encuentra en el extremo amino terminal, en donde se identificó un péptido señal (SP) involucrado en la regulación del intercambio y que sólo se encuentra en *ScNHX1*. *AtNHX1* es completamente inhibido

por el compuesto diurético amilorida a una concentración de 120 μM , mientras que *ScNHX1* sólo reduce su actividad en un 20 % (Darley et al., 2000; Quintero et al., 2000).

Se demostró que *AtNHX1* tiene una fuerte expresión en los tejidos vasculares de la raíz y en los pelos radiculares, exceptuando la punta sugiriendo su participación en el almacenamiento de Na^+ en las vacuolas de estas células. Además, se observó una alta expresión en las células guarda, donde podría participar en la regulación del pH y/o la homeostasis del K^+ (Shi y Zhu, 2002). La presencia del transcrito de *AtNHX1* es sustancialmente regulada por NaCl, KCl o por Ácido abscísico (ABA). Sin embargo, parece existir una ruta adicional de señalización que regula la presencia de *AtNHX1*, ya que el análisis de dobles mutantes en la vía de síntesis de ABA sólo reduce parcialmente la expresión de *AtNHX1* (Shi y Zhu, 2002).

La sobreexpresión de *AtNHX1* ha generado plantas tolerantes a la salinidad en *A. thaliana* (Apse et al., 1999), *Brassica* (Zhang et al., 2001), tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Zhang y Blumwald, 2001). Sin embargo, el relativo incremento en la abundancia de la proteína es menor al incremento de la actividad del transportador sobreexpresado. Esto puede indicar que la actividad medida puede estar dada por más de un intercambiador presente en vacuola. Además, el contenido de Na^+ en las plantas control y las sobreexpresoras es relativamente menor sugiriendo que el secuestro de los iones en la vacuola no es tan eficiente o que posiblemente se estén activando proteínas en la membrana plasmática que aumenten la salida de Na^+ durante el estrés salino.

Apse y colaboradores (2003) describieron el papel de *AtNHX1* en el desarrollo de la planta y en la homeostasis de Na^+ y K^+ en la célula vegetal, demostraron que *AtNHX1* participa en el desarrollo de la hoja, ya que sus mutantes muestran un patrón alterado de desarrollo sobretodo en las células epidérmicas, debido a que no hay una acumulación adecuada de Na^+ en la vacuola perdiéndose la proporción K^+/Na^+ en el interior celular.

En arroz (*Oryza sativa*), se aisló un gen homólogo a *AtNHX1*, *OsNHX1*, que posee 12 dominios transmembranales con un 73 % de similitud con *AtNHX1*. La expresión de *OsNHX1* es detectada diferencialmente en raíces y en la parte aérea y es estimulada por el estrés salino en ambos tejidos, sugiriendo su posible papel en la compartimentación de Na^+ en la vacuola de ambos tejidos. Su actividad intercambiadora es muy baja; sin embargo, es regulada por los niveles de Na^+ , indicando un importante papel en la tolerancia de la planta a la salinidad (Fukuda et al., 1999).

En la planta halófito, *Atriplex gmelini*, se identificó un antiportador Na^+/H^+ , *AgNHX1*, 75 % idéntico a los genes *AtNHX1* y *OsNHX1*, se localiza en tonoplasto y su expresión es inducida por estrés salino (Hamada et al., 2001). Con este gen se transformaron plantas de una variedad de arroz sensible a salinidad (*Oryza sativa* cv. *Kinuhikari*), observándose que hubo un aumento hasta de ocho veces en la actividad intercambiadora Na^+/H^+ pudiendo sobrevivir hasta en 300 mM de NaCl durante 3 días (Ohta et al., 2002).

4.2 SOS1 o *AtNHX7*

AtNHX1 funciona principalmente en la compartimentación de Na^+ en la vacuola y no se había descrito un gen que participara en su salida de la célula vegetal. En 1996 se describieron cierto tipo de mutantes en *A. thaliana* denominadas *sos* (siglas en inglés **s**alt **o**verly **s**ensitive; Wu et al., 1996). Estas plantas son mutantes recesivos con un fenotipo hipersensible a altas concentraciones de sales de Na^+ o Li^+ , incapaces de crecer a bajas concentraciones de K^+ y no mantienen el crecimiento de la raíz en concentraciones elevadas de NaCl y LiCl (Zhu et al., 1998). Estas mutantes fueron definidas como tres loci distintos *SOS*: *SOS1*, *SOS2* y *SOS3* (Zhu et al., 1998). El locus *SOS1* codifica para una proteína transmembranal con similitud a los intercambiadores Na^+/H^+ de bacteria y hongo presente en membrana plasmática (Shi et al., 2000). Posee un dominio citosólico el cual se sugiere que sirve como sensor de Na^+ (Zhu, 2002). El gen *SOS3* codifica para una proteína miristoilada que une Ca^{2+} similar a los sensores neuronales en animales y a la subunidad B de la calcineurina de levadura que responde a las elevaciones de Ca^{2+} citosólico (Liu y Zhu, 1998). El gen *SOS2* fue clonado y caracterizado como una proteína cinasa tipo serina/treonina (Liu et al., 2000). *SOS2* físicamente interactúa y es activada por *SOS3* y juntas forman parte de una ruta de señalización denominada ruta *SOS* que participa en el mantenimiento de la homeostasis iónica celular en respuesta al estrés salino (Halfter et al., 2000). El análisis de distintas mutantes ha permitido establecer que la ruta *SOS3/SOS2* controla la expresión de *SOS1* en condiciones de estrés salino. (Zhu et al., 1998; Shi et al., 2000). *SOS1* funciona en la salida de Na^+ desde el citosol hacia el espacio extracelular previniendo la rápida acumulación de Na^+ en el citoplasma (Shi et al., 2000).

Estudios más recientes indican que *AtSOS1* controla el movimiento de Na^+ a larga distancia al ser expresado en las células que rodean el xilema, participa en la recuperación de Na^+ presente en la savia del xilema (Shi et al., 2002). Se ha

demostrado que *AtSOS1* contribuye notablemente a bajar los niveles de Na^+ en el citoplasma (Qiu et al., 2002), debido a que la sobreexpresión *AtSOS1* genera plantas que acumulan menos Na^+ en el xilema y, además los niveles de transcrito son regulados e inducidos por la concentración de NaCl , sugiriendo un posible control post-transcripcional (Shi et al., 2003; Qiu et al., 2003). Es posible que exista una regulación entre los intercambiadores Na^+/H^+ de membrana plasmática y tonoplasto y que ambos funcionen alternativamente o en conjunto para disminuir las concentraciones de Na^+ en el citosol de la célula vegetal y que esto determine la tolerancia a la salinidad (Qiu et al., 2004). La nomenclatura actual ha nombrado a *AtSOS1* como *AtNHX7* por su actividad intercambiadora Na^+/H^+ y la homología existente entre los miembros de la familia de intercambiadores NHX de *A. thaliana*.

4.3 Familia de Intercambiadores Na^+/H^+ : *AtNHX* en *Arabidopsis thaliana*

La reciente secuenciación del genoma de *A. thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) ha permitido la identificación de al menos 18 genes que codifican para intercambiadores Na^+/H^+ . El análisis de la base de datos del genoma de *A. thaliana* y la predicción de la secuencia de aminoácidos indican la existencia de 12 dominios transmembranales y un dominio de unión para amilorida, los cuales han permitido la categorización de seis loci como miembros de la familia de genes *AtNHX* (Yokoi et al., 2002).

El cladograma de los intercambiadores Na^+/H^+ indica la relación filogenética entre ellos y su porcentaje de identidad (Tabla 4.3.1 y figura 4.3.1). Comparando dichos porcentajes se puede observar la homología entre *AtNHX1* y *AtNHX2-6* en contraste con *AtNHX7* donde el porcentaje de homología es muy bajo.

Los intercambiadores Na^+/H^+ de acuerdo con su filogenia, decremantan en su cercanía con *AtNHX1* y son categorizados en subgrupos: *AtNHX1-4* con un porcentaje de identidad del 88% y 56%, mientras que el subgrupo *AtNHX5-6* comparten sólo el 18%-20% con el subgrupo *AtNHX1-4* y entre ellos son 55% idénticos (Yokoi et al., 2002).

Tabla 4.3.1. Tabla de identidad entre la secuencia de aminoácidos de los siete miembros de la familia de intercambiadores Na^+/H^+ de *Arabidopsis thaliana* AtNHX1 (Yokoi et al., 2002).

	AtNHX1	AtNHX2	AtNHX3	AtNHX4	AtNHX5	AtNHX6	AtNHX7/ SOS1
AtNHX1	-	88%	69%	56%	20%	16%	14%
AtNHX2		-	69%	57%	19%	18%	14%
AtNHX3			-	56%	19%	16%	15%
AtNHX4				-	19%	18%	16%
AtNHX5					-	55%	13%
AtNHX6						-	16%
AtNHX7							-

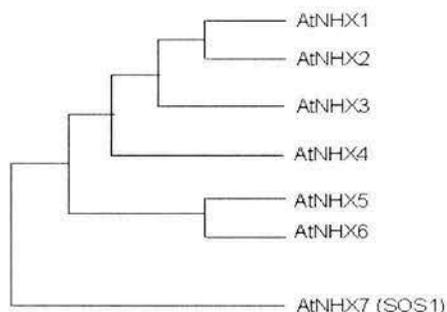


Figura 4.3.1. Relaciones filogenéticas entre los distintos miembros de la familia AtNHX de *Arabidopsis thaliana*. Estas proteínas pueden ser agrupadas en 4 subfamilias: AtNHX1 y AtNHX2; AtNHX3, y AtNHX4; AtNHX5 y AtNHX6 y AtNHX7 o SOS1

4.4 Localización de los Intercambiadores Na^+/H^+

Las distintas isoformas de *AtNHX* se aislaron y caracterizaron mediante la complementación en levadura utilizando una cepa mutante *nhx1* sensible a cationes. AtNHX1, AtNHX2 y AtNHX5 exitosamente complementaron a la mutante *nhx1*, suprimiendo su sensibilidad, indicando que son genes ortólogos al gen de levadura *ScNHX1* y a *AtNHX1* (Yokoi et al., 2002). *AtNHX3* y *AtNHX4* se caracterizaron de la misma manera, comprobándose su función como intercambiadores Na^+/H^+ al complementar a levaduras mutantes *nhx1* (Aharon et al., 2003). En cuanto a la localización de los intercambiadores *AtNHX* de *Arabidopsis*, se ha sugerido que *AtNHX2* y *AtNHX5*, pueden funcionar en compartimentos endosomales por su efecto de suprimir la sensibilidad a higromicina en las células *nhx1* de levadura, como en el caso de *ScNHX1* y *AtNHX1* (Yokoi et al., 2002).

4.4.1 Localización de los intercambiadores Na^+/H^+ a nivel de transcrito en diferentes tejidos celulares.

Mediante el análisis de Northern blot y RT-PCR se ha determinado la localización de cada uno de los miembros de la familia *AtNHX* a nivel de transcrito, observándose que *AtNHX1* y *2* son más abundantes en la raíz y en la parte aérea, mientras que *AtNHX3* aparece sólo en raíz; *AtNHX4* está expresado tanto en raíz como en la parte aérea; *AtNHX5* se encuentra en ambas partes de la planta, pero su abundancia fue baja en comparación con los otros miembros y *AtNHX6* también estuvo presente en ambas partes de la planta (Yokoi et al., 2002). Recientemente se realizó el análisis de los transcritos de estos genes en tejidos como flores, hojas, raíz y los tejidos vasculares del tallo. *AtNHX1* está presente en todos los tejidos y es el más abundante. *AtNHX2* es abundante en flores y raíz y menos abundante en hojas. *AtNHX3* y *AtNHX4* son detectados casi exclusivamente en flores y tejidos de la raíz, respectivamente. Por lo que respecta a *AtNHX5* los niveles de expresión son bajos en todos los tejidos, (Aharon et al., 2003), lo cual concuerda con lo observado por Yokoi et al. (2002).

4.4.2 Localización de los Intercambiadores Na^+/H^+ a nivel celular.

Otra forma de localizar a los diferentes miembros de la familia NHX es mediante fusiones con la proteína GFP (Green protein fluorescent). Con esta estrategia experimental fue posible determinar la presencia de *NHX1* y *NHX2* en células de cebolla. *AtNHX2* fue localizado en la vacuola, lo que indica su posible participación en el secuestro de iones y en el ajuste osmótico del citoplasma (Yokoi et al., 2002). Tanto *AtNHX1* (Apse et al., 1999), como *AtNHX2* son intercambiadores de tonoplasto y su papel puede estar involucrado en la regulación del volumen celular y la detoxificación de Na^+ en el citosol mediante el secuestro de iones Na^+ (Yokoi et al., 2002).

Debido a que los transcritos de *AtNHX1* y *AtNHX2* son abundantes en la parte aérea y en la raíz es posible que tengan una función importante durante la respuesta de la planta al estrés salino y su regulación coordinada puede ser esencial para que una planta sea tolerante a la salinidad (Yokoi et al., 2002).

5. ANTECEDENTES: INTERCAMBIADOR *AtNHX5*

El intercambiador *AtNHX5* pertenece a una subfamilia de los intercambiadores Na^+/H^+ de *Arabidopsis thaliana* donde comparte mayor identidad con *AtNHX6* (55%) en la secuencia de aminoácidos (Yokoi et al., 2002).

5.1 Actividad y Localización de *AtNHX5*

Los estudios realizados en *AtNHX5* han sido a nivel de transcrito y de actividad. Al analizar su transcrito se observó que es abundante en semillas y es inducido por NaCl (Yokoi et al., 2002) y como se mencionó su presencia es detectada a bajos niveles en todos los tejidos de la planta (Aharon et al., 2003). A diferencia del resto de la familia de intercambiadores Na^+/H^+ , *AtNHX5* responde únicamente al estímulo inducido por NaCl y no por agentes que provocan un estrés osmótico como sorbitol o ABA, sugiriendo que este gen responde más directamente al estrés iónico que los otros miembros de la familia *AtNHX*. Además se observó que *AtNHX5* es independiente de la ruta de señalización *SOS*, ya que su expresión se mantuvo aún cuando se analizaron diferentes mutantes tipo *sos*, y que posiblemente responda a un proceso fisiológico distinto o que depende del tipo celular en el cual se está expresando (Yokoi et al., 2002).

5.2 Antecedentes de *AtNHX5*

La respuesta al estrés osmótico y/o iónico, obtenida para *AtNHX1*, *AtNHX2* y *AtNHX5* indica que la regulación transcripcional de estos genes es un componente de la respuesta de la planta hacia el estrés. Por otro lado, la cercanía filogenética de *AtNHX5* y *AtNHX6* dentro del mismo subgrupo y de grupos divergentes de *AtNHX1*, que también suprimen la sensibilidad a NaCl de la mutante de levadura *nhx1* (Yokoi et al., 2002), indica que los distintos miembros de la familia *NHX* pueden tener una participación compartida en la respuesta al estrés, principalmente, salino. Además, pudiera ser que dentro de la familia *AtNHX* algunos de los miembros tengan una participación más directa en la respuesta al estrés salino en comparación a lo que se ha reportado para *AtNHX1*. Sin embargo, debido a que difieren en la localización y en el tipo de respuesta que presentan durante un determinado estrés, es posible que tengan diferentes papeles y/o grado de participación dentro del metabolismo de la planta, dependiendo del tipo

celular y/o tejido en donde se expresen de manera abundante y que el grado de regulación sea un factor característico para que una planta sea tolerante a la salinidad.

Debido a que la regulación de la respuesta genética en las plantas bajo condiciones de salinidad difiere, se han sugerido al menos tres diferentes rutas de señalización que podrían ser responsables de la tolerancia a la salinidad en las plantas (figura 5.2).

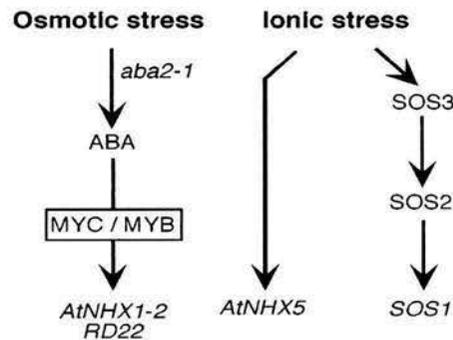


Figura 5.2.1 Rutas de señalización bajo estrés hiperosmótico e iónico que regulan la expresión de *AtNHX1*, *AtNHX2* y *AtNHX5* (Yokoi et al., 2002)

Analizando estas posibles rutas, se puede asegurar que la función de los distintos intercambiadores es diferente para los distintos procesos fisiológicos o los distintos tipos celulares (Yokoi et al., 2002).

Un estudio muy interesante fue el realizado por Venema y colaboradores (2003). En este reporte se caracteriza la actividad y localización de dos proteínas en tomate con un alto grado de similitud con los intercambiadores *AtNHX*: *LeNHX1* y *LeNHX2*. Al analizar las secuencias de aminoácidos se observó una identidad del 50.2% entre *LeNHX2* y *AtNHX5*, es posible que ambos intercambiadores compartan ciertas características. *LeNHX2* es un intercambiador K^+/H^+ que colocaliza con marcadores proteicos para el Aparato de Golgi. A diferencia de *AtNHX5*, *LeNHX2* responde al estrés osmótico y a ABA, lo cual indica que pueden ser diferentes isoformas con funciones y características distintas. Es importante resaltar que *AtNHX5*, por su especificidad para responder al estrés salino a diferencia de *LeNHX2*, resulta un intercambiador interesante para su estudio, debido a que puede ser la clave para entender la respuesta de la planta a las condiciones de estrés salino. Debido a que se carece de información, es necesario caracterizarlo a nivel de proteína determinando su capacidad de transporte y su localización a nivel celular. En el presente trabajo se realizó la caracterización de *AtNHX5* a nivel de proteína determinando su localización celular y sus capacidades de transporte.

6. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la salinidad representa un problema serio y que afecta la productividad agrícola, se han realizado diversos estudios enfocados en la caracterización bioquímica y molecular de la respuesta de diversas plantas hacia el estrés salino. El avance alcanzado en este campo comprende al menos la identificación de 18 posibles genes que responden a condiciones de estrés salino, de los cuales se han analizado 7 en la planta modelo, *Arabidopsis thaliana* (Yokoi et al., 2002 y Aharon et al., 2003). De estos 7 genes identificados como Intercambiadores Na^+/H^+ , mediante la sobreexpresión de *AtNHX1* y *AtNHX7* se ha visto un incremento en la tolerancia a la salinidad al menos en plantas transformadas con estos dos genes (Gaxiola et al., 1999; Apse et al., 1999; Shi et al., 2000). Sin embargo los genes restantes no han sido caracterizados en su totalidad. Se observó que el nivel de transcrito de *AtNHX5* aumentaba su expresión en condiciones de estrés salino, discriminando otros tipos de estreses como el osmótico. *AtNHX5* parece jugar un papel importante en respuesta a la salinidad y su caracterización a nivel bioquímico y molecular requiere mayor atención para determinar si puede ser un candidato ideal para que las plantas toleren un alto grado de salinidad en los suelos.

7. OBJETIVOS

GENERAL:

- Determinar la localización y caracterizar la actividad del intercambiador Na^+/H^+ *AtNHX5* en endomembranas de *Arabidopsis thaliana*.

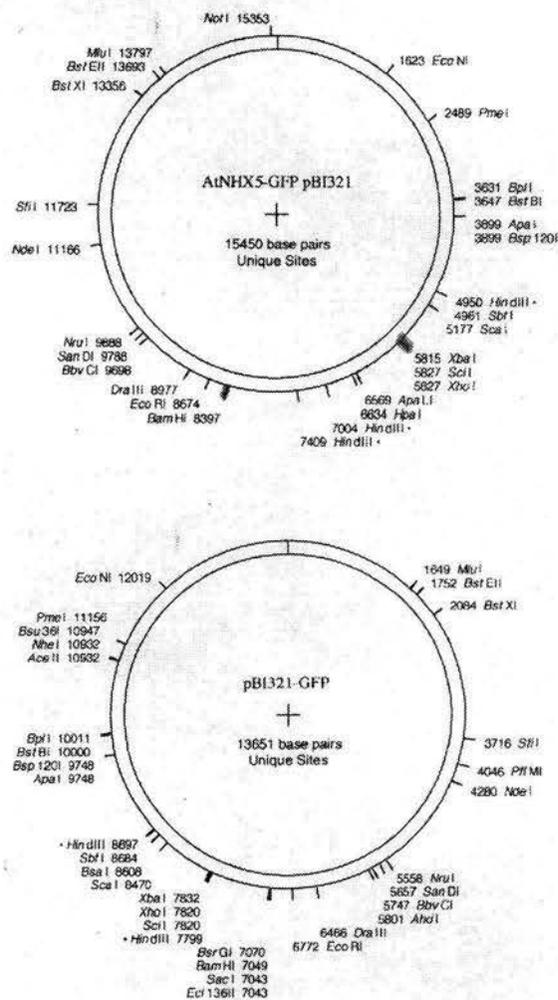
ESPECÍFICOS:

- Determinar la localización membranal de la proteína *AtNHX5* a través del uso de membranas altamente purificadas.
- Determinar la localización celular de la proteína *AtNHX5* a través del uso del microscopio confocal.
- Caracterizar la actividad intercambiadora proveniente de la proteína *AtNHX5*.
- Analizar la expresión del transcrito de *AtNHX5* en diferentes condiciones de estrés.
- Asignar un papel fisiológico a *AtNHX5* a través de la correlación de los niveles de transcrito, proteicos y su actividad intercambiadora durante el estrés salino.

8. Materiales y Métodos

Construcciones genéticas

Se utilizaron líneas transgénicas donadas en colaboración con el Dr. Pardo, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, España, creadas en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia con una construcción realizada en el vector pBI321, en donde se clonó el gen *AtNHX5*. Este gen se fusionó al promotor constitutivo 35S-CaMV del Virus de Mosaico de Coliflor; además, tiene fusionada en fase de lectura la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) en el extremo carboxilo. El inserto se encuentra entre los sitios de restricción de las enzimas Xho I y Bam H1, su tamaño es de 2570 pares de bases. Se cuentan con tres líneas transformadas independientemente: *AtNHX5*-GFP-1, *AtNHX5*-GFP-2, *AtNHX5*-GFP-3 y *AtpB132*-GFP, el vector vacío sólo con la proteína GFP. Los mapas de clonación se muestran a continuación.



Material Biológico

Se utilizaron líneas transgénicas con el gen *AtNHX5* *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia en todos los experimentos. La esterilización de las semillas se llevó a cabo en campana de flujo laminar. Las semillas se colocaron un minuto en etanol al 100 %, se lavaron con agua estéril una vez y se colocaron en cloro al 15 % diluido en agua estéril durante 10 min. Después se lavaron tres veces con un mililitro de agua estéril. Una

semilla se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con una base de agar al 0.6 % disuelto en agua miliQ estéril, para su germinación durante cuatro días en un cuarto de cultivo con fotoperiodo de luz de 16 h y 8 h de oscuridad a 25 °C. Posteriormente, se cortó la punta de los tubos y éstos fueron colocados en recipientes de plástico (figura 2), que contenían 10 l de una solución con Medio Hoagland's diluido a la mitad crecidas bajo condiciones de invernadero con un fotoperiodo normal a 25 °C. Su cultivo en medios hidropónicos favoreció la obtención de tejido de raíz limpio y en grandes proporciones, así como una parte aérea abundante. Después de 5 semanas, las plantas fueron cosechadas y usadas para el aislamiento de membranas. Para el análisis de las plantas en condiciones de estrés salino, a las 4 semanas de crecimiento, las plantas fueron tratadas con medios hidropónicos que contenían Medio Hoagland's a la mitad de su concentración y 50 mM de NaCl por 24 h; posteriormente se cambió la solución aumentando a 100 mM de NaCl por un periodo de 24 h.

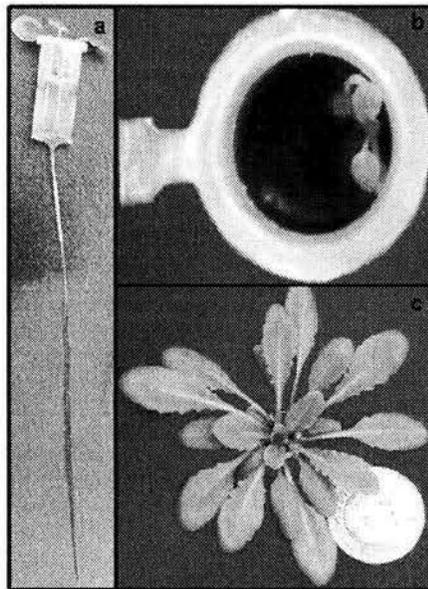


Figura 2. Plantas de *Arabidopsis* crecidas bajo condiciones hidropónicas. **a,b** Las semillas germinadas previamente en el tubo eppendorf con agar al 0.6 % son transferidas a recipientes de plástico y llevados al invernadero. **c** planta con 4 semanas de crecimiento.

Aislamiento de Membranas

Se homogenizaron 30 g de tejido proveniente de plantas de 5 semanas de crecimiento en 150 ml. de medio de homogenización a 4 °C que contiene: 400 mM de manitol, 10 % (w/v) de glicerol, 5 % (w/v) de polivinilpirrolidona-10 (PVP-10), 0.5% (w/v) de suero de albúmina bovina (BSA), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), 30 mM de Tris, 2 mM ditiotreititol (DTT), 5 mM etilen-glicol-bis-(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA), 5 mM MgSO₄, 0.5 mM hidroxitolueno butilado (BHT), 0.25 mM de dibucaína, 1mM de benzamidina y 26 mM de metabisulfito de potasio, pH ajustado a 8.0 con H₂SO₄. PVP-10 es adicionada al medio de homogenización para unir compuestos fenólicos liberados de la vacuola. El metabisulfito previene reacciones oxidativas. EGTA previene la agregación de las membranas y une metales pesados. BSA sirve como sustrato para las actividades de las proteasas. BHT y PMSF son usados para inhibir la ruptura de lípidos y la proteólisis y proteasas, respectivamente. La dibucaína inhibe a la fosfatasa A. El magnesio es añadido para incrementar la densidad

del Retículo Endoplásmico (ER), previniendo la contaminación de ER en las fracciones que están enriquecidas con tonoplasto. DTT es un agente reductor. La homogenización se llevó a cabo en una licuadora comercial en 6 ciclos de 30 s de molido y 30 s de descanso alternados, el tejido homogenizado se filtró con 4 capas de gasas y se centrifugó a 10,000 g en una centrifuga Sorvall RC-5B con rotor Sorvall SS34 durante 20 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100 000 g en una ultracentrifuga Beckman L8-M con rotor tipo Beckman 45Ti durante 50 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y la pastilla microsomal se resuspendió en un buffer de Suspensión que contiene: 400 mM de manitol, 10 % (w/v) glicerol, 6 mM Tris/Mes pH 8.0, 1.3 mM de DTT homogenizándolo con un homogenizador de tejidos Elvehjem de vidrio con pistilo de teflón Potter por 6 veces. Una vez obtenida la suspensión microsomal se colocó arriba de un gradiente continuo de sacarosa ((5 %-46 %) (w/v) Sac) el cual es preparado utilizando el medio de suspensión y dos soluciones de sacarosa de 5 % (w/v) y 46 % (w/v) y un preparador de gradientes Hoeffer SG100. El gradiente de sacarosa se centrifugó a 100,000g durante 3 h a 4 °C usando un rotor tipo SW28 de columpio (Beckman Coulter, Fullerton, CA) en una ultracentrifuga Beckman Coulter L8-M. El gradiente de sacarosa obtenido se colectó cada 0.5 ml para obtener un total de 64 fracciones. Las fracciones fueron congeladas directamente en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C. Para probar la linealidad del gradiente de sacarosa, se midió la concentración de sacarosa en un Refractómetro de luz colocando 30 µl de muestra.

En el caso de los gradientes discontinuos de sacarosa utilizados para medir actividad de transporte de H⁺ en las diferentes fracciones, se prepararon 9 ml de sacarosa al 12 % (w/w) sobre 6 ml de sacarosa al 22 % (w/w), sobre 6 ml de sacarosa al 32 % (w/w) y 6 ml de sacarosa al 40 % (w/w) disueltos en el medio de suspensión antes descrito. Este gradiente discontinuo se centrifugó a 100,000g durante 2 h 30 min a 4° C usando un rotor tipo SW28 de columpio (Beckman Coulter, Fullerton, CA) en una ultracentrifuga Beckman Coulter L8-M. Después de la centrifugación, las interfases entre las diferentes concentraciones de sacarosa fueron colectadas con una pipeta pasteur y diluidas con medio de suspensión y centrifugadas a 100 000 g en una ultracentrifuga Beckman Coulter L8-M con rotor tipo Beckman 55Ti durante 1 hora a 4 °C. La pastilla obtenida es resuspendida suavemente evitando la formación de burbujas en 100 µl de medio de suspensión y congelada en Nitrógeno líquido para su posterior análisis.

Determinación de proteína

Se determinó el contenido total de proteínas en cada fracción obtenida del gradiente de sacarosa mediante el método de Bradford modificado (1976) con suero de albúmina bovino como estándar. Se colocaron 20 µl de muestra y se mezclaron con 30 µl de Tritón X-100 0.5 % durante 5 min para solubilizar las membranas. Posteriormente se agregaron 900 µl de agua y 200 µl de solución Bradford (Protein Assay Dye Reagent concentrate, Bio-Rad), se mezclaron en el vortex durante 5 seg y se dejaron reposar durante 5 min para ver el desarrollo de color. Posteriormente las muestras se leyeron en el Diode Array Espectrofotómetro Hewlett Packard a una longitud de onda de 595 nm.

Ensayos de transporte de H⁺

Para medir el transporte de H⁺ a través de las membranas se utilizó un colorante fluorescente indicador de pH: Quinacrina (6-cloro-9-((4-(dietilamino)-1-metilbutil)amino)-2-metoxiacridin edihidrocloruro). Este colorante fue usado para monitorear la formación y disipación de gradientes de pH internos a través de vesículas recuperadas de las interfases del gradiente discontinuo de sacarosa. Las vesículas purificadas (30 µg de

proteína) fueron adicionados a 500 µl de un buffer que contiene: 250 mM de manitol, 10 mM Tris/MES (pH 8.0), 6 mM MgSO₄, 50 mM Cloruro de Tetrametilamonio y 3 µM de Quinacrina. El transporte de protones fue iniciado en las vesículas mediante la adición de 3 mM de bis-Tris Propano/ATP (BTP/ATP, pH 8.0). La fluorescencia fue monitoreada en celdas termoestables a 25°C usando un Espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS-50 (Norwalk, CT, USA) a longitudes de onda de excitación (427 nm) y emisión (495 nm) ambos con +/- 5 nm (error estándar). Para medir la recuperación de la fluorescencia, la cual es reflejo de la actividad intercambiadora Cationes/ H⁺, se añadieron distintas concentraciones de NaCl y KCl de 0.5 mM a 200 mM. Para disipar el gradiente fueron adicionados 12.5 mM de NH₄Cl, lo cual sirve como control para comprobar la existencia de un gradiente interno de pH dentro de las vesículas y que la fluorescencia registrada es debido a este hecho.

Para calcular la tasa inicial de fluorescencia y la recuperación de la misma con respecto al tiempo y la cantidad de proteína, se utilizó la siguiente fórmula, la cual refleja la tasa inicial de transporte de ATP o el transporte dependiente de protones:

$$\left[\frac{F_1 - F_2}{T_1 - T_2} \right] \frac{1000}{30} \frac{60}{1}$$

F_{\max}

Donde:

F ₁ Nivel de Fluorescencia 1	$\frac{1000}{30}$	miligramos de proteína
F ₂ Nivel de Fluorescencia 2	$\frac{60}{1}$	unidad de tiempo (min)
T ₁ Tiempo 1	$\frac{60}{1}$	
T ₂ Tiempo 2	$\frac{1}{1}$	

F_{max} Fluorescencia máxima: Nivel de fluorescencia inicial antes de la adición de ATP

Análisis de Inmunolocalización

Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas (Western Blotting)

Para realizar SDS-PAGE e inmunolocalización, las muestras de proteínas fueron preparadas de acuerdo con el método de Parry et al., (1989). Las proteínas fueron precipitadas por una dilución 50x de etanol:acetona 1/1 (v/v) a -30 °C e incubadas por al menos dos h a -30 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g durante 20 min a 4 °C usando un centrifuga Sorvall RC-5B con rotor Sorvall SS34. La pastilla obtenida se secó al aire y se resuspendió con un buffer de Laemmli (1970) (62.5 mM Tris/HCl, 2.5 % (w/v) de SDS, 5 % (w/v) 2,β-mercaptoetanol y .001 % (w/v) azul de bormofenol). Posteriormente, la muestra se calentó a 60 °C por 2 min previo al corrimiento en un minigel de acrilamida al 10 % (w/v) y 1 % SDS. En el gel de acrilamida se cargaron 15 µg de proteína por carril en 350 ml de buffer de corrida (0.06 M Tris, 0.04 M Glicina y 8 mM de SDS) y el corrimiento se llevó a cabo a 200mV por 50 min en una cámara de mini geles Mini Protean II BioRad a 4 °C.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (ECL, Amersham-Biosciences) en condiciones de humedad. El gel se puso en contacto con la membrana y se colocaron en medio de papel de cromatografía Whatman 3MM (una pieza a cada lado), dos almohadillas porosas y dos soportes de plástico, todo previamente humedecido en un buffer de transferencia (0.02 M Tris, 0.15 M Glicina y 20 % Metanol), usando una celda de transferencia Mini-Transblot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) durante 75 min a 100mV y a 4 °C.

Para verificar la transferencia de las proteínas las membranas se tiñeron en una solución de Ponceau 1/10 (2 % w/v) Ponceau S, 30 % (w/v) ácido tricloroacético, 30 %

(w/v, ácido sulfosalicílico) y posteriormente se lavaron con agua estéril para su bloqueo posterior.

Bloqueo de los sitios de unión de los anticuerpos sobre la membrana de nitrocelulosa y unión de los anticuerpos primario y secundario a la proteína blanco.

Las membranas fueron bloqueadas, con 5 % (w/v) de leche en polvo sin grasa en un buffer salino Tris (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 150 mM NaCl) que contiene 0.02 % (w/v) azida de sodio por 2 h a temperatura ambiente y con agitación. Después del bloqueo las membranas fueron incubadas en 8 ml de solución de bloqueo con azida de sodio con la dilución apropiada del anticuerpo primario por 12 h a temperatura ambiente y en agitación. Para detectar los inmunocomplejos formados, las membranas fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente en 8 ml de solución de bloqueo sin azida de sodio utilizando anticuerpos secundarios anti-conejo acoplado a una peroxidasa de rábano con una dilución de 1/5000 (Sigma-Aldrich, St. Louis). Las membranas se lavaron tres veces en buffer salino sin azida de sodio durante 10 min. La detección de la proteína blanco se realizó utilizando el Kit de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham) donde las membranas se humedecieron en 3 ml de los reactivos del Kit durante un minuto y medio. En seguida fueron expuestas a películas Kodak en tiempos de 12 seg hasta 10 min dependiendo de la abundancia de la proteína blanco. La película fue revelada en condiciones de oscuridad, colocándola durante 4 min en la solución reveladora, se lavó con agua destilada y se fijó en la solución fijadora. Cada mini gel que contiene 9 fracciones fue analizado independientemente. Los geles fueron fotografiados y analizados con la cámara Kodak DC-120 y el programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis software V.2, respectivamente (Kodak, México). Después las imágenes fueron alineadas y unidas con el software PhotoImpact SE 3.01 (Ulead Systems, Torrance, CA) para visualizar las fracciones representativas del gradiente de sacarosa.

Los anticuerpos utilizados para inmunodetectar los diferentes marcadores proteicos en las endomembranas fueron:

1. Anticuerpos específicos anti-GFP de Invitrogen en una dilución 1:1000.
2. Anti-At-Vam3 (33 kDa) proteína relacionada con sintaxinas vacuolares donado por Dr. M. S. Sato Universidad de Kyoto, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japón (Uemura, T. et al., 2002).
3. Anti-McHKT1 (56 kDa) el cual es una proteína cotransportadora de cationes de baja afinidad presente en membrana plasmática (Hua, S., et al., 2003)
4. Anti-McCRT Calreticulina (57 kDa) fue usado como marcador de Reticulo endoplásmico donados por el Dr. H. Bohnert. Universidad de Illinois, Urbana Champaign, USA (Nelson et al., 1997).
5. Anti-AtBP80 proteína que marca compartimentos prevacuolares (PVC), vesículas de clatrina (CCV) y es un receptor que trafica entre las diferentes zonas del Aparato de Golgi, con un peso de 80 kDa donado por Dr. J.C. Rogers (Jauh et al., 1999).
6. Anti-Pep12 (35 kDa), que es una proteína específica de PVC, fue comprados en Molecular Probes (Eugene, OR).
7. Anti-NHX5 anticuerpo obtenido para la detección específica de AtNHX5 (ProSci Incorporated, Poway, CA).

Síntesis del anticuerpo anti-NHX5

El péptido anti-AtNHX5 fue sintetizado y verificado por análisis de espectrometría de masas. Este péptido fue conjugado a la proteína Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) la cual actúa como una proteína acarreadora que estimula la respuesta inmune, pero sin

generar anticuerpos contra ella sólo contra el péptido blanco. El péptido conjugado fue inyectado a conejos y se colectó el suero pre-inmune y posteriormente se hizo la colecta de la primera y segunda muestra de sangre 6 y 7 semanas posteriores a la colecta del suero pre-inmune. Dos semanas después se realizó la tercera colecta de sangre y una semana después la última muestra. Se realizó una prueba de Elisa para la segunda muestra de sangre y encontrar los títulos de anticuerpos obtenidos: una dilución 1/1000 tuvo 1.398 mg de anticuerpo purificado por mililitro de muestra.

El anticuerpo fue purificado mediante cromatografía de afinidad utilizando el suero de la tercera muestra de sangre. El péptido fue unido covalentemente a una columna de sefarosa activada 4B CNBr. Los anticuerpos policlonales obtenidos que son específicos al antígeno pasaron a través de la columna y se unieron. Los anticuerpos inespecíficos no unidos y el suero pasaron a través de la columna y los antígenos unidos a los anticuerpos fueron lavados.

Cultivo de células en suspensión.

Para obtener cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, la primera etapa consiste en la obtención de callos provenientes de hojas y raíz. Por ello, las semillas fueron germinadas en medio MS por 3 semanas. Las hojas fueron cortadas en secciones de 0.5 mm con una navaja de rasurar en condiciones de esterilidad y para la raíz se cortaron secciones de 1 mm. Se colocaron en medio Murashige and Skoog (MS;1962) suplementado con 1 mg de ácido L⁻¹ 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.05 mg L⁻¹ Benzilaminopurina (BA), 10mg L⁻¹ Hidrocloruro de Tiamina, 1mg L⁻¹ ácido Nicotínico, 1 mg L⁻¹ Hidrocloruro de Piridoxina, 100 mg L⁻¹ *myo*-inositol, 3 % sacarosa y 1.5 % de agar bacteriológico (pH 5.7) a 25 °C en la oscuridad. Después de un periodo de 4 semanas, cuando el callo es friable, fueron transferidos a un medio líquido MS suplementado de la misma forma que el anterior, se incubaron a 25 °C en continua agitación (120 g) en la oscuridad.

Aislamiento de Protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Los protoplastos pueden ser aislados de cultivos de células en suspensión o de tejido de raíz u hoja directamente mediante tratamiento enzimático. En el caso del tejido de raíz y hoja, el material se cortó en pequeñas piezas, mientras que las células en suspensión se colectaron a través de papel filtro Whatman en un embudo bunsen para eliminar el medio de cultivo. Tanto los tejidos como las células se digirieron con el tratamiento enzimático que contiene 400 mM sorbitol, 0.5 mM CaCl₂, 25 mM MES, 0.5 % (w/v) BSA, 2 % (w/v) celulasa, 0.5 % (w/v) pectinasa ajustando el pH a 5.5 con KOH 5 N. Se colocó el material biológico en el medio de digestión por 1 a 2 h y las hojas y raíces por 30 min a 30 °C en la oscuridad y con agitación suave. De las hojas y raíces, los protoplastos se liberaron mediante golpeteo del recipiente y posteriormente se filtró la solución a través de una capa de miracloth y el filtrado se centrifugó a 800 x g por 5 min a 4 °C. La solución se descartó para volver a suspender los protoplastos en medio de lavado (400 mM sorbitol, 0.2 mM CaCl₂, 15 mM Tris/MES pH 5.5). Para purificar los protoplastos se colocaron en un gradiente de Percoll al 50 % y se centrifugaron por 10 min a 1200 g a 4 °C. Los protoplastos purificados se removieron de la interfase y se resuspendieron en un volumen grande de solución de lavado y se centrifugaron por otros 5 min a 800xg a 4 °C y se resuspendieron en solución de lavado.

Estudios de Inmunofluorescencia

Para el estudio de la inmunofluorescencia se utilizó la Microscopía confocal. Para ello, las muestras se prepararon como se describe a continuación: Las células en suspensión y cortes de tejidos de hoja y raíz se prepararon fijando las células o tejidos

con 1.4 % de paraformaldehído en una solución estabilizadora (10 mM BTP, 25 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA) con un pH final de 6.8, para células de *Arabidopsis* se ajustó la osmolaridad a 200 mOsmoles durante 15 min con agitación suave. Los tejidos o células ya fijados se lavaron tres veces con la solución estabilizadora por 5 min cada uno y se procedió a remover parcialmente la pared celular con tratamiento enzimático (10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM ácido ascórbico, 10 mM MES, 0.05 % BSA, 1 % celulasa, 0.02 % pectinasa, pH 6.8) por 20 min a temperatura ambiente con agitación suave. Posterior al tratamiento enzimático los tejidos o células se lavaron con la solución estabilizadora y se permeabilizó la membrana plasmática con el detergente Tritón X-100 al 10 % disuelto en la solución estabilizadora por 10 min con agitación suave repitiendo tres lavados con la solución estabilizadora por 5 min cada uno manteniendo la agitación entre los lavados. Previo a la adición del anticuerpo primario se bloquearon los sitios de las células expuestas para la unión de los anticuerpos empleados con 5 % de leche sin grasa disuelta en medio de estabilización durante 1 h. Se incubaron con el anticuerpo primario durante 4 h a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se lavaron las células con la solución estabilizadora tres veces por 5 min cada una con agitación. Enseguida, se agregó el anticuerpo secundario acoplado a diferentes fluoróforos (Alexa-fluor 488 o 568, Molecular Probes) y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente, con agitación y protegido de la luz. Al otro día se realizaron nuevamente tres lavados con solución estabilizadora y agitación durante 5 min y se analizaron las muestras en el microscopio confocal (Bio-Rad, México). En el microscopio se utilizaron los filtros YHS (por sus siglas en inglés Yellow high sensitivity) que absorbe a 568 nm para el anticuerpo Alexa-Fluor-568 y el filtro BHS (por sus siglas en inglés Blue high sensitivity) que absorbe a 488 nm para GFP. El láser empleado es Kriptón/Argón. El objetivo para obtener las imágenes de contraste de fases fue el de 40x (MRC-600 Bio-Rad, México). Las imágenes fueron obtenidas con un laser microimager Bio-Rad Confocal (Bio-Rad, Hercules, CA) montado sobre un Carl Zeiss Axioskop usando el software Cosmos 7.0 (Bio-Rad). Las imágenes digitales almacenadas fueron pseudocoloreadas, una como imagen roja y otra como imagen verde, usando el programa Photoshop 3.0 (Adobe, Mountain View, CA). Para las muestras empleadas para doble marcaje, las imágenes rojas y verdes fueron empalmadas usando el software confocal (Bio-Rad). Esto dió como resultado regiones de colocalización en color amarillo. Para una comparación, las imágenes fueron grabadas usando los mismos parámetros de potencia de láser y sensibilidad del fotomultiplicador.

El tratamiento con el detergente Tritón X-100 permite, por un lado, que los anticuerpos primarios utilizados penetren y reconozcan la estructura elegida y por otro, elimina la autofluorescencia de las células. Debido a que se utilizan células provenientes de las líneas transformadas con GFP, es importante la eliminación de la autofluorescencia porque tanto la señal de GFP como el espectro de autofluorescencia son detectados en el mismo rango de longitud de onda (GFP es detectada a 509 nm). Las células con GFP tratadas con Tritón X-100 no son expuestas a un anticuerpo primario, la señal emitida de GFP es detectada directamente al excitarla. Las células fueron tratadas sólo con el detergente para eliminar la autofluorescencia.

Utilizando esta técnica de inmunomarcaje en microscopio confocal se realizaron dobles marcajes utilizando células provenientes de *A. thaliana* tipo silvestre y células de las líneas transformadas con GFP. Para los dobles marcajes se emplearon los diferentes anticuerpos utilizados en la inmunodetección (P-ATPasa, McHKT1, BP80, Pep12, Calreticulina descritos en la sección de inmunolocalización).

Inmunomarcaje de fracción madura. Quema de Autofluorescencia con Metacrilato.

Las fracciones de tejido se sumergieron en una solución estabilizadora de microtúbulos, 100 μ M MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide éster), 0.1% Tritón X-100, 50 mM PIPES (pH 6.9), 5 mM EGTA y 2 mM $MgSO_4$, a temperatura ambiente durante 30 min. El tejido se fijó de la siguiente manera:

a) En solución de paraformaldehído al 4% en solución estabilizadora de microtúbulos durante 3 h. Al final de estos tiempos se lavaron con 15 ml de solución estabilizadora de microtúbulos 3 veces durante 10 min cada vez con agitación. Inmediatamente después se llevó a cabo la deshidratación con etanol absoluto al 10 %, 20 %, 30 %, 50 % y 70 % en agua mili-Q, cada paso por 20 min, agitando por rotación constante en disco giratorio. Se guardaron toda la noche en etanol al 70 %. Se colocaron en etanol al 80 % y al 90 % agitando durante 30 min cada vez. Después se sumergieron dos veces en etanol al 100 % con DTT 5 mM con agitación, por una hora cada vez. Al final de este tiempo se colocaron en una secuencia de soluciones de etanol absoluto más DTT 5 mM/solución de metacrilato y agitando por rotación a temperatura ambiente de la siguiente manera:

- 4/1 etanol/metacrilato (v/v)
- 3/1 etanol/metacrilato (v/v)
- 2/1 etanol/metacrilato (v/v)
- 1/1 etanol/metacrilato (v/v)
- 1/2 etanol/metacrilato (v/v)
- 1/3 etanol/metacrilato (v/v)
- 1/4 etanol/metacrilato (v/v)

Después se sumergieron en solución de metacrilato al 100 % durante toda la noche, con agitación y protegidos de la luz. Se hicieron tres cambios de solución de metacrilato al 100 % agitando durante una hora cada vez a temperatura ambiente. Después se polimerizaron durante 10 h en cápsulas de embeber (Polysciences, Inc. Warrington, PA), en baño de hielo con una temperatura de 0° C para evitar la formación de burbujas y bajo una lámpara de luz UV, a una distancia de 10 cm. Se cortaron las cápsulas y se sacaron las muestras para realizar los cortes tanto de hoja como de raíz en secciones semifinas de 10 micras recibéndolos en porta objetos cubiertos de Fisher pre-lavados. El metacrilato se eliminó de esos cortes remojando los porta objetos en acetona al 100 % (v/v) durante 60 min haciendo cambios cada 15 min a temperatura ambiente para después rehidratar y hacer el inmunomarcaje. La rehidratación de los cortes se llevó a cabo gradualmente en acetona/agua mili-Q al 100 % (v/v), 90 % (v/v), 70 % (v/v), 50 % (v/v), 30 % (v/v) y 10 % (v/v) durante 10 min cada vez. Se lavaron con TBST (Buffer Tris-salina, Triton-X100 (0.05 %)) tres veces durante 10 min cada vez a temperatura ambiente. Se bloquearon con leche al 5 % en TBST por 2 h a temperatura. Se colocó el anticuerpo primario diluido en leche sin grasa al 5 % en TBST. Se dejó toda la noche en base nivelada y cubiertos a 4 °C, dentro de una cámara húmeda. Se lavaron tres veces con TBST por 30 min cada vez a temperatura ambiente y se colocó el segundo anticuerpo diluido en TBST y se dejó por 4 h en base nivelada protegido de la luz a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con TBST por 30 min cada vez a temperatura ambiente. Se colocó una gotita de Cytofluor y cubreobjetos, sellando con barniz de uñas. Se dejó secar por 15 min y se almacenaron a 4 °C, protegidas de la luz.

Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las construcciones AtNHX5::GFP en DNA genómico en *A. thaliana*.

Extracción de DNA genómico de plantas de A. thaliana

Se obtuvo DNA genómico de plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de crecimiento utilizando el kit Nucleon PhytoPure (RPN 8510) Amersham. Se colocó 0.1 g

(peso fresco) de tejido de planta en un mortero frío y se agregaron tres volúmenes de nitrógeno líquido, el tejido se pulverizó hasta obtener un polvo fino, se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se agregaron 600 μ l del Reactivo I, se mezcló perfectamente utilizando un vortex por 10 seg. Después se agregó el Reactivo II se mezcló por inversiones hasta obtener una mezcla homogénea y se incubó a 65 °C durante 10 min mezclando alternativamente por inversión. Después el tubo se colocó en hielo durante 20 min. La muestra se removió del hielo y se le agregaron 500 μ l de cloroformo, el cual fue almacenado a -20 °C. Se adicionaron 100 μ l de una suspensión de Resina de extracción Nucleon PhytoPure DNA (Amersham, U.K.), se mezcló por agitación 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugo a 1300 xg por 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió la fase superior a un tubo eppendorf nuevo estéril y se le añadió un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C) se mezcló suavemente por inversión para precipitar el DNA. Se centrifugo a 4000 xg por 5 min y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70 % (v/v) centrifugándose por 5 min a 4000 g a temperatura ambiente. La pastilla fue secada al aire por 10 min a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 50 μ l de agua estéril.

Amplificación por PCR de la construcción AtNHX5::GFP

Para amplificar la construcción se preparó el tubo de reacción que contenía 5 μ l de buffer para PCR 10x, 1 μ l de dNTP's, 1.5 μ l de 50 mM de $MgCl_2$, 1 μ l de cada uno de los primers, 1 μ l de DNA, 0.5 μ l de Platinum DNA Taq polimerasa y se ajustó el volumen a 50 μ l con agua destilada estéril. La muestra se colocó en un Termociclador Hybaid Omn-E con el siguiente protocolo de temperaturas: 5 min a 94 °C en un primer ciclo para desnaturalizar y posteriormente 30 ciclos alternando temperaturas de 94 °C durante 45 seg, 53 °C durante 45 seg y 72 °C durante 45 seg y un último ciclo de 10 min a 72 °C. El DNA obtenido es visualizado en un gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1x. El oligo sentido hibrida en la región 5' del gen de AtNHX5 y el oligo antisentido hibrida en el extremo 3' del gen de la GFP.

Secuencia de los oligos

Oligo sentido : 5' AAA AAG AAG ACG TTC CAA CC 3'

Oligo antisentido: 5' ATG ATA ATC ATC GCA AGA CC 3'

Análisis de RT-PCR (Transcripción reversa mediante Reacción en Cadena de la DNA Polimerasa

La síntesis de cDNA se llevó a cabo empleando el Kit M-MLV Reverse Transcriptase (GibcoBRL). Se preparó una muestra de reacción donde se colocaron de 1 a 5 ng de RNA total, se adicionó 1 μ l de oligo dT, 1 μ l de dNTP (10 mM de cada deoxinucleotido: dATP, dGTP, dCTP, dTTP a pH neutral) y se ajustó a un volumen de 12 μ l con agua estéril. La mezcla se calentó a 65 °C por 5 min y se enfrió rápidamente en hielo. Se colectó el contenido con una breve centrifugación. Se adicionó 4 μ l de Buffer 5x (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 2 μ l de DTT 0.1 M y 1 μ l de RNaseOUT (Inhibidor Recombinante de la Ribonucleasa). Se mezcló el contenido suavemente y se incubó 2 min a 37 °C, se adicionó 1 μ l de M-MLV RT (por sus siglas en inglés Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) y se incubó 50 min a 37 °C, se inactivó la reacción calentando la mezcla a 70 °C por 15 min. Para preparar la reacción de PCR a un volumen final de 50 μ l se adicionaron 5 μ l de Buffer de PCR 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l de una mezcla de dNTP 10 mM, 1 μ l del primer de amplificación 1, 1 μ l del primer de

amplificación 2, 2 µl de cDNA, 38 µl de agua destilada estéril y 0.5 µl de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen 5U/µl). Se mezcló suavemente y la reacción se colocó en un Termociclador Hybaid Omn-E con el siguiente protocolo de temperaturas: 5 min a 94 °C en un primer ciclo para desnaturalizar y posteriormente 30 ciclos alternando temperaturas de 94 °C durante 45 seg, 54 °C durante 45 seg y 72 °C durante 45 seg y un último ciclo de 10 min a 72 °C. El DNA obtenido es visualizado en un gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1x.

Como control de carga, se amplificó el gen de la Adenosina Fosforibosiltransferasa (*APT1*) fragmento de 478 pares de bases con los oligos:

5' TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC 3'

5' CCTTCCCTTAAGCTCTG 3'

Secuencia de Oligonucleótidos específicos para la amplificación *AtNHX5* (Yokoi et al., 2002).

Primer 1: 5' CTT TGA AGA GAG CGA TCA TC 3'

Primer 2: 5' AGT ATG TCC CTC CTC CTT TT 3'

9. RESULTADOS

9.1 Presencia de la construcción *AtNHX5::GFP* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia.

Para poder estudiar el papel de *AtNHX5* en el proceso de adaptación de las plantas a la salinidad se utilizó una construcción fusionando al gen *AtNHX5* de *Arabidopsis thaliana* con la proteína GFP (Proteína verde fluorescente) en el extremo carboxilo y el fragmento del promotor constitutivo 35S (Virus Mosaico de la Coliflor; Hull et al., 2000). Esta construcción fue utilizada para transformar plantas de *A. thaliana* y de esta manera se obtuvieron tres líneas transgénicas independientes denominadas: *AtNHX5::GFP1*, *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3* las cuales fueron donadas en colaboración con el grupo del Dr. Pardo, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, España.

Como primer paso se verificó la presencia de la construcción en las plantas transgénicas mediante análisis de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). En la figura 9.1 se muestran los productos de PCR obtenidos después de 30 ciclos de amplificación. Los fragmentos de DNA obtenidos para las líneas *AtNHX5::GFP1*, *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3* tienen un tamaño aproximado de 3,000 pares de bases, el cual corresponde al peso esperado para la fusión de los genes *AtNHX5* y *GFP*, ya que el gen *AtNHX5* tiene un tamaño aproximado de 1700 pb y el gen *GFP* de 1500 pb. Por otro lado, al amplificar el vector el cual posee sólo el gen de *GFP* se obtuvo un producto de 1200 pb tamaño debido a que la zona donde se diseñaron los oligos no permitió obtener la amplificación completa del gen.

Como se puede observar en la figura 9.1 los fragmentos de 3,000 pb difieren en intensidad lo que puede reflejar diferencias en el número de copias insertadas en el genoma de *A. thaliana* para cada una de las líneas analizadas. Así, *AtNHX5::GFP1* aparentemente tiene el menor número de copias en relación con *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3* (figura 9.1 carriles 2,4,6). Como control de la calidad del DNA empleado fue usado el gen *AtAQP1*, el cual codifica para la acuaporina-1 con un peso de 1,500 pares de bases que se expresa de manera constitutiva en *A. thaliana* (figura 9.1 carriles 3, 5, 7)

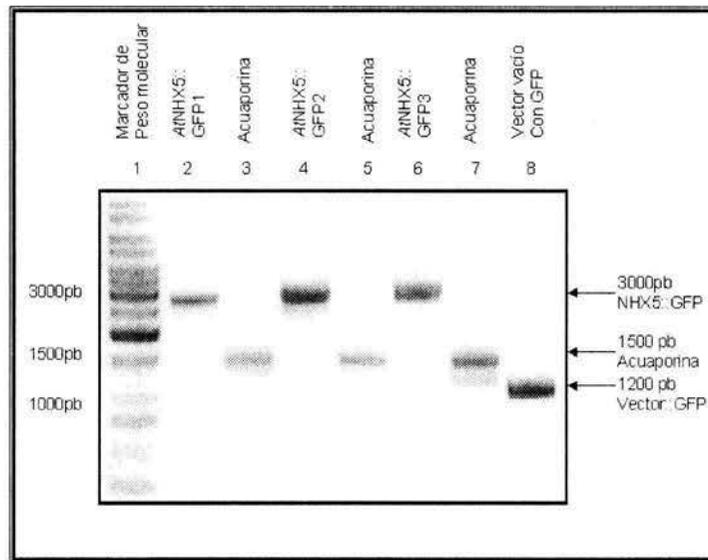


Figura 9.1 Análisis de PCR de DNA genómico de las líneas transgénicas *AtNHX5::GFP1*, *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3*.

Carril 1, Marcador de peso molecular; carriles 2, 4, 6 DNA de *AtNHX5::GFP1*, *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3*, respectivamente con un peso de 3000 pb; carril 6 Vector con el gen de GFP; carriles 3, 5, 7 DNA del gen *AQP1* acuaporinas con un peso de 1500 pb.

9.2 Detección de *AtNHX5* en la fracción microsomal de tejidos de plantas completas de las líneas transgénicas *AtNHX5::GFP1* y *AtNHX5::GFP2* de *Arabidopsis thaliana*.

Para entender el papel de un intercambiador Na^+/H^+ en la fisiología de la planta es importante conocer su localización membranal ya que es determinante para su funcionalidad y eficiencia en condiciones de salinidad (Gaxiola et al., 1999, Apse et al., 1999 y Yokoi et al., 2002). Datos acerca de la respuesta de *AtNHX5* sugieren que su expresión es específica hacia el estrés salino (Yokoi et al., 2002) y debido a que se desconoce su localización es importante determinarla a nivel microsomal y celular.

Mediante técnicas convencionales de centrifugación se separaron las endomembranas de la línea transgénica *AtNHX5::GFP1* en un gradiente continuo de sacarosa. Las fracciones fueron colectadas, concentradas y separadas en un gel al 10 % (p/v) de acrilamida seguido de una transferencia a membranas de nitrocelulosa y preparadas para la inmunodetección.

Utilizando el anticuerpo anti-GFP se detectó una banda proteica de aproximadamente 80 kDa, la cual corresponde con el peso esperado para la fusión entre *AtNHX5* (50 kDa) y GFP (30 kDa) (figura 9.2). La expresión de *AtNHX5* fue

detectada en todas las fracciones del gradiente continuo de sacarosa. Se observaron dos niveles de expresión, uno entre las fracciones 2 a la 16 con concentraciones de sacarosa de: 6 % (p/v) y 14 % (p/v) y otro entre las fracciones 26 y 48 y concentraciones de sacarosa de: 21 % (p/v) y 35 % (p/v). La expresión de *AtNHX5* en las fracciones 18 a la 24 (15 % (p/v) al 20 % (p/v)) fue baja.

Para determinar la localización de las diferentes membranas vegetales en el gradiente de sacarosa, se utilizaron anticuerpos contra marcadores proteicos abundantes en los distintos sistemas membranales. La presencia del tonoplasto fue detectada en la región media del gradiente de sacarosa mediante la proteína *AtVam3*, con un peso de 33 kDa (Uemura, et al., 2002), entre las concentraciones de 22 % (p/v) a 37 % (p/v) de sacarosa. La localización de la membrana plasmática fue determinada con la proteína *McHKT1*, intercambiador catiónico con un peso de 56 kDa (Hua, et al., 2003). Esta proteína mostró un pico de expresión en las últimas fracciones del gradiente de sacarosa que corresponden a concentraciones de 37 % (p/v) al 45 % (p/v) de sacarosa. Otro tipo de membrana abundante es el retículo endoplásmico cuya distribución se determinó con la proteína *McCRT*, calreticulina de 57 kDa (Nelson et al., 1997), Su expresión se detectó en todas las fracciones del gradiente sin un pico de expresión definido. La proteína *AtBP80* de 80 kDa (Jauh et al., 1999) es un marcador de vesículas de clatrina, aparato de Golgi y las vesículas que trafican entre sus compartimentos y estuvo presente en las primeras fracciones del gradiente entre las concentraciones 6 % (p/v) al 15 % (p/v) de sacarosa.

Con la localización obtenida de los marcadores proteicos en el gradiente de sacarosa y comparándolos con la localización de *AtNHX5*, podemos decir que la expresión de *AtNHX5* en la línea *AtNHX5::GFP1* no colocalizó específicamente con alguno de los marcadores, ya que su nivel de expresión se mantuvo a lo largo del gradiente. Por ello, es difícil determinar puntualmente en cuál compartimiento celular se localiza. Por otro lado, la separación de las distintas endomembranas en el gradiente es razonablemente buena, ya que no hay regiones en dónde se mezclen el tonoplasto y la membrana plasmática. Aunque todas las fracciones del gradiente contienen membranas provenientes del retículo endoplásmico, lo cual es normal y esperado dadas las concentraciones de magnesio empleadas en el medio de homogenización.

9.2.1 Detección de AtNHX5 en la fracción microsomal de tejidos de plantas completas de la línea transgénica AtNHX5::GFP2 de *Arabidopsis thaliana*.

Con la finalidad de verificar el patrón de expresión de AtNHX5 se realizaron los mismos análisis de inmunodetección en la línea AtNHX5::GFP2. Lo que se observó fue, por un lado que la intensidad de la señal fue más fuerte para esta línea transgénica y, por otro lado, el patrón de distribución de AtNHX5 se vio ligeramente modificado. El aumento en la intensidad de la señal puede ser reflejo de la existencia de un mayor número de copias de la proteína en esta línea. La localización de la señal de AtNHX5 detectada a partir de la banda proteica de 80 kDa (figura 9.2.1) mostró dos picos definidos. El primer pico en las fracciones menos densas del gradiente de sacarosa que correspondieron a una concentración de sacarosa del 6 % (p/v) al 10 % (p/v). El segundo se distribuyó desde la región media del gradiente hasta las fracciones más concentradas de sacarosa (15 % (p/v) al 45 % (p/v)). En las fracciones comprendidas entre la 12 y 16 se observó una ausencia de la banda de 80 kDa entre las concentraciones 11 % (p/v) al 14 % (p/v) de sacarosa.

Se analizó la ubicación de los marcadores proteicos para las distintas endomembranas y se observó que el tonoplasto (AtVam3) tuvo una región de expresión más amplia que en AtNHX5::GFP1 entre las concentraciones de 15 % (p/v) al 44 % (p/v) de sacarosa que corresponden a las fracciones de la 18 a la 60. La membrana plasmática (MchKT1) se expresó en las últimas fracciones (42-60) con una concentración de 31 % (p/v) al 44 % (p/v) de sacarosa empalmándose con las fracciones correspondientes al tonoplasto y su distribución también aumentó a lo largo del gradiente comparado con AtNHX5::GFP1. Los marcadores para retículo endoplásmico y aparato de golgi (McCRT) y BP80 (AtBP80) respectivamente, conservaron su distribución a lo largo del gradiente en ambas líneas (figura 9.2 y 9.2.1). En primera instancia, el primer pico de expresión de AtNHX5 pareció colocalizar con AtBP80 marcador del aparato de Golgi y vesículas de clatrina, mientras que el segundo pico de expresión se extiende en todo el gradiente sin colocalizar con algún marcador en específico.

Cuando se analizó la línea AtNHX5::GFP3 se observó el mismo patrón de expresión que en AtNHX5::GFP2. AtNHX5 mantiene dos picos de expresión uno en las regiones menos densas del gradiente y otro que abarca desde la región media hasta las últimas fracciones del gradiente. Por lo que respecta a los marcadores de endomembranas, tanto el tonoplasto como la membrana plasmática abarcan regiones

más amplias, indicando una posible modificación en la densidad de estas membranas (figura 9.2.1.1).

Es probable que las membranas provenientes del aparato de golgi estuvieran enriquecidas con AtNHX5 debido a que el primer pico de expresión de las tres líneas transgénicas (figuras 9.2, 9.2.1 y 9.2.1.1) colocalizó únicamente con este marcador habiendo ausencia de otros tipos membranales en esta región. También es importante remarcar que tanto el tonoplasto como la membrana plasmática mostraron rangos de expresión más amplios en AtNHX5::GFP2 y AtNHX5::GFP3 comparados con el patrón obtenido para AtNHX5::GFP1, afectándose la distribución de estas membranas en el gradiente de sacarosa.

9.3 Detección de AtNHX5 en tejidos de plantas completas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre.

Para determinar si la construcción empleada para transformar las plantas de *A. thaliana* estaba modificando las propiedades de las membranas de tonoplasto y la membrana plasmática y para verificar la localización de AtNHX5, por un lado, se aisló tejido de plantas tipo silvestre de *A. thaliana* y, por otro lado, se obtuvo un anticuerpo específico para AtNHX5.

El anticuerpo específico para AtNHX5 se obtuvo mediante el diseño de un péptido. Para ello, se tomó en cuenta que AtNHX5 es hasta 55 % idéntico a AtNHX6 (Yokoi et al., 2002) y se alinearon las secuencias de aminoácidos predichas de AtNHX5 (número de acceso AC005287) y AtNHX6 (número de acceso AC010793) usando el programa Clustal X (Thompson, et al.,1994). Con este alineamiento se determinó la región en la cual se diseñó el péptido con una secuencia:

ESD HQY VPP PFS DGA,

la cual se ubica en el extremo carboxilo de la proteína entre los aminoácidos 504 al 518 (figura 9.3). Esta región no corresponde a ningún segmento transmembranal lo cual facilita el reconocimiento del anticuerpo hacia la proteína, ya que el sitio se encuentra expuesto hacia el exterior y, además la región resulta altamente antigénica ya que posee un gran número de aminoácidos cargados positivamente. Esto permitió sintetizar un péptido específico para generar un anticuerpo anti-AtNHX5 el cual se realizó por la compañía Pro-Sci Incorporated (Poway, CA).

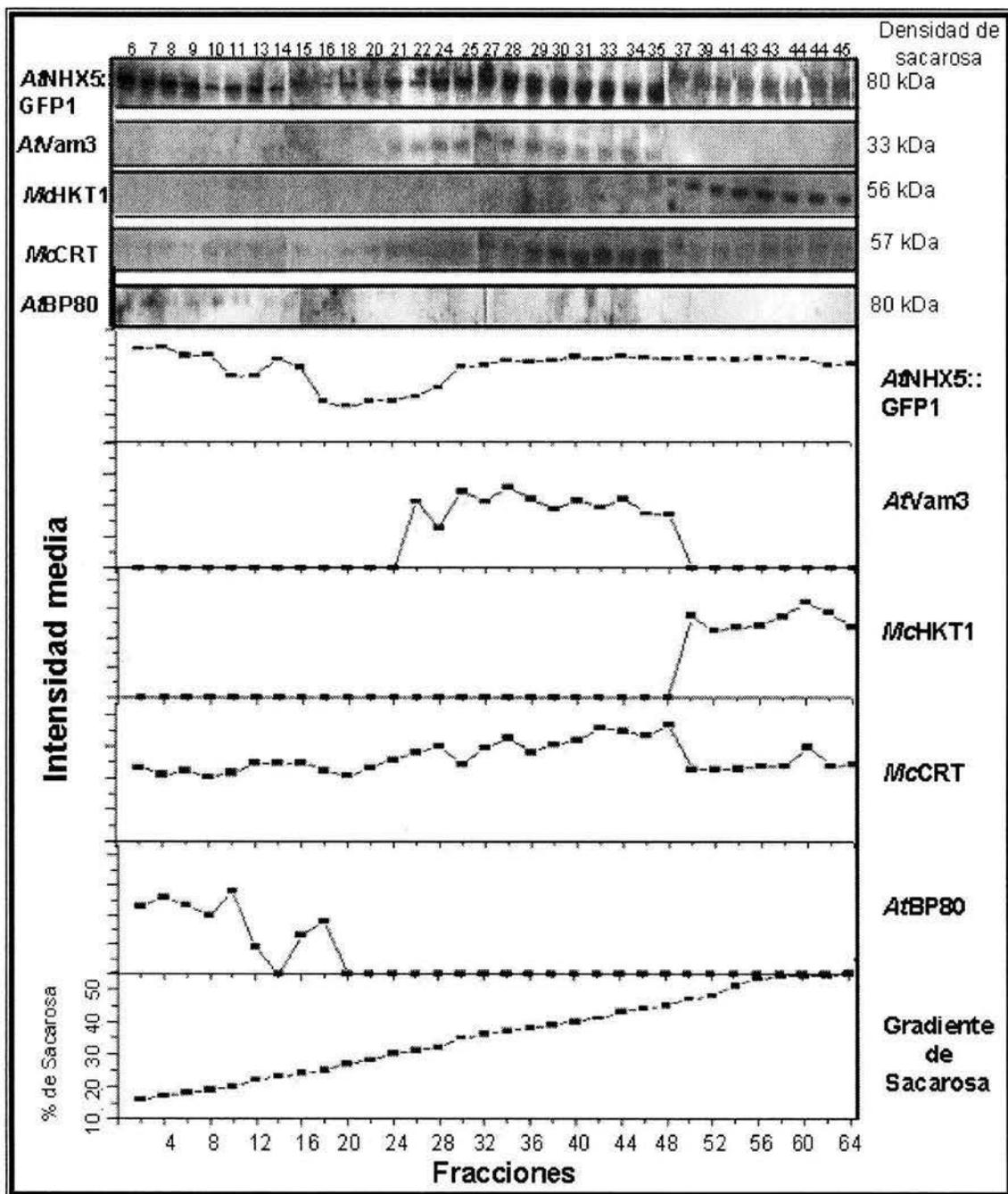


Figura 9.2. Expresión de *AtNHX5* en la línea *AtNHX5::GFP1* y su colocalización con marcadores proteicos de las distintas endomembranas de *A. thaliana*. Análisis de western-blot de las fracciones microsomales obtenidas de plantas completas crecidas en cultivos hidropónicos. Detección inmunológica de: (arriba hacia abajo), *AtNHX5::GFP1* (80 kD), tonoplasto: *AtVam3* (33kD), membrana plasmática: *MchKT1* (56 kD), retículo endoplásmico: *McCRT* calreticulina (57 kD) y aparato de golgi, vesículas de clatrina: *AtBP80* (80 kD). Intensidad media de cada uno de los marcadores proteicos utilizados en la detección inmunológica. Las membranas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

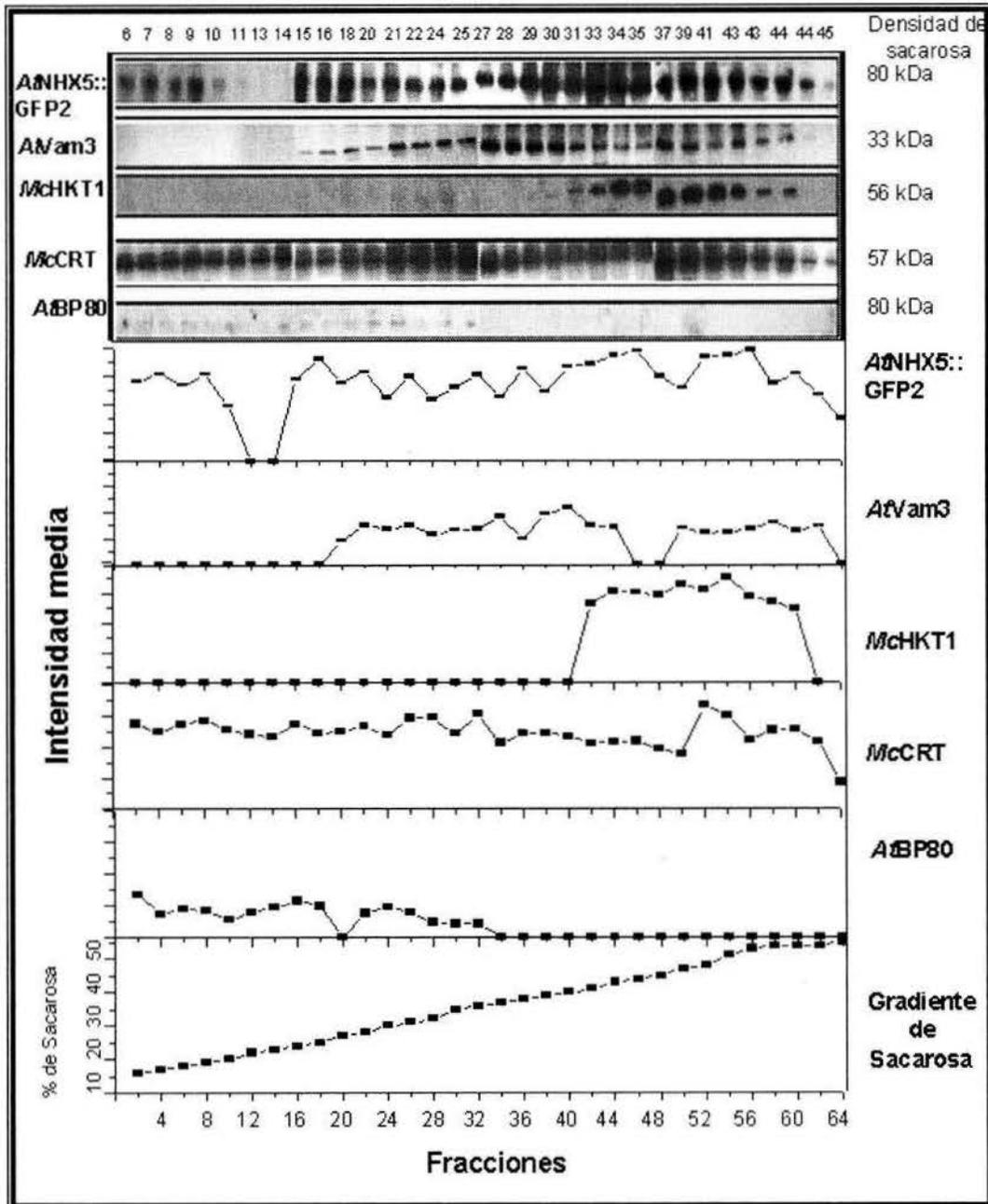


Figura 9.2.1 Expresión de *AtNHX5* en la línea *AtNHX5::GFP2* y colocalización con marcadores proteicos de las distintas endomembranas de *A. thaliana*. Análisis de western-blot de las fracciones microsomales obtenidas de plantas completas crecidas en cultivos hidropónicos. Detección inmunológica de: (arriba hacia abajo), *AtNHX5::GFP2* (80 kD), tonoplasto: *AtVam3* (33kD), membrana plasmática: *McHKT1* (56 kD), retículo endoplásmico: *McCRT* calreticulina (57 kD) y aparato de golgi, vesículas de clatrina: *AtBP80* (80 kD). Intensidad media de cada uno de los marcadores proteicos utilizados en la detección inmunológica. Las membranas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

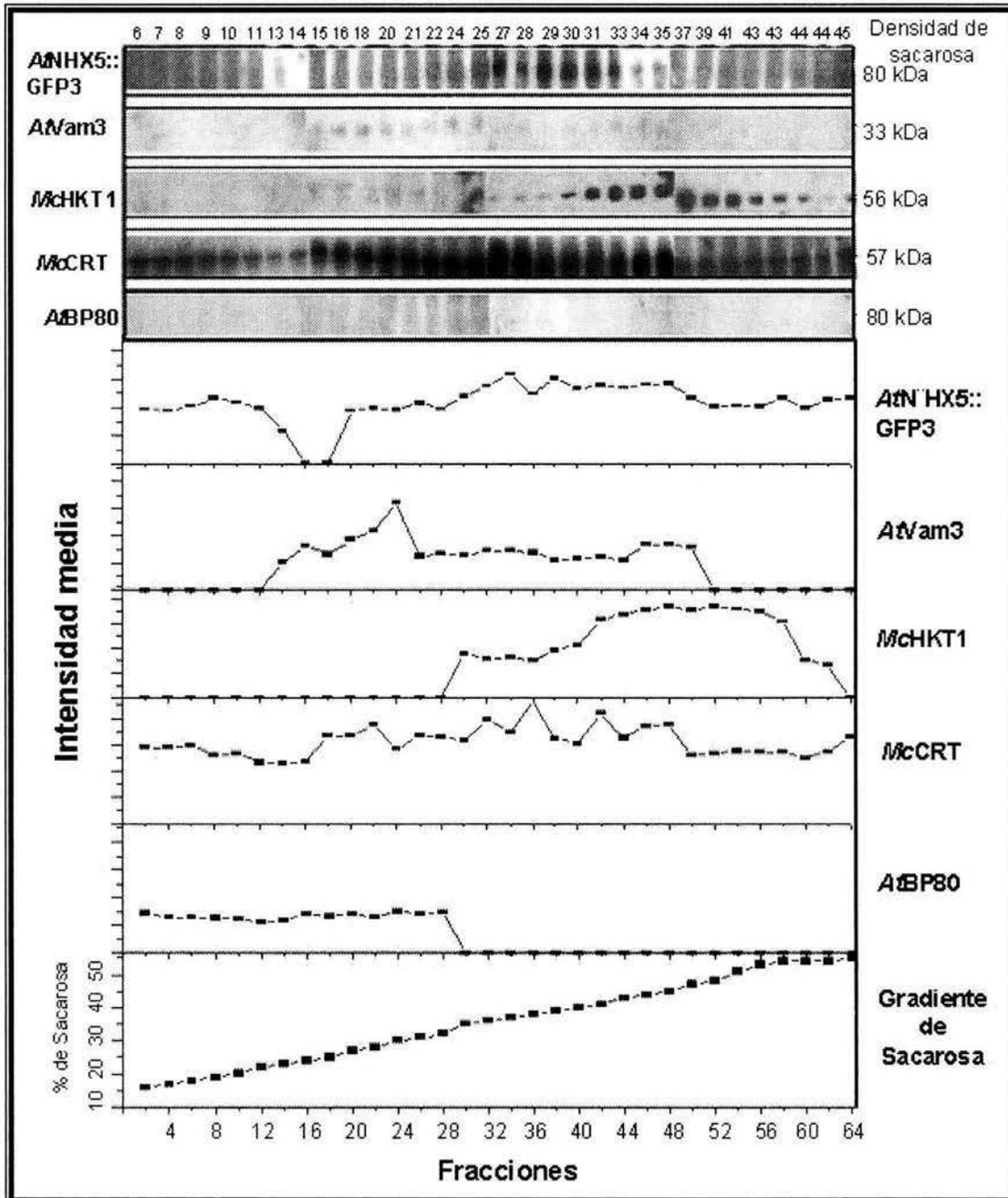


Figura 9.2.1.1 Expresión de *AtNHX5* en la línea *AtNHX5::GFP3* y colocación con marcadores proteicos de las distintas endomembranas de *A. thaliana*. Análisis de western-blot de las fracciones microsomales obtenidas de plantas completas crecidas en cultivos hidropónicos. Detección inmunológica de: (arriba hacia abajo), *AtNHX5::GFP* (80 kD), tonoplasto: *AtVam3* (33kD), membrana plasmática: *McHKT1* (56 kD), retículo endoplásmico: *McCRT* calreticulina (57 kD) y aparato de golgi, vesículas de clatrina: *AtBP80* (80 kD). Intensidad media de cada uno de los marcadores proteicos utilizados en la detección inmunológica. Las membranas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

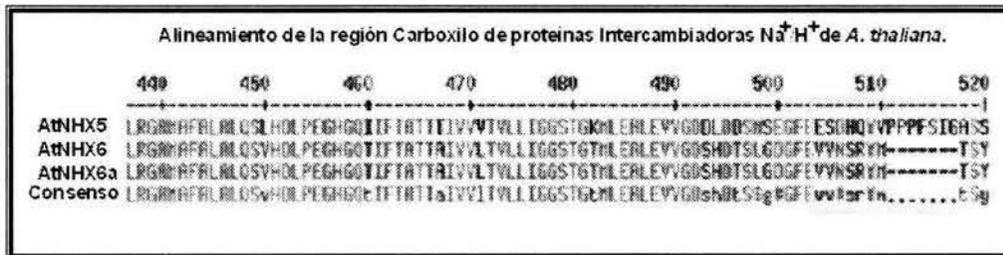


Figura 9.3 Secuencia de aminoácidos de la región carboxilo de AtNHX5, AtNHX6 y AtNHX6A. Se determinó la región menos conservada entre estas secuencias y que abarca del aminoácido 504 al 518.

Con el anticuerpo anti-NHX5, de manera interesante, se detectaron dos bandas de proteínas, una con un peso de 50 kDa y otra de aproximadamente 45 kDa. La banda de 50 kDa de AtNHX5 mostró un patrón de expresión ligeramente diferente al detectado en las líneas transgénicas (figura 9.3.1). Se observó una ausencia de expresión de AtNHX5 en las primeras fracciones del gradiente de sacarosa y comenzó a observarse a partir de la sexta fracción analizada con 11% (p/v) de sacarosa extendiéndose hasta el final del gradiente. La expresión de la banda de 45 kDa y que denominamos AtNHX5-45 sólo se observó en 8 fracciones con una concentración de 11% (p/v) a 21% (p/v) de sacarosa.

La localización de la expresión de los marcadores para tonoplasto y membrana plasmática mostró diferencias con la de las líneas transgénicas. El tonoplasto abarcó de la fracción 14 (13 % (p/v) de sacarosa) hasta la fracción 52 (39 % (p/v) de sacarosa), y la membrana plasmática conservó su distribución en las últimas fracciones del gradiente de sacarosa entre 34 % (p/v) y 45 % (p/v), similar al patrón observado en AtNHX5::GFP1. El retículo endoplásmico y aparato de golgi mantuvieron su patrón de expresión entre las líneas transgénicas y el tipo silvestre analizados.

Para observar la expresión endógena de AtNHX5 en las líneas transgénicas se utilizó el anticuerpo anti-NHX5. De manera sorprendente, no fue posible obtener ninguna señal a 50 kDa (peso esperado para AtNHX5), además tampoco fue posible observar la construcción AtNHX5::GFP en la región de los 80 kDa (peso esperado para la fusión de AtNHX5 y GFP), el anticuerpo no fue capaz de reconocer la construcción (figura 9.3.2). Debido a lo anterior, no fue posible comparar los niveles de expresión del transgen y la proteína nativa.

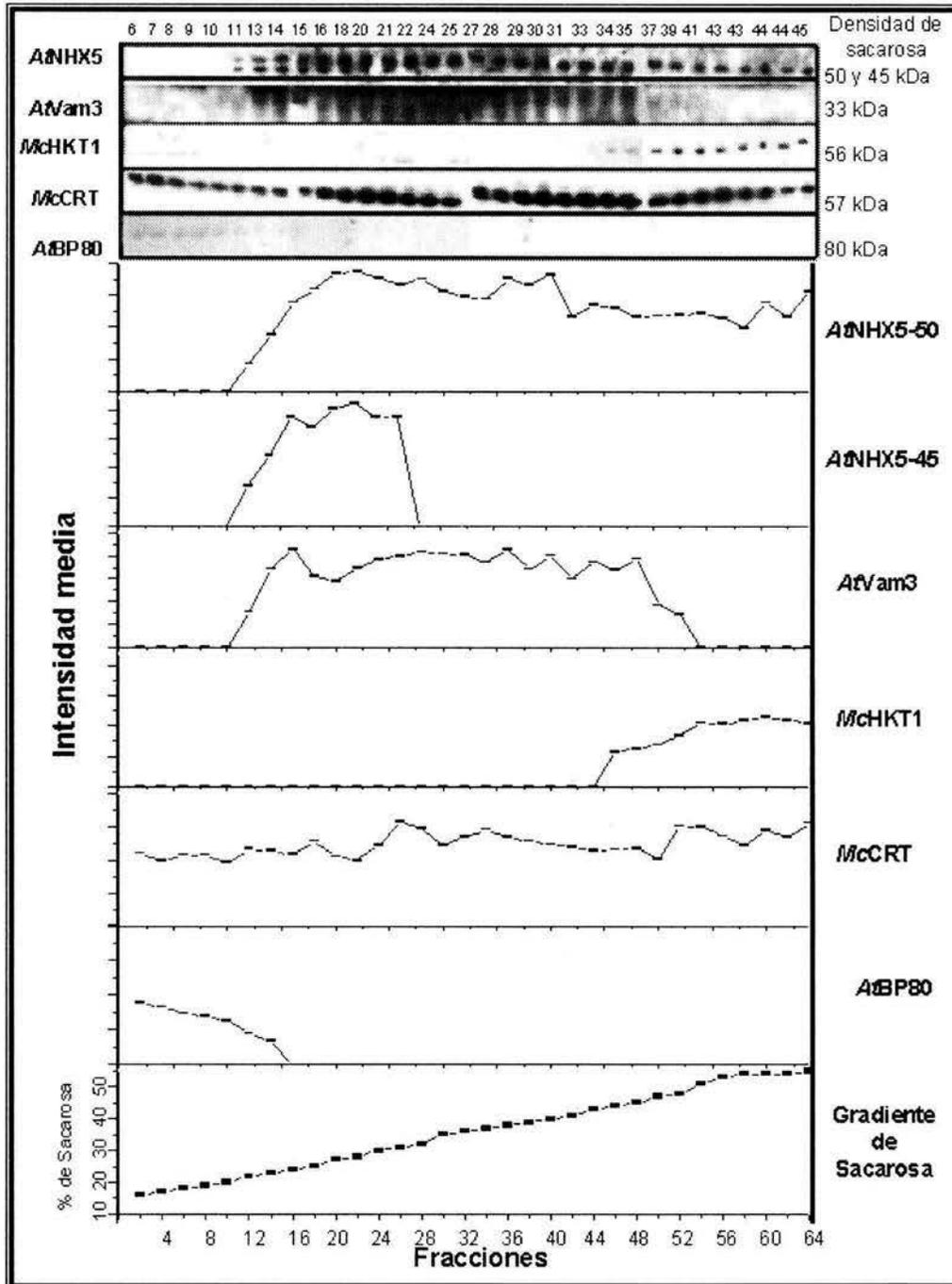


Figura 9.3.1 Expresión de AtNHX5 en *A. thaliana* ecotipo Columbia y colocación con marcadores proteicos de las distintas endomembranas. Análisis de western-blot de las fracciones microsomales de plantas completas crecidas en cultivos hidropónicos. Detección inmunológica de: (arriba hacia abajo), AtNHX5::GFP (80 kD), tonoplasto: AtVam3 (33kD), membrana plasmática: McHKT1 (56 kD), retículo endoplásmico: McCRT calreticulina (57 kD) y aparato de golgi, vesículas de clatrina: AtBP80 (80 kD). Intensidad media de cada uno de los marcadores proteicos utilizados en la detección inmunológica. Las membranas son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

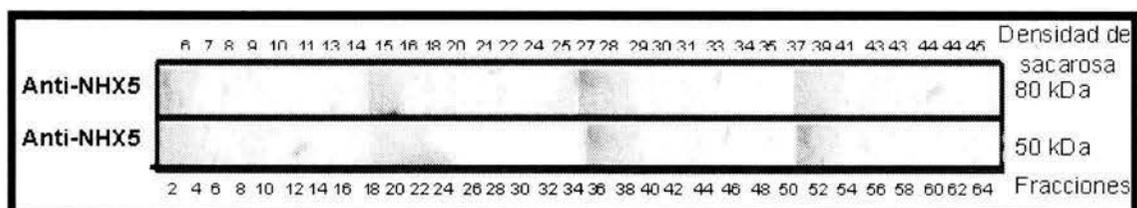


Figura 9.3.2 Inmunodetección en la línea *AtNHX5::GFP3* utilizando el anticuerpo específico *Anti-AtNHX5*. Las membranas son representativas de tres experimentos independientes y de *AtNHX5::GFP1* y *AtNHX5::GFP2*.

9.3 Análisis de la expresión de GFP en cultivo de células en suspensión de la línea transgénica *AtNHX5::GFP3* utilizando Microscopio confocal

9.4.1. Detección de la señal de GFP en cultivo de células en suspensión.

Utilizando cultivo de células en suspensión de *A. thaliana* obtenido a partir de callos provenientes de la parte aérea de plantas *AtNHX5::GFP3*, se les eliminó la autofluorescencia mediante un tratamiento con Tritón-X100 y se registró la señal de GFP con un microscopio confocal (figura 9.4.1). Las células en suspensión fueron observadas con un objetivo de 40x y las imágenes obtenidas son cortes realizados donde la señal de GFP fue observada en pequeños compartimentos (marcados con una flecha delgada) o vesículas dispersas en el citoplasma con un tamaño aproximado de 4 μm . En las células puede verse claramente la vacuola central la cual está señalada con una flecha gruesa y el espacio citosólico donde son abundantes las vesículas que contienen la señal de *AtNHX5::GFP*. Cabe resaltar que las células control no mostraron autofluorescencia, por lo que la señal registrada correspondió a la señal emitida por la presencia de la proteína GFP. Además, los fenotipos tanto de las células de *AtNHX5::GFP3* y el tipo silvestre fueron similares. De este modo, la sobreexpresión de la proteína no afectó la apariencia de las células de ninguna manera.

9.4.2 Análisis confocal de la colocalización de *AtNHX5* con los marcadores de endomembranas *AtBP80* y *AtPEP12*.

Como se mencionó en secciones anteriores, la sobreexpresión de *AtNHX5* la colocalizó con *AtBP80*, además de que se modificó la densidad de las membranas y parece que el patrón de expresión detectado para la construcción *AtNHX5::GFP* no corresponde con la distribución nativa de *AtNHX5*, decidimos realizar la inmunolocalización en las células en suspensión utilizando los marcadores *AtBP80* y *AtPEP 12*, Aparato de Golgi, vesículas de clatrina y compartimentos prevacuolares,

respectivamente. Estos marcadores fueron acoplados a anticuerpos secundarios fluorescentes, Alexa Fluor-568 y se utilizaron de manera independiente colocalizando su señal con la señal de GFP en la construcción *AtNHX5::GFP3* como se describió en los materiales y métodos (figura 9.4.2).

Las imágenes obtenidas, revelaron que no hay colocalización con *AtBP80* al menos en la mayor parte de las vesículas registradas con la señal de GFP. Se pudieron observar pequeños puntos en color amarillo, signo de colocalización, y que posiblemente revelan la presencia de *AtNHX5* y *AtBP80* juntos en estas vesículas; sin embargo la mayoría de la fluorescencia de GFP es distinta de la fluorescencia con *AtBP80*. Por otro lado, con *AtPEP12* (marcador de compartimentos prevacuolares), las vesículas no mostraron zonas en color amarillo, por lo que se descartó que *AtNHX5* estuviera presente en compartimentos prevacuolares.

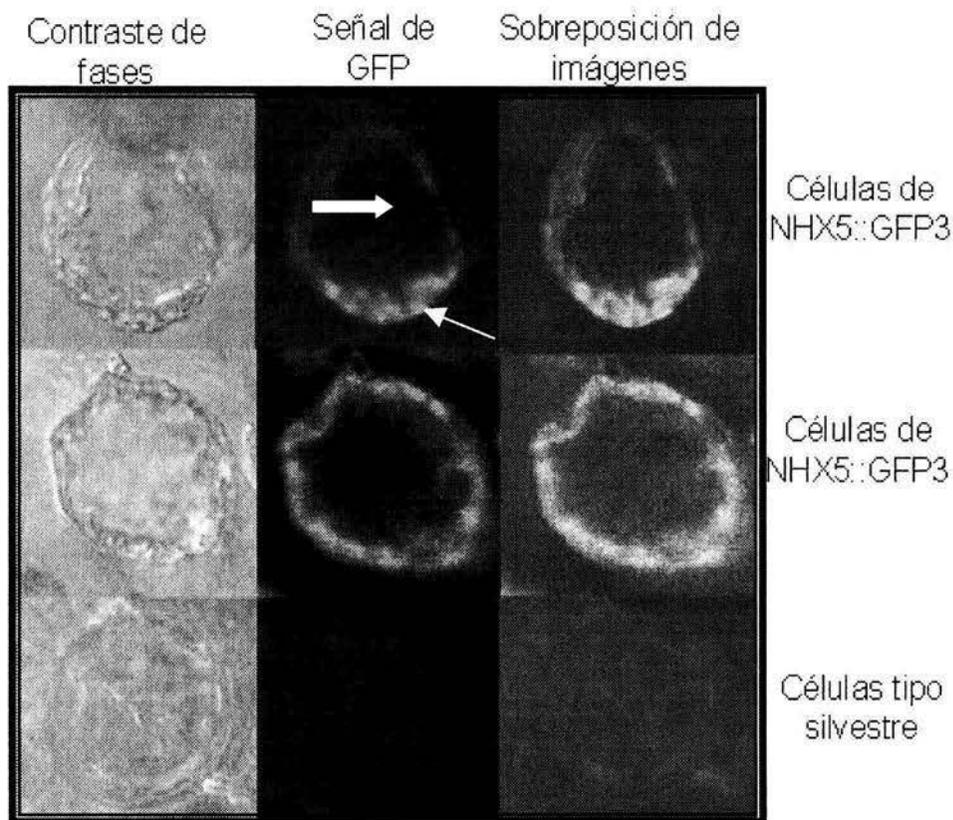


Figura 9.4.1 Análisis de fluorescencia de células en suspensión de la línea transgénica *AtNHX5::GFP3* utilizando microscopio confocal. Las imágenes obtenidas son cortes observados con el objetivo de 40x. En la superposición de imágenes, la imagen de contraste de fases se muestra en rojo y la señal emitida por GFP se ve en color verde. Las células tipo silvestre no muestran autofluorescencia. Las imágenes son representativas de al menos cuatro experimentos independientes. La flecha gruesa señala la vacuola central y la flecha delgada, las vesículas que contienen a *AtNHX5::GFP*

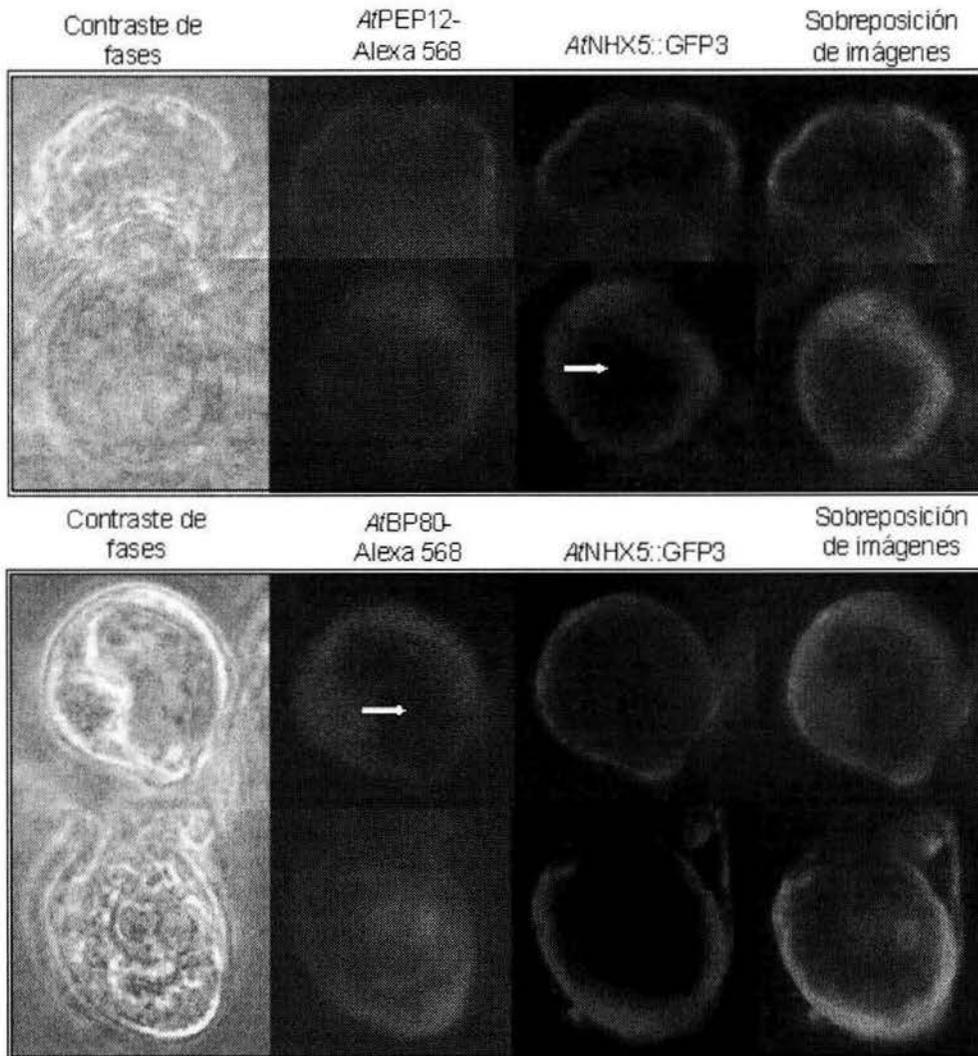


Figura 9.4.2 Análisis de doble marcaje con microscopio confocal en cultivo de células en suspensión de la línea *AtNHX5::GFP3*. Las células fueron crecidas durante 5 días después de su traspaso a medio fresco de cultivo y fueron marcadas con los anticuerpos primarios para *AtBP80* y *AtPEP12* los cuales fueron acoplados a un anticuerpo secundario fluorescente Alexa 568. En las imágenes de sobreposición, la señal de anti-*AtPEP12* y anti-*AtBP80* es mostrada en verde, la señal de GFP en rojo y la colocación de ambas señales en amarillo. Las imágenes son representativas de al menos 4 experimentos independientes. La flecha señala la vacuola central.

9.5 Caracterización de la V-ATPasa y el intercambio Na⁺/H⁺ en vesículas endomembranales provenientes de la interfase 0/12% de sacarosa aisladas de hojas y raíces de tipo silvestre y las líneas transgénicas AtNHX5::GFP1 y AtNHX5::GFP2 de *A. thaliana*.

A partir de los resultados obtenidos en las inmunodetecciones de AtNHX5::GFP que indicaron que era posible aislar endomembranas las cuales contuvieran la proteína AtNHX5 en fracciones de baja densidad y que además, mostraron no tener contaminación con membranas de compartimentos mayores, incluidos tonoplasto y membrana plasmática, donde se ha demostrado que existe actividad intercambiadora Na⁺/H⁺: AtNHX1 y AtSOS1, respectivamente, nos dió la oportunidad de medir la actividad intercambiadora atribuida a AtNHX5 y nos permitió comenzar a caracterizar la selectividad y la cinética del transporte de esta proteína. Se aislaron vesículas a partir de un gradiente discontinuo de sacarosa. Las concentraciones de sacarosa se establecieron con base a lo observado en las inmunodetecciones (figuras 9.2, 9.2.1 y 9.2.1.1), 12 % (p/v) de sacarosa fue la concentración límite en la cual se observó el primer pico de expresión para AtNHX5 en las líneas transgénicas. La interfase entre 12 % (p/v) y 22 % (p/v) de sacarosa permite el aislamiento de vesículas enriquecidas con endomembranas de tonoplasto.

Para medir la activación de la V-ATPasa o el intercambio Na⁺/H⁺ en vesículas selladas, se utilizó el cambio en la fluorescencia dado por el colorante quinacrina, el cual responde a cambios de pH ya que su protonación y desprotonación se monitorea como la tasa de disipación o formación de un gradiente de pH transmembranal partiendo de un medio ácido en el interior de la vesícula. Las tasas iniciales de la disminución de la fluorescencia (actividad de la V-ATPasa) o su recuperación (transporte de H⁺ dependiente de Na⁺) fueron medidas a lo largo de un intervalo de 30 a 100 seg, respectivamente. Las tasas iniciales fueron calculadas usando la fórmula:

Fórmula 1.

$$\left\{ \frac{[F_1 - F_2]}{[T_1 - T_2]} \right\} \times \frac{60}{1 \text{ min}} \times \frac{1000}{30 \text{ mg}} = \%F \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}$$

Donde F_1 and T_1 son la intensidad relativa inicial de fluorescencia y el tiempo inmediatamente después de la adición del ATP o del Na^+ , y F_2 and T_2 son la intensidad relativa de fluorescencia y tiempo después de 30 o 100 seg (para la V-ATPasa y el transporte H^+ dependiente de Na^+ , respectivamente).

Al analizar la actividad de la V-ATPasa en vesículas aisladas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa de membranas microsomales de tejido proveniente de la parte aérea, se observó que el genotipo silvestre tuvo una actividad 3 veces más alta en la V-ATPasa comparado con las líneas transgénicas *AtNHX5::GFP1* y *AtNHX5::GFP2* (figura 9.5.1.A, B y C y 9.5.2). Cuando las plantas fueron tratadas con 100 mM de NaCl por 24 h, la actividad de la V-ATPasa en el tipo silvestre se redujo dos veces, de 338 % F mg^{-1} proteína min^{-1} a 168 % F mg^{-1} proteína min^{-1} (figura 9.6.2). En contraste, en las líneas transgénicas no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento salino (figura 9.5.2).

En vesículas de endomembranas de hojas aisladas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa, la actividad intercambiadora Na^+/H^+ fue más elevada en el genotipo silvestre (11 % F mg^{-1} proteína min^{-1}) comparada con las dos líneas transgénicas (17 y 68 % F mg^{-1} proteína min^{-1} para *AtNHX5::GFP1* y *AtNHX5::GFP2*, respectivamente; figuras 9.5.1 A, B y C y 9.5.2.B), similar a lo que se observó con la actividad de la V-ATPasa (figura 9.5.2.A). La actividad intercambiadora Na^+/H^+ para el genotipo silvestre fue menor cuando las plantas fueron sometidas a un estrés salino previo (100 mM NaCl por 24 h; figura 9.5.2.B). Contrario a ello, en las líneas transgénicas no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento con NaCl (figura 9.5.2.B).

La línea transgénica *AtNHX5::GFP2* mostró mayor actividad del intercambiador Na^+/H^+ cuando se comparó con la actividad en la línea transgénica *AtNHX5::GFP1* (68 y 17 % F mg^{-1} proteína min^{-1} , respectivamente; figura 9.5.2.B). Esto pudiendo ser reflejo de una expresión superior del gen y de una mayor cantidad de proteína en esta línea (figura 9.5.2) más no de una actividad más alta de la proteína intercambiadora.

Reportes recientes han sugerido que el homólogo de *AtNHX5*, *LeNHX2* de tomate es más selectivo a K^+ que a Na^+ y exhibe una mayor tasa de intercambio K^+/H^+ que Na^+/H^+ . *LeNHX2* tiene una identidad de 50.2 % con *AtNHX5* en la secuencia de aminoácidos (Venema et al., 2003). Para estudiar la posibilidad de que el intercambio Na^+/H^+ medido en estas vesículas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa del tipo silvestre de *A. thaliana* proveniente de tejidos de hojas pudieran mediar el intercambio K^+/H^+ , medimos la habilidad de recuperar la fluorescencia a través de la estimulación

con K^+ . La figura 9.5.3 muestra el trazo original del transporte de K^+ dependiente de H^+ en la presencia de 100 mM KCl. La tasa inicial de recuperación de la fluorescencia de la quinacrina fue más alta en la presencia de NaCl que con KCl (figuras 9.5.1.A y 9.5.3, respectivamente).

Para determinar la distribución a nivel de tejido de la actividad intercambiadora Na^+ , K^+/H^+ en endomembranas de la interfase 0/12% (p/v) de sacarosa de plantas tipo silvestre, medimos la actividad en vesículas aisladas de tejido de la raíz.

La actividad de la V-ATPasa fue 2.3 veces más baja en la raíz comparada con los valores obtenidos en las hojas (145 y 338 % $F\ mg^{-1}\ prote\acute{a}na\ min^{-1}$, respectivamente; figura 9.5.2.A). Al analizar la recuperación de la fluorescencia por el movimiento de Na^+ dependiente de H^+ (100 mM de NaCl), no se registró ninguna recuperación (figura 9.5.4.A).

Para determinar si el intercambiador Na^+/H^+ presente en tejido de raíz muestra selectividad para K^+ , como fue observado en el tejido de hojas, probamos la habilidad del K^+ (100 mM de KCl) para dirigir el flujo de protones en estas vesículas aisladas. No se detectó un flujo de protones dependientes de K^+ lo cual indicaría una actividad intercambiadora K^+/H^+ (figura 9.5.4.B). Sin embargo, se observó que la presencia del K^+ causó una disminución adicional de la fluorescencia, lo cual se puede interpretar como una estimulación de la actividad de la V-ATPasa por este catión.

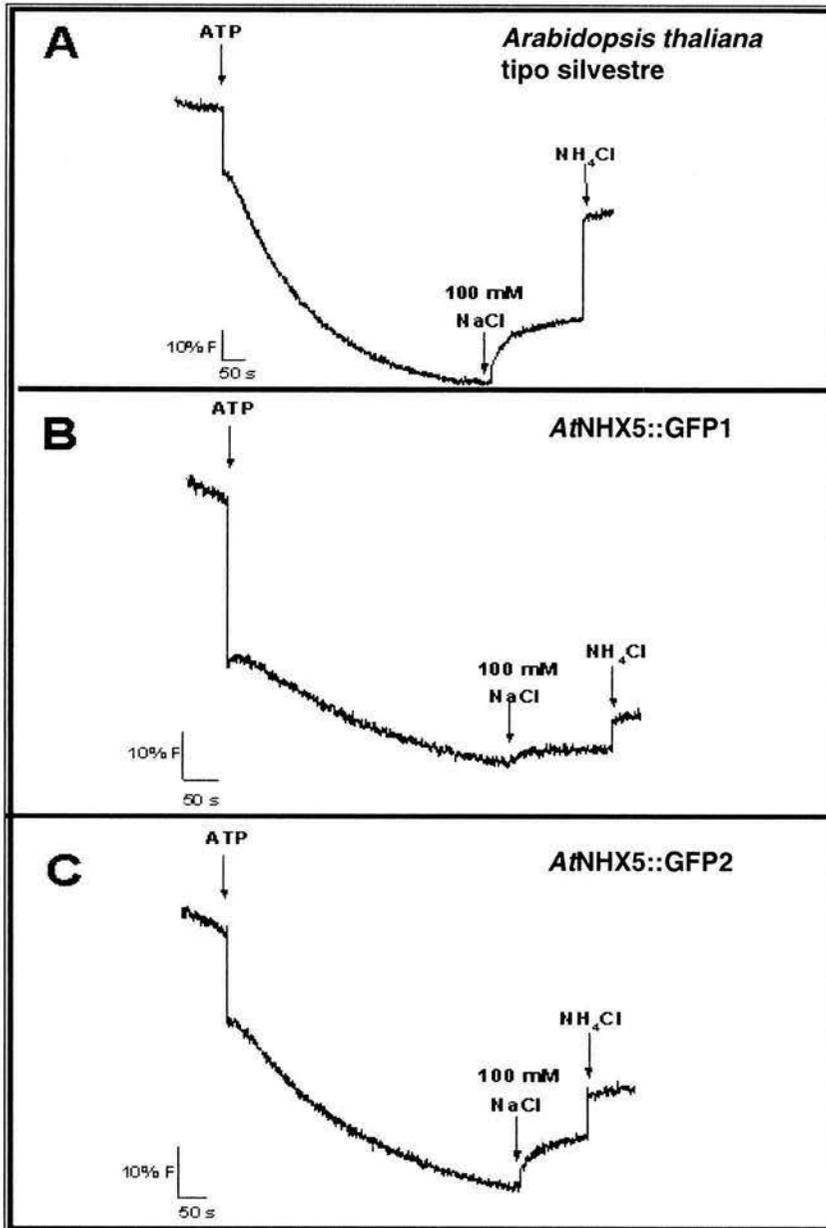


Figura 9.5.1 Caracterización del transporte de H^+ de la V-ATPasa y el intercambio Na^+/H^+ en vesículas endomembranales aisladas de la fracción 0/12% de sacarosa de hojas de plantas de *A. thaliana*.

Vesículas selladas de tipo silvestre (A), y las líneas transgénicas AtNHX5::GFP1 (B) y AtNHX5::GFP2 (C) de *A. thaliana* colectadas en la interfase 0/12% (p/v) de sacarosa. La V-ATPasa fue activada por la adición de 3 mM de ATP observándose un decremento en la fluorescencia. Después de alcanzar un nivel estable, se añadieron 100 mM de NaCl y el flujo de Na^+ dependiente de H^+ fue medido como la recuperación en la fluorescencia de la quinacrina. Se añadieron 2.5 mM de NH_4Cl para colapsar el gradiente de pH como un control de la medición. La gráfica es un registro original representativo de al menos 3 experimentos independientes. F, intensidad de la fluorescencia.

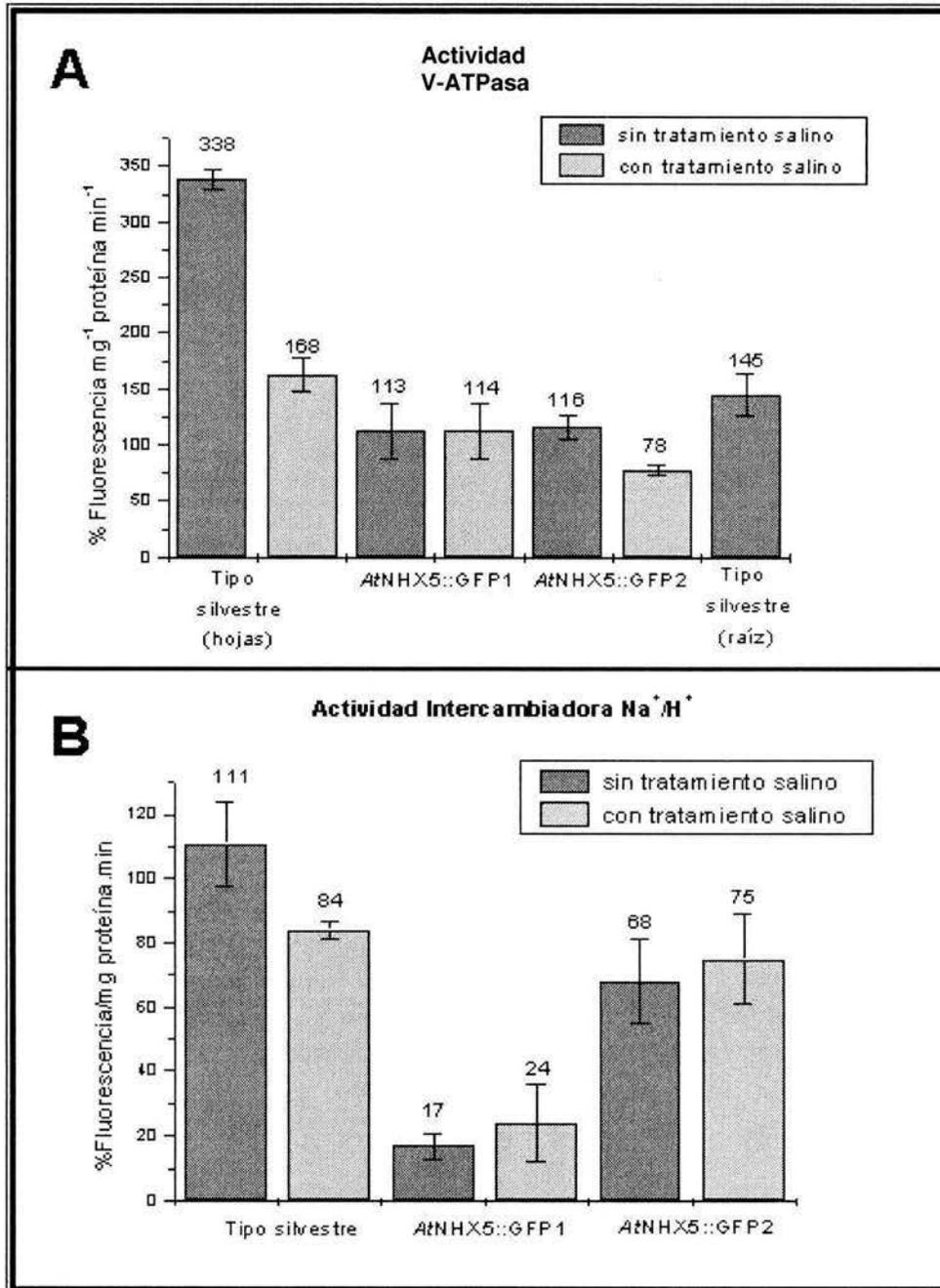


Figura 9.5.2 Tasas iniciales de la actividad de transporte de protones de la V-ATPasa **(A)** y el intercambiador Na⁺/H⁺ **(B)** en vesículas endomembranales selladas pertenecientes a la fracción 0/12% de sacarosa, aisladas de tejido de hoja y raíz (tipo silvestre).

Las plantas silvestres de *A. thaliana* y las transgénicas AtNHX5::GFP1 y AtNHX5::GFP2 fueron cosechadas en condiciones sin o con tratamiento salino (100 mM de NaCl por 24 h). Las tasas iniciales fueron calculadas después de los primeros 30 s de la adición del ATP y 100 s para el movimiento de Na⁺ dependiente de H⁺.

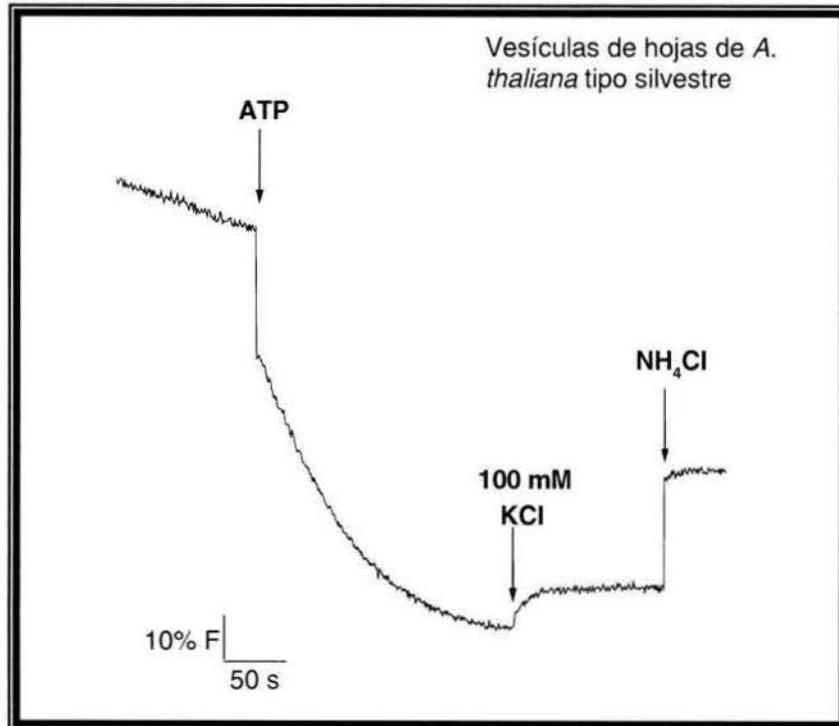


Figura 9.5.3 Caracterización del transporte de H^+ de la V-ATPasa y el intercambio de H^+ dependiente de K^+ en vesículas endomembranales de tejido de hojas de tipo silvestre de *A. thaliana* colectadas de la interfase 0/12% (p/v) de sacarosa

La V-ATPasa fue activada por la adición de 3 mM de ATP observándose un decremento en la fluorescencia. Después de alcanzar un nivel estable, se añadieron 100 mM de KCl y el flujo de K^+ dependiente de H^+ fue medido como la recuperación en la fluorescencia de la quinacrina. Se añadieron 2.5 mM de NH_4Cl para colapsar el gradiente de pH como un control de la medición. La gráfica es un registro original representativo de al menos 3 experimentos independientes. F, intensidad de la fluorescencia.

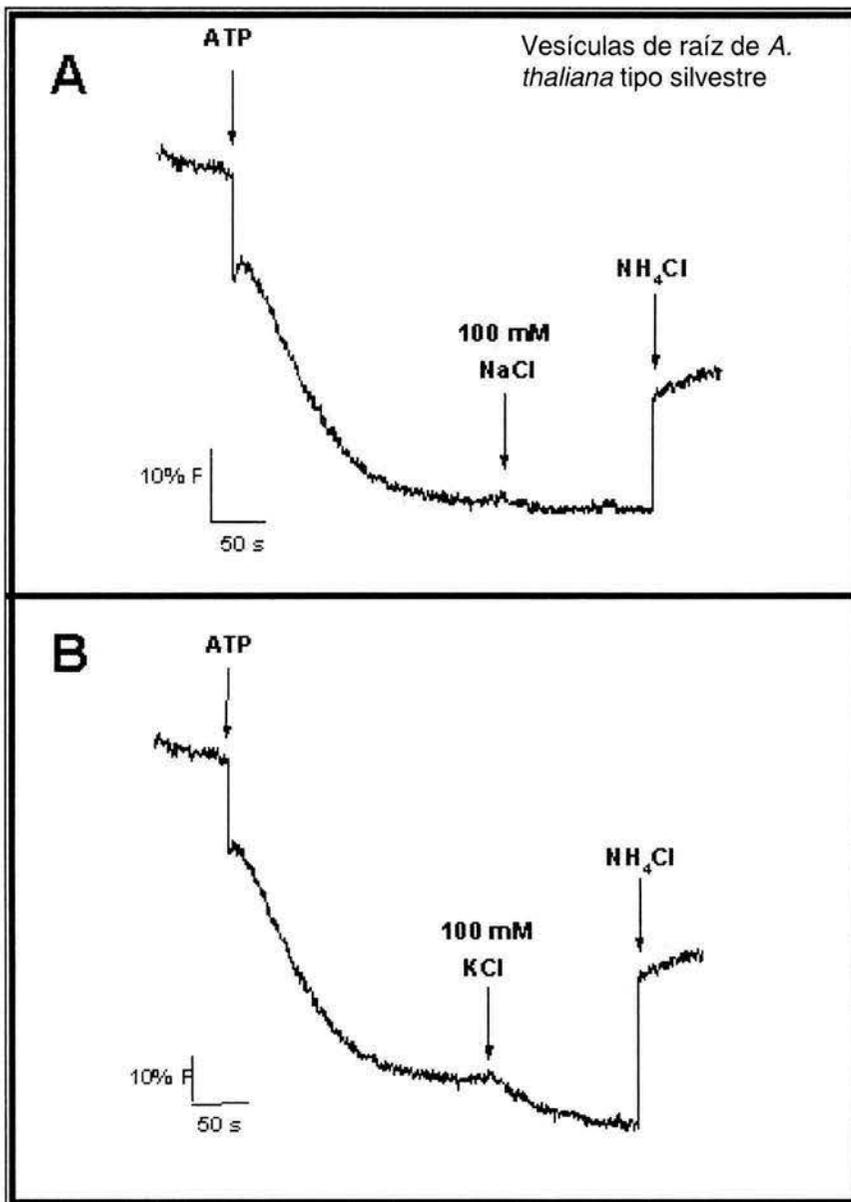


Figura 9.5.4 Caracterización del transporte de H^+ de la V-ATPasa y el intercambio Na^+/H^+ y K^+/H^+ en vesículas endomembranales de la raíz colectada de la interfase 0/12% (p/v) de sacarosa de *A. thaliana* tipo silvestre. La V-ATPasa fue activada por la adición de 3 mM de ATP y se observó un decremento en la fluorescencia de la quinacrina. Después de alcanzar un nivel estable se añadieron 100 mM de NaCl (**A**) y/o 100 mM de KCl (**B**), el flujo de Na^+/K^+ dependiente de H^+ fue medido como la recuperación en la fluorescencia de la quinacrina. Se añadieron 2.5 mM de NH_4Cl para colapsar el gradiente de pH como un control de la medición. Las gráficas son registros originales representativas de al menos 3 experimentos independientes. F, intensidad de la fluorescencia.

9.5.1.1 Análisis cinético del flujo de Na⁺ y K⁺ dependiente de H⁺ en vesículas de endomembranas aisladas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa de tejido de hoja de la línea transgénica AtNHX5::GFP1 de *A. thaliana*.

Para determinar si fue más alta la afinidad de transporte para Na⁺ que con K⁺ de la actividad intercambiadora cation/H⁺ medida en las vesículas de hojas aisladas de la interfase 0/12 % (p/v), fue necesario calcular la cinética de la reacción del intercambio para determinar los valores de K_m. Las tasas iniciales de intercambio cation/H⁺ fueron medidas con un incremento en la concentración del catión (10 mM hasta 200 mM de NaCl o KCl). Los análisis cinéticos fueron calculados aplicando la ecuación de Michaelis-Menten (fórmula 2). Las gráficas de los datos en las figuras 9.5.1.1.A y 9.5.1.1.B fueron realizadas usando el programa Origin V.5 (Microcal, USA).

Fórmula 2: Ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{[S]}{K_m + [S]} \times V_{max}$$

Donde:

v= velocidad inicial, [S]= concentración del sustrato, K_m= concentración del sustrato a la que se alcanza la velocidad media y V_{max}= velocidad máxima de la reacción.

De estos análisis se calculó la K_m para Na⁺ que fue igual a 61.5 ± 20.7 mM en vesículas endomembranales de la fracción 0/12 % (p/v) de sacarosa en la línea transgénica AtNHX5::GFP1 (figura 9.5.5 A). Cuando se usó K⁺ como sustrato, la K_m calculada para este catión fue de 16.15 ± 1.6 mM (figura 9.5.5 B).

9.6 Caracterización de la actividad intercambiadora Na⁺/H⁺ en vesículas endomembranales aisladas de la fracción 12/22 % (p/v) de sacarosa en plantas tipo silvestre de *A. thaliana* y plantas transformadas AtNHX5::GFP1 y AtNHX5::GFP2.

La actividad intercambiadora Na⁺/H⁺ atribuida a la expresión de AtNHX1 ha sido reportada en tonoplasto de *A. thaliana* (Apse et al., 1999). AtNHX1 muestra una homología del 20 % con AtNHX5 y ha sido el miembro de la familia NHX más estudiado

hasta la fecha (Yokoi et al., 2002). La actividad intercambiadora Na^+/H^+ en vesículas endomembranales de la interfase 12/22 % (p/v) de sacarosa puede ser atribuida al tonoplasto (figuras 9.6.1 y 9.6.3.A y B), lo cual nos permitió comparar la actividad intercambiadora medida en las vesículas aisladas de la fracción 0/12 % (p/v) y podríamos determinar las diferencias en cuanto a la función entre estas dos fracciones.

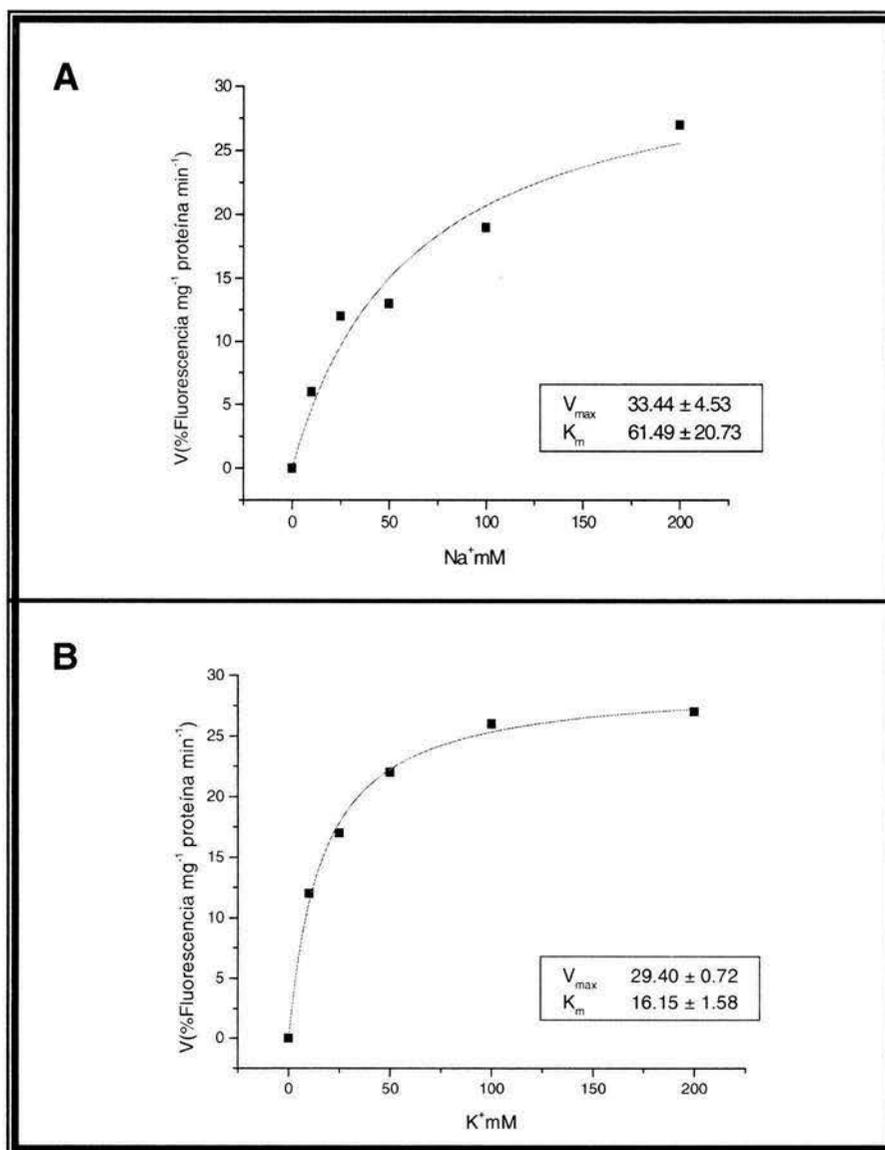


Figura 9.5.5 Análisis cinético del Intercambio cation/ H^+ en vesículas endomembranales de la interfase 0/12% (p/v) de sacarosa en la línea transgénica *AtNHX5::GFP1* de tejido de hoja. Intercambio Na^+/H^+ (A) y K^+/H^+ (B) fueron medidos en la presencia de un incremento en las concentraciones de NaCl y KCl (10 a 200 mM). El análisis se llevó a cabo usando el programa Origin V.5 (Microcal, USA) ajustándolos al modelo Michaelis-Menten.

La actividad de transporte de protones de la V-ATPasa en el tonoplasto de plantas tipo silvestre fue alta comparada con las líneas transgénicas; 111 % F mg⁻¹ proteína min⁻¹, comparada con 31 y 78 % F mg⁻¹ proteína min⁻¹ en las líneas transgénicas *A β NHX5::GFP1* y *A β NHX5::GFP2*, respectivamente (figura 9.6.2). Esto fue similar a lo observado para la actividad de la V-ATPasa medida en vesículas de la fracción 0/12 % (p/v) de sacarosa. De manera interesante, la actividad de la bomba se incrementó aproximadamente 4 veces en el tipo silvestre 473 % F mg⁻¹ proteína min⁻¹, cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino (100 mM de NaCl por 24 h), contrario a lo observado en la fracción 0/12 %, donde la actividad de la V-ATPasa fue reducida por el tratamiento salino. Esto indica una diferencia entre la regulación de la V-ATPasa en el tonoplasto y en las vesículas aisladas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa, sugiriendo, además un origen distinto en estos dos tipos de vesículas. La actividad de la V-ATPasa en las líneas transgénicas no mostraron cambios significativos como resultado del tratamiento con NaCl (figura 9.6.2).

Por lo que respecta a la actividad intercambiadora Na⁺/H⁺ caracterizada en la fracción 12/22 % (p/v) de sacarosa para las plantas silvestres y las líneas transgénicas fueron similares, en contraste a lo observado en la actividad medida en las vesículas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa. El crecimiento de las plantas en 100 mM de NaCl, previo al aislamiento de las membranas no tuvo efectos significativos sobre dicha actividad (figura 9.6.3 y 9.6.4).

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que las proteínas intercambiadoras tipo NHX pueden mover Na⁺ y K⁺ acoplado al movimiento de protones (Venema et al., 2002). Algunas evidencias sugieren que *A β NHX1* (presente en tonoplasto) también podría transportar K⁺ (Gaxiola et al., 1999). Por ello, también se monitoreo el intercambio utilizando K⁺ en vesículas aisladas de la interfase 12/22 % (p/v) de sacarosa tanto en plantas tipo silvestre (figura 9.6.5) como en la línea transgénica *A β NHX5::GFP1* (figura 9.6.6).

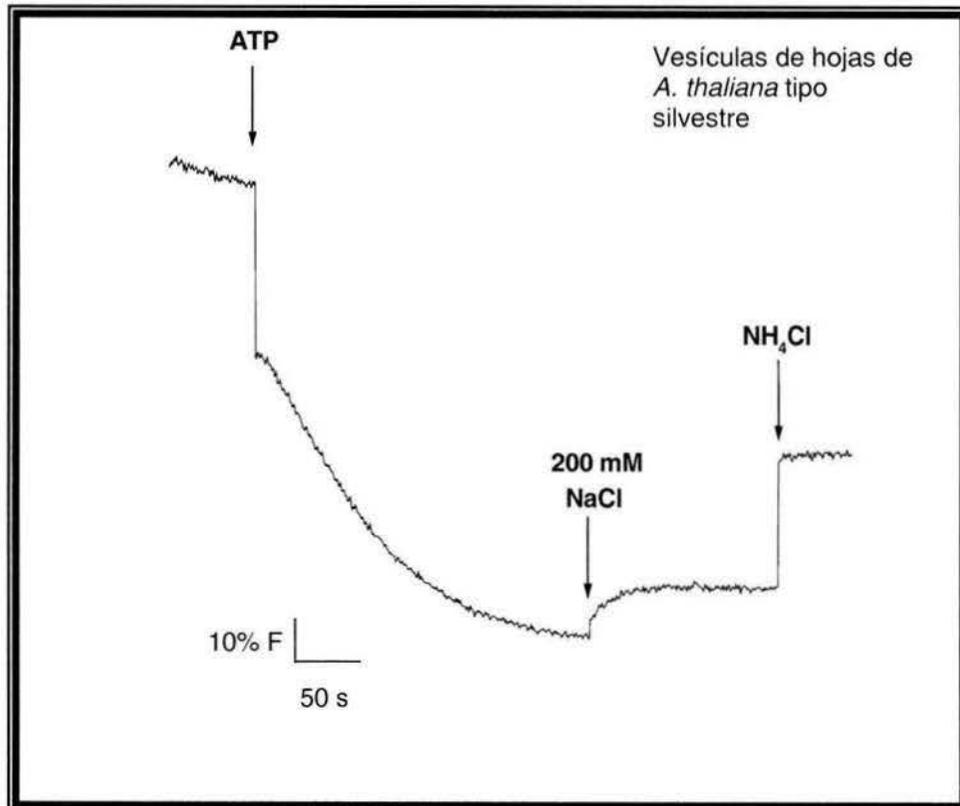


Figura 9.6.1 Caracterización del transporte de H^+ de la V-ATPasa y el intercambio Na^+/H^+ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 12/22% (p/v) de sacarosa.

La V-ATPasa fue activada por la adición de 3 mM de ATP y se observó un decremento de la fluorescencia de la quinacrina. Después de alcanzar un nivel estable se añadieron 200 mM de NaCl el flujo de Na^+ dependiente de H^+ fue medido como la recuperación en la fluorescencia de la quinacrina. Se añadieron 2.5 mM de NH_4Cl para colapsar el gradiente de pH como un control de la medición. Las gráficas son registros originales representativas de al menos 3 experimentos independientes. F, intensidad de la fluorescencia.

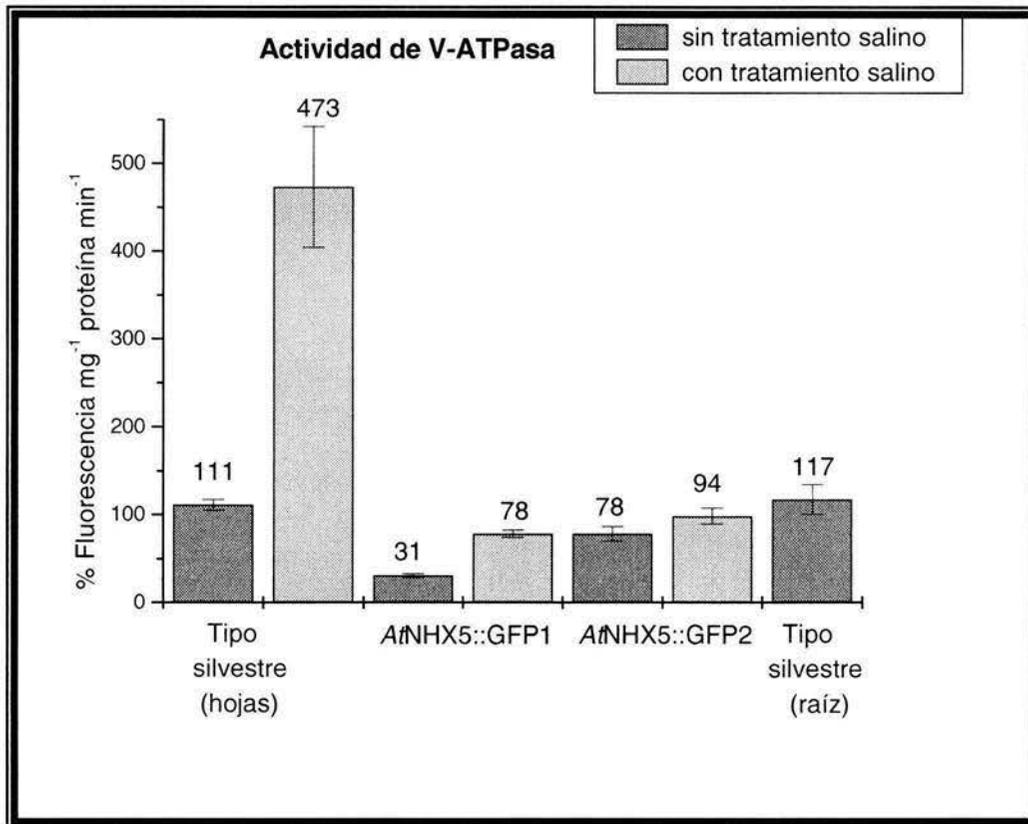


Figura 9.6.2. Tasas iniciales de la actividad de transporte de protones de la V-ATPasa en vesículas endomembranales pertenecientes a la interfase 12/22% (p/v) de sacarosa aisladas de tejido de hojas y raíz (tipo silvestre).

Las plantas silvestres de *A. thaliana* y las transgénicas AñNHX5::GFP1 y AñNHX5::GFP2 fueron cosechadas en condiciones sin y con tratamiento salino (100 mM NaCl por 24 h). Las tasas iniciales fueron calculadas en los primeros 30 s después de la adición de ATP.

Lo que se observó es que existe movimiento de iones K^+ a través de la membrana de las vesículas probadas y que los niveles de intercambio K^+/H^+ en plantas tipo silvestre fueron similares a los de AñNHX5::GFP1 cuando se estimuló con 100 mM de KCl (16 % y 17 % F mg^{-1} proteína min^{-1} , respectivamente; figura 9.6.6). Sin embargo, la tasa inicial es mucho más baja que la observada en la presencia de 100 mM de NaCl (figuras 9.6.4 y 9.6.6). Esto en contraste con lo observado en las vesículas de la interfase 0/12 % (p/v) de sacarosa donde la actividad de intercambio fue mayor para iones Na^+ que para iones K^+ .

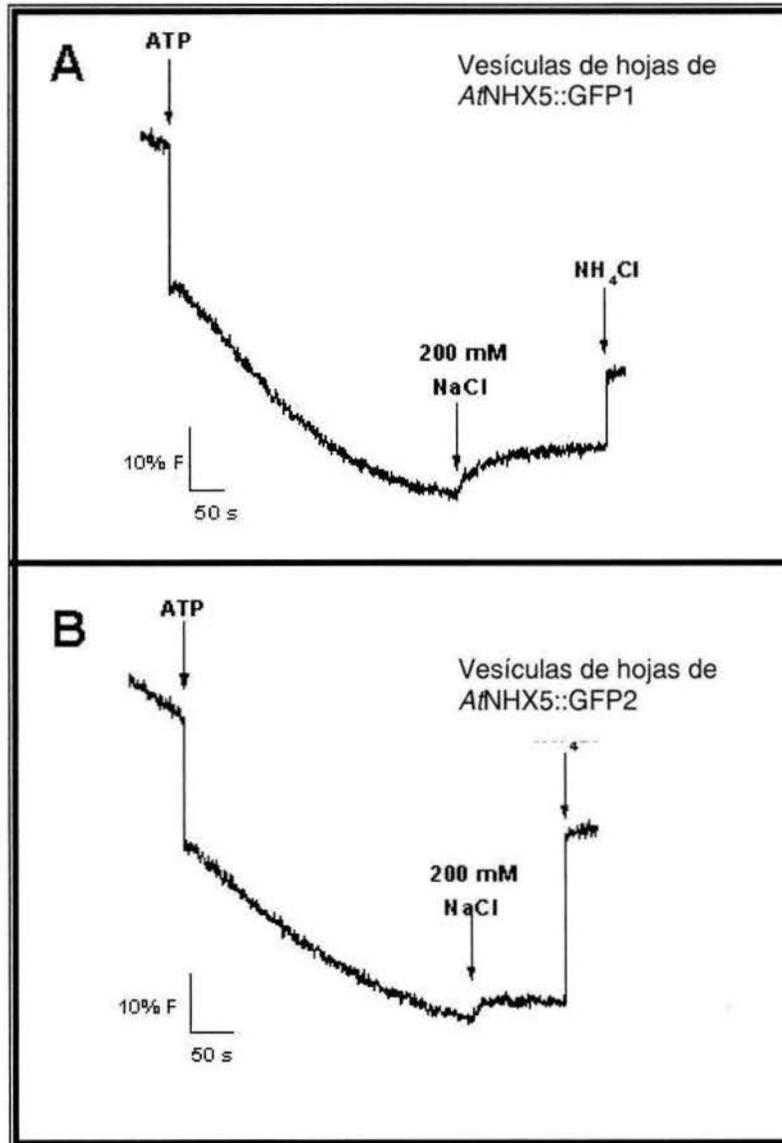


Figura 9.6.3 Caracterización del transporte de H^+ de la V-ATPasa y el intercambio Na^+/H^+ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 12/22% (p/v) de sacarosa. Líneas transgénicas *AtNHX5::GFP1* (A) y *AtNHX5::GFP2* (B) de *A. thaliana*. La V-ATPasa fue activada por la adición de 3 mM de ATP y se observó un decremento de la fluorescencia de la quinacrina. Después de alcanzar un nivel estable se añadieron 200 mM de NaCl, el flujo de Na^+ dependiente de H^+ fue medido como la recuperación en la fluorescencia de la quinacrina. Se añadieron 2.5 mM de NH_4Cl para colapsar el gradiente de pH como un control de la medición. Las gráficas son registros originales representativas de al menos 3 experimentos independientes. F, intensidad de la fluorescencia.

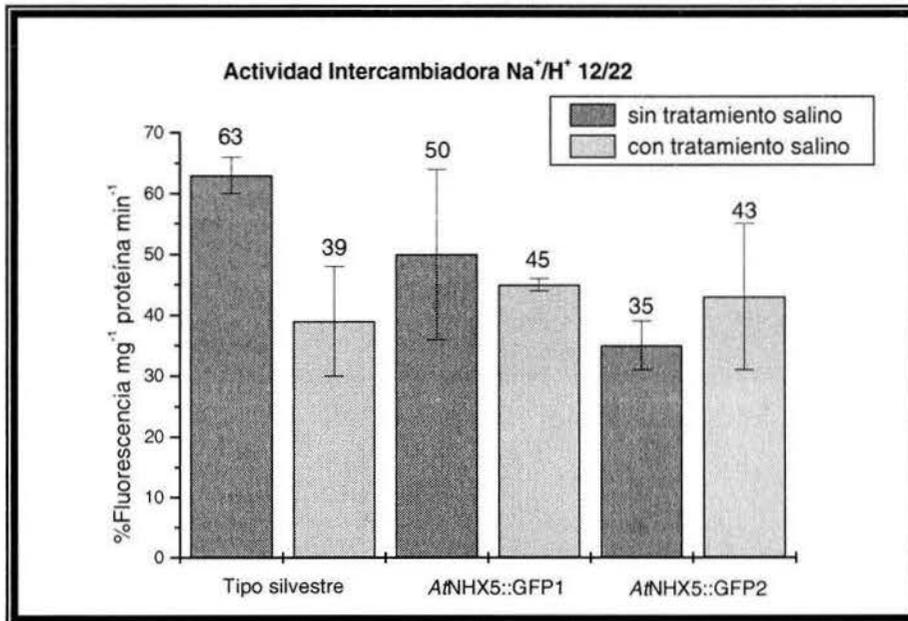


Figura 9.6.4 Tasas iniciales del transporte de Na⁺ dependiente de H⁺ en vesículas pertenecientes a la fracción 12/22% (p/v) de sacarosa aisladas de tejido de hoja.

Las plantas silvestres de *A. thaliana* y las transgénicas AtNHX5::GFP1 y AtNHX5::GFP2 fueron cosechadas en condiciones sin y con tratamiento salino (100 mM de NaCl por 24 h) previo a la cosecha del tejido. Las tasas iniciales fueron calculadas a los 100 s después de la adición de Na⁺. Los valores son promedio de tres experimentos independientes \pm S.E.

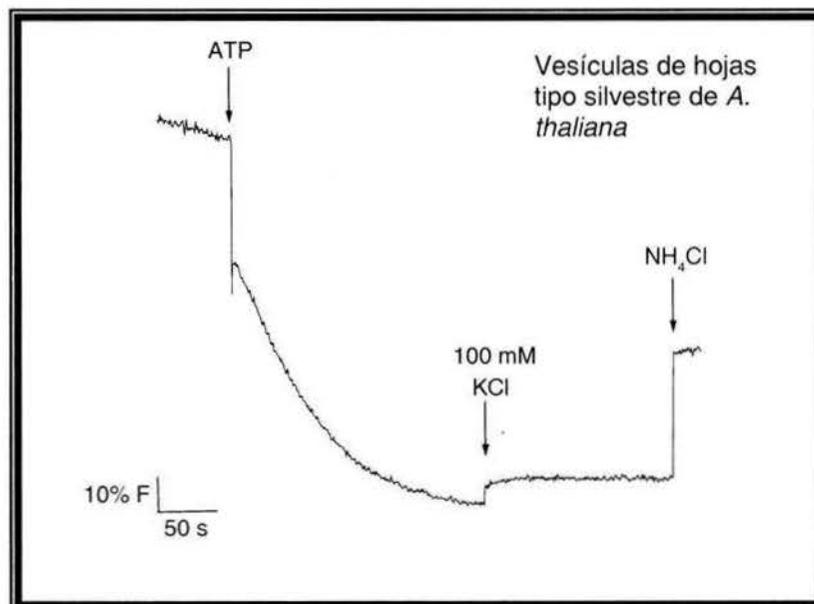


Figura 9.6.5 Caracterización del transporte de H⁺ de la V-ATPasa y el intercambio K⁺/H⁺ en vesículas endomembranales de tejido de hojas colectadas de la interfase 12/22% (p/v) de sacarosa.

La V-ATPasa fue activada por la adición de 3 mM de ATP y se observó un decremento de la fluorescencia de la quinacrina.

Después de alcanzar un nivel estable se añadió 100 mM de KCl, el flujo de K^+ dependiente de H^+ fue medido como la recuperación en la fluorescencia de la quinacrina. Se añadieron 2.5 mM de NH_4Cl para colapsar el gradiente de pH como un control de la medición. Las gráficas son registros originales representativas de al menos 3 experimentos independientes. F, intensidad de la fluorescencia.

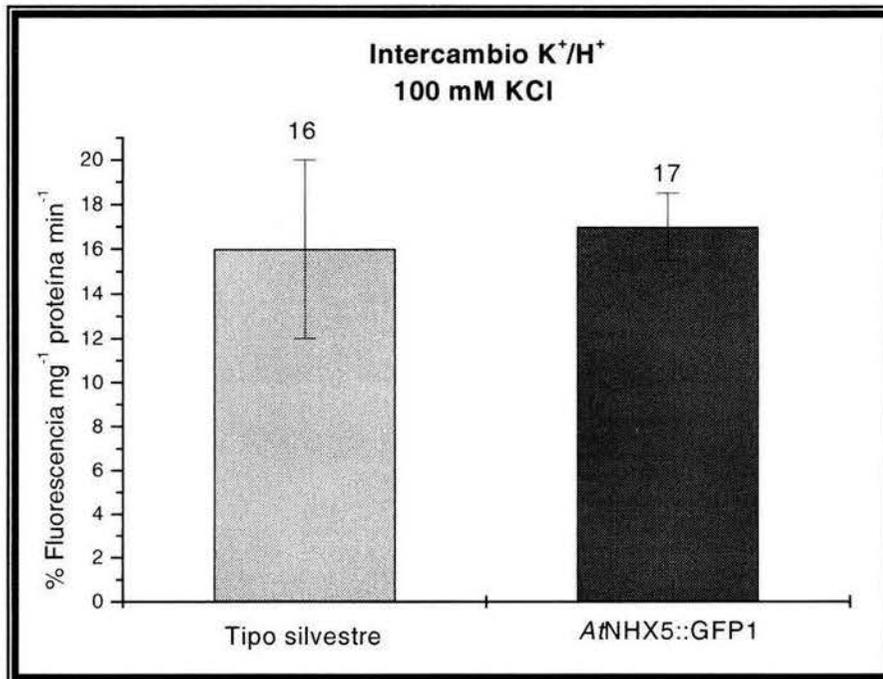


Figura 9.6.6 Tasas iniciales del transporte de K^+ dependiente de H^+ en vesículas pertenecientes a la fracción 12/22% (p/v) de sacarosa aisladas de tejido de hoja.

Las plantas silvestres de *A. thaliana* y la línea transgénica AtNHX5::GFP1 fueron cosechadas en condiciones sin tratamiento salino. Las tasas iniciales fueron calculadas a los 100 s después de la adición de K^+ . Los valores son significativos \pm S.E. de tres experimentos independientes.

Para determinar la distribución a nivel de tejido de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ en endomembranas colectadas en la interfase 12/22 % (p/v) de sacarosa de plantas tipo silvestre, medimos la actividad en vesículas aisladas de tejido de la raíz.

La actividad de la V-ATPasa en la raíz fue muy similar a lo que se midió en tejido proveniente de la hoja (117 y 111 % F mg⁻¹ proteína min⁻¹, respectivamente, figura 9.6.2) Esto en contraste con la actividad medida en las vesículas colectadas de la fracción 0/12 % donde la actividad en las raíces fue mucho más baja que en los tejidos de las hojas (figura 9.5.2). Por lo respecta a la actividad intercambiadora catión/ H^+ , lo que se observó fue un comportamiento similar al obtenido en la fracción 0/12 % de

sacarosa, donde el Na⁺ no estimuló la recuperación de la fluorescencia y, el K⁺ generó una disminución en la fluorescencia producto del posible estímulo de la actividad de la V-ATPasa.

9.7 Expresión de AtNHX5 en plantas de *A. thaliana* sujetas a diferentes tipos de estrés.

9.7.1 Expresión de AtNHX5 en condiciones de estrés salino ocasionado por NaCl.

Como se ha reportado a nivel de transcrito *AtNHX5* responde de manera específica al estrés salino (Yokoi et al., 2002). Para confirmar estas observaciones, sometimos a plantas de *A. thaliana* tipo silvestre de cinco semanas de edad a estrés salino en cultivos hidropónicos con 0.5x de solución de Hoagland's y 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM y 150 mM de NaCl por un periodo de 24 h. Posteriormente, mediante RT-PCR analizamos la expresión de *AtNHX5* (figura 9.7.1). Los niveles de expresión de *AtNHX5* bajo las diferentes concentraciones de NaCl variaron. El nivel de expresión fue analizado mediante densidad óptica con el programa Image-Pro Plus (Silver Spring, MD 20910, USA). *AtNHX5* aumenta su expresión en un orden de 2 veces, con respecto al control, a partir de 25 mM de NaCl, 2.3 veces a 50 mM, 1.3 veces a 75 mM de NaCl. Posteriormente, estos niveles disminuyeron considerablemente por debajo del control 0.3 veces a 100 mM y 2.3 veces a 150 mM. Fenotípicamente, las plantas mostraron pérdida de turgencia en la parte aérea a partir de los 100 mM y 150 mM de NaCl. Debido a que las plantas comenzaron a mostrar signos de muerte celular en las concentraciones de 100 mM y 150 mM de NaCl se descartó que la disminución de los niveles de expresión de *AtNHX5* fuera consecuencia de este proceso, mediante el análisis de la expresión del gen constitutivo *APT1*: adenosina fosforibosiltransferasa de 478 pares de bases. Sus niveles de expresión se mantuvieron estables aún durante el tratamiento con 100 mM y 150 mM de NaCl.

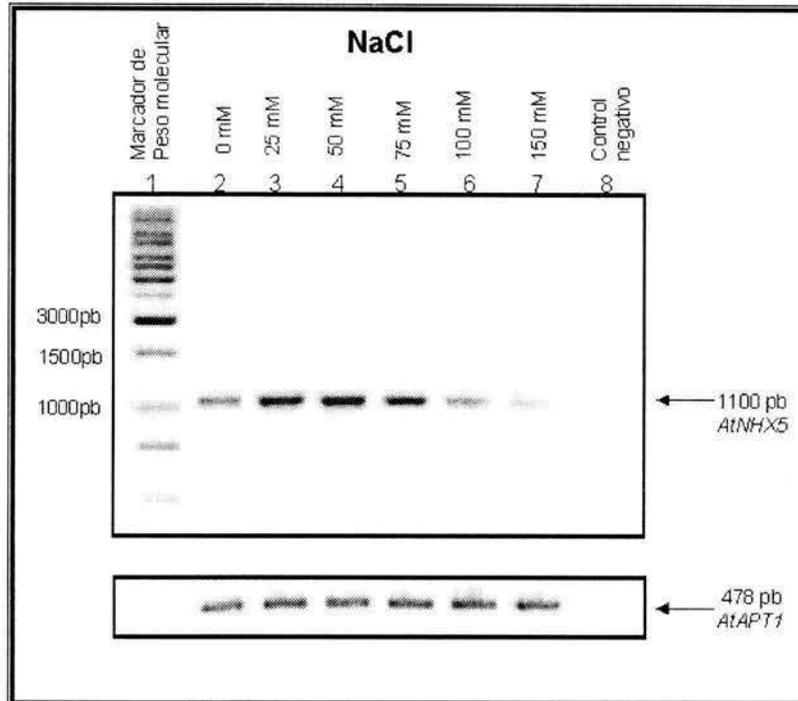


Figura 9.7.1 Inducción de la expresión de *AtNHX5* por estrés salino (*NaCl*).

Mediante análisis de RT-PCR se obtuvo la acumulación de *AtNHX5* bajo diferentes concentraciones de *NaCl*. Se observó *AtNHX5* como un fragmento de 1100 pb. Se utilizó como control de amplificación el gen de la adenosina fosforibosiltransferasa (*APT1*) con un peso de 478 pb. Carril 1, marcador de peso molecular. El aumento observado en el transcrito corresponde a: 2x a 25 mM, 2.3x a 50 mM, 1.3x a 75 mM, y un decremento de 0.3x a 100 mM y 2.3x a 150 mM de *NaCl*

9.7.2 Expresión de *AtNHX5* en condiciones de estrés ocasionado por Potasio.

Debido a que se postuló que a nivel de secuencia de aminoácidos *AtNHX5* es altamente homólogo a *LeNHX2* (más del 50 %), (Venema et al., 2003) y debido a que este transportador en tomate fue caracterizado como un intercambiador K^+/H^+ , decidimos observar la expresión de *AtNHX5* en estrés ocasionado por un exceso de K^+ en el medio. Al igual que el estrés por *NaCl*, las plantas de *A. thaliana* tipo silvestre de cinco semanas de edad fueron sometidas a estrés por K^+ durante 24 h de exposición en cultivos hidropónicos con 0.5x de solución de Hoagland's sin K^+ (figura 9.7.2). En la solución del cultivo hidropónico se añadió KNO_3 para obtener las concentraciones en un gradiente que fue de 5 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM a 150 mM. Lo que se observó es que, de la misma manera que en el estrés por *NaCl*, *AtNHX5* aumentó su expresión cuando las concentraciones de K^+ se elevaron. Cuando las plantas se

expusieron a 5 mM de KNO_3 el nivel de transcrito aumentó hasta 8 veces en comparación con el control y 14 veces a 25 mM de KNO_3 . A partir de esta concentración comenzó una disminución pero el nivel de expresión se mantuvo por arriba del control. A 50 mM aumentó 10 veces, 9 veces a 75 mM, 5 veces a 100 mM, y 4 veces a 150 mM de KNO_3 . Así, la apariencia de las plantas después de las 24 h de tratamiento con KNO_3 fue similar a la observada con NaCl, pérdida de turgencia a partir de los 100 mM de KNO_3 . *APT1* fue utilizado como control de carga descartando con ello la amplificación inespecífica de los genes debido a la muerte celular ocasionada por las condiciones de estrés. A diferencia de lo observado con NaCl, la expresión de *AtNHX5* se mantuvo considerablemente elevada en la condición con mayor concentración de KNO_3 . Con estos resultados fue posible decir que, al menos, a nivel de transcrito, *AtNHX5* responde a condiciones de estrés ocasionado tanto por NaCl como por KNO_3 .

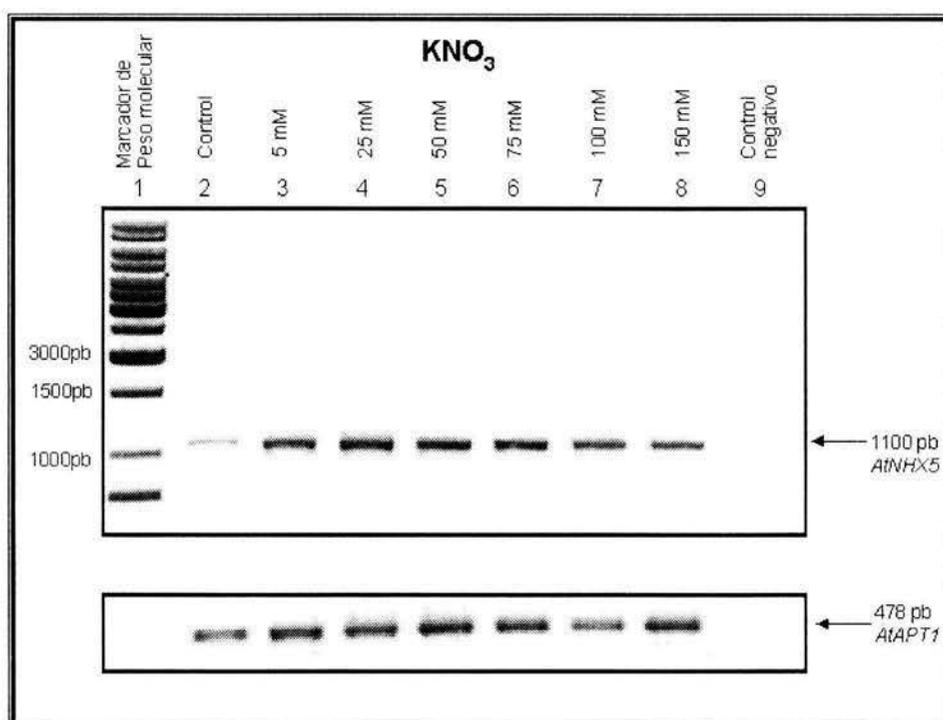


Figura 9.7.2 Inducción de la expresión de *AtNHX5* por estrés con K^+ . Mediante análisis de RT-PCR se obtuvo la acumulación de *AtNHX5* bajo diferentes concentraciones de KNO_3 . Se analizó la acumulación de *AtNHX5* obteniéndose un fragmento de 1100 pb. Se utilizó como control de carga la adenosina fosforibosiltransferasa (*APT1*) con un peso de 478 pb. Carril 1, marcador de peso molecular. Los aumentos en el nivel de transcrito corresponden a: 8x a 5 mM, 14x a 25 mM, 10x a 50 mM, 9x a 75 mM, 5x a 100 mM y 4x a 150 mM de KNO_3 .

10. DISCUSIÓN

En diferentes estudios se ha propuesto que la actividad intercambiadora Na^+/H^+ es uno de los mecanismos que participan en el proceso de destoxificación celular cuando las concentraciones de Na^+ se elevan en el citoplasma ($> 10 \text{ mM}$ de NaCl ; Blumwald, et al., 2000). La actividad intercambiadora ha sido localizada en membrana plasmática donde promueve la salida de Na^+ hacia el espacio extracelular (Qiu et al., 2003) y, en tonoplasto participa en el secuestro de este catión hacia el interior vacuolar (Gaxiola et al., 1999 y Apse et al., 1999). Ambos mecanismos reducen el efecto tóxico del Na^+ en el citoplasma.

Las proteínas encargadas de este proceso se han agrupado en una familia conocida como Intercambiadores Na^+/H^+ : NHX (**N** a^+/H^+ **e**xchangers). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado al menos 18 genes que podrían codificar para estas proteínas; sin embargo, hasta la fecha sólo se han caracterizado parcialmente 7 (Yokoi et al., 2002; Aharon et al., 2003). Los genes más estudiados hasta la fecha son *AtNHX1* y *AtSOS1* (*AtNHX7*). *AtNHX1* se localiza en compartimentos prevacuolares de levadura (Gaxiola et al., 1999) y en el tonoplasto de las células de hojas de *A. thaliana* (Apse et al., 1999) y se ha propuesto que tanto la localización como el incremento de la actividad intercambiadora es de vital importancia para que una planta tolere altas concentraciones salinas (200 mM de NaCl ; Apse et al., 1999). Por otro lado, *AtSOS1* presente en membrana plasmática representa; tal vez, el mecanismo primario de salida de iones Na^+ debido a su localización (Qiu et al., 2003), además parece responder de manera específica a los efectos iónicos provocados por el estrés salino (Shi et al., 2000). Se ha demostrado que la regulación de la actividad intercambiadora puede estar dada por diversos estímulos como el NaCl , ABA y sorbitol sugiriendo que la respuesta de esta actividad puede ser debida a los efectos osmóticos causados por el NaCl más que por sus efectos iónicos (Yokoi et al., 2002).

Dentro de la familia de intercambiadores NHX existen miembros que responden de manera específica al estrés salino, como *AtNHX5* (Yokoi et al., 2002). Poco se conoce acerca de este miembro. Filogenéticamente, *AtNHX5* se encuentra en un subgrupo distinto de *AtNHX1* y *AtSOS1* y es posible que la diferencia en la secuencia de aminoácidos determine las diferencias en sus propiedades funcionales y en su localización intracelular. Debido a lo anterior fue interesante determinar la localización

de la proteína *AtNHX5* a nivel microsomal y caracterizar su actividad intercambiadora para conocer su posible papel en la tolerancia al estrés salino.

Mediante el empleo de anticuerpos anti-GFP se determinó la localización de *AtNHX5* en líneas transgénicas que poseen la fusión de *AtNHX5::GFP*. Lo que obtuvimos de estos análisis fue que *AtNHX5::GFP* se distribuye en todo el gradiente de sacarosa y no colocalizó específicamente con ninguno de los picos de expresión de los marcadores proteicos empleados. En *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3* se observó un primer pico en las regiones menos densas del gradiente de sacarosa que colocalizó con el marcador *AtBP80* específico del aparato de Golgi y vesículas de clatrina.

Debido a que la fusión de *AtNHX5* con GFP estuvo dirigida por el promotor 35S, es posible que la sobreexpresión de *AtNHX5* permita su almacenamiento en vesículas como las de clatrina para su transporte hacia organelos intracelulares o dirigida hacia la membrana plasmática para su exocitosis debido al exceso en su síntesis. Se ha observado, que la sobreexpresión de cualquier proteína pueda tener consecuencias como son: una sobre acumulación en otros compartimentos celulares, como golgi, retículo endoplásmico, tonoplasto o el lumen vacuolar e inclusive la activación de la maquinaria de secreción podría excretar el exceso de proteína, como fue observado por Cross et al. (1999) cuando sobreexpresaron la proteína calreticulina en células de tabaco.

Por otro lado, el segundo pico de expresión en *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3* no colocalizó con ninguno de los marcadores proteicos utilizados desde la región media del gradiente (15 % de sacarosa) hasta las fracciones más densas del gradiente de sacarosa (45 % de sacarosa). Aunado a esto, se observó que en toda esta región del gradiente, además de la presencia de *AtNHX5*, encontramos membranas de tres diferentes orígenes: tonoplasto, membrana plasmática y retículo endoplásmico (figuras 9.2.1 y 9.2.1.1). Con esto, es difícil determinar zonas en las que sólo haya un tipo de membrana donde sea factible su aislamiento y en donde se verifique si ésta se encuentra enriquecida con la proteína *AtNHX5*. Estos resultados evidencian las limitaciones de la separación de membranas mediante métodos tradicionales como los gradientes de densidad de sacarosa. Debido a que el factor de separación es la densidad es posible que muchas fracciones endomembranales posean densidades similares, lo que puede provocar un solapamiento en una amplia extensión del gradiente. Técnicas recientes como la Electroforesis de flujo libre, en la cual las membranas, en su estado nativo, pueden ser separadas dependiendo de su carga neta,

en un campo eléctrico, ayudaría a resolver estos problemas inherentes (Maurel, et al., 1997).

En las líneas transgénicas *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3* el tonoplasto se distribuyó hacia las regiones más densas del 15 % al 44 % en el gradiente de sacarosa; mientras que en el tipo silvestre abarcó regiones menos concentradas (del 11 % al 39 % de sacarosa). Este cambio en el patrón de distribución del tonoplasto podría deberse a cambios en la densidad de la membrana. Esto provocado, posiblemente, por la sobreexpresión de la construcción *AtNHX5::GFP*, dirigida por el promotor 35S-CaMV.

Por otro lado, la membrana plasmática mostró un ligero desplazamiento hacia zonas menos concentradas del gradiente de sacarosa (25 % al 45 %), esto en las líneas *AtNHX5::GFP2* y *AtNHX5::GFP3*, traslapándose con las regiones donde se detectó el tonoplasto. Esto apoya la hipótesis de que la sobreexpresión de las proteínas afecta la densidad de las membranas, modificando el rango de expresión y, por lo tanto, aumentando el número de fracciones en las cuales se detectaron el tonoplasto y la membrana plasmática. La localización endógena de *AtNHX5* puede ser malinterpretada debido a los resultados obtenidos con la construcción *AtNHX5::GFP*. Es posible que el patrón de distribución nativo de la proteína *AtNHX5* esté alterado tanto por la sobreexpresión como por la fusión con GFP. Reportes de la deslocalización y el mal plegamiento de proteínas fusionadas con GFP o los efectos de estos eventos sobre la naturaleza de las proteínas, raramente son publicados en la literatura, por lo que es difícil asegurar con que frecuencia se presentan este tipos de artefactos.

Para evitar estos problemas intrínsecos atribuidos al uso de proteínas fusionadas a proteínas reporteras como GFP para su localización y, además para evitar los efectos atribuidos a la sobreexpresión de la proteína debido al promotor usado, optamos por emplear endomembranas aisladas de tejidos provenientes del tipo silvestre de *A. thaliana* para la detección de *AtNHX5* en condiciones endógenas utilizando el anticuerpo específico anti-*AtNHX5*-péptido.

Con el empleo del anticuerpo anti-péptido detectamos un gran pico de expresión de *AtNHX5* a través del gradiente del 11 % al 45 % de sacarosa (figura 9.4.1), similar al patrón de expresión en las líneas transgénicas. Las endomembranas en esta región correspondieron a tonoplasto, membrana plasmática y retículo endoplásmico. Sin embargo, a diferencia de las líneas transgénicas, la proteína *AtNHX5* no fue detectada en las fracciones menos densas del gradiente que corresponden con el primer pico de detección de la construcción *NHX5::GFP* en las líneas transgénicas y la endomembrana

que mostró expresión en esta región fue *AtBP80*, el marcador para vesículas del aparato de Golgi y vesículas de clatrina. Esto indicó que en condiciones endógenas la proteína *AtNHX5* no colocaliza con estos compartimentos, lo cual contrasta con la colocalización de *LeNHX2* en tomate, presente en aparato de Golgi, con el cual comparte 50.2 % de identidad con *AtNHX5* (Venema et al., 2003).

Además, se observó que el anticuerpo anti-péptido también detectó una banda proteica de 45 kDa en las fracciones de endomembranas del tipo silvestre a diferencia del patrón observado en la detección de la fusión *AtNHX5::GFP*. La banda presente en las fracciones de 11 % al 21 % de sacarosa corresponde al tonoplasto; por ello creemos que esta proteína de 45 kDa podría ser abundante en la vacuola. Debido a que no existen muchas evidencias que sugieran el posible origen de esta banda, uno puede ser resultado de procesos proteolíticos de la banda de 50 kDa o debido a que algunas proteínas intercambiadoras son ubiquitinadas (Padan et al., 2001), esta banda podría corresponder a una ausencia de ubiquitinación y, además, se esté almacenando en la vacuola. Sin embargo, no se descarta que sea derivado de una reacción no específica del anticuerpo; por ello, se requiere trabajo adicional para identificar el origen bioquímico de esta proteína de 45 kDa.

Una manera de comparar y comprobar las diferencias en el patrón de expresión de *AtNHX5*, de manera directa, fue probando el anticuerpo anti-péptido en las líneas transgénicas. De manera sorprendente, no encontramos la banda de 80 kDa, producto de la fusión de *AtNHX5* con la proteína GFP debido, posiblemente, a que la presencia de GFP interfiere con el reconocimiento del anticuerpo, ya que la región en la cual se diseñó el péptido corresponde a los últimos aminoácidos del carboxilo terminal (figura 9.4.2). Por otro lado, la proteína endógena, *AtNHX5*, tampoco fue reconocida por el anti-péptido en las endomembranas aisladas de las líneas transgénicas; debido, probablemente a que la sobreexpresión de la proteína fusionada a GFP en estas líneas haya suprimido la síntesis de la proteína endógena

Los resultados obtenidos con el microscopio confocal mostraron la fluorescencia atribuida a la proteína GFP claramente visible en pequeñas y definidas vesículas dispersas en el citoplasma de células en suspensión derivadas de plantas transgénicas *AtNHX5::GFP* de *A. thaliana* con un tamaño, aproximado de 4 μm (figura 9.4.1). Esto sugirió el encontrarla en vesículas pertenecientes al aparato de Golgi o de clatrina corroborando la colocalización con *AtBP80* obtenida con la inmunodetección de GFP. Sin embargo, la señal obtenida de GFP y de *AtBP80* acoplado a Alexa-Fluor 568 sólo

dio pequeñas zonas de colocación con la mayoría de la fluorescencia de GFP localizada en compartimentos vesiculares distintos (figura 9.4.2). Debido al tamaño de las vesículas se descartó que la fluorescencia fuera producto de la membrana plasmática, tonoplasto o compartimentos mayores como la mitocondria o proplástidos. Estos resultados sugieren que la localización de la fusión NHX5::GFP parece ser específica y no se puede atribuir a una deslocalización general ni a un sobre almacenamiento hacia otros tipos membranales. El sistema de endomembranas en plantas es complejo y extenso. Debido a que el origen de muchos compartimentos vesiculares no ha sido claramente identificado y que los marcadores proteicos de los diferentes compartimentos aún no están disponibles (Bethke and Jones, 2000), es posible que el compartimento vesicular donde se encuentra *AtNHX5* no identificado tenga un amplio rango de densidad y que esto explicara el por qué aparece en todo el gradiente de sacarosa detectado en los western blots.

Las diferencias entre la localización inespecífica de la proteína fusionada en los western blots y la localización específica de la misma obtenida con el microscopio confocal, podrían deberse al estado de plegamiento de la proteína GFP. Es decir, mientras que algunas de las proteínas *AtNHX5::GFP* están correctamente plegadas y funcionales, dando como resultado la actividad fluorescente de GFP, una gran proporción de estas proteínas fusionadas no lo está debido a un mal plegamiento de la GFP, lo que resulta en la pérdida de la fluorescencia y bajo el microscopio confocal esta población no es visualizada, como fue observado por Tanudji et al. (2002) donde la ausencia de fluorescencia fue debida a un mal plegamiento de la proteína GFP. Sin embargo, cuando la proteína fusionada es detectada usando anticuerpos anti-GFP, el epítipo es accesible y la población que detectamos contiene tanto proteínas correctamente plegadas y funcionales como aquellas que no lo están.

Algunos intentos por determinar el compartimento celular en el cual se encuentra *AtNHX5* fue la realización de cortes de tejido proveniente tanto de la parte aérea como de la raíz para microscopía electrónica donde se utilizó la resina metacrilato; sin embargo, esta técnica no fue exitosa debido a que la fijación de los cortes no fue adecuada, lo que ocasionó la pérdida total de las muestras de tejido. Por ello, a pesar de haber utilizado los marcadores más representativos y abundantes de las fracciones endomembranales, no fue posible determinar certeramente el compartimento en el cual es abundante *AtNHX5* en condiciones nativas ya que en

condiciones sobreexpresoras y fusionada a GFP parece estar presente en vesículas del aparato de Golgi y/o vesículas de clatrina.

Otro de los objetivos de este trabajo fue la caracterización de la actividad intercambiadora catión/ H^+ de *AtNHX5*. Considerando que el primer pico de expresión del transgen *AtNHX5::GFP* estuvo en las regiones menos densas del gradiente de sacarosa libre de contaminación de otras endomembranas, incluyendo membrana plasmática y tonoplasto; se aisló esta fracción para la realización de los ensayos de actividad. Además, nos permitió medir el intercambio catión/ H^+ de *AtNHX5* en la ausencia de *AtNHX1* y *AtSOS1* intercambiadores de tonoplasto y membrana plasmática, respectivamente.

La actividad de transporte de H^+ dependiente de Na^+ en endomembranas de la interfase 0/12 % de sacarosa mostraron una cinética de tipo Michaelis-Menten. El movimiento de Na^+ mostró una K_m de 61.49 mM, el cual refleja una baja capacidad de transporte de Na^+ con respecto a otros intercambiadores como *AtNHX1* que muestra valores de 7 mM y 11 mM, (Apse et al., 1999; Darley et al., 2000) y 22.8 mM para *AtSOS1/AtNHX7* (Qiu et al., 2003).

La actividad intercambiadora catión/ H^+ medida en estas endomembranas tuvo una afinidad más alta por K^+ que mostró una K_m de 16.5 mM, que fue cuatro veces más baja que la registrada para Na^+ . Estos resultados sugieren que la actividad de transporte K^+/H^+ fue mucho más eficiente que la de Na^+/H^+ . *AtNHX5* es capaz de intercambiar tanto Na^+ como K^+ pero con una mayor afinidad por K^+ , lo que sugiere que posiblemente esta proteína no participa, de manera importante, en la acumulación de Na^+ en los compartimentos en los cuales fue localizada. En contraste con lo que se ha reportado para *AtNHX1*, el cual transporta tanto iones Na^+ como K^+ con una afinidad más alta para Na^+ que para K^+ , lo que apoya su papel como una proteína involucrada en la acumulación de Na^+ en la vacuola (Zhang y Blumwald, 2001; Venema et al., 2002).

Estas propiedades de *AtNHX5* nos permiten considerar que posiblemente participe en el mantenimiento de la homeostasis del K^+ durante el estrés salino de manera parecida a lo reportado para el transportador *LeNHX2* con el cual comparte una alta homología comparados con los otros miembros de la familia NHX de *Arabidopsis thaliana* (Venema et al., 2003). Sin embargo, no se han detallado los análisis cinéticos del intercambio de *LeNHX2* ni se han aportado datos de K_m que puedan ser directamente comparados con los obtenidos para *AtNHX5* en este trabajo. Los intercambiadores K^+/H^+ , probablemente, jueguen papeles importantes en la regulación

del pH y en la osmoregulación de compartimentos endomembranales. Además, pueden ser generadores de una reserva de K^+ vacuolar lo cual podría generar el turgor requerido para la expansión celular y, podrían participar en la homeostasis del K^+ intracelular.

La inducción de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ correlacionada con una inducción en la actividad de la V-ATPasa medida cuando las plantas son crecidas bajo condiciones de salinidad han sido reportadas para muchas especies de plantas y ambas actividades han sido registradas tanto en membrana plasmática como tonoplasto (para su revisión ver Barkla y Pantoja, 1996 y Pantoja et al., 2000). Estos estudios resaltan la importancia de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ en la tolerancia de las plantas a la salinidad y el requerimiento de un incremento en la actividad de la V-ATPasa que energice la reacción de intercambio. El tratamiento salino impuesto a las plantas tanto tipo silvestre como las transgénicas no tuvo efectos significativos sobre la actividad intercambiadora Na^+/H^+ medida en vesículas endomembranales de la interfase 0/12 % de sacarosa y, además, provocó una disminución del 50 % en la actividad de la V-ATPasa en el tipo silvestre. La ausencia de la inducción del transporte de Na^+ parece sugerir que el intercambio medido en esta fracción no juega un papel importante en la tolerancia al estrés salino, pero debido a que preferencialmente mueve K^+ , sustenta la idea de que este intercambio participa en procesos de regulación del contenido de K^+ o de pH.

La actividad intercambiadora Na^+/H^+ ha sido descrita principalmente en tejidos de la parte aérea de *A. thaliana* (Apse et al., 1999; Qui et al., 2003; Barkla et al., 1995), aunque algunos miembros de la familia *AtNHX* han sido reportados que se expresan en la raíz, incluyendo *AtNHX3*, el cual parece ser una isoforma específica de raíz y *AtNHX1*, *AtNHX2*, *AtSOS1/AtNHX7* y *AtNHX5*, los cuales muestran expresión tanto en este tejido como en la parte aérea (Yokoi et al., 2002; Qiu et al., 2003). La ausencia de actividad intercambiadora Na^+/H^+ o K^+/H^+ en vesículas de raíz de la interfase 0/12 % de sacarosa sugiere que, posiblemente, la actividad intercambiadora medida en esta fracción corresponde a una isoforma específica de la parte aérea.

Las membranas de la interfase 12/22 % de sacarosa de plantas tipo silvestre enriquecidas con tonoplasto (figuras 9.7.2 y 9.7.4), mostraron un comportamiento distinto al observado en la interfase 0/12% de sacarosa tanto en la actividad de V-ATPasa como del intercambio Na^+/H^+ . En las vesículas de hojas tipo silvestre la actividad de V-ATPasa fue inducida significativamente por el tratamiento con NaCl como

ha sido previamente observada para la actividad de V-ATPasa en tonoplasto (Barkla y Pantoja, 1996 y Pantoja et al., 2000), aunque los niveles de actividad fueron más bajos que aquellos medidos en las membranas de la interfase 0/12 % de sacarosa. La actividad Na^+/H^+ fue más específica para Na^+ , como lo demuestran las tasas iniciales de intercambio siendo más altas en la presencia de Na^+ que en la de K^+ , de acuerdo con lo reportado para la actividad de *AtNHX1* en tonoplasto (Venema et al., 2002). Por un lado, esto refleja una diferencia funcional entre las vesículas de las dos interfases, sustentando la idea de que la actividad intercambiadora Na^+/H^+ en el tonoplasto participa en el almacenamiento de iones Na^+ en el interior vacuolar. Sin embargo, la actividad intercambiadora tanto para Na^+ como para K^+ no se vio estimulada por el crecimiento de las plantas en NaCl. Las diferencias en la regulación del movimiento de Na^+ a través de la actividad de V-ATPasa observadas entre las membranas aisladas de plantas tipo silvestre y plantas transgénicas puede ser reflejo de la expresión del transgen dirigido por un promotor constitutivo como es el 35S-CaMV, enmascarando la regulación del promotor nativo en condiciones de salinidad.

Mientras no hubo inducción de la actividad intercambiadora Na^+/H^+ en endomembranas provenientes tanto de la interfase 0/12 % como de la 12/22 % de sacarosa por el crecimiento de las plantas en medios con NaCl, la regulación de los niveles de transcrito fueron observados claramente. La expresión de *AtNHX5* fue inducida por la presencia de NaCl dependiendo de la concentración empleada entre 25 mM y 75 mM. Sin embargo, los niveles de transcrito cuando las plantas fueron tratadas con 100 mM de NaCl fueron similares o más bajos a los observados en plantas sin tratamiento salino (figura 9.7.1). Esto podría explicar porque no hubo inducción del intercambio cuando se midió el transporte en las plantas que fueron tratadas con 100 mM de NaCl por 24 h. Esto posiblemente haya representado un estrés demasiado severo para las plantas debido a que a concentraciones mayores de 100 mM de NaCl los niveles en los transcritos decayeron por debajo de los observados en las plantas sin tratamiento salino. Cuando las plantas fueron crecidas en presencia de K^+ también se observó una regulación del transcrito de *AtNHX5* con una fuerte inducción en comparación con lo observado para Na^+ . Esto sustenta los datos obtenidos en el transporte donde el intercambio de *AtNHX5* presentó mayor afinidad para K^+ que para Na^+ , sugiriendo que el intercambio catión/ H^+ atribuido a *AtNHX5* juega un papel más importante en la homeostasis del K^+ que en el secuestro de Na^+ .

Existen reportes de que *AtNHX5* y *LeNHX2*, muestran una regulación en los niveles de transcrito específica por el tratamiento con NaCl (Yokoi et al., 2002; Venema et al., 2003). Sin embargo, se ha reportado que también existe una regulación de la expresión del transcrito de *LeNHX2* (Venema et al., 2003) y de *OsNHX1* (intercambiador Na^+/H^+ en arroz; Fukuda et al., 2004) en presencia de K^+ , argumentando su participación en la regulación de los niveles de K^+ en las células vegetales. Siendo que la expresión *AtNHX1* es afectada tanto por los niveles de NaCl como de KCl, sugiere una respuesta hacia los cambios osmóticos externos más que a los iónicos (Venema et al., 2002). En el caso de *AtNHX5* la respuesta parece no ser específica al estrés por Na^+ , pero no necesariamente que sea un efecto de la osmolaridad del medio de crecimiento. Yokoi et al., (2002) demostró que el transcrito de *AtNHX5* no es inducido por sorbitol o ABA; sin embargo, ellos no investigaron directamente los efectos de K^+ sobre los niveles de transcrito de *AtNHX5*. La función de los intercambiadores Na^+/H^+ ha sido inferida a través de estudios de expresión ectópica o por sobreexpresión y su regulación es poco conocida (Shi y Zhu, 2002). Por ello, es necesario estudiar más detalladamente las vías de señalización que se activan en condiciones de estrés salino y la regulación que existe en los miembros de la familia NHX.

11. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en este trabajo indican que *AtNHX5* parece no ser uno de los mecanismos principales que participe en la respuesta de la planta al estrés salino. Esto apoyado en tres datos principales: en primer lugar, la localización y el tipo de vesículas que contienen a *AtNHX5* en el interior citoplásmico. La localización definida en pequeñas vesículas abundantes en el citoplasma parece no contar con los mecanismos ni el tamaño adecuados para almacenar grandes concentraciones de Na^+ . Segundo, basados en los datos obtenidos de la cinética de transporte, la tasa y afinidad de intercambio encontrados para esta proteína son muy bajos con respecto al movimiento de Na^+ . *AtNHX5* refleja una baja eficiencia y afinidad para el intercambio Na^+/H^+ . Su papel parece orientarse hacia la manutención de la homeostasis del K^+ y/o el control del pH del compartimento endomembranal donde se encuentra o del citosol dado que la afinidad por el intercambio con K^+ es mayor. Tercero, a pesar de que se observó un estímulo en los niveles de transcrito por NaCl , a concentraciones mayores de 100 mM de NaCl , el transcrito comienza a desaparecer sugiriendo una regulación negativa hacia la transcripción de *AtNHX5* y por ende, su participación durante el estrés salino severo es dudosa. Dado que el estímulo en la expresión de *AtNHX5* y la afinidad por el transporte de K^+ es mayor que por el Na^+ creemos, que *AtNHX5* podría participar en procesos de regulación de pH y en la homeostasis del K^+ más que ser una vía para el almacenamiento de Na^+ en las vesículas endomembranales.

12. PERSPECTIVAS

Debido a que la separación de las endomembranas por medio de los métodos convencionales reveló limitantes en la definición de los picos para cada una de las endomembranas, proponemos realizar una separación más fina de la fracción microsomal de plantas transgénicas *AtNHX5::GFP* y tipo silvestre de *A. thaliana* mediante la técnica de Electroforesis de Flujo Libre (FFE: **F**ree **F**low **E**lectrophoresis) y realizar nuevas inmunodetecciones tratando de probar nuevos marcadores proteicos. Además, será interesante obtener resultados utilizando el microscopio confocal de células en suspensión del genotipo silvestre de *A. thaliana* e inmunolocalizar *AtNHX5* utilizando el anticuerpo péptido específico anti-NHX5, de este modo obtendríamos el patrón de distribución celular de la proteína *AtNHX5* en condiciones endógenas.

Por lo que respecta a la caracterización de la actividad resulta atractivo probar la respuesta de la actividad intercambiadora atribuida a *AtNHX5* en vesículas endomembranales de la interfase 0/12 % de sacarosa tanto del genotipo silvestre y de las líneas transgénicas *AtNHX5::GFP* ante el anticuerpo específico anti-*AtNHX5* y registrar la posible inhibición de la actividad intercambiadora. Debido a que tanto la cinética de transporte como la respuesta del transcrito de *AtNHX5* se orientan hacia el movimiento de iones K^+ , será interesante registrar la actividad intercambiadora en estas vesículas, cuando las plantas tipo silvestre y las transgénicas *AtNHX5::GFP* de *A. thaliana* son sometidas a estrés con K^+ , como se realizó con Na^+ por un periodo de 24 h. Además, se podría analizar la respuesta de *AtNHX5* a concentraciones menores de 25 mM de NaCl y crear un gradiente con distintas concentraciones inferiores a 100 mM.

Por otro lado, debido a que el anticuerpo específico anti-*AtNHX5* reconoció una banda de 45 kDa en las inmunodetecciones, se plantea la posibilidad de caracterizarlo partiendo del análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína *AtNHX5* de 50 kDa a modo de obtener información de tipo regulatorio, como son zonas de glicosilación, fosforilación o si existe algún péptido señal insertado en la secuencia.

A nivel de transcrito y proteína resultaría interesante observar la respuesta de *AtNHX5* ante diversos tipos de estrés adicionales a los realizados por Yokoi et al., (2002), utilizando distintos tipos de sales como LiCl, RbCl, CsCl,

13. BIBLIOGRAFÍA

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.

Aharon, G. S., Apse, M. P., Duan, S., Hua, X. and Blumwald, E. (2003) Characterization of a family of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and soil*, 00:245-256

Amtmann, A. y Sanders, D. (1999) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research*, 29:75-112.

Amtmann, A., Fischer, M., Marsh, E. L., Stefanovic, A., Sanders, D. and Schachtman, D. P. (2001) The wheat cDNA *LCT1* generates hypersensitivity to sodium in salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology*, 126:1061-1071

Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, A. and Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285:1256-1258

Apse, M. P., Sottosanto, J. B. and Blumwald, E. (2003) Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Journal*, 36:229-239

Aronson, P. S. (1985) Properties of the renal Na⁺/H⁺ exchanger. *Annals of the New York Academy of Science*, 456:220-8.

Barkla, B. J., Zingarelli, L., Blumwald, E. and Smith A.C. (1995) Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology*, 109:549-556

Barkla, B. J. and Pantoja, O. (1996) Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:159-184

Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Camacho-Emiterio, J. and Pantoja, O. (2002) Na⁺/H⁺ exchange in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na⁺ storage. *Function Plant Biology*, 29:1017-1024.

Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P. A., Tester, M., Véry A.A., Sentenac, H. and Casse, F. (2003) Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *European Molecular Biology Organization Journal*, 22:2004-2014

Bethke, P.C. and Jones, R. L. (2000). Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:469-475.

Blumwald, E. and Poole, R. J. (1985) Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplasto vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol* 78:163-167.

Blumwald, E. and Poole, R. J. (1987) Salt tolerance in suspension cultures of Sugar beet. *Plant Physiology*, 83:884-887.

Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12:431-434

- Blumwald, E., Aharon, G. S. and Apse, M. P.** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 140-151
- Clustal X** (Thompson, JD, Higgins, DG, & Gibson, TJ (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680).
- Crofts, A. J., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L.E., Ashford, D.A and Denecke, J.** (1999). Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *The Plant Cell*, 11:2233-2247.
- Chen, T. H. and Murata, N.** (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:250-257.
- Darley, P. C., Wuytswinkel, O. C. M., Woude, K. V. D., Mager, W. H. and Boer, A. H.** (2000) *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochemistry Journal*, 351:241-249
- Davenport, R. J. and Tester, M.** (2000). A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiology*, 122:823-834.
- Demidchik, V. and Tester, M.** (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 128:379-387
- Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S. and Tanaka, Y.** (1998) Na⁺/H⁺ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. *Plant Cell Physiology*, 39(2):196-201.
- Fukuda, A., Nakamura, A. and Tanaka Y.** (1999) Molecular cloning and expresión of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1446:149-155.
- Gao, X., Ren, Z., Zhao, Y. and Zhang, H.** (2003) Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133:1873-1881
- Garg, A. K., Kim, J.K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. D., Kochian, L. V. and Wu, R. J.** (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99:15898-15903.
- Gassmann, W., Rubio F. and Schroeder, J.** (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high affinity potassium transporter HKT1. *Plant Journal*, 10 (5): 869-882.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L. and 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 Science of the United States of America*, 96:1480-1485.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allens, G.J., Alper, S. L. and Fink, G. R.** (2001) Drought-and salt tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H₁-pump. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98:11444-11449
- Glenn, E. P. and Brown J. J.** (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Review of Plant Sciences*, 18(2):227-255.

- Halfter, U., Ishtani, M. and Zhu, J.K.** (2000) The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97:3735-3740.
- Hamada, A., Shono, M., Xia, T., Ohta, M., Hayashi, Y., Tanaka, A. and Hayakawa, T.** (2001) Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Molecular Biology*, 46:35-42
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.K. and Bohnert, H. J.** (2000) Plant cellular and molecular response to high salinity. *Annual Review of the Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51:463-499.
- Hull, R., Harper, G. and Lockhart, B.** (2000) Viral sequence integrated into plant genome. *Trends in Plant Science*, 5:362-365.
- Jia, Z. P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. and Young, P.G.** (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *European Molecular Biology Organization Journal*, 11:1631-1640.
- Karley, A. J., Leigh, R. A. and Sanders, D.** (2000) Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends in Plant Science*, 5:465-470
- Karley, A. J., Leigh, R. A. and Sanders, D.** (2000). Differential ion accumulation and ion fluxes in the mesophyll and epidermis of barley. *Plant Physiology*, 122:835-844
- Katz, A., Pick, U. and Avron, M.** (1989) Characterization and reconstitution of the antiporter from the plasma membrane of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 983:9-14.
- Laurie, S., Feeney, K. A., Maathuis, F. J. M., Heard, P. J., Brown, S. J. and Leigh, R. A.** (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant Journal*, 32:139-149.
- Lefèvre, I., Gratia, E. and Lutts, S.** (2001) Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science*, 161:943-952
- Liu, J. and Zhu, J.K.** (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280:1943-1945.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S. and Zhu, J.K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97:3730-3734.
- Maurel, C., Tacnet, F., Güclü, J., Guern, J. and Ripoche, P.** (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94:7103-7108
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbair, D. J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertson, W., Sussman, M. R. and Schroeder, J. I.** (2002) Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by

genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *Federation of European Biochemical Societies*, 531:157-161

McNeil, S. D., Nuccio, M. L. and Hanson, A. D. (1999) Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology*, 120:945-949.

Mühling, K. H. and Läuchli, A. (2002) Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 159:137-14

Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25:239-250

Nass, R., Cunningham, K.W. and Rao, R. (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42): 26145-26152.

Nass, R. and Rao, R. (1998) Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *Journal Biological Chemistry*, 273: 21054-21060

Nelson, D. E., Koukoumanos, M. and Bohnert, H. J. (1999) Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiology*, 119:165-172.

Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T. and Hayakawa, T. (2002) Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 532:279-282

Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y. and Dover, N. (2001) Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1505:144-157

Pantoja O., Barkla, B.J. and Vera-Estrella, R. (2000) Ion channels and ion co-transporters in the tonoplast. In vacuolar compartments. Robinson DG and Rogers JC (eds). Sheffield Academic Press England. *Annual Plant Reviews*, 5:199-220

Parks, G. E., Dietrich, M. A. and Schumaker, K. S. (2002) Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, 53:1055-1065.

Putney, L. K., Denker, S. P. and Barber, D. L. (2002) The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, HNE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42:527-552

Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker K. S. and Zhu, J. K. (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 y SOS3. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99:8436-8441

Qiu, Q. S., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Zhu, J. K. and Schumaker K. S. (2003) Na⁺/H⁺ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132:1041-1052.

Qiu, Q. S., Guo, Y., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Schumaker K. S. and Zhu, J. K. (2004) Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279:207-215

- Quintero, F. J., Blatt, M. R. and Pardo, J. M.** (2000) Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *Federation of European Biological Societies Letters*, 471:224-228.
- Rubio, F., Gassmann, W. and Schroeder, J. I.** (1995) Sodium driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270:1660-1663
- Russ, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B., Matsumoto, T. K., Koiwa, H., Zhu, J. K., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M.** (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98:14150-14155
- Schachtman, D. P. and Schroeder, J. I.** (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370:655-658
- Schachtman, D. P., Kumar, R., Schroeder, J. I. and Marsh, E. L.** (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94:11079-11084
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Zhu, J. K.** (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 14:465-477.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97:6896-6901.
- Shi, H. and Zhu, J. K.** (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 50:543-550
- Shi, H., Lee, B., Wu, S. J. and Zhu, J. K.** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 21:81-85.
- Sze, H., Ward, J. M., Lai, S. and Perera, I.** (1992) Vacuolar-type H⁺ translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. *Journal of Experimental Biology*, 172:123-135.
- Tanudji, M., Hevi, S. and Chuck, S. L.** (2002) Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *Journal of Science*, 115:3849-3857.
- Tester, M. and Davenport, R.** (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91:503-527.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E. P., Nakamura, T. and 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*, 122:1249-1259
- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P. and Donaire J. P.** (2003). A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to

- Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278:22453-22459.
- Ward, J. M., Hirschi, K. D. and Sze, H.** (2003). Plants pass the salt. *Trends in Plant Science*, 8(5):200-201
- Wegner, L. H. and Raschke, K.** (1994). Ion channel in the xylem parenchyma of barley roots. *Plant Physiology*, 105:799-813
- West, I. C. and Mitchell, P.** (1974) Sodium/proton ions antiport in *Escherichia coli*. *Biochemistry Journal*, 144:87-90
- White, P. J.** (1999) The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends in Plant Science*, 4:245-246
- Wiebe, C. A., DiBattista, E. R. and Fliegel, L.** (2001) Functional role of polar amino acid residues in Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochemistry Journal*, 357:1-10.
- Wu, S. J., Ding, L. and Zhu, J. K.** (1996) SOS1, a genetic locus essential for Salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, 8:617-627.
- Xia, T., Apse, M. P., Aharon, G.S. and Blumwald, E.** (2002) Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 116:206-212.
- Yamaguchi, T., Apse, M. P., Shi, H. and 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 Science of the United States of America*, 100:12510-12515
- Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M.** (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal*, 30:529-539
- Zhang, H. X., Hodson, J. N., Williams, J. P. and Blumwald, E.** (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98:12832-12836
- Zhang, H. X. and Blumwald, Ed.** (2001) Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature*, 19:765-768
- Zhu, J. K., Liu, J. and Xiong, L.** (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell*, 10:1181-1191.
- Zhu, J. K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97:6896-6901
- Zhu, J. K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53:247-273

APÉNDICE

Nos pareció interesante demostrar si existen diferencias en el intercambio con Na^+ cuando es acoplado a diferentes aniones, por ello decidimos probar diferentes sales de Na^+ con una concentración de 100 mM.

Lo que puede observarse en la figura 10.10.1 es que la máxima actividad del intercambiador se da cuando se estimula con 200 mM de NaCl: 45% Fluorescencia $\text{mg}^{-1}\text{proteína min}^{-1}$, comparada con el resto de las sales de Na^+ . Si observamos las diferentes sales se pudo observar que movimiento de iones Na^+ en distintos niveles dependiendo la sal que se emplea. Tanto glutamato como gluconato de sodio mostraron los niveles más bajos de actividad: 17% Fluorescencia $\text{mg}^{-1}\text{proteína min}^{-1}$ para ambas sales. Donde se observó una actividad semejante a la obtenida con 200 mM de NaCl fue con sulfato de sodio: 42% Fluorescencia $\text{mg}^{-1}\text{proteína min}^{-1}$. Sin embargo, es posible que el sulfato por si mismo esté, de alguna manera, enmascarando la recuperación de la fluorescencia más que por el movimiento propio del Na^+ . Por ello, se decidió probar otra sal de sulfato que fue el sulfato de magnesio. Lo que se monitoreo fue: 43% Fluorescencia $\text{mg}^{-1}\text{proteína min}^{-1}$, de manera interesante, que existe movimiento de esta sal recuperando la fluorescencia de manera muy semejante a la registrada con 200 mM de NaCl. Cabe la posibilidad de que sea el sulfato el que provoque la recuperación en la fluorescencia; sin embargo, no se ha detallado, a la fecha algún intercambiador en membranas de células vegetales capaz de mover sulfato. La actividad intercambiadora Na^+/H^+ no se ve alterado aún modificando la sal empleada.

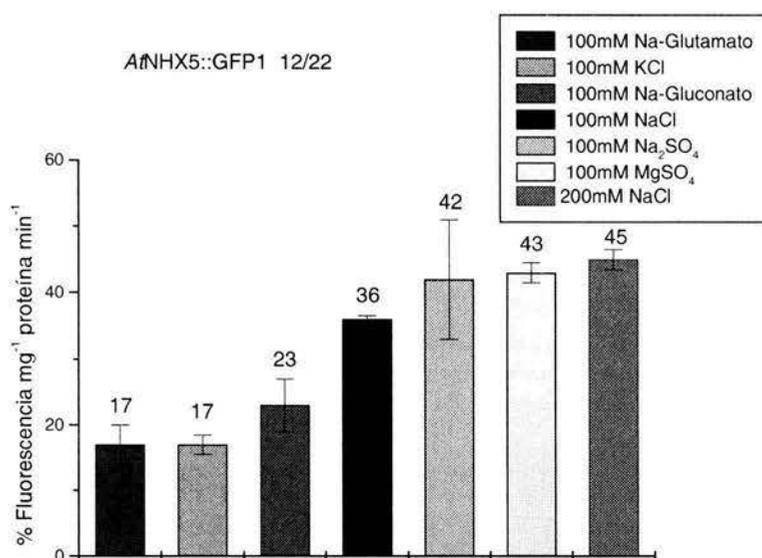


Figura 10.11.1. Tasas iniciales del transporte de Na^+ dependiente de H^+ en vesículas pertenecientes a la fracción 12/22% (p/v) de sacarosa aisladas de tejido de hoja. Las plantas de la línea transgénica *A/NHX5::GFP1* fueron cosechadas en condiciones sin tratamiento salino. Las tasas iniciales fueron calculadas a los 100 s después de la adición de Na^+ acoplado a diferentes aniones. Los valores son significativos \pm S.E. de tres experimentos independientes.