



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

(Departamento de Biología Molecular de Plantas)

**Regulación funcional del transportador de  $\text{Na}^+$  OsHKT1;3 del arroz**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Doctor en Ciencias**

P R E S E N T A:  
M. en C. Paul Rosas Santiago

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Omar H. Pantoja Ayala  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, Facultad de Química  
Dr. Ignacio López Gonzáles, Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos.

Febrero, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*Con amor a mi madre*

*Con Cariño a mi Familia*

*Con admiración y respeto a mis  
Instructores, Omar, Bronwyn y  
Rosario*

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Omar H. Pantoja Ayala en el departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de los estudios de Doctorado se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 204770.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de los proyectos: CONACyT 2013/79191 y DGAPA IN203112

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi mentor el Dr. Omar H. Pantoja Ayala (IBt-UNAM)

A mi comité tutorial:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño (FQ-UNAM)

Dr. Ignacio López González (IBt-UNAM)

A los miembros del jurado:

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles (IBt-UNAM)

Dr. Roberto Coria Ortega (IFC-UNAM)

Dra. Marina Gavilanes Ruiz (FQ-UNAM)

Dra. Helena Porta Ducoing (IBt-UNAM)

Dr. Christopher Wood (IBt-UNAM)

Al personal académico del laboratorio 16 del IBt-UNAM:

Dra. Bronwyn Jane Barkla

Dra. Rosario Vera Estrella

Técnico. María Guadalupe Muñoz García

Al laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del IBt-UNAM:

M. en C. Andrés Saralegui

Dr. Arturo Pimentel

Q.F.B. Xóchitl Alvarado

Dr. Adán Guerrero

A la Unidad de Microscopía Electrónica

Dra. Guadalupe Zavala

A la Dra. Hana Sychrová del Instituto de Fisiología de la Academia de Ciencias de la Republica Checa por la colaboración y el empleo del sistema de expresión heteróloga de las levaduras.

Al Dr. Wolf Frommer del Carnegie Institution for Science, EUA, por la colaboración y el empleo del sistema mbSUS.

A mi mamá la Sra. Blanca Esthela Santiago Roy y mi tía Margarita Cuatlayotl.

A mi papá el Sr. Santiago Rosas y mi tío Gilberto Rosas

Se agradece a todas las personas que brindaron ideas, apoyo moral, apoyo técnico, apoyo administrativo, reactivos y buenos momentos:

M. en C. Víctor Tierrafría  
M. en C. Ramces García  
Dr. Armando Bravo  
Dr. Juan Estévez  
Dra. Patricia León  
M. en C. Marel Chenge  
Dra. Mariana Gutiérrez  
Dr. Alejandro Torres  
Dr. Mario Rocha  
M. en C. Maricela Olvera  
M. en C. Noreide Nava  
Dra. Isabel  
Dra. Carmen Beltrán  
Dra. Gladys Cassab  
M. en C. Violeta Matus  
M. en C. Israim Sotelo  
M. en C. Ania Cervantes  
Dr. Julio Amezcua  
M. en C. Gilda Guerrero  
M. en C. Leidy Bedolla  
M. en C. Omar Piña  
Dra. Daniela Silva  
M. en C. Francisco Romero  
Dra. Yadira Olvera  
M. en C. Fernanda Gomez  
Dr. Juan Esteves  
Ing. Gustavo Lastiri  
Dra. Dulce Figueiras

Dr. Adán Guerrero  
Psi. Erick Rosas  
Psi. Amalia Martinez  
Conta. Edgar Arellano  
Biol. Elisa Encarnación  
M. en C. Rocío Pascano  
Dra. Cristina Torres  
Dra. Ana Laura Muñoz  
Dra. Cindy Ast  
Dr. Niek de Klein  
Dra. Viviane Lanquar  
Dra. Eva Nowack  
Dra. Mona Houcheime  
Dr. Roberto De Michelle  
Dra. Lorena Sánchez  
Biol. Delia Narvárez  
M. en C. Adriana Garibay  
Biol. Daniel Lagunas  
Biol. Carolina Yañez  
Dra. Marion Egb  
Dr. Cuauhtemoc Cassani  
M. en C. Thomas Schwarz  
M. en C. Jesús Torres  
Dra. Isabel Gomez  
Lic. Arturo Hernandez

## INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
Mecanismos de acción contra el estrés por NaCl en las plantas.....	2
Mecanismos a nivel celular para la tolerancia al estrés salino.....	3
El uso de Arabidopsis en estudios de tolerancia a la salinidad.....	5
Estrés salino en arroz .....	6
Los transportadores HKT y su asociación a la tolerancia a la salinidad .....	8
Regulación de los transportadores iónicos .....	11
JUSTIFICACIÓN .....	16
HIPOTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL:.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Registros electrofisiológicos en los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	19
Construcción de los plásmidos .....	19
Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5 $\alpha$ ).....	21
Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	22
Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina (miniprep).....	23
Mutagénesis dirigida de S94G del transportador <i>OsHKT1;3</i> .....	24
Transcripción <i>in vitro</i> del ADNc .....	24
Obtención y defoliculación de los ovocitos.....	25
Microinyección del ARNc de <i>OsHKT1;3</i> y <i>OsCNIH1</i> en los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	26
Registros electrofisiológicos .....	27
Crecimiento de Plantas .....	27
Tratamiento con sal .....	28
Separación de los compartimientos subcelulares .....	29
Aislamiento de la membrana microsomal .....	29
Separación de las membranas mediante gradientes de sacarosa.....	29

Electroforesis zonal de flujo libre .....	30
SDS-PAGE y Western blotting .....	31
Purificación por inmuno afinidad del anticuerpo anti <i>OsHKT1;3</i> .....	32
Inmunolocalización en tejido de la hoja y raíz de <i>OsHKT1;3</i> .....	33
Microscopía electrónica .....	34
Mediciones de conductividad estomática y fotosíntesis .....	35
Intercambio gaseoso.....	35
Cuantificación de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en la raíz y la parte aérea.....	35
Ensayos de RT-PCR tiempo real (qRT-PCR).....	36
Identificación de interacciones proteína/proteína con el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS, mating-based Split Ubiquitin System).....	36
Clonación de los genes <i>OsHKT</i> , <i>OsCNIH1</i> , <i>OsCIPK</i> y <i>ERV14</i> en el sistema Gateway .....	38
Transformación de levadura.....	39
Medios de crecimiento para la levadura.....	40
Identificación de falsos positivos y falsos negativos.....	40
Transporte de Na <sup>+</sup> en levadura.....	41
Construcción de los Plásmidos .....	41
Cepas y Medios de Crecimientos.....	42
Expresión transitoria en hojas de la epidermis de <i>Nicotiana benthamiana</i> . .....	43
Construcción de los plásmidos .....	43
Células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
Expresión transitoria de proteínas fluorescentes en la lámina de la hoja de tabaco por medio de transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	45
Observación al microscopio de epi-fluorecencia y microscopio confocal multifotónico .....	46
<b>RESULTADOS</b> .....	47
Localización tisular y celular de <i>OsHKT1;3</i> .....	47
Inmunolocalización de <i>OsHKT1;3</i> en la raíz y las hojas.....	48
Inmunolocalización de <i>OsHKT1;3</i> mediante microscopía electrónica .....	51
Aislamiento de compartimientos subcelulares por electroforesis de flujo libre.....	53
Localización de <i>OsHKT1;3</i> mediante su fusión en su carboxilo terminal a la EYFP .....	58
Las estructuras puntuales marcadas por <i>OsHKT1;3</i> -EYFP muestran una motilidad elevada.....	66

<i>OshKT1;3</i> transporta Na <sup>+</sup> en el sistema de expresión heteróloga de los ovocitos de <i>Xenopus</i> ...	66
<i>OshKT1;3</i> no se bloquea por inhibidores para los canales de K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	74
Las corrientes de Na <sup>+</sup> generadas por <i>OshKT1;3</i> son insensibles a cambios en el pH interno y externo, pero son sensibles al inhibidor de cinasas de proteínas, estaurosporina .....	75
Posible fosforilación de <i>OshKT1;3</i> mediante cinasas de proteínas tipo CIPK .....	79
Los transportadores <i>OshKTs</i> no forman oligómeros .....	80
Interacciones de los transportadores <i>OshKT</i> con proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	83
<i>OshKT1;3</i> interactúa con <i>OscNIH1</i> en levaduras .....	86
<i>OscNIH1</i> co-localiza con <i>OshKT1;3</i> y está presente en el Aparato de Golgi, Retículo Endoplásmico y en los puntos de salida del retículo endoplásmico.....	89
La expresión heteróloga de <i>OshKT1;3</i> y <i>OscNIH1</i> en los ovocitos de <i>Xenopus</i> inhibe el transporte de Na <sup>+</sup> .....	96
Mutación de <i>ERV14</i> , el homólogo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de <i>OscNIH1</i> , modifica la localización intracelular de <i>OshKT1;3</i> la cual se restablece por la presencia <i>de novo</i> de <i>Erv14p</i> o <i>OscNIH1</i> .....	100
La fotosíntesis de la planta de arroz cv. Nipponbare es afectada en presencia de 50 mM de NaCl .....	105
La expresión del transcrito tanto de <i>OscNIH1</i> como de <i>OshKT1;3</i> aumentó en las raíces del arroz cv. Nipponbare bajo tratamiento con sal.....	107
DISCUSION.....	110
<i>OshKT1;3</i> es un transportador/canal de Na <sup>+</sup> .....	111
<i>OshKT1;3</i> se localiza en el Aparato de Golgi .....	113
Posible papel de <i>OshKT1;3</i> en la conductancia de corto circuito en el aparato de Golgi .....	114
En la planta de arroz <i>OshKT1;3</i> no participa en la tolerancia a la salinidad como los demás miembros de la subfamilia 1 .....	117
<i>OshKT1;3</i> interactúa con el receptor putativo de carga <i>OscNIH1</i> .....	119
Cornichon, un receptor cargo presente en células eucariotas.....	121
<i>OscNIH1</i> podría regular la localización y la actividad de transporte de <i>OshKT1;3</i> en la planta de arroz .....	122
CONCLUSIONES .....	124
PERSPECTIVAS.....	124
REFERENCIAS.....	125

## INDICE DE FIGURAS

Figura A. Diversidad en la tolerancia a la salinidad de varias especies.....	1
Figura B. Principales mecanismos para la tolerancia a la salinidad en plantas.....	4
Figura 1. Inmunolocalización de <i>OsHKT1;3</i> en los tejidos de la planta del arroz y cambios causados por su exposición a 30 mM de NaCl por 40 h.....	49
Figura 2. Autofluorescencia de los tejidos de la raíz y de las hojas del arroz y de la señal del suero preinmune .....	50
Figura 3. Inmunolocalización de <i>OsHKT1;3</i> mediante microscopía electrónica.....	52
Figura 4. Separación de las membranas celulares de las hojas del arroz por electroforesis de flujo libre a partir de la fracción microsomal .....	54
Figura 5. Identificación de las fracciones membranales donde se expresan las proteínas <i>OsHKT1;1</i> , <i>OsHKT2;3</i> y <i>OsHKT1;3</i> .....	56
Figura 6. La epidermis de tabaco no presenta autofluorescencia.....	59
Figura 7. <i>OsHKT1;3</i> -EYFP se localiza en el citoplasma .....	60
Figura 8. <i>OsHKT1;3</i> se localiza en el Aparato de Golgi.....	63
Figura 9. La localización intracelular de <i>OsHKT1;3</i> -EYFP se modifica en presencia de Brefeldina A .....	65
Figura 11. <i>OsHKT1;3</i> es un transportador selectivo a Na <sup>+</sup> .....	68
Figura 12. Propiedades de transporte de <i>OsHKT1;3</i> .....	70
Figura 13. La mutación S94G en el PA de <i>OsHKT1;3</i> no generó un cambio en su selectividad a Na <sup>+</sup> .....	73
Figura 14. La corriente entrante de Na <sup>+</sup> debida a <i>OsHKT1;3</i> no se inhibió por la presencia de bloqueadores específicos de canales de Ca <sup>2+</sup> o K <sup>+</sup> .....	76
Figura 15. La actividad de <i>OsHKT1;3</i> es insensible al pH y se afecta por la estaurosporina .....	78
Figura 16. Los transportadores HKT no interactúan con las cinasas CIPK.....	81
Figura 17. Los transportadores HKT no forman oligómeros .....	82
Figura 18. Interacción de los transportadores <i>OsHKT</i> con el interactoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	85
Figura 19. Análisis de la secuencia de la proteína Cornichon ( <i>OsCNIH1</i> ).....	88
Figura 20. Interacción proteína-proteína entre el transportador de Na <sup>+</sup> <i>OsHKT1;3</i> y <i>OsCNIH1</i> .	90
Figura 21. La reconstitución de la fluorescencia indica la interacción de <i>OsCNIH1</i> con <i>OsHKT1;3</i> y demuestra la probable oligomerización de <i>OsCNIH1</i> en hojas de tabaco .....	92
Figura 22. Co-localización Intracelular de <i>OsHKT1;3</i> con <i>OsCNIH1</i> .....	96

Figura 23. <i>OsCNIH1</i> co-localiza con el marcador del sistema COPII <i>AtSec24</i> .....	97
Figura 24. Co-expresión de <i>OsHKT1;3</i> y <i>OsCNIH1</i> en ovocitos de <i>Xenopus</i> previene la expresión de <i>OsHKT1;3</i> en la membrana plasmática.....	99
Figura 25. <i>OsCNIH1</i> restaura la expresión intracelular de <i>OsHKT1;3</i> en la mutante de levadura <i>BY4741<math>\Delta</math>erv14</i> .....	102
Figura 26. La sensibilidad de la mutante <i>BY4741<math>\Delta</math>erv14</i> al $\text{Na}^+$ se restablece por la co-expresión de <i>OsHKT1;3</i> y <i>OsCNIH1</i> .....	104
Figura 27. Respuesta de plantas de arroz cv. Nipponbare y cv. Pokalli al tratamiento con 50 mM de NaCl .....	106
Figura 28. Cuantificación del transcrito de <i>OsHKT1;3</i> y de <i>OsCNIH1</i> en plantas de arroz cv. Nipponbare expuestas a 50 mM de NaCl.....	108
Figura 29. Cuantificación del transcrito de <i>OsHKT1;3</i> y de <i>OsCNIH1</i> en plantas de arroz cv. Pokalli expuestas a 50 mM de NaCl .....	109

## RESUMEN

Las plantas se enfrentan a una gran variedad de estreses tanto bióticos como abióticos. La producción de plantas con interés agrícola está severamente afectada por la erosión de los suelos de cultivo que poseen un alto contenido de sales, principalmente NaCl. Las plantas emplean varias estrategias para poder contender a la salinidad: minimizar la entrada de sodio ( $\text{Na}^+$ ) por las raíces, reducir la entrada de  $\text{Na}^+$  al xilema para evitar su llegada a la parte aérea, o si ya se transportó a la parte aérea, recircularlo por el floema hacia las raíces. Otras alternativas podrían ser, el secuestro del  $\text{Na}^+$  dentro de organelos, como las vacuolas, por medio de antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  o transportarlo hacia las hojas viejas, o incluso acumularlo en tejidos especiales como las células vejiga que están localizadas en la epidermis de las hojas (Tester y Davenport, 2003).

El paso del ion  $\text{Na}^+$  a través de las membranas celulares ocurre mediante proteínas de membrana especiales denominadas transportadores o canales iónicos. Recientemente se han propuesto a los transportadores de captura de alta afinidad pertenecientes a la familia HKT como partícipes en los mecanismos que proveen tolerancia a la salinidad. En *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* se ha sugerido que miembros de esta familia de transportadores juegan un papel importante en evitar que el  $\text{Na}^+$  llegue a la parte aérea removiéndolo del xilema. Los HKT ortólogos en trigo se han propuesto que dirigen al  $\text{Na}^+$  presente en la parte aérea hacia la vaina de la hoja evitando así el alto contenido de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea de tal manera que la fotosíntesis y la síntesis proteica no se afectan.

En *O. sativa* se identificaron 7 genes y 2 pseudogenes que codifican para transportadores HKT, sin embargo, solo dos de ellos se pudieron determinar su participación en la fisiología de la planta.

En el presente trabajo, se analizaron las propiedades de transporte de OSHKT1;3 mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos en el sistema de *Xenopus laevis*. Los resultados obtenidos permiten proponer que OSHKT1;3 muestra una alta selectividad hacia  $\text{Na}^+$  sobre el resto de los cationes alcalinos

analizados, además de ser un transportador de baja afinidad. Otros resultados mostraron que la actividad del transporte de  $\text{Na}^+$  de OsHKT1;3 podría estarse regulando por la fosforilación de esta proteína. La localización de la proteína de este transportador mediante técnicas inmunoquímicas mostraron que este transportador se expresa en el órgano de la raíz de la planta de arroz donde fue abundante en la epidermis, exodermis, haces vasculares como el floema y el xilema así como en la corteza. Esta localización es muy similar a lo que se ha reportado pero a nivel de transcrito para esta misma proteína. Hasta ahora las investigaciones sobre los transportadores HKT han mostrado la localización de estas proteínas en la membrana plasmática. En el presente trabajo mostramos mediante la fusión de OsHKT1;3 a proteínas fluorescentes que éste se localiza intracelularmente, específicamente en el aparato de Golgi. Gracias a un estudio masivo de interacción proteína-proteína con proteínas de Arabidopsis empleando el sistema mbSUS en levadura, se pudieron probar 3233 proteínas, de las cuales 19 proteínas interactuaron con OsHKT1;3, siendo una de ellas Cornichon. La interacción de OsHKT1;3 con OsCNIH1 se demostró por el sistema de la reconstitución de la fluorescencia de la EYFP en epidermis de las hojas de tabaco y del mbSUS en levaduras. Este homólogo de Cornichon en plantas, exhibió un patrón de expresión visto gracias a su fusión a proteínas fluorescentes expresadas en células de la epidermis de tabaco, en varios compartimientos subcelulares tales como el retículo endoplásmico, los sitios de salida del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, lugares donde previos estudios en Cornichon de otras especies parecen expresarse también. De todos los estudios previos hechos en Cornichon se pudo determinar que esta proteína funciona como un receptor cargo participe de la ruta anterógrada del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, esta ruta es mejor conocida como vía COPII. En el presente trabajo se generaron datos de colocalización con varios marcadores de organelos subcelulares fluorescentes en células de la epidermis de tabaco, que nos llevaron a concluir que debido a que OsCNIH1 colocaliza con OsHKT1;3, interactúa con él, sugiriendo que OsCNIH1 funciona también como un receptor cargo en las células vegetales. Para evaluar a mayor profundidad este supuesto se hizo uso de las levaduras como un sistema

de expresión heterólogo y logramos determinar que OshKT1;3 es un cargo de OsCNIH1 debido a que es necesaria la co-expresión de OshKT1;3 junto a OsCNIH1 para que OshKT1;3 pueda llegar a expresarse en el aparato de Golgi, ya que sin la expresión de OsCNIH1, la expresión de OshKT1;3 se localiza en el retículo. Todos estos resultados en su conjunto mostraron datos relevantes y novedosos sobre estas dos proteínas en plantas. Por una parte un receptor cargo no descrito previamente presente en plantas importante para el tráfico vesicular anterógrado y por otro lado un transportador de Na<sup>+</sup> de la familia HKT no localizado en la membrana plasmática y ubicado en el aparato de Golgi.

## ABSTRACT

Plants deal with a sort of different stresses such as abiotic and biotic. Agronomic plants are affected by soil erosion with a high percentage of salt on it, mainly NaCl. Plants employ different actions to encounter salinity stress: minimizing root sodium uptake ( $\text{Na}^+$ ), fending off  $\text{Na}^+$  access to the xylem to prevent it reaches the leaves, or if  $\text{Na}^+$  is already in leaves it can be recirculated to the roots by phloem. Plants can segregate  $\text{Na}^+$  into organelles such as vacuoles applying carries like  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters or accumulating it into specialized cells as the bladder cells or as well in older leaves.

$\text{Na}^+$  only can cross cellular membranes through integral membrane proteins named ion channels or ion transporters. The high affinity  $\text{K}^+$  transporters (HKT) have been related as part of salt tolerance mechanisms. There are reports on *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* of HKT transporters as participants in removing  $\text{Na}^+$  out of the xylem in order to prevent it reaches the leaves. In wheat, HKT transporters can accumulate  $\text{Na}^+$  on the leave sheath to allow photosynthesis and protein synthesis to proceed normally.

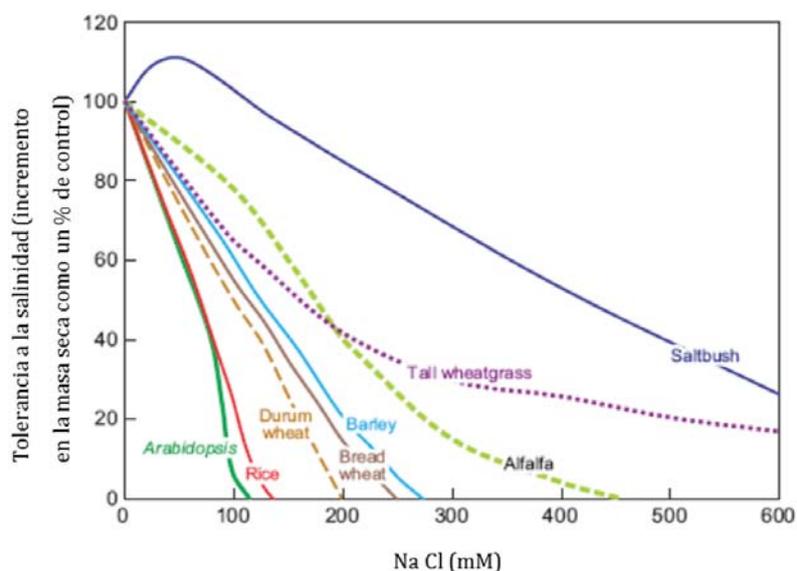
*O. sativa* has 9 HKT coding genes, two of them are pseudogenes. Only two of the seven have been reported their participation in plant physiology.

In this thesis the transport properties of the protein OSHKT1;3 was analyzed by employing the voltage-clamp technique in *Xenopus*' oocytes. OSHKT1;3 displays a high  $\text{Na}^+$  selectivity over the rest of the alkaline cations and a low affinity to it. It was shown that the phosphorylation status of the protein is necessary for the  $\text{Na}^+$  activation currents. Immunocytochemistry techniques showed localization of the OSHKT1;3 protein in the rice root tissues such as epidermis, exodermis, cortex, xylem and phloem vasculature. The protein location is relative similar to that reported for the transcript. All HKT transporters has been located to the plasma membrane, though in the present work by means of fluorescent protein fusion to OSHKT1;3, it is shown an intracellular location, specifically in the Golgi apparatus of the tobacco cell epidermis leaves. Massive screen search was applied in order

to look at 3233 interacting possible Arabidopsis proteins with OsHKT1;3 through the mating base split-ubiquitin system (mbSUS) in yeast. Nineteen-interacting OsHKT1;3 proteins were found, and Cornichon was present among them. Visualization of the interaction between OsCNIH1 and OsHKT1;3 was achieved by the bimolecular fluorescent complementation of the enhanced yellow fluorescent protein in leave epidermis cells of tobacco and by mbSUS in yeast. OsCNIH1 could be located at several intracellular compartments by the emission of the fluorescent proteins attached to it in tobacco plant cells, such as ER, endoplasmic reticulum exit sites (ERES) and Golgi, location previously reported for the animals and yeast Cornichon homologues. Several former studies done with Cornichon reveal it as a cargo receptor participating in the anterograde secretion path from the ER to the Golgi, titled COPII pathway. All data generated from co-localization studies in plant cells from tobacco showed that OsCNIH1 co-localized and interacted with OsHKT1;3, suggesting a cargo receptor function of OsCNIH1. To further evaluate this suggestion, *S. cerevisiae* was used as a heterologous expression system to bring about results of OsHKT1;3 as a cargo protein for OsCNIH1 attributable to the consequently co-expression of OsHKT1;3 along with OsCNIH1 in the yeast cells necessarily for the OsHKT1;3 Golgi location. Taken together, the data presented in this thesis reveal relevant and unique features for these two proteins. The outstanding trait for OsCNIH1 as the cargo receptor function, indicated that is not unique among the Cornichon family and it was not reported before in plant cells. In addition, the Na<sup>+</sup> selective transporter OsHKT1;3 showed to be essentially located at Golgi apparatus, being the first HKT member described that is not restricted to the plasma membrane.

## INTRODUCCIÓN

A partir de que las sociedades humanas comenzaron con la práctica de la agricultura se cree que se inició el desarrollo de civilizaciones auto-sustentables. La práctica de cultivar plantas requiere una fuerte labor, conocimiento y habilidades que actualmente se estudian para mejorar la calidad de las técnicas de producción y la transformación de los productos agrícolas. Principalmente los procesos se enfocan al tratamiento del suelo, control de plagas y mejoramiento de las especies de interés para lograr un incremento en la productividad agrícola.



**Figura A. Diversidad en la tolerancia a la salinidad de varias especies.** Se muestra el incremento de la masa seca de la parte aérea con respecto al incremento de NaCl durante 3 semanas. Estos valores se hicieron relativos a plantas en condiciones control. Datos de arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum turgidum ssp durum*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), trigo salvaje (*Thinopyrum ponticum, syn. Agropyron elongatum*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), alfalfa (*Medicago sativa*), y arbusto salino (*Atriplex amnicola*).

Sin embargo, estudios agronómicos muestran que el tratamiento de los suelos como las prácticas de limpia y la irrigación han causado que una gran porción de los suelos agrícolas se hayan modificado aumentando su contenido de sales, principalmente NaCl. Estas prácticas agrícolas provocan superficies freáticas que

incrementan y concentran las sales (principalmente NaCl) en la zona de las raíces. Los reportes muestran que de los 1500 millones de ha (hectáreas) usadas para la agricultura en zonas semiáridas, 32 millones (2%) se han afectado por estas prácticas a diferentes niveles. Por otro lado, de los 230 millones de ha sujetas a irrigación, 45 millones (20%) son afectadas por la salinidad. Resulta interesante que de todas las tierras cultivadas, las irrigadas abarcan el 15%, sin embargo su productividad es del doble, comparada con aquella de suelos agrícolas que dependen de la lluvia, de manera que son proveedoras de 1/3 de la comida en el mundo e irónicamente al usar el sistema de irrigación se ven afectadas por la salinidad (FAO, 2010).

En la figura A se puede observar que la tolerancia de las plantas al estrés por sal varía. De los cereales, el arroz (*Oryza sativa*) es el más sensible y la cebada (*Hordeum vulgare*) es la más tolerante, sin embargo, la cebada no llega a ser tan tolerante a la salinidad como lo es arbusto salino (*Atriplex amnicola*). También se puede apreciar que *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) es una de las plantas más sensible a la salinidad (Fig. A).

### **Mecanismos de acción contra el estrés por NaCl en las plantas**

La salinidad ejerce dos tipos de estrés sobre las plantas: el estrés osmótico y el estrés iónico. Lo primero que se afecta por el estrés osmótico es el crecimiento, ya que se disminuye el potencial hídrico y con ello la expansión celular. Por otro lado el estrés iónico se desarrolla con el tiempo y se debe a una combinación de la acumulación de los iones en la parte aérea y a una incapacidad de tolerar a los iones acumulados en este tejido. En general las especies que son más sensibles a la salinidad carecen de la habilidad de controlar el transporte de  $\text{Na}^+$ , por ello se cree que el estrés iónico tiene un mayor impacto sobre las plantas que el estrés osmótico. Básicamente y de manera muy general, son cuatro los mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas:

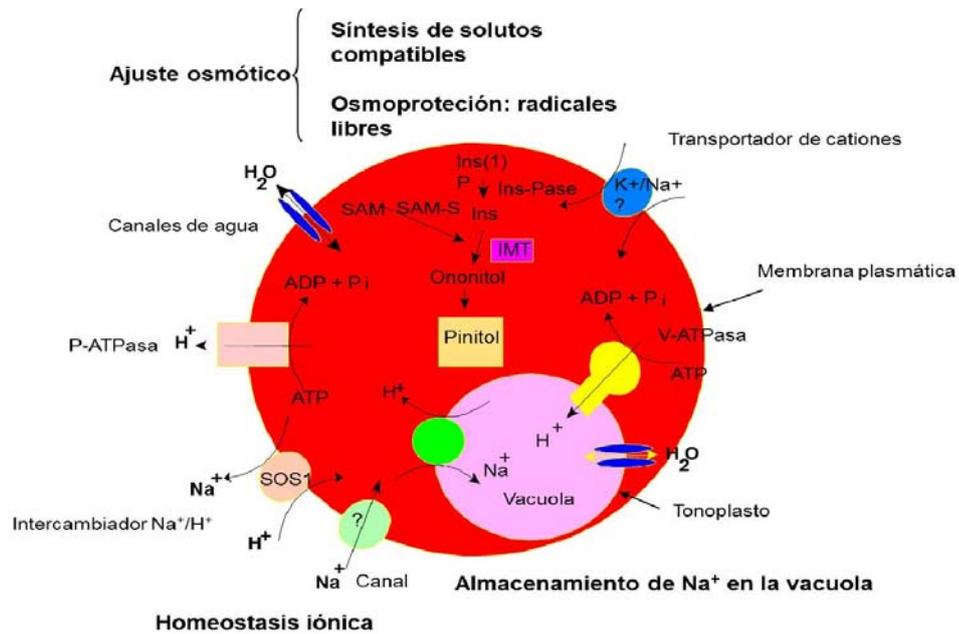
1. Tolerancia al estrés osmótico. Para tolerar el estrés osmótico se reduce de manera inmediata la expansión celular en las puntas de las raíces y en las

hojas jóvenes, al mismo tiempo que se cierran los estomas y se inicia la biosíntesis de solutos compatibles que actúen como osmoprotectores. Además se ha reportado que las proteínas LEA (late embryogenesis abundant) se acumulan para proteger la actividad de algunas proteínas durante este estrés.

2. Remoción del  $\text{Na}^+$  de las hojas. Remover el  $\text{Na}^+$  desde las hojas hacia las raíces asegura que el  $\text{Na}^+$  no se acumule en concentraciones tóxicas dentro de las hojas. Esto se logra mediante transportadores iónicos encargados de la recirculación del  $\text{Na}^+$  y su posterior expulsión hacia el exterior de la planta por mecanismos aun no descritos.
3. Tejidos especializados en la tolerancia al  $\text{Na}^+$ . La tolerancia al  $\text{Na}^+$  requiere del almacenaje de éste ion a nivel celular o intracelular, ya sea en organelos como las vacuolas, o tejidos especializados en el almacenaje (células vejiga) o excreción (glándulas de sal) del  $\text{Na}^+$ . El almacenamiento o secuestro del  $\text{Na}^+$  en estos compartimentos es necesario para evitar el incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma mediante proteínas de transporte iónico.
4. Tolerancia al estrés oxidativo. Los mecanismos mejor conocidos para la tolerancia al estrés oxidativo son la síntesis de glutatión y ascorbato, así como la participación de enzimas como la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, deshidroascorbato reductasa y catalasas, encargadas de disminuir la concentración de radicales libres generados por el estrés salino.

Indudablemente, en cada uno de estos cuatro mecanismos se engloban procesos complejos en donde existe la participación de diversos genes para lograr con éxito la tolerancia a la salinidad (Munns & Tester, 2008; Cuevas-Velazques et al., 2014).

#### **Mecanismos a nivel celular para la tolerancia al estrés salino**



**Figura B. Principales mecanismos para la tolerancia a la salinidad en plantas.**

En la figura B se puede observar de manera resumida la participación de varios mecanismos a nivel molecular para lograr la homeostasis iónica y osmótica de las células vegetales tomando como ejemplo lo descrito para la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* ante el estrés por sal (Barkla & Pantoja, 1996; Barkla et al., 2009; Barkla et al., 1999; Kirch et al., 2000; Su et al., 2001; Vera-Estrella et al., 2012). Uno de los mecanismos para confrontar el estrés por el Na<sup>+</sup> es mediante su exclusión o secuestro de las células. Las plantas hacen uso de transportadores o canales iónicos para lograr este proceso. Estos diferentes transportadores o canales podrían estar ubicados en diferentes membranas celulares, ya sea en la membrana plasmática o en el tonoplasto. Los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> se encargan de remover al Na<sup>+</sup> del citoplasma, ya sea hacia el espacio extracelular o al interior de la vacuola utilizando el gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> generado por las H<sup>+</sup>-ATPasas ubicadas tanto en la membrana plasmática como en el tonoplasto (Garbarino & Dupont, 1988; Barkla & Pantoja, 1996). Dentro de las proteínas participantes durante estos ajustes están

la enzima mio-inositol-metiltransferasa, involucrada en la síntesis de pinitol, el osmolito más abundante en esta planta (Adams et al., 1998), cuya síntesis aumenta el potencial osmótico de la célula que junto con la actividad de las aquaporinas o canales de agua mantienen la osmolaridad de las células. Los canales CNGC (“Cyclic Nucleotide Gated Channel”), LCT (“Low-affinity Cation Transporter”) y VIC (“Voltage-Insensitive monovalent Cation channel”; Amtmann et al., 2001; Balagué et al., 2003; Maathuis & Sanders, 2001; White, 1999) corresponden a los posibles transportadores involucrados en la absorción del  $\text{Na}^+$  a la célula (Fig. B).

### **El uso de *Arabidopsis* en estudios de tolerancia a la salinidad**

Si bien existen dudas sobre el uso de *Arabidopsis thaliana* como un organismo modelo para los estudios de tolerancia a la salinidad debido a su sensibilidad a altas concentraciones de sal, aún se plantea si esta planta ha mantenido durante la evolución genes de tolerancia a éste estrés. Estudios de genética inversa han generado varios fenotipos de tolerancia (Quesada et al., 2000) y de hipersensibilidad a la salinidad como el sistema SOS (salt overly sensitive; Wu et al., 1996) que se conforma por una proteína dependiente de calcio similar la calcineurina tipo B (CBL; SOS2), una cinasa de proteínas dependiente de la CBL (CIPK; SOS3) y el antiportador  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  (SOS1). La vía de señalización derivada de CBL-CIPK regula la actividad del antiportador generando una tolerancia al estrés al  $\text{Na}^+$ . Mecanismo que se ha propuesto estar presente en arroz (Martinez-Atienza et al., 2007). Además un estudio llevado a cabo con distintos ecotipos de *Arabidopsis* demostró que para el caso de *AtSOS1* existió una correlación inversa de la expresión y de la acumulación total de  $\text{Na}^+$  en la planta en los ecotipos más tolerantes. De la misma manera se observó que los ecotipos con una gran expresión de *AtHKT1;1* en las raíces mostraron menores concentraciones de  $\text{Na}^+$  en las hojas (Shirley et al., 2010) donde se ha demostrado que la sobre-expresión en la estela de la raíz de *AtHKT1;1* incrementa la tolerancia a la salinidad (Moller et al., 2009). Este mecanismo también está presente en arroz (Ren et al., 2005). Estos estudios ilustran que todas las plantas poseen en sus genomas genes que

están involucrados en la tolerancia a la salinidad, sin embargo sin una presión selectiva es probable que dichos genes no se expresen propiamente para llegar a conferir tolerancia a la salinidad.

### **Estrés salino en arroz**

El arroz es un cereal de alto consumo alrededor del mundo, ya que es una fuente de carbohidratos, es libre de colesterol, posee niacina, vitamina D, calcio, hierro, tiamina y riboflavina. Como anteriormente se mencionó, el arroz es sensible a la salinidad, sin embargo dentro de la especie *Oryza sativa* existen variedades que muestran tolerancia a la salinidad que pertenecen principalmente a las denominadas Indica que provienen de la India o las Filipinas o a las variedades denominadas Japonica, que provienen de China y Corea. Las variedades Indica han mostrado una mayor tolerancia a la salinidad que las variedades Japonica (Lee et al., 2003). De ambas variedades se tiene estudios sobre los efectos del estrés salino así como fuentes curadas de datos y de libre acceso en donde se pueden realizar análisis genómico comparativo.

Mediante mapeos de QTLs (Quantitative Trait Loci) se mostró que la tolerancia a la salinidad de algunas variedades de arroz está dada por características multigénicas abarcando la participación de transportadores iónicos (Gong et al., 1999, 2001). En una variedad tolerante, Nona Bokra, se ha observado que a nivel molecular existe una secuencia de pasos para poder enfrentar al estrés salino. Mediante un estudio de microarreglos se mostró que los primeros genes en cambiar su expresión ante la salinidad fueron los relacionados a la regulación de la expresión genética como factores de transcripción, y/o la regulación de proteínas, como lo son las cinasas de proteínas. Después se encuentran los que se encargan de mantener el balance osmótico y/o la homeostasis iónica, así como aquellos que participan en procesos de inhibición del crecimiento celular. Por último están los que participan en la fotosíntesis y en la síntesis de carbohidratos (Chao et al., 2005). Por otro lado, los genes como OsCDPK7 (Calcium Dependent Protein Kinase), la fosfatasa 2C y la glyoxalasa, que ayuda a combatir a los aldehídos reactivos que se generan durante el estrés oxidativo, así como genes de

la familia SYP (sintaxina), perteneciente a la super familia de las SNARE, previamente caracterizados como importantes en la respuesta ante la salinidad supuestamente regulando a los transportadores/canales iónicos presentes en las células guarda importantes en la apertura y cierre de los estomas (Ohta et al., 2003; Saijo et al., 2000; Singla-Pareek et al., 2003; Zhu et al., 2002a), no cambiaron su expresión en la planta sensible IR28, mientras que en Nona Bokra sí lo hicieron (Chao et al., 2005).

En otra variedad sensible a la salinidad denominada Wuyunfing 8 se observó que la actividad de la P-ATPasa disminuye 48 h después del tratamiento con 150 mM NaCl (Cheng et al., 2009). Aunque no se sabe cómo se regula la actividad de la P-ATPasa, la cual es importante para mantener la fuerza motora de protones en plantas, se ha observado que los niveles de PIP2 (fosfatidil-inositol-bifosfato) y de PA (ácido fosfatídico) aumentan a los 5 min de exposición a 250 mM de NaCl (Darwish et al., 2009). Recientemente se ha observado la participación directa de cardiolipinas y fosfatidiletanolamina en la regulación de la V-ATPasa de *Enterococcus hirae* y *Thermus thermophilus*, respectivamente (Zhou et al., 2011), en donde los lípidos se intercalan en la subunidad  $V_0/F_0$ , la cual se encarga de transportar al  $\text{Na}^+$  o al  $\text{H}^+$  a través de la membrana, disminuyendo el radio del poro de la subunidad  $V_0/F_0$  obstruyendo el transporte de iones (Zhou et al., 2011).

En otra variedad sensible a la salinidad, Zhongua, se observó que una mutación provocó un fenotipo que los autores denominaron como DST (Drought and Salt Tolerant). Después se reveló que la tolerancia a la salinidad en esta mutante depende en un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados a la homeostasis del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como se sabe, durante la señalización por ABA (Abscisic Acid) se incrementa la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocasionando el cierre de los estomas, mecanismo que se sabe es importante para la tolerancia a la sequía y la salinidad (Zhu, 2002b). Otro rasgo que se observó en la mutante *dst* fue una menor densidad de estomas y en consecuencia, una menor conductividad estomática lo que generó un incremento en la tolerancia a la sequía y la salinidad (Huang et al., 2009). Por otra parte el tránsito de  $\text{Na}^+$  mediante transportadores o

canales iónicos ocurre diferencialmente en variedades sensibles y tolerantes. En un estudio comparativo de las variedades de arroz, BRR1 Dhan29 (sensible) y Pokkali (tolerante), se observó que el contenido de  $\text{Na}^+$  citoplasmático de los protoplastos de BRR1 Dhan29 fue mayor que en Pokkali durante el estrés salino (Kader y Lindberg, 2005). Al usar bloqueadores típicos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , se observó una disminución en la concentración de  $\text{Na}^+$  citoplasmático en los protoplastos de las hojas de la variedad de Pokkali bajo estrés por sal y estos no tuvieron el mismo efecto en los protoplastos de BRR1 Dhan29. Estos resultados sugieren una expresión diferenciada en la membrana plasmática de transportadores o canales iónicos en estas dos variedades de arroz (Kader & Lindberg, 2005). Otro dato que indica que la selectividad iónica es un factor determinante para evitar la acumulación del  $\text{Na}^+$  es el reporte en donde se muestra que la expresión del canal de  $\text{K}^+$  OsKAT1 permite que se mantenga el balance iónico adecuado de una línea celular de arroz bajo estrés salino (Obata et al., 2007). Se piensa que la aportación de OsKAT1 es aminorar el estrés salino debido a su alta selectividad por  $\text{K}^+$  y probablemente a la cooperación que tenga con otros canales de la familia AKT-KAT, los cuales se expresan ubicuamente en el arroz (Obata et al., 2007) y se asocian entre sí para formar hetero-oligómeros (Baizabal-Aguirre et al., 1999; Pilot et al., 2001) lo que podría originar variaciones en la actividad de transporte iónico, manteniendo la proporción  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  interna, estable. Otro mecanismo que se propone es importante en el mantenimiento de la proporción  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  baja es el aislamiento de la raíz mediante la suberina. La mayor parte del  $\text{Na}^+$  se interioriza a la planta a lo largo del apoplasto, y se ha observado que la tolerancia de las plantas de arroz a la salinidad se asocia a la suberización de las raíces lo que ocasiona una menor absorción de  $\text{Na}^+$  y de agua (Krishnamurthy et al., 2011; Malagoli et al., 2008).

### **Los transportadores HKT y su asociación a la tolerancia a la salinidad**

Inicialmente, los transportadores HKT (High Affinity K<sup>+</sup> Transporter) se caracterizaron como co-transportadores  $\text{K}^+-\text{H}^+$ , como lo fue el co-transportador TaHKT2;1 (Schachtman & Schroeder, 1994). Trabajos posteriores ampliaron estos

resultados y se pudo demostrar que este mismo transportador puede funcionar como un mecanismo de transporte de baja afinidad por  $\text{Na}^+$ , cuando este catión se encuentra en concentraciones milimolares (mM). Esta actividad es dominante sobre el transporte de alta afinidad a  $\text{K}^+$ , lo que sugirió que los transportadores HKT son una vía de entrada de  $\text{Na}^+$  en las plantas en condiciones de salinidad (Gassmann et al., 1996; Rubio et al., 1999).

Posteriormente, se han identificado otros transportadores HKT que pueden transportar  $\text{Na}^+$ , como *AtHKT1;1* (Uozumi et al., 2000), *OsHKT2;1*, *OsHKT1;5*, *OsHKT1;1* (Garcia de Blas et al., 2003; Gollack et al., 2002; Horie et al., 2001; Ren et al., 2005) *PutHKT2;1* (*Puccinellia tenuiflora*) y *PhaHKT2;1* (*Phragmites australis*; Ardie et al., 2009; Takahashi et al., 2007).

Se ha propuesto que *AtHKT1;1* tiene una función en la remoción del  $\text{Na}^+$  del xilema en las raíces donde flujo de este catión puede suceder de manera pasiva desde los haces vasculares del xilema hacia las células del parénquima del xilema (Munns, 2005), y así se previene el transporte de  $\text{Na}^+$  hacia las partes aéreas. Interesantemente *AtHKT1;1* parece no estar relacionado con la absorción de  $\text{Na}^+$  por las raíces, ya que su expresión analizada mediante el sistema del gen reportero GUS ( $\beta$ -Glucoronidasa) se limita a los haces vasculares del xilema (Davenport et al., 2007) y/o en la estela de la raíz (Moller et al., 2009).

Se ha observado en arroz y otras plantas que la absorción de  $\text{Na}^+$  a concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) puede ser benéfica. En esta absorción de alta afinidad por  $\text{Na}^+$  participa *OsHKT2;1* y se ha reportado que en condiciones de deficiencia de  $\text{K}^+$ , la absorción de  $\text{Na}^+$  en concentraciones  $\mu\text{M}$  evita la pérdida de la turgencia celular debido a la falta de  $\text{K}^+$ , lo que permite el crecimiento celular continuo (Horie et al., 2007).

Por otro lado, *OsHKT1;5* se identificó mediante el mapeo de un QTL de tolerancia a la salinidad en la variedad de arroz Nona Bokra cv. Indica (Ren et al 2005). Su expresión mediante el gen reportero GUS mostró que ocurre en las células del parénquima del xilema, lo que condujo a estos autores a proponer a *OsHKT1;5*

como un mecanismo involucrado en la remoción del  $\text{Na}^+$  del xilema. Un papel similar se ha propuesto para *AtHKT1;1* (Davenport et al., 2007). y los ortólogos de trigo *TmHKT1;4* (*Triticum monococcum*), que participan en la remoción del  $\text{Na}^+$  del xilema en la raíz (Byrt et al., 2007; Benderradji et al., 2011) así como en la base de la hoja, conocida como cobertura de la hoja. En la cobertura de la hoja se midieron concentraciones altas de  $\text{Na}^+$ , siendo éstas muy elevadas con respecto a las de la lámina de la hoja. Los autores proponen que este transportador retiene al  $\text{Na}^+$  en la cobertura de la hoja, previniendo así, que el  $\text{Na}^+$  llegue a la hoja evitando el daño a los procesos enzimáticos en el citoplasma (Huang et al., 2006; James et al., 2011). En cebada se ha relacionado a *HvHKT1;1* y a *HvHKT2;1* en mantener la proporción  $\text{Na}^+:\text{K}^+$  baja, función que podría ser la misma a sus homólogos en trigo. Estas deducciones se basan en estudios de asociaciones con SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en 189 variedades tolerantes a la salinidad de cebada y de su expresión a nivel de transcrito (Qiu et al., 2011). El grupo de Rodríguez-Navarro ha propuesto a los HKT, sobre todo a *OsHKT2;1*, como un mecanismo de transporte de alta afinidad a  $\text{Na}^+$  y que esta captura se inhibe por la presencia de  $\text{K}^+$ , lo cual concuerda con los resultados reportados (Garcíadeblás et al., 2003; Horie et al., 2007). Por otro lado *OsHKT1;1* participa en el transporte de baja afinidad por  $\text{Na}^+$  en levaduras mutantes ( $\Delta\text{trk1}\Delta\text{trk2}$ ) en los mecanismos de alta afinidad de toma de  $\text{K}^+$ , sin embargo, no reportó actividad alguna para *OsHKT1;3* al expresarse en estas mismas mutantes de levadura. Posteriormente se describió en los ovocitos de *Xenopus laevis* que *OsHKT1;3* es un transportador de baja afinidad pero de alta selectividad a  $\text{Na}^+$  (Rosas-Santiago, 2008; Jabnourne et al., 2009). La expresión de los transcritos observados mediante hibridaciones *in situ* realizados en tejidos de la raíz de *OsHKT2;1*, *OsHKT1;1* y *OsHKT1;3* se mostró en la epidermis, exodermis, tejidos vasculares como el parénquima del xilema y floema así como en la corteza. Por otro lado en la hoja se observaron en las células bulliformes de la epidermis adaxial así como en los tejidos vasculares. La propuesta sobre la función de *OsHKT1;1* y *OsHKT1;3* como participes en la exclusión del  $\text{Na}^+$  en la planta de arroz surge a partir de las evidencias previas presentadas de la actividad de sus homólogos (Jabnourne et al., 2009)., sin

embargo es necesario demostrar con evidencia directa la intervención en la tolerancia a la salinidad de estos transportadores

A partir de los datos obtenidos hasta ahora sobre la función de los transportadores HKT se les consideran importantes participantes en los mecanismos de la tolerancia a la salinidad en plantas.

### **Regulación de los transportadores iónicos**

El arroz no es una planta halófila, sin embargo se han identificado cultivares de arroz resistentes a la salinidad, como el cultivar Indica.

Las plantas halófitas como *Mesembryanthemum crystallinum*, poseen tejidos especializados como las células vejiga que proveen tolerancia a la salinidad, (Adams et al., 1998). El arroz, no posee esta capacidad de almacenaje de  $\text{Na}^+$ , por lo que un transporte de  $\text{Na}^+$  altamente regulado es necesario para evitar desajustes iónicos para la planta. Es por ello que la regulación de la actividad de los transportadores de  $\text{Na}^+$  presentes en la raíz, como lo es OSHKT1;3, debe ser necesaria para mantener el flujo adecuado de  $\text{Na}^+$  a través de la planta.

Se ha reportado la regulación post-traducciona de los canales y transportadores iónicos se mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Este segundo mensajero participa en diferentes procesos, como el crecimiento del tubo polínico (Holdaway & Hepler, 2003), el movimiento de los estomas (Young et al., 2006) y la respuesta de las leguminosas a los factores de nodulación (Shaw & Long, 2003).

Se ha propuesto que las células vegetales deben de mantener las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmicas ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ ) bajas ya que actúa como un segundo mensajero muy versátil controlando una multitud de reacciones celulares y respuestas adaptativas. Para ello existen bombas o transportadores como las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas y los transportadores CAX que son antiportadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  localizados en la membrana vacuolar (Barkla et al., 2008; Cho et al., 2012; Punshon et al., 2012; Yang et al., 2012). Con el uso de varias técnicas, como indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , electrofisiología, plantas mutantes, plantas transgénicas y

farmacología, se ha propuesto que estímulos como el ABA, especies reactivas de oxígeno (ej.  $H_2O_2$ ) o pH generan incrementos en las concentraciones de  $Ca^{2+}_{cit}$ , ya sean temporales o de larga duración (Hetherington & Brownlee, 2004).

Ejemplos de esa regulación por  $Ca^{2+}$  son: 1) El canal de  $K^+$  rectificador entrante AKT3 (Arabidopsis K<sup>+</sup> Transporter) que se expresa abundantemente en el floema y que sugiere que su función es en el transporte de  $K^+$  hacia el interior del floema se regula por  $Ca^{2+}_{cit}$  (Marten et al., 1999). 2) En las células guarda, se ha observado la expresión de los canales de  $K^+$  rectificadores entrantes KAT2/3 (K<sup>+</sup> Arabidopsis Transporter) que participan en la apertura y cierre de los estomas cuya actividad es sensible a  $Ca^{2+}_{cit}$  (Ivashikina et al., 2005). 3) La regulación por  $Ca^{2+}_{cit}$  del canal TPC1 (Two-Pore Channel) de Arabidopsis ubicado en la vacuola es otro ejemplo sobre la diversidad de mecanismos de transporte iónico que dependen de la concentración de  $Ca^{2+}_{cit}$  (Dadacz-Narloch et al., 2011). 4) Por otra parte existe evidencia de que los canales NSCC (Non Selective Cation Channels) puedan ser bloqueados por  $Ca^{2+}$  mediante la obstrucción del poro del canal (Davenport & Tester, 2000; Very et al., 1998).

Existe otra forma de regulación de la actividad del transporte de los canales iónicos por  $Ca^{2+}$ , sin embargo, esta regulación no es directa como los procesos que se han descrito anteriormente. Esta regulación sucede mediante la participación del dúo compuesto de la proteína tipo Calcineurina tipo B (CBL) y la cinasa de proteínas independiente de  $Ca^{2+}$  que interactúa con la CBL (CIPK). Se ha descrito que cuando el calcio citoplásmico aumenta en respuesta al estrés salino, se promueve la interacción CBL-CIPK (Sánchez-Barrena et al., 2007; Shi et al., 1999), lo que permite la fosforilación de sus proteínas blanco (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Por ejemplo, CBL4 y CIPK24 interactúan para regular la actividad del antiportador  $Na^+-H^+$  SOS1 de la membrana plasmática para remover al  $Na^+$  del citoplasma cuando las células están bajo estrés salino (Chinnusamy et al., 2004; Shi et al., 2000). La participación de este complejo CBL-CIPK sucede aparte del estrés por sal en la adaptación a la sequía y el estatus nutricional. Se ha reportado que CBL1 y CBL9 interactúan con CIPK23 para regular la actividad del canal

AKT1 mediante su fosforilación, lo cual causa que el canal se abra, y que su desfosforilación por una fosfatasa de la familia PP2CA, AIP1, lo cierra (Cheong et al., 2007; Lee et al., 2007; Xu et al., 2006). En el canal AKT2 se demostró que CIPK6 forma un complejo con la CBL4 para incrementar su actividad de transporte iónico, pero que el incremento en la actividad del canal AKT2 no se debió a la fosforilación del mismo sino a una translocación de AKT2 del retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática y que esta translocación es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Held et al., 2011). Estos resultados revelan lo complejo del sistema CIPK-CBL para la regulación de los canales iónicos en Arabidopsis. En arroz no se tiene evidencia de la regulación en la actividad de canales o transportadores iónicos mediante este complejo CIPK-CBL, excepto para el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  OsSOS1, donde se observó que el complejo CIPK24-CBL4, tanto de Arabidopsis como de arroz, activan al antiportador (Martínez-Atienza et al., 2007). El canal de  $\text{K}^+$  OsAKT1 también se regula por un complejo específico CBL1-CIPK23 (Li et al., 2014).

También el pH puede regular la actividad de canales iónicos independientemente del  $\text{Ca}^{2+}$ , tal es el caso de KST1 en papa ( $\text{K}^+$  *Solanum tuberosum* Transporter; Hoth et al., 1997), o los canales de malato de la vacuola (Pantoja & Smith, 2002), así como los anti-transportadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (Pittman et al., 2005). En el canal rectificador entrante de  $\text{K}^+$  SKT1 se observó que la corriente disminuyó cuando se alcalinizó el pH extracelular (Zimmermann et al., 1998), y se propuso que la histidina (H267) ubicada cerca de la región del poro es la responsable de la sensibilidad al pH. En el caso del canal rectificador entrante de  $\text{K}^+$  de *Arabidopsis thaliana* KAT1, y de manera similar, la histidina (H267) participa en la sensibilidad al pH, sin embargo se descubrió que un residuo de ácido glutámico (E240), también ubicado en el poro, participa en la activación mediante la acidificación de la parte extracelular- (González et al., 2012).

Otra forma de regulación de la actividad de transportadores o canales iónicos es por la formación de hetero-oligómeros con otros transportadores de la misma familia. Datos sobre este tipo de asociación provienen principalmente de la familia

de los canales tipo Shaker como KAT, AKT, SKT y KST (Dreyer et al., 1997; Xicluna et al., 2007; Zimmermann et al., 2001). Estudios sobre estos canales han demostrado que las diferentes combinaciones (oligomerización) que se pueden establecer entre ellos, pueden regular su afinidad por  $K^+$ , o sus propiedades electrofisiológicas, como es la rectificación, haciendo de esta una vía de regulación adicional para la absorción o liberación de  $K^+$  de acuerdo a las necesidades de la célula. Otro ejemplo de hetero-oligomerización lo constituyen *AtAMT1;1* y *AtAMT1;2*, los transportadores de alta y baja afinidad a amonio, respectivamente, los cuales se ha demostrado que interactúan entre sí formando trímeros funcionales (Ludewig et al., 2003). Sin embargo, la asociación entre estos dos transportadores no cambia su afinidad por el amonio (Ludewig et al., 2003). La oligomerización de proteínas de transporte no es exclusiva de plantas, por ejemplo, en los eritrocitos de humanos existe el transportador de glucosa GLUT1, el cual puede existir en forma de dímero o tetrámero. En forma de dímero posee un solo sitio de unión a glucosa y en forma de tetrámero posee varios sitios de unión. Este hallazgo presupone una regulación del transporte de glucosa en respuesta a la demanda energética de las células (Heberts & Carruthers, 1992). Otro ejemplo de este tipo de interacción son los transportadores de sacarosa de plantas. Schulze y col (2003) demostraron que *AtSUC2* (Sucrose transporter) y *AtSUT4* (Sucrose Transporter), transportadores de alta y baja afinidad de sacarosa, respectivamente, junto con *AtSUT2* se expresan en las células acompañantes del floema en las venas menores de las hojas. Esta coincidencia en la expresión de las tres proteínas en las mismas células llevó a proponer que pudiera existir una hetero-oligomerización. Estos autores demostraron mediante el empleo del sistema de ubiquitina dividida (split ubiquitin system) que *AtSUC2* interacciona con *AtSUT2* y *AtSUT4*, aunque no se reportó si las propiedades de transporte de los heterooligómeros fue o no diferente a la de los homooligómeros (Schulze et al., 2003).

Otra forma de regular la actividad de los transportadores iónicos es mediante su abundancia en la membrana. Este proceso se lleva a cabo por varias vías. Una de ellas sería mediante la ubiquitinación, que es el proceso por el cual se conjuga la

ubiquitina a una proteína específica y con ello se pueda regular la estabilidad, la actividad o la localización de la proteína ubiquitinada. Mediante este complejo proceso las proteínas cargo marcadas mediante su ubiquitinación son destinadas a los lisosomas o las vacuolas para su degradación (Hicke & Dunn, 2003). La abundancia de las proteínas de transporte también puede ser regulada mediante la vía secretoria por la cual estas proteínas tienen que transitar, previo a su llegada al lugar de residencia donde llevaran a cabo su función. La vía secretoria más conocida es la ruta COPII en la cual se pueden transportar tanto proteínas de membrana como proteínas solubles. En plantas, levaduras y humanos se sugiere que la selección de proteínas cargos es a través de Sec24, una subunidad del complejo COPII (Conger et al., 2011; Faso et al., 2009; Mancias & Goldberg, 2008; Miller et al., 2002; Mossessoiva et al., 2003), inclusive se han detectado los dominios que actúan para la selección de los cargos (Miller et al., 2003; Mossessoiva et al., 2003). Se ha observado que existen otras proteínas importantes denominadas “receptores-cargo”, las cuales participan en la selección de las proteínas cargo que pueden ser proteínas solubles destinadas a la secreción o proteínas de membrana destinadas a intercalarse en las membranas de diferentes organelos o vesículas (Dancourt & Barlowe, 2010). La participación de estos receptores-cargo mejora la especificidad de la vía secretoria debido a la estrecha selección de un receptor por su cargo, de tal manera que la distribución celular de este cargo sea específica (Dancourt & Barlowe, 2010). En las levaduras, la participación de las proteínas Erv (Endoplasmic reticulum vesicle) como receptores cargo está puesta de manifiesto debido a su asociación con las vesículas COPI y COPII, su reciclaje entre el retículo endoplásmico y el Golgi, y la inhibición selectiva del transporte del cargo al mutar uno de estos genes (Belden & Barlowe, 2001). Un ejemplo de este mecanismo es Erv29p quien selecciona proteínas solubles secretorias como la carboxypeptidasa Y así como a la proteinasa A (Belden & Barlowe, 2001; Otte & Barlowe, 2004). Por otro lado, Erv26p participa en la exportación de proteínas de membrana tipo II como la fosfatasa alcalina y la manosiltransferasa (Bue & Barlowe, 2009; Bue et al., 2006). Es interesante mencionar que Erv14p participa en la exportación de proteínas de

membrana desde el retículo endoplásmico a través de vesículas de transporte tipo COPII (Herzig et al., 2012; Powers & Barlowe, 1998, 2002). El receptor de cargo, Erv14p de levaduras, es una proteína conservada en las células eucariotas, inicialmente identificada en *Drosophila* como Cornichon (pepinillo; Roth et al., 1995), después en mamíferos se demostró que se asocia a los receptores de glutamato tipo AMPA (Schwenk et al., 2009). En plantas, hay poca información sobre el posible papel que desempeñan estos receptores cargo en las vías de secreción, con la excepción de los receptores de cargo vacuolares que participan en la selección de proteínas solubles para ser llevadas al lumen de la vacuola (Sanderfoot, et al., 1998; Tse et al., 2004; Wang et al., 2011).

## JUSTIFICACIÓN

Mediante el estudio de plantas mutantes de arroz se determinó que *OsHKT2;1* y *OsHKT1;5* son necesarios para el crecimiento celular en condiciones de escaso  $K^+$  (Horie et al., 2007) o para la tolerancia a la salinidad (Ren et al., 2005), respectivamente. Para llegar a esas conclusiones se necesitó la acumulación de evidencia generada en distintos estudios como lo son la expresión a nivel de proteína o transcrito en la planta y la influencia de un estrés sobre su abundancia, su localización celular, así como sus propiedades de transporte iónico, entre otros. Tanto *OsHKT2;1* y *OsHKT1;5* se expresan en los tejidos de los haces vasculares de la raíz, sin embargo, su función es totalmente distinta. Se ha reportado que la expresión de *OsHKT2;1* es similar a la de *OsHKT1;3*, *OsHKT1;1* y *OsHKT2;3* (Jabnourne et al., 2009) la cual se observó tanto en los tejidos vasculares de la raíz y de las hojas. La expresión de *OsHKT1;3* en las hojas, principalmente en las células bulliformes de la epidermis adaxial, sugirió que el papel de *OsHKT1;3* al ser un transportador de  $Na^+$  coordina el flujo de este catión para regular la turgencia de las células bulliformes (Jabnourne et al., 2009). Sin embargo, en la raíz la expresión de *OsHKT1;3* se identificó en la epidermis, exodermis, corteza, además de los haces vasculares lo cual podría sugerir que éste es una vía de entrada para el  $Na^+$ . Por lo anteriormente expuesto se cuestiona cuál es la función de *OsHKT1;3* en la planta de arroz. Con la finalidad de contribuir a resolver esta

duda fue necesario conocer más sobre esta proteína y poder así determinar una posible función en la planta de arroz. De igual manera fue interesante saber cómo es que esta proteína puede regularse. Por ello fue necesario abordar desde distintos aspectos el estudio de OsHKT1;3, siendo uno de ellos a nivel estructural de la proteína gracias a los estudios electrofisiológicos que revelarían datos de sus propiedades de transporte iónico. La localización de la proteína a nivel tisular y celular se obtuvo a través de estudios inmunoquímicos y de fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes, respectivamente. Por último se investigó también su regulación por tráfico vesicular ya que a través de un estudio masivo de interacción proteína/proteína, se identificó a un receptor cargo, conservado en las células eucariotas denominado Cornichon, con el que OsHKT1;3 interactúa y podría determinar su localización y por ende su función.

## **HIPOTESIS**

El transportador de Na<sup>+</sup> OsHKT1;3 participa en la tolerancia a la salinidad en el arroz.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Identificar el papel funcional del transportador de sodio OsHKT1;3

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Determinar la localización tisular y celular de OsHKT1;3 mediante técnicas inmunoquímicas en tejidos de *Oryza sativa* y de su apreciación a través de fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes expresadas transitoriamente en células de la epidermis de las hojas de *Nicotiana benthamiana*, respectivamente.
- Ampliar la caracterización de las propiedades del transporte de Na<sup>+</sup> de OsHKT1;3 mediante su expresión en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* combinada con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos y de su expresión en las células de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Buscar proteínas que interactúen con OsHKT1;3 usando al sistema mbSUS en levaduras mediante el empleo de la librería del interactoma de membrana de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar cómo la interacción proteína-proteína regula el transporte de Na<sup>+</sup> de OsHKT1;3 mediante el uso de las levaduras y el de los ovocitos de *X. laevis* como sistemas de expresión heterólogo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Registros electrofisiológicos en los ovocitos de *Xenopus laevis*.**

La caracterización electrofisiológica del transportador OsHKT1;3, se realizó a través de su expresión heteróloga en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.

### **Construcción de los plásmidos**

Para expresar a OsHKT1;3 y OsCNIH1 en los ovocitos de *Xenopus*, ambos genes fueron clonados dentro del vector de expresión para ovocitos pOO2, el cual contiene tanto la región no traducida del 5'- y del 3'- (UTR) del gen de la  $\beta$ -globina de *Xenopus laevis* que ayudan a incrementar la expresión del transcrito en los ovocitos. La construcción que codifica para la fusión traduccional OsHKT1;3-EGFP se llevó a cabo mediante la adición de la región codificante de la EGFP (pEGFP-C1; Clontech) a la región C-terminal de OsHKT1;3 para después ser sub-clonadas dentro de pOO2. Los procedimientos se describen a continuación (las clonas se enlistan en el apéndice B).

Inicialmente, la región codificante de OsHKT1;3 se encontraba clonada en el vector pYPGE15 flanqueada tanto en el 5' como en el 3' por el sitio de restricción para la enzima EcoRI. Para extraer la región codificante de OsHKT1;3, este vector se digirió con la enzima EcoRI para posteriormente clonarla en el vector de expresión para los ovocitos pOO2, el cual posee un sitio de restricción EcoRI en la región de clonación múltiple. Al mismo tiempo se confirmó que dentro del cDNA OsHKT1;3 no existiera algún sitio de restricción para EcoRI, evitando el corte del inserto OsHKT1;3 con esta enzima. El éxito de la ligación requirió que ambos ADNs fuesen digeridos adecuadamente con la enzima EcoRI siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen) y de la calidad de la extracción de ADN ( $OD_{260} \geq 1.8$ ). Para determinar la eficiencia de la digestión se realizó eficientemente, se corrieron geles de Agarosa al 0.8% (agarosa disuelta en TAE al 0.5%; 50X: 242 g Tris base, 57.1 ml Ácido acético y 100 ml 0.5 M EDTA aforando a un litro de volumen final con agua MilliQ, pH 8.0). Para ello, por cada 5  $\mu$ l de

muestra de ADN se agregó 1  $\mu$ l de Buffer de carga (0.25% de Azul de Bromofenol, 0.25% de Xylene Cyanol FF y 30% de Glicerol en agua), las muestras se cargaron en los pozos del gel colocado en una cámara de electroforesis con Buffer de corrida (TAE 0.5%) a 100 V durante 30 min. Empleando un marcador de peso molecular (Gene Ruler™ 1 Kb, Fermentas) y tinción con bromuro de etidio, se pudo determinar el tamaño de ADN (Gel Doc XR+, BIO-RAD). Habiendo comprobado que se tenía una digestión óptima, fue necesario aislar y purificar el ADN del gel de agarosa. Para ello se utilizó el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) lo cual permitió una recuperación máxima sin dañar al ADN. Antes de ligar el inserto con el vector, éste último se defosforiló usando la enzima Fosfatasa Alcalina (Sigma), para evitar que se volviera a ligar, ya que se removieron los grupos fosfatos de las terminales 5', aumentando la posibilidad de obtener la ligación con el inserto. El ADN se precipitó con 1/10 del volumen de la reacción de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de la reacción de etanol frío, se centrifugó en una microcentrífuga (Sorvall, MICROFUGE *pico*) a máxima velocidad (13,000 g) durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en agua MilliQ. Una vez aislados y purificados, tanto el inserto OsHKT1;3 como el vector pOO2, se unieron con la T4 ligasa siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen). Por lo general se empleó una relación de 1:3 vector:inserto. La cantidad del inserto y de vector agregados a la reacción se calcularon con geles teñidos con Bromuro de etidio y observados en un transiluminador de UV (las cantidades agregadas fueron aproximadamente 150 ng de vector y 450-500 ng de inserto). A la mezcla de ADN (inserto y vector) se le agregaron 2.5  $\mu$ l de Buffer de la T4 ligasa, 1  $\mu$ l de la T4 ligasa (Invitrogen) y se llevaron a un volumen final de 25  $\mu$ l con agua MilliQ. Esta reacción se incubó toda la noche a 16 °C. Para asegurar que el vector se hubiese ligado al inserto, estas ligaciones se usaron para transformar a *E. coli* para replicar estas construcciones y verificarlas mediante secuenciación en la unidad de secuencia del IBT-UNAM.

Para llevar a cabo la fusión traduccional de OsHKT1;3 con la región codificante de la EGFP, se llevó a cabo la amplificación de *OsHKT1;3* mediante PCR usando oligos específicos (Anexo 1) que permitieron colocar sitios de restricción para las

enzimas BamHI y EcoRI en el 5' y 3' de la región codificante, respectivamente, evitando al mismo tiempo incluir el codón de paro. La amplificación de la EGFP se llevó a cabo mediante PCR usando oligos específicos (Anexo 1) que posicionaron a los sitios de restricción EcoRI y PstI en el 5' y 3' de la región codificante, respectivamente. Posteriormente, el plásmido pOO2 y el amplicón de *OshKT1;3* se digirieron con BamHI y EcoRI, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Thermo Scientific), para después limpiarse mediante el kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), y con ello poder ligarlos con la ligasa T4 (Invitrogen). La ligación se confirmó mediante la extracción de ADN de transformantes de *E. coli* y su doble digestión con BamHI y EcoRI (Invitrogen). Posteriormente se procedió a ligar a *OshKT1;3* con *EGFP* haciendo una doble digestión tanto del amplicón (*EGFP*) como del vector (pOO2-*OshKT1;3*), digiriendo con EcoRI y PstI, para después limpiar mediante el kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), y con ello poder ligarlos con la ligasa T4 (Invitrogen). La ligación se confirmó mediante la extracción de ADN de transformantes de *E. coli* y su triple digestión con BamHI, EcoRI y PstI (Invitrogen).

Para el caso de *OscNIH1* su clonación se fue en el vector pENTR-TOPO (Invitrogen) y se transfirió al vector pOO2-GW mediante una reacción LR (Invitrogen). La transferencia de *OscNIH1* al vector pOO2-GW se comprobó mediante una digestión con PvuII (Thermo Scientific).

### **Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ )**

Para la preparación de células electrocompetentes, inicialmente se obtuvo un preinóculo agregando una alícuota de células DH5 $\alpha$  en un tubo Falcon de 15 ml, conteniendo 5 ml de medio LB (triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y pH ajustado a 7.0 con NaOH) que se dejó crecer toda la noche a 37 °C a 200 rpm. Con este preinóculo, se inoculó un matraz con 1 L de medio LB estéril bajo en sales (triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L y pH ajustado a 7.0 con NaOH), y se incubó durante aproximadamente 4-5 h, o hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.6 a 0.8. Alcanzada la OD se colocó en hielo y en el cuarto frío por 30 min; después se centrifugó a 4,000 rpm a 4 °C, durante 15 min (Rotor JA-10,

Beckman Coulter). Se eliminó el sobrenadante rápidamente y se agregó ½ volumen inicial de glicerol al 10% frío y estéril; a continuación se resuspendieron las células suavemente con una pipeta de vidrio estéril. Se volvió a centrifugar a 4,000 rpm a 4°C durante 15 min con el mismo rotor, y se eliminó el sobrenadante rápidamente para resuspender suavemente con una pipeta de vidrio en ¼ de volumen inicial de glicerol al 10% frío y estéril, y se volvió a centrifugar a 4,000 rpm a 4°C, durante 15 min empleando el mismo rotor y centrífuga. Se eliminó el sobrenadante rápidamente y se resuspendieron las células en 1/5 de volumen inicial de glicerol al 10% frío y estéril para centrifugar a 4,000 g a 4°C durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3 ml de glicerol al 10% para posteriormente hacer alícuotas de 50 µl en tubos estériles de 1.5 ml previamente fríos que después se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para su posterior transformación, la cual se describe a continuación.

#### **Transformación de *Escherichia coli***

Las células competentes guardadas a -80°C se descongelaron en hielo en una campana de flujo laminar para evitar una posible contaminación, se agregó 1.5 a 3 µl de ADN plasmidico (150-800 ng) y se mezclaron suavemente sin pipetear. Posteriormente se pasaron a las celdas previamente frías de 0.1 cm (BioRad) y se les dio un choque eléctrico con un electroporador (*MicroPulser Electroporation Apparatus, BioRad*) a 1.8 kV durante 4.5 mili segundos. A continuación, se les agregó 400 µl de LB líquido y se incubaron a 37 °C con agitación a 300 rpm durante una hora. Después se sembraron 200 µl del cultivo de células transformadas en caja Petri con medio LB sólido conteniendo Espectomicina, Kanamicina, o Ampicilina según el vector empleado (a una concentración de 50 µg/ml). Se incubaron a 37 °C durante 12 h aproximadamente. Las clonas positivas así crecidas, fueron sujetas a extracción de ADN mediante lisis alcalina, método que se describe a continuación.

### **Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina (miniprep)**

Para llevar a cabo el aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina, inicialmente se obtuvo un cultivo en medio líquido conteniendo el antibiótico apropiado. A continuación, se inoculó un tubo Falcón de 15 ml conteniendo 5 ml de medio LB, con una sola colonia bacteriana, todo esto en una campana de flujo laminar para evitar contaminación, e incubándose a 37 °C con agitación constante a 300 rpm durante 12 h. Después de este tiempo, el cultivo se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 min a 25 °C (Centrífuga GS-15R, Beckman Coulter). Se removió el sobrenadante por aspiración dejando la pastilla de bacterias tan seco como fue posible. Las células se resuspendieron en 200 µl de la solución I esterilizada (25 mM Tris-HCL pH 8.0, 50 mM de EDTA) y se pasaron a tubos Eppendorf de 1.5 ml agregando RNAsa A (10 mg/ml). A continuación se les agregó 200 µl de la solución II recién preparada (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se mezclaron de 5 a 6 veces suavemente por inversión, evitando permanecer en este paso por más de 3 a 5 min. Inmediatamente después, se agregaron 200 µl de solución III (5 M KOAC pH 4.8, ácido acético 11.5 % v/v) fría, se invirtió suavemente hasta observar un precipitado blanco y se colocó en hielo durante 5 min. Después de este tiempo, las células lisadas se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C; se recuperó el sobrenadante, sin alterar la pastilla, y se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 600 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v:v:v) y se mezcló muy bien en un vortex, se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. A continuación se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadieron 600 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v:v), se mezcló bien en un vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente; se removió la fase superior a un tubo nuevo y se añadió 1 ml (o dos volúmenes) de etanol al 100% frío, se mezcló muy bien y se incubó en hielo durante 2 a 5 min. Después se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se removió el sobrenadante y se descartó, y la pastilla se lavó con etanol al 70% dejándose secar durante 5 min; posteriormente la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua milliQ.

### **Mutagénesis dirigida de S94G del transportador OsHKT1;3**

Para determinar si la Serina localizada en la posición 94 de OsHKT1;3, que se ha identificado como importante en conferir la selectividad hacia el ion sodio en los transportadores HKT (Mäser et al., 2002), se procedió a substituir con una Glicina mediante mutagénesis dirigida. Esta mutación se llevó a cabo utilizando el paquete “QuickChange site directed mutagenesis kit” siguiendo las recomendaciones del proveedor (Stratagene) por medio de la técnica de PCR y empleando los oligos correspondientes (Anexo 1). Una vez que se obtuvo el producto de PCR, este se empleó para transformar las células de *E. coli* XL-Blue (incluidas en el Kit). Mediante secuenciación se pudo verificar que la mutagénesis se realizó correctamente (las clonas se enlistan en el apéndice B).

### **Transcripción *in vitro* del ADNc**

Para la expresión de la proteína de OsHKT1;3 y OsCNIH1 en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, se realizó la inyección de ARNc, el cual se obtuvo de la transcripción *in vitro*. Las construcciones pOO2-OsHKT1;3, pOO2-OsHKT1;3-EGFP y pOO2-OsCNIH1 se digirieron con la enzima de restricción Bbr PI siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche). El sitio de corte de esta enzima de restricción esta inmediatamente por debajo del inserto, la cual produce un templado lineal de tal forma que la ARN polimerasa puede generar el ARNm. El plásmido pOO2 posee al promotor SP6. La digestión se detuvo agregando 1/20 del volumen de EDTA 0.5 M, 1/10 del volumen de acetato de sodio (NaAc) 3 M y 2 volúmenes de etanol frío. Se mezcló bien y se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 15 min. El ADN se sedimentó por centrifugación en una microcentrifuga (MARCA) durante 15 min a máxima velocidad (13,000 rpm). A continuación se removió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua libre de ARNasas. Esta agua ( $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC) se obtuvo mezclando agua MQ y DEPC (dietil pirocarbonato) 0.05 % en agitación continua e incubándose toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ ; por último esterilizándose en una autoclave durante 25 min.

De las construcciones pOO2-OsHKT1;3, pOO2-OsHKT1;3-EGFP y pOO2-OsCNIH1 linealizadas, se tomaron muestras con una concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y la

transcripción *in vitro* se realizó de acuerdo a las indicaciones del paquete mMessage mMachine (Ambion). Posteriormente, esta reacción se incubó a 37°C durante 12 h. Para recuperar el ARN se agregó a la reacción 30 µl de LiCl 7.5 M, se mezcló muy bien y se incubó durante 30 min a -20°C. A continuación, se centrifugó durante 15 min a máxima velocidad para coleccionar el ARN en el fondo de un tubo de 1.5 ml. Con cuidado se removió el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó agregando 1 ml de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar para remover los nucleótidos que no se incorporaron en la reacción. Con cuidado se eliminó el etanol al 70% y el ARN se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC. La cantidad de ARN obtenida se determinó empleando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Sin embargo, otra manera de apreciar, cuantificar y corroborar la calidad del ARN fue mediante su separación en geles de agarosa al 1 %, la cual se disolvió en buffer de corrida para geles con MOPS 10X (MOPS 0.1 M pH 7.0, NaAc 40 mM y EDTA 5 mM a pH 8.0) y Formaldehído 2.2 M. Por cada µl de muestra de ARN se agregaron 9 µl de Buffer de carga (2 µl Formamida, 1 µl MOPS 10x, 2 µl Formaldehído al 38%, 2 µl de Buffer provisto en el paquete mMessage mMachine, 1 µl de 10 mg/ml de Bromuro de Etidio, 1 µl H<sub>2</sub>O). A continuación, estas muestras se cargaron en los pozos del gel y se corrieron en una cámara de electroforesis conteniendo Buffer de corrida para geles con Formaldehído (MOPS 1X) a 50 V durante 60 min en una campana de extracción (el formaldehído genera gases tóxicos). Con la ayuda de un transiluminador de UV se observó la calidad del ARN. Habiendo determinado la calidad del ARN y su concentración mediante NanoDrop, éste se guardó a -80°C hasta antes de ser usado.

### **Obtención y defoliculación de los ovocitos**

Para la obtención de los ovocitos, inicialmente se anestesió por 30 min a una rana con tricaina (ethyl-m-aminobenzoate metahene sulfonic acid; Sigma) al 0.15% disuelta en agua. Una vez que se comprobó que la rana se encontraba anestesiada, se procedió a obtener los ovocitos. Para esto, se hizo una incisión en el abdomen de 0.5 cm para tener acceso a los lóbulos de los ovarios, de donde se obtuvieron los ovocitos. Una vez que se había colectado un número suficiente de

ovocitos, los ovarios se colocaron dentro de la cavidad abdominal y la rana se suturó, posteriormente se colocó en agua corriente para su recuperación. Los ovocitos así obtenidos se colocaron en una caja Petri con solución OR-2 libre de calcio (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, con una osmolaridad de 0.240-0.260 osmol/kg y un pH de 7.5 ajustado con NaOH) y se separaron manualmente con pinzas de punta fina. Para facilitar la remoción de las células foliculares que envuelven a los ovocitos, estos se incubaron en la misma solución conteniendo colagenasa (2 mg/ml; Sigma) por 30 min a temperatura ambiente con agitación (100 rpm) y después se lavaron varias veces con la solución OR-2 libre de calcio. Los ovocitos se dejaron reposar durante 4 h. Pasado este tiempo, las células foliculares fueron removidas manualmente bajo un microscopio estereoscópico con ayuda de unas pinzas de punta muy fina (Sigma). Los ovocitos seleccionados correspondían a los estados V-VI, mostrando los polos animal y vegetal bien definidos, es decir, bien coloreados (negro y amarillo, respectivamente) y con un borde bien definido entre ambos polos. Finalmente, los ovocitos fueron colocados en solución ND-96 con calcio (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, Gentamicina 50 µg/ml, a 0.240-0.260 Osmol/kg y pH de 7.6 ajustado con NaOH) y se incubaron a 15°C durante toda la noche.

### **Microinyección del ARNc de *OsHKT1;3* y *OsCNIH1* en los ovocitos de *Xenopus laevis***

Para la microinyección del ARNc fue necesario utilizar una micropipeta, la cual fue obtenida con un jalador de micropipetas KOPF (Modelo 730, David KOPF Instruments) a partir de un tubo capilar (Drummond, Cat. No. 3-000-204) de 10 µl, Para llenar la pipeta con el ARN, la punta de la pipeta se rompió de tal manera que quedara abierta a un diámetro de 10-20 µm. Posteriormente esta pipeta se llenó con aceite mineral evitando dejar burbujas dentro de la misma y se colocó dentro del émbolo del microinyector (Nanoject II™ Auto-Nanoliter Injector, Dromond Scientific). El ARNm (1-2 µl) se colocó sobre una gota de aceite colocada previamente sobre parafilm (Pechiney), se succionó con el microinyector el cual se

montó sobre un micromanipulador mecánico (MMN8 Narishige) lo cual facilitó esta acción. Los ovocitos inmersos en solución ND96 se microinyectaron bajo observación en un microscopio estereoscópico (SMZ645 Nikon). Los ovocitos se colocaron en fila dentro de una caja Petri y para evitar que éstos se movieran, el piso de la caja Petri se rayó haciendo la superficie áspera. La cantidad de ARN inyectado en los ovocitos fue de 13.8 ng en volúmenes no mayores a 50 nl. Los ovocitos así inyectados se colocaron en solución ND96 y se incubaron a 15°C por 48 h para posteriormente ser empleados en los registros electrofisiológicos.

### **Registros electrofisiológicos**

Los registros electrofisiológicos se realizaron de 2 a 3 días después de la microinyección. La técnica que se utilizó fue la de fijación de voltaje con dos electrodos empleando el amplificador GeneClamp 500B (Axon Instruments Inc.). Los microelectrodos de registro se obtuvieron a partir de micropipetas de 100  $\mu$ l (Sigma) con un jalador de pipetas (PP83, Narishige). Estos microelectrodos se llenaron con una solución de KCl 1M y se insertaron en los portaelectrodos que contenían un alambre de Ag/AgKCl; estos portaelectrodos a su vez, se montaron por separado a los cabezales HS-24 del amplificador (Axon Instruments Inc.). Al sumergir los microelectrodos dentro de la solución de registro (MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM y MES-Tris 10 mM pH 7.5, y el sorbitol necesario para obtener una osmolaridad de 0.240-0.260 Osmol/kg) se midió el potencial de la punta de los dos microelectrodos y se ajustaron a 0 mV; al mismo tiempo se midió la resistencia de los mismos, la cual varió entre 0.5 a 5 M $\Omega$ , pero generalmente, se emplearon dos electrodos con la misma resistencia eléctrica. Para el registro de las corrientes eléctricas, el ovocito se colocó dentro de una cámara de acrílico insertando inicialmente el electrodo de Voltaje, y a continuación el electrodo de Corriente. La solución de registro se fluyó y se esperó hasta que el potencial de membrana se estabilizara. Una vez estable, el potencial de membrana se fijó mediante el programa Clampex del paquete pClamp10 instalado en una computadora. El registro y el análisis de los resultados se realizaron empleando los programas Clampex y Clampfit, respectivamente, incluidos en el paquete pClamp10. Las

soluciones de los cationes se prepararon tomando a la solución de registro como base y agregándole los cationes requeridos en las concentraciones deseadas. En los experimentos que se realizaron para determinar la selectividad del transportador a los diferentes cationes alcalinos se emplearon sales de cloro en la misma solución de registro.

### **Crecimiento de las plantas**

Para el crecimiento de las plantas de arroz variedad Pokalli y Nipponbare, inicialmente las semillas fueron esterilizadas con etanol al 100% durante 1 min y lavadas con agua estéril para después dejarlas reposar en una solución con cloro al 15% y Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate; Sigma) al 0.05% durante 15 min. A continuación, las semillas se lavaron muy bien con agua estéril para después colocarlas en medio Murashige & Skoog (MS:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,650 mg/l,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440 mg/l,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370 mg/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.8 mg/l,  $\text{KNO}_3$  1,900 mg/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22.3 mg/l, KI 0.83 mg/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6 mg/l,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.2 mg/l, i-Inositol 100 mg/l, Niacina 0.5 mg/l, Piridoxina HCl 0.5 mg/l, Tiamina HCl 0.1 mg/l, Sacarosa 20 g/l y bacto-agar 8 g/l) para su germinación en una incubadora a 28°C durante 3 días en obscuridad total. Después, las semillas germinadas se pasaron a una incubadora con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a 28°C durante 2 días. Posteriormente, las plantas se colocaron en contenedores plásticos con una solución nutritiva de Hoagland's (0.5 mM  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ , 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 12  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 8  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 0.38  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 1.76  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.041  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4$ , 0.11 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.1 mM  $\text{FeSO}_4$ ; Hoagland y Arnon, 1938), diluida a la mitad de su concentración y se dejaron crecer por 13 días en el invernadero a 25°C. La solución nutritiva de Hoagland's se renovó cada 7 días.

### **Tratamiento con sal**

Pasados los 13 días en el invernadero un grupo de plantas se trataron con 30 ó 50 mM de NaCl en la solución nutritiva de Hoagland's mientras que otras

permanecieron en condiciones control. Este tratamiento con sal duró 40 h ó 15 días. La solución nutritiva de Hoagland's se renovó cada 7 días.

## **Separación de los compartimientos subcelulares**

### **Aislamiento de la membrana microsomal**

Para la obtención de la fracción microsomal de las hojas y raíces de las plantas de arroz, el material vegetal (30 g) fue secado y cortado en pequeños pedazos. El tejido se colocó en 300 mL de medio de homogenización frío (400 mM Manitol, 10% (w/v) glicerol, 30 mM Tris, 0.5% (w/v) BSA, 5 mM EGTA, 0.5 mM BHT, 0.25 mM Dubucaina, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5% (w/v) PVP-10, 5% (w/v) PVP insoluble, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 1 mM Benzamidina, 26 mM K-metabisulfito, el pH se ajustó a 8 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Todos los procedimientos siguientes se realizaron a 4°C. El material vegetal se molió en una licuadora y se filtró a través de cuatro capas de gasa para obtener el homogenizado. Posteriormente este homogenizado se centrifugó a 10,000 g por 20 min a 4°C en un rotor JA-20 en una centrífuga Avanti J30-I (Beckman Coulter). La pastilla se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 100,000 g por 50 min a 4°C en un rotor Ti-45 en una ultracentrífuga L-80 (Beckman Coulter). Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer de suspensión (250 mM Manitol, 10% (w/v) glicerol, 2 mM DTT y 10 mM Tris/MES pH8).

### **Separación de las membranas mediante gradientes de sacarosa**

Para la separación de las diferentes membranas celulares, los microsomas aislados se colocaron sobre gradientes discontinuos de sacarosa 22%, 32% y 38% [p/v] el más ligero quedándose en la parte superior, por debajo del microsoma y se centrifugaron a 100,000 X g por 3 h a 4°C usando un rotor de columpio (modelo SW 28, Beckman Instruments) en una ultracentrífuga (modelo L-80, Beckman Instruments). Se colectaron 3 fracciones (2 ml por fracción) en la interfase de estos tres gradientes, se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C.

## **Electroforesis zonal de flujo libre**

La separación de las membranas del microsoma se realizó también con el empleo de la electroforesis de flujo libre usando el sistema BD FFE (BD Proteomics). Antes del fraccionamiento de la fracción microsomal, las muestras de microsomas se centrifugaron a 14,000 g por 8 min a 4° C y se desechó la pastilla. La muestra fue inyectada (3 mg/mL) continuamente mediante una bomba peristáltica a una velocidad de 1.2 mL/h en la entrada de muestras aniónicas. Los medios que entran a la cámara del sistema BD FFF tienen la siguiente composición: las entradas de la 2 a las 6 son medios de separación (10 mM TEA, 10 mM ácido acético, 2 mM de KCl y 250 mM sacarosa); las entradas 1 y 7 son medios de estabilización (40 mM TEA, 40 mM ácido acético, 8 mM KCl y 180 mM sacarosa). Las soluciones electrolíticas del circuito anódico-catódico consisten de 100 mM TEA, 100 mM ácido acético, 20 mM KCl, el pH se ajustó con NaOH a 7.4. A la solución anódica se le agregó formaldehído al 0.4% para prevenir la pérdida de cloruro por oxidación anódica. Los medios de contra flujo para las entradas C1, C2 y C3 fueron los mismos que el medio de separación. La electroforesis de flujo libre se llevó a cabo en un modo horizontal a un voltaje constante de 750 V (118 mA) con un medio y una velocidad de contra flujo de 250 mL/h. La temperatura durante la corrida se mantuvo a 5° C debido al continuo flujo de un refrigerante debajo de la placa de separación de vidrio, proveniente de una incubadora a base de agua. Después de la separación en la cámara, las fracciones de membrana fueron colectadas continuamente en varias placas de 96 pozos profundos (con una capacidad por pozo de 4 mL; Sunergia Medical). Las fracciones de membranas de corridas seriales se juntaron para después concentrarse mediante centrifugación a 100,000 g 50 min a 4° C en un rotor Ti-45 en una centrifuga L-80 (Beckman Coulter).

Las pastillas conteniendo las membranas fueron resuspendidas en buffer de suspensión, congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80 ° C. La separación hecha por la electroforesis de flujo libre se monitoreó mediante placas colectoras (con capacidad de 250 µL por pozo) a distintos tiempos durante la corrida. La

proteína se cuantificó a una OD<sub>280</sub> usando un espectrofotómetro de micro placas (Power Wavex, Bio-Tek Instruments).

### **SDS-PAGE y Western blotting**

La cuantificación de la proteína obtenida de la separación de las fracciones de membrana fue hecha mediante el método de Bradford. En tubos de vidrio se mezcló 5 µl de la muestra y 10 µl de SDS al 10%, dejándose reposar por 5 min. Posteriormente se agregó 200 µl del reactivo Bradford (BioRad) y 800 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ y se mezclaron los componentes mediante vortex. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente, para la separación de las proteínas por SDS-PAGE, se precipitaron 15 µg de proteína de cada fracción mediante una dilución de 50 veces en una solución de etanol/acetona 1:1 (v/v) e incubación por toda la noche a -30° C. Las muestras se centrifugaron a 14,000 g durante 20 min a 4° C (Centrifuga GS-15 R, Beckman Coulter). Las muestras se dejaron secar y se resuspendieron en un buffer de carga (2% (w/v) SDS, 2.5% (v/v) mercaptoetanol, 5% glicerol (v/v), 10 mM Tris-HCl, 0.8% (w/v) sacarosa y azul de bromo-fenol). Las muestras se calentaron a 60° C durante 2 min antes de cargarse en geles SDS-PAGE al 10% (w/v). Los geles se corrieron en un buffer de corrida (125 mM Tris, 950 mM Glicina y 0.5% (w/v) SDS) durante 1 h 25 min a 200 V. Las proteínas ya separadas en los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (ECL, Amersham) que sirven como soporte para inmunoensayos tipo Western-blot. La transferencia de las proteínas se realizó a 100 V por 2 h con un buffer de transferencia (25 mM Tris, 150 mM Glicina y 20% (v/v) Metanol). Algunos geles se tiñeron con azul de Coomasie para visualizar con mayor claridad a las proteínas.

Para los estudios de Western-blot, inicialmente la membrana de nitrocelulosa se incubó a 25° C en 1X TBS con 5% (w/v) de leche descremada y 0.02% (w/v) azida de sodio durante 1 h en constante agitación para bloquear sitios inespecíficos. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario (ProSci-Poway) a la dilución deseada y se incubó durante toda la noche en 1X TBS con 5% (w/v) de leche descremada y 0.02% (w/v) azida de sodio. Posteriormente, la membrana se lavó 3

veces con 1X TBS, la segunda vez al 1X TBS se le agregó 0.05% (w/v) Tween 20 (Sigma). La membrana ya limpia se incubó a 25° C en 1X TBS con 5% (w/v) de leche descremada con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG (Santa Cruz Biotechnology) a la dilución deseada durante 2 h en constante movimiento. Pasado el tiempo se volvió a lavar la membrana tres veces con 1X TBS, la segunda vez al 1X TBS se le agregó 0.05% (w/v) tween 20. Para revelar la interacción, se usó el Western blotting detection reagent (ECL, Amersham) en una dilución 1:1 (w/v) y películas de revelado (Kodak). Las imágenes fueron capturadas mediante un scanner Hewlett-Packard (Scan Jet 8250 Hewlett-Packard).

### **Purificación por inmuno afinidad del anticuerpo anti *OshKT1;3***

El anticuerpo policlonal anti-OshKT1;3 se generó en conejo contra el polipéptido RHDGEDSKTEKINKRK ubicado en la asa citoplásmica localizada entre el tercer y cuarto dominio transmembranal de OshKT1;3 de acuerdo a su secuencia de aminoácidos (ProSci-Poway).

Para purificar el anticuerpo policlonal anti-OshKT1;3 por inmunoafinidad, el suero del segundo sangrado se centrifugó a 2,500 g por 10 min y se filtró a través de un filtro de 0.45µm (Millipore). La columna cromatográfica de inmuno afinidad fue provista por ProSci Incorporated (Poway) y se lavó con 10 (50 mL) volúmenes de PBS (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7.4 con HCl) antes de correr el suero a través de ella. Se eluyó un volumen (5 mL) del suero a través de la columna cromatográfica de inmuno-afinidad y se incubó durante 15 min a 4° C en movimiento. Posteriormente, se dejó drenar la columna y se repitió este paso hasta pasar 25 mL de suero a través de la columna. La columna se volvió a lavar con 10 volúmenes de PBS. Posteriormente, los anticuerpos adheridos a la columna se disociaron usando 8 mL de una solución de 100 mM glicina a pH 2.5. Se colectó 1mL de fracción y se agregó 50 µL de 1 M Tris pH 9.5. Para concentrar el anticuerpo se emplearon cámaras de diálisis de 10 kDa (Pierce USA) a las cuales se les hizo tres cambios de PBS a 4° C. Finalmente

se midió la concentración del anticuerpo con una OD<sub>280</sub> para obtener una concentración final de 0.365 mg por mL de suero.

### **Inmunolocalización en tejido de la hoja y raíz de OsHKT1;3**

Para identificar la localización de OsHKT1;3 en los tejidos del arroz se procedió a realizar ensayos de inmunolocalización. Los tejidos de las hojas y la raíz fueron colectadas en un buffer de estabilización (50 mM PIPES, 5 mM EGTA y 2 mM MgSO<sub>4</sub>, a un pH de 6.9 ajustado con KOH). Posteriormente se dejaron reposar en 100 µM m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide-ester y 0.1% Triton X-100 por 15 min disueltos en agua. Los tejidos fueron fijados con 4% (w/v) de *p*-formaldehído diluido en un Buffer de estabilización y deshidratados de manera gradual con una serie de diluciones de etanol con 5 mM de DTT y una mezcla de metacrilato. Las series de etanol-metacrilato fueron 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 (v/v), seguido de tres cambios de metacrilato al 100%. La mezcla de metacrilato fue de 4:1 (v/v) butil-metacrilato:metil-metacrilato (Sigma) con 0.37% (w/v) benzoin ethyl ether (Fluka Chemika). Las muestras fueron depositadas y orientadas en capsulas de gelatina (Electron Microscopy Sciences) con metacrilato al 100%. La polimerización se llevó a cabo en un baño de temperatura controlado (VWR Scientific) con anticongelante a -5°C, usando luz Ultravioleta (Blak-Ray long wave UV lamp Electron Microscopy Sciences) a una distancia de 10 cm sobre la muestra en un periodo de 8-12 h. Los tejidos embebidos fueron seccionados a 3 µm de grosor usando un ultramicrotomo (Leica Ultracut R) y colocados sobre una gota de agua en un porta objetos de diagnóstico con multi pozos. El tejido se adhirió cuando la muestra se calentó durante dos minutos hasta que el agua se evaporó. El metacrilato se removió con cuatro lavados de acetona (15 min cada uno) y los tejidos se re-hidrataron con TBS. Antes de ser incubados con el primer anticuerpo, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 1% (w/v) de leche en polvo libre de grasa diluida en TBS (Svelty, Nestle). Los tejidos fueron posteriormente incubados durante 1 h con el anticuerpo primario usado en una dilución 1:100 o el suero del presangrado, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti- conejo IgG acoplado a Q-Dots (Qdot 655 Invitrogen)

en una dilución (1:200). Entre las incubaciones, los tejidos se lavaron durante 30 min en TBS.

Las muestras se montaron usando Citifluor (Ted Pella) y un cubre objetos para su visualización en el microscopio confocal (Zeiss LSM 510). La excitación de los Qdot se logró con una laser a 488 nm y su emisión se detectó con un filtro BP 650-710 nm.

### **Microscopía electrónica**

Con el objetivo de observar en que organelos subcelulares se expresa OsHKT1;3 se procedió a inmunolocalizarlo mediante microscopia electrónica. Los tejidos de las plantas fueron químicamente fijados en 4% de paraformaldehído diluido en un Buffer de fosfatos a 0.1 M en vacío durante 1 h. Los tejidos fueron deshidratados con diluciones graduales de etanol, luego de acetona para posteriormente ser infiltrados con la resina London (LR) blanca. Secciones delgadas de 80-90 nm fueron cortados usando una navaja de diamante (Diatome, Biel, Sw) en un ultramicrotomo (Leica microsystems, B, IL) y colocados en rejillas cubiertas de oro. Todos los buffers usados para la tinción inmunológica fueron esterilizados por infiltración. Los cortes histológicos fueron incubados con 1% BSA en PBS por 1 h a temperatura ambiente para bloquear sitios inespecíficos antes de incubarse toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario diluido a 1:100 en PBS; a continuación se lavaron tres veces con PBS. Los cortes fueron posteriormente incubados con PBS conteniendo los anticuerpos secundarios Q-Dots en una dilución 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente, después se lavaron tres veces con PBS y agua.

La tinción de los tejidos se realizó con una solución saturada de acetato de uranilo por 10 min, se lavaron 3 veces con agua, para finalmente, dejarse secar a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos se incubaron en una solución de 0.2% (w/v) de citrato de plomo acuoso y se lavaron cuatro veces con agua. Las secciones se visualizaron en el microscopio electrónico de transmisión.

## **Mediciones de conductividad estomática y fotosíntesis**

### **Intercambio gaseoso**

Para la medición de la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la fotosíntesis ( $P_s$ ) en las hojas de arroz de la variedad Nipponbare se usó un analizador de gas infrarrojo equipado con una fuente de luz mezclada LED azul-roja (LICOR 6400XT, Li-COR Biosciences). Las mediciones se hicieron a las 12:00 PM GMT-5:00 Ciudad de México en hojas independientes de plantas control y plantas tratadas con 50 mM de NaCl a los tiempos estipulados. El tiempo de muestreo en la hoja fue de 5 min. Las condiciones de la celda de medición durante el intercambio gaseoso fueron ajustadas a las condiciones ambientales del invernadero. El área de la hoja tomada en cuenta para realizar las mediciones fue de  $1.5 \text{ cm}^2$ . La temperatura del aire se mantuvo a  $25 \pm 1.2^\circ \text{ C}$  y la intensidad de radiación fotosintéticamente activa fue de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La velocidad de flujo de  $\text{CO}_2$  fue de 400 ppm y se pudo controlar mediante un mezclador de  $\text{CO}_2$  (Li-COR Biosciences).

### **Cuantificación de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ en la raíz y la parte aérea**

Para la cuantificación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en la raíz y en la hoja de plantas del arroz, el tejido de la raíz se lavó con 20 mM  $\text{LaCl}_3$  y agua destilada para la remoción de las sales adheridas a los tejidos. Las hojas y las raíces se colectaron por separado a los tiempos estipulados y se almacenaron dentro de papel aluminio (Reynolds) dejándose deshidratar en una incubadora a  $80^\circ \text{ C}$  (Felisa) durante 5 días. Posteriormente, se pesó el tejido de cada colecta y se tomaron 150 mg de tejido seco para la digestión di-acídica. El tejido seco se molió en un mortero con nitrógeno líquido y el tejido en polvo se colocó en tubos de ensayo de vidrio (PIREX). Se agregó a cada muestra 1 mL de una mezcla di-acídica de ácido nítrico y ácido perclórico 5:1 (v/v) y se digirió durante 3 días. Posteriormente se agregó 4 mL de agua mili-Q esterilizada y se continuó digiriendo 24 h más. El tejido ya digerido se usó para hacer las cuantificaciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en un flamómetro (Instrumentation Laboratory). Los datos obtenidos del flamómetro se ajustaron a mg de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  por gramo de peso seco.

### **Ensayos de RT-PCR tiempo real (qRT-PCR)**

Para determinar si la salinidad causó cambios en la expresión de los transcritos de *OsHKT1;3* o de *OsCNIH1*, se llevaron a cabo ensayos de qRT-PCR. Inicialmente se colectaron muestras de la hoja y de la envoltura de la hoja, así como de la raíz de plantas control y plantas tratadas con 50 mM de NaCl a los tiempos estipulados. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C para su uso posterior. El ARN total de los tejidos se extrajo usando Trizol Reagent (Invitrogen). Para evitar contaminación con ADN genómico, el ARN fue tratado con ADNasa (Fermentas) y se limpió mediante columnas (RNeasy mini kit, QIAGEN). Se utilizaron 4 µg de ARN total (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) para la retro transcripción con la enzima M-MuLV (Fermentas), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Los ensayos de qRT-PCR se llevaron a cabo usando el equipo StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystem) junto con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las condiciones de la PCR fueron de un ciclo de 95° C 10 min para la activación de la enzima AmpliTaq, seguido de 40 ciclos de 95 °C 15 sec para la desnaturalización del templado y 60° C 60 sec para la alineación de los oligos y la extensión del amplicón. Los oligos se describen en la anexo 1. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de expresión relativa de  $\Delta Ct$ . La expresión relativa de los genes fue normalizada con respecto a la media geométrica de la expresión relativa de los tres genes control endógenos que se expresan de manera uniforme en el arroz como lo es el factor de elongación 1- $\alpha$  (MXC9), una proteína putativa en la síntesis de ubiquinona (COQ9) y una proteína de fase vegetativa corta (SVP1) para cada muestra (Jain, 2009). Estos genes de referencia son poco abundantes.

### **Identificación de interacciones proteína/proteína con el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS, mating-based Split Ubiquitin System)**

Con el objetivo de saber si los transportadores *OsHKT* pueden interactuar entre ellos formando hetero u homoligómeros o interactuar con cinasas de proteínas del tipo CIPK, se decidió usar el sistema de la ubiquitina dividida en levadura,

mbSUS, que permite reconocer la interacción entre dos proteínas de membrana o una proteína de membrana y una citosólica. Al mismo tiempo, se pudo realizar un análisis más amplio al emplear el interactoma con las proteínas de Arabidopsis disponibles en este sistema (Jones et al., 2014). Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Wolf Frommer en Carnegie Institution for Science, Stanford California U.S.A.

El uso de esta técnica es similar al sistema de dos híbridos, sin embargo mbSUS fue desarrollado para detectar específicamente interacción entre proteínas de membrana o entre una proteína de membrana con una citosólica. El mbSUS se basa en el secuestro de un factor de transcripción en la membrana y su liberación debido a la acción de una proteasa como resultado de la interacción de las dos mitades de la ubiquitina. Cuando el dominio N-terminal de la ubiquitina (Nub) se co-expresa con su parte C-terminal (Cub) se reconstituye la funcionalidad de la ubiquitina. Una mutante, NubG (la cual posee la mutación Ile13Gly) muestra una afinidad reducida (si se compara con el Nub silvestre) hacia el Cub, lo cual evita que se reconstituya la funcionalidad de la ubiquitina a menos que las proteínas a las cuales están fusionadas tanto el NubG como el Cub estén lo suficientemente próximas para reconstituir a la ubiquitina. El factor transcripcional artificial PLV (Protease A-LexA-VP16), está fusionado al C-terminal del Cub. Cuando dos proteínas interactúan, tanto el NubG como el Cub reconstituyen a la ubiquitina funcional, y una proteasa endógena específica para ubiquitina libera el factor de transcripción de la membrana hacia el citosol. Este factor de transcripción se difunde hacia el núcleo en donde activa la transcripción de los genes reporteros His3, Ade2 y LacZ. En este sistema es importante determinar si las fusiones al Cub pueden resultar en falsos negativos o falsos positivos. De tal manera que cuando las construcciones fusionadas al Cub se expresan de manera correcta y eficiente es de esperarse que se induzca la actividad de los genes reporteros cuando se co-expresa con el NubWT el cual posee una fuerte afinidad por el Cub. Para identificar los falsos positivos las construcciones fusionadas al Cub se co-expresan con el NubG soluble el cual no muestra afinidad hacia el Cub, de tal

manera que si se llegasen a activar los genes reporteros, este fenómeno sería en la ausencia de una interacción verdadera, revelando un resultado falso positivo.

### **Clonación de los genes *OsHKT*, *OsCNIH1*, *OsCIPK* y *ERV14* en el sistema Gateway**

Para expresar a los genes estudiados dentro de distintos sistemas se decidió clonarlos dentro del sistema con tecnología Gateway (Invitrogen), lo cual permite eludir el clásico sistema de clonación mediante enzimas de restricción y agilizar la expresión de estos genes en cualquier sistema provisto de esta tecnología. De manera específica el sistema emplea la recombinación del sitio reversible entre attB, attP, attL y attR, reacciones que ocurren durante la integración del fago  $\lambda$  en el genoma de *E. coli*, permitiendo una clonación direccional dentro de un plásmido, usando una reacción simple y es particularmente ventajosa en la construcción de fusiones traduccionales.

La amplificación del marco de lectura abierto (sin los codones de paro) de cada uno de los siguientes genes *OsHKT1;1*, *OsHKT1;3*, *OsHKT2;1*, *OsHKT2;3*, *OsCIPK5*, *OsCIPK11*, *OsCIPK14*, *OsCIPK15*, *OsCIPK16*, *OsCIPK17*, *OsCIPK25* se realizó mediante reacciones de PCR usando los oligos descritos en el anexo 1. Los productos de PCR se aislaron de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El producto de PCR de cada gen se clonó dentro del vector pDONR221 mediante una reacción de BP clonasa (Invitrogen). Se realizaron PCR de colonias de bacteria para identificar los plásmidos que contenían los insertos de los tamaños esperados. Los genes clonados se secuenciaron con los oligos M13 reverse y M13 forward. La clonación de *OsCNIH1* y de *ERV14* se llevó a cabo mediante oligos diseñados para amplificar la región codificante y se realizó una reacción de PCR usando como templado ADNc de la planta de arroz cv. Nipponbare y de la cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Los productos de PCR se clonaron en un vector pENTR-TOPO con tecnología Gateway siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen). Para asegurarnos que los genes clonados dentro del vector pENTR-TOPO-GW

estuvieran libres de mutaciones, se secuenciaron con los oligos M13 reverse y M13 forward en la unidad de secuenciación del IBT, UNAM.

Los plásmidos con las secuencias correctas, y aquellos con mutaciones silenciosas se transfirieron dentro de los vectores pXN22\_GW, pNX32\_GW (Clonas Nub) o pMETYC\_GW (clonas Cub) del mbSUS mediante una reacción de recombinación LR in Vitro (Invitrogen). De las colonias que crecieron en los medios de selección usando Kanamicina (50 µg/mL), se extrajo ADN para hacer un análisis de restricción usando la enzima PvuII (Roche), conservando aquellos que mostraron el patrón de restricción esperado y se almacenaron a -80°C (las clonas se enlistan en el apéndice B).

### **Transformación de levadura**

Para expresar los genes de interés dentro de las levaduras, se requirió la introducción de los plásmidos pMETYC\_GW y pXN22;32\_GW mediante la transformación de las cepas de levadura THY.AP4 [*MATa ura3, leu2, lexA::LacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] y THY.AP5 [*MATα URA3, leu2, trp1, his3 loxP::ADE2*], con los plásmidos respectivos. Las levaduras fueron transformadas con sus respectivos vectores mediante el método de Acetato de Litio (LiAc). De manera general, las cepas se inocularon en 15 mL de medio YPD-adenina (yeast peptone dextrose, Difco) y se diluyeron (a un volumen final de 300 mL) al día siguiente para alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.1. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta obtener una OD<sub>600</sub> 0.5 ó 0.6. A las células se les removió el medio mediante centrifugación y cada cepa se resuspendió por separado en un volumen de 1.8 mL de 100 mM LiAc en Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5). Estos 1.8 mL de células se combinaron con 7 mL 50% (w/v) de polietilén glicol 4,000, 0.8 mL 1M LiAc en TE, 0.3 mL de ssADN recientemente desnaturalizado (8-10 mg/mL). De esta mezcla se tomaron 99 µL y se les agregó 1 µL del ADN plasmídico (50-100 ng/µL). Posteriormente, las células se incubaron por 30 min a 28°C seguido de un choque térmico a 42°C por 13 min. Las células fueron lavadas en agua miliQ y resuspendidas en 75 µL de agua miliQ. Diez µL de células fueron sembradas en medio sólido N (THY.AP5) o C (THY.AP4). Después de 3 días de crecimiento, las

células fueron transferidas a medios líquidos N o C. Después de 3 días de crecimiento en medios líquidos, se tomaron alícuotas de estas células para hacer gliceroles y almacenar las células a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Las clonas se enlistan en el apéndice C.

### **Medios de crecimiento para la levadura**

Los medios para el crecimiento de las levaduras fueron YPD SC (Synthetic Complete) y una mezcla de aminoácidos (arginina, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina, valina, serina y treonina) esenciales para el crecimiento de la levaduras menos histidina, triptófano, uracilo, leucina, adenina y metionina. Dependiendo de la selección, el medio SC fue suplementado con 20 mg/L de hemisulfato de adenina, 20 mg/L de histidina-HCl, 500  $\mu\text{M}$  de metionina, 20 mg/L de triptófano, 20 mg/L de uracilo y/o 240 mg/L de leucina. Las células que contenían el vector pMETYC\_GW fueron crecidas en medios SC suplementados con triptófano, histidina, adenina y uracilo (medio C) y las células conteniendo el vector pXN22\_GW pNX32\_GW fueron crecidas en medio SC suplementado con leucina, histidina y adenina (medio N). Las células diploides fueron crecidas en medios SC suplementados con adenina e histidina (medio DS), mientras que los medios para probar las interacciones fueron hechos con SC suplementado con 0  $\mu\text{M}$  metionina (medio IS-0) o 500  $\mu\text{M}$  metionina (IS-500). Las fusiones dentro del vector Cub están bajo el control del promotor MET25 que es reprimido por metionina. De tal manera que un incremento en la metionina en los medios de selección disminuye los niveles de expresión y con ello se incrementa la astringencia del ensayo (Ver apéndice A).

### **Identificación de falsos positivos y falsos negativos**

A las clonas Cub se les hizo un análisis de interacción para determinar falsos positivos o falsos negativos. Las clonas Cub de la cepa THY.AP4 se crecieron en medio C y la cepa THY.AP5 expresando ya fuese el vector NubWT soluble (control para falsas negativas) o el vector NubG soluble (control para los falsos positivos), se creció en medio N. Las células THY.AP4 y THY.AP5 se aparearon en medios YPD por 24 h a  $28^{\circ}\text{C}$  y a continuación se hizo un plaqueo de réplica en

medios DS. Las interacciones se probaron en medios IS-0 e IS-500. El crecimiento se documentó mediante el escaneo de las placas (cámara CanoScan 8400F, Canon). Las clonas Cub o Nub fueron distribuidas en placas de 96, 384 o 1536 pozos mediante el uso del rotor HDA yeast pinning robot (Singer instruments).

## **Transporte de Na<sup>+</sup> en levadura**

### **Construcción de los Plásmidos**

Para expresar a los genes *OsHKT1;3* y *OsCNIH1* en las levaduras se llevarón a cabo la clonación de estos genes en plásmidos apropiados para su expresión en este organismo. Este trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología de la Academia de Ciencias en Praga en el laboratorio de la Dra. Hana Sychrová. Los plásmidos YEp352-NHA1 y pGRU1-NHA1 poseen al antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHA1 bajo el control de su promotor (Navarrete et al., 2010). La región codificante de *OsHKT1;3* fue amplificada mediante PCR con los oligos descritos en la anexo 1. Posteriormente, tanto el producto de PCR como los vectores YEp352-NHA1 o pGRU1-NHA1 se digirieron con las enzimas PstI o PvuII, respectivamente, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Fermentas). A continuación, la construcción se llevó a cabo por recombinación homóloga en la cepa de *S. cerevisiae* BW31a (MATa *leu2-3/122 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal10 ena1-4Δ::HIS3 nha1::LEU2*) mediante electroporación. Este procedimiento consistió en crecer la cepa BW31a en 80 ml de YPD + Ade a 30°C con agitación hasta obtener una OD<sub>600</sub>= 1.8-2.2. Posteriormente las células se sedimentaron mediante centrifugación a 4,000 rpm durante 3 min a 24°C y la pastilla se resuspendió en 50 ml de agua Milli-Q estéril fría. Esta suspensión de células se centrifugo a las mismas condiciones anteriormente mencionadas y se resuspendió en 8 ml de 25 mM DTT, se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente, centrifugándose después a la misma velocidad y tiempo. La células se resuspendieron en 5 ml del medio TpEB (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub> y 270 mM Sacarosa) y se incubaron en hielo durante 15 min, para ser centrifugadas de nuevo a las mismas condiciones. Por último, la pastilla de células se resuspendió en 0.8 ml de TpEB, para tomar 100 µl de células de levadura a las

que se les aplicó un pulso de 625 V durante 24 ms para su electroporación. Después del choque eléctrico, a las células se les adicionaron 100 µl de agua Milli-Q estéril fría y se dejaron reposar 15 min. Posteriormente las células se sembraron en medio sólido YNB+ Adenina, Triptófano, Leucina e Histidina (ATLH) a una concentración de 20 µg/ml.

Para la extracción del ADN plasmídico de células de levadura, las colonias transformadas que crecieron en medio sólido YNB+ATLH (positivas), se multiplicaron en medio líquido YNB+ATLH hasta alcanzar una OD<sub>600</sub>= 0.5. Posteriormente las células se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min y la pastilla se resuspendió en 200 µl de buffer ADNr (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM Na-EDTA), 200 µl de fenol-cloroformo y 300 µl de bolitas de cristal lavadas con ácido (tratamiento con HCl puro, enjuagadas con H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta alcanzar un pH de 5.0). Mediante Vortex continuo (5-10 min) se logró romper las células. Después se centrifugó a máxima velocidad por 5 min. Se tomó el sobrenadante (aproximadamente 130 µl) y se le agregó un volumen de isopropanol, se mezcló perfectamente y se centrifugó a 4°C durante 10 min. La pastilla del ADN plasmídico (ADNp) se lavó con etanol al 70% y se dejó secar para después resuspender en 30 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril.

Con este plásmido se transformaron células de *E. coli* para replicarlo y extraer ADNp para corroborar que esto originó las construcciones YEp352-*OsHKT1;3* o pGRU1-*OsHKT1;3* mediante digestión con PstI (Invitrogen) y por su secuenciación. *OsCNIH1* y *ERV14* se clonaron en *pDR-F1-GW-LEU*, el cual tiene el promotor *PMA1* de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la levadura, por una reacción LR (Invitrogen). Las construcciones fueron verificadas por la digestión con la enzima PvuII (Thermo Scientific. Inc).

### **Cepas y Medios de Crecimientos**

La cepa BY4741 (*MATa his3Δleu2Δmet15Δura3Δ*) se usó para determinar la sensibilidad a Na<sup>+</sup> en ensayos de gota. Para ello, las células se crecieron a 30°C en medio YPD (para preparar células competentes para la transformación) o

medios YNB sin aminoácidos (para seleccionar y mantener las transformantes) con 2% de glucosa como fuente de carbono y los suplementos auxotróficos adecuados. El fenotipo evidenciado por el crecimiento celular fue estimado mediante los ensayos de gota, los cuales consistieron en realizar diluciones seriales 1:10 a partir de una concentración de células con  $OD_{600} = 3$  en medios YNB sólidos sin y con las diferentes concentraciones de NaCl. El crecimiento celular se registró después de 4 días de incubación a 30°C mediante la adquisición de imágenes (Molecular Imager Gel, Doc XR, BioRad). La mutación del gen *ERV14* se llevó a cabo mediante la recombinación homóloga usando el marcador KanMx y el sistema Cre-LoxP, generándose la cepa BY4741 $\Delta$ *erv14*. Los oligos usados se describen en la anexo 1. Las clonas obtenidas se enlistan en el apéndice C.

### **Expresión transitoria en hojas de la epidermis de *Nicotiana benthamiana*.**

#### **Construcción de los plásmidos**

Para la identificación de la localización de las proteínas mediante la fluorescencia de *OsHKT1;3*-EYFP y *OsCNIH1*-EYFP, la región codificante de *OsHKT1;3* y *OsCNIH1*, se amplificó por PCR usando los oligos descritos en la anexo 1 sin incluir el codón de paro, para su posterior clonación en el vector pENTR-TOPO, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen). Estos productos de PCR se subclonaron en los vectores binarios pX-EYFP-GW y pX-Cherry-GW mediante una reacción LR siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen). En los experimentos donde se analizó la complementación de la fluorescencia de la YFP se usaron los plásmidos pYFC43-GW y pYFN43-GW (Belda-Palazón et al., 2012). La fusión traduccional de las proteínas fluorescentes se llevó a cabo en el carboxilo terminal, ya sea de *OsCNIH1* o de *OsHKT1;3*. Esto resultó en la generación de los vectores p*OsHKT1;3*-EYFP, p*OsCNIH1*-*mCherry* y p*OsHKT1;3*-*mCherry*. Las construcciones fueron verificadas por digestión con la enzima PstI siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen). Posteriormente se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 con cada una de estas construcciones, pero para ello se tuvieron que preparar

previamente células electrocompetentes de *A. tumefaciens* como se describe a continuación, para su posterior uso en la expresión en las hojas de Tabaco (las clonas se enlistan en el apéndice B).

### **Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

Para la preparación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*, se preparó un preinóculo, el cual se obtuvo al sembrar una asada de células de *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 en un tubo falcón de 15 ml, conteniendo 5 ml de medio LB con rinfampicina 50 µg/ml. Este cultivo se dejó crecer durante dos días con agitación constante de 300 rpm a 28 °C. Con 5 ml del preinóculo, se inoculó un matraz con 1 L de LB + rinfampicina 50 µg/ml y se dejó crecer toda la noche a 28°C a 300 rpm; una vez alcanzada la OD de 0.5, inmediatamente se pasó a hielo y se incubó en el cuarto frío (4°C) por 30 min. Después, las células se centrifugaron a 4,000 g a 4°C durante 20 min (o JA-10, Beckman Coulter); terminada la centrifugación se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron suavemente sin hacer burbujas en 500 ml de 1 mM de HEPES pH 7 frío. Se volvió a centrifugar a 4,000 g a 4 °C durante 20 min; rápidamente se desechó el sobrenadante y la células se resuspendieron suavemente en 250 ml de 1 mM de HEPES pH 7 frío, se volvió a centrifugar a 4,000 g a 4°C durante 20 min y rápidamente se volvió a desechar el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente en 50 ml de glicerol al 10% en 1mM de HEPES pH 7 frío. Se volvió a centrifugar a 4,000 g a 4°C, se desechó rápidamente el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2.5 ml de glicerol al 10% en 1 mM de HEPES pH 7 frío para posteriormente hacer alícuotas de 100 µl en tubos estériles de 1.5 ml previamente fríos, las células competentes se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaran a -80°C.

### **Transformación de *Agrobacterium tumefaciens***

Las células electrocompetentes guardadas en -80°C se descongelaron en hielo dentro de una campana de flujo laminar para evitar una posible contaminación, se les agregó 1.5 a 3 µl de ADN plasmidico (150-400 ng), y se mezclaron suavemente sin pipetear. Posteriormente se pasaron a las celdas de

electroporación previamente frías de 0.1 cm (BioRad) y se les aplicó un choque eléctrico con un electroporador (*MicroPulser Electroporation Apparatus, BioRad*) 2.2 kV durante 5 ms. Posteriormente se les agregó 400 µl de medio LB líquido y se incubaron a 30 °C con agitación a 300 rpm durante 2 h. Después se sembraron 200 µl del cultivo de células transformadas en caja Petri con medio LB sólido conteniendo Espectomicina/Rifampicina o Kanamicina/Rifampicina (a una concentración de 50 µg/ml para ambos antibióticos). Se dejaron incubar a 30 °C durante 48 h aproximadamente.

### **Expresión transitoria de proteínas fluorescentes en la lámina de la hoja de tabaco por medio de transformación con *Agrobacterium tumefaciens***

Para la expresión transitoria de las proteínas fluorescentes OsHKT1;3 y OsCNIH1 se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de una edad de 7 a 8 semanas crecidas en condiciones de invernadero a 25°C en macetas conteniendo suelo Metromix 500 (SunGro) mediante el uso de *A. tumefaciens* (Cepa GV3101). Para llevar a cabo la infiltración de las hojas con *Agrobacterium*, un cultivo de *A. tumefaciens* de 30 ml se incubó a 28°C en LB conteniendo espectomicina (50µg/ml) y rinfampicina (50 µg/ml) con una agitación de 300 rpm por alrededor de 20 h hasta tener una OD<sub>600</sub> de 0.3 a 0.5. Este cultivo se centrifugó a 4,000 g por 5 min a temperatura ambiente (centrífuga GS-15R, Beckman, Coulter) y las células se resuspendieron en buffer de infiltración (IF; 0.6 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, 0.4 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, 250 mg Glucosa y 25 µl de Acetociringona 100 mM en un vol final de 50 ml). Subsecuentemente, el cultivo se re-centrifugó y se resuspendió en 1 ml de buffer IF. La densidad óptica OD<sub>600</sub> de la mezcla de bacterias para infiltrar las hojas se ajustó a 0.3 con buffer IF para las construcciones *pOsHKT1;3-EYFP*, *pOsHKT1;3-mCherry*, *pOsCNIH1-EYFP*, *pOsCNIH1-mCherry* y para las construcciones *pAtPIP2A-mCherry*, *pAtWAK2-Citrina* y *pGmMAN-Citrina* se ajustó a 0.1. En el caso particular de *pAtSec24-YFP* la densidad de infección fue de 0.05. La inyección en la lámina de las hojas de tabaco fue realizada mediante una jeringa para insulina de 1 ml sin aguja en una sección donde previamente se había removido la epidermis.

## **Observación al microscopio de epi-fluorescencia y microscopio confocal multifotónico**

Para observar la fluorescencia se empleó el microscopio de Epifluorescencia gentilmente prestado del Laboratorio del Dr. Mario Rocha. Tanto las hojas infectadas con las construcciones *pOsHKT1;3-EYFP*, *pOsHKT1;3-mCherry*, *pOsCNIH1-EYFP*, *pOsCNIH1-mCherry*, *pAtPIP2A-mCherry*, *pAtWAK2-Citrina*, *pGmMAN-Citrina* y *pAtSec24-YFP* como los ovocitos inyectados con la construcción *pOsHKT1;3-EGFP* se probaron en un periodo de 1 a 5 días después de la infiltración/inyección para determinar el tiempo requerido para la correcta expresión de las proteínas.

Las imágenes capturadas en el microscopio confocal fueron obtenidas de epidermis de hojas después de 3 días de haber sido infectadas. La adquisición de las imágenes fue mediante el microscopio IX81 invertido multi-fótonico Olympus FV1000. Aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> del tejido epidérmico abaxial de hojas de tabaco se montó en un porta objetos con agua. El objetivo 60x de inmersión en aceite se utilizó para su análisis. Para observar la fluorescencia de EYFP se empleó un láser Multi-line Argon a 514 nm para su excitación y un filtro de barrera 540/30 para su emisión. La fluorescencia de la Citrina se llevó a cabo mediante su excitación con un láser Multi-line Argón a 488 nm y un filtro de barrera 515/30 para su emisión. La fluorescencia de mCherry se visualizó mediante su excitación con un láser Green Helium Neon a 543 nm y un filtro de barrera 630/60 para su emisión. El tamaño de la imagen es en todos los experimentos de 640 x 640 píxeles. La intensidad del láser para estas proteínas fluorescentes fue de 2, 3 y 5%, respectivamente.

Para llevar a cabo los experimentos de co-localización de las proteínas de interés, el primer paso fue identificar dos proteínas fluorescentes (PF) con espectros de excitación y emisión que no coincidieran. Es por ello que se trató de evitar el efecto conocido en microscopia de fluorescencia como sangrado de la fluorescencia que ocurre cuando el espectro de emisión de una PF se sobrepone al espectro de otra PF. Al mismo tiempo se evitó el fenómeno conocido como

excitación cruzada o “crosstalk” que sucede cuando la excitación de ambas PF es por la misma longitud de onda. Para obtener la mejor resolución posible y prevenir la excitación cruzada y el sangrado de las señales asociadas a las proteínas fluorescentes, se decidió utilizar a las proteínas EYFP y mCherry en pareja para los estudios de colocalización. Como se describe a continuación la excitación cruzada es mínima en este par de PF debido a que cuando estas PF se excitan con la longitud de onda de 514 nm (con la cual se logra el 100% de la excitación de la EYFP) solo un 18% de la mCherry se logra excitar. De la otra manera cuando se excitan con una longitud de onda de 543 nm (con la cual se llega a excitar hasta un 51% de la mCherry ya que el confocal del LNMA-IBT no cuenta con un láser de 594 nm que podría excitar hasta el 90% de la mCherry) solo un 8% de la EYFP logra ser excitada. Por otra parte el efecto de sangrado en este par de PG es mínimo ya que los espectros de emisión para la EYFP y mCherry alcanzan un máximo de emisión a 527 y 610 nm, respectivamente mostrando un sobreposición de 1.8% entre ellos, sin embargo gracias al empleo del filtro de emisión para la EYFP que permiten la colecta de la fluorescencia en un rango del espectro entre 525 a 555 nm y el usado para la mCherry que está en un rango del espectro entre 600 a 660 nm se pudo evitar principalmente este sangrado de la emisión de la EYFP sobre la emisión de la mCherry y con ello estar seguros de que la fluorescencia obtenidas del microscopio confocal pertenecen a cada una de las PF fusionadas a los marcadores subcelulares o proteínas a estudiar.

## **RESULTADOS**

### **Localización tisular y celular de OsHKT1;3**

Varios trabajos sobre los transportadores HKT en plantas muestran la localización de este transportador en la membrana plasmática. En plantas existe cierta incertidumbre sobre la localización de estas proteínas de transporte iónico en las membranas de las células vegetales ya que un gran número de estos transportadores de plantas se expresaron en células animales, (Horie et al., 2001; Horie et al., 2007, 2011). Existen varias técnicas para el estudio de la localización

real de este transportador en la célula vegetal, tales como inmunolocalización directamente en tejidos tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica. Por otro lado se puede hacer uso de la microscopía confocal en combinación con proteínas fluorescentes asociadas a las proteínas de interés, así como el fraccionamiento subcelular de las membranas biológicas con la finalidad de identificar la localización intracelular de la proteína.

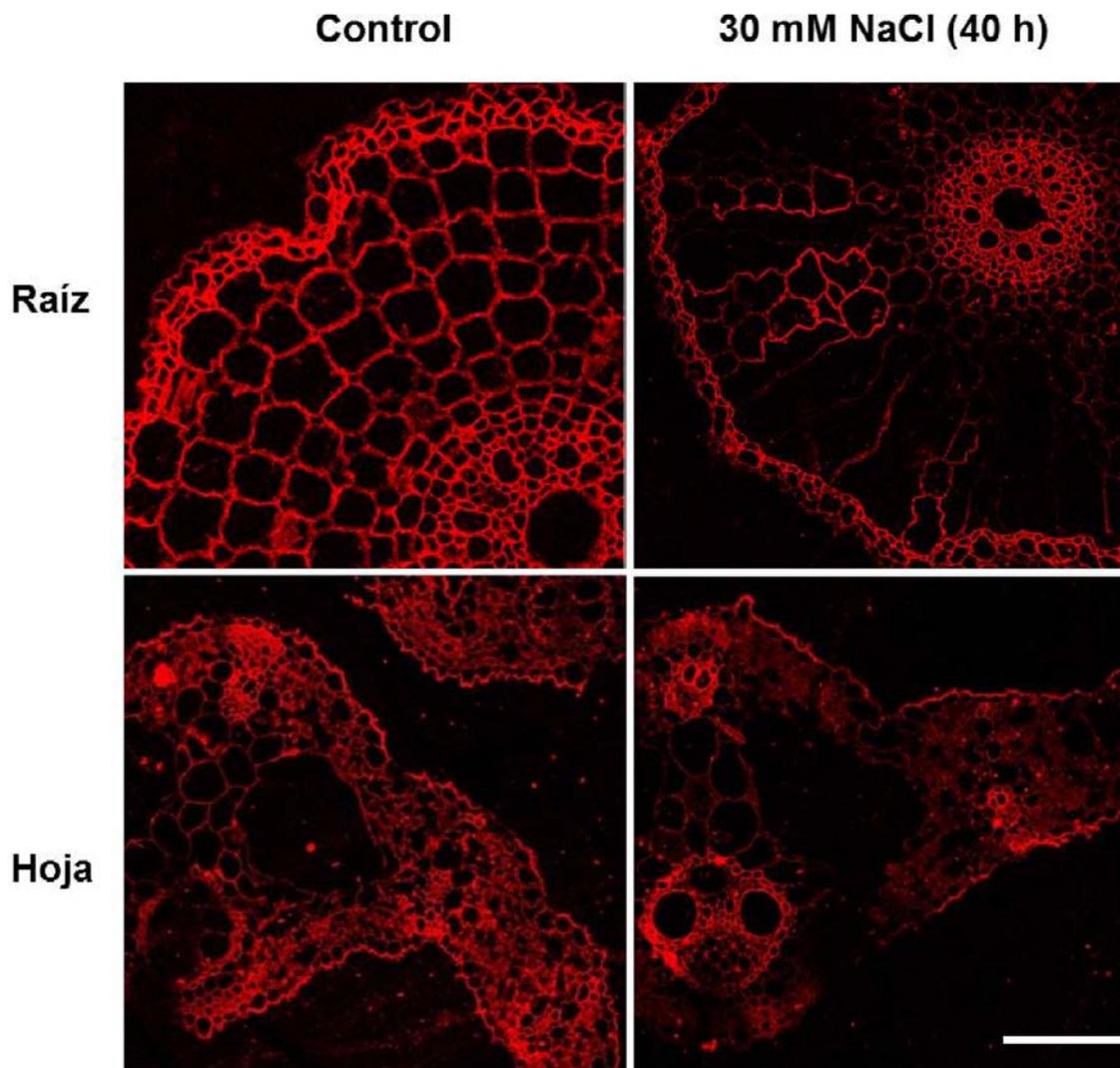
A continuación se describe el empleo de varias de estas técnicas para demostrar la localización celular de OsHKT1;3.

### **Inmunolocalización de OsHKT1;3 en la raíz y las hojas**

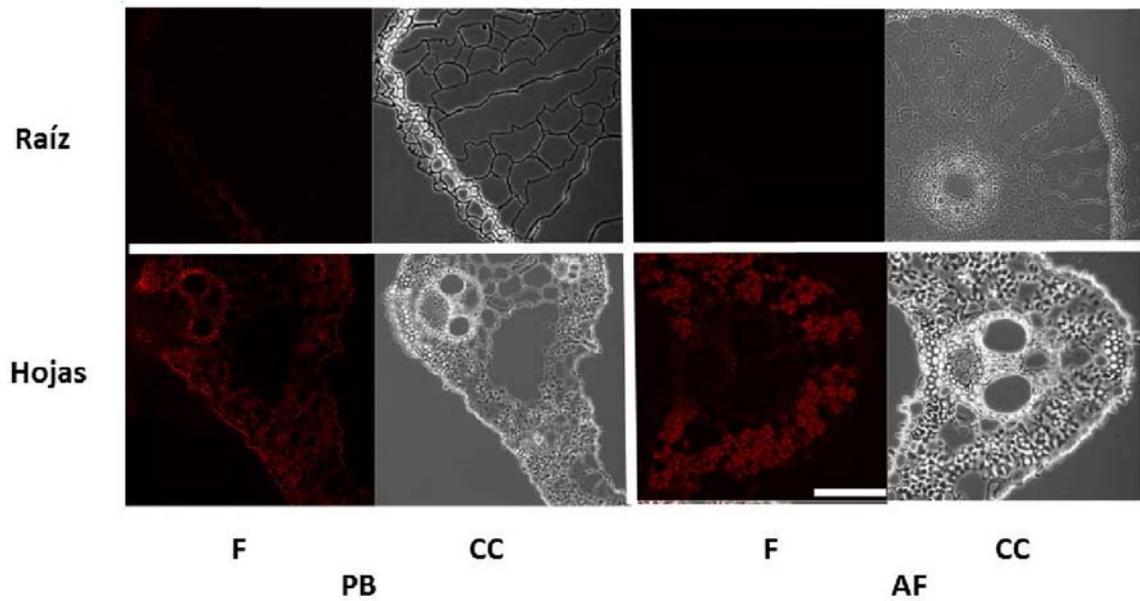
Se ha observado que en la adaptación de las plantas al estrés por  $\text{Na}^+$ , es muy importante el control de la absorción de este catión, su transporte a larga distancia a lo largo del floema y/o xilema, su acumulación en la parte aérea, así como su almacenamiento a nivel sub-celular y/o en los tejidos. Para identificar la localización de OsHKT1;3 en los tejidos del arroz se inmunolocalizó con un anticuerpo primario a anti-OsHKT1;3 para después acoplarlo al anticuerpo secundario asociado a los nanocristales Q-Dots. Los Q-Dots muestran varios beneficios en la detección de proteínas de baja abundancia mediante visualización de su fluorescencia a través de microscopía confocal.

Estos estudios de inmunolocalización se realizaron en tejidos de plantas de arroz cv. Pokkali crecidas en condiciones normales (controles) a 40 días de edad. Los resultados indican que OsHKT1;3 se localiza abundantemente en la epidermis, la exodermis, los haces vasculares y la corteza de la raíz (Fig. 1 Raíz-Control). En las hojas, se observó que la expresión de OsHKT1;3 ocurre principalmente en las células Bulliformes, en la epidermis, en los tejidos vasculares (células del parénquima del floema y del xilema) y en el mesófilo (Fig. 1 Hoja-Control).

En la literatura se ha reportado que varios transportadores de la familia HKT participan en procesos de tolerancia a la salinidad (Cotsaftis et al., 2012; Ren et al., 2005), por ello se estudió la expresión de la proteína OsHKT1;3. cuando las plantas del arroz se expusieron a 30 mM NaCl durante 40 h. En raíces expuestas



**Figura 1. Inmunolocalización de OsHKT1;3 en los tejidos de la planta del arroz y en condiciones control y de exposición a 30 mM de NaCl.** Fluorescencia correspondiente a la localización de OsHKT1;3 en un corte transversal de una raíz madura de una planta control (Raíz, control), de una raíz expuesta a 30 mM NaCl por 40 h (Raíz, NaCl), una hoja control (Hoja, control) y una hoja de una planta expuesta a NaCl (Hoja, NaCl). La escala corresponde a 50  $\mu$ m.

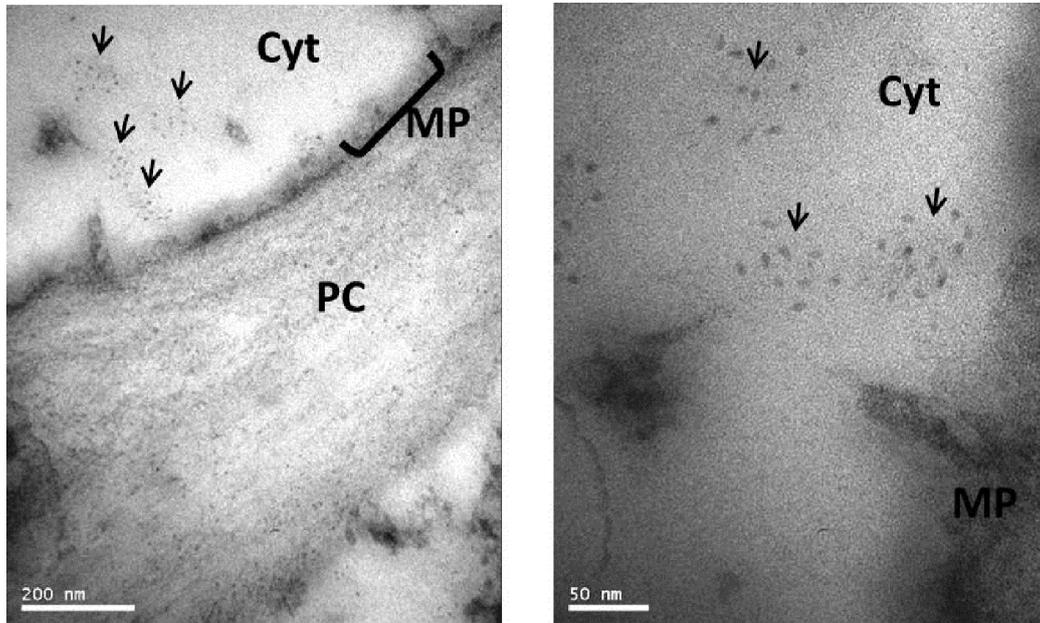


**Figura 2. Autofluorescencia de los tejidos de la raíz y de las hojas del arroz y de la señal del suero preinmune.** Cortes transversales de la **Raíz** y de una **Hoja** expuestos al suero preinmune (**PB**) y sin ser expuestos a suero alguno para observar su autofluorescencia (**AF**). **F** muestra la señal de la fluorescencia y **CC**, es el campo claro de los tejidos. La escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

al NaCl, la abundancia de OsHKT1;3 disminuyó como lo indica la menor fluorescencia observada en las células de los haces vasculares y la exodermis, así como en las células de la corteza (Fig. 1 Raíz-30 mM Na<sup>+</sup>). En las hojas de plantas tratadas con Na<sup>+</sup> también se observó que la intensidad de la fluorescencia disminuyó en el mesófilo pero no en las células bulliformes, ni en las células parenquimatosas de los haces vasculares (Fig. 1 Hojas-30 mM Na<sup>+</sup>). En ambos experimentos se empleó la misma intensidad del láser para excitar los Q-dots. Para comprobar que la fluorescencia fue debida al reconocimiento específico de la proteína por los anticuerpos, se analizó la señal de autofluorescencia en muestras de ambos tejidos en ausencia del anticuerpo anti-OsHKT1;3. Como se muestra en la figura 2, en la raíz no se observó autofluorescencia alguna, (Fig. 2 Raíz-AF). Sin embargo, en la hoja se observó auto-fluorescencia en el mesófilo con menor intensidad que la observada con el anti-OsHKT1;3 (Fig. 2 Hoja-AF). Por otro lado y para descartar la posibilidad de que la fluorescencia fuese no específica y debida al reconocimiento de proteínas de origen vegetal debido al uso de anticuerpos obtenidos de conejos, se usaron los sueros del pre-sangrado tanto en las raíces como en las hojas (Fig. 2 PB). Estos análisis mostraron que en las raíces hubo una señal ligera en la exodermis (Fig. 2 Raíz-PB), mientras que en la hoja además de observar la auto-fluorescencia del mesófilo, se observó una ligera señal en los haces vasculares (Fig. 2 Hojas-PB).

Los resultados mostraron que la localización de la proteína OsHKT1;3 en la raíz fue confiable para los tejidos de la epidermis, haces vasculares y la corteza, debido a que no se detectó autofluorescencia, solo cuando se usó el suero del pre-sangrado se detectó una señal en la exodermis por lo cual se descartó la localización en este tejido de la proteína OsHKT1;3. Desafortunadamente en el caso de las hojas tanto el suero pre-inmune como la autofluorescencia muestran una señal abundante con lo cual fue imposible determinar la localización de la proteína OsHKT1;3 en este tejido.

### **Inmunolocalización de OsHKT1;3 mediante microscopia electrónica**

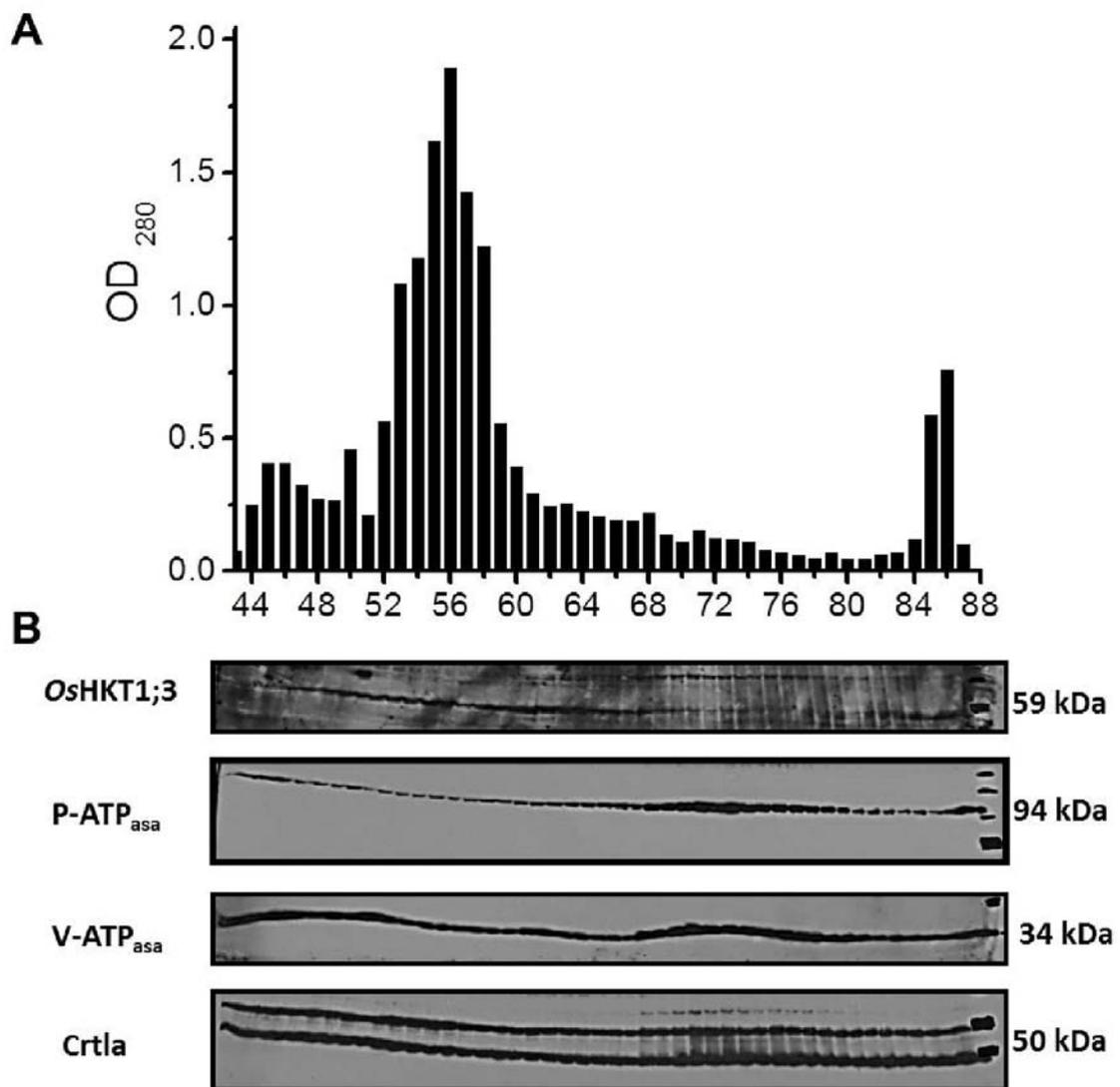


**Figura 3. Inmunolocalización de OsHKT1;3 mediante microscopía electrónica.** Imágenes capturadas mediante microscopía electrónica a baja (Izquierda) y alta resolución (Derecha) revelaron la señal de los Q-Dots acoplada al anticuerpo anti-OsHKT1;3 en la parte intracelular (partículas ovaladas, **Flechas**) y no en la membrana plasmática (**MP**) de células de la raíz de plantas de arroz cv. Pokalli. Citoplasma (**Cyt**); Pared celular (**PC**). La escala corresponde a 200 y 50 nm en la izquierda y derecha, respectivamente.

Para determinar los compartimientos subcelulares en donde se localiza OsHKT1;3 se empleó la microscopia electrónica en combinación con los anticuerpos anti-OsHKT1;3 y los anticuerpos secundarios anti-conejo ligados a Q-Dots, que por ser electrónicamente densos, pueden observarse en el microscopio electrónico. Empleando este procedimiento en las raíces de la planta de arroz cv. Pokkali en condiciones normales de crecimiento (Fig. 3), se observó la presencia de cuerpos ovalados agregados en el citoplasma de la célula y que corresponden a los Q-dots, indicando que la expresión de OsHKT1;3 ocurre intracelularmente (Fig. 3 Izq.). Desafortunadamente, el proceso de fijación y tinción de las muestras no permitió la identificación del compartimiento subcelular donde se localizó a OsHKT1;3, sin embargo estos resultados sugieren que esta proteína no se localiza en la membrana plasmática.

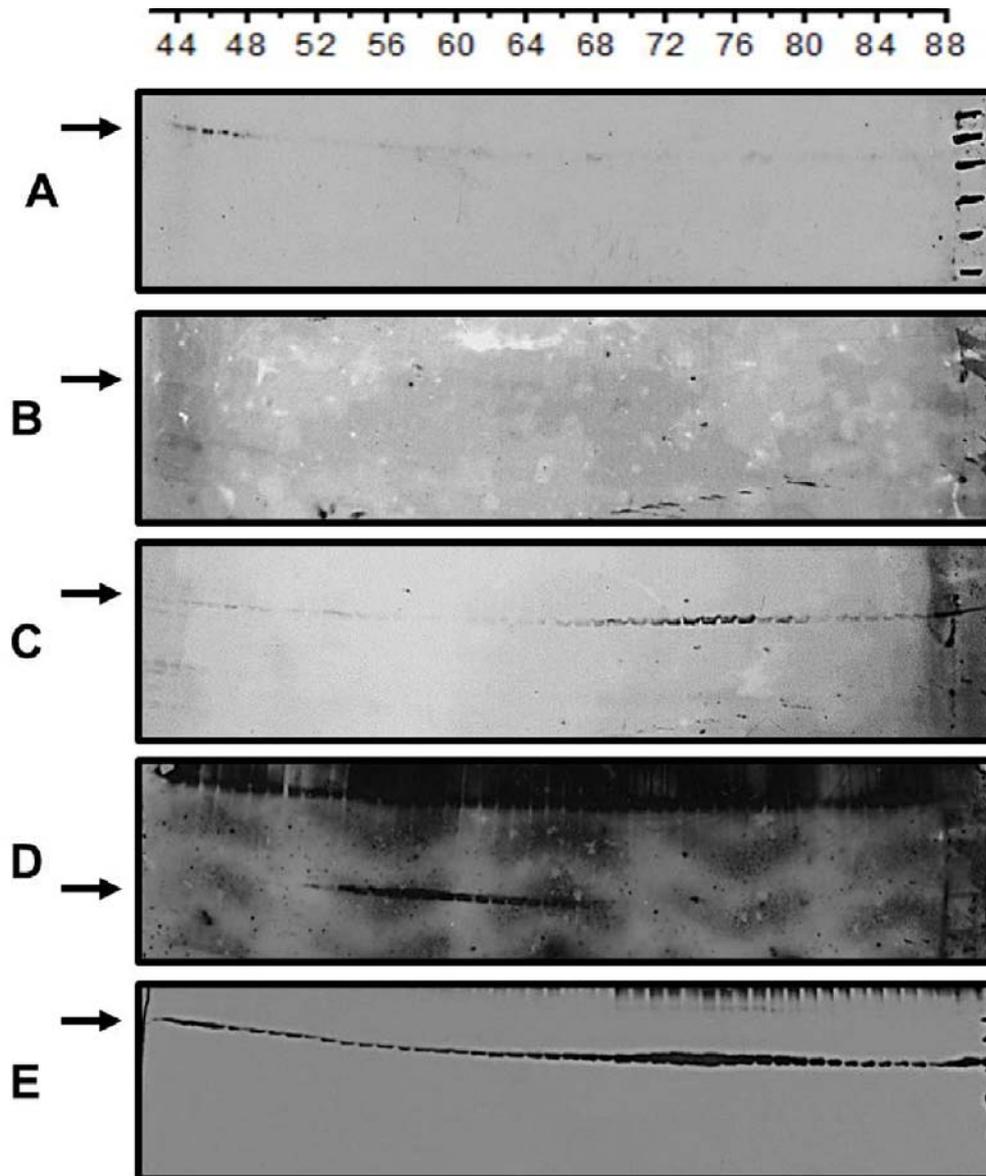
#### **Aislamiento de compartimientos subcelulares por electroforesis de flujo libre**

Como se pudo observar en la figura 3 la localización subcelular de OsHKT1;3 no es clara por ello se dio paso a aislar a los compartimientos subcelulares mediante la técnica de electroforesis de flujo libre. Se sabe que la membrana de cada compartimiento celular posee una carga eléctrica neta, siendo la membrana plasmática la más electronegativa y el tonoplasto la más electropositiva (Barkla et al. 2007). Mediante la electroforesis de flujo libre, la fracción microsomal, la cual contiene a todas las membranas celulares, se separa en una cámara donde la matriz es líquida y el establecimiento de un campo eléctrico perpendicular al flujo de esta matriz separa a los compartimientos subcelulares hacia el ánodo o hacia el cátodo, según su carga. Este aparato tiene la posibilidad de coleccionar hasta 96 fracciones, lo que permite la separación de las diferentes membranas. Como se muestra en la figura 4, la cuantificación de la absorbancia a 280 nm de todas las fracciones permitió identificar que a partir de la fracción 43 y hasta la fracción 87 se observó la acumulación de proteínas de las hojas del arroz. Como se puede observar en el histograma, la separación de las diferentes proteínas de membrana ocurrió principalmente en tres grupos, siendo el primero en las fracciones 45-46, el segundo en las fracciones 55-56 y el tercero en las fracciones 85-86 (Fig. 4 A). La



**Figura 4. Separación de las membranas celulares de las hojas del arroz por electroforesis de flujo libre a partir de la fracción microsomal. A** Absorbancia a 280 nm de la proteína colectada en las fracciones 43 a la 87 separadas a partir de la fracción microsomal de las hojas de arroz crecidas en condiciones normales y 40 días de edad. **B** Western-Blots de las fracciones 43-87 donde se revela la señal de OsHKT1;3 (fracciones 45-68 y 83-87), de la P-ATPasa (fracciones 68-80; marcador de membrana plasmática), la subunidad E de la V-ATPasa (fracciones 43-87; marcador del tonoplasto) y Calreticulina (fracciones 43-87; Crtla; marcador del Retículo endoplásmico/Aparato de Golgi). El suero anti-OsHKT1;3 se usó para revelar la señal en los WB.

aparición de tres picos en el histograma sugiere la separación de tres membranas celulares de acuerdo a su carga eléctrica en las fracciones antes mencionadas. Para identificar los compartimientos subcelulares correspondientes a los tres picos, se procedió a separar las proteínas presentes en estas fracciones (43 a 87) mediante SDS-PAGE para analizarlas posteriormente con ensayos tipo western-blot (WB). Empleando el anticuerpo que reconoce a la H<sup>+</sup>-ATPasa expresada en la membrana plasmática, se observó que esta proteína se localizó en todo el gradiente, con una mayor abundancia en las fracciones 68 a la 80 (Fig. 4 B P-ATPasa). Empleando el anticuerpo que reconoce a la subunidad E de la V-ATPasa presente en el tonoplasto, observamos que ésta se localizó también a lo largo de todas las fracciones, pero sin presentar un enriquecimiento aparente en fracciones específicas (Fig. 4 B V-ATPasa). Mediante el empleo de un anticuerpo en contra de la calreticulina, una proteína localizada en el retículo endoplásmico (RE), se observó la presencia de dos polipéptidos en todas las fracciones, sin identificar el enriquecimiento de estos en alguna fracción en particular (Fig. 4 B Ctrl). A pesar de que estos resultados no nos permitían identificar claramente a los diferentes compartimientos intracelulares, empleamos el anticuerpo no purificado en contra de OsHKT1;3 para determinar en qué fracciones se encuentra esta proteína. Como se observa en la figura 4 B (OsHKT1;3), aparentemente y de manera no muy clara, el anticuerpo reveló una banda correspondiente al peso molecular de la proteína ( $\pm 59$ kDa) y mostró que OsHKT1;3 se localizó desde la fracción 45 hasta la 68 y entre las fracciones 83-87. De igual manera notamos que el anticuerpo anti-OsHKT1;3 reconoció otras proteínas que suponemos no corresponderían a OsHKT1;3 debido al peso molecular, ya que son de aproximadamente 100 kDa y se expresaron entre las fracciones 69-79. Sin embargo, estos resultados podrían sugerir que OsHKT1;3 no se expresa en la membrana plasmática, ya que su localización no coincide con la correspondiente a la P-ATPasa donde hay una disminución en la expresión de OsHKT1;3 (Fig. 4 B; comparar fracciones 68-80). Los resultados obtenidos mediante el fraccionamiento de los microsomas por EFF y el uso de anticuerpos para la localización de los compartimientos subcelulares pareció ser exitoso solo para la identificación de la



**Figura 5. Identificación de las fracciones membranales donde se expresan las proteínas OshKT1;1, OshKT2;3 y OshKT1;3.** Los inmunoensayos mostraron que la señal correspondiente a  $\pm 59$  kDa para OshKT1;1 (**A**) ocurrió en las fracciones 43-50; para OshKT2;3 (**C**) en las fracciones 68-80 y para OshKT1;3 (**B**) no se observó señal alguna. La señal correspondiente a la  $H^+$ -PP<sub>asa</sub> (43 kDa; fracciones 53-64) indica la localización del tonoplasto (**D**). La señal a 95 kDa para la P-ATP<sub>asa</sub> (fracciones 68-80) indica la localización de la membrana plasmática (**E**). Los anticuerpos purificados para anti-OshKT1;1, anti-OshKT1;3 y anti-OshKT2;3 se usaron para revelar la señal en los WB. Las flechas indican los pesos moleculares aproximados. La barra de arriba indica las fracciones.

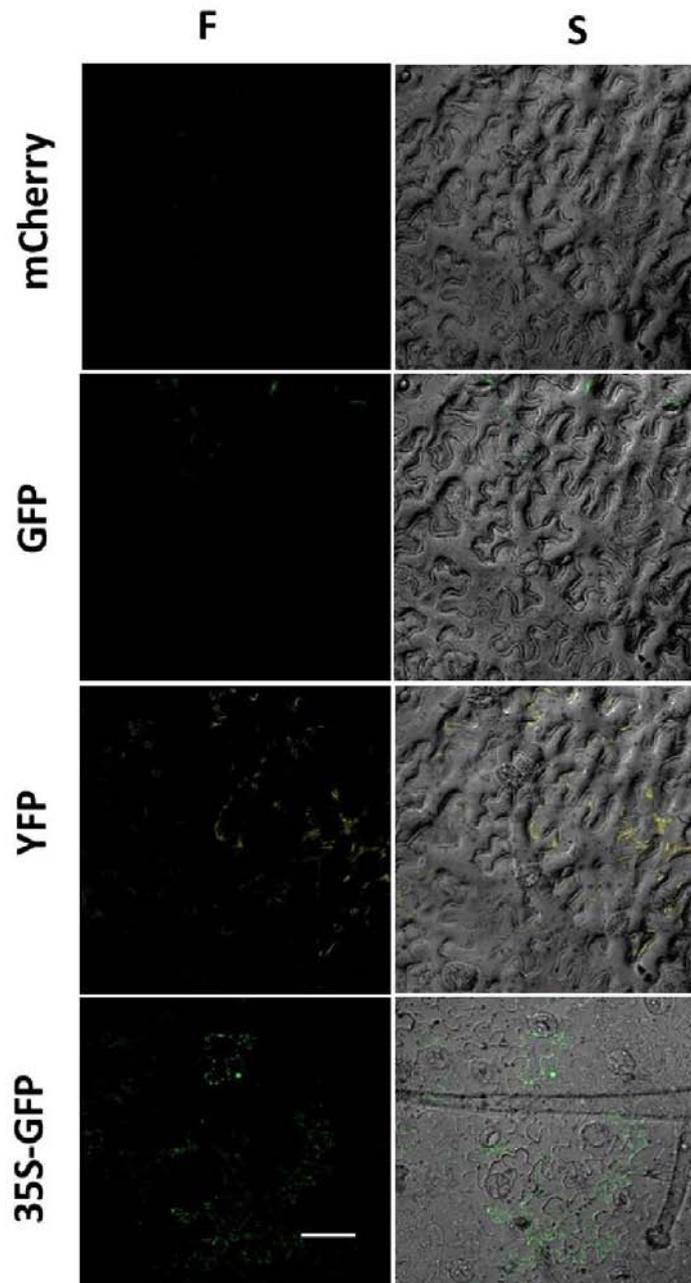
membrana plasmática (Fig. 4 B; P-ATPasa), ya que existe la incertidumbre de si el anticuerpo contra la subunidad E de la V-ATPasa realmente está identificando solo al tonoplasto u otros compartimientos debido a la señal obtenida en todas las fracciones. También cabe la posibilidad de que mediante esta técnica el enriquecimiento del tonoplasto no se pudo obtener fracciones específicas para la planta de arroz. Por ello se decidió emplear el anticuerpo que reconoce a la pirofosfatasa, otro marcador del tonoplasto, con el cual se observó un enriquecimiento de las fracciones 51 a la 65 (Fig. 5 D). Para los siguientes WB no se usó el suero anti-OsHKT1;3 sino los anticuerpos purificados anti-OsHKT1;3 ya que los primeros resultados poco contundentes con el anticuerpo anti-OsHKT1;3 aparentemente no reconocía claramente a OsHKT1;3, o también cabe la posibilidad de que no es adecuado para la técnica de WB. Con ello surgió la necesidad de comprobar si el anticuerpo anti-OsHKT1;3 era adecuado para los ensayos de WB. Para ello decidimos usar otros dos anticuerpos puros, los cuales reconocen a OsHKT1;1 y a OsHKT2;3. El homólogo más cercano de este último es OsHKT2;4 con el que comparte el 93% de identidad a nivel de aminoácidos y se localiza en la membrana plasmática (Horie et al., 2011a), con lo cual se podría especular que la localización probable de OsHKT2;3 fuese también en la membrana plasmática. OsHKT1;1 comparte una identidad del 37% con OsHKT1;5, el cual se localiza en la membrana plasmática (Ren et al., 2005). El empleo de estos dos anticuerpos en ensayos de WB mostraron que OsHKT1;1 se detecta en las fracciones 43-50, fracciones que no comprenden al tonoplasto (Fig. 5D) ni a la membrana plasmática (Fig. 5 E, P\_ATP<sub>asa</sub>). El anticuerpo anti-OsHKT1;3 no reconoció a ninguna proteína en todas las fracciones (Fig. 5 B). El anticuerpo anti-OsHKT2;3 reaccionó con una proteína de aproximadamente 50 kDa (Fig. 5 C) en las fracciones correspondientes a la membrana plasmática de acuerdo a lo observado con el anticuerpo anti-P-ATPasa (Fig. 5 E P-ATPasa). Debido a los resultados obtenidos mediante WB el anticuerpo anti-OsHKT1;3 no muestra ser adecuado para la detección de la proteína fraccionada.

## **Localización de OsHKT1;3 mediante su fusión en su carboxilo terminal a la EYFP**

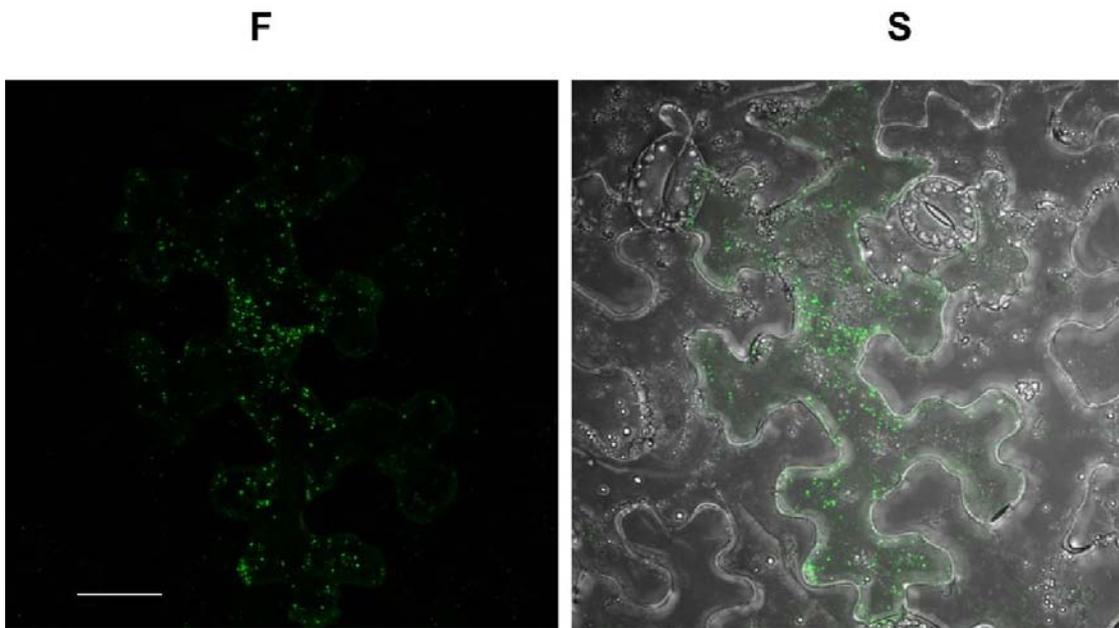
Los datos de la microscopía electrónica mostraron que el transportador OsHKT1;3 se localizó intracelularmente, desafortunadamente no se pudo resolver en qué organelo estaba ubicado, por ello se decidió fusionar en el extremo carboxilo de OsHKT1;3 a la proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP, Enhanced Yellow Fluorescent Protein) como alternativa para identificar la localización subcelular de OsHKT1;3. La expresión del transportador OsHKT1;3 y de la proteína fluorescente estuvieron bajo control del promotor 35S. El sistema que se empleó fue la expresión transitoria de OsHKT1;3 en las hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante su infección y posterior transformación con *A. tumefaciens*.

Como controles de señales positivas falsas se utilizó la epidermis de las hojas de tabaco silvestres no transformadas y se observaron en el microscopio confocal empleando las mismas condiciones que se usaron en las epidermis transformadas con las construcciones génicas descritas más adelante, esto es, longitud de onda de excitación de 488 nm para GFP, 514 nm para YFP y 543 nm para mCherry. En la figura 6 se muestra la auto-fluorescencia de la epidermis a las diferentes longitudes de onda, la cual fue basal (YFP), o nula en algunos casos (mCherry). Como control de la transformación se usó una construcción que expresa a la GFP citoplásmica bajo el control del promotor 35S (Fig. 6 35S-GFP). Estos resultados mostraron que la metodología empleada para la expresión transitoria de las proteínas de interés no causó artefactos, lo cual permitió continuar con los estudios sobre la localización subcelular de OsHKT1;3.

Mediante microscopía confocal se pudieron obtener imágenes de la localización de OsHKT1;3-EYFP, la cual se observó como puntos distribuidos por toda la célula (Fig.7, Izq.), lo cual estaría confirmando que OsHKT1;3-EYFP se localiza intracelularmente (Fig.7 Der. y comparar Fig. 3). El resultado de la localización de OsHKT1;3 intracelularmente nos condujo a identificar cuál era el compartimiento subcelular en donde reside esta proteína. Para ello decidimos co-expresar en las plantas de tabaco a la proteína OsHKT1;3 con marcadores subcelulares. Para

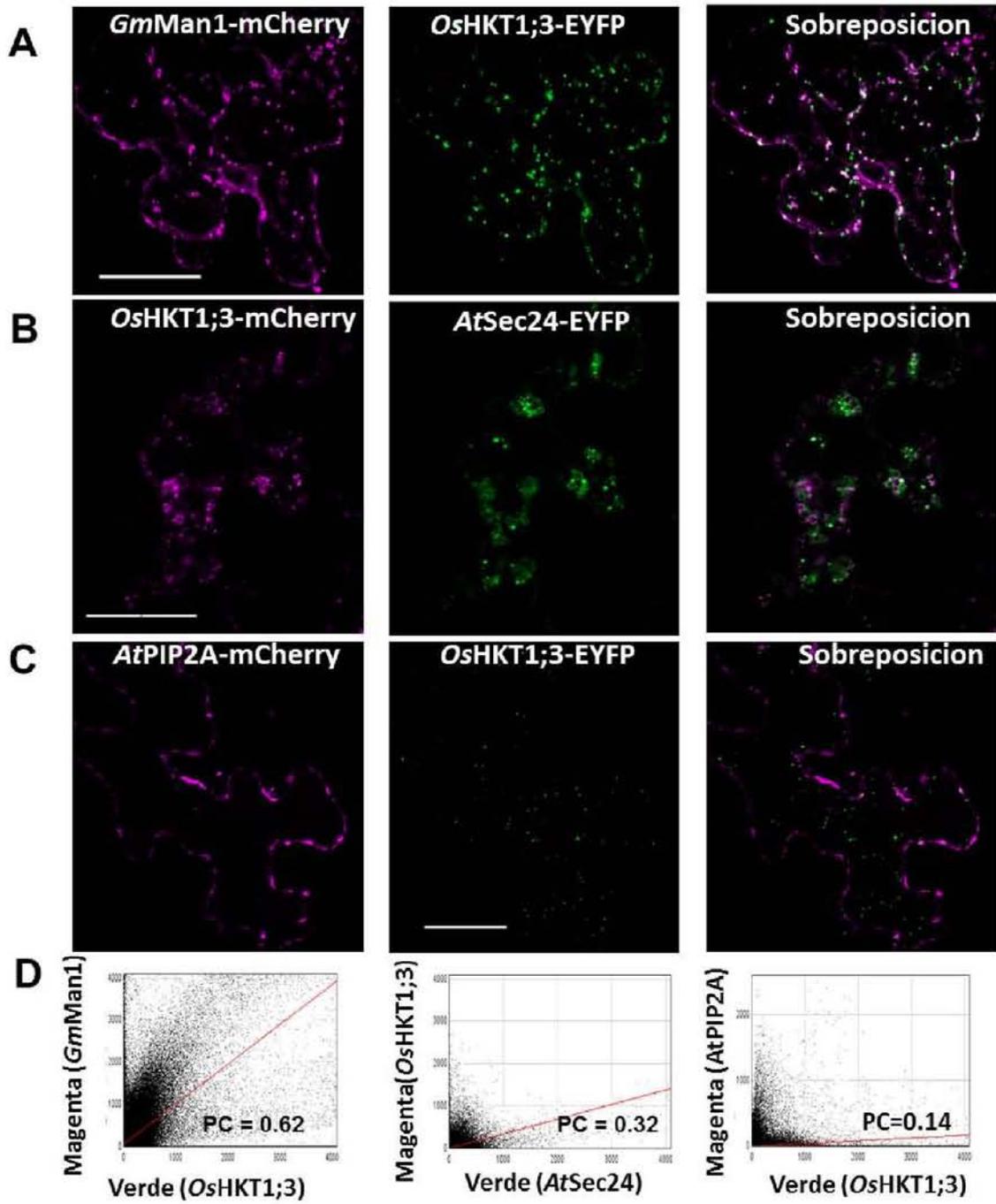


**Figura 6. La epidermis de hojas de tabaco no presenta autofluorescencia.** Cortes confocales de células de la epidermis de hojas del tabaco obtenidos bajo las mismas condiciones (longitudes de onda de excitación y emisión) empleadas para excitar a las proteínas fluorescentes **mCherry** (543 y 630/60 nm), **GFP** (488/ y 515/30 nm) o **YFP** (514 y 540/30nm), sin expresar proteína fluorescente alguna. **F** Fluorescencia; **S** sobreposición con el campo claro. Fluorescencia de la GFP dentro de una célula epidérmica de la hoja del tabaco transformada con una construcción conteniendo a la GFP soluble dirigida bajo el promotor 35S, **35S-GFP**. La escala corresponde a 50  $\mu$ m.



**Figura 7. OshKT1;3-EYFP se localiza en el citoplasma.** La fluorescencia de la EYFP (**F**) fusionada al carboxilo terminal de OshKT1;3 se observó de forma punteada en el citoplasma. **S** Sobreposición de esta señal con el campo claro (**S**). La escala es de 50  $\mu$ m.

obtener la mejor resolución posible y prevenir la sobreposición de las señales asociadas a las proteínas fluorescentes, se decidió utilizar a las proteínas EYFP y mCherry en pareja para los estudios de colocalización, ya que sus espectros de excitación y emisión muestran poca sobreposición (ver Materiales y Métodos). En la figura 8 A (Centro) se observa la expresión de *OsHKT1;3-EYFP* como puntos de color verde distribuidos por toda la célula, como anteriormente se había percibido (Fig.7 Izq.). En comparación, el marcador del aparato de Golgi, *GmMan1-mCherry*, se observó de igual forma, como puntos de color magenta (Fig. 8 A Izq.), que al sobreponer ambas imágenes se pudo ver claramente regiones de color blanco, lo que indicaba la colocalización de ambas proteínas (Fig. 8 A, Der.). Al mismo tiempo se pudieron observar puntos de color magenta o verde, lo cual indicaba que existían regiones en donde las dos proteínas no co-localizaban. Para obtener una cuantificación del nivel de colocalización de las dos proteínas, se analizaron las imágenes mediante el software ImageJ, usando el Plug-in JACoP. La colocalización de las dos señales percibidas en dos colores se puede observar en una gráfica de dispersión en donde el número de píxeles en verde y magenta corresponden a los ejes X y Y, de manera que si se observa una relación lineal, indica que las dos señales colocalizan. Si el número de píxeles es mayor para una de las señales, la relación lineal se desviará hacia el eje correspondiente. Posteriormente, mediante un ajuste de mínimos cuadrados, se puede calcular la pendiente del ajuste lineal, la cual es directamente proporcional al coeficiente de Pearson. Si el valor de esta pendiente es 1 indica que el 100% de las señales colocalizan y si es 0 significa una sobreposición al azar de los dos colores. En la figura 8D izquierda se muestra una gráfica de dispersión en donde los píxeles correspondientes a los dos canales (magenta y verde) se agruparon en una línea recta que tendió hacia el canal magenta (señal que corresponde a *GmMan1-mCherry*) debido al mayor número de píxeles. El coeficiente de Pearson (PC) calculado fue de 0.62, lo cual indica que *OsHKT1;3-EYFP* y el marcador del aparato de Golgi colocalizan. Para demostrar que la probabilidad (*P-value*) de esta colocalización cuantificada por el valor del PC es estadísticamente significativa y que este valor no se debe a una colocalización al azar de las proteínas, el Plug-in



JACoP lleva cabo un análisis de imágenes con el cual se distribuyen al azar los píxeles de una imagen (magenta) y se mide el valor de PC con la otra imagen, la cual mantiene la distribución original de los píxeles (verde). Comparando así la cantidad de la correlación medida de la imagen con los píxeles distribuidos al azar, se puede determinar si la probabilidad de distribución de una cantidad específica de estas dos proteínas se debe a una sobreposición al azar (colocalización falsa). El análisis se hace 200 veces con lo cual se pudo obtener un *P-value* 100%, indicando que existe un valor significativo de colocalización verdadera.

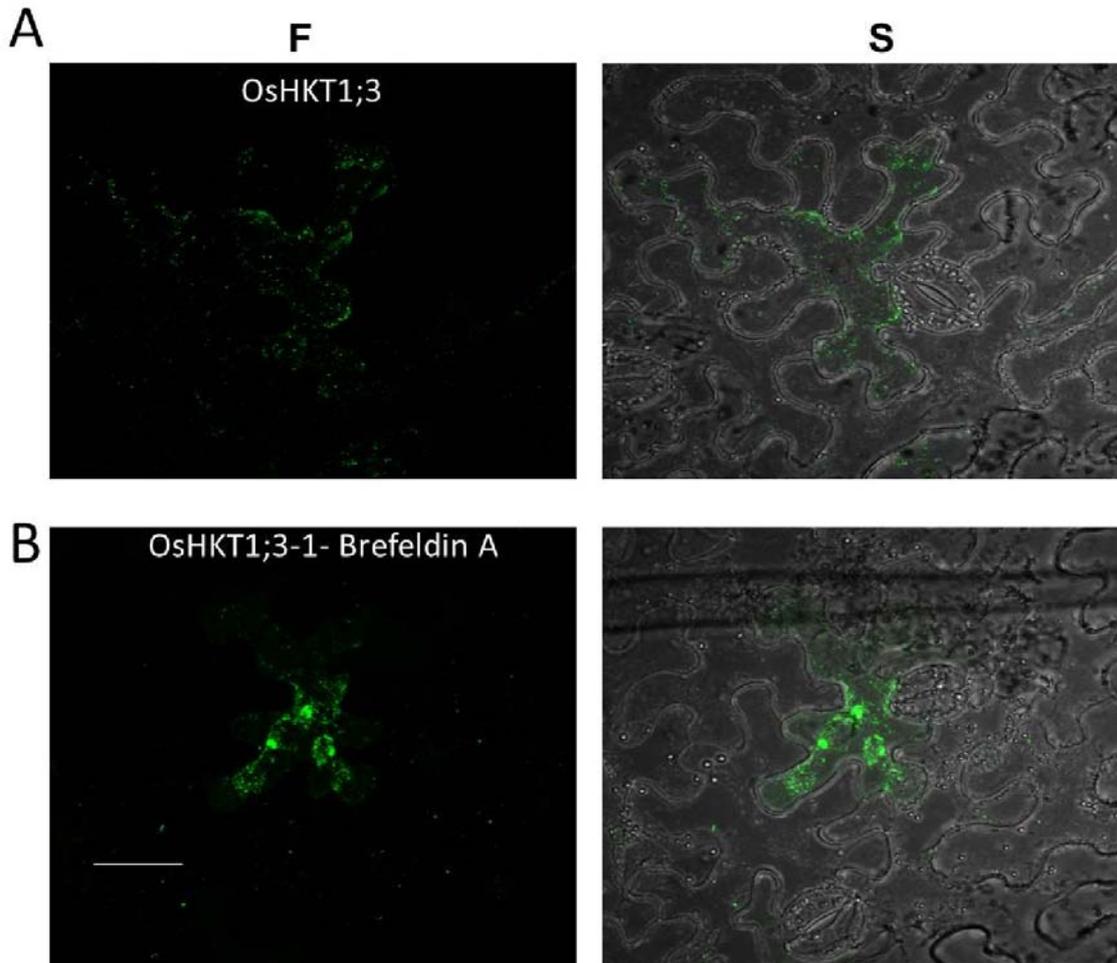
Con nuestros resultados podemos sugerir que OSHKT1;3 se localiza en el aparato de Golgi. Sin embargo la expresión en forma de puntos se parece a los sitios de salida del retículo endoplásmico, ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites). La evidencia actual en plantas indica que los compartimientos ER-ERES-Golgi muestran una estrecha asociación, de tal manera que se decidió usar al marcador bona fide de los ERES y del sistema COPII, la proteína *AtSec24-YFP*, para resolver esta duda. Como se puede observar en la figura 8 B, la expresión de *AtSec24-YFP* (Centro) ocurrió en forma de puntos y pequeños círculos, que cuando se superpusieron con la expresión de OSHKT1;3-mCherry (Fig. 8 B, Izq.) se observó que colocalizaron en muy pocos sitios (Fig. 8 B, Der.). Al hacer el análisis de la sobreposición de estas dos imágenes, la gráfica de dispersión mostró que los píxeles se distribuyeron hacia cada uno de los ejes, que de acuerdo al valor de PC calculado de 0.32 ( $P = 100\%$ ) estas dos proteínas no

**Figura 8. OSHKT1;3 se localiza en el aparato de Golgi.** **A** Análisis de co-localización entre OSHKT1;3-EYFP (centro) y *GmMan1*, marcador del aparato de Golgi (izquierda). Sobreposición de las dos imágenes mostró (en blanco) la colocalización de las dos proteínas (Derecha). **B** Co-expresión de OSHKT1;3-mCherry (Izquierda) y el marcador de ERES/COPII, *AtSec24-YFP* (centro). Sobreposición de las dos imágenes (estructuras blancas) demostró escasos puntos de colocalización de las dos proteínas (Derecha). **C** Co-localización entre OSHKT1;3-EYFP (centro) y el marcador de membrana plasmática *AtPIP1;2-mCherry* (izquierda). Sobreposición de las dos imágenes (estructuras blancas) demostró escasos puntos de colocalización de las dos proteínas (Derecha). **D** Diagramas de dispersión de los píxeles de los canales magenta (eje de las Y) y verde (eje de las X) empleando el algoritmo de Costes incluido en el Plug-in JACoP (ImageJ Software) para **A** (Izquierda), **B** (Centro) y **C** (Derecha). **PC** Coeficiente de correlación de Pearson. Las escalas son de 25  $\mu\text{m}$  de **A** a **C**. Los valores de P fueron 100% de **A** a **C**.

colocalizan (Fig. 8 D, Centro). La línea recta cuya pendiente está cargada hacia el canal verde (*AtSec24-YFP*) se debió al mayor número de píxeles de la fluorescencia de la EYFP (Fig. 8 D, Centro). Estos resultados sugieren que *OshKT1;3* no colocaliza con los ERES, y que es probable que este no recluta el receptor de cargo *AtSec24*.

Los trabajos donde se ha estudiado la localización de los transportadores HKT han mostrado que ellos se expresan en la membrana plasmática (Horie et al., 2007, 2011; Lan et al., 2010; Ren et al., 2005), por lo que se decidió usar a *AtPIP2A-mCherry* como marcador de la membrana plasmática para confirmar que *OshKT1;3-EYFP* no reside en este compartimento. La figura 8 C muestra la expresión puntual de *OshKT1;3-EYFP* (centro) por toda la célula y la de *AtPIP2A-mCherry* (izquierda) en la periferia, lo que indica que su localización es en la membrana plasmática, y de acuerdo a lo reportado en la literatura (Nelson et al., 2007). Cuando ambas imágenes se sobrepusieron (Fig. 8 C, Der.), se observó que no había regiones evidentes de color blanco correspondiente a la colocalización de las dos proteínas. Al hacer el análisis de imágenes, la gráfica de dispersión mostró que la distribución de los píxeles ocurrió a lo largo de los ejes y no en una línea recta debido a la ausencia de correlación de los píxeles del canal verde con el canal magenta. Este patrón de dispersión sugiere una clara exclusión de las dos señales (Fig. 8 D, Der.), lo que se confirmó con el valor de PC de 0.14 (P-value=100%). En conjunto, estos resultados mostraron que *OshKT1;3* no está en la membrana plasmática ni en los ERES sino que se localiza en el aparato de Golgi.

La posible expresión de *OshKT1;3* en el Golgi condujo a la búsqueda de más evidencias que reforzaran los datos. Para ello, se decidió usar a la Brefeldina A cuyo efecto en las células vegetales ha demostrado que disgrega el aparato de Golgi haciendo que la GTPasa ARF1 deje de funcionar y con ello el transporte vesicular se detenga (Fujiwara et al., 1988; Satiat-Jeunemaitre et al., 1996). Este fenómeno se puede observar visualmente ya que el Golgi se agrega en grandes vesículas que en la literatura se conocen como cuerpos de Brefeldina (Ritzenthaler



**Figura 9. La localización intracelular de OshKT1;3-EYFP se modifica en presencia de Brefeldina A.** La localización de OshKT1;3-EYFP en forma de puntos pequeños se observó por toda la célula **A**. Acumulación de OshKT1;3-EYFP en cuerpos intracelulares más grandes causada por la presencia de Brefeldina A (25  $\mu$ M) durante 15 min, **B**. La escala es de 50  $\mu$ m. **F** Fluorescencia; **S** sobreposición con el campo claro.

et al., 2002). Cuando se incubaron las epidermis de tabaco que expresaban a OshKT1;3-EYFP con 25  $\mu$ M de Brefeldina A durante 15 min y después se observaron con microscopia confocal, se apreciaron estructuras intracelulares de mayor tamaño (Fig. 9 B) que las observadas en ausencia del inhibidor (Fig. 9 A), estructuras similares a los cuerpos de Brefeldina. Estos resultados junto con la colocalización con el marcador del Golgi *GmMan1* sugieren fuertemente que OshKT1;3 se encuentra localizado en el Golgi.

### **Las estructuras puntuales marcadas por OshKT1;3-EYFP muestran una motilidad elevada**

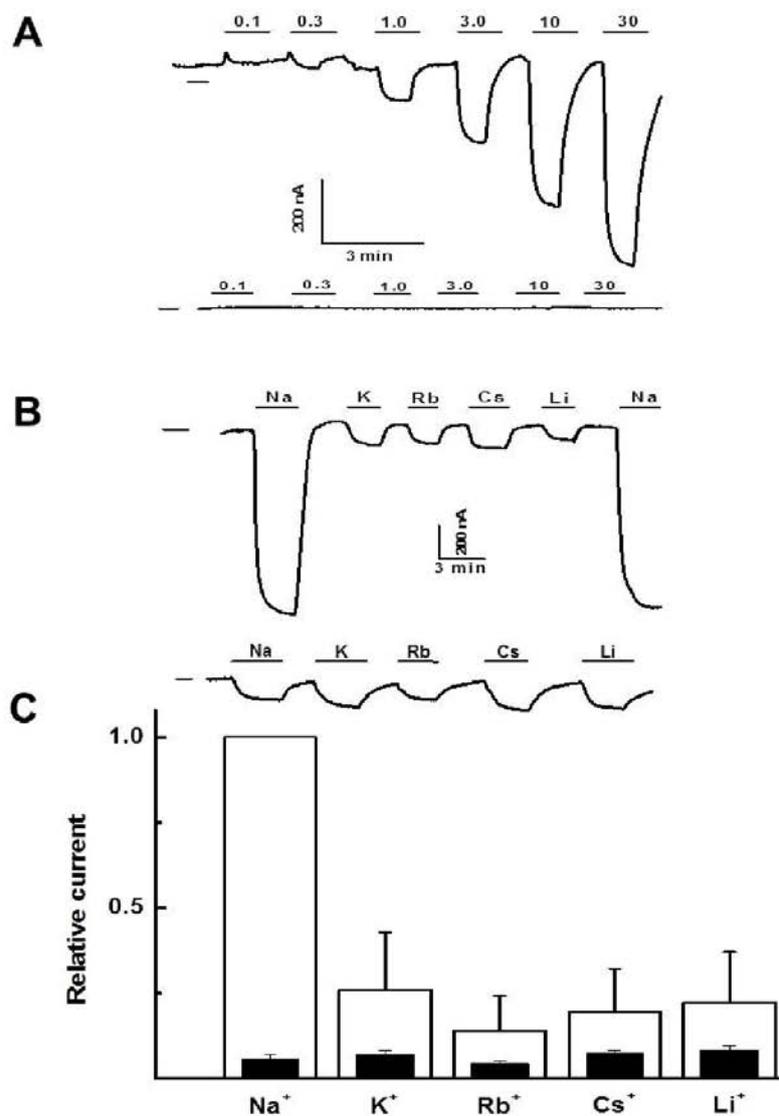
Durante el análisis de la expresión de OshKT1;3-EYFP en el microscopio confocal se pudo observar que estas estructuras se movían, lo que nos condujo a tomar imágenes seriales en un solo plano cada 130 ms para calcular la velocidad de movimiento de dichas estructuras. Una vez obtenidas estas imágenes, se analizaron con el software ImageJ y el Plug-in MTrack, para obtener los valores de la velocidad de las estructuras marcadas por OshKT1;3-EYFP. Los valores obtenidos se agruparon en dos grupos uno con velocidades de entre 0.081-0.061  $\mu$ m  $\text{sec}^{-1}$ , y el segundo entre 0.108 a-0.224  $\mu$ m  $\text{sec}^{-1}$ , obteniendo una velocidad promedio de 0.14  $\mu$ m $\text{sec}^{-1}$  (Fig.10- video). Este tipo de motilidad es una característica que se ha asociado al Golgi. Estas observaciones apoyan la localización de OshKT1;3 en este organelo (Boevink et al., 1998).

### **OshKT1;3 transporta $\text{Na}^+$ en el sistema de expresión heteróloga de los ovocitos de *Xenopus*.**

Con la finalidad de recabar más datos acerca de las propiedades de transporte de esta proteína (Jabnourne et al., 2009) se decidió expresar a OshKT1;3 en el sistema heterólogo de los ovocitos de *Xenopus laevis*. La figura 11 A, registro superior, muestra un registro original en donde se fluyeron soluciones conteniendo diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 mM). Al fluir las distintas soluciones sobre un ovocito inyectado con el ARNc de OshKT1;3 y fijando el potencial de membrana al potencial de reposo de  $-150$  mV, se generaron

corrientes entrantes, negativas, cuya magnitud aumentó a la par con el incremento de la concentración externa de  $\text{Na}^+$ . En estos registros se observó que el nivel de corriente se recuperaba conforme se reemplazaban las soluciones que contenían las diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  por la solución de registro (sin  $\text{Na}^+$ ), indicando que el movimiento de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana del ovocito es resultado de la expresión del transportador OsHKT1;3. Como control se usaron ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC para descartar que estas corrientes fueran generadas por canales o transportadores endógenos del ovocito. Al fluir las mismas soluciones de  $\text{Na}^+$  sobre los ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC y con un potencial de mantenimiento de  $-125$  mV no se registraron cambios en el nivel de la corriente inicial (Figura 11 A, registro inferior).

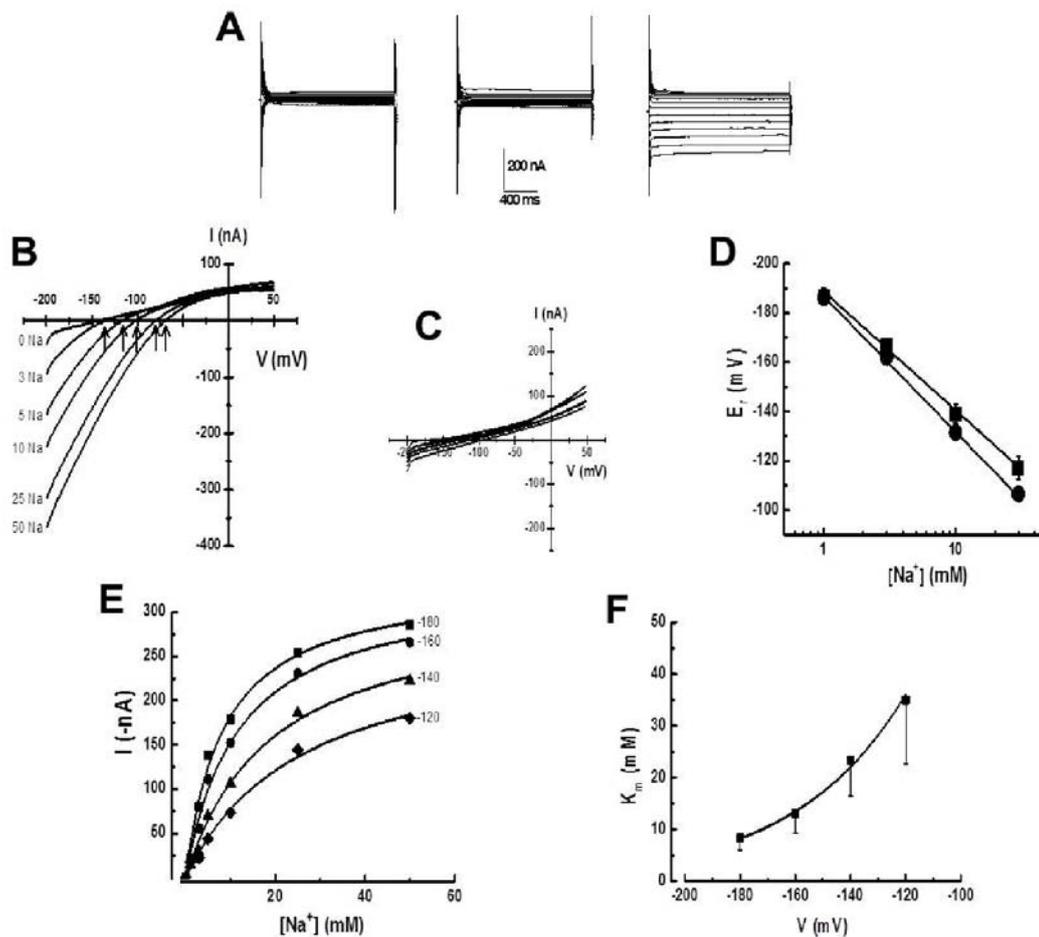
Los resultados descritos arriba mostraron que OsHKT1;3 fue permeable a  $\text{Na}^+$ . Para conocer más acerca de la permeabilidad de este transportador medimos su permeabilidad a otros cationes monovalentes ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , y  $\text{Rb}^+$ ). En la figura 11 B, registro superior, se muestra que cuando un ovocito transformado con OsHKT1;3 se expuso a cada uno de los cationes alcalinos a una concentración de 30 mM, se observaron corrientes entrantes de diferente magnitud, siendo el  $\text{Na}^+$  el catión alcalino que generó la mayor corriente entrante. De acuerdo a estos resultados, OsHKT1;3 mostro la siguiente secuencia de permeabilidades:  $\text{Na}^+ \gg \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+$  (Fig. 11 B, registro superior). Al hacer estos mismos experimentos en ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC se registraron corrientes entrantes muy similares para todos los cationes y de menor magnitud que las registradas en los ovocitos que expresaron a OsHKT1;3 (Fig. 11 B, registro inferior). Si bien se observó una corriente entrante de aproximadamente 50 nA al fluir los diferentes cationes, muy probablemente esta corriente se deba a la actividad del canal de cloro presente en los ovocitos (Barish, 1983; Miledi, 1982; Schlieff & Heinemann, 1995), ya que en estos experimentos se emplearon sales de cloro. Analizando los resultados de varios registros de ovocitos que expresaron a OsHKT1;3 y normalizando la corriente a la generada por  $\text{Na}^+$ , se pudo notar que el resto de los cationes alcalinos produjeron corrientes muy por debajo de aquellas causadas por el  $\text{Na}^+$  (Fig.11 C, barras en blanco). Estos mismos experimentos se



**Figura 11. *OsHKT1;3* es un transportador selectivo a Na<sup>+</sup>.** **A (arriba)** Registro original que muestra la activación de corrientes entrantes en respuesta al incremento en la concentración extracelular de Na<sup>+</sup> en ovocitos de *Xenopus* inyectados con ARNc de *OsHKT1;3*. **(abajo)** Registro original que muestra la ausencia de las corrientes entrantes en un ovocito control inyectado con H<sub>2</sub>O-DEPC y expuesto a las mismas soluciones de Na<sup>+</sup>. **B (arriba)** Registro original de corrientes entrantes inducidas por la exposición de un ovocito inyectado con el cARN de *OsHKT1;3* a los diferentes cationes alcalinos (30 mM de sales de cloro). **(abajo)** Corrientes registradas de un ovocito control inyectado con H<sub>2</sub>O-DEPC expuesto a las mismas soluciones. **C** Histograma que resume las corrientes relativas activadas por los diferentes cationes alcalinos en ovocitos inyectados con al ARNc de *OsHKT1;3* (barras blancas) o H<sub>2</sub>O-DEPC (barras negras). Datos obtenidos de siete ovocitos de tres o cuatro ranas diferentes y corresponden a la media ± SD. El potencial de mantenimiento fue de -150 mV.

realizaron en ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O-DEPC (Fig.11 C, barras negras) donde se puede observar que los distintos cationes alcalinos produjeron corrientes de magnitud similar, pero mucho menores que los que expresaron a OshKT1;3.

Al observar los datos anteriores se decidió ampliar la caracterización de la proteína OshKT1;3 para determinar su actividad de transporte y generar más datos como son la selectividad, la concentración de saturación, la constante de afinidad, indagar sobre los posibles sitios de unión a Na<sup>+</sup> y/o K<sup>+</sup> entre otros para así tener información para proponer un papel funcional de esta proteína en las células vegetales. Inicialmente, se aplicaron pulsos de voltaje a los ovocitos que expresaron a OshKT1;3 entre -200 mV a 60 mV en pasos de 20 mV los cuales generaron corrientes negativas cuando se perfundió sobre los ovocitos una solución de 30 mM de NaCl (Fig.12 A, Der.). Esta corriente desapareció cuando el mismo ovocito se expuso a la solución inicial de registro sin Na<sup>+</sup> (Fig.12 A, Centro). Para demostrar que estas corrientes no eran endógenas de los ovocitos, se perfundió una solución con la misma concentración de Na<sup>+</sup> en ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O-DEPC (Fig.12 A, Izq.) en donde se pudo apreciar que no hubo activación de corrientes entrantes de Na<sup>+</sup>. Estos datos sugerían fuertemente que este transportador lleva a cabo el transporte de Na<sup>+</sup>, por lo que se decidió realizar protocolos de rampas de voltaje para confirmar esta observación. En ovocitos que expresaron a OshKT1;3 y expuestos a distintas soluciones de Na<sup>+</sup> (0, 3, 5, 10, 25 y 50 mM) se pudo apreciar que conforme fue incrementándose la concentración de Na<sup>+</sup> extracelular, la magnitud de las corrientes negativas aumentó, así como causando un desplazamiento positivo del potencial de inversión (Fig. 12 B; Flechas). El mismo tipo de experimento se realizó en ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O-DEPC y las curvas I-V mostraron que la magnitud de las corrientes fue muy pequeña e independiente de la concentración extracelular de Na<sup>+</sup>, además de no observar cambios en el desplazamiento del potencial de inversión (Fig. 12 C). Estos resultados indicaban que las corrientes entrantes y los cambios en el potencial de inversión correspondían al transporte de sodio realizado por OshKT1;3 en los ovocitos de *Xenopus*. Esta observación se confirmó al graficar los cambios del potencial de inversión (E<sub>r</sub>) en contra de las concentraciones de



**Figura 12. Propiedades de transporte de OshKT1;3.** **A** Registros originales de las corrientes activadas por pulsos de voltaje entre -200 y 60 mV en pasos de 20 mV de un ovocito control inyectado con H<sub>2</sub>O-DEPC expuesto a 30 mM de NaCl (**izquierda**), y uno expresando a OshKT1;3 perfundido con una solución sin (**Centro**) o con 30 mM NaCl (**Derecha**). **B** Corrientes activadas por rampas de voltaje (-200 a 50 mV) en un ovocito expresando a OshKT1;3 y perfundido con diferentes concentraciones de NaCl; observar los cambios en el E<sub>r</sub> conforme la concentración de Na<sup>+</sup> se incrementa (**flechas**). **C** Corrientes activadas por rampas de voltaje en un ovocito inyectado con H<sub>2</sub>O-DEPC y perfundido con las mismas soluciones de NaCl que en **B**. **D** Grafica semi-logarítmica que muestra la relación lineal entre E<sub>r</sub> y las concentraciones extracelulares de Na<sup>+</sup> en ovocitos expresando a OshKT1;3 y expuestos a las diferentes soluciones de NaCl en la ausencia de KCl (**círculos**) o en la presencia de 1 mM KCl (**cuadrados**). Las líneas son ajustes lineales por mínimos cuadrados con una pendiente de 54.2 mV y de 50 mV por cada diez veces el incremento de las concentraciones extracelulares de Na<sup>+</sup> en ausencia y presencia de K<sup>+</sup>. **E** Cinética del transporte de sodio fue voltaje dependiente observándose corrientes mayores a potenciales de membrana más negativos. Las líneas son el ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten con una r<sup>2</sup> ≥ 0.9. **F** La afinidad de OshKT1;3 por Na<sup>+</sup> fue voltaje dependiente. La línea es un ajuste de la ecuación 1. Estos datos fueron obtenidos de más de cinco ovocitos de tres a cuatro diferentes ranas y corresponden a la media ± SD.

$\text{Na}^+$  extracelulares (1, 3, 10 y 30 mM) de manera semi-logarítmica. Con ello se pudo obtener una relación lineal con la cual se pudo calcular mediante un ajuste de mínimos cuadrados una pendiente con valor de 54.2 mV por cada 10 veces el incremento de las concentraciones externas de  $\text{Na}^+$  (Fig.12 D, Círculos). Este dato confirma claramente, y de acuerdo a la ecuación de Nernst, que OsHKT1;3 es un transportador altamente selectivo a  $\text{Na}^+$ , ya que el valor teórico aproximado para un canal selectivo a un catión monovalente es de 59 mV por cada 10 veces el incremento de la concentración externa de  $\text{Na}^+$ .

OsHKT1;3 es un transportador que según la última clasificación reportada de esta familia lo agrupa dentro de la subfamilia 1, la cual alberga en su mayoría a transportadores de  $\text{Na}^+$  (Platten et al., 2006a). Los datos anteriores mostraron que OsHKT1;3 es un transportador de  $\text{Na}^+$ , sin embargo existía la duda sobre la posible modificación del transporte de  $\text{Na}^+$  por la presencia de  $\text{K}^+$ , ya que el primer transportador HKT caracterizado fue *TaHKT2;1* en trigo y se demostró que podía transportar  $\text{K}^+$  acoplado al de  $\text{Na}^+$  y que en condiciones de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  el transporte de este catión es preferencial sobre el del  $\text{K}^+$  (Gassmann et al., 1996; Rubio et al., 1999). Si bien los primeros resultados mostraron que OsHKT1;3 no transportaba  $\text{K}^+$ , se decidió probar si este ion pudiera intervenir en el transporte de  $\text{Na}^+$ . De tal manera que se optó por exponer a los ovocitos que expresaron a OsHKT1;3 a diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  manteniendo siempre en cada una de estas soluciones una concentración de 1 mM de  $\text{K}^+$  durante la aplicación de rampas de voltaje. Al calcular la pendiente mediante un ajuste lineal de los valores obtenidos para los potenciales de inversión  $E_r$  con las diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$ , se calculó que este valor fue de 50 mV muy similar al obtenido en ausencia de 1 mM de  $\text{K}^+$ , lo que indicaría que el transporte de  $\text{Na}^+$  no fue afectado por la presencia de este catión (Fig.12 D, cuadros).

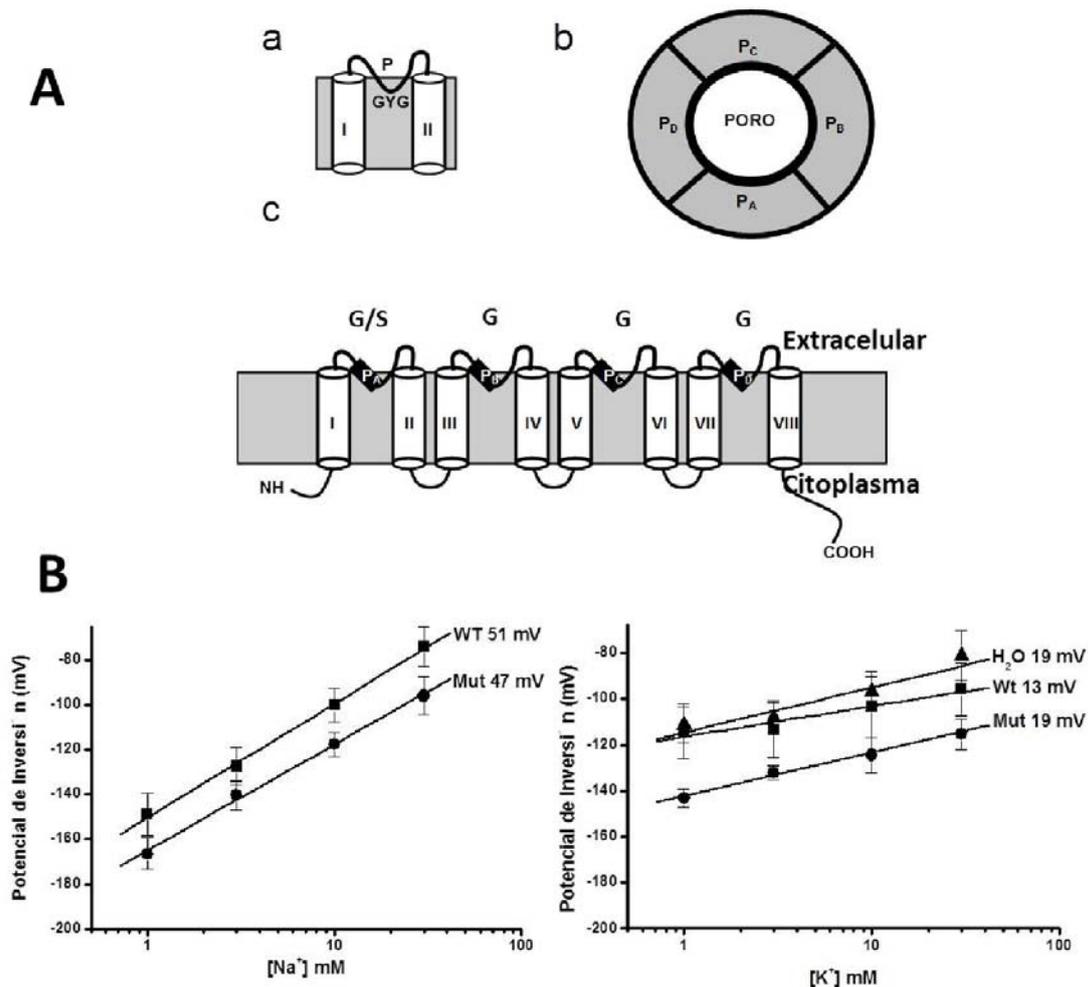
Una propiedad adicional que se obtuvo del transportador a partir de las corrientes activadas por las rampas de voltaje fue el efecto del potencial de membrana sobre la afinidad de OsHKT1;3 por  $\text{Na}^+$ . Al graficar las corrientes generadas en contra de las diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  a los distintos potenciales de membrana, se

pudo observar (Fig. 12 E) que la afinidad por Na<sup>+</sup> fue menor cuando el potencial de membrana fue menos negativo, como lo revelan los valores de la K<sub>m</sub> de 6.4, 9.6, 17.1 y 42.6 mM a -180, -160, -140 and -120 mV, respectivamente. Asumiendo un solo sitio de unión para sodio, se empleó la ecuación 1 para evaluar la dependencia de la K<sub>m</sub> del voltaje, en donde  $\delta$  es la fracción de la distancia eléctrica,  $e$  es la carga elemental,  $V$  es el potencial de membrana,  $k$  es la constante de Boltzmann, y  $T$  es la temperatura absoluta (Woodhull, 1973).

$$K_m(\delta) = K_m^{(0mV)} * \exp(\delta * e * \frac{V}{k * T}) \quad (1)$$

De este análisis, y como lo muestra la figura 12 F, fue posible calcular el sitio putativo de unión a Na<sup>+</sup> localizado a ( $\delta$ ) 65% dentro del campo eléctrico de la membrana. Todos estos resultados muestran que OsHKT1;3 es un transportador de baja afinidad y altamente selectivo a Na<sup>+</sup>.

La familia de los transportadores de HKT se ha clasificado en dos subfamilias 1 y 2; la mayoría de los miembros de la subfamilia 1 se han reportado como transportadores exclusivos de Na<sup>+</sup>, mientras que los pertenecientes a la subfamilia 2 pueden llevar cabo el co-transporte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Platten et al., 2006b). La estructura topológica de los transportadores HKT es de dos dominios transmembranales unidos por un asa formadora del poro (Fig.13 A-a), estructura que se repite cuatro veces en una sola cadena polipeptídica (Fig.13 A-c). Se ha postulado que cada una de estas asas (P<sub>A</sub>-P<sub>D</sub>) estructuran el poro de selectividad, ya que cada una posee al aminoácido glicina (G) que se ha propuesto ser el responsable de la selectividad a K<sup>+</sup>, en homología con el canal KcsA (Durell et al., 1999; Kato et al., 2001; Fig.13 A-b). En la primera asa o P<sub>A</sub>, se ha demostrado que la presencia de una Glicina o una Serina influyen sobre la selectividad hacia K<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>, respectivamente (Mäser et al., 2002; Fig.13 A). Esta regla no aplica a todos los integrantes de la familia HKT ya que los transportadores del Eucalipto *EcHKT1;1* y *EcHKT1;2* son co-transportadores Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y poseen una Serina en el P<sub>A</sub> (Liu et al., 2001). Con base en estas observaciones, se decidió explorar los posibles efectos de sustituir esta Serina en el P<sub>A</sub> de OsHKT1;3 por una Glicina. La mutación S94G



**Figura 13. La mutación S94G en el PA de OshKT1;3 no generó un cambio en su selectividad a  $\text{Na}^+$ .** **A** Estructura básica de dos dominios transmembranales unidos por una asa formadora del poro en donde se localizan los tres aminoácidos GYG propuestos en el canal bacteriano KcsA que determinan la selectividad a  $\text{K}^+$  (**a**). Estructura propuesta para la formación del poro en OshKT1;3 (**b**); cada una de las cuatro asas ( $P_A$ ,  $P_B$ ,  $P_C$  y  $P_D$ ) participan en su estructuración. Topología propuesta para los transportadores HKT compuesta de dos dominios transmembranales unidos por una asa formadora del poro repetida 4 veces en un solo polipéptido (**c**). Se muestra la presencia de los aminoácidos G o S en cada uno de las asas. **B Izquierda** Grafica semi-logarítmica que muestra la variación de  $E_r$  con las concentraciones extracelulares de  $\text{Na}^+$  en ovocitos expresando a OshKT1;3 (**WT**; **cuadrados**) o en la proteína mutante OshKT1;3-S94G (**Mut**; **círculos**). Las líneas son ajustes lineales por mínimos cuadrados con una pendiente de 51 para WT y 47 mV para Mut por cada diez veces el incremento de las concentraciones extracelulares de  $\text{Na}^+$ . **B Derecha** Valores de  $E_r$  en respuesta a la concentración extracelular de  $\text{K}^+$  en la proteína silvestre OshKT1;3 (**WT**; **cuadrados**), en la proteína mutada OshKT1;3-S94G (**Mut**; **círculos**), o en ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC ( **$\text{H}_2\text{O}$** ; **triángulos**). Las líneas son ajustes lineales por mínimos cuadrados. El potencial de mantenimiento fue de -180 mV. Datos obtenidos de más de cinco ovocitos de tres a cuatro diferentes ranas y corresponden a la media  $\pm$  SD.

se llevó a cabo en OshKT1;3 y su ARNc se inyectó en los ovocitos de la rana de *Xenopus* para observar mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos las propiedades de esta mutación. Para ello se realizaron curvas I-V a partir de rampas de voltaje en donde se obtuvo el valor de los cambios en el  $E_r$  conforme se incrementaron las concentraciones extracelulares de  $\text{Na}^+$ . Al graficar de manera semilogarítmica y después de realizar un ajuste lineal de estos puntos se pudo obtener una pendiente de 47 mV por cada diez veces el incremento de la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$ , comparada con la pendiente de 51 mV/década que se obtuvo para la proteína silvestre (Fig. 13 B Izq.). Estos valores indican que la selectividad hacia  $\text{Na}^+$  no se vio afectada por la mutación S94G. Anteriormente, se ha demostrado (ver Fig. 11) que OshKT1;3 no transportó  $\text{K}^+$ , de tal manera que se decidió estudiar si la mutación S94G causó un cambio en la selectividad hacia el ion  $\text{K}^+$ . Nuevamente, se obtuvo el  $E_r$  para cada una de las concentraciones extracelulares de  $\text{K}^+$ . Al graficarlos de manera semilogarítmica y hacer un ajuste lineal (Fig.13 B, Der.) se obtuvo una pendiente de 19 mV/década (Fig. 13 Mut; círculos) comparada con los 13 mV/década obtenidos para la proteína silvestre (Fig. 13 B; wt, cuadros). En los ovocitos de las ranas de *Xenopus* existen corrientes endógenas entrantes de  $\text{K}^+$  (Lu et al., 1990; Tzounopoulos et al., 1995), por ello decidimos calcular en ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ , este mismo valor, el cual fue de 19 mV. Estos datos nos indican que la mutación de S94G en OshKT1;3 no tuvo efecto en la selectividad a  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , abriendo la posibilidad de que los sitios de selectividad a  $\text{Na}^+$  en OshKT1;3 residan en otras partes de esta proteína.

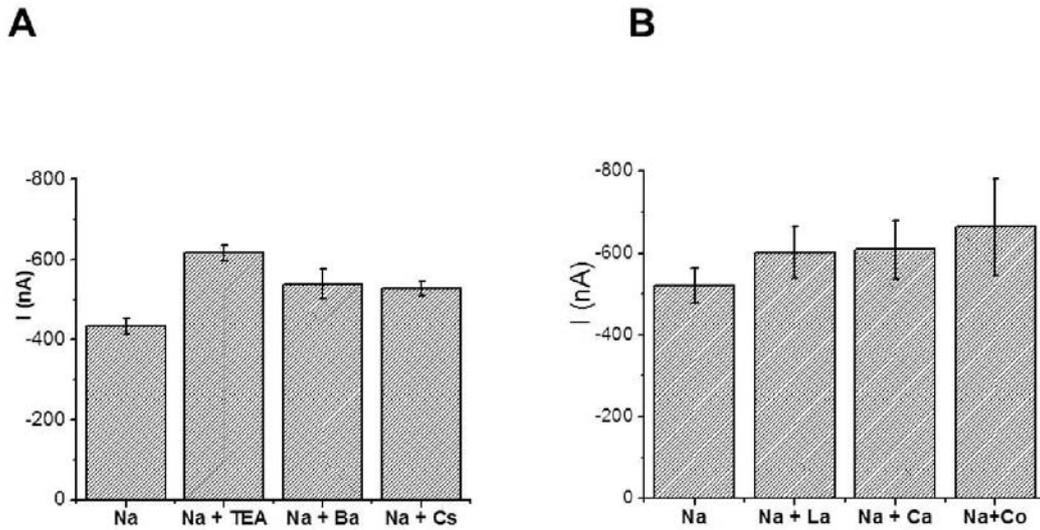
### **OshKT1;3 no se bloquea por inhibidores para los canales de $\text{K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$**

Mucho se ha especulado acerca de la posible similitud de los transportadores HKT con el canal bacteriano altamente selectivo a  $\text{K}^+$ , KcsA (Durell & Guy, 1999; Kato et al., 2001). Sin embargo, la caracterización electrofisiológica de varios transportadores HKT ha mostrado que éstos no poseen una alta selectividad a  $\text{K}^+$ , como lo es el canal bacteriano KscA, por el contrario, muestran selectividad a  $\text{Na}^+$  o funcionan como simportadores  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  (Platten et al., 2006b). Estos resultados

muestran que si bien es posible que exista una cierta similitud entre la familia de los HKT con la del canal KscA, también revela que las propiedades de transporte son distintas y sugieren al mismo tiempo que la topología de las proteínas HKT en la membrana plasmática difiere de la que se sugiere para el canal KscA. De tal manera que se decidió hacer uso de algunos inhibidores para canales iónicos y así determinar la posible similitud del poro de la proteína de OshKT1;3 con la del canal KcsA. Está bien establecido que solo ciertos compuestos bloquean el transporte de iones y son específicos para ciertos canales iónicos. Estos datos han demostrado que de manera casi general algunos bloqueadores solo tienen efecto en canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$  (Grissmer et al., 1993; Lansman, 1990; Pearson et al., 1999; Winegar et al., 1991). Primero decidimos probar diferentes bloqueadores clásicos de los canales de  $K^+$  como son el TEA,  $Ba^{2+}$  y  $Cs^+$ . Al exponer a los ovocitos que expresaron a OshKT1;3 con una solución con 10 mM de  $Na^+$  se registró una corriente que en promedio fue de -500 nA (Fig.14 A). Al fluir junto con el  $Na^+$  al  $Cs^+$ , o al  $Ba^{2+}$ , o al TEA a una concentración de 10 mM, no se observaron cambios significativos en la corriente registrada. Lo que muestra que ninguno de estos bloqueadores específicos de canales de  $K^+$  afectó de manera negativa el transporte de  $Na^+$  en OshKT1;3 (Fig.14 A). De igual manera, se decidió utilizar al  $Co^{2+}$  y al  $La^{3+}$ , ya que han mostrado ser inhibidores de canales de Calcio y como se muestra en la Figura 14 B no hubo una inhibición de la corriente de  $Na^+$  a través de OshKT1;3 en presencia de estos bloqueadores a una concentración de 2.5 mM. Por último, también se decidió explorar la posible regulación del transporte de  $Na^+$  en presencia de  $Ca^{2+}$ . El resultado de la perfusión en ovocitos que expresaron a OshKT1;3 con una solución con 10 mM de  $Na^+$  adicionado con 2.5 mM de  $Ca^{2+}$  tampoco afectó la magnitud de las corrientes entrantes (Fig.14 B).

#### **Las corrientes de $Na^+$ generadas por OshKT1;3 son insensibles a cambios en el pH interno y externo, pero son sensibles al inhibidor de cinasas de proteínas, estaurosporina**

Está bien establecido que algunos transportadores y canales iónicos son regulados por el pH (Hoth et al., 1997; Morton et al., 2005; Muller-Rober et al.,



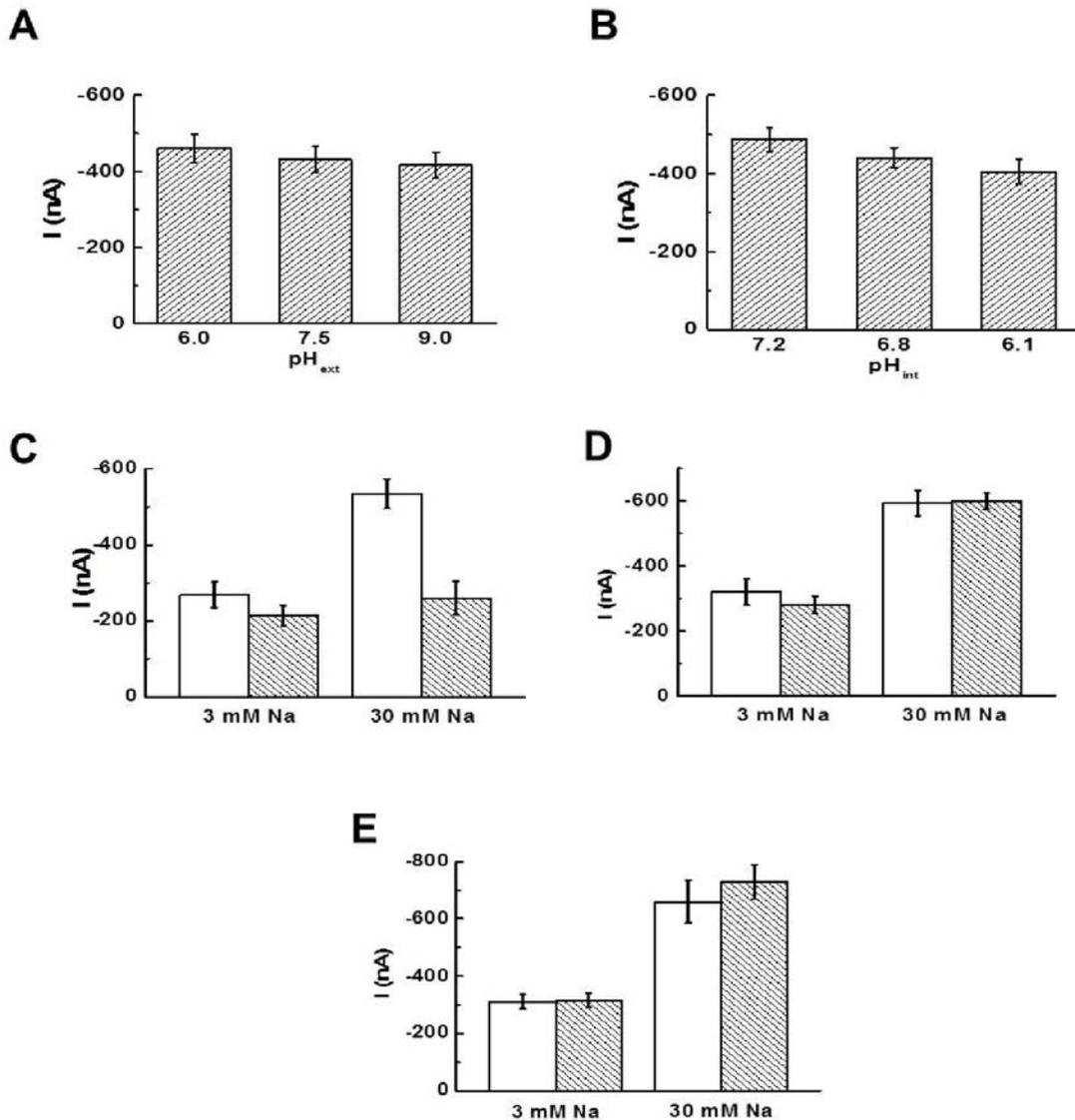
**Figura 14. La corriente entrante de  $\text{Na}^+$  debida a OshKT1;3 no se inhibió por la presencia de bloqueadores específicos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{K}^+$ .** **A** Corrientes promedio obtenidas a  $-180$  mV en ovocitos que expresaron a OshKT1;3 expuestos a una solución de  $\text{Na}^+$  10 mM ( $\text{Na}^+$ ) o conteniendo además 10 mM de cloruro de tetraetilamonio ( $\text{Na}^+$  + TEA),  $\text{BaCl}_2$  ( $\text{Na}^+$  +  $\text{Ba}^{2+}$ ) o  $\text{CsCl}$  ( $\text{Na}^+$  +  $\text{Cs}^+$ ). **B** Corrientes promedio activadas a  $-180$  mV en ovocitos expresando OshKT1;3 y expuestos a una solución de  $\text{Na}^+$  10 mM ( $\text{Na}^+$ ) y en presencia de 2.5 mM de  $\text{LaCl}_3$  ( $\text{Na}^+$  +  $\text{La}^{3+}$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Na}^+$  +  $\text{Ca}^{2+}$ ) o  $\text{CoCl}_2$  ( $\text{Na}^+$  +  $\text{Co}^{2+}$ ). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD de por lo menos cuatro ovocitos de dos-tres ranas.

1995; Pantoja & Smith, 2002), por lo que se decidió estudiar la posibilidad de que OshKT1;3 se regule por el pH interno y/o pH externo. Se llevaron a cabo experimentos en los ovocitos de *Xenopus* que expresaron al transportador OshKT1;3 y en los que se varió el pH tanto en el citoplasma como en el medio extracelular del ovocito.

Al exponer los ovocitos que expresaron al transportador OshKT1;3 a una solución de 30 mM de NaCl se pudo observar que la corriente negativa generada por la presencia del Na<sup>+</sup> fue cercana a -500 nA y no varió al cambiar el pH<sub>ext</sub> de 6 a 7.5 o a 9 (Fig. 15 A). En otros experimentos se varió el pH intracelular de los ovocitos que expresaron a OshKT1;3 mediante un buffer de acetatos que permea a través de la membrana y que se ha demostrado que acidifica el citoplasma (ver Materiales y Métodos). Los niveles de la corriente generada en ovocitos perfundidos con la solución de 30 mM de Na<sup>+</sup> con un pH<sub>int</sub> 7.2, 6.8 o 6.1 no cambió significativamente (Fig.15 B). Estos datos muestran que las corrientes generadas por la actividad de OshKT1;3 no fueron afectadas por cambios en el pH intracelular ni en el pH extracelular.

Como un primer intento por determinar si la actividad de OshKT1;3 se regula por procesos de fosforilación/desfosforilación, se decidió estudiar los efectos de varios inhibidores/activadores de cinasas o fosfatasas de proteínas. Al incubar a los ovocitos inyectados con el ARNc del transportador OshKT1;3 con un inhibidor general de cinasas de proteínas como lo es la estaurosporina (STP) a una concentración de 10 μM durante 30-50 min y registrar las corrientes en presencia de 3 ó 30 mM de NaCl, a un voltaje de -200 mV, la magnitud de éstas disminuyó (Fig.15 C, Barras rayadas), con respecto a los ovocitos no expuestos al inhibidor (Fig. 15 C, Barras blancas). Este resultado muestra una reducción en la actividad de OshKT1;3 por la posible inhibición de la cinasas endógenas del ovocito causada por la STP, lo que sugiere que la actividad de OshKT1;3 se estimula por su fosforilación.

Debido a que se observó una disminución en la actividad de OshKT1;3 con la inhibición de cinasas de proteínas con STP, decidimos probar si fármacos como el



**Figura 15. La actividad de OshKT1;3 es insensible al pH y se afecta por la Estaurosporina.** **A** Cambios en el pH extracelular no modificaron la corriente de Na<sup>+</sup> transportada por OshKT1;3 en ovocitos de *Xenopus* expuestos a una solución de 30 mM NaCl. **B** Actividad de OshKT1;3 registrada con 30 mM NaCl y pH intracelular de 7.2, 6.8 o 6.1 establecidos por un buffer de acetatos, (55 mM CH<sub>3</sub>COOK, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 10mM HEPES a pH 8.2, 7.4 y 6.3). **C, D, E** Corrientes de Na<sup>+</sup> generadas por la actividad de OshKT1;3 expresado en ovocitos en presencia de 3 y 30 mM de NaCl antes (barras blancas) o después (barras rayadas) de incubarse con 30 μM de estaurosporina por 1 h **C**; con 40 μM de OAG **D**; o 10 μM de ácido okadaico (AOK) **E**. Los datos corresponden a la media ± SD de por lo menos seis ovocitos de dos-tres ranas.

ácido okadaico (AOK), que es un inhibidor de fosfatasa de proteínas y el 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG), el cual es un activador de la PKC (Protein Kinase C), podrían regular la actividad de OsHKT1;3. Para ello, a los ovocitos que expresaron a OsHKT1;3 se incubaron en 10  $\mu$ M de AOK o 40  $\mu$ M de OAG durante una hora. Los resultados que se muestran en la figura 15 indican que la actividad de OsHKT1;3 en presencia de AOK (Fig.15 D Barras rayadas ) o OAG (Fig.15 E Barras rayadas) no cambió con respecto a la observada en ausencia de cualquiera de estos dos efectores (Fig.15 D-E Barras blancas), lo que sugiere que la inhibición de las fosfatasas en los ovocitos y la estimulación de la PKC no reguló la actividad de este transportador.

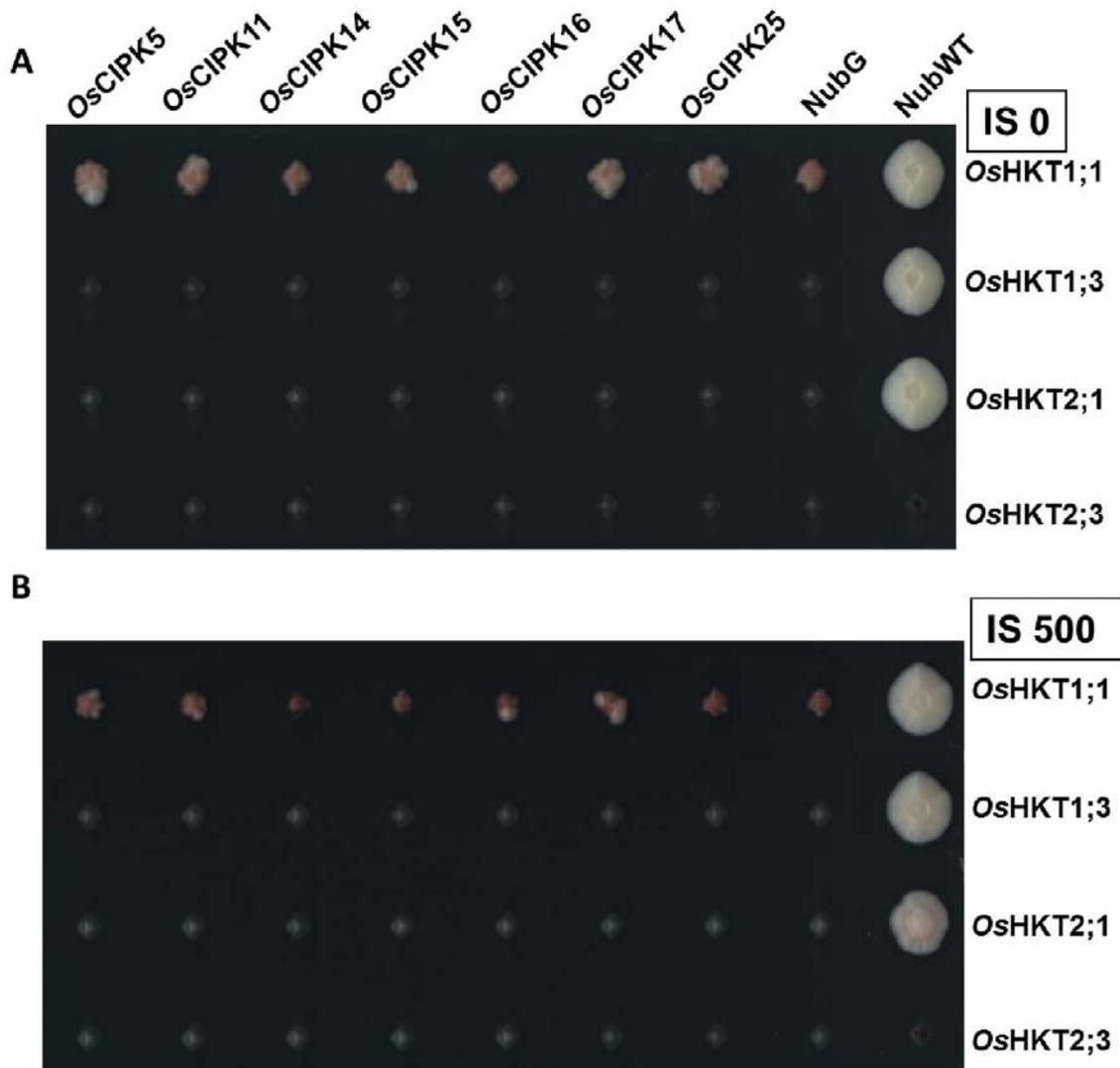
### **Posible fosforilación de OsHKT1;3 mediante cinasas de proteínas tipo CIPK**

Con el objetivo de obtener evidencias adicionales sobre la posible regulación de OsHKT1;3 por fosforilación, como lo indicaban los resultados anteriores, se decidió estudiar la participación del sistema CBL/CIPK. Se ha observado que este complejo es una forma de regulación postraduccional de la actividad de transporte de algunos canales iónicos de plantas y que es causada indirectamente por el  $Ca^{2+}$ . (Hedrich & Kudla, 2006). En el arroz se tiene evidencia sobre la regulación de la actividad del antiportador  $Na^+/H^+$  OsSOS1 por el complejo CIPK24-CBL4 el cual activa al antiportador (Martínez-Atienza et al., 2007), así como para OsAKT1 que lleva a cabo la absorción de  $K^+$  en las raíces y que se regula por el dúo CBL1-CIPK23 (Li et al., 2014). Para explorar la posibilidad de que OsHKT1;3 se regulara por el sistema de señalización CBL-CIPK, se buscó cual(es) de las 34 CIPK presentes en el arroz responden a condiciones de salinidad, ya que OsHKT1;3 siendo un transportador selectivo a  $Na^+$  y presente en la raíz pudiera estar relacionado con la respuesta a la salinidad. Esta información la obtuvimos usando la base de datos curada del Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) donde observamos que la abundancia del transcrito de *OsCIPK5*, *OsCIPK11*, *OsCIPK14*, *OsCIPK15*, *OsCIPK16*, *OsCIPK17* y *OsCIPK25* se afecta en respuesta a un estrés por sal. Posteriormente, las clonas de las OsCIPK se obtuvieron del National Institute of

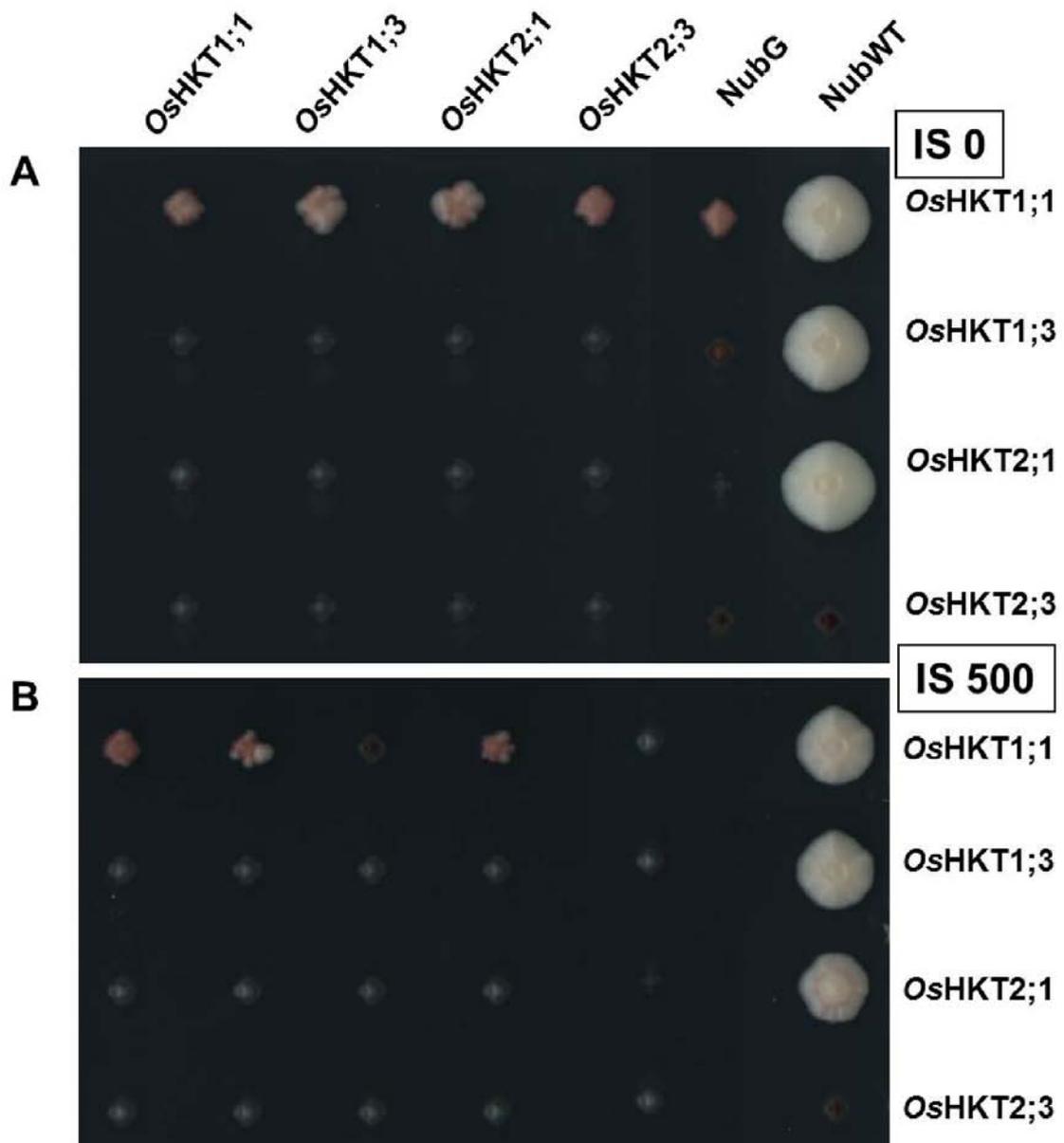
Agrobiological Sciences (NIAS, Japón). Se analizaron las secuencias de las clonas para determinar que los marcos de lectura abierta fueran correctos, y una vez que se confirmaron como correctos, se clonaron en el sistema Gateway para ser transferidos al sistema mbSUS y probar su posible interacción proteína-proteína con OsHKT1;3, OsHKT1;1, OsHKT2;1 y OsHKT2;3. Los transportadores OsHKT se usaron como carnadas y se nombraron clonas Cub ya que están fusionados traduccionalmente al carboxilo terminal de la ubiquitina y las cinasas de proteínas OsCIPK se usaron como presas y se nombraron como clonas Nub ya que están fusionadas traduccionalmente al amino terminal de la ubiquitina. Como se observa en la figura 16, ninguna de las OsCIPK mostró interacción con los OsHKT en los medios de selección IS-0 o IS-500 (Fig.16 A y B). Para comprobar que el sistema funcionó de manera correcta, se incluyeron controles de falsos negativos (NubWT) y controles de falsos positivos (NubG) observando crecimiento en los primeros, pero no en los segundos, con excepción del OsHKT2;3 el cual no mostró interacción con NubWT, indicando que OsHKT2;3 dio una señal de falso negativo en el sistema mbSUS.

### **Los transportadores OsHKTs no forman oligómeros**

Otra posible forma de regulación de la actividad de OsHKT1;3 que se estudió fue por su hetero-oligomerización con otros transportadores de la misma familia. Datos sobre este tipo de asociación provienen principalmente de la familia de los canales tipo Shaker como KAT, AKT, SKT y KST (Xicluna et al., 2007; Zimmerman et al., 2001; Dreyer et al., 1997). Estudios sobre estos canales han demostrado que las diferentes combinaciones (hetero-oligomerización) que se pueden establecer entre ellos, regulan su afinidad por  $K^+$ , o sus propiedades electrofisiológicas, como es la rectificación, haciendo de esta una vía de regulación adicional para la absorción o liberación de  $K^+$  de acuerdo a las necesidades de la célula. Otro ejemplo de hetero-oligomerización lo constituyen *AtAMT1;1* y *AtAMT1;2*, los transportadores de alta y baja afinidad a amonio, respectivamente, los cuales se ha demostrado que interactúan entre sí formando trímeros funcionales (Ludewig et al., 2003). Con el objetivo de determinar si los



**Figura 16. Los transportadores HKT no interactúan con las cinasas CIPK.** Interacción entre las proteínas OsHKT's y las proteínas OsCIPK's empleando el sistema mbSUS en medios de selectividad IS-0 (**A**) y IS-500 (**B**). Las clonas Cub se colocaron en las columnas y las clonas Nub en los renglones. NubG y NubWT se emplearon como controles de falsos positivos y falsos negativos, respectivamente.



**Figura 17. Los transportadores HKT no forman oligómeros.** Interacción entre las proteínas OsHKT's empleando el sistema mbSUS en medios de selección IS-0 (**A**) y IS-500 (**B**). Las clonas Cub se colocaron de manera vertical y las clonas Nub de manera horizontal. NubG y NubWT se emplearon como controles de falsos positivos y falsos negativos, respectivamente.

transportadores OsHKTs podrían tener interacciones del tipo homo o hetero oligomérico, se empleó el mbSUS. De un total de 16 posibles interacciones, sólo las levaduras que expresaron a OsHKT1;1-Cub mostraron un leve crecimiento cuando co-expresaron a OsHKT1;3-Nub o OsHKT2;1-Nub, aunque este crecimiento no fue comparable al control de falsos negativos NubWT (Fig. 17A). Al realizar un plaqueo de réplica en medio IS-500 para confirmar las interacciones en condiciones más astringentes, se observó que el crecimiento fue menor para las interacciones del OsHKT1;1 al compararlo con el medio IS-0 y que este crecimiento fue similar al control de falsos positivos NubG (Fig.17 B). Estos datos sugieren que los transportadores OsHKT no forman oligómeros entre ellos.

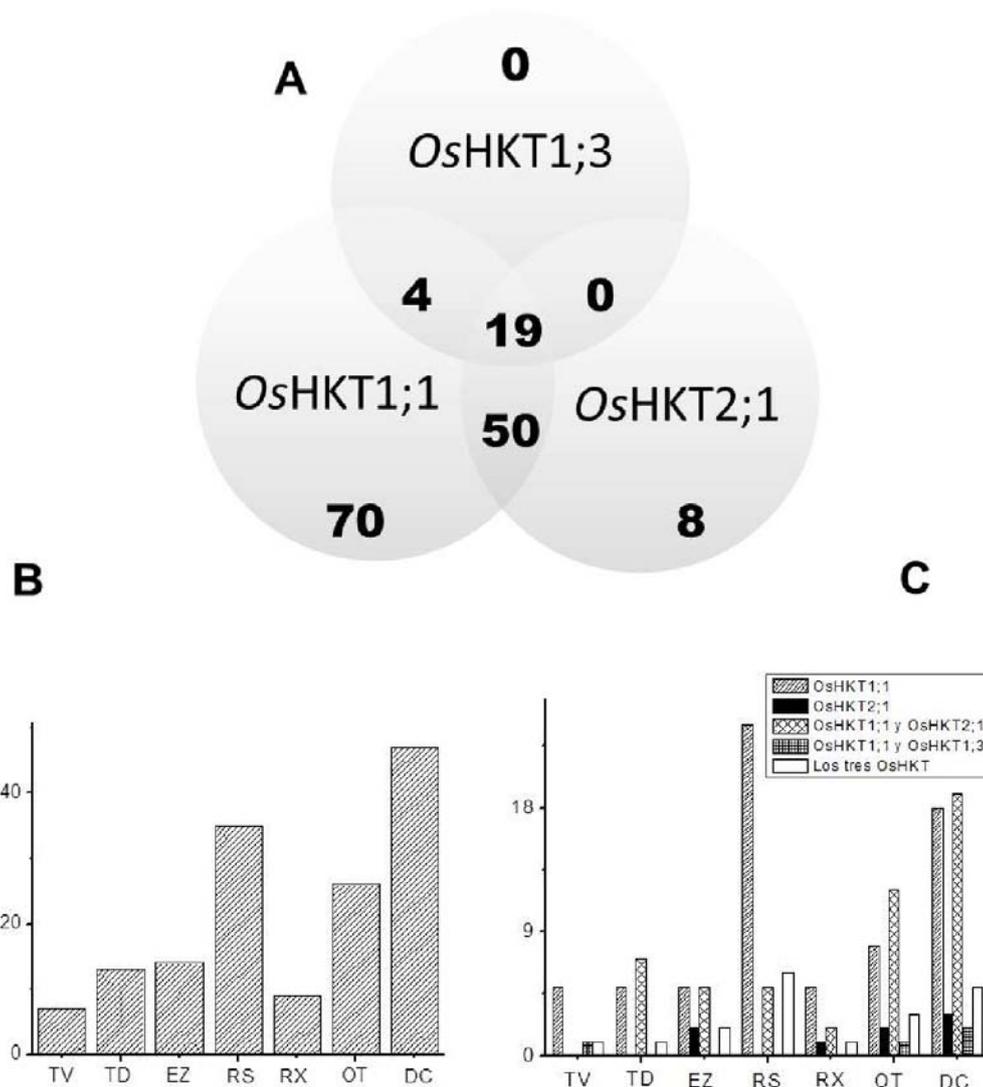
### **Interacciones de los transportadores OsHKT con proteínas de *Arabidopsis thaliana***

A pesar de los resultados anteriormente descritos, el estudio de las interacciones proteína/proteína se amplió con el objetivo de identificar posibles proteínas que pudiesen regular la actividad de OsHKT1;3, por lo que se realizó un estudio masivo empleando el sistema desarrollado recientemente en el laboratorio del Dr. Wolf Frommer nombrado “Arabidopsis Membrane Interactome Project” (<http://associomics.stanford.edu/index.php>), el cual tiene como objetivo determinar las interacciones de 8,400 proteínas de Arabidopsis, de entre las cuales, se incluyen proteínas integrales de membrana (>4,300) y un gran número (>1,000) de proteínas relacionadas en la señalización mediante el empleo del mbSUS.

Usando las cuatro construcciones de los OsHKT-Cub como carnadas, se empleó la biblioteca de los genes de Arabidopsis-Nub como presas para encontrar posibles proteínas que interactúen con estos transportadores. De este análisis se identificaron 151 proteínas que interactuaron con tres de los OsHKT, de los cuales OsHKT1;1 mostró 143, OsHKT1;3 23, y OsHKT2;1 77 interacciones. En el diagrama de Venn (Fig. 18 A) se muestra que de estos genes, 70 interactuaron únicamente con OsHKT1;1, ocho con OsHKT2;1 y no se obtuvo algún gen que interactuara únicamente con OsHKT1;3. De los genes compartidos se observó que 50 genes interactuaron tanto con OsHKT1;1 como con OsHKT2;1, y 4 genes

interactuaron con OsHKT1;3 y OsHKT1;1. Se observó que 19 genes interactuaron con los tres OsHKT (Fig. 18 A).

De acuerdo a su función, las 151 proteínas se dividieron en siete grupos; siete proteínas están relacionados al tráfico vesicular, 13 corresponden a transportadores, 14 son enzimas, 35 participan en procesos de regulación o señalización, 9 se implican en el estado redox de la célula, 26 proteínas participan en “procesos diversos” y 47 son genes que aún se desconoce su función (Fig. 18 B). Cuatro de las proteínas implicadas en el tráfico vesicular interactuaron exclusivamente con el transportador OsHKT1;1 como VPS2 que es parte del componente ESCRT-III, dos proteínas centrales en la vía secretoria del retículo endoplásmico tipo ERAD (ER-associated protein degradation) y una proteína VAMP (vesicle associated membrane protein) las cuales se han visto que participan en la fusión vesicular. AtBET12 que es una proteína tipo v-SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor, V-type) interactuó tanto con OsHKT1;1 como con OsHKT1;3 y el gen VPS60 interactuó con los tres transportadores OsHKT. Siete de los transportadores, entre los que se encuentran un intercambiador  $H^+/Mg^{2+}$ , dos transportadores galactosa-UDP y dos acuaporinas del tipo PIP, interactuaron tanto con OsHKT1;1 como OsHKT2;1. Se identificó que OsHKT1;1 interactuó exclusivamente con dos antiportadores cationes/ $H^+$  de la familia CHX, con un canal de cloro de la familia CLC-E, así como un transportador de azúcar-nucleótidos. Una proteína de la familia MATE (Multidrug And Toxin Efflux) interactuó con los tres transportadores OsHKTs. Se identificaron cinco enzimas que interactuaron con los transportadores OsHKT1;1 y OsHKT2;1, una de estas cinco enzimas es la peptidyl-prolyl cis-trans isomerase la cual pertenece a la familia de las ciclofilinas. Esta se expresa en las células guarda y su función se relaciona al plegado de proteínas. Cuatro enzimas interactuaron exclusivamente con el transportador OsHKT1;1, una de ellas de la familia de las desaturasas de ácidos grasos y otra perteneciente a la familia de las glicosiltransferasas. La primera participa en el metabolismo de lípidos y la segunda en la glicosilación de las proteínas. Se encontraron dos enzimas relacionadas al proceso de ubiquitinación que interactuaron con los tres transportadores OsHKT.



**Figura 18. Interacción de los transportadores OshKT con el interactoma de *Arabidopsis thaliana*.** **A** Diagrama de Venn mostrando el número de proteínas de *Arabidopsis* que interactuaron con los tres transportadores OshKT empleando el mbSUS. **B** Clasificación de las proteínas que interactuaron con los tres OshKT de acuerdo a su función. **C** Clasificación de las proteínas de acuerdo a su función que interactuaron con OshKT1;1 (rayas transversales), con OshKT2;1 (negro), con OshKT1;1 y OshKT2;1 (rayas cruzadas), con OshKT1;1 y OshKT1;3 (entretejido) y con los tres OshKTs (vacío). Transporte vesicular (TV), Transportadores (TD), Enzimas (EZ), Regulación y/o señalización (RS), Estado Redox (RX), Otros (OT) y Desconocidos (DC).

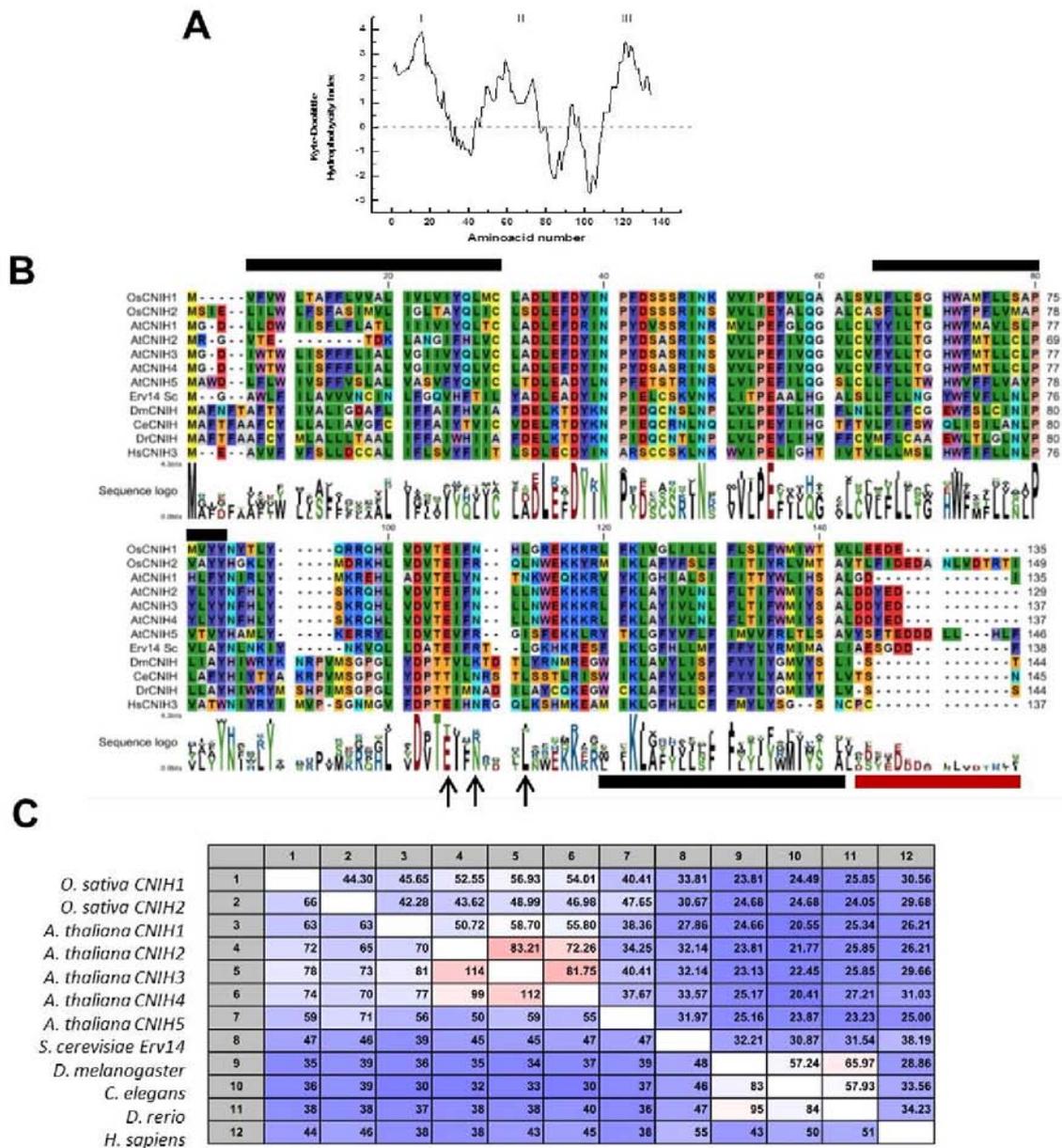
Dos enzimas del tipo UDP-GlcNAc:dolichol phosphate N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase encargadas de la transferencia de glicanos unidos a Asp en los polipéptidos salientes del retículo endoplásmico, que participan en el plegamiento de las proteínas, se asociaron exclusivamente con el transportador OsHKT2;1. Se encontró que 24 proteínas relacionadas a procesos de señalización y/o regulación interactuaron solo con OsHKT1;1 (Fig. 18 C). Algunas de estas proteínas son cinasas de proteínas de varios tipos, fosfatasas, elementos de respuesta a ácido abscísico, receptores como el BIR1 (BAK1-interacting receptor-like kinase) o el RLK (Receptor-like kinase). Un gen que codifica para una proteína con sitios homólogos a TRAF y meprin interactuó con los tres OsHKT. Esta proteína participa en respuesta al estrés salino y de manera interesante, se ha reportado que se localiza en el tonoplasto y la envoltura del cloroplasto. Un factor de transcripción de la familia MYB, así como una cinasa de proteínas y una proteína de unión a calmodulina también interactuaron con estos tres transportadores. Cinco proteínas relacionadas en el proceso de estrés oxidativo interactuaron solo con el transportador OsHKT1;1 de entre las cuales están thioredoxinas del tipo H, una subunidad del complejo de NAD(P)H deshidrogenasa. Otra thioredoxina y glutaredoxina interactuaron tanto con OsHKT2;1 y OsHKT1;1. Resulta interesante el hecho de que un factor regulador del tipo G-BOX que codifica para un miembro de la familia de las proteínas 14-3-3 interactuó con los tres transportadores OsHKT. Esta proteína 14-3-3 interactúa con una ascorbato peroxidasa en respuesta a estrés, sugiriendo una participación en el metabolismo oxidativo.

### **OsHKT1;3 interactúa con OsCNIH1 en levaduras**

Como se puede observar en el diagrama de Venn (Fig. 18 A), 19 proteínas fueron las que interactuaron con los tres transportadores OsHKT. Al analizar estas, seis de ellas están relacionadas a distintos procesos celulares, sin embargo la perteneciente a la familia del Cornichon (CNIH) llamó la atención debido a los reportes que existen en la literatura sobre esta familia. En el cerebro de la rata se observó que los receptores de glutamato del subtipo AMPA (AMPA<sub>r</sub>) se

ensamblan con dos isoformas del CNIH, 2 y 3, los cuales incrementan la expresión de los AMPAr en los ovocitos de la rana *Xenopus* alterando también la apertura y cierre del canal (Schwenk et al., 2009). Estos resultados mostraron que el CNIH está asociado con proteínas de membrana y en algunos casos, con la regulación de su actividad, como en los AMPAr. Datos adicionales revelan que en levaduras el homólogo del CNIH, Erv14p se necesita para que la proteína de membrana Axl2p llegue a la membrana plasmática y se pueda producir un patrón de gemación axial correcto (Powers & Barlowe, 1998). En *Drosophila*, CNIH es importante para generar la polaridad dorso-ventral del embrión (Roth et al., 1995). Debido a la participación relevante de CNIH en distintos organismos, se eligió esta proteína para su estudio como posible regulador de la actividad de OshKT1;3.

De acuerdo a las bases de datos, en *Arabidopsis* existen 5 isoformas de CNIH y en el arroz hay solo dos, OsCNIH1 y OsCNIH2 (Fig. 19 B) que al alinearse con otros homólogos de CNIH presentes en los siguientes organismos: *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *D. rerio* y *H. sapiens*, dio como resultado que entre estos homólogos existe un nivel de identidad cercano al 45% (Fig. 19 C). La estructura que se predice para OsCNIH1 es de tres dominios transmembranales (Fig. 19 A; barras negras en Fig. 19 B), con la terminal amino expuesta hacia el citoplasma y la terminal carboxilo hacia el lumen del retículo endoplásmico (Fig. 19 A). Esta estructura es similar a la que se ha mencionado previamente sobre su homólogo en levaduras Erv14p (Powers & Barlowe, 2002). En el alineamiento se puede observar una región muy conservada entre los aminoácidos 30-63 en todos los miembros presentes, la cual se ha empleado para definir a la familia del CNIH. Un aspecto importante que sobresale es que en la parte del carboxilo terminal entre los miembros que pertenecen a las plantas y la levadura existe un dominio ácido, similar al dominio di-ácido que es una señal de retención en el retículo endoplásmico H(K)DEL (Gomord et al., 1997; Pagny et al., 1999), y que en los CNIH de animales está ausente (Fig. 19 B, barra roja). También se observó que los aminoácidos necesarios para la unión a vesículas COPII en Erv14p están conservados en la mayoría de los miembros de esta familia (ver flechas en Fig. 19 B).

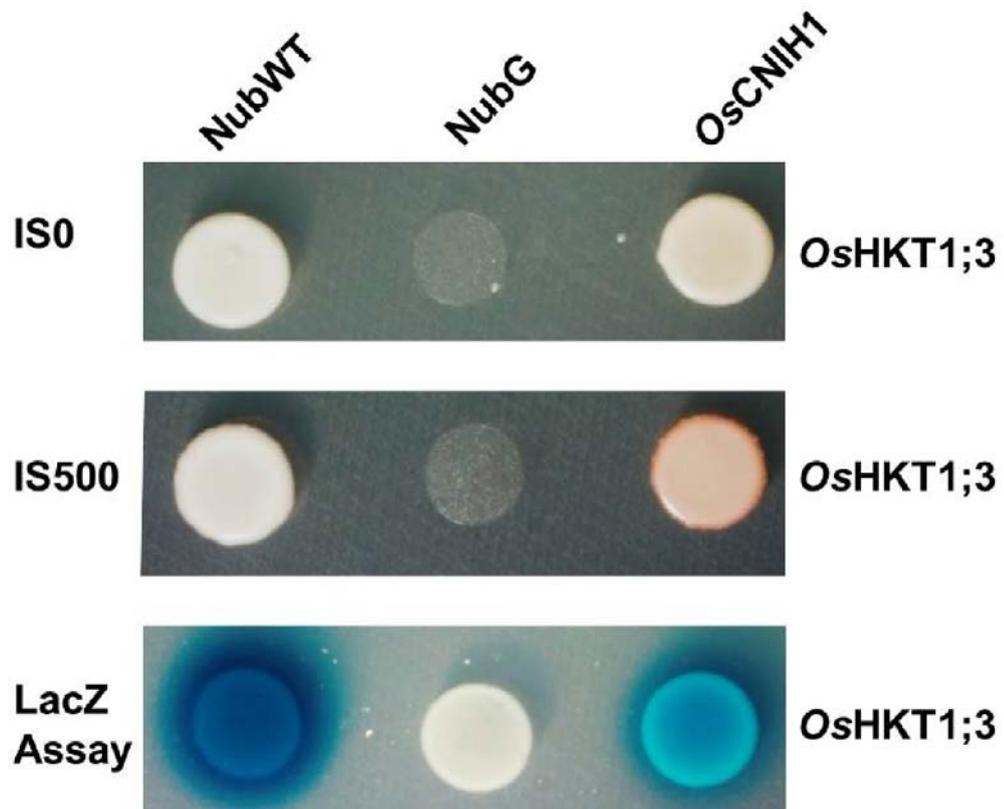


**Figura 19. Análisis de la secuencia de la proteína Cornichon (OsCNIH1).** **A** Gráfica Kyte y Doolittle que muestra tres dominios transmembrana (valores > 0) en OsCNIH1. **B** Alineamiento de las secuencias de OsCNIH1 con OsCNIH2, AtCNIH1, AtCNIH2, AtCNIH3, AtCNIH4, AtCNIH5, Erv14p, y las proteínas de Drosophila (*D. melanogaster*), el gusano (*C. elegans*), pez cebra (*D. rerio*) y humano isoforma 4 (*H. sapiens*); los números de acceso son Os06g04500, Os12g32180, At4g12090, At1g12340, At1g12390, At1g62880, At3g12180, YGL054C Erv14, NP\_477068, CAB01516, NP\_001028278, NP\_001264129.1, respectivamente. Las barras negras indican dominios transmembranales putativos; flechas indican residuos de aminoácidos conservados que participan en la unión a las vesículas COPII en levadura (I96, F97 and L100); la barra roja muestra el dominio ácido en la C-terminal. **C** Porcentaje de identidad (esquina superiores derecha) y número de residuos idénticos (esquina inferior izquierda) entre las proteínas mostradas en **B**.

Para comprobar que la interacción heteróloga OsHKT1;3-AtCNIH1 ocurre con el CNIH del arroz, se procedió a analizar esta interacción. El transportador OsHKT1;3 se empleó como carnada (Clona Cub) y el OsCNIH1 como presa (Clona Nub). En la figura 20 se puede apreciar que la presencia de ambas proteínas en las células diploides de las levaduras permitió su crecimiento auxótrofo en medios -His y -Ade, debido a la interacción que hay entre OsHKT1;3 y OsCNIH1 (IS-0). Para confirmar que esta interacción era específica, se realizó el ensayo en presencia de 500  $\mu$ M de metionina, que al observar el crecimiento de las levaduras que expresaban ambas proteínas, comprobaba que la interacción fue específica (Fig. 20; IS-500). Los controles de falsos positivos (NubG) y falsos negativos (NubWT) mostraron que el sistema mbSUS estaba funcionando adecuadamente. Por último, se llevó a cabo el ensayo LacZ para lo cual las colonias de levadura se incubaron en presencia de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactosidase (X-Gal) como sustrato para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual solo es activa cuando existe interacción proteína-proteína y que causa la liberación del factor de transcripción, generando una coloración azul en las células de levadura, como se puede observar para la interacción OsHKT1;3 vs NubWT y OsHKT1;3 vs OsCNIH1 (Fig. 20; LacZ). En conjunto, estos resultados mostraron claramente que OsHKT1;3 y OsCNIH1 establecen una interacción proteína/proteína específica.

### **OsCNIH1 co-localiza con OsHKT1;3 y está presente en el Aparato de Golgi, Retículo Endoplásmico y en los puntos de salida del retículo endoplásmico**

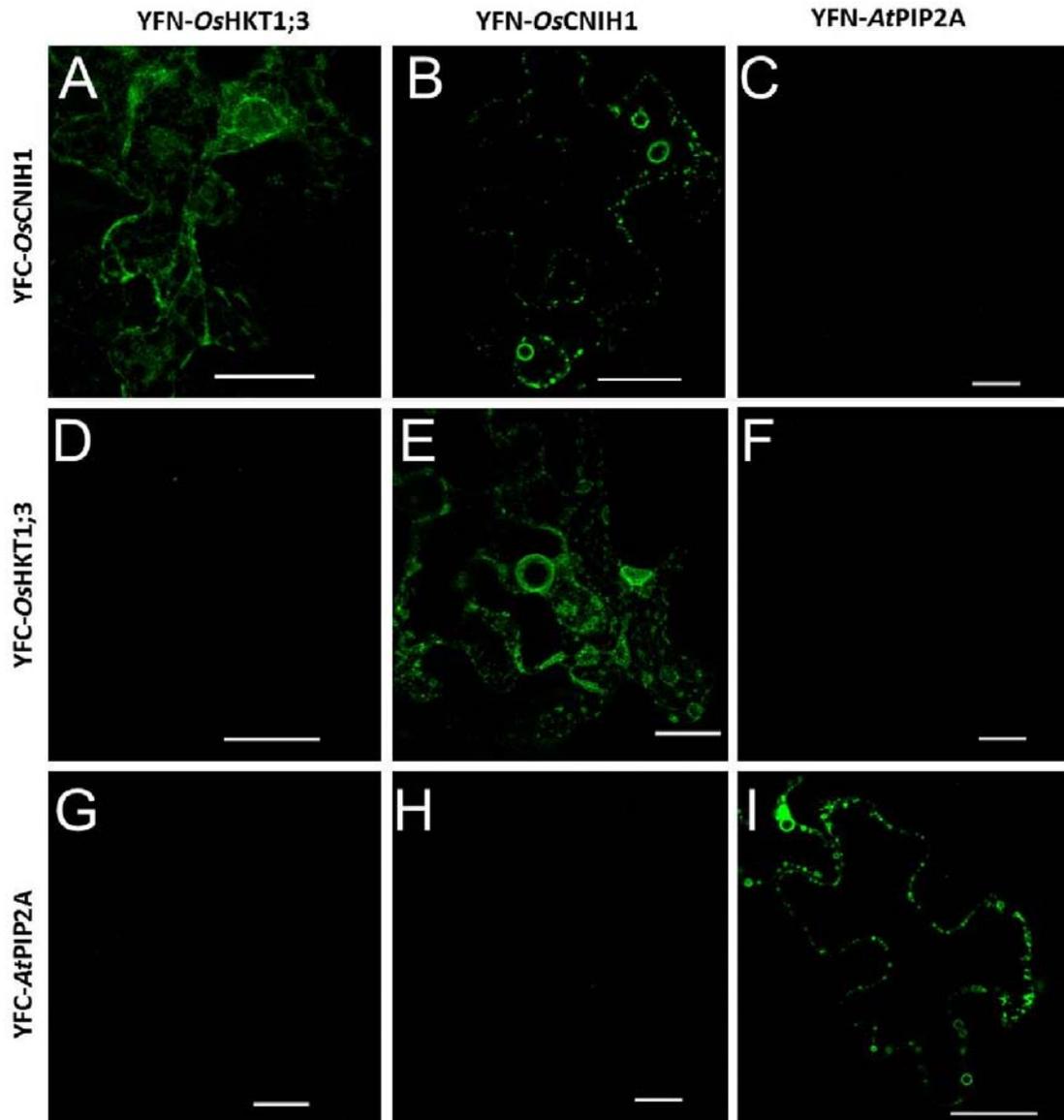
Aun y cuando las evidencias anteriormente descritas mostraban la interacción entre OsHKT1;3 y OsCNIH1, era importante demostrar que esto ocurría *in planta*, por lo que se procedió a analizar la interacción de estas dos proteínas en células de la epidermis de tabaco mediante la reconstitución de la fluorescencia de la EYFP dividida. Para realizar esto, se fusionó la mitad amino terminal de la EYFP a la terminal amino terminal de OsHKT1;3 originando la construcción YFN-OsHKT1;3. Paralelamente, la mitad carboxilo terminal de la EYFP se fusionó a la región del amino terminal de OsCNIH1 dando la construcción YFC-OsCNIH1. Ambas construcciones se co-expresaron en las hojas de tabaco y la fluorescencia asociada a la reconstitución de la EYFP fue registrada mediante microscopía



**Figura 20. Interacción proteína-proteína entre el transportador de Na<sup>+</sup> OsHKT1;3 y OsCNIH1.** La interacción entre las proteínas OsHKT1;3 y OsCNIH1 de la planta del arroz cv. Nipponbare se confirmó con el sistema mbSUS mediante el crecimiento de las levaduras en los medios de selección IS-0 y IS-500. Corroboración de la interacción entre OsHKT1;3 y OsCNIH1 se demostró por la actividad de LacZ y revelada con X-Gal como sustrato (LacZ).

confocal. La interacción entre *OshKT1;3* y *OscNIH1* sí ocurrió *in planta*, como lo mostró la reconstitución de la fluorescencia de la EYFP, y que esta sucedió en el RE, como lo indicó la estructura reticulada asociada a la fluorescencia de la EYFP (Fig. 21 A). Esta interacción y colocalización de ambas proteínas fue confirmada con la fusión de las terminales carboxilo y amino de la EYFP a las terminales amino de *OscNIH1* (YFN-*OscNIH1*) y *OshKT1;3* (YFC-*OshKT1;3*), respectivamente (Fig. 21 E). Como control positivo de esta técnica se empleó a la acuaporina *AtPIP2A* la cual se sabe que se oligomeriza conformando un tetrámero en la membrana plasmática. Para ello, tanto la mitad amino como como la mitad carboxilo de la EYFP se fusionaron al amino terminal de *AtPIP2A* generando las construcciones YFN-*AtPIP2A* y YFC-*AtPIP2A* que al ser co-expresadas en la epidermis del tabaco, condujo a la reconstitución de la fluorescencia de EYFP en la periferia de la célula, confirmando la localización de la acuaporina en la membrana plasmática (Fig. 21 I). Un resultado interesante fue la reconstitución de la fluorescencia asociada a EYFP, sugiriendo la oligomerización de *OscNIH1*, en estructuras semejantes a las asociadas con el Golgi (Fig. 21 B). Por otro lado, y al igual que lo observado con el mbSUS el cual demostró que *OshKT1;3* no forma oligómeros, la co-transformación de las células epidérmicas del tabaco con las construcciones YFN-*OshKT1;3* y YFC-*OshKT1;3* falló en reconstruir la fluorescencia de EYFP confirmando que *OshKT1;3* no forma oligómeros (Fig. 21 D). Empleando estas construcciones, también se pudo determinar que la acuaporina *AtPIP2A* no interactuó con *OshKT1;3* ni con *OscNIH1* (Fig. 21 F, G, H y C). Estos resultados demostraron que la interacción entre *OscNIH1* y *OshKT1;3* es específica, y al mismo tiempo, reveló que esta asociación sucede en el retículo endoplásmico y que *OscNIH1* forma un homo-oligómero en estructuras asociadas con el Golgi.

Otra forma para observar si *OshKT1;3* y *OscNIH1* coincidían en el mismo compartimento, fue mediante la fusión a distintas proteínas fluorescentes y su posterior co-expresión en la epidermis de la hoja del tabaco y así determinar una posible colocalización a través de microscopía confocal. La co-infiltración de las construcciones *OshKT1;3*-EYFP y *OscNIH1*-mCherry en hojas del tabaco



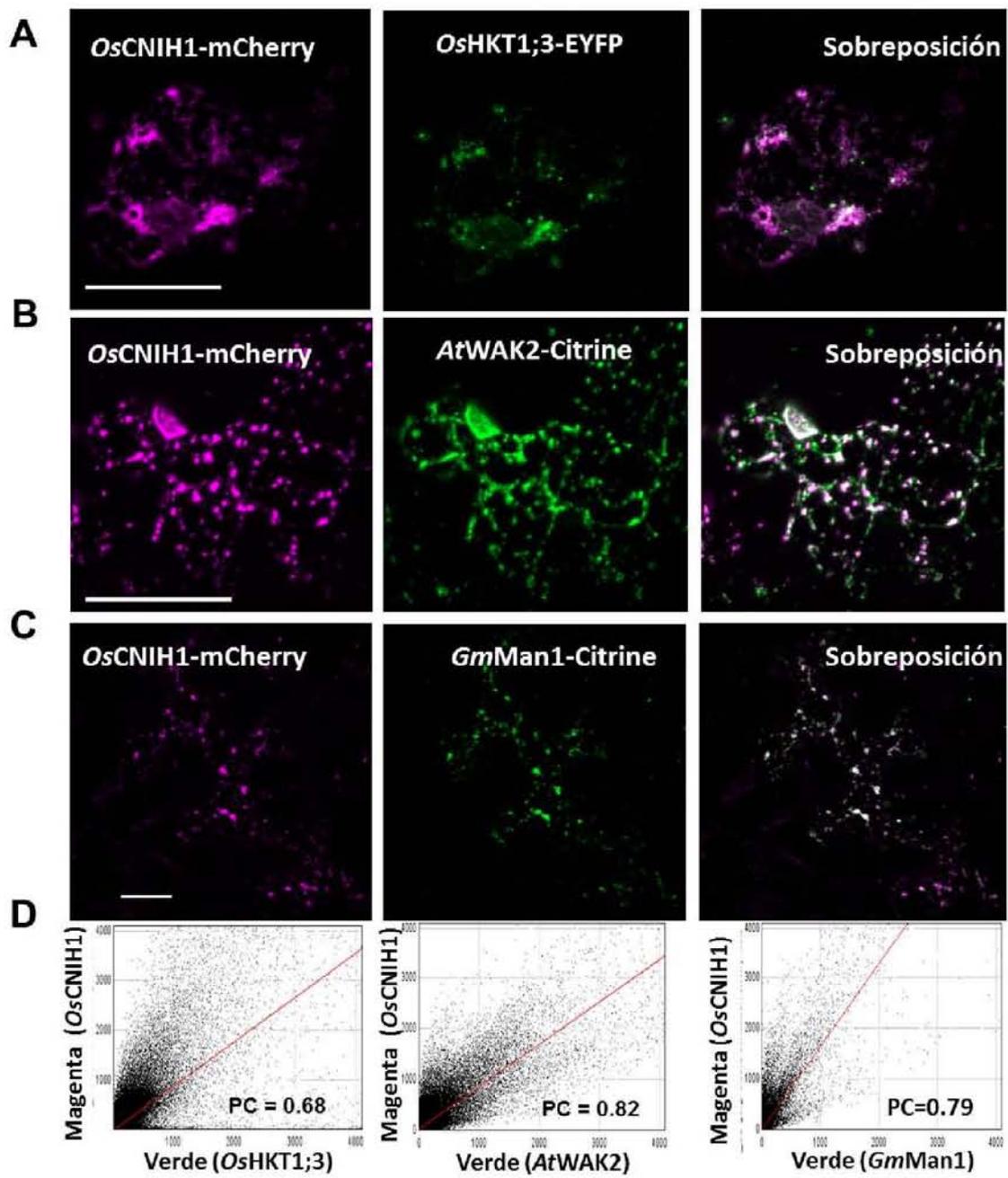
**Figura 21. Reconstitución de la fluorescencia indica la interacción de *OsCNIH1* con *OsHKT1;3* y demuestra la probable oligomerización de *OsCNIH1* en hojas de tabaco. **A, E** Interacción recíproca entre YFC-*OsCNIH1*/YFN-*OsHKT1;3* y YFN-*OsCNIH1*/YFC-*OsHKT1;3* confirman la interacción de estas dos proteínas en el retículo endoplásmico. **B** Co-expresión de YFC-*OsCNIH1* y YFN-*OsCNIH1* indica la posible oligomerización de Cornichon en el RE. La ausencia de la reconstitución de la fluorescencia indica que: *OsCNIH1* no interactúa con *AtPIP2A*, **C y H**; *OsHKT1;3* no forma oligómeros, **D**; el transportador y la acuaporina no interactúan, **F y G**. Co-expresión de YFC-*AtPIP2A* y YFN-*AtPIP2A* confirma la oligomerización de la acuaporina en la membrana plasmática, **I**. La escala es de 25  $\mu$ m.**

permitió observar la fluorescencia correspondiente a OsHKT1;3-EYFP en forma de puntos localizados por toda la célula. Sin embargo, también se logró observar una estructura reticulada (Fig. 22 A, Centro). Por otro lado, la fluorescencia emitida por OsCNIH1-mCherry fue de forma reticulada y ligeramente punteada (Fig. 22 A, Izq.). Cuando ambas imágenes se superpusieron se pudo observar que la fluorescencia coincidió, lo cual se interpreta como la colocación de ambas proteínas (Fig. 22 A; Der.) La imagen muestra que la asociación entre OsCNIH1 y OsHKT1;3 ocurrió principalmente en una estructura que asemeja al RE. Al graficar el número de píxeles de los dos canales (uno correspondiente a la fluorescencia de OsCNIH1-mCherry y otro al de OsHKT1;3-EYFP) se observó que existía una correlación de los dos canales con una tendencia hacia el canal rojo (Fig. 22 D; Izq.). El valor calculado del PC mediante el método de Costes fue de 0.68 (P=100%), lo cual sugiere que existe una co-localización entre estas dos proteínas.

Evidencias en otros organismos como levaduras, *Drosophila* y Humanos han mostrado que las proteínas de la familia del CNIH se encuentran en el retículo endoplásmico, sin embargo, en plantas no se tienen datos sobre su localización (Brockie et al., 2013; Castro et al., 2007; Harmel et al., 2012; Powers & Barlowe, 1998; Sauvageau et al., 2014). Por lo cual se decidió expresar a OsCNIH1-mCherry junto con algunos marcadores subcelulares para determinar la localización de esta proteína en plantas. La co-expresión de *AtWAK2*-Citrina, marcador para el RE (Fig. 22 B, Centro) y OsCNIH1-mCherry (Fig. 22 B, Izq.) mostró que ambas proteínas se localizan en una estructura reticulada que caracteriza al RE. Al sobreponer ambas imágenes se observó una señal de color blanco en casi toda la estructura marcada por la fluorescencia de ambas proteínas. Al llevar a cabo el análisis de estas imágenes, se pudo observar en la gráfica de dispersión que los píxeles de ambas señales coincidían en una línea recta lo cual indicaba una co-localización de ambas proteínas, con un valor de PC= 0.82 (P=100%), lo cual corrobora estas observaciones (Fig. 22 D, centro).

En humanos y *Drosophila* se ha propuesto que CNIH lleva a cabo el transporte de proteínas cargo desde el RE hasta el Golgi a lo largo de la vía anterógrada y que CNIH podría ser parte del sistema COPII (Bökel et al., 2006; Powers & Barlowe, 2002; Schwenk et al., 2009). Por ello se decidió analizar la co-localización de OsCNIH1-mCherry con *GmMan1*-Citrina, un marcador del aparato de Golgi. Como se describió anteriormente, la señal de OsCNIH1-mCherry se observó como un retículo que posee algunos puntos definidos (Fig. 22 C, Izq.). Por otro lado, la señal de *GmMan1*-Citrina (Fig. 22 C Centro) se observó en forma punteada por todo el citoplasma. Cuando se superpusieron ambas imágenes, se observó que existía una co-localización de ambas proteínas (Fig 22 C, Der.). Sin embargo es de notar que algunas señales pertenecientes a *GmMan1*-Citrina se localizan en sitios independientes. Al realizar el análisis de la sobreposición de las imágenes se observó que los pixeles se agruparon hacia el eje Y, con una regresión lineal que permitió calcular un  $PC=0.79$  ( $P=100\%$ ) (Fig. 22 D, Der.), confirmando la colocación de las dos proteínas.

Estos dos últimos resultados indicaban que OsCNIH1 está presente tanto en el retículo endoplásmico como en el Golgi, aunque en este último de manera parcial. Como anteriormente se mencionó, se ha sugerido que OsCNIH1 participa en el sistema de tránsito vesicular mediado por el sistema COPII. Para determinar si esto también ocurría en células vegetales, decidimos hacer uso de uno de los marcadores *bona fide* para este sistema, *AtSec24*, el cual reside en los puntos de salida del retículo endoplásmico ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites; Faso et al., 2009) y es parte integral del complejo multimérico COPII encargado de la ruta anterógrada del retículo endoplásmico hacia el Golgi. La fluorescencia de la YFP fusionada a *Atsec24* se observó en forma de puntos que son característicos de la estructura en la que reside esta proteína, los ERES (Fig. 23, Centro). Por otro lado la señal de la fluorescencia de mCherry fusionada a OsCNIH1 mostró una forma reticulada y algunos puntos distribuidos por toda la célula (Fig. 23, Izq.). Al sobreponer las dos imágenes se observó que hubo puntos que co-localizaron (Fig. 23, Der. flechas). Al hacer un análisis de esta imagen, se obtuvo la gráfica de dispersión de los pixeles, donde la mayoría de estos se agruparon hacia el canal

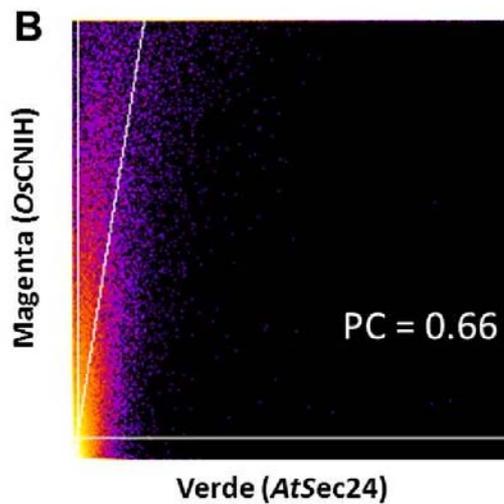
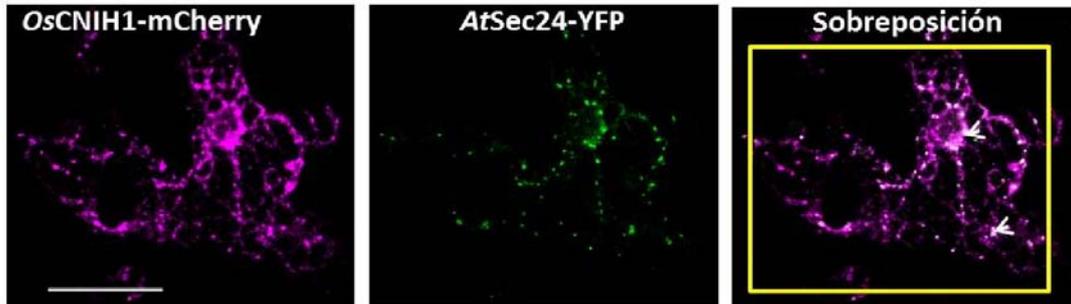


magenta y la línea recta muestra la correlación de las dos señales (Fig. 23 B). El valor de PC obtenido mediante el método de Costes fue de 0.66, lo cual indicaba la co-localización parcial de las dos proteínas. Los datos mostrados hasta ahora evidencian la interacción proteína-proteína entre *OshKT1;3* y *OscNIH1* en las células de tabaco mediante la reconstitución de la fluorescencia de la EYFP. Al mismo tiempo se pudo apreciar que los marcadores del retículo endoplásmico (*AtWAK2*), del Aparato de Golgi (*GmMan1*) y de los ERES (*AtSec24*) co-localizaron con la expresión de *OscNIH1*. Estos datos muestran que *OscNIH1* está presente en el Retículo Endoplásmico, en el ERES y de manera parcial en el Golgi.

### **La expresión heteróloga de *OshKT1;3* y *OscNIH1* en los ovocitos de *Xenopus* inhibe el transporte de $\text{Na}^+$**

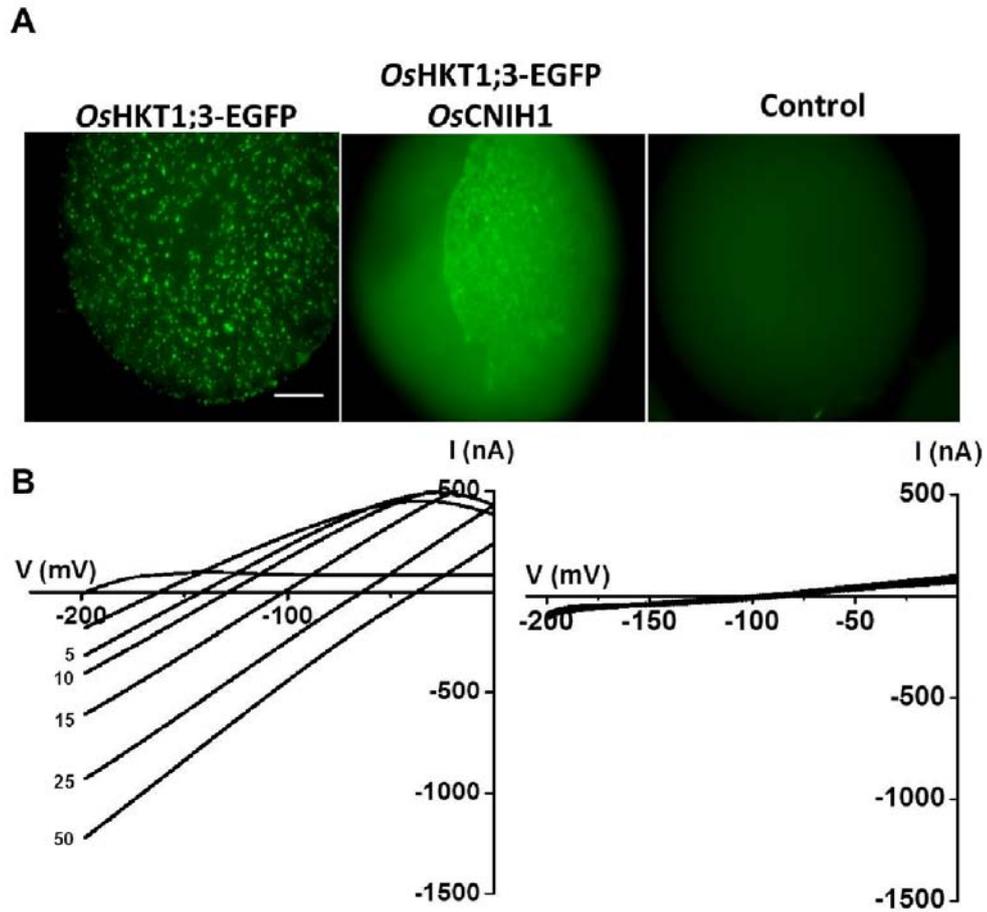
La evidencia hasta aquí descrita indicaba la interacción entre *OshKT1;3* y *OscNIH1*, por lo que fue importante determinar que ocurría con la actividad de transporte de *OshKT1;3* cuando ambas proteínas se co-expresaban. Una manera de demostrar esta interacción, fue estudiar algún efecto sobre la expresión o las propiedades de transporte de *OshKT1;3* en presencia de *OscNIH1* en los ovocitos de *Xenopus*. Para ello se fusionó la EGFP al carboxilo terminal de

**Figura 22. Co-localización Intracelular de *OshKT1;3* con *OscNIH1*.** **A** Co-expresión de *OshKT1;3* con *OscNIH1* en hojas de tabaco. La localización de *OshKT1;3*-EYFP (Centro) se observó sobre una estructura reticulada correspondiente a la señal de *OscNIH1*-mCherry (Izquierda); co-localización de las dos proteínas se observa como estructuras de color blanco (Derecha). **B** Expresión del marcador *AtWAK2*-Citrina revela al retículo endoplásmico dentro de la célula (Centro); estructuras similares fueron marcadas por la señal de *OscNIH1*-mCherry (Izquierda); sobreposición de las dos imágenes identifica la co-localización de las dos proteínas iluminadas de color blanco (Derecha). **C** Localización del marcador del aparato de Golgi, *GmMan1*-Citrina (Centro); fue similar a la señal de *OscNIH1*-mCherry (Izquierda); sobreposición de las dos imágenes (señal blanca) indica las zonas de co-localización de las dos proteínas (derecha). **D** Graficas de dispersión de los pixeles entre los canales magenta (eje Y) y verde (eje X) para *OshKT1;3*-EYFP y *OscNIH1*-mCherry (Izquierda); *AtWAK2*-Citrine y *OscNIH1*-mCherry (Centro); y *GmMan1*-Citrine y *OscNIH1*-mCherry (Derecha). **PC** Coeficiente de correlación de Pearson. La escala es 25  $\mu\text{m}$ .

**A**

**Figura 23. OsCNIH1 co-localiza con el marcador del sistema COPII AtSec24.** **A** Co-expresión de OsCNIH1 y AtSec24 en hojas de tabaco. La localización del marcador del compartimento ERES/COPII, AtSec24-YFP, se observa como estructuras punteadas distribuidas en toda la célula (Centro); la localización de OsCNIH1-mCherry corresponde a estructuras reticuladas acompañadas en algunas zonas de estructuras punteadas (Izquierda). La sobreposición de las imágenes muestra la co-localización de ambas proteínas (señal blanca), la cual es más intensa en las regiones punteadas (Derecha; flechas). **B** Análisis de co-localización de las dos proteínas mediante la gráfica de dispersión de los píxeles, la línea blanca muestra la colocalización de las dos señales. **PC** Coeficiente de correlación de Pearson. La escala es de 25  $\mu\text{m}$ .

OshKT1;3 y la construcción se clonó en el vector de expresión para los ovocitos pOO2. El ARNc de esta quimera se inyectó en ovocitos de ranas albinas y se observó la expresión de OshKT1;3-EGFP mediante microscopía de epifluorescencia. La figura 24 A (Izq.) OshKT1;3-EGFP mostró de manera punteada y distribuida por la toda la superficie de la célula, lo cual indicó que esta proteína se localiza en la membrana plasmática del ovocito. Con la finalidad de determinar si la localización de OshKT1;3-EGFP se afectó por la presencia de OsCNIH1, se procedió a co-inyectar ambos ARNc en una proporción 1:1. Bajo estas condiciones, la fluorescencia de OshKT1;3-EGFP en presencia de OsCNIH1 se observó dentro de la célula en forma reticulada, posiblemente en el retículo endoplásmico (Fig. 24 A, Centro). Para confirmar que la fluorescencia correspondía a la expresión de OshKT1;3-EGFP y no a la auto-fluorescencia propia del ovocito, se analizó la señal de un ovocito inyectado con H<sub>2</sub>O-DEPC bajo el microscopio de epifluorescencia en donde no se observó fluorescencia (Fig. 24 A, Der.), confirmando así que las señales observadas en ovocitos inyectados con la construcción OshKT1;3-EGFP sí corresponden a la localización del transportador. Estos resultados mostraron que OshKT1;3-EGFP se expresa en la membrana plasmática pero que cuando se co-expresa con OsCNIH1 su localización cambia y ocurre intracelularmente. Este cambio en la localización de OshKT1;3 sugiere que la actividad de transporte en los ovocitos debería inactivarse debido a su internalización y secuestro en membranas internas. Por ello se decidió registrar la actividad de transporte de OshKT1;3 en presencia de OsCNIH1. Como se puede apreciar en la figura 24 B, (Izq.), los ovocitos de *Xenopus* que expresaron a OshKT1;3 generaron corrientes negativas/entrantes, las cuales aumentaron su magnitud conforme la concentración de Na<sup>+</sup> se incrementó extracelularmente, resultados similares a los mostrados anteriormente (Fig. 11-15). Asociados a estos cambios en la magnitud de las corrientes, también se observaron los desplazamientos positivos del E<sub>r</sub>, corroborando que las corrientes correspondieron al transporte de Na<sup>+</sup>. Sin embargo, cuando se co-inyectó el ARNc de OshKT1;3 junto con el correspondiente a OsCNIH1, las corrientes activadas por rampas de voltaje fueron pequeñas y su magnitud no fue



**Figura 24. Co-expresión de OsHKT1;3 y OsCNIH1 en ovocitos de Xenopus previene la expresión de OsHKT1;3 en la membrana plasmática.** **A** Fluorescencia correspondiente a OsHKT1;3-EGFP se observó como estructuras punteadas en la membrana plasmática del ovocito de Xenopus (Izquierda); su co-expresión con OsCNIH1, causó que la fluorescencia se observara intracelularmente como en una estructura reticulada (centro). La auto-fluorescencia de un ovocito inyectado con H<sub>2</sub>O-DEPC fue difusa y de menor intensidad (derecha). La barra de la escala es de 250  $\mu$ m. **B** Expresión de OsHKT1;3 en un ovocito de Xenopus expuesto a diferentes concentraciones de Na<sup>+</sup> generó corrientes entrantes de Na<sup>+</sup> activadas por rampas de voltaje (Izquierda). Co-inyección del ARNc de OsHKT1;3 y OsCNIH1 en una proporción 1:1 previno la activación de corrientes entrantes en ovocitos expuestos a las mismas soluciones de Na<sup>+</sup> (derecha). El potencial de mantenimiento fue de -180 mV. Resultados representativos de siete

modificada por cambios en la concentración extracelular de Na<sup>+</sup> (Fig. 24 B, Der.). Estos resultados junto con la localización intracelular de la fluorescencia de OsHKT1;3-EGFP confirmaban la interacción de las dos proteínas y su retención en el retículo endoplásmico de los ovocitos.

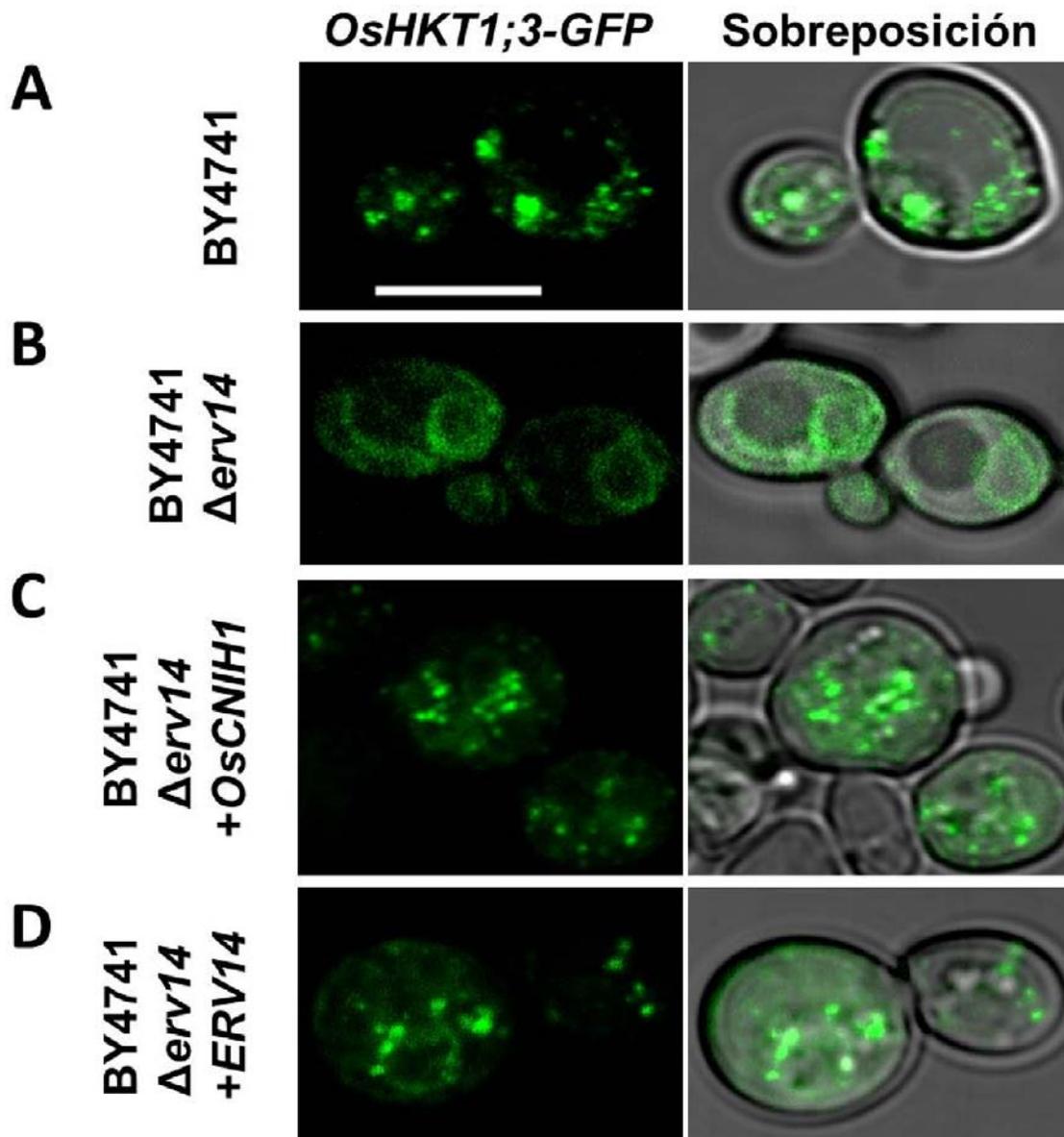
**Mutación de *ERV14*, el homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* de *OsCNIH1*, modifica la localización intracelular de *OsHKT1;3* la cual se restablece por la presencia *de novo* de *Erv14p* o *OsCNIH1***

Las evidencias hasta ahora descritas muestran que *OsCNIH1* está presente en el RE, ERES y el Golgi sugiriendo un tránsito activo entre estos compartimientos. Por otro lado se mostró que su co-expresión junto con *OsHKT1;3* en los ovocitos de *Xenopus*, modificó la localización original del transportador en la membrana plasmática a posiblemente el RE. Resultados adicionales mostraron primero, que estas dos proteínas sí interactúan y que además esta interacción sucede probablemente en el RE. Todas estas evidencias, junto con los reportes en la literatura (Drummond et al., 2012; Gillingham et al., 2004; Harmel et al., 2012; Herring et al., 2013; Powers & Barlowe, 1998), sugieren que *OsCNIH1* es un receptor cargo de *OsHKT1;3*, y que a través de la interacción de las dos proteínas en el RE, *OsHKT1;3* pueda moverse del RE hasta el Golgi en donde éste transportador reside. Con la finalidad de demostrar este papel de *OsCNIH1* como receptor cargo para *OsHKT1;3* se procedió a emplear el sistema de expresión heterólogo de la levadura, *S. cerevisiae*, ya que en este organismo existe solo un homólogo del *OsCNIH1* denominado *ERV14*.

Para observar la localización de *OsHKT1;3* en las levaduras, éste gen se clonó en el vector pGRU1, lo que permitió fusionar a la GFP en su carboxilo terminal (*OsHKT1;3*-GFP). La transformación de la cepa BY4741 con la construcción *OsHKT1;3*-GFP permitió observar que la fluorescencia asociada al transportador ocurrió intracelularmente y en forma de puntos sólidos (Fig. 25 A), los cuales asemejan al aparato de Golgi de las levaduras (Kurokawa et al., 2014). Posteriormente y para evaluar si la ausencia de *ERV14* podría afectar la localización de *OsHKT1;3* se generó la mutante *erv14* en la cepa BY4741 a la que

se denominó como *BY4741Δerv14*. La fluorescencia de *OshKT1;3-GFP* en la mutante *BY4741Δerv14* se observó alrededor del núcleo y alrededor de toda la célula, cercana a la membrana plasmática (Fig. 25 B). Este patrón de expresión es muy similar a la localización del RE de las levaduras, ya que el retículo en este organismo se ha identificado como retículo nuclear, rodeando al núcleo y el retículo cortical, localizado muy pegado a la membrana plasmática (Manford et al., 2012). Estos resultados muestran que la mutación de *erv14* en levaduras genera un cambio en la localización de *OshKT1;3*, lo que sugirió que *Erv14p* estaba reconociendo a *OshKT1;3* como a una proteína cargo. Para comprobar esta observación, se co-expresó *OscNIH1* en la cepa *BY4741Δerv14* junto con *OshKT1;3-GFP* esperando redirigir al transportador al Golgi. En estas células co-transformadas la fluorescencia asociada a *OshKT1;3-GFP* se observó como puntos sólidos en el citoplasma, indicando que efectivamente la presencia de *OscNIH1* restableció la localización de *OshKT1;3* a la membrana del Golgi (Fig. 25 C). De la misma manera, se pudo reintegrar la expresión de *OshKT1;3-GFP* en el Golgi cuando la mutante *BY4741Δerv14* se co-trasformó con *ERV14*, como se puede observar por el patrón de expresión de la fluorescencia (Fig. 25 D). Estos resultados demostraban que *OscNIH1* actúa como un receptor cargo reclutando a *OshKT1;3* en el retículo y transportándolo a su compartimiento de residencia que es el Golgi.

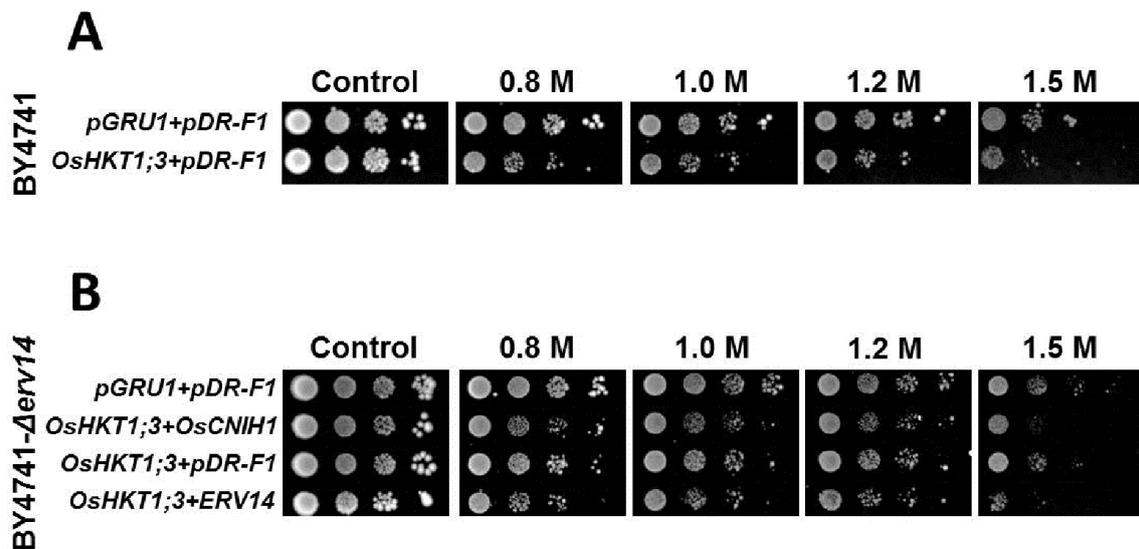
Una interrogante que surgió de la expresión intracelular de *OshKT1;3* en lo que aparentemente es el Golgi, fue los posibles efectos que podría acarrear su sobreexpresión. Para responder esta pregunta, se decidió expresar a *OshKT1;3-GFP* dentro de la cepa de levaduras *BY4741* y realizar ensayos de sensibilidad de crecimiento en medios con diferentes concentraciones de *NaCl*. En condiciones control (sin  $\text{Na}^+$ ) tanto la cepa *BY4741* transformada con los plásmidos vacíos (*pGRU1* y *pDR-F1*), como la que expresó a *OshKT1;3* y al plásmido vacío *pDR-F1* crecieron de manera similar al comparar las correspondientes diluciones seriales (Fig. 26 A). Cuando las levaduras crecieron en presencia de *NaCl* de 0.8 M a 1.5 M se pudo apreciar que las levaduras transformadas con los plásmidos vacíos fueron capaces de crecer a estas concentraciones observando solo un menor



**Figura 25. *OscNIH1* restaura la expresión intracelular de *OshKT1;3* en la mutante de levadura *BY4741Δerv14*.** Imágenes de la emisión de la fluorescencia y su sobreposición con el campo claro de células vivas de levaduras expresando a *OshKT1;3-GFP* en la cepa *BY4741* (**A**) y en la mutante *BY4741Δerv14* (**B**). (**C**) y (**D**) células de levadura de la mutante *BY4741Δerv14* co-expresando ya sea *OshKT1;3-GFP* y *OscNIH1* o *OshKT1;3-GFP* y *ERV14*, respectivamente. La escala es de 5  $\mu$ m.

crecimiento en presencia de 1.5 M de  $\text{Na}^+$  (Fig. 26 A pGRU1+pDR-F1). Sin embargo, las levaduras que expresaron a OshKT1;3 mostraron un menor crecimiento desde concentraciones a 0.8 M de NaCl, sensibilidad que se hizo más evidente con el aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  (Fig. 26 A, OshKT1;3+pDR-F1). Estos resultados mostraron que la expresión de OshKT1;3 en las levaduras generó una sensibilidad al  $\text{Na}^+$ . Con base en los resultados donde se mostró que en la mutante BY4741 $\Delta$ erv14, OshKT1;3 cambió su localización del Golgi al RE se cuestionó si este cambio generaría un efecto en la sensibilidad al  $\text{Na}^+$ . Para dar respuesta a este cuestionamiento, se estudió el efecto del NaCl sobre levaduras BY4741 $\Delta$ erv14 transformadas con OshKT1;3-GFP. Los resultados mostraron que éstas células mantuvieron los niveles de sensibilidad al  $\text{Na}^+$  muy parecidos a la mutante que se transformó con los plásmidos vacíos (Fig. 26 B pGRU1+pDR-F1). Sin embargo, cuando se co-expresaron juntos OshKT1;3 y OsCNIH1 se observó que la sensibilidad de éstas células al  $\text{Na}^+$  aumentó (Fig. 26 B OshKT1;3+OsCNIH1). Este resultado sugiere que OshKT1;3 cuando llega al Golgi por medio de OsCNIH1, logra generar una sensibilidad hacia el  $\text{Na}^+$ , efecto que podría sugerir que su actividad como transportador de  $\text{Na}^+$  puede alterar el balance iónico de este compartimiento y de ahí la respuesta fisiológica evidenciada por la sensibilidad a este catión. Para demostrar que este fenotipo sensible a  $\text{Na}^+$  está asociado también a Erv14p como receptor cargo de OshKT1;3, se procedió a restablecer la expresión de ERV14 en la mutante BY4741 $\Delta$ erv14, y como se puede apreciar en la figura 26 B (OshKT1;3+ERV14), la presencia de Erv14p generó un fenotipo sensible al  $\text{Na}^+$  como se observó inicialmente en la cepa BY4741 (Fig. 26 B OshKT1;3+ERV14).

Los resultados mostrados en esta tesis exponen que OshKT1;3 se expresa en el Golgi y es un transportador de  $\text{Na}^+$ . Demostramos que la interacción proteína-proteína de este transportador con el receptor cargo OsCNIH1 ocurre en el RE tanto en ovocitos de *Xenopus* como en las células vegetales. El receptor cargo OsCNIH1 se expresa en RE, ERES y el Golgi en las células vegetales y posee un movimiento dinámico en algunos de estos compartimientos. En células de levadura se demostró que OsCNIH1 es necesario para la expresión de OshKT1;3

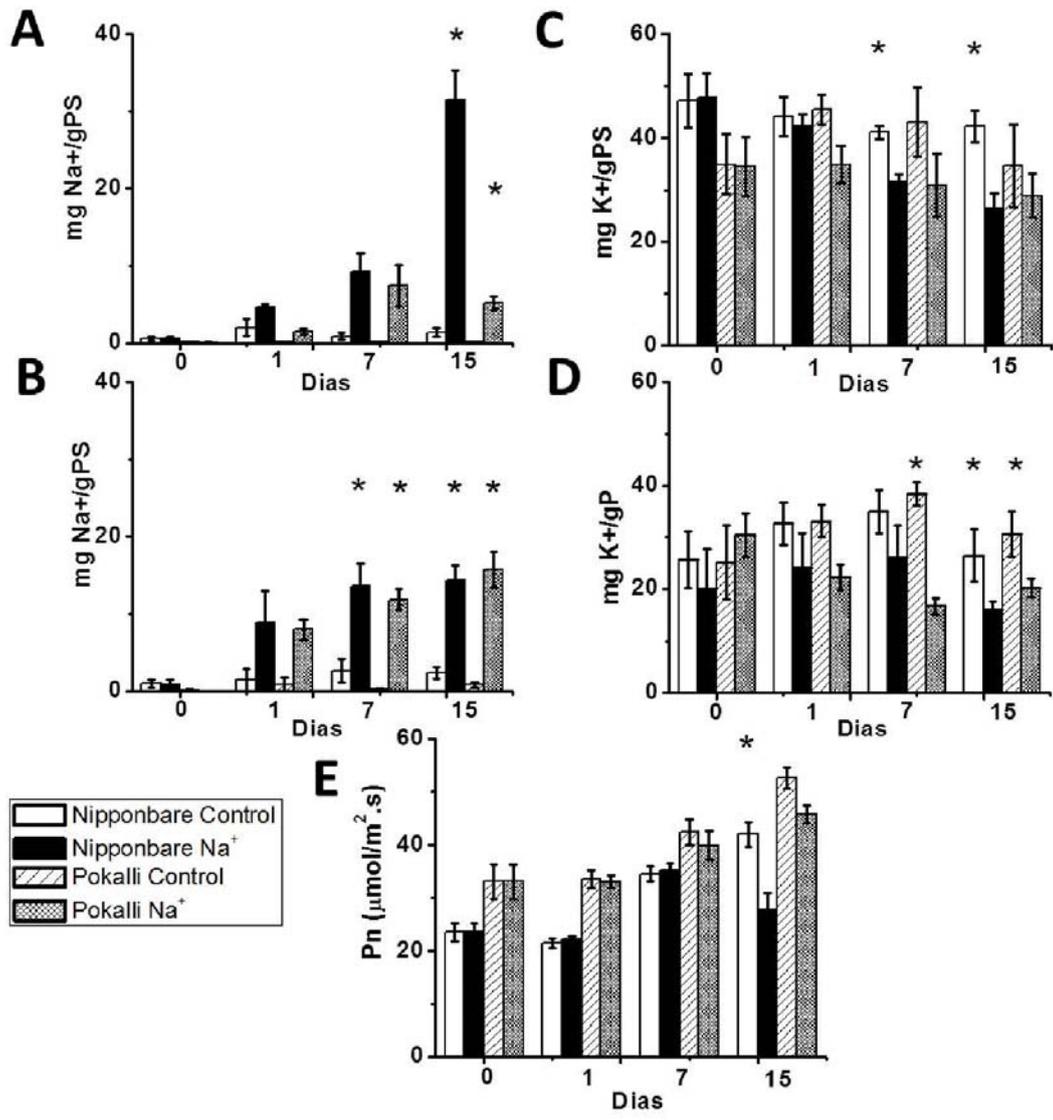


**Figura 26. La sensibilidad de la mutante BY4741 $\Delta$ erv14 al Na<sup>+</sup> se restablece por la co-expresión de *OsHKT1;3* y *OsCNIH1*. A** Ensayos de sensibilidad de crecimiento en la cepa BY4741 en medios solidos con diferentes concentraciones (M) de NaCl transformadas con los vectores vacíos (*pGRU1+pDR-F1*) o *OsHKT1;3* y el vector vacío *pDR-F1* (*OsHKT1;3+pDR-F1*). **B** Ensayos de sensibilidad de crecimiento en la cepa BY4741 $\Delta$ erv14 en medios de crecimiento con diferentes concentraciones de Na<sup>+</sup> (M) transformada con los vectores vacíos (*pGRU1+pDR-F1*); *OsHKT1;3* y *OsCNIH1* (*OsHKT1;3+OsCNIH1*); *OsHKT1;3* y el vector vacío *pDR-F1* (*OsHKT1;3+pDR-F1*); o *OsHKT1;3* y *ERV14* (*OsHKT1;3+ERV14*).

en el Golgi. Estos resultados en conjunto indican que *OsHKT1;3* es reconocido como un cargo del receptor de cargo *OsCNIH1* el cual es necesario para que este transportador de  $\text{Na}^+$  pueda residir en el Golgi.

### **La fotosíntesis de la planta de arroz cv. Nipponbare es afectada en presencia de 50 mM de NaCl**

Inicialmente, los estudios de la expresión génica se han hecho para entender como cierto gen puede contribuir a generar cierto fenotipo (Harrison et al., 2012; Malone et al. 2009; Pavey et al., 2010; Sudarsanam & Cohen, 2014). *OsHKT1;3* ha sido objeto de estos estudios para entender su contribución en la fisiología de la planta (Garcia de Blas et al., 2003; Jabnourne et al., 2009). Con la finalidad de analizar ampliamente la expresión génica de *OsHKT1;3*, se cuantificó mediante qRT-PCR. Como control del estrés generado por la salinidad, se midieron diferentes parámetros fisiológicos como el contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  así como los niveles de fotosíntesis. Se determinó el tiempo de exposición necesario para desencadenar una respuesta de estrés en el cv. (cultivar) Pokallí y el cv. Nipponbare que son tolerantes y sensibles a la salinidad, respectivamente. Se expusieron plantas de arroz de ambos cv. en paralelo durante 15 días a 50 mM de NaCl y se tomaron muestras de la raíz y de las hojas a los días 0, 1, 7 y 15 para cuantificar el contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . La concentración de 50 mM de NaCl, es la mínima reportada que desencadena una respuesta al estrés en el arroz (Endo et al., 2005). El contenido de  $\text{Na}^+$  en las hojas de ambos cultivares aumentó claramente al día 7 de exposición (Fig. 27 A, barras negras y entretrejadas), con respecto a la condición normal de crecimiento (Barras blancas y rayadas). Este valor se aumentó de manera significativa a los 15 días de exposición (Fig. 27 A), siendo el incremento de  $\text{Na}^+$  mucho mayor en la cv. Nipponbare (Fig. 27 A barras negras). En la raíz el contenido de  $\text{Na}^+$  se incrementó desde el primer día en ambos cv., pero de manera significativa a los 7 días (Fig. 27 B); ese aumento se sostuvo hasta los 15 días que duró el tratamiento (Fig. 27 B, barras negras y entretrejadas), en comparación con la condición control (Barras blancas y rayadas). También se observó que el contenido de  $\text{Na}^+$  en la raíz de ambos cultivares fue muy similar entre ellos (Fig. 27 B). El contenido de  $\text{K}^+$  en las hojas de cv.

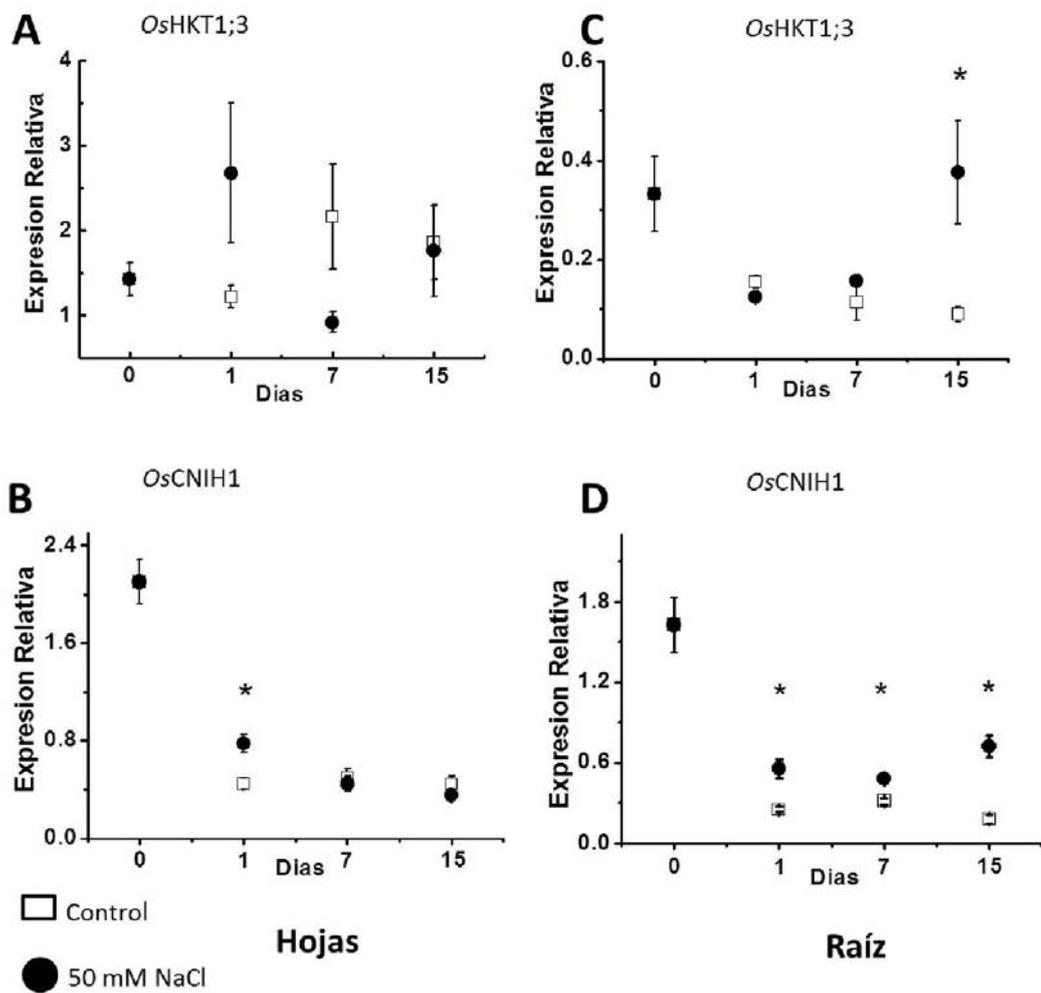


**Figura 27. Respuesta de plantas de arroz cv. Nipponbare y cv. Pokalli al tratamiento con 50 mM de NaCl.** Contenido de Na<sup>+</sup> de plantas de arroz de 15 días de edad en condiciones normales de crecimiento Nipponbare (barras blancas) y Pokalli (barras rayadas) y tratadas con 50 mM de NaCl a diferentes tiempos en Nipponbare (barras negras) y Pokalli (barras entretrejidas) en tejidos aéreos (A) y en la raíz (B). Contenido de K<sup>+</sup> en las hojas (C) y en la raíz (D) en condiciones normales de crecimiento en Nipponbare (barras blancas) y Pokalli (barras rayadas) y en tratamiento con 50 mM de NaCl en Nipponbare (barras negras) y Pokalli (barras entretrejidas). Actividad fotosintética (E) de plantas tratadas con 50 mM de NaCl (barras negras y entretrejidas) o crecidas en condiciones normales (barras blancas y rayadas). Los valores en A-E son el promedio de tres replicas biológicas ± DS para cada muestreo. Los valores estadísticos se obtuvieron de una prueba two-sample t-student. \* *p* > 0.05.

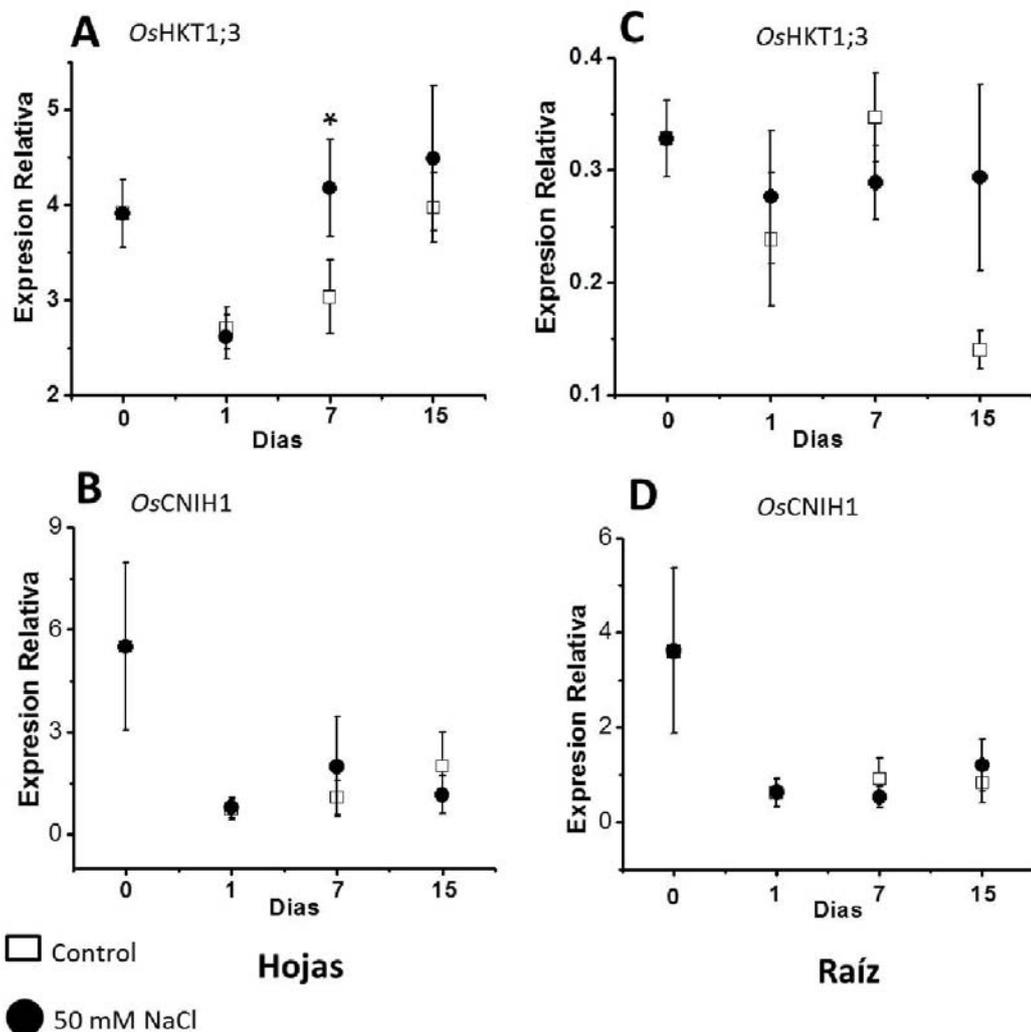
Nipponbare expuestas al estrés por sal (Fig. 27 C, Barras negras) disminuyó significativamente a los 7 y 15 días del tratamiento con respecto al control (Barras blancas). Para el caso del cv. Pokalli el contenido de  $K^+$  no disminuyó en las hojas durante los 15 días que duró el tratamiento con sal (Fig. 27 C comparar barras rayas con entretejidas). En la raíz, se notó que en el cv. Pokalli a los 7 días del tratamiento el contenido de  $K^+$  disminuyó significativamente (Fig. 27 D barras entretejidas). En ambos cultivares el estrés por  $Na^+$  durante 15 días indujo una disminución del contenido de  $K^+$  en la raíz de manera significativa (Fig. 27 D, Barras negras y entretejidas) con respecto a la condición control (Barras blancas y rayadas). Por otro lado, la cuantificación de la actividad fotosintética mostró que solo el cv. Nipponbare se afectó en este parámetro fisiológico y solo hasta los 15 días de exposición al  $Na^+$  (Fig. 27 E, Barras negras) comparado con la actividad de plantas en condiciones normales (Fig. 27 E, Barras blancas). Como se puede apreciar la actividad fotosintética de cv. Pokalli no es significativamente distinta en el tratamiento con sal (Fig. 27 E barras entretejidas) y la condición control (barras rayadas). Estos datos indicaron que la exposición a 50 mM de NaCl causó una acumulación de  $Na^+$  en la raíz de ambos cultivares generando que el contenido de  $K^+$  disminuyera en este órgano. Por otro lado al comparar el contenido de  $Na^+$  en las hojas de ambos cultivares se observó que este fue mayor en el cv. Nipponbare a los 15 días de tratamiento lo que generó un efecto negativo en la fotosíntesis, parámetro fisiológico que no se afectó en cv. Pokalli.

### **La expresión de los transcritos de *OsCNIH1* y *OshKT1;3* aumentó en las raíces del arroz cv. Nipponbare bajo tratamiento con sal**

El resultado de la inmunocitología demostró que la abundancia de la proteína de *OshKT1;3* disminuyó en respuesta al  $Na^+$  (Fig. 1), también fue importante determinar posibles cambios a nivel del transcrito ya que no siempre se tiene una correlación de ambos (Greenbaum et al., 2002; Washburn et al., 2003). Así mismo, se cuantificaron los posibles cambios en la expresión de *OsCNIH1* ante un estrés por sal mediante qRT-PCR. La expresión del transcrito tanto de *OshKT1;3* como de *OsCNIH1* se monitoreó a los días 0, 1, 7 y 15 con y sin tratamiento con 50 mM de NaCl en las hojas y en la raíz del cv. Nipponbare (Fig. 28) y cv. Pokalli



**Figura 28. Cuantificación del transcrito de *OsHKT1;3* y de *OsCNIH1* en plantas de arroz cv. Nipponbare expuestas a 50 mM de NaCl.** Cuantificación de la expresión génica de *OsHKT1;3* mediante qRT-PCR en las hojas (A) y en las raíces (C) de plantas de arroz cv. Nipponbare de 15 días de edad crecidas en condiciones normales (cuadros blancos) y en presencia de 50 mM de NaCl (círculos negros) durante 15 días. Cuantificación de la expresión del transcrito de *OsCNIH1* en hojas (B) y en raíces (D) de arroz en condiciones normales de crecimiento (cuadros blancos) y expuestas a 50 mM de NaCl (círculos negros). La expresión relativa de *OsHKT1;3* y *OsCNIH1* se normalizó con respecto a la media geométrica de la expresión relativa de tres genes control endógenos MXC9, COQ9 y SVP1 para cada muestra, tejido y condición. Los valores estadísticos se obtuvieron de una prueba two-sample t-student. \*  $p > 0.05$ .



**Figura 29. Cuantificación del transcrito de *OsHKT1;3* y de *OsCNIH1* en plantas de arroz cv. Pokalli expuestas a 50 mM de NaCl.** Cuantificación de la expresión génica de *OsHKT1;3* mediante qRT-PCR en las hojas (A) y en las raíces (C) de plantas de arroz cv. Pokalli de 15 días de edad crecidas en condiciones normales (cuadros blancos) y en presencia de 50 mM de NaCl (círculos negros) durante 15 días. Cuantificación de la expresión del transcrito de *OsCNIH1* en hojas (B) y en raíces (D) de arroz en condiciones normales de crecimiento (cuadros blancos) y expuestas a 50 mM de NaCl (círculos negros). La expresión relativa de *OsHKT1;3* y *OsCNIH1* fue normalizada con respecto a la media geométrica de la expresión relativa de tres genes control endógenos *MXC9*, *COQ9* y *SVP1* para cada muestra, tejido y condición. Los valores estadísticos se obtuvieron de una prueba two-sample t-student. \*  $p > 0.05$ .

(Fig. 29). La expresión del transcrito de *OsHKT1;3* en las hojas de ambos cultivares crecidos en condiciones normales (cuadros) o expuestas a un estrés por sal (círculos) mostró oscilaciones a lo largo del tiempo, observándose que a los 15 días no hubo una diferencia clara entre ambas condiciones (Fig. 28 y 29 A). En la raíz, la expresión de *OsHKT1;3* sólo mostró un aumento significativo a los 15 días de tratamiento con sal (Fig. 28 C, círculos) con respecto a las plantas control (Fig. 28 C, cuadros) en el cv. Nipponbare, ya que en cv. Pokalli el nivel del transcrito se mantuvo sin un aparente cambio (Fig. 29 C). Por otro lado, la expresión del transcrito de *OsCNIH1* en la hoja aumentó significativamente a partir del primer día de exposición a  $\text{Na}^+$  en cv. Nipponbare (Fig. 28 B círculos), no obstante, este incremento no se mantuvo, mostrando que la abundancia del transcrito fue igual al de las plantas control a los 7 y 15 días de tratamiento (Fig. 28 B cuadros). En el cv. Pokalli se observó que *OsCNIH1* se mantuvo sin cambios en su abundancia durante los 15 días del tratamiento (Fig. 29 B). En contraste, los niveles del transcrito de *OsCNIH1* en la raíz del cv. Nipponbare aumentaron significativamente desde el primer día de exposición al tratamiento con  $\text{Na}^+$  (Fig. 28 D, círculos), y se mantuvieron por arriba de los de las plantas control hasta los 15 días de tratamiento (Fig. 28 D, cuadros), situación que no se observó en el cv. Pokalli donde la expresión de *OsCNIH1* se mantuvo constante (Fig. 29 D).

## DISCUSION

Las proteínas encargadas del transporte en las células son proteínas transmembranales muy importantes en el movimiento de una gran variedad de iones y metabolitos. Gracias a ellas se establecen los gradientes o condiciones necesarias para mantener la identidad y el funcionamiento de los organelos subcelulares. Algunas son conocidas como transportadores activos, los cuales requieren del uso de energía ya sea directamente (como las bombas mediante la hidrólisis de ATP), o indirectamente (como la fuerza motora de  $\text{H}^+$  o de algún otro ion) para llevar a cabo el transporte de iones o solutos en contra de su gradiente electroquímico a través de las membranas biológicas. Por otro lado, el transporte pasivo permite el movimiento de los iones siguiendo su gradiente electroquímico

sin gasto alguno de energía, generando una velocidad de movimiento que es de 4 a 5 órdenes de magnitud mayor a la que se genera en el transporte activo. Debido a este último hecho, generalmente se les adjudica a este tipo de transportadores el mantenimiento del potencial en reposo de las membranas en las cuales se ubican.

En esta tesis se mostró utilizando diferentes metodologías que OshKT1;3 se expresa en el Aparato de Golgi y que transporta al ion  $\text{Na}^+$  con una selectividad alta sobre el resto de los cationes alcalinos. Además se demostró la interacción de éste transportador con el receptor putativo de proteínas cargo OsCNIH1, perteneciente a la familia del receptor Cornichon. En conjunto, estas evidencias sugieren que OsCNIH1 podría conducir a OshKT1;3 hacia la membrana del aparato de Golgi, donde este transportador puede participar en el establecimiento del potencial de membrana de éste compartimiento así como en la regulación del pH luminal que es importante en el tráfico vesicular y en la secreción de componentes hacia la pared celular entre otros varios procesos.

### **OshKT1;3 es un transportador/canal de $\text{Na}^+$**

La planta del arroz posee nueve genes que codifican para la familia de los transportadores HKT y algunos de ellos han sido caracterizados como transportadores de  $\text{Na}^+$  (Garcia de Blas et al., 2003; Horie et al., 2007; Jabnourne et al., 2009), simportadores  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  (Horie et al., 2001, 2007) o canales de Calcio (Lan et al., 2010). En este trabajo se ha demostrado que OshKT1;3 funciona como un transportador de  $\text{Na}^+$  en dos diferentes sistemas de expresión heterólogos, los ovocitos de *Xenopus* y en la levadura (Fig. 11, 12, 13 y 26). Los datos electrofisiológicos obtenidos del sistema de los ovocitos muestran una dependencia de las corrientes entrantes de  $\text{Na}^+$  y la alta selectividad hacia este catión en comparación al resto de los cationes alcalinos (Fig. 12); además, se observó un cambio positivo en el potencial de inversión conforme las concentraciones extracelulares de  $\text{Na}^+$  se incrementaron, dando un valor de 54.2 mV por cada diez veces el incremento de  $\text{Na}^+$  extracelular, lo cual confirma la selectividad de este transportador por  $\text{Na}^+$  (Fig. 13 D). La afinidad de OshKT1;3

hacia  $\text{Na}^+$  ( $K_m$ ) fue de 6.4 mM (Fig. 12 E) lo que lo clasifica como un mecanismo de baja afinidad. La constante de afinidad mostró una fuerte dependencia del voltaje en el rango entre -120 a -180 mV la cual disminuyó a potenciales de membrana más negativos, una observación que indica una mayor afinidad de esta proteína por el  $\text{Na}^+$ . Este análisis permitió identificar un solo sitio de unión al  $\text{Na}^+$  localizado a 65% dentro del campo eléctrico de la membrana (Fig.12F). Todas estas observaciones, junto con las obtenidas sobre la susceptibilidad de la cepa BY4741 de la levadura transformada con *OsHKT1;3* al  $\text{Na}^+$  (Fig. 26), confirman la selectividad de este transportador por este catión. En conjunto, estos datos claramente demuestran que *OsHKT1;3* funciona como un transportador selectivo a  $\text{Na}^+$ , como se reportó (Jabnoue et al., 2009), y confirma la visión sobre los miembros de la subfamilia 1 de las proteínas HKT como transportadores de  $\text{Na}^+$  (Rosas-Santiago, 2008; Platten et al., 2006).

De los transportadores HKT, se ha observado que en los miembros pertenecientes a la subfamilia 1, la presencia de una Serina en la primera asa formadora del  $P_A$ , sugiere que la mayoría de estas proteínas funcionan principalmente como transportadores de  $\text{Na}^+$ , mientras que los integrantes de la subfamilia 2 poseen un residuo de Glicina en esta misma asa y funcionan como co-transportadores  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  (Mäser et al., 2002; Platten et al., 2006). Sin embargo, la mutación S94G localizada en  $P_A$  y propuesta como importante en la selectividad  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  no modificó la selectividad a  $\text{Na}^+$  en *OsHKT1;3* (Fig. 15). Estos resultados indican que la selectividad de esta familia de transportadores no depende exclusivamente de la presencia de una Ser o Gly en el asa formadora del poro como se ha reportado para *AtHKT1;1* (Mäser et al., 2002). Esta conclusión se ve reforzada por los resultados reportados para los transportadores HKT del Eucalipto quienes pertenecen a la subfamilia 1 y poseen la Serina en el  $P_A$ , sin embargo funcionan como co-transportadores  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  (Liu et al., 2001). Estos datos muestran que es probable que la selectividad a  $\text{Na}^+$  resida en otros aminoácidos y/o no se pueda aplicar este criterio para todos los miembros de la familia de los HKT.

### **OsHKT1;3 se localiza en el Aparato de Golgi**

Para entender el posible papel funcional de OsHKT1;3 uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar en qué membrana se localiza OsHKT1;3. La expresión subcelular de OsHKT1;3 mediante su fusión a la EYFP y su expresión transitoria en células de tabaco mostró que éste se localiza intracelularmente en forma punteada (Fig. 7 y 10), que junto con su colocalización con el marcador del aparato de Golgi, *GmMan1* (Fig. 8 A and D Izq.) y la confirmación de ésta por el análisis de imágenes cuantitativo (Costes et al., 2004; PC de 0.62) (Fig. 8 A y D) indicó claramente que OsHKT1;3 se localiza en el Golgi. Esta conclusión se refuerza por el cambio en la distribución de OsHKT1;3 causado por la brefeldina A, la cual causó su acumulación en partículas intracelulares de mayor tamaño (Fig. 9 B). Se ha reportado que la brefeldina A inhibe la activación de la GTPasa pequeña Arf1 tanto en células animales (Chardin & McCormick, 1999) como en células vegetales (Ritzenthaler et al., 2002). Los efectos de esta toxina son la interrupción del transporte vesicular que sucede en el Golgi, lo cual genera una pérdida de la identidad de las distintas cisternas y de la fusión de algunas al retículo endoplásmico (Ritzenthaler et al., 2002). En proteínas residentes del Golgi fusionadas a la GFP se ha observado que la exposición de células vegetales a BFA revela la agregación de cúmulos de cuerpos fluorescentes (Ritzenthaler et al., 2002). En acuerdo a estas observaciones, en las células de levaduras, la localización OsHKT1;3 se observó dentro de la célula, en forma punteada (Fig. 25 A), confirmando que en ambos organismos la localización de este transportador de  $\text{Na}^+$  ocurre en el aparato de Golgi. Otra característica que distingue este organelo es su alta motilidad (Boevink et al., 1998; Brandizzi et al., 2002) como se pudo observar en el presente trabajo (Fig. 10). Las velocidades de movimiento que se calcularon fueron muy similares a las reportadas en la literatura (Nebenführ et al., 1999; Runions et al., 2006) sugiriendo que OsHKT1;3 está en el Golgi. En la literatura existen reportes que muestran que los miembros pertenecientes a una misma familia residen en distintos compartimientos como es el caso de los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHX5 y NHX6 que se reportaron en el Golgi (Bassil et al., 2011) sin embargo, otros miembros de esta familia se han localizado en la

membrana plasmática (Shi et al., 2000) así como en endomembranas y la vacuola (Apse et al., 1999; Pardo et al., 2006; Apse & Blumwald, 2007; Hamaji et al., 2009). En plantas la familia de los transportadores de fosfatos se han localizado en la membrana plasmática y en las membranas internas de la mitocondria y los plástidos (Knappe et al., 2003; Rausch & Bucher, 2002) así como en el Golgi se identificó al transportador de fosfatos PHT4;6 (Cubero et al., 2009) y las proteínas de endomembranas de *Arabidopsis* localizados en el aparato de Golgi (Gao et al., 2012), además de observarse en otras endomembranas (Aguilar et al., 2010) apoyando nuestra conclusión sobre la localización de *OsHKT1;3* en el Golgi (Fig. 8, 9 y 10).

Por otro lado, la clara separación de las señales correspondientes a *OsHKT1;3* y *AtSec24* indica que estas dos proteínas se encuentran en compartimientos separados. Se ha demostrado que *AtSec24* está presente en un compartimiento específico entre el retículo endoplásmico y el cis Golgi (Langhans et al., 2012) y que está asociado a las estructuras de ERES/COPII. Es notorio que otros transportadores de la familia HKT han sido localizados en la membrana plasmática (Horie et al., 2007, 2011), siendo el presente trabajo el primer reporte sobre la localización de un miembro de esta familia en la membrana de un organelo subcelular (Fig. 8 A y C). Al ser éste un transportador de alta selectividad a  $\text{Na}^+$  (Fig. 11, 12 y 13), se genera la pregunta sobre su función en el aparato de Golgi.

### **Posible papel de *OsHKT1;3* en la conductancia de corto circuito en el aparato de Golgi**

El aparato de Golgi, como parte del sistema de endomembranas posee una V-ATPasa (Dettmer et al., 2005; Strompen et al., 2005) y una  $\text{H}^+$ -PPasa tipo II (AVP2; (Mitsuda et al., 2001)) como mecanismos responsables de la energización de su membrana, generando la fuerza motora de protones (FMP), así como para el establecimiento y mantenimiento del pH ácido del lado del lumen, requerido para el funcionamiento del sistema secretor y la activación de transportadores iónicos localizados en el Golgi. Para mantener la actividad de las bombas de  $\text{H}^+$  se requiere la presencia de una conductancia de corto circuito (shunt conductance)

necesaria para disipar el potencial de membrana. Esta función se ha atribuido a los canales aniónicos de la familia CLC, que en Arabidopsis, se ha asociado al canal *AtCLC-d* (von der Fecht-Bartenbach et al., 2007). Sin embargo, la mutación del gen *AtCLC-d* no causa un fenotipo claro ni afecta el contenido de cloro o nitrato de las plantas (von der Fecht-Bartenbach et al., 2007), por lo que se sugiere la posible existencia de un mecanismo alternativo responsable de la conductancia de corto circuito.

Una alternativa a la conductancia de corto circuito diferente a la propuesta para los canales CLC, pueden ser canales de cationes que permitan el movimiento de cargas positivas hacia el citoplasma, y por lo tanto, ayuden a reducir el potencial de membrana establecido por las bombas de protones. El potasio es el principal catión en las células vegetales, alcanzando concentraciones citoplásmicas alrededor de 100-150 mM. En la vacuola esta concentración depende directamente de la disponibilidad del  $K^+$ , con valores  $\leq 5$  mM bajo condiciones normales de  $K^+$  extracelular bajo ( $K_{ext} < 1$  mM), o tan altos como 100 mM a concentraciones mayores de  $K_{ext}$  (100-150 mM; Walker et al., 1996)). Asumiendo una condición similar para el Golgi en condiciones de alto y bajo  $K_{ext}$ , el movimiento de  $K^+$  del lumen del Golgi hacia el citoplasma debe de ser activo, descartando la posibilidad de que una corriente rectificante entrante de  $K^+$  pudiera estar actuando como una conductancia de corto circuito para regular las bombas de  $H^+$ .

Recientemente, en Arabidopsis se ha reportado la localización de los intercambiadores  $Na^+/H^+$ , *AtNHX5* y *AtNHX6* en la membrana del Golgi (Bassil et al., 2011). Por otro lado, se ha reportado que estos dos transportadores funcionan como intercambiadores de  $Na^+/H^+$  (Yokoi et al., 2002). Estas dos observaciones en conjunto abren la posibilidad de que la concentración de  $Na^+$  en el interior del Golgi pudiera alcanzar niveles similares a aquellos reportados para la vacuola, las cuales podrían ser de cuatro a diez veces más altas a las reportadas para el citoplasma en donde se han asumido ser  $\leq 10$  mM (Barkla et al., 1990). Bajo estas condiciones, la presencia de un transportador de baja afinidad y selectivo a  $Na^+$

como lo es OsHKT1;3 en la membrana del Golgi pudiera llevar a cabo el transporte de Na<sup>+</sup> del Golgi al citoplasma, ya que según cálculos hechos con la ecuación de Nernst este transporte no requiere de energía. De manera hipotética podríamos asumir que 50 mM de NaCl en el lumen del Golgi y 10 mM de Na<sup>+</sup> en el citoplasma, se obtiene un potencial de equilibrio para el Na<sup>+</sup> de:

$$E_{Na^+} = 60 \text{ mV} \cdot \log_{10} \left[ \frac{50 \text{ mM}}{10 \text{ mM}} \right] = 41.93 \text{ mV}$$

Es decir, que se requiere de un potencial de membrana de +41.93 mV para que haya un flujo neto igual a cero del Na<sup>+</sup> entre el citoplasma y el lumen del Golgi y que es necesario un potencial de membrana en el aparato de Golgi por arriba del E<sub>Na+</sub> teórico calculado para generar la salida del Na<sup>+</sup> hacia el citoplasma. En la célula vegetal, hasta donde se conoce no se ha podido medir el potencial de la membrana del Golgi directamente, sin embargo, se podría asumir que debido al bombeo activo de H<sup>+</sup> al lumen del Golgi (Dettmer et al., 2005; Strompen et al., 2005; Mitsuda et al., 2001) el potencial de membrana de este compartimiento sería positivo como se ha visto que sucede en el tonoplasto (Pantoja et al 1989; Sze et al., 1999), y que este valor del potencial podría ser hasta de +50 mV (Sze, 1985). Estos valores de suceder en el aparato de Golgi, apoyarían la idea de que a través de OsHKT1;3 se favorece la salida de Na<sup>+</sup> del lumen del Golgi hacia el citoplasma, de tal manera que podría estar generando una conductancia de corto circuito en este organelo. Un mecanismo similar se ha propuesto para la acidificación del lumen del lisosoma en macrófagos a través de la actividad de una “conductancia” selectiva a cationes (Steinberg et al., 2010), en donde la mutación de los transportadores CLC no modificó la acidificación del lisosoma causada por la V-ATPasa. Recientemente, esta hipótesis fue comprobada al demostrar que el canal TPC (Two-Pore Channel), localizado en la membrana del lisosoma, funciona como un canal rectificador entrante de Na<sup>+</sup> (Wang et al., 2012).

En las células del arroz, la actividad concertada de las bombas de H<sup>+</sup>, los intercambiadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y el transportador OsHKT1;3 podría ser la responsable de la regulación del pH luminal del Golgi, necesaria para mantener el

complejo transporte de carbohidratos requeridos para construir la pared celular de las plantas, la secreción de proteínas y lípidos, así como la glicosilación de estos últimos.

### **En la planta de arroz *OsHKT1;3* no participa en la tolerancia a la salinidad como lo demás miembros de la subfamilia 1**

Los resultados aquí mostrados nos han revelado que *OsHKT1;3* está en el Golgi (Fig. 7-9) donde suponemos este generando la corriente de corto circuito para regular la acidificación de este compartimiento, propuesta que contrasta con la participación en mecanismos de tolerancia a la salinidad descritos para algunos transportadores de la subfamilia 1 de los HKT (Benderradji et al., 2011; Byrt et al., 2007; Davenport et al., 2007; Qiu et al., 2011; Ren et al., 2005; Schroeder et al., 2013). Por ahora no se cuenta con la evidencia suficiente para probar el planteamiento sobre la generación de la conductancia de corto circuito a través de *OsHKT1;3* en el Golgi en las plantas del arroz, pero sí podemos descartar la participación de *OsHKT1;3* en la tolerancia a la salinidad. Para ello la expresión génica de *OsHKT1;3* se monitoreó en plantas tolerantes y sensibles a la salinidad de arroz que acumularon  $\text{Na}^+$  o disminuyeron el  $\text{K}^+$  de manera más evidente para el cv. Nipponbare en las hojas lo cual provocó que este cultivar disminuyera su actividad fotosintética a los 15 días de iniciado el estrés; este fenómeno no fue el mismo en el cv. Pokalli, un cultivar resistente a la salinidad (Fig. 27). En la raíz, ambos cultivares acumularon  $\text{Na}^+$  de forma similar, lo cual generó también una disminución en el contenido de  $\text{K}^+$  (Fig. 27). Estos resultados muestran que la tolerancia a la salinidad en la planta de arroz depende grandemente de evitar la llegada del ion  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, función que el cv. tolerante Pokalli parece realizar con mayor eficiencia. Es interesante señalar que la expresión del transportador de  $\text{Na}^+$  *OsHKT1;5* en los haces vasculares del xilema de la raíz del cultivar tolerante Nona Bokra se incrementó a las 24 h a 140 mM de NaCl, apoyando la función de la remoción del  $\text{Na}^+$  de este tejido para así disminuir la acumulación del catión en las hojas (Ren et al., 2005). La localización y expresión de *OsHKT1;3* también se observó en los haces vasculares del xilema de la raíz (Fig. 1; (Jabnoue et al., 2009). Sin embargo su abundancia a las 24 h de estrés a

50 mM, no se incrementó en ninguno de los cultivares (Fig. 28 C y 29 C), no obstante los niveles de *OshKT1;3* sí se incrementaron de manera significativa solo en el cv. sensible Nipponbare hasta los 15 días del tratamiento (Fig. 28 C Círculos) en donde se cuantificó el contenido de  $\text{Na}^+$  más alto en las hojas (27 A barras negras). Estos resultados muestran que *OshKT1;3* no participa en la remoción del  $\text{Na}^+$  del Xilema durante un estrés por sal, actividad que se ha demostrado para *OshKT1;5* en el arroz, *AtHKT1;1* en Arabidopsis y *TmHKT1;5* en trigo (Benderradji et al., 2011; Byrt et al., 2007; Davenport et al., 2007; Ren et al., 2005).

En la hoja por otro lado, se ha observado que las plantas de arroz tolerantes a la salinidad del cv. Pokalli acumulan  $\text{Na}^+$  en la cobertura de la hoja, previniendo así que, el catión llegue a la lámina de la hoja donde puede interferir con la actividad fotosintética de la planta (Cotsaftis et al., 2012). Se ha descrito que *OshKT1;4* participa en lograr esta función, ya que durante un estrés por sal durante 9 días a 70 mM de NaCl los niveles de *OshKT1;4* se incrementaron en el cv. Pokalli, no así en el cv. sensible Nipponbare (Cotsaftis et al., 2012). Este mismo papel fisiológico se les ha asignado también a los transportadores HKT de cebada (Qiu et al., 2011) y trigo (Huang et al., 2006; James et al., 2011). Los resultados de la expresión de *OshKT1;3* en las hojas mostraron que en general la abundancia del transcrito fue muy similar en ambos cultivares (Fig. 28 A y 29 A), mostrando un incremento significativo en el cv. Pokalli a los siete días del estrés por  $\text{Na}^+$  (Fig. 29 A Círculos negros), sin embargo, se apreció que el contenido de  $\text{Na}^+$  a los siete días en las hojas de ambos cultivares fue similar (Fig. 27 barras negras y entretejidas). No obstante a los 15 días del tratamiento se pudo cuantificar que la abundancia de *OshKT1;3* se mantuvo de manera similar en ambos cultivares con respecto a la condición control (Fig. 28 A y 29 A), además se observó que hubo un incremento significativo en el contenido de  $\text{Na}^+$  en ambos cultivares (Fig. 27 A barras negras y entretejidas) con respecto a su condición control. Estos resultados muestran que *OshKT1;3* no contribuye en la acumulación del  $\text{Na}^+$  en la cobertura de la hoja y con ello no participa en la tolerancia a la salinidad como lo hace *OshKT1;4*, *HvHKT1;1*, *HvHKT2;1* y *TmHKT1;4* (Cotsaftis et al., 2012; S. Huang et al., 2006; James et al., 2011).

El análisis de estos resultados muestran que OsHKT1;3 no se requiere para la tolerancia a la salinidad. Estudios con mutantes en OsHKT1;3 en plantas de arroz reforzaran estas conjeturas.

### **OsHKT1;3 interactúa con el receptor putativo de cargo OsCNIH1**

Los estudios hasta ahora realizados sobre la familia de los HKT no han revelado si estos pueden ser regulados por otras proteínas o factores citoplasmáticos como pH o  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ , como ocurre con otros transportadores iónicos (Chinnusamy et al., 2004; Held et al., 2011; Leyman et al., 1999; Shi et al., 2000; Xicluna et al., 2007; Zimmermann et al., 200; Pittman et al., 2005; Pantoja & Smith, 2002), por eso fue importante estudiar estas posibilidades de regulación sobre OsHKT1;3. La magnitud de la corriente generada por la expresión del transportador de  $\text{Na}^+$  en los ovocitos de *Xenopus* no se vio afectada por el cambio el  $\text{pH}_{\text{ext}}$  o  $\text{pH}_{\text{int}}$  (Fig. 15 A y B). Por otro lado el efecto negativo de la estaurosporina (Fig. 15 C), un inhibidor de cinasas de proteínas general, supuso que la actividad de transporte de OsHKT1;3 se regula por eventos de fosforilación, como se ha visto que sucede en otras proteínas de transporte iónico (Amezcuá-Romero et al., 2010; Batistic et al., 2004; Luan, 2008; Törnroth-Horsefield et al., 2006; Whiteman et al., 2008) y que en plantas se ha registrado que este fenómeno ocurre por el complejo CIPK-CBL (Cheong et al., 2007; Held et al., 2011; Kim et al., 2007; Lan et al., 2011; Lee et al., 2007; Li et al., 2014; Li et al., 2006; Maierhofer et al., 2014; Quan et al., 2007; Xu et al., 2006). La falta de asociación entre OsHKT1;3 con algunas CIPK de arroz (Fig. 16) reveló que es probable que la fosforilación ocurra por otras cinasas de proteínas presentes en plantas (Hardie, 1999) como se ha observado que sucede para los canales KAT1 y SLAC1 que son fosforilados por una cinasa tipo SnRK2 (SNF1-Related protein Kinase 2; Sato et al., 2009; Lee et al., 2009).

Por otro lado al realizar un análisis masivo de interacción proteína-proteína empleando la técnica del mbSUS y el interactoma de *Arabidopsis* (Chen et al., 2012; Jones et al., 2014; Lalonde et al., 2010), se identificó la interacción de tres transportadores HKT del arroz (OsHKT1;1, OsHKT1;3 and OsHKT2;1) con 151 proteínas de membrana de *Arabidopsis* (Anexo 2) de entre las cuales, 19

interactuaron con los tres OsHKT. Dentro de estas se identificó y seleccionó a la proteína homóloga de *Drosophila* y humano, el Cornichon (CNIH; Bökel et al., 2006; Schwenk et al., 2009) y Erv14p de levaduras (Powers & Barlowe, 1998, 2002) para caracterizar posibles modificaciones en la función de OsHKT1;3. La confirmación de la interacción homóloga entre OsHKT1;3 y OsCNIH1 se obtuvo empleando la técnica del mbSUS en donde las células diploides crecieron en medios selectivos (IS-0 e IS-500) así como por la señal positiva causada por la activación del reportero LacZ (Fig. 22). Datos adicionales que apoyan a esta interacción se obtuvieron mediante la reconstitución de la fluorescencia de la EYFP (Fig. 21 A y E), además de la identificación de la co-localización intracelular de ambas proteínas expresadas en hojas de tabaco, en donde OsHKT1;3 se observó como pequeños puntos superpuestos sobre la estructura reticulada resaltada por la expresión de OsCNIH1 (Fig. 22 A). En conjunto, estos resultados indican que ambas proteínas se asocian en el RE. Sin embargo, se sabe que el Golgi y el RE en plantas están muy cercanos (Sparkes et al., 2009), lo cual hace difícil identificar el sitio donde sucede la co-localización entre OsHKT1;3 y OsCNIH1. Resulto interesante observar la señal de la fluorescencia de OsHKT1;3-EGFP en los ovocitos de *Xenopus* en un compartimiento intracelular cuando se co-expresó junto con OsCNIH1, el cual asemeja el retículo endoplásmico (Terasaki et al., 2001), como lo indica la fluorescencia reticulada observada en las células (Fig. 24 A). Este resultado, además de confirmar la interacción entre OsHKT1;3 y OsCNIH1, indica que su asociación previene la expresión del transportador en la membrana plasmática, como lo indica la ausencia de corrientes entrantes en ovocitos co-expresando ambas proteínas y perfundidos con las mismas soluciones de Na<sup>+</sup> (Fig. 24 B). Este dato contrasta con los resultados obtenidos cuando OsHKT1;3 se expresó de manera individual en los ovocitos, lo cual condujo a la activación de corrientes entrantes de sodio y a la expresión de la proteína en la membrana plasmática de la célula (Fig. 11, 12, y 24 B). Es probable que la liberación de OsHKT1;3 del RE hacia el Golgi, y eventualmente hacia la membrana plasmática de los ovocitos, no ocurra como consecuencia de la ausencia de proteínas adicionales requeridas para el transporte de proteínas de

membrana a su residencia final, ya que este proceso parece depender de una estequiometría adecuada de las subunidades que estructuran estos compartimientos (vesículas tipo COPII) en donde las proteínas de membrana viajan a su membrana destino (Hanton et al., 2007). En vista de todos estos resultados, se propone que OsCNIH1 podría funcionar como un receptor de proteínas cargo, entre ellas OsHKT1;3 en el arroz. Esta propuesta se basa en observaciones reportadas para otros sistemas, como por ejemplo en la levadura, donde Axl2p, una proteína transmembranal requerida para el establecimiento del crecimiento axial, o la golgina Rud3p dependen de Erv14p para alcanzar su membrana de residencia (Gillingham et al., 2004; Powers & Barlowe, 1998, 2002). Por otro lado, el factor de crecimiento Gurken en *Drosophila* (Bökel et al., 2006) y el receptor de glutamato GluRAo en mamíferos (Harmel et al., 2012; Herring et al., 2013; Schwenk et al., 2009), se ha reportado que dependen de los homólogos del Cornichon para expresarse correctamente en sus organelos de residencia. En base a estas evidencias, se propone que OsCNIH1 puede servir como un receptor de proteínas cargo para OsHKT1;3 en el arroz. Esta propuesta se ve apoyada por los resultados de la expresión heteróloga de OsHKT1;3 en levaduras. Con el uso de este sistema se pudo confirmar que la correcta expresión de OsHKT1;3-GFP en el Golgi en la cepa BY4741 $\Delta$ erv14 se restableció por la co-expresión de OsCNIH1 o Erv14p (Fig. 25 C-D).

### **Cornichon un receptor cargo presente en células eucariotas**

La proteína denominada Cornichon, es un miembro de una familia de proteínas presentes en células eucariotas que muestran entre 30-40% de identidad, posee tres dominios transmembranales (TMD), y de acuerdo a la abundancia de cargas positivas de los aminoácidos en el citoplasma de las proteínas integrales de membrana (Heijne, 1992), se infiere que las terminales amino y carboxilo deben estar orientadas hacia el citoplasma y el lumen del RE/Golgi, respectivamente (Fig. 21).

OsCNIH1 del arroz conserva tres de los cinco aminoácidos (I96, F97 and L100) en el asa citoplásmica entre los dominios transmembranal dos y tres, el cual se ha

demostrado afecta la unión de su homólogo Erv14p con las vesículas COPII (Powers & Barlowe, 2002), indicando que en plantas, el transporte de las proteínas de membrana en la vía de secreción COPII podría también estar asociado a OsCNIH1. Esta conclusión se basa en la co-localización de OsCNIH1 y el marcador para COPII AtSec24 en hojas de tabaco (Fig. 24). La expresión de OsHKT1;3 en el aparato de Golgi debido a la asociación con OsCNIH1 es similar a la localización de la golgina Rud3p en este organelo en las levaduras, donde se demostró su asociación con el homólogo Erv14p, en combinación con la proteína de unión a GTP Arf1 (Gillingham, Hin, et al., 2004). Resultados recientes han demostrado el papel central de Erv14p como receptor cargo de un gran número de proteínas de membrana como la flipasa Dnf1-2p, los transportadores de hexosas Hxt3-5p, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Nha1p, entre otros (Herzig et al., 2012). Estas observaciones apoyan la propuesta del papel de OsCNIH1 como un receptor cargo para proteínas de membrana en plantas. En vista de estas evidencias, se analizó el interactoma de Arabidopsis (Chen et al., 2012; Lalonde et al., 2010) y se encontró que AtCNIH1 (At3g12180), uno de los cinco homólogos presentes en esta planta, interactúa con 535 proteínas (Anexo 3), de las cuales 30% de ellas corresponden a transportadores, reforzando la propuesta del papel de CNIH como un receptor de proteínas de membrana en plantas.

### **OsCNIH1 podría regular la localización y la actividad de transporte de OsHKT1;3 en la planta de arroz**

Para identificar la regulación de la localización subcelular y la actividad del transportador OsHKT1;3 en la planta de arroz por medio de OsCNIH1 requiere de experimentos donde sería adecuado emplear mutantes de ambos genes. No obstante, el estudio de la expresión génica de *OsCNIH1* podría ayudar a entender esta cuestión. El análisis de los niveles de *OsCNIH1* en ambos cultivares Nipponbare y Pokalli, demostraron que en las hojas *OsCNIH1* se mantuvo constante (Fig. 28 B y 29 B), exceptuando que en cv. Nipponbare al día 1 se observó un incremento significativo durante el estrés por sal (Fig. 28 B, Círculos). En la raíz se apreció que la expresión de *OsCNIH1* (Fig. 28 D y 29 D) se

incrementó significativamente desde el día uno y se mantuvo constante hasta los 15 días bajo estrés salino solo en el cv. Nipponbare (Fig. 28 D Círculos).

Los datos en conjunto sugieren que *OsCNIH1* interactúa con *OsHKT1;3* (Fig. 20 y 21) y que esta interacción en el RE (Fig. 21 A y E; 22 A; 24 A) permite que *OsHKT1;3* se establezca en la membrana del Golgi (Fig. 25; 8 A; 9) que en el caso de las células de las levaduras evoca un respuesta de sensibilidad al  $\text{Na}^+$  posiblemente por su sobreexpresión en este compartimiento lo que origina un desajuste en la homeostasis iónica del aparato de Golgi (Fig. 25 y 26). Resultó interesante observar que en el cultivar sensible a la salinidad Nipponbare a los 15 días del estrés por  $\text{Na}^+$  mostró una disminución significativa en la actividad fotosintética (Fig. 27 E barras negras), originada probablemente por la acumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea (Fig. 27 A barras negras), así como la pérdida de  $\text{K}^+$  (Fig. 27 C barras negras). Es probable que el incremento en la expresión de *OsCNIH1* y *OsHKT1;3* en la raíz de cv. Nipponbare ayude a que aumente la abundancia de *OsHKT1;3* en la membrana del Golgi del arroz y este fenómeno contribuya al desajuste de la homeostasis iónica de este compartimiento, lo cual puede apreciarse en el fenotipo de sensibilidad observado en el cv. Nipponbare (Fig. 27) y que también ocurre en las células de levadura (Fig. 25 y 26). Este resultado es similar al reportado para *Erv14p*, el homólogo de *OsCNIH1*, en la localización de la golgina *Rud3p* en el Golgi en las levaduras, (Gillingham et al., 2004), y para que la proteína de membrana *Axl2p* llegue a la membrana plasmática y se pueda producir un patrón de gemación axial correcto (Powers & Barlowe, 1998), además de los resultados recientes sobre el papel central de *Erv14p* como receptor cargo de un gran número de proteínas de membrana (Herzig et al., 2012). Por otro lado en *C. elegans* se observó que *Cornichon* es necesario para controlar la exportación de los AMPAr del RE y con ello regular la excitabilidad sináptica de este organismo (Brockie et al., 2013).

## CONCLUSIONES

En esta tesis se ha presentado evidencia que indica la localización del transportador de  $\text{Na}^+$  *OsHKT1;3* en el aparato de Golgi en células vegetales y de levadura y en donde pudiera estar funcionando como la conductancia de corto circuito requerida para mantener el pH luminal vía su coordinación con la actividad de la V-ATPasa y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . La actividad de *OsHKT1;3* puede regularse por fosforilación y es independiente de cambios en el pH citosólico y luminal. No obstante, es probable que mecanismos de regulación adicional puedan estar actuando sobre *OsHKT1;3*.

Mediante un estudio de interacción masivo se detectó la interacción directa proteína-proteína entre *OsHKT1;3* y *OsCNIH1*. En células de tabaco se observó la expresión de *OsCNIH1* en el retículo endoplásmico, los ERES y el aparato de Golgi. La complementación de la fluorescencia demostró que *OsHKT1;3* interactúa con *OsCNIH1* en el retículo endoplásmico. Usando a las levaduras como sistema de expresión heterólogo, se demostró que la localización de *OsHKT1;3* en el Golgi depende de la presencia de *Erv14p*, el homólogo de Cornichon en levaduras. Empleando este mismo sistema, se comprobó que la localización de *OsHKT1;3* en la mutante *erv14* se restableció en el Golgi por la presencia de *OsCNIH1*.

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que *OsCNIH1* es un receptor de carga que interactúa y reconoce como proteína carga a *OsHKT1;3* en el retículo endoplásmico y que ambos son transportados desde este organelo por la vía COPII hasta el aparato de Golgi.

## PERSPECTIVAS

1. Demostrar el papel fisiológico de *OsHKT1;3* en la planta de arroz.
2. Mediante mutantes en *OsHKT1;3* generar datos que demuestren la relevancia biológica de este gen en el aparato de Golgi.
3. Determinar si el transporte vesicular se ve afectado en estas mutantes.

4. Medir la actividad iónica de OsHKT1;3 en el aparato de Golgi en células vegetales.
5. Demostrar que en células vegetales la presencia de OsHKT1;3 es necesaria para la conductancia de corto circuito en el aparato de Golgi.
6. Determinar que OsCNIH1 es parte del complejo COPII.
7. Demostrar que OsCNIH1 es un receptor cargo de proteínas de membrana en células vegetales.
8. Determinar que OsCNIH1 permite la localización de OsHKT1;3 en el aparato de Golgi en células de la planta de arroz.
9. Demostrar en la planta de arroz que la interacción entre OsCNIH1 y OsHKT1;3 es necesaria para la función del transportador de Na<sup>+</sup> en el aparato de Golgi.

## REFERENCIAS

- Adams, P., Nelson, D. E., Yamada, S., Chmara, W., Jensen, R. G., Bohnert, H., & Griffiths, H. (1998). Tansley Review No . 97 Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* ( Aizoaceae ). *New Phytologist*, 138(97), 171–190.
- Aguilar, P.S. et al. (2010). A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 901–908.
- Amezcuca-Romero, J. C., Pantoja, O., & Vera-Estrella, R. (2010). Ser<sup>123</sup> is essential for the water channel activity of *McPIP2;1* from *Mesembryanthemum crystallinum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16739–47.
- Amtmann, A, Fischer, M., Marsh, E. L., Stefanovic, a, Sanders, D., & Schachtman, D. P. (2001). The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology*, 126(3), 1061–71.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256–1258.
- Apse, M.P., and Blumwald, E. (2007). Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Lett.* 581: 2247–2254.
- Ardie, S. W., Xie, L., Takahashi, R., Liu, S., & Takano, T. (2009). Cloning of a high-affinity K<sup>+</sup> transporter gene *PutHKT2;1* from *Puccinellia tenuiflora* and its

- functional comparison with OsHKT2;1 from rice in yeast and Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 60(12), 3491–502.
- Baizabal-aguirre, V., Clemens, S., Uozumi, N., & Schroeder, J. I. (1999). Suppression of Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channels KAT1 and AKT2 by Dominant Negative Point Mutations in the KAT1 alpha-Subunit. *J. Mem Biol*, 167(2), 119–125.
- Balagué, C., Lin, B., Alcon, C., Flottes, G., Malmström, S., Köhler, C., ... Roby, D. (2003). HLM1, an Essential Signaling Component in the Hypersensitive Response, Is a Member of the Cyclic Nucleotide – Gated Channel Ion Channel Family. *The Plant Cell*, 15, 365–379.
- Barish, M. E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *Journal of Physiology*, 342, 309–325.
- Barkla, B., Charuk, J., Cragoe, E., & Blumwald, E. (1990). Photolabeling of tonoplast from sugar beet cell suspensions by [3H]5-(N-methyl-N-isobutyl)-amiloride, an inhibitor of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport. *Plant Physiology*, 93, 924–930.
- Barkla, B. J., Hirschi, K. D., & Pittman, J. K. (2008). Exchangers man the pumps Functional interplay between proton pumps and proton-coupled Ca<sup>2+</sup> exchangers. *Plant Signaling and Behavior*, 3(5), 354–356.
- Barkla, B. J., & 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., Hernández-Coronado, M., & Pantoja, O. (2009). Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. *The Plant Cell*, 21(12), 4044–58.
- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., & Pantoja, O. (2007). Enhanced separation of membranes during free flow zonal electrophoresis in plants. *Analytical Chemistry*, 79(14), 5181–7.
- Barkla, B., Vera-Estrella, R., Maldonado-Gama, M., & Pantoja, O. (1999). Abscisic acid induction of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiology*, 120(3), 811–20.
- Bassil, E., Ohto, M., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., ... Blumwald, E. (2011). The Arabidopsis intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant Cell*, 23(1), 224–39.

- Batistic, O., & Kudla, J. (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor / CIPK protein kinase network. *Planta*, 915–924.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., ... Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One*, 7(10), e46907.
- Belden, W. J., & Barlowe, C. (2001). Role of Erv29 in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science*, 294, 1528.
- Benderradji, L., Brini, F., Amar, S. Ben, Kellou, K., Azaza, J., Bouzerzour, H., & Hanin, M. (2011). Sodium transport in the seedlings of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes showing contrasting salt stress tolerance. *Australasian Journal of Crop Science*, 5(3), 233–241.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, a, & Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 15(3), 441–7.
- Bökel, C., Dass, S., Wilsch-Bräuninger, M., & Roth, S. (2006). Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF $\alpha$ -like growth factor Gurken. *Development*, 133(3), 459–70.
- Brandizzi, F., Fricker, M., & Hawes, C. (2002). A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(7), 520–30.
- Brockie, P. J., Jensen, M., Mellem, J. E., Jensen, E., Yamasaki, T., Wang, R., ... Maricq, A. V. (2013). Cornichons control ER export of AMPA receptors to regulate synaptic excitability. *Neuron*, 80(1), 129–42.
- Bue, C. a, & Barlowe, C. (2009). Molecular dissection of Erv26p identifies separable cargo binding and coat protein sorting activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24049–60.
- Bue, C. a, Bentivoglio, C. M., & Barlowe, C. (2006). Erv26p directs pro-alkaline phosphatase into endoplasmic reticulum-derived coat protein complex II transport vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 17(11), 4780–9.
- Byrt, C. S., Platten, J. D., Spielmeyer, W., James, R. a, Lagudah, E. S., Dennis, E. S., ... Munns, R. (2007). HKT1;5-like cation transporters linked to Na<sup>+</sup> exclusion loci in wheat, Nax2 and Kna1. *Plant Physiology*, 143(4), 1918–28.

- Castro, C. P., Piscopo, D., Nakagawa, T., & Derynck, R. (2007). Cornichon regulates transport and secretion of TGF $\alpha$ -related proteins in metazoan cells. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 14), 2454–66.
- Chao, D. Y., Luo, Y. H., Shi, M., Luo, D., & Lin, H. X. (2005). Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis. *Cell Research*, 15(10), 796–810.
- Chardin, P., & McCormick, F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell*, 97(2), 153–5.
- Chen, J., Lalonde, S., Obrdlik, P., Noorani Vatani, A., Parsa, S. a, Vilarino, C., ... Rhee, S. Y. (2012). Uncovering Arabidopsis membrane protein interactome enriched in transporters using mating-based split ubiquitin assays and classification models. *Frontiers in Plant Science*, 3(June), 124.
- Cheng, Y., Qi, Y., Zhu, Q., Chen, X., Wang, N., Zhao, X., ... Zhang, W. (2009). New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics*, 9(11), 3100–14.
- Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Grant, J. J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.-G., ... Luan, S. (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 52(2), 223–39.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J.-K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 225–36.
- Cho, D., Villiers, F., Kroniewicz, L., Lee, S., Seo, Y. J., Hirschi, K. D., ... Kwak, J. M. (2012). Vacuolar CAX1 and CAX3 influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH. *Plant Physiology*, 160(3), 1293–302.
- Conger, R., Chen, Y., Fornaciari, S., Faso, C., Held, M. a, Renna, L., & Brandizzi, F. (2011). Evidence for the involvement of the Arabidopsis SEC24A in male transmission. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4917–26.
- Costes, S. V, Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., & Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal*, 86(6), 3993–4003.
- Cotsaftis, O., Plett, D., Shirley, N., Tester, M., & Hrmova, M. (2012). A two-staged model of Na<sup>+</sup> exclusion in rice explained by 3D modeling of HKT transporters and alternative splicing. *PloS One*, 7(7), e39865.

- Cubero, B., Nakagawa, Y., Jiang, X.-Y., Miura, K.-J., Li, F., Raghothama, K. G., ... Pardo, J. M. (2009). The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the Golgi apparatus of *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2(3), 535–52.
- Cuevas-Velazques C.L., Rendon-Luna D.F., Covarrubias A.A. (2014). Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins. *Frontiers in Plant Science*, 5, 583.
- Dadacz-Narloch, B., Beyhl, D., Larisch, C., López-Sanjurjo, E. J., Reski, R., Kuchitsu, K., ... Hedrich, R. (2011). A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium levels. *The Plant Cell*, 23(7), 2696–707.
- Dancourt, J., & Barlowe, C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 777–802.
- Darwish, E., Testerink, C., Khalil, M., El-Shihy, O., & Munnik, T. (2009). Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant & Cell Physiology*, 50(5), 986–97.
- Davenport, R. J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A., & Tester, M. (2007). The Na<sup>+</sup> transporter *AtHKT1;1* controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 30(4), 497–507.
- Davenport, R. J., & Tester, M. (2000). A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiology*, 122(3), 823–34.
- Dettmer, J., Schubert, D., Calvo-Weimar, O., Stierhof, Y.-D., Schmidt, R., & Schumacher, K. (2005). Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 41(1), 117–24.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Muller-rber, B., Palme, K., Pongs, O., ... Hedrich, R. (1997). Plant K Channel  $\alpha$ -Subunits Assemble Indiscriminately. *Biophysical Journal*, 72, 2143–2150.
- Drummond, J. B., Simmons, M., Haroutunian, V., & Meador-Woodruff, J. H. (2012). Upregulation of cornichon transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuroreport*, 23(17), 1031–4.
- Durell, S. R., & Guy, H. R. (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophysical Journal*, 77(2), 789–807.

- Durell, S. R., Hao, Y., Nakamura, T., Bakker, E. P., & Guy, H. R. (1999). Evolutionary relationship between K<sup>+</sup> channels and symporters. *Biophysical Journal*, 77(2), 775–88.
- Endo, N., Yoshida, K., Akiyoshi, M., Yoshida, Y., & Hayashi, N. (2005). Putative UDP-galactose Epimerase and Metallothioneine of *Paspalum vaginatum* Enhanced the Salt Tolerance of Rice, *Oryza sativa* L. from Transplanting to Harvest Stages. *Breeding Science*, 55(2), 163–173.
- FAO. (2010). Proceedings of the Global Forum on Salinization and Climate Change (GFSCC2010). FAO, (October 2010), 25–29.
- Faso, C., Chen, Y.-N., Tamura, K., Held, M., Zemelis, S., Marti, L., ... Brandizzi, F. (2009). A missense mutation in the Arabidopsis COPII coat protein Sec24A induces the formation of clusters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *The Plant Cell*, 21(11), 3655–71.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, a, & Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18545–52.
- Gao, C., Yu, C. K. Y., Qu, S., San, M. W. Y., Li, K. Y., Lo, S. W., & Jiang, L. (2012). The Golgi-localized Arabidopsis endomembrane protein12 contains both endoplasmic reticulum export and Golgi retention signals at its C terminus. *The Plant Cell*, 24(5), 2086–104.
- Garbarino, J., & Dupont, F. M. (1988). NaCl Induces a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in Tonoplast Vesicles from Barley Roots. *Plant Physiology*, 86(1), 231–6.
- GarciadeBlas, B., Senn, M. E., Bañuelos, M. A., & Rodriguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal*, 34, 788–801.
- Gassmann, W., Rubio, F., & Schroeder, J. (1996). Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *The Plant Journal*, 10(5), 869–882.
- Gillingham, A. K., Hin, A., Tong, Y., Boone, C., & Munro, S. (2004). The GTPase Arf1 and the ER to Golgi cargo receptor Erv14p cooperate to recruit the golgin Rud3p to the cis-Golgi. *The Journal of Cell Biology*, 167(2), 281–292.
- Goldack, D., Su, H., Quigley, F., Kamasani, U. R., Muñoz-Garay, C., Balderas, E., ... Pantoja, O. (2002). Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 31(4), 529–42.

- Gomord, V., Denmat, L.-A., Fitchette-Lainé, A.-C., Satiat-Jeunemaitre, B., Hawes, C., & Faye, L. (1997). The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *The Plant Journal*, 11(2), 313–325.
- Gong, J., He, P., Qian, Q., Shen, L., Zhu, L., & Chen, S. (1999). Identification of salt-tolerance QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin*, 44, 68–71.
- Gong, J., Zheng, X., Du, B., Quian, Q., Chen, S., Zhu, L., & He, P. (2001). Comparative study of QTLs for agronomic traits of rice (*Oryza sativa* L.) between salt stress and non-stress environment. *Science in China*, 44(Series C), 73–82.
- González, W., Riedelsberger, J., Morales-Navarro, S. E., Caballero, J., Alzate-Morales, J. H., González-Nilo, F. D., & Dreyer, I. (2012). The pH sensor of the plant K<sup>+</sup>-uptake channel KAT1 is built from a sensory cloud rather than from single key amino acids. *The Biochemical Journal*, 442(1), 57–63.
- Greenbaum, D., Jansen, R., & Gerstein, M. (2002). Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics*, 18(4), 585–596.
- Grissmer, S., Nguyen, a N., & Cahalan, M. D. (1993). Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *The Journal of General Physiology*, 102(4), 601–30.
- Hamaji, K., et al. (2009). Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 2023–2033.
- Hanton, S. L., Chatre, L., Renna, L., Matheson, L. a, & Brandizzi, F. (2007). De novo formation of plant endoplasmic reticulum export sites is membrane cargo induced and signal mediated. *Plant Physiology*, 143(4), 1640–50.
- Haraldsdóttir, H. S., Thiele, I., & Fleming, R. M. T. (2012). Quantitative assignment of reaction directionality in a multicompartmental human metabolic reconstruction. *Biophysical Journal*, 102(8), 1703–11.
- Hardie, D. G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 97–131.

- Harmel, N., Cokic, B., Zolles, G., Berkefeld, H., Mauric, V., Fakler, B., ... Klöcker, N. (2012). AMPA receptors commandeer an ancient cargo exporter for use as an auxiliary subunit for signaling. *PLoS One*, 7(1), e30681.
- Harrison, P. W., Wright, A. E., & Mank, J. E. (2012). The evolution of gene expression and the transcriptome – phenotype relationship. *Semin Cell Dev Biol*, 23(2), 222–229.
- Heberts, D. N., & Carruthers, A. (1992). Glucose Transporter Oligomeric Structure Determines Transporter Function. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23829–23838.
- Hedrich, R., & Kudla, J. (2006). Calcium signaling networks channel plant K<sup>+</sup> uptake. *Cell*, 125(7), 1221–3.
- Heijne, G. Von. (1992). Membrane Hydrophobicity Protein Structure Prediction Analysis and the Positive-inside. *Journal of Molecular Biology*, 225(2), 487–494.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., & Hashimoto, K. (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4 / CIPK6 calcium sensor / protein kinase complex. *Nature*, 21(7), 1116–1130.
- Herring, B. E., Shi, Y., Suh, Y. H., Zheng, C.-Y., Blankenship, S. M., Roche, K. W., & Nicoll, R. a. (2013). Cornichon proteins determine the subunit composition of synaptic AMPA receptors. *Neuron*, 77(6), 1083–96.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S., & Schuldiner, M. (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biology*, 10(5), e1001329.
- Hetherington, A. M., & Brownlee, C. (2004). The generation of Ca<sup>2+</sup> signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 401–27.
- Hicke, L., & Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 141–72.
- Hoagland, D. R., & Arnold, D. I. (1938). The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.*, 357, 1–39.
- Holdaway-Clarke, T. L., & Hepler, P. K. (2003). Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. *New Phytologist*, 159(3), 539–563.

- Horie, T., Brodsky, D. E., Costa, A., Kaneko, T., Lo Schiavo, F., Katsuhara, M., & Schroeder, J. I. (2011). K<sup>+</sup> transport by the OsHKT2;4 transporter from rice with atypical Na<sup>+</sup> transport properties and competition in permeation of K<sup>+</sup> over Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions. *Plant Physiology*, 156(3), 1493–507. doi:10.1104/pp.110.168047
- Horie, T., Costa, A., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H.-Y., ... Schroeder, J. I. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *The EMBO Journal*, 1–12.
- Horie, T., Yoshida, K., & Nakayama, H. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. *The Plant Journal*, 27(2), 129–38.
- Hoth, S., Dreyer, I., Dietrich, P., Becker, D., Muller-Rober, B., & Hedrich, R. (1997). Molecular basis of plant-specific acid activation of K<sup>+</sup> uptake channels. *PNAS*, 94, 4806–4810.
- Huang, S., Spielmeyer, W., Lagudah, E. S., James, R. a, Platten, J. D., Dennis, E. S., & Munns, R. (2006). A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiology*, 142(4), 1718–27.
- Huang, X.-Y., Chao, D.-Y., Gao, J.-P., Zhu, M.-Z., Shi, M., & Lin, H.-X. (2009). A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes & Development*, 23(15), 1805–17.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Fischer, S., Ache, P., & Hedrich, R. (2005). AKT2/3 subunits render guard cell K<sup>+</sup> channels Ca<sup>2+</sup> sensitive. *The Journal of General Physiology*, 125(5), 483–92.
- Jabnourne, M., Espeout, S., Mieulet, D., Cecile, F., Jean-Luc, V., Genevieve, C., ... Anne-Alienor, V. (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family, 150, 1955–1971.
- Jain, M. (2009). Genome-wide identification of novel internal control genes for normalization of gene expression during various stages of development in rice. *Plant Science*, 176(5), 702–706.
- James, R. a, Blake, C., Byrt, C. S., & Munns, R. (2011). Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2939–47.

- Jones, A. M., Xuan, Y., Xu, M., Wang, R.-S., Ho, C.-H., Lalonde, S., ... Frommer, W. B. (2014). Border control--a membrane-linked interactome of Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6185), 711–6.
- Kader, M. A., & Lindberg, S. (2005). Uptake of sodium in protoplasts of salt-sensitive and salt-tolerant cultivars of rice, *Oryza sativa* L. determined by the fluorescent dye SBFI. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3149–58.
- Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E. P., ... Uozumi, N. (2001). Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6488–93.
- Kim, B.-G., Waadt, R., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Dominguez-Solis, J. R., Schültke, S., ... Luan, S. (2007). The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 52(3), 473–84.
- Kirch, H., Vera-estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Michalowski, C. B., Barkla, B. J., & Bohnert, H. J. (2000). Expression of Water Channel Proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*, 123, 111–124.
- Knappe, S., Flügge, U.I., and Fischer, K. (2003). Analysis of the plastidic phosphate translocator gene family in Arabidopsis and identification of new phosphate translocator-homologous transporters, classified by their putative substrate-binding site. *Plant Physiology*. 131, 1178–1190.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Nayak, S., Schreiber, L., & Mathew, M. K. (2011). Root apoplastic barriers block Na<sup>+</sup> transport to shoots in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4215–28.
- Kurokawa, K., Okamoto, M., & Nakano, A. (2014). Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nature Communications*, 5, 3653.
- Lalonde, S., Sero, A., Pratelli, R., Pilot, G., Chen, J., Sardi, M. I., ... Frommer, W. B. (2010). A membrane protein/signaling protein interaction network for Arabidopsis version AMPv2. *Frontiers in Physiology*, 1(September), 24.
- Lan, W.-Z., Wang, W., Wang, S.-M., Li, L.-G., Buchanan, B. B., Lin, H.-X., ... Luan, S. (2010). A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 7089–94.

- Lan, W., Lee, S., Che, Y., Jiang, Y., & Luan, S. (2011). Mechanistic Analysis of AKT1 Regulation by the CBL – CIPK – PP2CA Interactions. *Molecular Plant*, 4(3), 527–536.
- Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A., & Robinson, D. G. (2012). ERES (ER exit sites) and the “ Secretory Unit Concept .” *Journal of Microscopy*, 247(January), 48–59.
- Lansman, J. B. (1990). Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *The Journal of General Physiology*, 95(4), 679–96.
- Lee, K.-S., Choi, W.-Y., Ko, J.-C., Kim, T.-S., & Gregorio, G. B. (2003). Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa L.*) at the seedling stage. *Planta*, 216(6), 1043–6.
- Lee, S. C., Lan, W.-Z., Kim, B.-G., Li, L., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., ... Luan, S. (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15959–64.
- Lee, S. C., Lan, W., Buchanan, B. B., & Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21419–24.
- Leyman, D., Geelen, D., Quintero, F., & Blatt, M. (1999). A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science*, 283, 537–540.
- Li, J., Long, Y., Qi, G.-N., Xu, Z.-J., Wu, W.-H., & Wang, Y. (2014). The Os-AKT1 Channel Is Critical for K<sup>+</sup> Uptake in Rice Roots and Is Modulated by the Rice CBL1-CIPK23 Complex. *The Plant Cell*, 1, 1–17.
- Li, L., Kim, B.-G., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., & Luan, S. (2006). A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12625–30.
- Liu, W., Fairbairn, D. J., Reid, R. J., & Schachtman, D. P. (2001). Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiology*, 127(1), 283–94.
- Lu, L., Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T. C., & Guggino, W. B. (1990). A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal*, 57(6), 1117–23.

- Luan, S. (2008). The CBL – CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science*, 14(1), 37–42.
- Ludewig, U., Wilken, S., Wu, B., Jost, W., Obrdlik, P., El Bakkoury, M., ... Frommer, W. B. (2003). Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH<sub>4</sub> uniporters. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45603–10.
- Maathuis, F. J. M., & Sanders, D. (2001). Sodium Uptake in Arabidopsis Roots Is Regulated by Cyclic Nucleotides 1. *Plant Physiology*, 127(December), 1617–1625.
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, Jan Niklas Hubert, B., Lind, C., Hashimoto, K., Al-Rasheid, K., ... Hedrich, R. (2014). Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science*, 7(342), 86.
- Malagoli, P., Britto, D. T., Schulze, L. M., & Kronzucker, H. J. (2008). Futile Na<sup>+</sup> cycling at the root plasma membrane in rice (*Oryza sativa* L.): kinetics, energetics, and relationship to salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4109–17.
- Malone, B. M., Perkins, A. D., & Bridges, S. M. (2009). Integrating phenotype and gene expression data for predicting gene function. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 1, S20.
- Mancias, J. D., & Goldberg, J. (2008). Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *The EMBO Journal*, 27(21), 2918–28.
- Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., Macgurn, J. a, & Emr, S. D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Developmental Cell*, 23(6), 1129–40.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K. a, Hoshi, T., & Hedrich, R. (1999). AKT3, a phloem-localized K<sup>+</sup> channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7581–6.
- Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.-K., Pardo, J. M., & Quintero, F. J. (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 143(2), 1001–12.
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., ... Uozumi, N. (2002). Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT

- transporters from plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6428–33.
- Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Science*, 215(1201), 491–497.
- Miller, E. a, Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C. S., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, 114(4), 497–509.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., & Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *The EMBO Journal*, 21(22), 6105–13.
- Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K., & Sato, M. H. (2001). Novel type *Arabidopsis thaliana* H<sup>+</sup>-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Letters*, 488(1-2), 29–33.
- Møller Inge S., Gilliham Matthew, Jha Deepa, Mayo Gwenda M., Roy Stuart J., Coates Juliet C., Haseloff Jim and Tester Mark. (2009). Shoot Na<sup>+</sup> exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell-type specific alteration of Na<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis*, 21:2163-2178.
- Morton, M. J., Abohamed, A., Sivaprasadarao, A., & Hunter, M. (2005). pH sensing in the two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TASK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 16102–6.
- Mossessova, E., Bickford, L. C., & Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 114(4), 483–95.
- Muller-roberl, B., Ellenberg, J., Provart, N., Willmitzer, L., Busch, H., Becker, D., ... Hedrich, R. (1995). Cloning and electrophysiological analysis of KST1, 14(11), 2409–2416.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *The New Phytologist*, 167(3), 645–63.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–81.
- Navarrete, C., Petrezsélyová, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahrádka, J., Ariño, J., ... Ramos, J. (2010). Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Research*, 10(5), 508–17.

- Nebenführ, a, Gallagher, L. a, Dunahay, T. G., Frohlick, J. a, Mazurkiewicz, a M., Meehl, J. B., & Staehelin, L. a. (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiology*, 121(4), 1127–42.
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 51(6), 1126–36.
- Obata, T., Kitamoto, H. K., Nakamura, A., Fukuda, A., & Tanaka, Y. (2007). Rice shaker potassium channel *OskAT1* confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiology*, 144(4), 1978–85.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., & Zhu, J.-K. (2003). A novel domain in the protein kinase *SOS2* mediates interaction with the protein phosphatase 2C *ABI2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11771–6.
- Otte, S., & Barlowe, C. (2004). Sorting signals can direct receptor-mediated export of soluble proteins into COPII vesicles. *Nature Cell Biology*, 6(12), 1189–94.
- Pagny, S., Lerouge, P., Faye, L., & Gomord, V. (1999). Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 50(331), 157–164.
- Pantoja, O., Dainty, J., & Blumwald, E. (1989). Ion channels in vacuoles from halophytes and glycophytes. *FEBS Letters*, 255(1), 92–96.
- Pantoja, O., & Smith, J. a C. (2002). Sensitivity of the plant vacuolar malate channel to pH,  $Ca^{2+}$  and anion-channel blockers. *The Journal of Membrane Biology*, 186(1), 31–42.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., and Quintero, F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 1181–1199.
- Pavey, S. a, Collin, H., Nosil, P., & Rogers, S. M. (2010). The role of gene expression in ecological speciation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206, 110–29.
- Pearson, W. L., Dourado, M., Schreiber, M., Salkoff, L., & Nichols, C. G. (1999). Expression of a functional Kir4 family inward rectifier  $K^+$  channel from a gene cloned from mouse liver. *The Journal of Physiology*, 514 ( Pt 3), 639–53.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (2001). Guard cell inward  $K^+$  channel activity in arabidopsis

- involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3215–21.
- Pittman, J. K., Shigaki, T., & Hirschi, K. D. (2005). Evidence of differential pH regulation of the Arabidopsis vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters CAX1 and CAX2. *FEBS Letters*, 579(12), 2648–56.
- Platten, J. D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R. J., Fairbairn, D. J., ... Davenport, J. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, 11(8), 372–4.
- Powers, J., & Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p Depends on Erv14p, an ER–Vesicle Protein Related to the Drosophila cornichon Gene Product. *The Journal of Cell Biology*, 142(5), 1209–1222.
- Powers, J., & Barlowe, C. (2002). Erv14p Directs a Transmembrane Secretory Protein into COPII-coated Transport Vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 13(March), 880–891.
- Punshon, T., Hirschi, K., Yang, J., Lanzirotti, A., Lai, B., & Guerinot, M. Lou. (2012). The role of CAX1 and CAX3 in elemental distribution and abundance in Arabidopsis seed. *Plant Physiology*, 158(1), 352–62.
- Qiu, L., Wu, D., Ali, S., Cai, S., Dai, F., Jin, X., ... Zhang, G. (2011). Evaluation of salinity tolerance and analysis of allelic function of *HvHKT1* and *HvHKT2* in Tibetan wild barley. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 122(4), 695–703.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., ... Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *The Plant Cell*, 19(4), 1415–31.
- Quesada V., Ponce M. R., Micol J. (1999). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*, *Genetics*, 154:421-436.
- Rausch, C., and Bucher, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*. 216, 23–37.
- Ren, Z.-H., Gao, J.-P., Li, L.-G., Cai, X.-L., Huang, W., Chao, D.-Y., ... Lin, H.-X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 37(10), 1141–6.
- Ritzenthaler, C., Nebenführ, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., ... Robinson, D. G. (2002). Reevaluation of the effects of brefeldin A

- on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *The Plant Cell* ..., 14(January), 237–261.
- Rosas-Santiago, P. (2008). Caracterización funcional de los transportadores OsHKT1;3 Y OsHKT2;3 de *Oryza sativa*.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G., & Schüpbach, T. (1995). cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell*, 81(6), 967–78.
- Rubio, F., Schwarz, M., Gassmann, W., & Schroeder, J. (1999). Genetic Selection of Mutations in the High Affinity K<sup>+</sup> Transporter HKT1 That Define Functions of a Loop Site for Reduced Na<sup>+</sup> Permeability and Increased Na<sup>+</sup> Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 6839–6847.
- Runions, J., Brach, T., Kühner, S., & Hawes, C. (2006). Photoactivation of GFP reveals protein dynamics within the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Experimental Botany*, 57(1), 43–50.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., & Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 23(3), 319–27.
- Sánchez-Barrena, M. J., Fujii, H., Angulo, I., Martínez-Ripoll, M., Zhu, J.-K., & Albert, A. (2007). The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Molecular Cell*, 26(3), 427–35.
- Sanderfoot a a, Ahmed SU, Marty-Mazars D, Rapoport I, Kirchhausen T, Marty F, Raikhel N V. 1998. A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 9920–5.
- Satiat-Jeunemaitre, B., Cole, L., Bouret, T., Howard, R., & Hawes, C. (1996). Brefeldin A effects in plant and fungal cells: Something new about vesicle trafficking? *Journal of Microscopy*, 181(2), 162–177.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., ... Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *The Biochemical Journal*, 424(3), 439–48.

- Sauvageau, E., Rochdi, M. D., Oueslati, M., Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Simpson, J. C., ... Bouvier, M. (2014). CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and controls their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 15(4), 383–400.
- Schachtman, D., & Schroeder, J. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370, 655–658.
- Schlief, T., & Heinemann, S. H. (1995). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chloride currents are indicative of an endogenous Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange mechanism in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology*, 486(1), 123–130.
- Schroeder, J. I., Delhaize, E., Frommer, W. B., Guerinot, M. Lou, Harrison, M. J., Herrera-Estrella, L., ... Sanders, D. (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 497(7447), 60–6.
- Schulze, W. X., Reinders, A., Ward, J., Lalonde, S., & Frommer, W. B. (2003). Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochemistry*, 4, 3.
- Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., ... Akos, K. (2009). Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science ...*, 323(March), 1313–1319.
- Shaw, S. L., & Long, S. R. (2003). Nod Factor Elicits Two Separable Calcium Responses in *Medicago truncatula* Root Hair Cells. *Plant Physiology*, 131(March), 976–984.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6896–901.
- Shi, J., Kim, K. N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., ... Kudla, J. (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 11(12), 2393–405.
- Shirley D. JHA, N., Tester M. & Roy S. J. (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell & Environment*, 33:793-804.
- Singla-Pareek, S. L., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2003). Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(25), 14672–7.
- Sparkes, I. a, Ketelaar, T., de Ruijter, N. C. a, & Hawes, C. (2009). Grab a Golgi: laser trapping of Golgi bodies reveals in vivo interactions with the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 10(5), 567–71.
- Steinberg, B. E., Huynh, K. K., Brodovitch, A., Jabs, S., Stauber, T., Jentsch, T. J., & Grinstein, S. (2010). A cation counterflux supports lysosomal acidification. *The Journal of Cell Biology*, 189(7), 1171–86.
- Strompen, G., Dettmer, J., Stierhof, Y.-D., Schumacher, K., Jurgens, G., Mayer, U., & Jürgens, G. (2005). Arabidopsis vacuolar H-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 41(1), 125–32.
- Su, H., Gollack, D., Katsuhara, M., Zhao, C., & Bohnert, H. J. (2001). Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant Physiology*, 125(2), 604–14.
- Sudarsanam, P., & Cohen, B. a. (2014). Single nucleotide variants in transcription factors associate more tightly with phenotype than with gene expression. *PLoS Genetics*, 10(5), e1004325.
- Sze, H. (1985). H<sup>+</sup>-Translocating Atpases: Advances Using Membrane Vesicles. *Annual Review of Plant Physiology*, 36, 175–208.
- Sze, H., Li, X., & Palmgren, M. (1999). Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*, 11(4), 677–90.
- Takahashi, R., Liu, S., & Takano, T. (2007). Cloning and functional comparison of a high-affinity K<sup>+</sup> transporter gene *PhaHKT1* of salt-tolerant and salt-sensitive reed plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), 4387–95.
- Terasaki, M., Runft, L. L., & Hand, a R. (2001). Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Molecular Biology of the Cell*, 12(4), 1103–16.
- Tester, M., & Davenport, R. J. (2003). Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503–527.
- Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., ... Kjellbom, P. (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439(7077), 688–94.

- Tse Y, Mo B, Hillmer S, Zhao M. 2004. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *The Plant Cell* 16, 672–693.
- Tzounopoulos, T., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal*, 69(3), 904–8.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., ... Schroeder, J. I. (2000). The Arabidopsis HKT1 Gene Homolog Mediates Inward Na<sup>+</sup> Currents in *Xenopus laevis* Oocytes and Na<sup>+</sup> Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, 122(April), 1249–1259.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Amezcua-Romero, J. C., & Pantoja, O. (2012). Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell & Environment*, 35(3), 485–501.
- Very, A.-A., Robinson, M. F., Mansfield, T. A., & Sanders, D. (1998). Guard cell cation channels are involved in Na<sup>+</sup> – induced stomatal closure in a halophyte. *The Plant Journal*, 14(February), 509–521.
- Von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Krebs, M., Stierhof, Y.-D., Schumacher, K., & Ludewig, U. (2007). Function of the anion transporter *AtCLC-d* in the trans-Golgi network. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 50(3), 466–74.
- Walker, D., Leigh, R., & Miller, A. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10510–4.
- Wang, X., Zhang, X., Dong, X.-P., Samie, M., Li, X., Cheng, X., ... Xu, H. (2012). TPC proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell*, 151(2), 372–83.
- Wang H, Zhuang X-H, Hillmer S, Robinson DG, Jiang L-W. 2011. Vacuolar sorting receptor (VSR) proteins reach the plasma membrane in germinating pollen tubes. *Molecular Plant* 4, 845–53.
- Washburn, M. P., Koller, A., Oshiro, G., Ulaszek, R. R., Plouffe, D., Deciu, C., ... Yates, J. R. (2003). Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3107–12.
- White, P. (1999). The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends in Plant Science*, 4(7), 245–246.

- Whiteman, S.-A., Nühse, T. S., Ashford, D. a, Sanders, D., & Maathuis, F. J. M. (2008). A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 56(1), 146–56.
- Winegar, B. D., Kelly, R., & Lansman, J. B. (1991). Block of current through single calcium channels by Fe, Co, and Ni. Location of the transition metal binding site in the pore. *The Journal of General Physiology*, 97(2), 351–67. Woodhull, a M. (1973). Ionic blockage of sodium channels in nerve. *The Journal of General Physiology*, 61(6), 687–708.
- Wu Shaw-Jye, Ding Lei, Zhu Jian-Kang. (1996). SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition, *The Plant Cell*, 8:617-627.
- Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., ... Chérel, I. (2007). Increased functional diversity of plant K<sup>+</sup> channels by preferential heteromerization of the shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 486–94.
- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L., & Wu, W.-H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125(7), 1347–60.
- Yang, J., Punshon, T., Guerinot, M. Lou, & Hirschi, K. D. (2012). Plant calcium content: ready to remodel. *Nutrients*, 4(8), 1120–36.
- Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. a, Hasegawa, P. M., & Pardo, J. M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 30(5), 529–39.
- Young, J. J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E., & Schroeder, J. I. (2006). CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), 7506–11.
- Zhou, M., Morgner, N., Barrera, N. P., Politis, A., Isaacson, S. C., Matak-Vinković, D., ... Robinson, C. V. (2011). Mass spectrometry of intact V-type ATPases reveals bound lipids and the effects of nucleotide binding. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6054), 380–5.
- Zhu, J., Gong, Z., Zhang, C., Song, C.-P., Damsz, B., Inan, G., ... Bressan, R. a. (2002a). OSM1/SYP61: a syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *The Plant Cell*, 14(12), 3009–28.

- Zhu, J.-K. (2002b). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247–73.
- Zimmermann, S., Hartje, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., & Mueller-Roeber, B. (2001). The K<sup>+</sup> channel SKT1 is co-expressed with KST1 in potato guard cells--both channels can co-assemble via their conserved KT domains. *The Plant Journal*, 28(5), 517–27.
- Zimmermann, S., Talke, I., Ehrhardt, T., Nast, G., & Müller-Röber, B. (1998). Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology*, 116(3), 879–90.