



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EL TRÁFICO DEPENDIENTE DE VESÍCULAS DE CLATRINA DE LAS
ACUAPORINAS PIP DE *Mesembryanthemum crystallinum*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
MARIA FERNANDA GÓMEZ MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
Dr. OMAR HOMERO PANTOJA AYALA
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. ROSANA SÁNCHEZ LOPEZ
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. MARINA GAVILANES RUÍZ
[Facultad de Química](#)



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.

La realización de este trabajo fue posible por el apoyo a los proyectos de investigación A1-S-8007 y por la beca número 434649, a través del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT).

Para Luz y Luis de Luna

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones:

- ❖ Agradezco al CONAHCYT por el financiamiento proporcionado, a través del proyecto A1-S-8007 y el número de beca 434649.
- ❖ Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), otorgados a través de la UNAM por el financiamiento otorgado para la asistencia al XVII Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress & X Mexico-USA Symposium en Puerto Vallarta, México, 2017.

A los académicos:

- ❖ Agradezco ampliamente a los doctores, José Luis Reyes Taboada, Elizabeth Cordoba Martínez, Eleazar Martínez Barajas, Claudia Rodríguez Almazán y Adriana Garay Arroyo, quienes formaron parte como miembros del jurado de examen de grado y enriquecieron el presente documento por medio de sus comentarios.
- ❖ Agradezco a las doctoras Rosana Sanches López y Marina Gavilanes Ruiz, quienes formaron parte del comité que evaluó el desarrollo del presente proyecto durante el transcurso del programa de posgrado.

A las personas:

Agradezco y extendiendo los siguientes párrafos a las personas cuya presencia, apoyo y motivación permitió el inicio y finalización del presente trabajo de investigación:

- ❖ A la Dra. Rosario Vera Estrella, quien fue mi mentora desde el inicio de mi carrera científica. La Dra. Rosario me enseñó facetas de la vida, que en conjunto me brindaron crecimiento académico y personal. Primeramente, los cimientos de esta investigación fueron posibles por la innovación, el esfuerzo y el criterio científico de la Dra. Rosario. El aprendizaje constante, la tenacidad, y el trabajo arduo, son los principales valores que ella inculcó dentro de mi formación. Muchas de sus enseñanzas impactaron en gran medida la toma de decisiones dentro del proyecto. A nivel personal, Rosario te agradezco que creyeras en mí. Lamento que no pudiéramos concluir el trabajo juntas, pero espero que veas este producto final como un logro más tuyo.
- ❖ Al Dr. Omar Pantoja Ayala, le agradezco su apoyo durante la finalización del presente trabajo. Su experiencia y comentarios permitieron que pudiera ver el alcance del proyecto desde otro punto de vista.
- ❖ Al Dr. Paul Rosas le agradezco su colaboración y las sugerencias realizadas durante el transcurso del proyecto. Tus consejos me permitieron ser perceptiva a la crítica y también reforzaron mi apreciación por el producto derivado después de estos seis años de investigación.
- ❖ A la Dra. Elizabeth Córdoba, quien me apoyo a cultivar mis conocimientos en la genética. Agradezco, su paciencia y disponibilidad para enseñarme, discutir y sugerir alternativas de análisis, aun cuando en su momento no era su responsabilidad.
- ❖ Agradezco a los miembros del laboratorio 18, del Departamento de Biología Molecular de Plantas del IBt por su ayuda a nivel técnico y por medio de sus

sugerencias durante los seminarios de grupo. En especial agradezco a Guadalupe Muñoz y a Jorge Ruiz cuya presencia también siempre hizo más ameno el día a día.

- ❖ Agradezco a Jimena Martínez, Guadalupe Arce y a Víctor Barajas quienes me permitieron explorar mi capacidad de enseñanza. Espero haber contribuido positivamente en su formación.
- ❖ A mis amigos del IBt que también experimentan o experimentaron el posgrado, Mary, Julio, Alfonso y David les agradezco su compañía en este mismo camino de los experimentos fallidos, seminarios departamentales, reuniones de comité, café por la mañana y a veces cerveza por la noche. Mary, Julio y David deseo que tengan mucho éxito y agradezco que mi paso por el posgrado me haya permitido conocerlos. Alfonso, gracias por confiar en mí desde la licenciatura, espero que sigamos recordando los viejos tiempos, pero también a medida que avanzamos sigamos contándonos nuevas anécdotas.
- ❖ A mis amigas desde hace ya quince años Daniela Tapia y Nohemí Arrieta. Su presencia me ayudo a sobrellevar los momentos difíciles. Siempre me dieron puntos de vista fuera de la vida del posgrado, abriendo mi panorama a las posibilidades. Su amistad con los años se siente más fuerte, deseo que sigamos acompañados, aconsejándonos e intentando siempre cosas nuevas.
- ❖ A mi mamá Guadalupe, sin tu apoyo mi carrera académica no hubiera iniciado o hubiera sido posible. Desde pequeña aprendí de ti a no rendirme y a trabajar duro. La finalización de esta etapa es gracias a tus enseñanzas, y

apoyo. De hecho, verte avanzar en tu propio camino, me contagio de fortaleza por lograr mi propio objetivo.

- ❖ A mi familia, Sami, Naty, Caro, Katy, Jorge, Lore y Chucho quienes con su presencia me permitieron llevar una vida familiar con momentos que balancearon mi carga académica.
- ❖ A mis perritos, Mel, Salpy y Juay the rito por ser adorables y recibirme siempre felices en casa.
- ❖ Finalmente, estas páginas no hubieran sido concluidas sin Luz y Luis de Luna. Su compañía en casa o en el laboratorio me han enseñado en todos los sentidos. Gracias a ustedes mis días están llenos de amor, alegría y diversión. Agradezco la paciencia y la comprensión que nos compartimos. Con ustedes la versatilidad de la vida está presente, a pesar de que los experimentos no salgan, compartir la cena en casa es la recompensa después de un largo día de trabajo. Mucha gracias por la preparación de botana para darme ánimos durante las tardes y noches de escritura. Este logro no es solo mío, es también para y por ustedes. En unos años no se donde estaremos, pero estoy segura de que mientras sigamos creciendo y avanzando juntos estaremos bien.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	4
II. MARCO TEORICO	5
II.1 La absorción de agua en la raíz de las plantas	5
II.2 Descubrimiento y estructura de las acuaporinas	8
II.3 Diversidad de subfamilias de acuaporinas en plantas	13
II.4 Las acuaporinas tipo PIP1 y PIP2	15
II.5 El transito intracelular de las PIP	18
II.6 Las vesículas de clatrina y su participación en el tránsito intracelular de AQP	22
II.7 Cambio de localización de las PIP en respuesta a estrés salino en glicófitas	27
II.8 Las halófitas como modelo de estudio del transporte eficiente de agua durante condiciones de salinidad	30
III. ANTECEDENTES	32
III.1 Las acuaporinas de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> y sus mecanismos de regulación	32
III.2 Evidencia del tráfico de McPIP por medio de las CCV	34
IV. JUSTIFICACIÓN	39
V. HIPÓTESIS	41
VI. OBJETIVOS	41
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	42
VII.1 Análisis evolutivo por el método de Máxima Verosimilitud	42
VII.2 Material biológico	42
VII.3 Aislamiento de RNA total y síntesis de cDNA	43
VII.4 Clonación de los genes y generación de vectores	44
VII.5 Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	45
VII.6 Microscopía confocal y tratamiento con inhibidores o FM4-64	46
VII.7 Análisis de imágenes	48
VII.8 Ensayo de ubiquitina dividida basada en apareamiento o mbSUS	48
VII.9 Aislamiento de vesículas recubiertas de clatrina	49

VII.10 Cuantificación de proteína	50
VII.11 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes	50
VII.12 Inmunodetección tipo “western blot”	51
VIII. RESULTADOS	53
VIII.1 La abundancia de <i>McPIP</i> aumenta en CCV aisladas de la raíz de <i>M. crystallinum</i> durante condiciones de salinidad	53
VIII.2 <i>McCLC</i> , <i>McAP1μ</i> y <i>McAP2μ</i> están conservados en la escala evolutiva de las plantas	54
VIII.3 <i>McCLC</i> , <i>McAP1μ</i> y <i>McAP2μ</i> son funcionales	62
VIII.4 <i>McPIP</i> se localizan en la membrana plasmática y se asocian con <i>McCLC</i>	69
VIII.5 Las <i>McPIP</i> establecen interacciones diferenciales con las proteínas <i>McAPμ</i>	73
VIII.6 <i>McPIP1;4</i> y <i>McPIP2;1</i> forman hetero-oligómeros.	81
IX. DISCUSIÓN	84
X. CONCLUSIONES	88
XI. PERSPECTIVAS	89
XII. APÉNDICE	90
Tabla XII.1 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación	90
XII.2 Figuras suplementarias	91
XII.3 Publicaciones en el periodo	96
XIII. LITERATURA CITADA	97

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Fig. 1	Modelo del movimiento de agua en el sistema suelo-raíz-hoja-atmósfera	6
Fig. 2	Rutas de transporte radial del agua en las células vegetales	7
Fig. 3	Características estructurales de las acuaporinas	12
Fig. 4	Modelo del transporte de agua a través del poro en las acuaporinas	13
Fig. 5	Modelo tridimensional de la estructura tetramérica en la familia PIP	18
Fig. 6	Modelo del tránsito intracelular de las PIP	21
Fig. 7	Modelo de la estructura del triskelion de clatrina y su conformación como CCV	23
Fig. 8	Los complejos adaptadores de las CCV	25

ANTECEDENTES

Fig. 9	Identificación de fracciones de vesículas cargadas positivamente en las raíces de <i>M. crystallinum</i>	35
Fig. 10	Las fracciones cargadas positivamente poseen naturaleza subcelular mixta	36

RESULTADOS

Fig. 11	La salinidad incrementa la abundancia de las McPIP en vesículas de clatrina purificadas y en fracciones de membrana plasmática de la raíz de <i>M. crystallinum</i>	54
Fig. 12	Árbol filogenético de McCLC	56
Fig. 13	McCLC posee el dominio putativo de unión a CHC	57
Fig. 14	Árbol filogenético de McAP1 μ y McAP2 μ .	59
Fig. 15	La McAP1 μ posee conservación estructural	60
Fig. 16	La McAP2 μ posee conservación estructural	61
Fig. 17	Localización subcelular de las proteínas asociadas a CCV de <i>M. crystallinum</i>	63
Fig. 18	Las proteínas asociadas a CCV McAP1 μ y McCLC colocalizan	64
Fig. 19	Las proteínas asociadas a CCV McAP2 μ y McCLC colocalizan	65
Fig. 20	McAP2 μ colocaliza con el marcador de la endocitosis FM4-64, a diferencia de McAP1 μ	67
Fig. 21	McAP1 μ y McAP2 μ participan en el tráfico post-Golgi	68
Fig. 22	Localización de McPIP1;4 y McPIP2;1 en <i>N. benthamiana</i>	69
Fig. 23	McPIP1; 4 y McPIP2; 1 están presentes en los filamentos de Hecht	70
Fig. 24	McCLC-mCherry colocaliza con McPIP1;4-EYFP	72
Fig. 25	McCLC-mCherry colocaliza con McPIP2;1-EYFP	73
Fig. 26	McPIP1;4-mCherry colocaliza con EYFP-McAP1 μ	75
Fig. 27	McPIP1;4-mCherry colocaliza con EYFP-McAP2 μ	76
Fig. 28	McPIP2;1-mCherry colocaliza con EYFP-McAP1 μ	77
Fig. 29	McPIP2;1-mCherry colocaliza con EYFP-McAP2 μ	78
Fig. 30	Las acuaporinas McPIP1;4 y McPIP2;1 interactúan con McAP2 μ o McAP1 μ , respectivamente	80
Fig. 31	Las acuaporinas McPIP1;4 y McPIP2;1 forman heterooligómeros	82

Fig. 32	Las acuaporinas <i>McPIP1;4</i> y <i>McPIP2;1</i> colocalizan en la MP	83
APÉNDICE		91
Fig. Sup 1	Mapa del plásmido destino pX-EYFP-GW	92
Fig. Sup 2	Mapa del plásmido destino pX-mCherry-GW	93
Fig. Sup 3	Mapa del plásmido destino pMETYC_GW	94
Fig. Sup 4	Mapa del plásmido destino pXN32_GW	95

ABREVIATURAS

AG	Aparato de Golgi
Ala	Alanina
AQP	Acuaporina
Asn	Asparagina
Arg	Arginina
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CCV	Vesículas recubiertas de clatrina
CME	Endocitosis dependiente de clatrina
Cys	Cisteína
EZFL	Electroforesis Zonal del Flujo Libre
FP	Fracciones cargadas positivamente
Glu	Ácido Glutámico
Gly	Glicina
H	Hidrógeno
His	Histidina
L_{pr}	Conductividad hidráulica de la raíz
MP	Membrana plasmática
MVB	Cuerpo multivesicular
Phe	Fenilalanina
PIP	Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática
Pro	Prolina
PVC	Compartimento prevacuolar
RE	Retículo Endoplasmático
r_p	Índice de correlación de Pearson
r_s	Índice de correlación de Spearman
TGN/EE	Red del trans-Golgi/Endosoma temprano
Thr	Treonina
TIP	Proteínas intrínsecas del Tonoplasto
TP	Tonoplasto
BFA	Brefeldina A
TryA23	Trifostina A23
EYFP	Proteína amarillo fluorescente
mCherry	Proteína monomérica rojo fluorescente
mbSUS	Ensayo de ubiquitina dividida basada en apareamiento
QSQE	Calidad de la estructura cuaternaria
MHD	Dominio con homología μ

RESUMEN

La regulación de las acuaporinas tipo PIP en la raíz se ha propuesto como un aspecto importante para la tolerancia a la salinidad en plantas. Sin embargo, los detalles moleculares y celulares alrededor de este proceso en halófitas no se han estudiado. Anteriormente, utilizando la técnica electroforesis zonal de flujo libre y proteómica sin marca, se identificó una posible relación entre el aumento de abundancia de las PIP en la raíz de la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* y su tráfico dependiente de vesículas de clatrina, durante condiciones de salinidad. Para corroborar esta relación, se analizó la abundancia proteica de las PIP tanto en vesículas de clatrina purificadas como en fracciones enriquecidas en membrana plasmática de plantas tratadas como no tratadas con NaCl. Los resultados demostraron que las PIP se ubican en las vesículas de clatrina, y durante condiciones de salinidad su abundancia incrementa paralelamente en ambos sitios subcelulares. Para profundizar en la maquinaria molecular de *M. crystallinum* que participan en la formación de las vesículas de clatrina, se analizó a la cadena ligera de la clatrina (*McCLC*) y las subunidades $\mu 1$ y $\mu 2$ del complejo adaptador (*McAP1 μ* y *McAP2 μ*). Identificamos que estos componentes son ortólogos funcionales a los reportados para *Arabidopsis thaliana*. Además, realizamos análisis de localización que indicaron que *McAP1 μ* y *McAP2 μ* se asocian a la membrana plasmática y responden a inhibidores de tráfico vesicular. También se comprobó por medio de ensayos de colocalización, que *McAP1 μ* y *McAP2 μ* se asocian a las acuaporinas de membrana plasmática *McPIP1;4* y *McPIP2;1*. Así mismo, se confirmó la interacción proteína-proteína entre *McPIP2;1* y *McAP1 μ* y entre *McPIP1;4* y *McAP2 μ* , indicando interacciones diferenciales entre los tipos de complejos adaptadores y los diferentes tipos de PIP. Comprobamos además que ambas acuaporinas pueden interaccionar y se localizan en la membrana plasmática. Los resultados indican que *M. crystallinum* posee componentes conservados e implicados en la formación de vesículas de clatrina, los cuales influyen en la localización de las acuaporinas tipo PIP en la membrana plasmática y participan en la respuesta a la salinidad.

ABSTRACT

The regulation of PIP-type aquaporins in the root has been proposed as an important aspect of plant salinity tolerance. However, the molecular and cellular details around this process in halophytes have not been studied. Previously, using free-flow zone electrophoresis and label-free proteomics, we identified a relation between the increased abundance of PIPs in the root of the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* and their trafficking via clathrin coated vesicles during salinity conditions. To corroborate this relationship, the protein abundance of the PIPs was analyzed both in purified clathrin coated vesicles and in fractions enriched in the plasma membrane of plants treated and not treated with NaCl. The results showed that PIPs are in clathrin coated vesicles and during salinity conditions their abundance increases in parallel in both subcellular sites. To gain insight into the molecular machinery of *M. crystallinum* involved in the formation of clathrin coated vesicles, the clathrin light chain (*McCLC*), and the $\mu 1$ and $\mu 2$ subunits of the adapter complex (*McAP1 μ* and *McAP2 μ*) were analyzed. We identified that these components are functional orthologs to those reported for *Arabidopsis thaliana*. In addition, we performed localization analyses that showed *McAP1 μ* and *McAP2 μ* associate with the plasma membrane and respond to inhibitors of vesicular trafficking. We also verified through colocalization assays that *McAP1 μ* and *McAP2 μ* associate with the plasma membrane aquaporins *McPIP1;4* and *McPIP2;1*. Likewise, the protein-protein interaction between *McPIP2;1* and *McAP1 μ* , and *McPIP1;4* and *McAP2 μ* was confirmed, indicating differential interactions between the types of adapter complexes and the different types of PIP. We also verified that both aquaporins can interact and locate at the plasma membrane. The results indicate that *M. crystallinum* has conserved components involved in forming clathrin coated vesicles, which influence the localization of PIP-type aquaporins at the plasma membrane and contribute to the response to salinity.

I. INTRODUCCIÓN

Las raíces de las plantas son fundamentales para fijarse al suelo y realizar la absorción de agua y nutrientes, lo que permite el establecimiento y desarrollo vegetal. La raíz también es el órgano vegetal que lidia directamente con los cambios ambientales que se originan en suelo, siendo la salinidad uno de los estreses abióticos más prevalentes a escala mundial (Läuchli y Grattan, 2007). Entender cómo responde la raíz a la salinidad constituye un aspecto relevante dentro de la fisiología vegetal. En este contexto, los efectos de la salinidad se han estudiado principalmente en plantas sensibles al estrés salino, como *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, dentro de la diversidad vegetal, la planta tolerante a la salinidad, *Mesembryanthemum crystallinum* constituye un modelo emergente de investigación, ya que mantiene el balance hídrico durante periodos de salinidad, proceso identificado como un factor clave para contender con el estrés salino (Alexandersson *et al.*, 2005; Aroca *et al.*, 2012; Sutka *et al.*, 2011). El presente trabajo se ha enfocado en entender como las proteínas de membrana de *M. crystallinum* especializadas en el movimiento de agua, llamadas acuaporinas, coordinan su tráfico vesicular durante condiciones de salinidad. Debido a que *M. crystallinum* es un organismo no secuenciado, el análisis de la maquinaria implicada en el tráfico vesicular de las acuaporinas se inició con un análisis filogenético, y posteriormente se complementó con varios análisis funcionales, usando sistemas heterólogos de expresión y técnicas de microscopía. Con este trabajo se logró identificar que la adaptación de las plantas a las condiciones de salinidad depende de la regulación selectiva de componentes celulares conservados, que conducen

diferencialmente al control de la abundancia de las acuaporinas, dependiendo de la ecología de la especie.

II. MARCO TEORICO

II.1 La absorción de agua en la raíz de las plantas

Las plantas poseen un metabolismo autotrófico que utiliza el CO_2 de la atmósfera, el agua y los nutrientes del suelo, para llevar a cabo la fotosíntesis (Steudle, 2000). Así mismo, la división y expansión celular requieren de la captación continua de agua para mantener la presión de turgencia, proceso que está controlado por un gradiente hídrico y de solutos (Chaumont y Tyerman, 2014). En las plantas, el agua ingresa y asciende a lo largo de los vasos del xilema, gracias al potencial hídrico (ψ_w) que hace referencia a la energía potencial del agua para poder realizar trabajo. El ψ_w cuantifica la tendencia del agua a fluir de un área a otra, en donde el agua se mueve de un sitio de mayor hacia uno de menor ψ_w (Salisbury y Ross, 1992). La diferencia entre el ψ_w de la planta y el suelo se origina por la apertura de los estomas, que llevan a cabo el proceso de intercambio respiratorio y conlleva a la disminución del ψ_w de las hojas. Este proceso induce tensión o presión negativa en los vasos del xilema y resulta en el movimiento del agua del suelo hacia el interior de la planta, a través de las raíces (Steudle, 2000). Otro factor importante para el movimiento del agua hacia el resto de la planta está dado por la conductividad hidráulica de la raíz (L_{pr}), la cual hace referencia a la permeabilidad de las raíces al agua por unidad de área. La L_{pr} es la suma de las fuerzas hidrostática y osmótica a las que las raíces estén sometidas en cierto tiempo y/o condición ambiental (Steudle, 2000). En la L_{pr} influye directamente el ψ_w de las plantas, debido a que

existe una correlación directa entre la capacidad y eficiencia en la toma de agua y los valores de L_{pr} (Aroca, 2012; Steudle, 2000). Por lo tanto, el movimiento del agua en la planta es un proceso pasivo, regulado por las diferencias en el potencial hídrico, que dan como resultado una conductividad hidráulica diferencial entre los componentes del sistema suelo – raíz – hoja – atmósfera. Cuando las raíces absorben agua y solutos, se crea una L_{pr} positiva, porque los solutos y el agua recién absorbidos promueven la generación de un ψ_w negativo en el interior de la planta, lo que genera la toma de agua (Lobet *et al.*, 2014, Fig. 1).

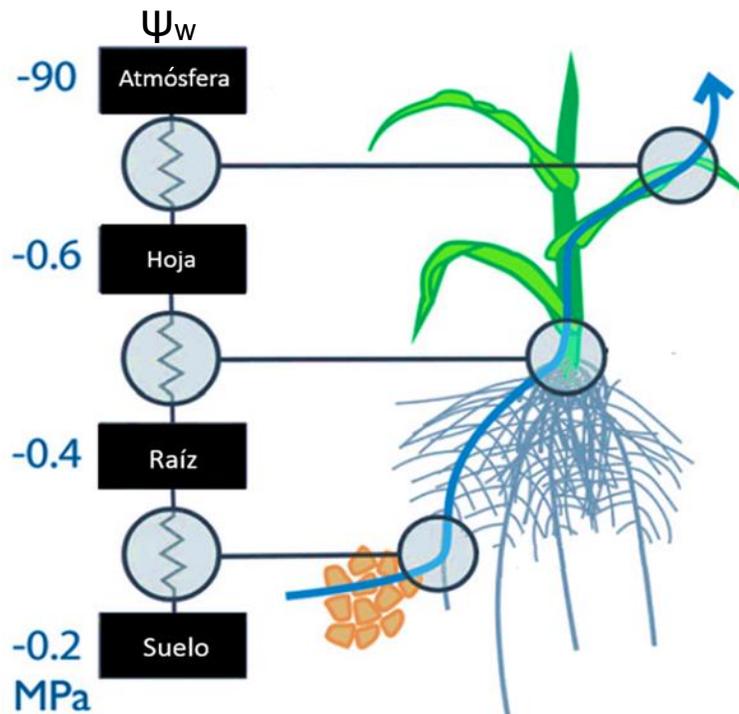


Figura 1. Modelo del movimiento de agua en el sistema suelo-raíz-hoja-atmósfera. La absorción y el movimiento del agua al interior de las plantas dependen de las diferencias en el ψ_w del suelo, la raíz, las hojas y la atmósfera. Mientras se conserve un ψ_w negativo en la planta, la L_{pr} se mantiene positiva, lo cual permite la absorción de agua. La ψ_w se muestra en unidades de presión (MPa). Modificado de Lobet *et al.*, 2014.

El movimiento radial de agua por su parte está dividido en tres rutas: 1) la vía apoplástica que conduce el movimiento de agua a través del espacio extracelular periférico a la pared celular, 2) la vía simplástica que permite el movimiento del agua a través de los plasmodesmos y 3) la vía transcelular o transmembranal que consiste en el flujo del agua intracelular a través de las membranas celulares (Steudle, 2000; Steudel y Peterson, 1998). Estas tres vías permiten que se mantenga la presión hidrostática intracelular (turgor) de las células, tejidos y órganos vegetales (Afzal *et al.*, 2016). Debido a la dificultad de discernir experimentalmente entre la vía simplástica y la transmembranal, la suma de ambas representa la vía célula – célula (Steudle y Peterson, 1998). En la vía célula – célula la presencia de las proteínas de membrana llamadas acuaporinas (AQP) es fundamental para que el agua se mueva y fluya de manera inter e intracelular (Fig. 2; Afzal *et al.*, 2016).

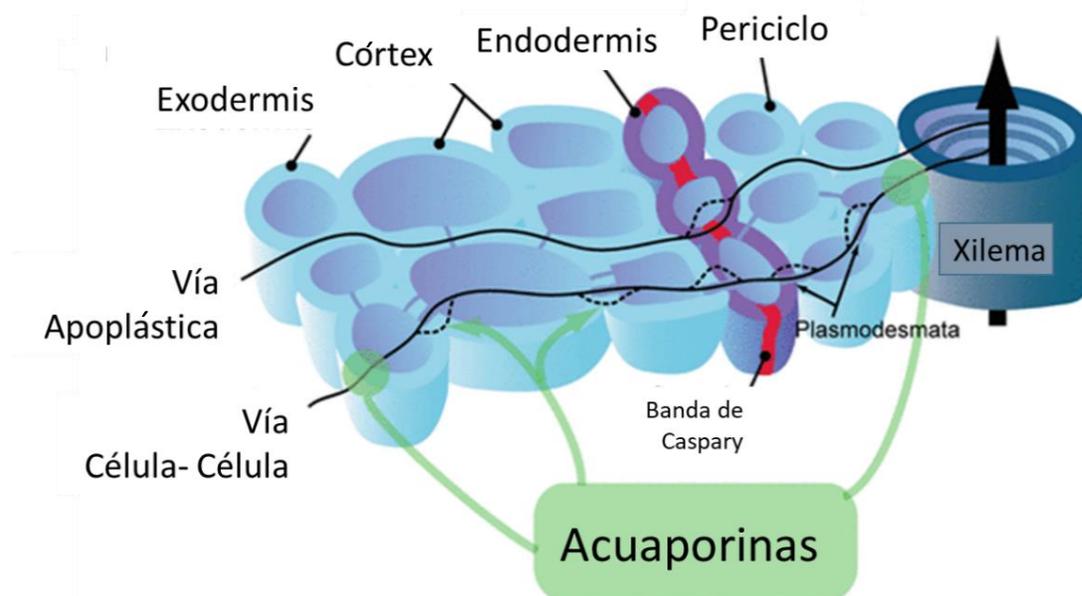


Figura 2. Rutas de transporte radial del agua en las células vegetales. El agua dentro de las células vegetales se mueve por tres vías, *i*) vía apoplástica, la cual ocurre a través del espacio extracelular periférico a los protoplastos, y puede presentar una barrera hidráulica en la endodermis denominada banda de Caspary (en rojo); *ii*) la vía simplástica y *iii*) la vía transmembranal, el flujo del agua intracelular e intercelular ocurre a través de los

plasmodesmos y las membranas celulares, respectivamente. Ambas vías forman la vía célula-célula, y conducen el flujo de agua a través de las membranas de las células, gracias a la presencia de acuaporinas. El paso del agua entre la vía simplástica y transcelular por medio de AQP está señalada en verde. Tomado y modificado de Gambetta *et al.*, 2017.

II.2 Descubrimiento y estructura de las acuaporinas

El movimiento transmembranal del agua en una célula y entre las células se creyó que ocurría a través de la bicapa lipídica por difusión simple (Hacke y Laur, 2016). Sin embargo, el flujo de agua por difusión simple a través de una membrana es tan lento que no coincide con los procesos fisiológicos (Afzal *et al.*, 2016). Además, las diferentes membranas subcelulares de una misma célula tienen distintos valores de permeabilidad al agua, lo cual no puede ser explicado por el movimiento de agua a través de la membrana lipídica por difusión simple. En 1970, Macey y Farmer publicaron una nota preliminar, donde lograron bloquear de manera reversible el flujo de agua y otros solutos hidrofílicos y lipofílicos en eritrocitos de mamíferos, al usar mercurio como agente citotóxico (Macey y Farmer, 1970). Esta evidencia sugirió la existencia de proteínas especializadas en el movimiento del agua sensibles al mercurio, que posteriormente fueron nombradas acuaporinas (AQP) (Denker *et al.*, 1988). El primer reporte de la identidad molecular de las proteínas especializadas en el movimiento de agua surgió a través del trabajo de Peter Agre y colaboradores (Agre *et al.*, 1999), quienes identificaron a CHIP28 (por su nombre en inglés, **C**hannel **I**ntegral **M**embrane **P**rotein of **28** kDa), una proteína abundante e integral de membrana formadora de poros. Debido a que la expresión heteróloga de CHIP28 incrementaba drásticamente la permeabilidad al agua en ovocitos de *Xenopus leavis*, los cuales no expresan endógenamente ninguna AQP, permitió comprobar la funcionalidad de CHIP28 como canal de agua y fue re-nombrada como

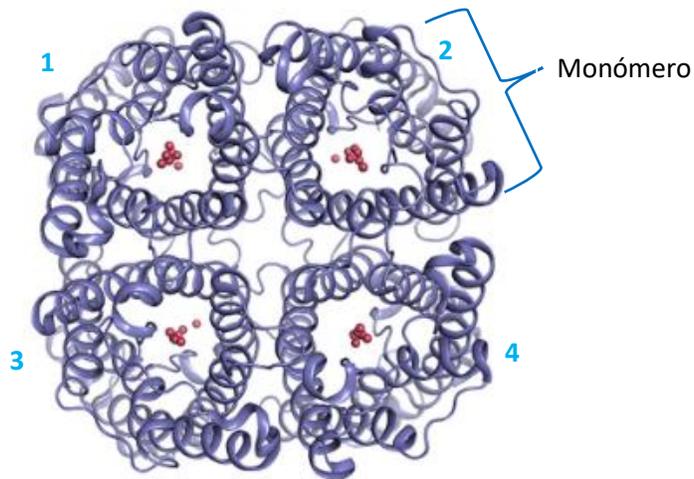
AQP1 (Preston *et al.*, 1992; Agre 2004). A partir del descubrimiento de las AQP, fue posible elucidar la relevancia de la regulación del transporte transmembranal del agua al interior de la célula y entre las células de un organismo.

Las AQP pertenecen a una súper familia conservada de proteínas integrales de membrana, conocida como MIP (por su nombre en inglés, **M**ajor **I**ntrinsic **P**rotein) (Danielson y Johanson, 2008). Esta familia se encuentra presente en todos los organismos vivos excepto en los *Archea* termófilos, como el género *Thermotoga sp.* y las bacterias intracelulares, como *Rickettsia* (Abascal *et al.*, 2014). Las AQP permiten el flujo selectivo bidireccional de agua impulsado por un gradiente osmótico celular, sin embargo, algunos otros miembros de la familia son capaces de facilitar el movimiento de gases y/o moléculas pequeñas polares (Ozu *et al.*, 2022). Las AQP funcionan como tetrámeros, en donde cada monómero posee un poro funcional (Heymann y Engel, 1999; Fig. 3A) La presencia del tetrámero es indispensable para la función de los monómeros individuales y se ha determinado que existe una sinergia funcional a consecuencia de oligomerización en las AQP (Ozu *et al.*, 2022). Como, por ejemplo, la capacidad de movilizar iones o gases a través del poro central del tetrámero, así como funcionar como sensores de la tensión membranal, por medio de la interacción de monómeros adyacentes con los lípidos que componen la membrana (Byrt *et al.*, 2017). Cada monómero de AQP está formado por seis α -hélices transmembranales (TM1-TM6) con el carboxilo (C-terminal) y el amino terminal (N-terminal) orientados hacia el citosol. Además, cada TM está unida por un lazo, nombrados LA a LE. Los lazos LB y LE son hidrofóbicos y cada uno contienen la secuencia de aminoácidos NPA (Asn-Pro-Ala), conservada

y característica de la familia MIP (Hacke y Laur, 2016; Fig. 3B). Ambos lazos se configuran de manera opuesta en el centro del canal de manera helicoidal y crean la región NPA, que forma el poro con un diámetro de 2.8 Å, por el cual las moléculas del agua pueden moverse, debido a su rotación dipolar (Kozono *et al.*, 2002). Debido a que el tamaño del poro es muy cercano al tamaño de una molécula de agua, el movimiento del agua a través de éste ocurre en una configuración de hilera (Hacke y Laur, 2016). Otra característica importante del transporte de agua a través de las AQP es la región aromático-Arginina (ar/R) o filtro de selectividad, la cual está localizada en el vestíbulo extracelular y está compuesta por una arginina y tres aminoácidos adicionales de los cuales uno es aromático. La región ar/R funciona como un filtro de selección ya que crea la constricción física del poro, permitiendo la exclusión de sustratos por tamaño y la repulsión electrostática; ya que las cargas positivas fijas de la región ar/R repelen el paso de cationes, incluyendo el agua protonada. De manera adicional, la formación de puentes de hidrógeno (H) dentro del poro en la región entre los residuos de oxígeno y las cargas positivas parciales de los residuos de Asn en el motivo NPA, resulta en el movimiento de agua a través del poro (Andrews *et al.*, 2008; Fig. 4). Sin embargo, a través de simulaciones dinámicas se observó que el número de enlaces H que forman las moléculas de agua (que se rompen inmediatamente) con los residuos de las cadenas laterales se correlaciona con la capacidad de transporte de agua del canal, donde más enlaces H producen una menor permeabilidad (Horner *et al.*, 2015). Por lo tanto, la conformación estructural de las AQP está relacionada a su permeabilidad. Se ha logrado calcular que en promedio cada monómero tiene la capacidad de translocar 10^9 moléculas de H_2O s^{-1} (Hashido *et al.*, 2007). Las AQP pueden dividirse en dos

grandes subfamilias, dependiendo de su funcionalidad, aquellas que sólo transportan agua, denominadas AQP ortodoxas y las acuagliceroporinas, capaces de transportar, además de agua, solutos neutros como el glicerol, la urea, el peróxido de hidrógeno, el amonio, el dióxido de carbono y los metaloides (Zardoya., 2005; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). La capacidad de transporte en las acuagliceroporinas se debe a que el filtro de selección es más amplio que en las AQP ortodoxas (Hacke y Laur, 2016). En el caso de las AQP ortodoxas, la región ar/R contiene una Phe en la TM2, una His en la TM5 y una Cys, Thr o Ala en LE que proporciona oxígeno al carbonilo principal, junto con una Arg que está altamente conservada tanto en las acuaporinas ortodoxas como en las acuagliceroporinas. En cambio, en las acuagliceroporinas, la Phe de TM2 es reemplazada por Trp, la His de la TM5 es reemplazada por una Gly y en LE una Phe reemplaza a Cys, Thr o Ala, dando lugar a un filtro de selectividad más amplio (Jensen *et al.*, 2001; Beitz *et al.*, 2006). Otra manera de clasificar a las AQP es a través de la extensión del extremo N-terminal, el cual poseen los motivos característicos AEF o AEFXXT, y permite clasificarlas en diferentes subfamilias (Hacke y Laur, 2016).

A)



B)

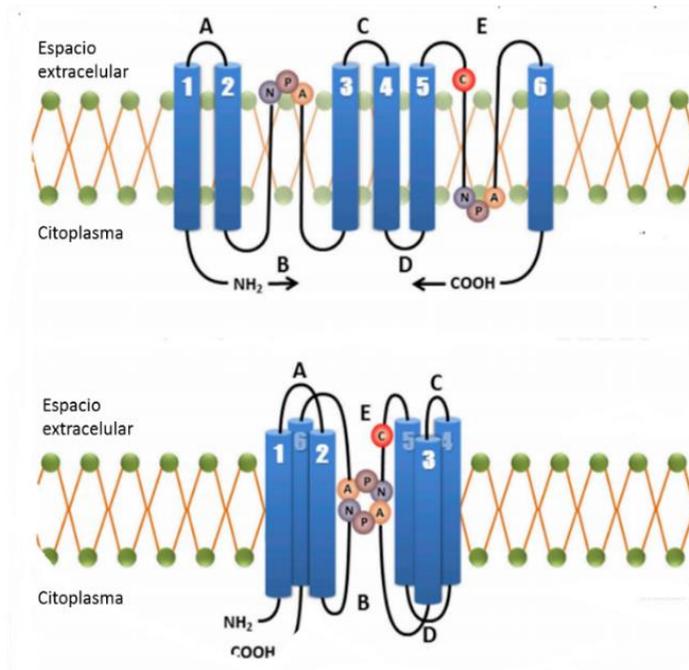


Figura 3. Características estructurales de las acuaporinas. A) Modelo tetramérico de la estructura de la acuaporina 1 (AQP5), obtenida por rayos X, en donde cada monómero (1-4) es funcional, modelo con vista desde el espacio extracelular. Las moléculas de agua en el poro se muestran como círculos rojos. Tomado y modificado de Roche y Törnroth-Horsefield, 2017. **B)** Representación de la estructura de un monómero de AQP en una membrana celular, los seis dominios transmembranales (TM 1 a 6) están conectados por cinco lazos (A-E), donde los lazos A, C y E se encuentran en el espacio extracelular y B y D en el espacio intracelular. Los lazos B y E contiene el motivo conservado NPA (marcados con círculos), que forman el poro de selectividad de este grupo de proteínas. En un círculo rojo se muestra la Cys donde los compuestos citotóxicos de mercurio se unen y bloquea la actividad de la mayoría de las AQP. Modificado de Sales *et al.*, 2013.

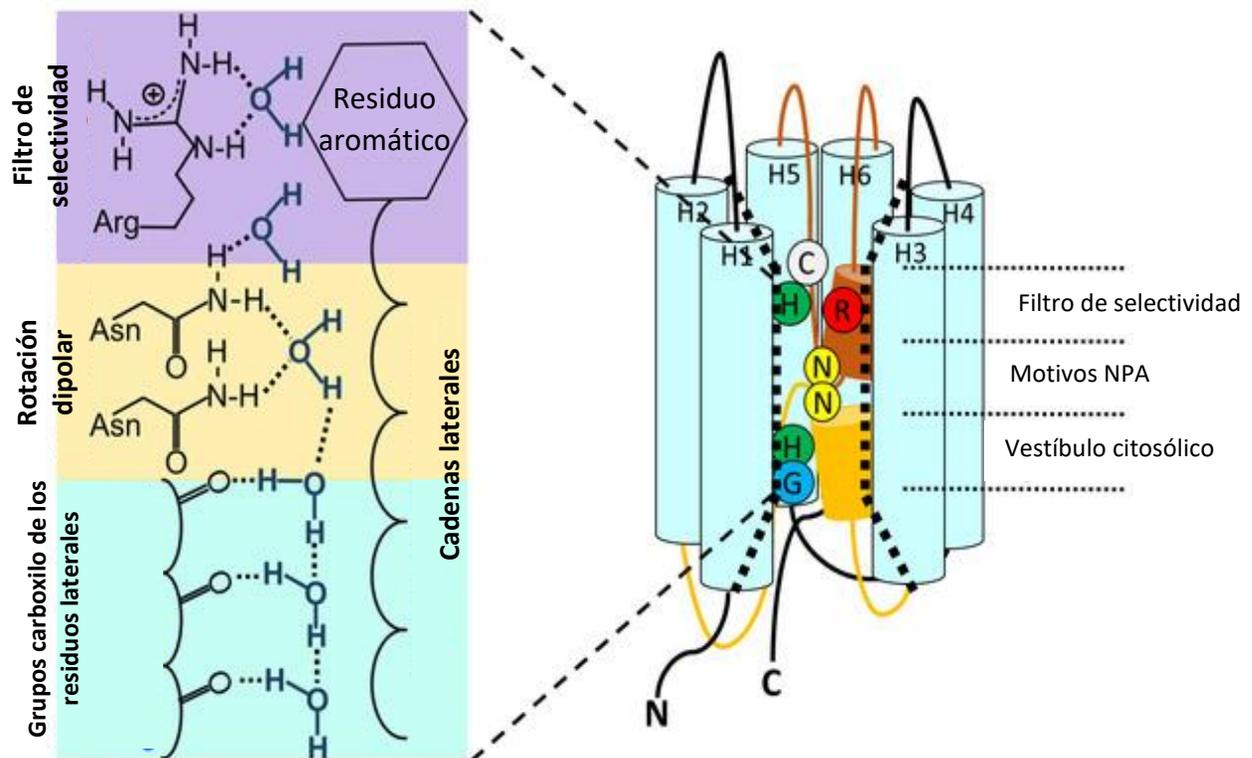


Figura 4. Modelo del transporte de agua a través del poro en las acuaporinas. Representación de configuración de “reloj de arena” de las AQP. El transporte de agua a través de las AQP inicia en el filtro de selección (ar/R), formado por un aminoácido aromático y una arginina (R), el cual se localiza 8 Å por arriba del motivo NPA, y conduce las moléculas de agua a la N (círculo amarillo), donde se crea un momento dipolar, permitiendo la repulsión electrostática que restringe la entrada de protones a través del poro. Posteriormente, en el vestíbulo citosólico los residuos donantes de enlaces de H permiten conducir a las moléculas de agua al final del canal. Los dominios transmembranales están marcados como H1 a H6. Los dominios helicoidales (HB y HE, en café y amarillo respectivamente) forman la región del poro con los motivos NPA. Los extremos carboxilo y amino de la proteína se orientan hacia el citosol. Tomado y modificado de Ozu *et al.*, 2022.

II.3 Diversidad de subfamilias de acuaporinas en plantas

Los organismos unicelulares, como las bacterias y las levaduras, poseen la menor cantidad de AQP ya que tienen de uno a cinco genes que codifican para estas proteínas (Tanghe *et al.*, 2006). En cambio, en los mamíferos se han identificado 13 AQP, las cuales poseen diversas funciones fisiológicas, como la concentración de

la orina, la secreción de fluidos, la hidratación de la piel y en el control de la presión ocular (Agré, 2004; Verkman, 2012). Sin embargo, la mayor diversidad de AQP se encuentra en las plantas, donde se han identificado hasta 70 homólogos, en *Gossypium hirsutum* (Tabla 1). La diversidad de AQP en plantas refleja su alta dinámica funcional, como *i*) la redundancia genética, *ii*) las propiedades de transporte y *iii*) los patrones de expresión y localización de acuerdo con el estado de desarrollo o condición ambiental (Yanef *et al.*, 2015). Indicando que la diversidad evolutiva de esta familia en plantas es un reflejo de su estilo de vida sésil y la necesidad de modular continuamente el flujo del agua con su entorno.

Tabla 1. Genes identificados de acuaporinas en diferentes especies de plantas.

<i>Especie vegetal</i>	<i>No. de acuaporinas</i>	<i>Referencia</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	32	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>Oryza sativa</i>	33	Sakurai <i>et al.</i> , 2005
<i>Citrus sinensis</i>	34	Martins <i>et al.</i> , 2015
<i>Zea mays</i>	36	Chaumont <i>et al.</i> , 2001
<i>Sorghum bicolor</i>	41	Reddy <i>et al.</i> , 2015
<i>Solanum lycopersicum</i>	47	Reuscher <i>et al.</i> , 2013
<i>Musa sp.</i>	50	Shekhawat <i>et al.</i> , 2013
<i>Populus trichocarpa</i>	60	Grupta y Sankaramakrishnan., 2009
<i>Glycine max</i>	66	Ali <i>et al.</i> , 2013
<i>Gossypium hirsutum</i>	71	Park <i>et al.</i> , 2012

Las AQP en las plantas participan en la movilización de agua desde el suelo, a través del sistema vascular y hasta los diferentes compartimentos intracelulares para mantener la homeostasis celular (Hacke y Laur, 2016; Afzal *et al.*, 2016). Además, están involucradas en cada fase del desarrollo y en diversas condiciones

ambientales a las que las plantas se encuentren sometidas (Hachez *et al.*, 2006). En las plantas, las AQP se han clasificado según su homología en siete subfamilias: proteínas integrales de membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP), proteínas intrínsecas parecidas a nodulina-26 (NIPs), proteínas intrínsecas básicas pequeñas (SIP), proteínas intrínsecas parecidas a GlpF (GIP), proteínas híbridas intrínsecas (HIP) y proteínas intrínsecas X (XIP) (Xu *et al.*, 2013; Kaldenhoff *et al.*, 2007). Las familias PIP, TIP, NIP y SIP están conservadas en las plantas terrestres, mientras que la familia XIP está ausente en las monocotiledóneas y en la familia *Brassicaceae* (Chaumont y Tyerman, 2014). Así mismo, las familias HIPs y GlpF sólo están presentes en plantas no vasculares como *Physcomitrium patens* y *Selaginella moellendorffi* (Danielson y Johanson, 2008).

La clasificación de las PIP y TIP podría referirse a que su localización subcelular es exclusiva a la membrana plasmática (MP) y a la membrana de la vacuola, el tonoplasto (TP), respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que la relación entre la clasificación y la localización subcelular en estas dos familias no se cumple, ya que existen reportes *in planta* que muestran que las PIP y TIP pueden localizarse en membranas diferentes a la MP o TP, dependiendo de las necesidades fisiológicas (Barkla *et al.*, 1999; Vera-Estrella *et al.*, 2004).

II.4 Las acuaporinas tipo PIP1 y PIP2

La subfamilia más grande de AQP en plantas, con 13 miembros en *Arabidopsis* y *Zea mays* es la PIP. Esta subfamilia, se divide en dos grupos diferentes, PIP1 y PIP2, además cada subgrupo puede estar conformado por varias isoformas, por ejemplo, PIP1;1 y PIP1;2 (Danielson y Johanson, 2008; Hacke y Laur, 2016). Las

isoformas dentro de la familia PIP crean diversidad molecular y por consiguiente diversidad dentro de los procesos de regulación, por ejemplo, en *Z. mays* y en *Oriza sativa* se ha observado que ciertas isoformas de PIP se localizan específicamente en subdominios del haz vascular de la raíz, y en *A. thaliana* se ha determinado que ninguna isoforma de la familia PIP posee el mismo patrón de expresión, lo cual indica que cada isoforma posee una función y localización específica (Abascal *et al.*, 2014). La separación de las subfamilias PIP1 y PIP2 ocurrió por análisis filogenético (Kjellbom *et al.*, 1999; Vera-Estrella y Bohnert, 2011). Las PIP1 tienen el extremo N-terminal más extenso que las PIP2, y éstas a su vez, poseen un C-terminal más extenso que las PIP1. Ambas subfamilias tienen el extremo N-terminal más largo que las AQP pertenecientes a la familia TIP (Schäffner, 1998). En cuanto a su funcionalidad, se ha determinado para varias especies, que las PIP1 son menos permeables al agua ($P_f = 0.2$ a 2×10^{-2} cm s⁻¹), comparadas con las PIP2, que son altamente permeables al agua ($P_f = 0.5$ a 20×10^{-2} cm s⁻¹; Hernández, 2007; Chaumont *et al.*, 2000; Moshelion *et al.*, 2002, Fetter *et al.*, 2004; Suga y Maeshima, 2004; Sakurai *et al.*, 2005). Por otro lado, la capacidad de interacción entre monómeros de PIP1 y monómeros de PIP2 para formar tetrámeros funcionales ha sido demostrado ampliamente en varias especies vegetales (Zelazny *et al.*, 2007; Fetter *et al.*, 2004). Actualmente, todas las estructuras resueltas por medio de cristalografía corresponden a homotetrámeros, los cuales tienen el LA de cada monómero orientado hacia al centro del tetrámero, lo cual propicia que los residuos de Cys presentes formen un puente disulfuro entre monómeros adyacentes (Fig. 5). La comparación estructural de las PIP1 con las PIP2 por medio de simulaciones de dinámica molecular permitió identificar que se pueden formar puentes disulfuro

entre monómeros de PIP1 y PIP2, que conducen a la conformación de la estructura heteroligomérica (Fetter *et al.*, 2004; Chaumont *et al.*, 2005), con una estequiometría de 3:1, 1:3 y 2:2 entre los monómeros PIP1 y PIP2 en *Z. mays* y *Beta vulgaris* (Berny *et al.*, 2016; Jozefkowicz *et al.*, 2016). Por su parte, la conformación heteroligomérica impacta en la permeabilidad al agua, debido a que la expresión conjunta de PIP1 y PIP2 incrementa el flujo de agua significativamente en ovocitos de *X. leavis*, a diferencia de la permeabilidad registrada con el homoligómero al expresar independientemente a cada una de las AQP (Fetter *et al.*, 2004; Temmei *et al.*, 2005). El incremento de permeabilidad al agua a través del heteroligómero se ha registrado en varias especies como *Mimosa pudica* (Temmei *et al.*, 2005), *O. sativa* (Matsumoto *et al.*, 2009), *Beta vulgaris* (Bellati *et al.*, 2010), *Fragaria x ananassa* (Yanef *et al.*, 2014), *Nicotiana tabacum* (Otto *et al.*, 2010) y *Arabidopsis* (Sorieul *et al.*, 2011), y entre varias isoformas de una misma especie, como en *Z. mays*, donde *ZmPIP1*;2 puede interaccionar con diferentes miembros tipo *ZmPIP2*, (Fetter *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2007).

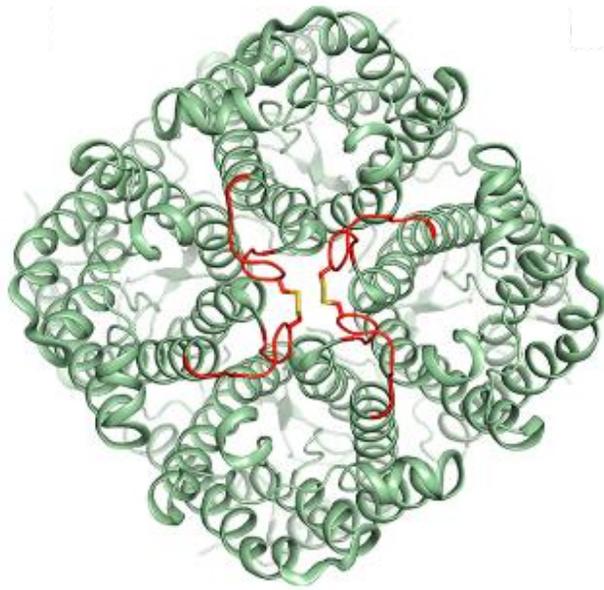


Figura 5. Modelo tridimensional de la estructura tetramérica en la familia PIP. Representación de la estructura cuaternaria de un homotetrámero de SoPIP2;1. Dos monómeros adyacentes comparten un puente disulfuro entre los residuos de Cys 69 (en amarillo) presentes en LA (mostrados en naranja) de cada monómero. La distancia entre los átomos de azufre es de 6.2 Å. Tomado y modificado de Roche y Törnroth-Horsefield, 2017.

II.5 El tránsito intracelular de las PIP

La localización final de una proteína dentro de una célula proporciona el contexto fisiológico para su función y regulación. Las PIP son proteínas de membrana que son sintetizadas e insertadas co-traduccionalmente en la membrana del retículo endoplasmático (RE) (Fig. 6), sitio celular donde también ocurre la formación de puentes disulfuro entre monómeros adyacentes para la conformación de tetrámeros funcionales (Bienert *et al.*, 2012). Posteriormente, para su localización en la MP, las PIP se mueven entre organelos por medio de vesículas a través de tráfico vesicular. Este proceso, inicia en el RE, por medio de motivo di-acídico (D/ExD/E) presente en el extremo C-terminal de las PIP, el cual permite que los tetrámeros interaccionen y sean cargados en las vesículas tipo COPII (por su nombre en inglés, **Coat complex**

protein II), para ser dirigidas hacia el Aparato de Golgi (AG, Fig. 6, Chavalier *et al.*, 2015; Hachez *et al.*, 2013, Zelazny *et al.*, 2007). La presencia del motivo di-acídico está predominantemente presente en las PIP2. De hecho, cuando se expresaron independientemente en células de *Z. mays*, *ZmPIP1;2*, que no posee el motivo, ésta se retiene en el RE, mientras que *ZmPIP2;5* se encuentra en la MP, indicando que gracias a la presencia del motivo di-acídico, *ZmPIP2;5* es capaz de moverse del RE hacia la MP. Sin embargo, al co-expresar ambas PIP, se produce la relocalización de *ZmPIP1;2* del RE a la MP, lo cual permitió identificar que la interacción entre las dos isoformas es importante para que las PIP1 puedan ser cargadas a las vesículas COPII (Zelazny *et al.*, 2007 y 2009). Otro ejemplo de la influencia de las PIP2 en la localización de las PIP1 se observó estudiando las AQP de cebada (*Hordeum vulgare*). *HvPIP1;2* al expresarse en ovocitos de *X. leavis* no se localizó en la MP, sin embargo, al expresar una versión quimérica, en la cual las regiones N- y C-terminal fueron reemplazadas con las regiones correspondientes de *HvPIP2;4*, se produjo que la versión quimérica de *HvPIP1;2* se localizara en la MP (Shibasaka *et al.*, 2020). Esto confirmó que en el N- y C-terminal de *HvPIP2;4* existen determinantes importantes para que ocurra el tráfico intracelular hacia la MP. Así mismo, se ha considerado que la presencia o relación entre homo y heterooligómero es una forma de regular a nivel postraduccional la permeabilidad al agua a nivel celular (Singh *et al.*, 2020). Sin embargo, la maquinaria celular que participa en el tráfico post-Golgi de las PIP no se tiene claro. Se hipotetiza que este proceso continúa hacia la red del trans-Golgi (TGN/EE), y que a partir de ahí se crean vesículas cargadas con PIP hacia la MP (Hachez *et al.*, 2012). En *Z. mays* y *A. thaliana* se conoce que los receptores de proteínas de fusión sensible a la N-

etilmaleimida (Q-SNARE) SYP121 o SYP61, y las proteínas asociadas a la membrana de vesículas 721 (VAMP721) y 722 (VAMP722), participan en la fusión de las vesículas que contiene a las PIP con la MP (Besserer *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Una vez en la MP, se conoce que las PIP están sujetas a eventos de difusión lateral de entre el 20 al 46%, lo cual se evidenció al realizar experimentos tipo FRAP (por su nombre en inglés, **F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hoto**bleaching**; Fig. 6, Besserer *et al.*, 2012, Luu *et al.*, 2012).

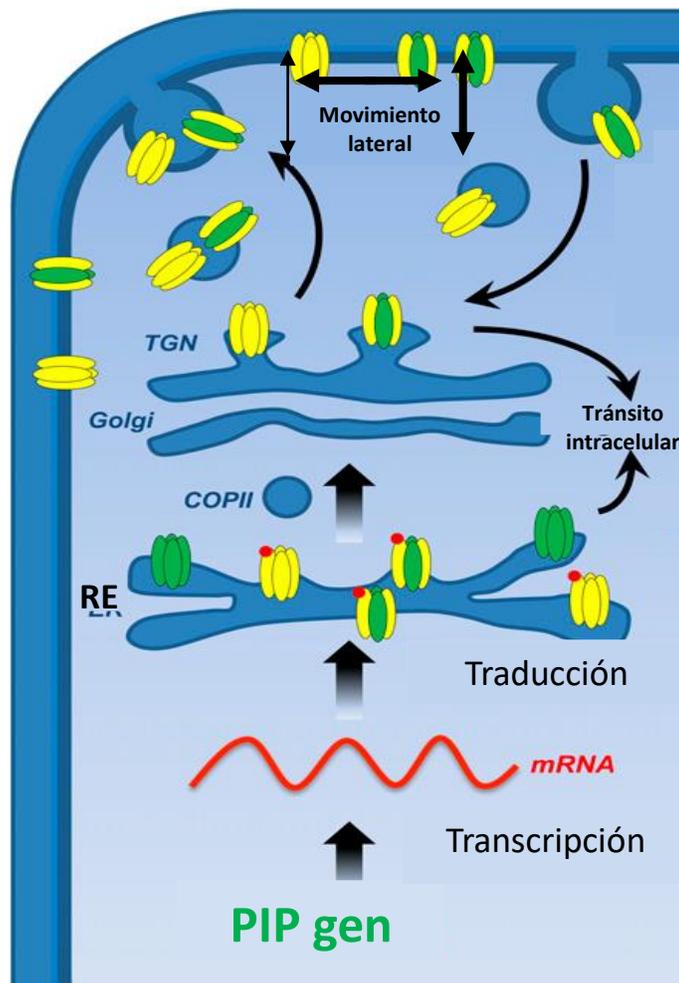


Figura 6. Modelo del tránsito intracelular de las PIP. Los transcritos de las PIP son traducidos en el RE (mRNA, línea roja). Las PIP2 (ovalos amarillos, ●) o PIP1 (ovalos verdes, ●) forman homo o heterotetrámeros. En el extremo C-terminal las PIP2 poseen el motivo di-acídico (D/ExD/E, círculo rojo, ●), el cual funciona como una señal de salida del RE, y permite que los tetrámeros sean cargados en las vesículas tipo COPII, para finalmente ser transportados al AG. Posteriormente llegan al TGN/EE y se cargan en vesículas secretoras para ser enviadas a la MP, donde las sintaxinas SYP121, SYP61, VAMP721 y VAMP722 participan en su inserción y fusión con la MP. Una vez en la MP, las PIP pueden presentar movimiento lateral, y dependiendo si su conformación es de homo o heterotetrámero, presentar permeabilidad al agua diferencial. La internalización de las PIP desde la MP hacia compartimentos intracelulares, también se regula por medio de tráfico vesicular. Tomado y modificado de Chaumont y Tyerman, 2014.

II.6 Las vesículas de clatrina y su participación en el tránsito intracelular de AQP

Las vesículas de clatrina (CCV, por su nombre en inglés **Clathrin Coated Vesicles**) participan en diferentes procesos del tráfico intracelular post-Golgi de AQP (Dhonukshe *et al.*, 2007; Pertl-Obermeyer *et al.*, 2015). Las CCV poseen una cubierta formada por la interacción de unidades triméricas denominadas, triskelion. Cada triskelion está formado por la interacción entre tres cadenas pesadas de clatrina de aproximadamente 190 kDa (CHC, por su nombre en inglés **Clathrin Heavy chain**) y tres cadenas ligeras de clatrina (CLC, por su nombre en inglés **Clathrin Light chain**) de 23 a 26 kDa. Cada CHC se asocia a una CLC a través del dominio proximal que converge en el centro del triskelion, conocido como dominio de trimerización (Fig. 7). La CHC funge como la base estructural de la cubierta de las CCV, mientras que CLC regula la asociación y disociación de la estructura del triskelion. Así mismo, las unidades de triskelion pueden interaccionar entre sí, a través del N-terminal de las CHC y el dominio distal del triskelion aledaño, permitiendo la formación de caras hexagonales y pentagonales de triskelion, que inducen la invaginación de la membrana y dan como resultado la formación de una CCV (Fig. 7). CHC y CLC al ser proteínas citosólicas, requieren de los complejos adaptadores (AP) para asociarse a la membrana. Actualmente se encuentran identificados en genomas de vertebrados y de plantas, cinco diferentes tipos de AP, designados como AP1 a AP5 (Fig. 8A; Hirst, *et al.*, 2012; Deepanksha *et al.*, 2021).

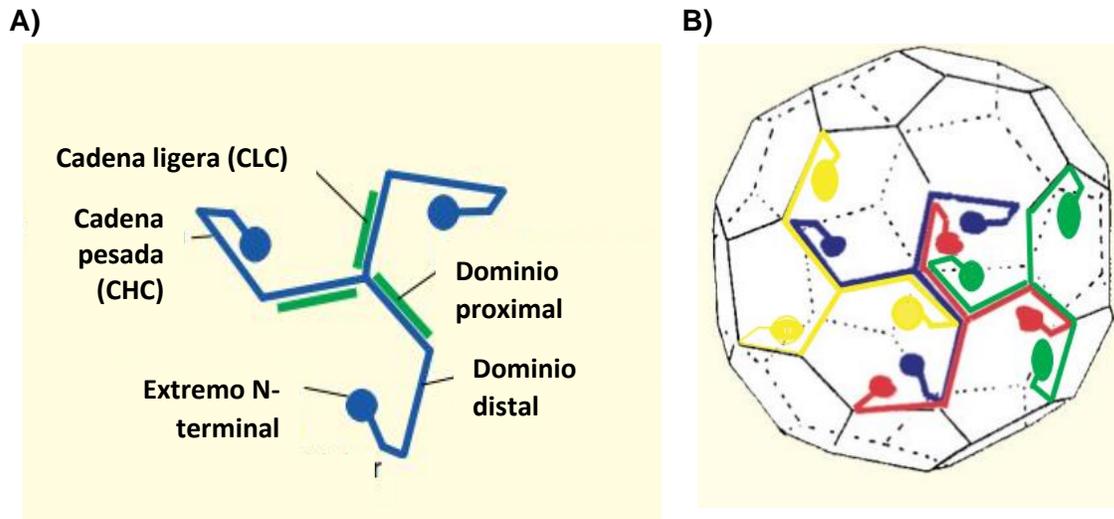


Figura 7. Modelo de la estructura del triskelion de clatrina y su conformación como CCV. A) Estructura de un triskelion mostrando el dominio distal y el proximal en CHC. La asociación de CLC a cada cadena de CHC ocurre en el dominio proximal, que es importante para la trimerización. **B)** Representación del arreglo entre cuatro triskeliones dentro de la CCV, cada color representa un triskelion independiente. Se muestran cuatro CHC diferentes interactuando a lo largo de sus dominios proximal y distales entre sí. Las cadenas CLC se omiten para una mejor visualización. Tomado y modificado de Ungewickell, 1999.

AP1 funciona en el TGN/EE, y participa en la formación de CCV que direccionan a cargos dentro de la vía secretoria o exocitosis tanto hacia la MP como a la vacuola (Park *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). AP1 también participa en la formación de la pared celular durante la citocinesis (Teh *et al.*, 2013), lo cual caracteriza al AP1 como el único adaptador que puede funcionar en eventos independientes de tráfico intracelular. Por su parte, AP2 funciona únicamente durante la endocitosis dependiente de clatrina (por sus siglas en inglés, **C**lathrin **m**ediated **e**ndocytosis) desde la MP (Yamaoka *et al.*, 2013). AP3 se localiza en el TGN/EE, y participa en la biogénesis de la vacuola (Feraru *et al.*, 2010), y en el caso de AP4, éste también se localiza en el TGN/EE, sin embargo, su localización está asociada a diferentes sub-dominios, que no empalman con AP1 o AP3, y funciona preferencialmente

dirigiendo cargos hacia la vacuola para dirigirlos hacia su degradación, lo cual diferencia su función con AP3, que se especializa en el mantenimiento de la composición de la vacuola (Fuji *et al.*, 2016). Por último, la función de AP5 no es clara, pero su localización se ubica en el cuerpo multivesicular (por sus siglas en inglés, **Multi-vesicular body**), y en mamíferos en los lisosomas (Law *et al.*, 2022). Los AP se caracterizan por ser complejos tetraméricos constituidos por dos subunidades grandes, siendo la primera β 1 a 5, y la segunda α , γ , δ , ϵ , ζ , dependiendo el tipo de AP. Por su parte, las subunidades mediana y pequeña se denominan μ 1-5 ó σ 1-4, respectivamente (Fig. 8B). Las dos subunidades grandes tienen la capacidad de interactuar con la cabeza de los fosfoinosítidos de la membrana, por medio de residuos básicos ubicados en el N-terminal, lo cual permite crear una plataforma para la formación de las CCV. Así mismo, los AP se organizan en tres regiones principales, llamadas bisagra, apéndice y centro. Las subunidades grandes contienen la secuencia consenso LFXFD/E en el dominio bisagra, caracterizado por ser largo, flexible e importante para la interacción con el N-terminal de CHC, lo cual permite la interacción con los triskeliones de clatrina (Figura 8B, Kirchhausen *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2014; Kovtun *et al.*, 2020). En cuanto a la región del apéndice, ésta se considera regulatoria, ya que tiene la capacidad de interactuar con cerca de 20 proteínas, las cuales participan en la formación o disociación de las CCV (Fig. 8B). Por otro lado, el dominio N-terminal en las dos subunidades grandes junto con las subunidades μ y σ forman el "núcleo" de los AP. Actualmente se conoce que la subunidad μ a través del C-terminal, identifica los residuos citosólicos YXX Φ (donde Y es tirosina, X cualquier aminoácido y Φ un

aminoácido hidrofóbico), presentes en las proteínas a incorporar o cargos de las CCV (Fig. 8B y C, Robinson *et al.*, 2014, Martina *et al.*, 2001).

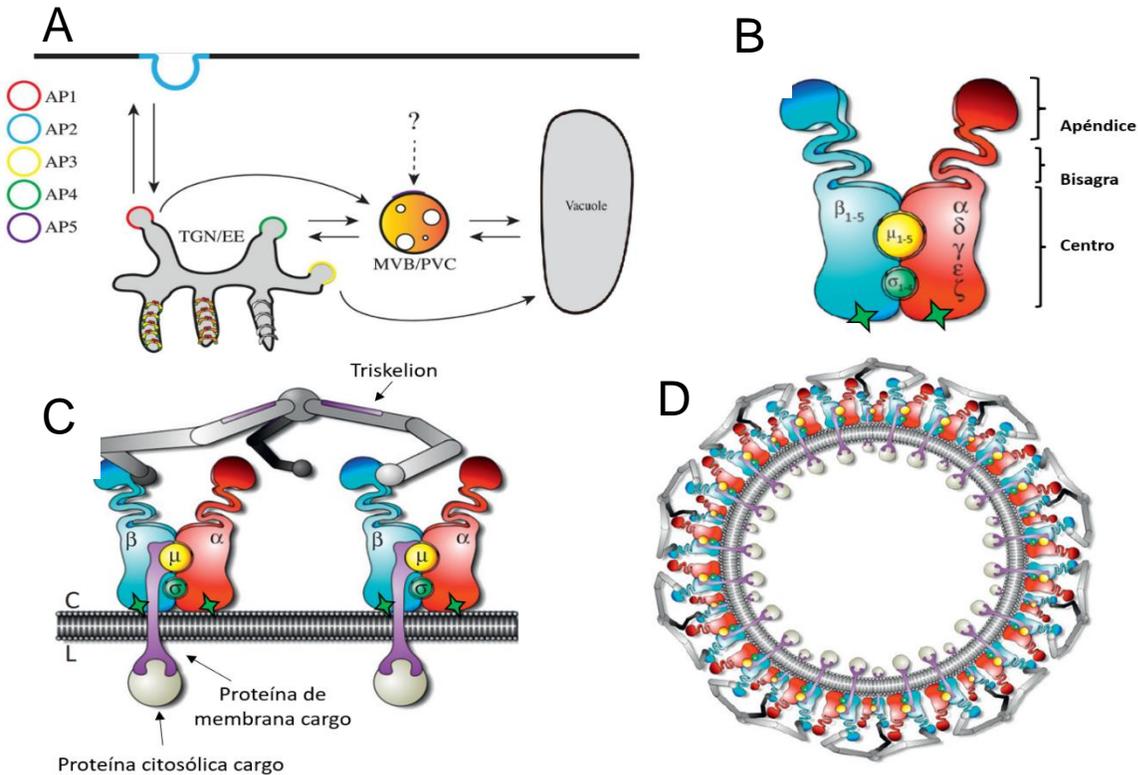


Figura 8. Los complejos adaptadores de las CCV. A) Localización y función de los cinco AP que participan en la formación de CCV. **B)** Conformación de los complejos AP, formados por cuatro subunidades, dos grandes, una mediana y una pequeña. Ambas subunidades grandes poseen motivos básicos (indicados con una estrella) que permiten la interacción del AP con los fosfoinosítidos presentes en las diferentes membranas celulares. El complejo AP está dividido en tres secciones, el centro, la bisagra y el apéndice. La bisagra tiene la capacidad de interactuar con el N- terminal de la CHC. El núcleo de los AP se caracteriza por tener la capacidad de reconocer las proteínas cargo para incorporarlas a las CCV por medio de la subunidad μ . **C)** Interacción entre el AP que funciona como interfase entre la cubierta y la membrana desde donde se forma la vesícula, se ejemplifica la interacción entre la subunidad μ y una proteína cargo membranal (morado) o citosólico (blanco). **D)** Representación de un corte transversal de una CCV mostrando la cubierta externa formada por la interacción entre las cadenas de CHC y el dominio de la bisagra. Tomados y modificados de Robinson y Pimpl, 2014; y Law *et al.*, 2022.

La capacidad de interacción entre una AQP y la subunidad μ de un AP se identificó inicialmente en la AQP4 de mamíferos. En las células epiteliales, AQP4 mantiene

su localización basolateral por medio del reconocimiento e interacción proteína-proteína del motivo YXXΦ, localizado en el C-terminal, con la subunidad μ del AP2 (AP2μ). Esta interacción permite que a través de la endocitosis se regule y mantenga la localización polarizada de AQP4. Aunado a esto, se identificó que una vez endocitada, AQP4 puede reciclarse de regreso a la membrana basolateral o ser enviada a su degradación hacia el lisosoma, dependiendo del estado fisiológico de la célula. Para ser enviada a degradación, se requiere de la fosforilación de la S276 y la interacción entre el motivo YXXΦ en el C-terminal de la AQP4 con la subunidad μ del AP3 (AP3μ), proceso que es necesario para disminuir la abundancia de la AQP en células expuestas a edema. Estos datos permitieron determinar cómo las diferentes rutas usadas por los diferentes AP tienen la capacidad de interactuar con el C-terminal de las AQP y, por consiguiente, regular la abundancia de éstas en la membrana, lo cual resulta en el control de la permeabilidad al agua a nivel celular de acuerdo con las necesidades fisiológicas (Madrid *et al.*, 2001).

En plantas se ha determinado a través del uso del colorante fluorescente y selectivo de membrana, el FM4-64 (N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) hexatrienilo) piridinio dibromuro), que las AQP se endocitan por medio de CCV (Dhonukshe *et al.*, 2007). Esto se debe a que el FM4-64 se caracteriza por ser una molécula no-fluorescente en medio acuoso, pero al unirse a la cara externa de la MP a través sus colas lipofílicas, se torna fluorescente en el medio hidrofóbico. Una vez que se une a la capa lipídica, el FM4-64 se internaliza por la vía endocítica y se distribuyen por el sistema endosomal. Así mismo, el tráfico endocítico por medio de CCV de AQP se ha analizado por medio del uso conjunto del FM4-64 y la Trifostina

A23 (TryA23). La TryA23 se caracteriza por bloquear específicamente la interacción entre la subunidad μ del AP2 y el motivo citosólico YXXØ, a diferencia de su análogo inactivo TryA51 (Banfury *et al.*, 2003). Evidencia experimental de la inhibición de la endocitosis por medio de la TryA23 está disponible para AtPIP1;2 y AtPIP2;1 (Wudick *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2011, Luu *et al.*, 2011). Sin embargo, el motivo YXXØ está presente en el C-terminal de todos los miembros de PIP1 y PIP2 tanto, de *A. thaliana* como de *Z. mays* (Hachez *et al.*, 2013), pero aún no se cuenta con datos experimentales que demuestren la interacción proteína-proteína entre la subunidad μ del AP2 y las PIP. Aunado a esto, es posible que las PIP tengan la capacidad de interacción con otros AP dentro de otra ruta de tráfico intracelular dependiente de CCV. En un estudio proteómico realizado en mutantes *ap3 β* y *ap4 β* , se observó un cambio en la distribución de PIP1 y PIP2, lo cual indicó que la mutación en ambos AP afectó la localización celular de las PIP, fenómeno que se corroboró al observar menor permeabilidad al agua de los protoplastos aislados de estas líneas mutantes, indicando, por consiguiente, para la localización y funcionamiento de las PIP, los componentes de AP3 y AP4 son necesarios (Pertl-Obermeyer *et al.*, 2016). A pesar de estos reportes aún no existe evidencia experimental entre la interacción proteína-proteína entre la subunidad μ de los AP y las PIP en plantas.

II.7 Cambio de localización de las PIP en respuesta a estrés salino en glicófitas

El ajuste de la composición proteica de las diferentes membranas celulares por medio del transporte de proteínas a través de vesículas es un proceso indispensable para percibir y responder favorablemente a condiciones de estrés (Levine, 2002). Las plantas, al ser organismos sésiles, están sujetas a los cambios constantes en

las condiciones ambientales. El estrés salino es uno de los principales causantes de la pérdida de cultivos agrícolas, y se estima que para el año 2050 el 50% de la tierra cultivable a nivel global estará afectada por la salinización (Wang *et al.*, 2003). La salinización de un suelo ocurre cuando existe una acumulación o deposición de sales solubles en el agua, que induce que la conductividad eléctrica del suelo en su extracto de saturación sea mayor a 4 dS m^{-1} , lo cual equivale a una concentración de 40 mM de NaCl en el suelo (Rengasamy, 2006). Este tipo de suelos, se originan por el uso de fertilizantes; y a la exacerbada irrigación de cultivos agrícolas con agua con alto contenido de Na^+ (Carrillo *et al.*, 2011). Las plantas que no pueden crecer en suelos salinizados se denominan glicófitas y tienen como límite de exposición concentraciones no mayores a 50 mM de NaCl (Munns y Termaat, 1986). Como representantes de las glicófitas podemos mencionar a la mayoría de los cultivos agrícolas de importancia económica como el maíz, la soya y el frijol. Subsecuentemente, la salinidad constituye una de las condiciones ambientales que produce pérdidas significativas en la producción agrícola. Bajo condiciones de salinidad se produce tanto estrés iónico como estrés osmótico en las glicófitas (Afzal *et al.*, 2016). El estrés iónico se refiere al efecto tóxico que puede causar el exceso de NaCl que ingresa y se acumula en las células, afectando el metabolismo de la planta a través de la inhibición enzimática, el desequilibrio iónico, la deficiencia en la fotosíntesis e incluso la necrosis del tejido (Horie *et al.*, 2012). Por su parte, el estrés osmótico produce un desbalance hídrico en la planta, esto se debe a que el exceso de sales en el suelo induce la disminución de la L_{pr} , proceso que evita la absorción de agua y también desencadena el cierre de los estomas, lo cual limita el intercambio de gases con la atmósfera y lleva a la deshidratación celular (Munns,

2002, Läuchali y Grattan, 2007; de Oliveira *et al.*, 2013). Bajo este panorama, se conoce que la disminución de la L_{pr} está directamente relacionada con la disminución en la abundancia y/o actividad de las PIP de la MP (Boursiac *et al.*, 2005; Sutka *et al.*, 2011). Por ejemplo, en tomate, después de 40 min de un tratamiento con 100 mM de NaCl, se provoca la disminución de la L_{pr} (Peyrano *et al.*, 1997), y en melón se observa una reducción de hasta el 80% del valor de la L_{pr} después de 3 días de exposición a la salinidad (Carvajal *et al.*, 2000).

En *A. thaliana* se ha logrado estudiar con más detalle el efecto del estrés salino en la localización y abundancia de las PIP en la MP. Por ejemplo, se ha identificado que la reducción de la L_{pr} está relacionada con la internalización de AtPIP2;1-GFP en estructuras intracelulares (Boursiac *et al.*, 2005 y 2008), proceso que ocurre por endocitosis (Muries *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Zwiewka *et al.*, 2015; Hachez *et al.*, 2013; Luu *et al.*, 2012). Así mismo, se sabe que la exposición a 100 mM de NaCl produce la de-fosforilación de la Ser283 en el C-terminal de AtPIP2;1, y este cambio funge como una señal para que ocurra la endocitosis de la AQP desde la MP. El destino de las PIP endocitadas en condiciones de salinidad, es su degradación en la vacuola vía el compartimento pre-vacuolar (PVC, por sus siglas en inglés, **P**re-**v**acuolar **c**ompartiment; Boursiac *et al.*, 2008). Con base en estos datos, se propuso que la internalización de PIP en *A. thaliana*, por medio de CME (por su nombre en inglés, **C**lathrin **m**ediated **e**ndocytosis), es una respuesta temprana que se desarrolla en esta planta para disminuir la abundancia de estas proteínas, y así, evitar la pérdida de agua que se induce por el cambio del ψ_w del suelo, a causa del exceso de NaCl (Boursiac *et al.*, 2005; Baral *et al.*, 2015).

También se ha reportado que en la raíz de *A. thaliana* el estrés salino induce un incremento significativo de la endocitosis (Leshem *et al.*, 2007), lo cual ocurre al inicio del estrés, respuesta que evita el daño celular por plasmólisis a corto plazo (Baral *et al.*, 2015; Zwiewka *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante recalcar que, a pesar de estas respuestas tempranas, *A. thaliana* no es capaz de sobrevivir por periodos largos en concentraciones mayores a 50 mM de NaCl, y en el transcurso de pocos días se producen efectos negativos en el metabolismo celular. Estos datos indican que la endocitosis de AQP, no es suficiente para que *A. thaliana* sea capaz de evitar la deshidratación y tolerar altos niveles de salinidad en el suelo.

II.8 Las halófitas como modelo de estudio del transporte eficiente de agua durante condiciones de salinidad

Las halófitas son plantas que tienen la capacidad de sobrevivir y reproducirse, aún en presencia de concentraciones por arriba de 200 mM de NaCl en el suelo (Shabala, 2013). Las halófitas representan tan sólo el 1% del total de plantas terrestres y crecen en hábitats con alto contenido de sales, como las regiones costeras, las marismas y los desiertos (Flowers y Colmer, 2008). En este tipo de plantas se ha reportado la capacidad tolerar hasta 1000 mM de NaCl en el suelo, y algunos géneros representativos son *Atriplex*, *Salicornia*, *Suaeda*, *Zostera* y *Mesembryathenum*. (Khan *et al.*, 2005; Flower *et al.*, 2010). Una manera de diferenciar entre una halófito y una planta sensible al estrés salino es su capacidad de producir biomasa durante un periodo determinado en condiciones de salinidad (Munns, 2002). La diferencia entre la adaptación y la sensibilidad reside en los

mecanismos de regulación y en la velocidad con la cual las diferentes especies son capaces de responder al estrés salino (Zhu *et al.*, 2000).

Las halófitas acumulativas se caracterizan por tomar el NaCl del medio y transportarlo hacia la parte aérea de la planta, en donde lo acumulan y lo utilizan para el ajuste osmótico, junto con la síntesis de solutos compatibles. Como consecuencia, en las raíces de las halófitas existe una concentración menor de NaCl, lo que favorece el consumo y el transporte del agua al interior de la planta (Adams *et al.*, 1992). Por lo cual, las halófitas se han presentado como un modelo ideal para el estudio del transporte eficiente de agua bajo condiciones de salinidad elevada. Se ha observado, además, que las halófitas mantienen la L_{pr} a pesar de estar sujetas a periodos largos de salinidad. Respuesta que se ha asociado al aumento en el transporte de agua a través de las membranas celulares, lo cual se ha atribuido, principalmente, al aumento en la abundancia de AQP (Alexandersson *et al.*, 2005, Aroca *et al.*, 2001 y 2012; Sutka *et al.*, 2011). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados para que ocurra esta respuesta en las halófitas aún no se tienen esclarecidos.

III. ANTECEDENTES

III.1 Las acuaporinas de *Mesembryanthemum crystallinum* y sus mecanismos de regulación

M. crystallinum es una halófito que se utiliza como modelo biológico para el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad y a la sequía. *M. crystallinum* es una planta que posee mecanismos especializados para sobrevivir y crecer en regiones áridas, con alto contenido de sales disueltas en el suelo (Adams *et al.*, 1998). En esta halófito se ha observado que para mantener un balance hídrico óptimo en condiciones de salinidad y/o de estrés osmótico, es necesaria la expresión y regulación diferencial de las AQP (Kirch *et al.*, 2000; Vera-Estrella *et al.*, 2004 y 2012). *M. crystallinum* se caracteriza por cambiar de metabolismo C3 a CAM (por sus siglas en inglés, Crassulacean Acid Metabolism) cuando alcanza la etapa adulta. Dicho metabolismo le permite evitar la pérdida de agua, debido a que durante la noche se lleva a cabo el intercambio gaseoso, y durante el día los estomas se mantienen cerrados. Además, *M. crystallinum* cuenta con un tipo de células modificadas en la epidermis, llamadas células tipo vejiga, cuya función principal es la acumulación de agua y hasta 1M de Na⁺ (Adams *et al.*, 1998). Además de las células tipo vejiga, esta planta también tiene la capacidad de almacenar el Na⁺ en las vacuolas de todas las células de las hojas y el tallo. Como consecuencia, en las raíces de esta halófito existe una concentración menor de NaCl, lo que favorece el consumo y el transporte del agua, y gracias a la síntesis de solutos compatibles como el pinitol, el ononitol y la prolina, se mantiene el potencial osmótico de la planta (Adams *et al.*, 1992 y 1998).

En *M. crystallinum* se han identificado seis genes PIP, *McPIP1;2*, *McPIP1;4* y *McPIP1;5*, de la subfamilia PIP1 y *McPIP2;1*, *McPIP2;2* y *McPIP2;8*, de la subfamilia PIP2 (Kirch *et al.*, 2000). En esta halófito, a diferencia de su contraparte la glicófito *A. thaliana*, la abundancia de AQP no disminuye, bajo tratamiento con 200 mM de NaCl por 5 días, sino al contrario la abundancia de estas proteínas incrementa (Vera-Estrella *et al.*, 2004 y 2012; Amezcua-Romero, 2012). En el caso de *McPIP1;4*, que se caracteriza por ser una acuagliceroporina que se expresa en las células asociadas al floema de las hojas y de la raíz (Kirch *et al.*, 2000), bajo eventos de salinidad en el suelo, incrementa su abundancia proteica total (Hernández-Domínguez, 2007). Un comportamiento similar se observa en la acuaporina *McPIP2;1*, específica de la raíz, y con alta permeabilidad al agua, que se localiza sub-celularmente en el RE, el AG, el TP y la MP. Al igual que *McPIP1;4*, la abundancia de *McPIP2;1* se incrementa por estrés salino (Amezcua-Romero, 2012). El mecanismo molecular o celular implicado en el mantenimiento de su localización y el incremento de la abundancia de ambas durante condiciones de salinidad, no está bien identificado. Sin embargo, se ha determinado que el aumento en los niveles de fosforilación, glucosilación y regulación por tránsito vesicular son tipos de regulación post-traduccionales presentes en las AQP de *M. crystallinum* (Vera-Estrella *et al.*, 2004 y 2012). Además, cuando se realizó la expresión conjunta de *McPIP1;4* con *McPIP2;1* en ovocitos de *X. laevis*, se observó un incremento en la permeabilidad al agua (Hernández-Domínguez, 2007), indicando que entre estas PIP pueden formarse heterolígomeros más activos (en términos de permeabilidad al agua), en comparación con la actividad de los homolígomeros de *McPIP2;1* o *McPIP1;4* (Hernández-Domínguez, 2007). Interesantemente, en *Z. mays* es

necesaria la formación de heteroligómeros entre AQP *ZmPIP1;2* y *ZmPIP2;1* para que la localización de *ZmPIP1;2* cambie del RE a la MP (Zelazny *et al.*, 2007), lo cual permite argumentar que en *M. crystallinum* la formación de heteroligómeros también podría influir en el tráfico intracelular de las PIP1 y PIP2.

III.2 Evidencia del tráfico de *McPIP* por medio de las CCV

Hasta ahora, todos los reportes del movimiento de AQP por las CCV y el reciclamiento de estas proteínas, se derivan del estudio de la raíz de *A. thaliana* (Dhonukshe *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Hachez *et al.*, 2013; Luu *et al.*, 2012; Zwiewka *et al.*, 2015). Sin embargo, no existe algún reporte en la literatura que haya evaluado este mecanismo de respuesta en las halófitas, la única evidencia que se tiene hasta el momento se derivó de un análisis realizado en nuestro grupo de investigación. Utilizando una muestra inicial de microsomas de raíz de plantas crecidas en presencia (T) o ausencia (NT) de 200 mM de NaCl durante 5 días, se obtuvieron 96 fracciones (Fig. 9, línea gris y negra, respectivamente), obtenidas por medio de electroforesis zonal de flujo libre (EZFL). Al analizar la distribución, se identificó que las fracciones 30 a 60 presentaron un perfil de distribución similar, pero las fracciones 80 a 85 se caracterizaron por formar un grupo independiente de separación y preferencialmente hacia el cátodo del sistema EZFL, por lo cual se les denominó fracciones cargadas positivamente (FP, Fig. 9, cuadro verde). El área bajo la curva correspondiente a las FP, indicó que el contenido de proteína fue mayor en microsomas derivados de la raíz que de la hoja, representando el 19% y el 0.09% de la proteína total, respectivamente (Fig. 9, línea azul), indicando que las FP corresponden a membranas abundantes en la raíz. Posteriormente, con el

objetivo de identificar el enriquecimiento subcelular de las fracciones 20 a 60 y las FP, se analizaron por medio de anticuerpos en contra de los marcadores celulares. Se utilizó la P-ATPasa como marcador de la MP (100 kDa), la calreticulina (CTR1, 57 kDa) como marcador del RE, un polipéptido glicosilado como marcador del AG (RGP1, 41 kDa) y la subunidad VHA-E de la V-ATPasa (VHA-5, 31 kDa) o la AQP McTIP1;2 (34 kDa) como marcadores de la membrana de la vacuola o tonoplasto (TP). Las fracciones enriquecidas en TP estuvieron distribuidas entre las fracciones 20 a 37, las correspondientes a la MP entre las fracciones 38 a 46, mientras que las correspondientes al RE y el AG se empalmaron entre las fracciones 47 a 55 (Fig. 10A). Al analizar la presencia de los diferentes marcadores en las FP, se observó que poseen una naturaleza endomembranal mixta, y que en las muestras T la intensidad de todos los marcadores aumentó, lo que sugiere que las FP responden a la salinidad (Fig. 10B). Al analizar las FP por medio de espectrometría de masas (LC-MS/MS), se identificó que estas fracciones contenían un número importante de PIP, donde *McPIP1;2*, *McPIP1;4*, *McPIP2;1* y *McPIP2;5* incrementaron significativamente dos veces en su abundancia ($p < 0.05$) en las muestras T (Tabla 2). También se identificó que estas fracciones estaban enriquecidas con algunos de los componentes implicados en la formación de CCV, como CHC y la subunidad μ de los AP1 y AP2, los cuales no mostraron un cambio de abundancia por el tratamiento con NaCl (Tabla 2). Así mismo, se identificó en ambas condiciones a la proteína RABA1f, una GTPasa de la familia Rab, la cual es una proteína reguladora del movimiento vesicular entre la MP y el TGN/EE (Asaoka *et al.*, 2013), la cual incrementó 2.7 de abundancia en las muestras T ($p < 0.05$). Estos datos abrieron la posibilidad de que existiera una relación entre el incremento de abundancia de las

McPIP y su tráfico dependiente de CCV entre la MP y el sistema endomembranal en la raíz de *M. crystallinum* durante condiciones de salinidad (Gómez-Méndez, 2015).

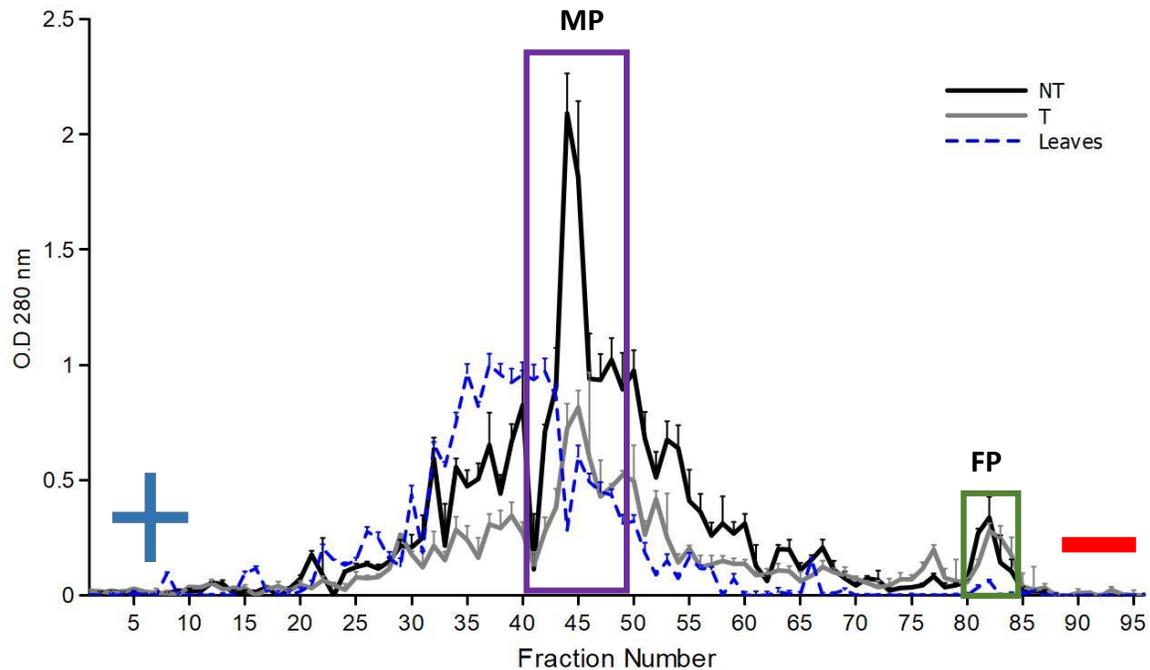


Figura 9. Identificación de fracciones de vesículas cargadas positivamente en las raíces de *M. crystallinum*. Contenido de proteína en las 96 fracciones obtenidas por EZFL de microsomas de raíz de *M. crystallinum* tratadas (T, gris) o no (NT, negro) durante 5 d con 200 mM de NaCl; el contenido de proteína en las fracciones obtenidas a partir de microsomas de hojas se muestra en azul. Los símbolos positivo y negativo representan el campo eléctrico aplicado en la cámara de separación. Las fracciones enriquecidas en MP están marcadas con un recuadro morado. Las fracciones cargadas positivamente (FP) están marcadas con un recuadro verde. n=3.

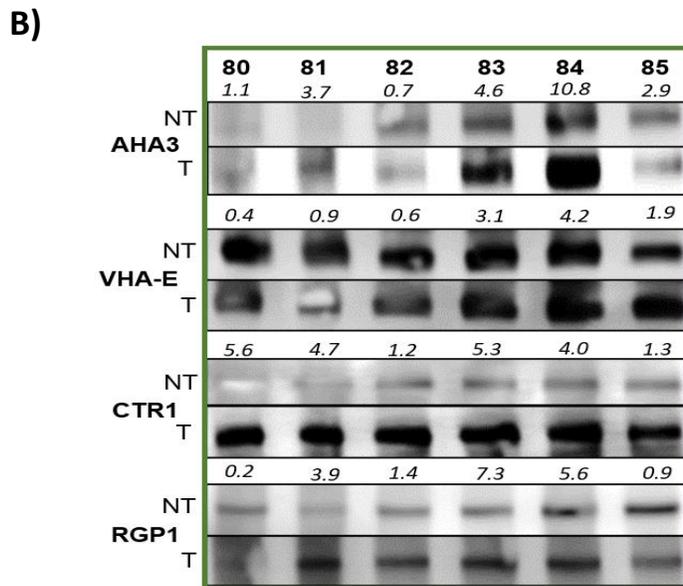
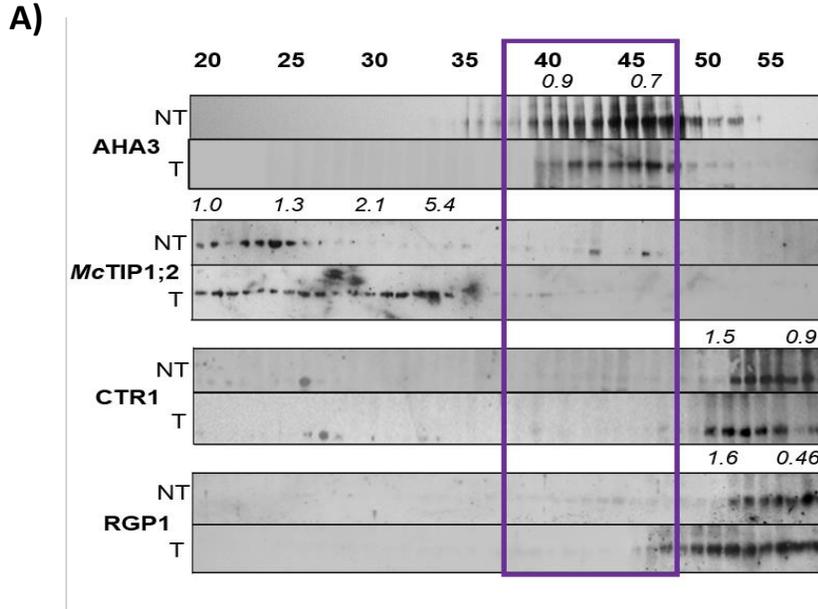


Figura 10. Las fracciones cargadas positivamente poseen naturaleza subcelular mixta. Inmunodetección de los marcadores subcelulares AHA3 (MP), *McTIP1;2* y VHA-E (TP), CTR1 (RE) y RGP1(AG) en las fracciones 20 a 55 **A)** y las FP (80 a 85) en **B)** obtenidas por EZFL. Las fracciones enriquecidas en MP están marcadas con un recuadro morado. Los números en negrita sobre cada línea del inmunoblot indican el número de fracción y el número en cursiva muestra la diferencia en abundancia (densitometría) entre T/NT. Los pesos moleculares de las proteínas marcadoras son: AHA3, 100 kDa; *McTIP1;2*, 34 kDa; VHA-E, 31 kDa; CTR1, 57 kDa; RGP1, 41 kDa. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Tabla 2. McPIP y componentes de CCV identificados en las FP.

Nombre de la proteína	Cambio de abundancia T/NT*	Valor-p*
<i>McPIP1;2</i>	1.6	0.027
<i>McPIP1;4</i>	2	0.038
<i>McPIP2;1</i>	2	0.020
<i>McPIP2;5</i>	2.1	0.007
<i>McCHC</i>	1.2	0.039
<i>McAP1μ</i>	NA	NA
<i>McAP2μ</i>	NA	NA
<i>McRABA1f</i>	2.7	0.020

**El cambio de abundancia se calculó con base en el índice de abundancia exponencial de cada proteína comparando T/NT, que es proporcional al contenido de proteína dentro de una mezcla compleja. El resultado se validó por medio de la prueba de Bonferroni, n=4. NA, indica que no existió un cambio de abundancia entre T/NT.*

IV. JUSTIFICACIÓN

La raíz de las plantas es el primer órgano en enfrentar de manera directa el estrés salino. Por ello, la habilidad de la raíz de responder de manera eficiente a estímulos externos es primordial para mantener las funciones vitales de absorción de agua y nutrientes durante las condiciones de estrés y así, poder cumplir con las necesidades fisiológicas de la planta (Chen *et al.*, 2011). Dentro de los diferentes tipos de estrés abiótico, la salinidad es una de las principales causas de la pérdida de los cultivos agrícolas y una condición en la cual se ha explorado ampliamente la respuesta y regulación de las PIP presentes en la raíz, principalmente en glicófitas (Maurel *et al.*, 2021, Chaumont *et al.*, 2014). Actualmente, ningún estudio se ha enfocado en entender la maquinaria molecular que las halófitas utilizan para incrementar la abundancia de las PIP en la MP (Sutka *et al.*, 2011; Aroca *et al.*, 2001 y 2012). Por su parte en *M. crystallinum* se observó por medio de análisis proteómicos la relación entre el incremento de la abundancia de PIP y componentes de las CCV durante condiciones de salinidad, indicando que el tráfico mediado por CCV podría estar participando en el incremento de la abundancia de las PIP en la MP, en esta halófitas (Tabla 2, Gómez-Méndez, 2015). Debido a que *M. crystallinum* es un modelo emergente de investigación, la conservación en los componentes de CCV en plantas halófitas aún no se ha explorado. Por lo tanto, un análisis que explore la maquinaria asociada a las CCV de *M. crystallinum* y cómo participan en la exocitosis, internalización, y/o reciclado de las McPIP, resulta significativo para el entendimiento de los componentes dentro del tráfico subcelular presentes en este tipo planta adaptada a la salinidad. Los resultados permitirían identificar si el cambio

de abundancia de *McPIP* en CCV y en la MP durante eventos de salinidad son procesos que ocurren paralelamente. Además, permitirá obtener evidencias que diferencian la respuesta celular en el contexto de la permeabilidad al agua entre halófitas y glicófitas, lo cual es un punto clave para el desarrollo de cultivos tolerantes a la salinidad.

V. HIPÓTESIS

Las acuaporinas tipo PIP de *M. crystallinum* pueden utilizar la vía dependiente de clatrina para su tráfico intracelular

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la vía dependiente de clatrina en el tráfico intracelular de las acuaporinas tipo PIP de *M. crystallinum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar si el incremento de la abundancia de las acuaporinas tipo PIP de la membrana plasmática, ocurre paralelamente con su incremento en las vesículas de clatrina durante condiciones de salinidad en *M. crystallinum*.
- ❖ Demostrar que *McCLC*, *McAP1 μ* y *McAP2 μ* son componentes ortólogos en la vía dependiente de vesículas de clatrina.
- ❖ Verificar por técnicas de microscopía que *McPIP2;1* y *McPIP1;4* se asocian a componentes de las vesículas de clatrina.
- ❖ Determinar la participación de la subunidad μ del complejo AP1 y del AP2 en el tráfico intracelular de las *McPIP*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Análisis evolutivo por el método de Máxima Verosimilitud

Para analizar la historia evolutiva de los componentes de CCV de *M. crystallinum*, las secuencias de proteínas para los ortólogos de los genes CLC y AP se obtuvieron del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con la herramienta BLAST (en el año de 2020) utilizando las secuencias de *A. thaliana* como referencia y estableciendo un umbral esperado de 0,05. Un total de 78 ortólogos AP de siete especies y 135 ortólogos CLC de 49 especies fueron recuperados, como grupos externos para el análisis se consideró a las proteínas homólogas de *Synechococcus sp.* y *Streptococcus pyrogenes*. Los análisis se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), y la historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Le y Gascuel (2008), para las proteínas AP, y el modelo de Whelan y Goldman (2001), para las proteínas CLC. Se encontraron valores de probabilidad de -14641.66 para el árbol de AP y -15452.87 para el árbol de CLC. Se usaron distribuciones Gamma discretas para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios y se establecieron cinco categorías con (+G, parámetro = 2.5496) para los AP; mientras que para los CLC se utilizó (+G, parámetro = 0.7554). Se eliminaron todos los puestos con menos del 75% de cobertura del sitio. En el caso de las proteínas tipo AP, el modelo de variación de velocidad permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables ([+I], 2,15 % de sitios).

VII.2 Material biológico

Las plantas de *M. crystallinum* se cultivaron a partir de semillas sembradas en sustrato Metro mix 510 (Scotts, Marysville, OH), mezclada con agrolita (DicaMex,

México), en una relación de 4:1 v/v. Tres semanas después de su germinación, las plántulas se transfirieron a recipientes de 20 o de 1 L para su cultivo hidropónico, conteniendo 0.5 X de la solución nutritiva de Hoagland's (Hoagland y Arnon, 1938), con aeración constante. Los tratamientos con sal se iniciaron seis semanas después de la germinación, que consistieron en utilizar solución de Hoagland's suplementada con 200 mM de NaCl. El tratamiento de las plantas se mantuvo por 5 días. La germinación de *N. benthamina* se realizó en macetas con el mismo sustrato antes descrito, dos semanas después de su germinación, las plántulas se trasplantaron a macetas individuales. Semanalmente se regaron con 0.5 X de la solución nutritiva de Hoagland's (Hoagland y Arnon, 1938) y cada 2 d con agua corriente. Las plantas se conservaron en un invernadero bajo radiación y fotoperiodo natural, en un intervalo de temperatura entre 12 a 28°C.

VII.3 Aislamiento de RNA total y síntesis de cDNA

Para clonar los candidatos de *M. crystallinum* identificados como componentes de las CCV, primeramente, se realizó la extracción de RNA total, utilizando 100 mg de tejido de la raíz por medio del método de Trizol™ (Invitrogen, GE Healthcare, México). En un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido, se congeló el tejido y subsecuentemente se pulverizó con un pistilo. Una vez pulverizado, se añadió 1 mL de Trizol™ y se continuó triturando hasta la formación de una mezcla homogénea, la cual se transfirió a un microtubo de 1.5 mL. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo-alcohol isoamílico en una relación 24:1, se mezcló durante 15 s y se incubó por 2 min, para separar las fases, durante 5 min a 13000 g_{av} en una centrífuga refrigerada

5415R (Eppendorf, EUA). La fase acuosa se colectó y se le añadieron 500 μ L de alcohol isopropílico. La muestra se incubó por 10 min a temperatura ambiente, para finalmente centrifugar por 10 min a 13000 g_{av} , y obtener una pastilla que se lavó con etanol al 70% y se dejó secar durante 5 min para después re-suspenderla con DEPC-H₂O. La calidad del RNA se analizó por medio de un gel desnaturizante de agarosa al 1%. Para la síntesis de cDNA se utilizaron 5 μ g del RNA total, 50 mM de oligo d(T), 10 mM de dNTPs, y 200 unidades de la enzima RT-MLV transcriptasa reversa (Fermentas, México), durante una hora a 42 °C.

VII.4 Clonación de los genes y generación de vectores

La clonación de *McPIPs* se llevó a cabo utilizando la tecnología Gateway® (Thermo Fisher), y utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla XI.1. Brevemente, el ADN complementario (cDNA) de *McTIP1;2*, *McPIP1;4* (Vera-Estrella *et al.*, 2012) y *McPIP2;1* (Amezcuca-Romero *et al.*, 2010) sin codón de paro, se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR se insertaron en el vector pDONR221 (Gateway® pDONR™ Vectors, Invitrogen, EUA) con una reacción con BP clonasa II (BP Clonase, Invitrogen, EUA, (Katzen *et al.*, 2007). La transformación de las células competentes de *Escherichia coli* DH5 α se realizó por electroporación y se incubaron en medio Luria-Bertani (10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl), suplementado con 50 mg/mL de kanamicina. A las colonias resistentes se les extrajo el plásmido por medio del kit de mini-preparación de plásmido ZR (Zymo Research, EUA). Los vectores de entrada se verificaron mediante digestión, usando las enzimas de restricción PvuII y BstEII y por secuenciación, en la unidad de Unidad de Síntesis y Secuenciación

de DNA (USSDNA, Instituto de Biotecnología, UNAM). La transferencia del casete Gateway® de los vectores de entrada a los vectores de destino pX-EYFP-GW y pX-mCherry-GW (Fig. Suplementaria 1 y 2; Rosas-Santiago *et al.*, 2015), para expresión transitoria en planta o pMETYC_GW (Cub, Fig. Suplementaria 3) y pXN32_GW (Nub, Fig. Suplementaria 4), para expresión en levadura, se realizó con una reacción de LR clonasa II (Thermo-Fisher, EUA). Por su parte, las secuencias de RNAm para *McCLC* (Comp12569), *McAP1 μ* (Comp25471) y *McAP2 μ* (Comp 26254 y Comp27452) se obtuvieron de los datos de secuenciación de *M. crystallinum*, obtenidos de <http://thellungiella.org/blast/trinity.html> (Oh *et al.*, 2015). Los oligonucleótidos para la amplificación de los genes se muestran en la Tabla XI.1. *McAP1 μ* y *McAP2 μ* se amplificaron usando cDNA de la raíz de *M. crystallinum* y la enzima KAPA3G (plant PCR Kit KAPA BIOSYSTEM, EUA). Los productos de PCR se verificaron mediante secuenciación y se clonaron usando el kit pENTR/D-TOPO (Thermo-Fisher). Los vectores de entrada se recombinaron en los vectores pEarleyGate-104 (Fig. Suplementaria 5) o pXN32_GW (Fig. Suplementaria 4), utilizando el kit LR clonasa II (Thermo-Fisher, EUA). La clonación de *McCLC* se realizó con la tecnología Gateway® a partir de un producto de PCR, en el vector pDONR221 y una reacción de clonación con la enzima BP (Thermo-Fisher, EUA). El vector de expresión *McCLC*-mCherry se obtuvo por medio de una reacción de recombinación tipo LR con el vector pX-mCherry-GW (Fig. Suplementaria 2).

VII.5 Expresión transitoria en *N. benthamiana*

Para analizar la localización y la asociación de los componentes de CCV y las PIP de *M. crystallinum*, se llevaron a cabo expresiones transitorias en *N. benthamiana*,

de las siguientes construcciones, p*Mc*PIP2;1-EYFP, p*Mc*PIP1;4-EYFP, p*Mc*CLC-*Mcherry*, pEYFP-*Mc*AP1 μ , pEYFP-*Mc*AP2 μ . Estas construcciones primero se transformaron de forma independiente en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y se seleccionaron en placas de LB con la combinación de antibióticos adecuados; rifampicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y espectinomicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para p*Mc*PIP2;1-EYFP, p*Mc*PIP1;4-EYFP y p*Mc*CLC-*mCherry*; o rifampicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y kanamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para pEYFP-*Mc*AP1 μ y pEYFP-*Mc*AP2 μ . Colonias individuales se transfirieron a medio LB líquido con los antibióticos apropiados y se crecieron hasta la fase estacionaria a 28°C. Estos cultivos se centrifugaron a 4000 g_{av} durante 10 min en tubos de de vidrio para centrífuga de 30 mL con las camisas correspondientes (Corex, USA) en el rotor JA25.5 (Beckman–Coulter, México). La pastilla resultante se lavó tres veces con la solución de transformación (100 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM acetosiringona y 250 mg de glucosa). La densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de cada uno de los cultivos se midió en el espectrofotómetro DU (Hewlett Packard, EUA) y se ajustó a 0.3 y 0.5 OD_{600} para la expresión o co-expresión, respectivamente de las proteínas por medio de la infiltración de éstas en plantas de 6 a 8 semanas. La infiltración se realizó en la cara abaxial de hojas de *N. benthamiana* con una jeringa de insulina sin aguja. Después de la infiltración, las plantas se regaron y se mantuvieron con poca iluminación durante tres días hasta la observación microscópica.

VII.6 Microscopía confocal y tratamiento con inhibidores o FM4-64

Para determinar la localización y asociación de los componentes de CCV y de las *Mc*PIP de *M. crystallinum*, se analizó la expresión transitoria en la epidermis abaxial

de las hojas infiltradas de *N. benthamiana*, las cuales se colocaron en portaobjetos, con ayuda de pinzas de punta fina. A la preparación se le agregó agua y se cubrió con un cubreobjetos. Cuando fue necesario seguir la endocitosis en hojas de epidermis transformadas con los componentes de CCV, las preparaciones se incubaron con 10 μ M de FM4-64 (Invitrogen) durante 5 min para garantizar la saturación de la MP con el colorante. Así mismo, para determinar la asociación de las McPIP a la MP, se analizó la presencia de las hebras Hechtian, mediante la adición de NaCl 1 M antes de la obtención de imágenes. También, para determinar la respuesta de TryA23 y TryA51 (Sigma), en la señal y localización de McAP1 μ y McAP2 μ , se utilizó una concentración final de 30 μ M de ambos compuestos, y las preparaciones se incubaron durante 5 min, antes de su observación. Para conocer el efecto de la Brefeldina A (BFA, Invitrogen) en la localización de McAP1 μ y McAP2 μ , se disolvió BFA en DMSO para obtener una solución stock y se infiltró 90 μ M de BFA (con una jeringa de insulina sin la aguja) 3 h antes de la toma de las imágenes. Posteriormente, la señal de las preparaciones obtenidas se analizó por medio de microscopía confocal de barrido láser (CLSM), utilizando un microscopio confocal multifotónico invertido (Olympus FV1000), equipado con un objetivo de inmersión en aceite x60 (NA 1.3), del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA), en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Las longitudes de onda de excitación fueron 488 nm (láser de argón), para EYFP y 543 nm (láser de diodo), para mCherry y FM4-64. La emisión se detectó a 520 nm (BA505-520), para EYFP y 572 nm, para mCherry (BA560-620) y FM4-64 (BA560-660). Los resultados son imágenes representativas de >3 células de al menos tres transformaciones independientes.

VII.7 Análisis de imágenes

La evaluación del grado de asociación de las señales obtenidas por CLSM, se realizó por medio del software Image J (Schindelin *et al.*, 2012). La cuantificación se realizó en una región de interés (ROI), en al menos diez secciones ópticas en el eje Z, en cada réplica biológica. El “plugin” PSC de ImageJ (v.1) desarrollado por el laboratorio de visión computacional de la Universidad Nottingham, se utilizó para calcular los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman, después de ajustar el nivel de fondo de acuerdo con las instrucciones (French *et al.*, 2008). Ambos valores son estadísticos y permiten validar el grado de colocalización (Costes *et al.*, 2004). Valores de $r=1$ indican que las dos señales fluorescentes colocalizan perfectamente y están relacionadas linealmente, mientras que valores de $r=0$ indican que las señales no colocalizan. Valores de r mayores a 0.5 indican que las señales están asociadas y presenta cierto grado de colocalización. Los resultados se presentan en gráficas de dispersión de píxeles (“Scatterplot”), en donde la intensidad de un fluoróforo (eje X), se grafica contra de la intensidad del otro fluoróforo (eje Y), para cada píxel. La gráfica resultante indica la distribución de la colocalización de todos los píxeles que forman la imagen.

VII.8 Ensayo de ubiquitina dividida basada en apareamiento o mbSUS

Para evaluar interacción proteína-proteína, entre los *McAP* y las *McPIP* se realizaron ensayos de ubiquitina dividida basada en apareamiento (mbSUS). Los medios de levadura se prepararon como se describe en Lalonde *et al.*, 2010. Las cepas de levadura THY.AP4 (*MATa ura3, leu2, lexA::LacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*) y THY.AP5 (*MAT α URA3, leu2, trp1, his3 loxP::ade2*) fueron utilizadas

para realizar el ensayo (Obrdlik *et al.*, 2004). Las construcciones Cub, pMcPIP1;4-Cub y pMcPIP2;1-Cub, se transformaron en la cepa THY.AP4, mientras que las construcciones Nub, pMcAP1 μ -NuP, pMcAP2 μ -Nub y pMcPIP1;4-Nub, se transformaron en la cepa THY.AP5 empleando LiAc (Lalonde *et al.*, 2010). Aquellas fusiones que no interactuaron con el NubWT soluble, con una fuerte afinidad por el dominio Cub, se consideraron falsos negativos; mientras que los que sí interactuaron con el NubG correspondieron a falsos positivos.

VII.9 Aislamiento de vesículas recubiertas de clatrina

Para el aislamiento de CCV, utilizamos el protocolo reportado por Reynolds *et al.*, 2014, con algunas modificaciones. Se cortaron raíces de *M. crystallinum* (30 g), en pequeños fragmentos y se homogeneizaron con 5 pulsos de 30 s con descansos de 30 s entre cada pulso, en una licuadora comercial (Waring, México), con 300 mL de medio de aislamiento (400 mM manitol, 100 mM MES, 1 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.5 mM butilhidroxitolueno, 1 mM benzamidina, 2 mM DTT y 26 mM K₂S₂O₅ pH 7.5). El tejido homogeneizado se filtró a través de seis capas de gasa y se centrifugó a 10000 g_{av} durante 25 min en un rotor JA25.5 (Beckman-Coulter, México). Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 30000 g_{av} por una hora en el rotor Ti45 y en una ultracentrífuga Beckman L-80 (Beckman-Coulter, México). El precipitado resultante se volvió a suspender en 5 mL de medio y se centrifugó a 16000 g_{av} durante 10 min en una centrifuga refrigerada 5415R (Eppendorf, EE. UU.). El sobrenadante resultante se colocó en un gradiente discontinuo de 10, 20, 35 y 50% de sacarosa. Este gradiente se ultracentrifugó a 116000 g_{av} durante 50 min en el rotor SW40 Ti. Se recolectó la fase al 10% y la interfase al 10/35%, y luego

se sometió a un lavado por ultracentrifugación a 200000 g_{av} durante 50 min. Se recolectaron 2.5 mL y se colocó encima de un gradiente lineal de D₂O-Ficoll que se sometió a centrifugación durante 16 h a 80000 g_{av} en el rotor SW40 Ti. Las fases resultantes se recogieron y lavaron por ultracentrifugación a 174000 g_{av} en el rotor Ti 50.2. El sedimento final constituyó las CCV, las cuales se resuspendieron en 100 μ L y se almacenaron a -80 °C para su análisis.

VII.10 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford modificado (Bradford, 1976), con albúmina de suero bovino (BSA), como estándar. Para cuantificar el contenido de proteína de cada muestra se tomaron 5 μ L y se añadieron 30 μ L de Triton X-100 al 0.05%. Después de 5 min se añadieron 800 μ L de H₂O y 200 μ L del reactivo de Bradford (BIO-RAD, EUA). El contenido total de proteína libre en cada muestra se cuantificó 5 min después a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro DU (Hewlett Packard, EUA). Cada una de las cuantificaciones proteicas se realizó por duplicado.

VII.11 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

Para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante de las proteínas obtenidas a partir de las CCV enriquecidas o de fracciones obtenidas por EZFL de la raíz de *M. crystallinum*, se precipitaron 25 μ g de proteína en una solución de 50% de etanol y 50% de acetona al menos 3 h a -30°C. Las muestras se centrifugaron por 20 min a 14000 g_{av} en la centrífuga de mesa refrigerada 5415R (Eppendorf, EUA). La pastilla obtenida se secó y resuspendió en amortiguador Laemmli 1X con 2.5% de SDS (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 60°C por 2 min para permitir su

desnaturalización. Posteriormente se cargaron en un gel desnaturalizante de acrilamida:bisacrilamida al 10%. La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo en una solución amortiguadora (25 mM Tris/HCl pH 8.3, 250 mM Glicina y 0.1% de SDS), por 45 min, a 200 V en un sistema de electroforesis Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Los geles se tiñeron por 30 min con Azul de Coomassie R250 al 0.25%, en una solución de metanol 50%: ácido acético 7% y se destiñeron con una solución de metanol:ácido acético:H₂O en una proporción 1:1:8 por 24 h.

VII.12 Inmunodetección tipo “western blot”

La evaluación del cambio de abundancia de las proteínas obtenidas de las CCV enriquecidas o de fracciones obtenidas por EZFL de la raíz de *M. crystallinum*, se realizó por medio de la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo por medio de una solución amortiguadora de transferencia (25 mM Tris, 190 mM Glicina y 25% de Metanol), a 100 V por 1 h 15 min. Después de la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de Ponceau S al 0.2% (p/v) y se tomaron fotografías de las membranas para usarlas como controles de carga (Sander et al., 2019); también se utilizó la tinción con azul de Coomassie (R-250) como control de carga, cuando así se indique. Posteriormente, se bloquearon los sitios libres de unión a proteína con una solución al 5% de leche en polvo sin grasa (Svelty, Nestlé, México) disuelta en TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos contra *McPIP1;2*; *McPIP1;4*; *McPIP2;1* o el C-terminal de *McTIP1;2*, se utilizaron de acuerdo con Vera-Estrella *et al.*, 2012. Los anticuerpos

en contra de la cadena ligera de clatrina (CLC2) fueron donados por el Dr. Sebastian Y. Bednarek (Wang *et al.*, 2013). El anticuerpo de la cadena pesada de clatrina (CHC) se obtuvo de Agrisera. Todos los anticuerpos primarios fueron usados a una dilución 1:1000. Terminada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas de nitrocelulosa se lavaron de manera sucesiva con TBS, TBS-tween-20 y TBS por 10 min para cada lavado, con lo que se eliminó el anticuerpo primario no unido a proteínas específicas, y después se incubó por al menos 2 h con el anticuerpo secundario, IgG H+L conjugado a la peroxidasa del rábano a una dilución 1:5000. Después de este tiempo, las membranas se lavaron en forma sucesiva como en el paso anterior. La detección de la proteína conjugada con el anticuerpo se realizó por quimioluminiscencia con el paquete Luminata (Millipore, Billerica MA, EUA). El método se basa en la oxidación del luminol (que provoca la emisión de luz), catalizado por la peroxidasa de rábano y peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 La abundancia de *McPIP* aumenta en CCV aisladas de la raíz de *M. crystallinum* durante condiciones de salinidad

Con el objetivo de determinar si el incremento de la abundancia de las acuaporinas tipo PIP de la MP en la raíz de *M. crystallinum*, ocurre paralelamente con su incremento en las CCV durante condiciones de salinidad, se obtuvieron preparaciones de CCV de raíces de plantas tratadas (T) o no (NT), con 200 mM de NaCl por 5 días. El enriquecimiento de CCV fue verificado mediante inmunodetecciones utilizando los anticuerpos anti-CHC y anti-CLC (Fig. 11, CCV). Al analizar estas CCV purificadas, se observó la presencia de varias *McPIP* en CCV obtenidas de raíces T y NT, con la abundancia de *McPIP*_{1;2}, *McPIP*_{1;4} y *McPIP*_{2;1} aumentando >3 veces en plantas T en comparación con plantas NT (Fig. 11, CCV). Confirmando que la vía dependiente de CCV participa en el tráfico vesicular de las *McPIP*, y además, que la abundancia de las *McPIP* en las CCV incrementa durante condiciones de salinidad. Posteriormente, para determinar si este incremento está acoplado a posibles cambios en la abundancia de estas mismas PIP pero en la MP, se utilizaron las fracciones enriquecidas de MP anteriormente purificadas por EZFL (Fig.10, recuadro morado). Al analizar la presencia de las *McPIP* en esta fracción de MP se observó que, en condiciones de salinidad, la abundancia de *McPIP*_{1;2} aumentó 3 veces, mientras que *McPIP*_{1;4} mostró un aumento de 5 veces, y para *McPIP*_{2;1} se observó un aumento de 2 veces comparando entre T/NT (Fig. 11, MP). Lo cual indica que el incremento de abundancia de *McPIP* ocurre paralelamente

tanto en las preparaciones enriquecidas de CCV, como en la MP, corroborando que ambos procesos participan durante la respuesta a la salinidad.

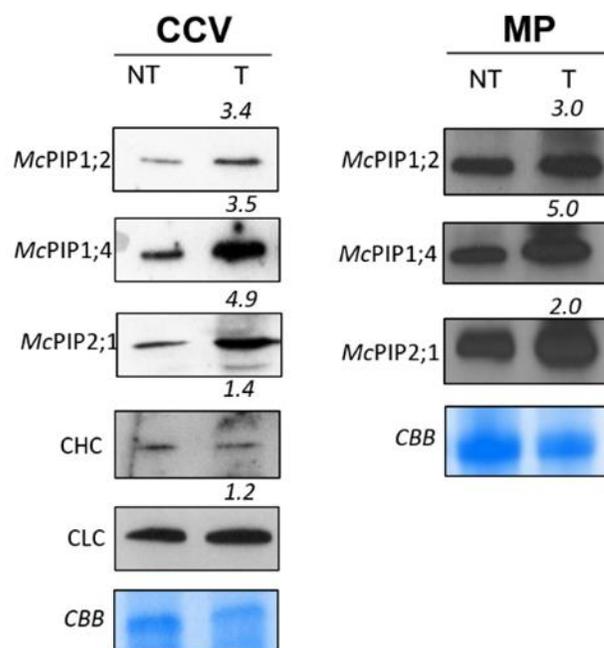


Figura 11. La salinidad incrementa la abundancia de las McPIP en vesículas de clatrina purificadas y en fracciones de membrana plasmática de la raíz de *M. crystallinum*. Inmunodetección de las McPIP en CCV o en fracciones enriquecidas en MP aisladas de raíces de *M. crystallinum*, tratadas (T) o no (NT), durante 5 d con NaCl 200 mM. La purificación de CCV se validó mediante el uso de los anticuerpos anti-CLC y anti-CHC. Los números en cursiva sobre cada carril muestran la diferencia en abundancia (densitometría) entre T/NT. Los pesos moleculares de las proteínas inmunodetectadas son 170 kDa, CHC; 58 kDa, CLC; McPIP1;2, 25 kDa, McPIP1;4, 40 kDa y McPIP2;1, 31-33 kDa. La tinción con azul brillante de Coomassie (CBB), se muestra como control de carga. Las imágenes de los inmunoblots son representativas de tres experimentos independientes.

VIII.2 McCLC, McAP1 μ y McAP2 μ están conservados en la escala evolutiva de las plantas

La coordinación del tráfico exocítico y endocítico es fundamental para regular el área celular y la abundancia de las proteínas de la MP (Zhang *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2021). Para establecer si las proteínas identificadas como componentes de CCV de *M. crystallinum* (Gómez-Méndez, 2015), son proteínas conservadas estructural

y funcionalmente, inicialmente se realizó un análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos identificados para *M. crystallinum*. El análisis para *McCLC* se llevó a cabo usando 79 secuencias de CLC. El árbol mostró que *McCLC* comparte un origen evolutivo más cercano a la subfamilia CLC2 que a los homólogos pertenecientes a las familias CLC1 y CLC3 (Fig. 12). Al realizar un alineamiento entre los tres genes identificados para CLC en *A. thaliana* (*AtCLC1* a *AtCLC3*), y *McCLC*, se identificó que *McCLC* posee un 33.5% de identidad respecto a estas secuencias (Fig. 13A). Para determinar la conservación a nivel de estructural se realizó un modelado por homología, el cual mostró que la estimación de la calidad de la estructura cuaternaria (QSQE) de *McCLC* fue de 0.66 (Fig. 13B). El mayor grado de confianza en el modelo obtenido, se observó entre los aminoácidos 111 a 161, los cuales se distribuyen en la región estructurada como α -hélices, y se ubican a la derecha del diagrama de Ramachandran obtenido a partir del modelo (Fig.13C). Estos residuos constituyen una región tipo “coiled-coiled”, característica de otros homólogos de CLC e importante para la interacción con CHC (Scheele *et al.*, 2002). Estos datos indican que *McCLC* está conservada no sólo evolutivamente, sino también a nivel estructural.

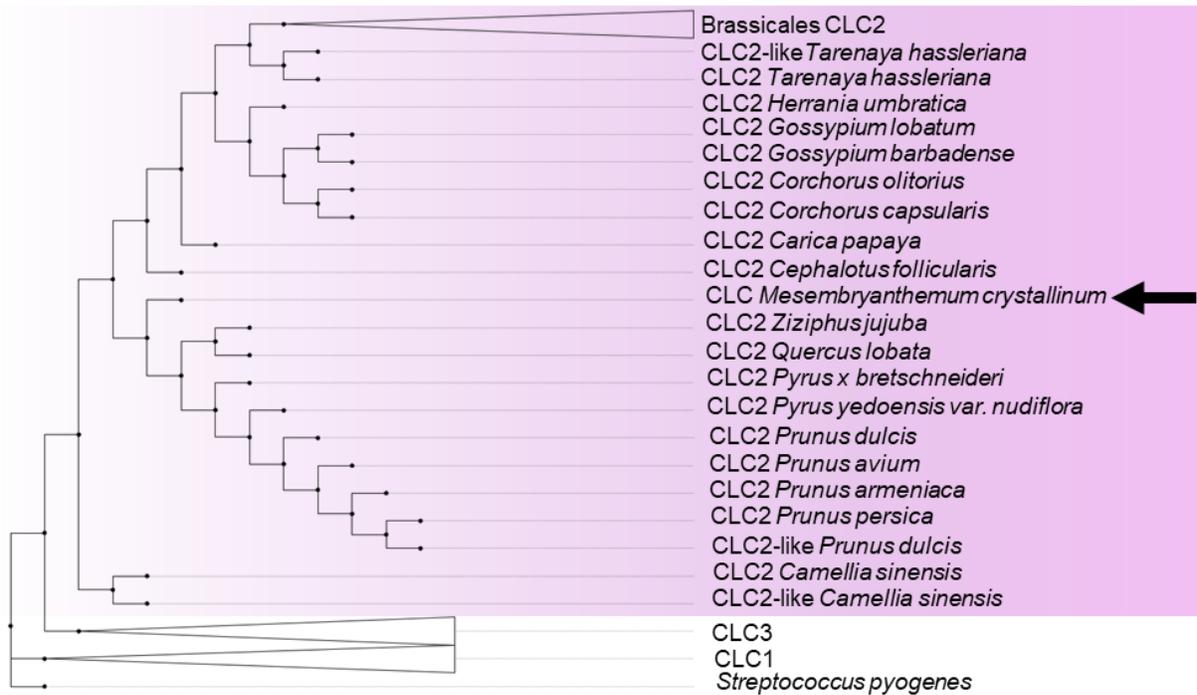
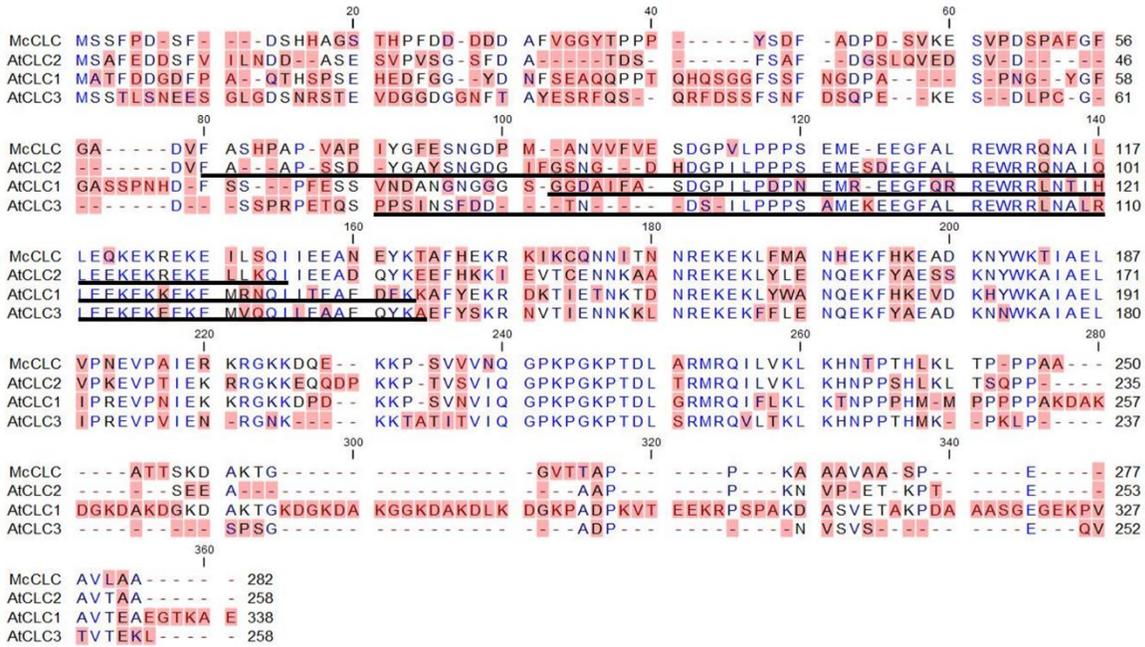
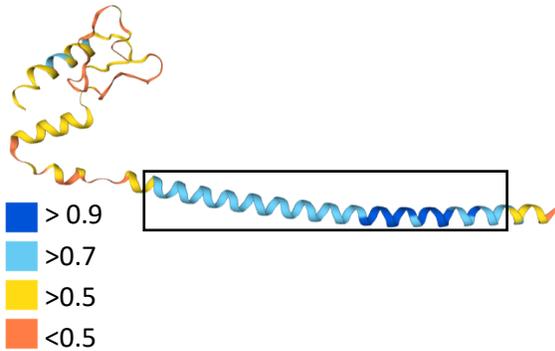


Figura 12. Árbol filogenético de McCLC. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud de Le y Gascuel, 2008. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas mediante un modelo JTT y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. Este análisis involucró 79 secuencias, con un total de 418 posiciones para el conjunto de datos finales. En el análisis evolutivo se añadió una secuencia bacteriana como grupo externo. El clado al que pertenece *McCLC* está indicado en color morado. La flecha indica la posición evolutiva de la secuencia de *M. crystallinum*.

A)



B)



C)

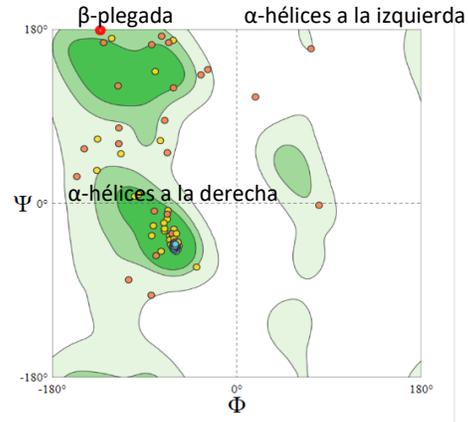


Figura 13. McCLC posee el dominio putativo de unión a CHC. A) Alineamiento de McCLC y las tres isoformas de AtCLC. Las letras azules o resaltadas con rojo indican conservación o no de los residuos, respectivamente. El dominio de unión a CHC en las AtCLC está delineado. El alineamiento se realizó con CLC Main Workbench 8 y usando AtCLC1 (AT2G20760), AtCLC2 (AT2G40060) y AtCLC3 (AT3G51890). **B)** Modelo estructural de McCLC. El modelado por homología se realizó utilizando como base la estructura cristalográfica de CLCb (6wcj.1, Paraan *et al.*, 2020). El grado de confianza del modelo se muestra de acuerdo con la leyenda. La estructura “coiled-coiled” entre los aminoácidos 111 a 161, se encuentra encerrada en un cuadro. **C)** Diagrama de Ramachandran, obtenido del modelado por homología, indicando la alta probabilidad de estructura “coiled-coiled” en McCLC. Se muestran los ángulos diédricos Ψ contra Φ en los aminoácidos, nótese como en el tercer cuadrante se hallan las hélices α orientadas a la derecha, las cuales corresponde a los mismos residuos en B). Los resultados se obtuvieron usando MolProbity (Chen *et al.*, 2010) y SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018).

El análisis filogenético para los AP μ identificados de *M. crystallinum* se realizó utilizando 136 secuencias para AP μ pertenecientes a las cinco diferentes familias anotadas. El árbol identificó que *McAP1 μ* se agrupa en la subfamilia AP1 μ y el *McAP2 μ* lo hace en el grupo AP2 μ (Fig. 14), indicando que las proteínas de *M. crystallinum* están conservadas en la escala evolutiva dentro de las familias de AP1 y AP2, respectivamente. El genoma de *A. thaliana* se encuentran codificados dos genes de AP1 μ , *AtAP1 μ 1* y *AtAP1 μ 2* y un gen para AP2 μ , *AtAP2 μ* (Park *et al.*, 2013; Yamaoka *et al.*, 2013). Al realizar un alineamiento con los *McAP μ* , se determinó que *McAP1 μ* posee una identidad del 90%, y *McAP2 μ* un 95%, con respecto a las secuencias de *A. thaliana*. Además, ambos *McAP μ* contienen el dominio MHD (Por sus siglas en inglés, μ **H**omology **D**omain), característico de la familia e importante para funcionar como una plataforma para las interacciones proteína-proteína durante la formación de CCV (Fig. 15A y 16A, Martina *et al.*, 2001). Al realizar el modelado por homología para ambos *McAP μ* , se obtuvo un modelo para *McAP1 μ* con un valor QSQE de 0.8 (Fig. 15B) y de 0.71 para *McAP2 μ* (Fig. 16B), en los cuales es posible identificar el dominio MHD en un arreglo de dos β -plegadas empalmadas, evidenciadas también en la región izquierda superior del diagrama de Ramachandran obtenido para cada modelo (Fig. 15C y 16C). En estos modelos también es posible identificar en el C-terminal el motivo Trp-Val-Arg-Tyr en un saco hidrofóbico, indispensable para la interacción con los residuos citosólicos YXX Φ , presentes en las proteínas a incorporar a las CCV (Martina *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2017). Esto datos indican que ambos *McAP μ* poseen las determinantes estructurales para las interacciones proteína-proteína necesarias para la formación y cargado de CCV.

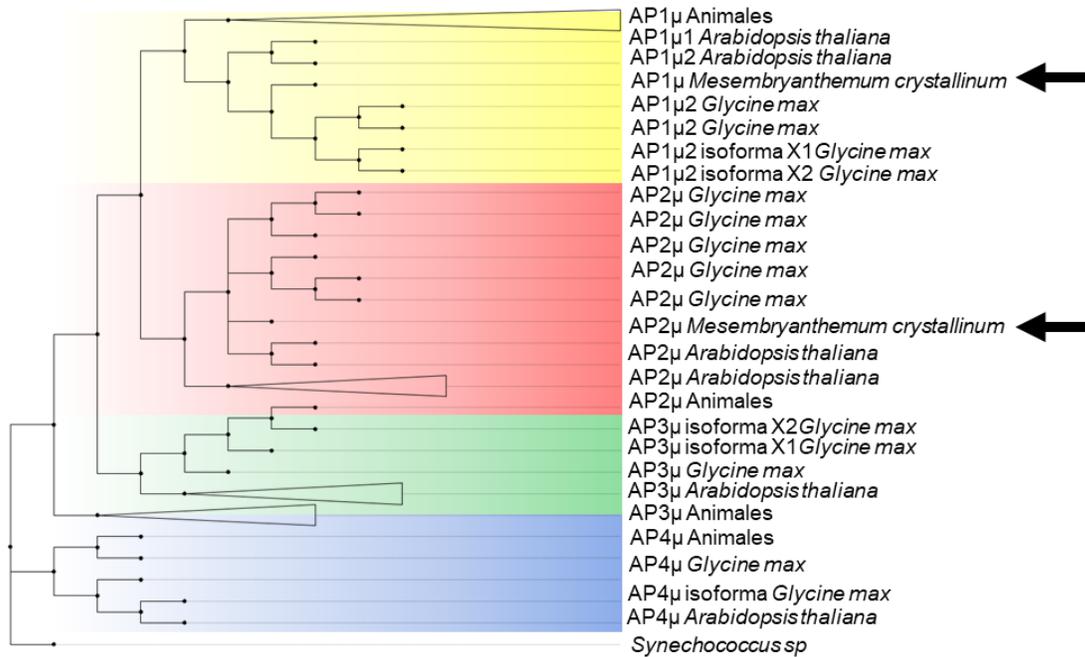


Figura 14. Árbol filogenético de McAP1μ y McAP2μ La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud de Le y Gascuel., 2008. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas mediante un modelo JTT y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. Este análisis involucró 136 secuencias con un total de 235 posiciones para el conjunto de datos finales. En el análisis evolutivo se añadió una secuencia bacteriana como grupo externo. . El clado al que pertenecen McAP1μ y McAP2μ está indicado en amarillo y rojo, respectivamente. Los clados de AP3μ y AP4μ están indicados en verde y azul, respectivamente. Las flechas indican la posición evolutiva de las secuencias de *M. crystallinum*.

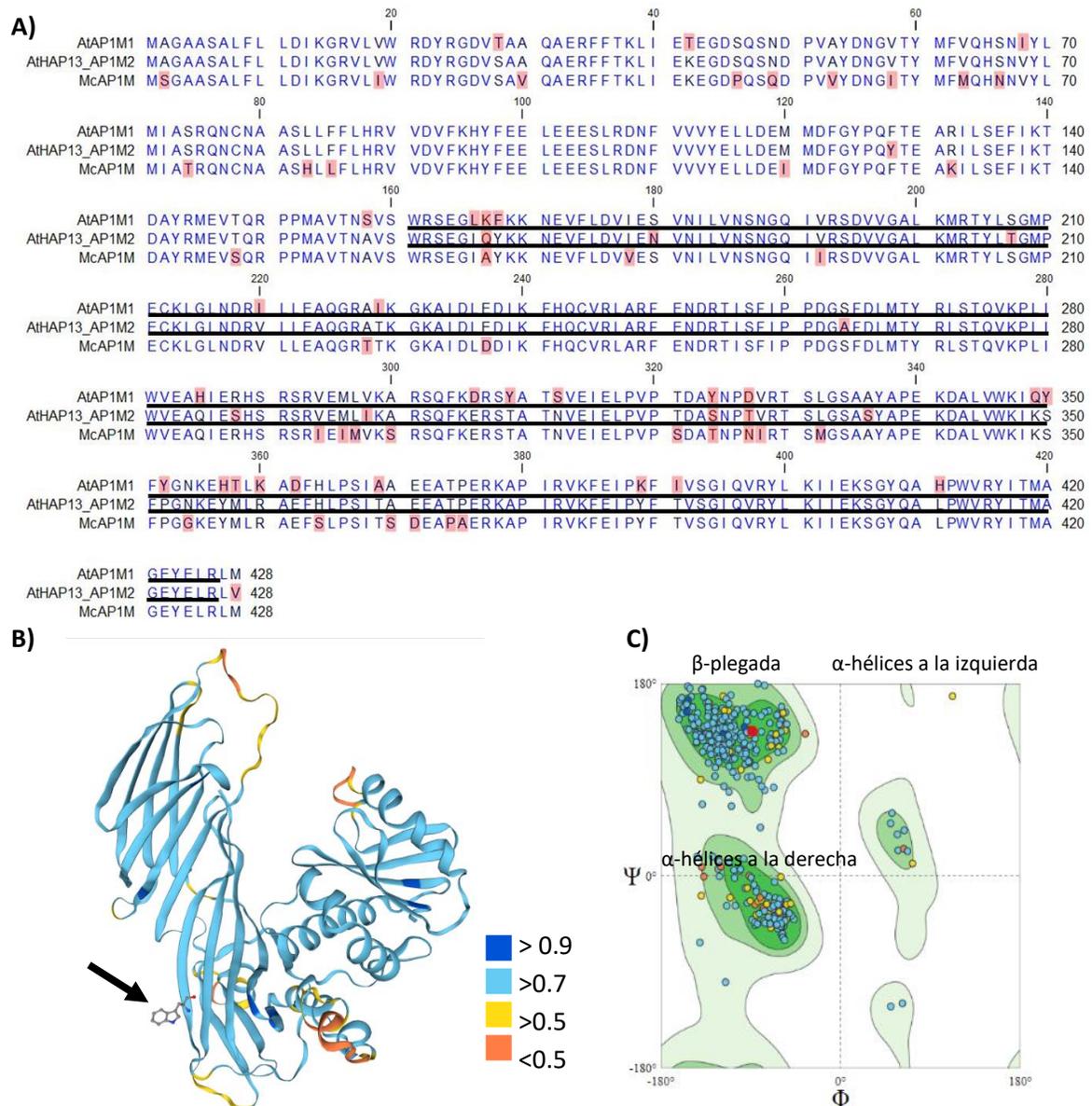


Figura 15. La McAP1 μ posee conservación estructural. A) Alineamiento de McAP1 μ y las dos isoformas de AtAP1 μ . Las letras azules o resaltadas con rojo indican conservación o no de los residuos, respectivamente. El dominio MDH en las AtAP1 μ está delineado. El alineamiento se realizó con CLC Main Workbench 8 y usando AtAP1 μ 1 (AT1G10730) y AtAP1 μ 2 (AT1G60780). **B)** Modelo estructural de McAP1 μ . El modelado por homología se realizó utilizando como base la estructura cristalográfica del AP1 de Humanos (4p6z.1, Jia *et al.*, 2014). El grado de confianza del modelo se muestra de acuerdo con la leyenda. El primer residuo Trp 413 dentro de la bolsa hidrofóbica, se encuentra resaltado con una flecha. **C)** Diagrama de Ramachandran, obtenido del modelado por homología. Se muestran los ángulos diédricos Ψ contra Φ en los aminoácidos, los cuales corresponden a los mismos residuos en B). Los resultados se obtuvieron usando MolProbity (Chen *et al.*, 2010) y SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018)

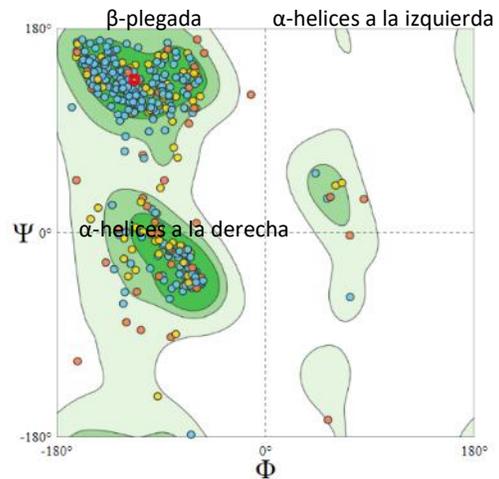
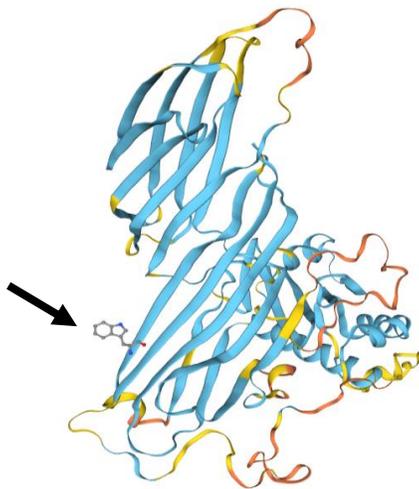
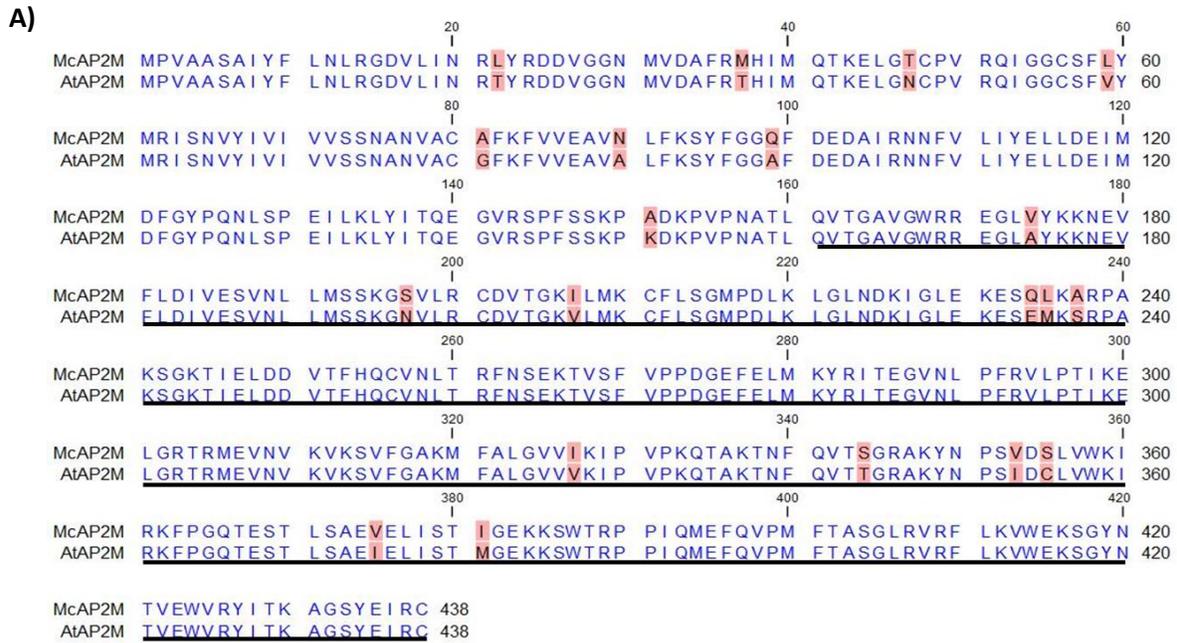


Figura 16. La *McAP2μ* posee conservación estructural. A) Alineamiento de *McAP2μ* y *AtAP2μ*. Las letras azules o resaltados con rojo indican conservación o no en los residuos, respectivamente. El dominio de unión MDH en *AtAP2μ* está delineado. El alineamiento se realizó con CLC Main Workbench 8 y usando *AtAP2μ* (AT5G46630). **B)** Modelo estructural de *AtAP2μ*. El modelado por homología se realizó utilizando como base el modelo obtenido por microscopía electrónica del AP2 de ratón (6wcj.1, Partlow *et al.*, 2019). El grado de confianza del modelo se muestra de acuerdo con la leyenda. El primer residuo Trp 424 en la bolsa hidrofóbica, se encuentra resaltado con una flecha. **C)** Diagrama de Ramachandran, obtenido del modelado por homología. Se muestran los ángulos diédricos Ψ contra Φ en los aminoácidos, los cuales corresponde a los mismos en B). Los resultados se obtuvieron usando MolProbity (Chen *et al.*, 2010) y SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018).

VIII.3 *McCLC*, *McAP1* μ y *McAP2* μ son funcionales

En otros sistemas se ha identificado la estrecha interacción entre las subunidades de los complejos AP y el trisikelion de clatrina (Martina *et al.*, 2001). Para determinar si existe esta misma clase de asociación entre los componentes *McCLC*, *McAP1* μ y *McAP2* μ de *M. crystallinum*. Estos componentes se clonaron y fusionaron a proteínas fluorescentes, con el objetivo de realizar ensayos de localización subcelular en *N. benthamiana*, los cuales nos permitirían identificar ubicación subcelular de estas proteínas. En estos estudios fue posible observar en la proyección en Z de las imágenes confocales, que *McCLC*-mCherry, EYFP-*McAP1* μ y EYFP-*McAP2* μ se localizaron en la periferia de la célula (Fig. 17, flechas) y también en puntos intracelulares (Fig. 17, puntas de flecha). En estudios previos realizados en *A. thaliana*, *AtCLC* y la subunidad μ de *AtAP1* y *AtAP2* se observaron altamente asociados en la MP y en estructuras intracelulares (Shimizu *et al.*, 2021). Para determinar si existe esta misma asociación entre las proteínas de *M. crystallinum*, se realizaron ensayos de colocalización, los cuales nos permitieron cuantificar el grado y la localización subcelular de dicha asociación. Observamos que, en el corte central de la proyección en Z, *McCLC*-mCherry y EYFP-*McAP1* μ (Fig. 18), o *McCLC*-mCherry y EYFP-*McAP2* μ (Fig. 19), se localizaron muy cerca de la periferia de la célula. Con la superposición de ambas imágenes se observó que ambas señales se asocian (Fig. 18 y 19, "Merge"), y en el análisis de colocalización se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson (rp) y de Spearman (rs) mayores a 0.8 (Scatterplot). Asociación que se mantiene en todos los cortes en Z, ya que al realizar el análisis en cada uno de los cortes confocales, se obtuvieron valores constantes por arriba de 0.5 de rp y rs (Fig. 18 y 19, gráfica de cajas), indicando que *McCLC* y ambos AP μ están asociadas a la misma localización subcelular y podrían funcionar coordinadamente.

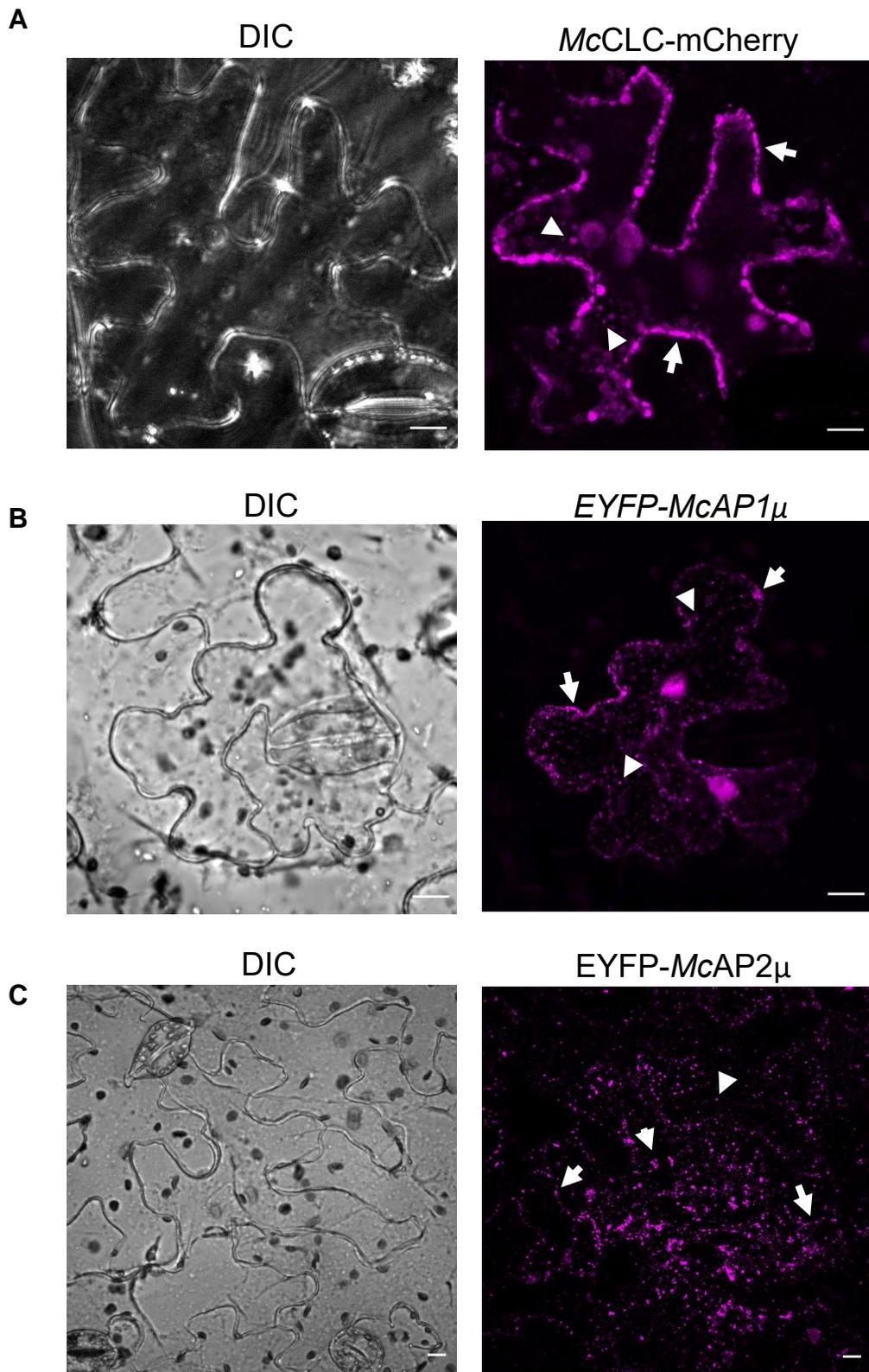


Figura 17. Localización subcelular de las proteínas asociadas a CCV de *M. crystallinum*. Imágenes representativas de una proyección en Z de la epidermis abaxial de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con **A)** *McCLC-mCherry*, **B)** *EYFP-McAP1 μ* o **C)** *EYFP-McAP2 μ* . Las flechas indican señal cerca de la membrana plasmática y las puntas de flecha indican señal intracelular. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

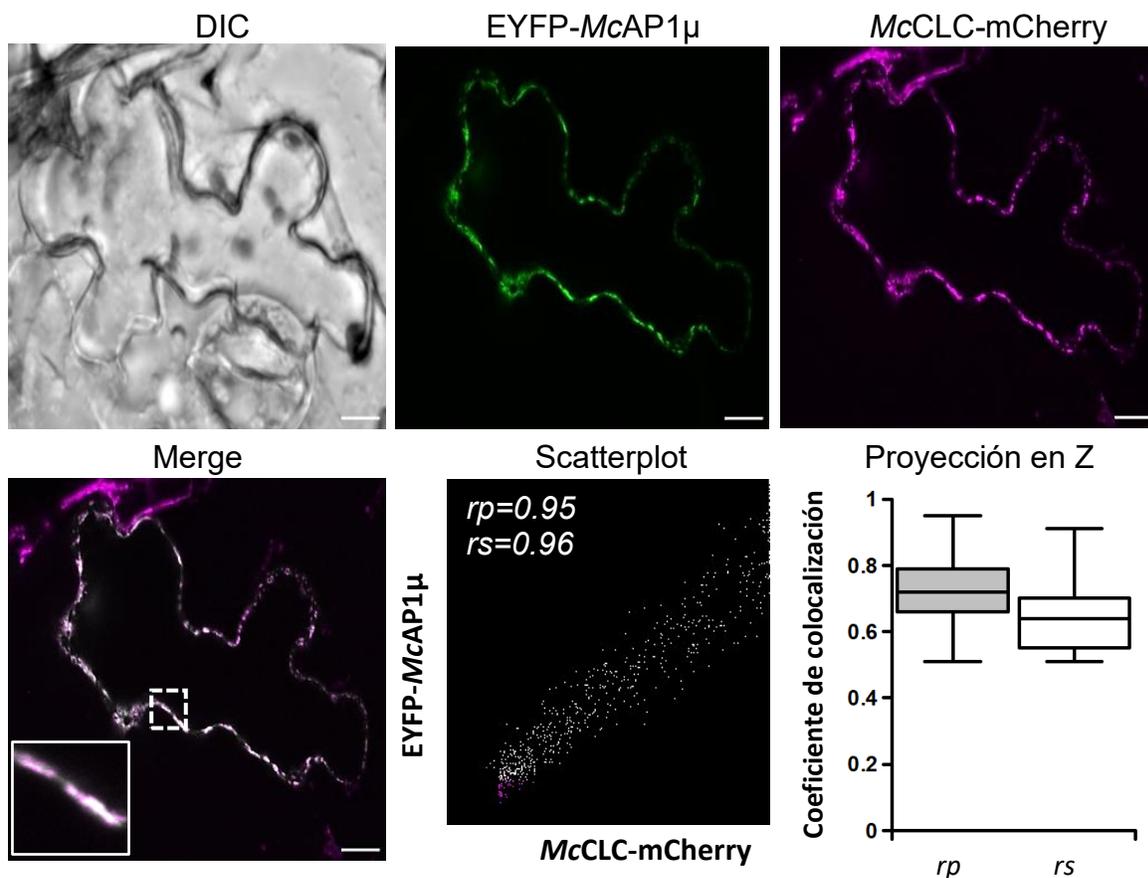


Figura 18. Las proteínas asociadas a CCV $McAP1\mu$ y $McCLC$ colocalizan. Imágenes representativas de un corte en Z al coexpresar $McCLC$ -mCherry (magenta) y EYFP- $McAP1\mu$ (verde). La imagen sobrepuesta (“Merge”), muestra la región de interés (ROI) encerrada con un recuadro blanco y mostradas como áreas de mayor aumento. Se utilizó para calcular los índices de colocalización el Plugin PSC (French *et al.*, 2008). Los valores de correlación rp y rs se muestran en el diagrama de dispersión (Scatterplot). Los valores de la proyección en Z se representan en los diagramas de cajas, donde se indican los rangos máximos y mínimos que se obtuvieron rp (barras grises) y rs (barras blancas). DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

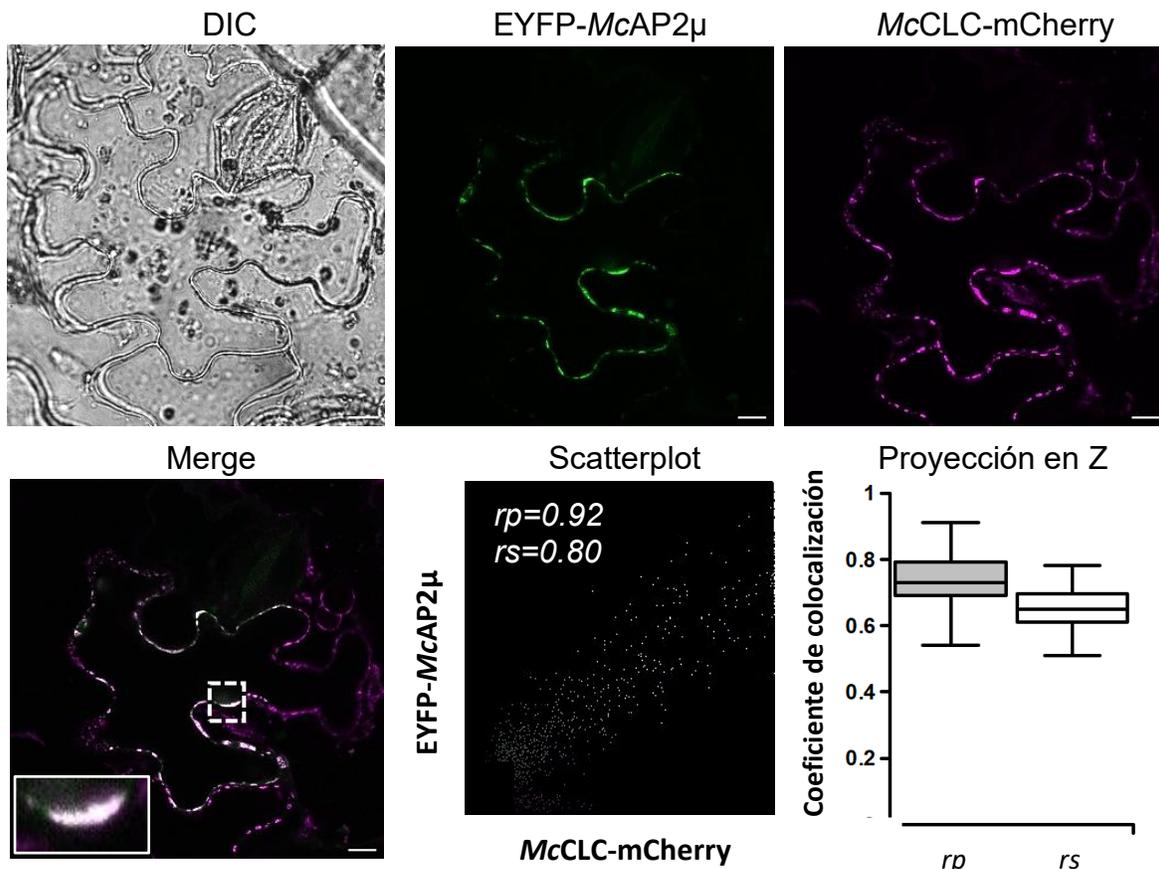


Figura 19. Las proteínas asociadas a CCV *McAP2 μ* y *McCLC* colocalizan. Imágenes representativas de un corte en Z al coexpresar *McCLC-mCherry* (magenta) y *EYFP-McAP2 μ* (verde). La imagen sobrepuesta (“merge”), muestra la región de interés (ROI) encerrada con un recuadro blanco y mostradas como áreas de mayor aumento. Se utilizó para calcular los índices de colocalización el Plugin PSC (French *et al.*, 2008). Los valores de correlación rp y rs se muestran en el diagrama de dispersión (Scatterplot). Los valores de la proyección en Z se representan en los diagramas de cajas, donde se indican los rangos máximos y mínimos que se obtuvieron rp (barras grises) y rs (barras blancas). DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

La colocalización de *McCLC* con ambos *McAP* μ indicó que estas proteínas podrían funcionar coordinadamente en la misma vía celular. Sin embargo, para verificar la identidad funcional de los dos *McAP* μ en la vía exocítica o endocítica, se realizó su expresión individual y se analizó junto con el colorante FM4-64. Colorante ampliamente usando para marcar inicialmente la MP y seguir el proceso de endocitosis (Rigal *et al.*, 2015). Al observar las señales correspondientes de EYFP-*McAP2* μ y FM4-64, la fluorescencia asociada a cada fluoróforo se observó en la periferia de la célula, y al sobreponer las imágenes se observó una colocalización significativa entre EYFP-*McAP2* μ y FM4-64 en estructuras similares a vesículas (Fig. 20A, "Merge", $r_p = 0.70$; $r_s = 0.72$). Al observar la distribución de EYFP-*McAP1* μ respecto al FM4-64, observamos que ambos marcaron la periferia de la célula, pero en la imagen superpuesta no presentaron correlación (Fig. 20B $r_p = 0.34$; $r_s = 0.25$), indicando que *McAP2* μ , pero no *McAP1* μ , está asociado con la endocitosis.

La toxina BFA es un inhibidor del tráfico vesicular post-Golgi, debido a que produce disrupción y aglomeración del AG, TGN/EE y las membranas endosomales en los cuerpos de BFA (Norambuena y Tejos, 2017; Robinson *et al.*, 2008). Al realizar un tratamiento por 3 h con 90 μ M de BFA en la epidermis infiltrada con EYFP-*McAP1* μ (Fig. 21A) o EYFP-*McAP2* μ (Fig. 21B), se observó la reubicación de ambos AP μ dentro de los cuerpos de BFA (Fig. 21, flechas), pero no en presencia de DMSO, utilizado como tratamiento control. Esta observación indicó la asociación de ambos *McAP* μ con el TGN/EE y el tráfico post-Golgi, similar a lo observado para los ortólogos de *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Tomando en cuenta los resultados previos se puede concluir que *McCLC*, *McAP1* μ y *McAP2* μ son ortólogos funcionales que se asocian para formar CCV.

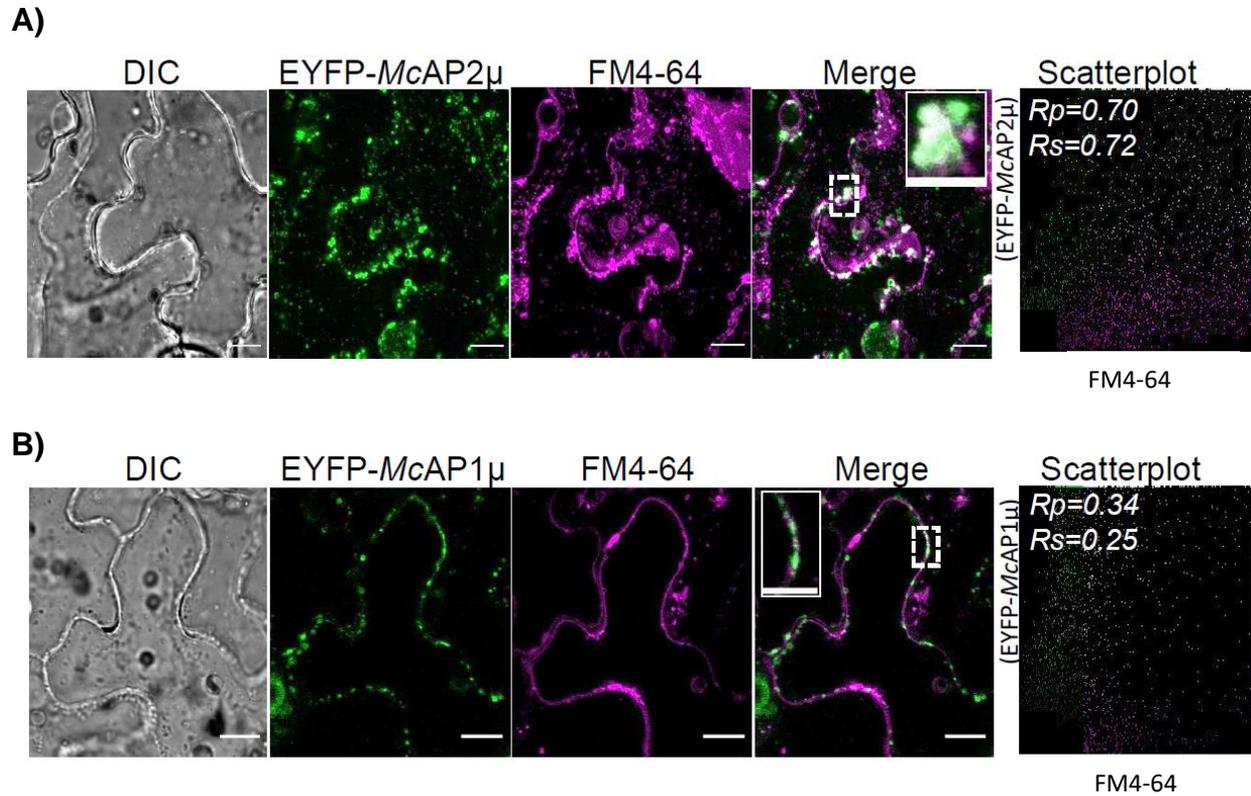


Figura 20. *McAP2* μ colocaliza con el marcador de la endocitosis FM4-64, a diferencia de *McAP1* μ . Imágenes representativas de un corte confocal de la epidermis de *N. benthamiana* infiltrada con **A)** EYFP-*McAP2* μ o **B)** EYFP-*McAP1* μ y marcada con FM4-64. La imagen sobrepuesta (“Merge”), muestra la región de interés (ROI) encerrada con un recuadro blanco y mostrada como áreas de mayor aumento. El Plugin PSC (French *et al.*, 2008), se utilizó para calcular los índices de colocalización. Los valores de correlación r_p y r_s se muestran en el diagrama de dispersión (“Scatterplot”). DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

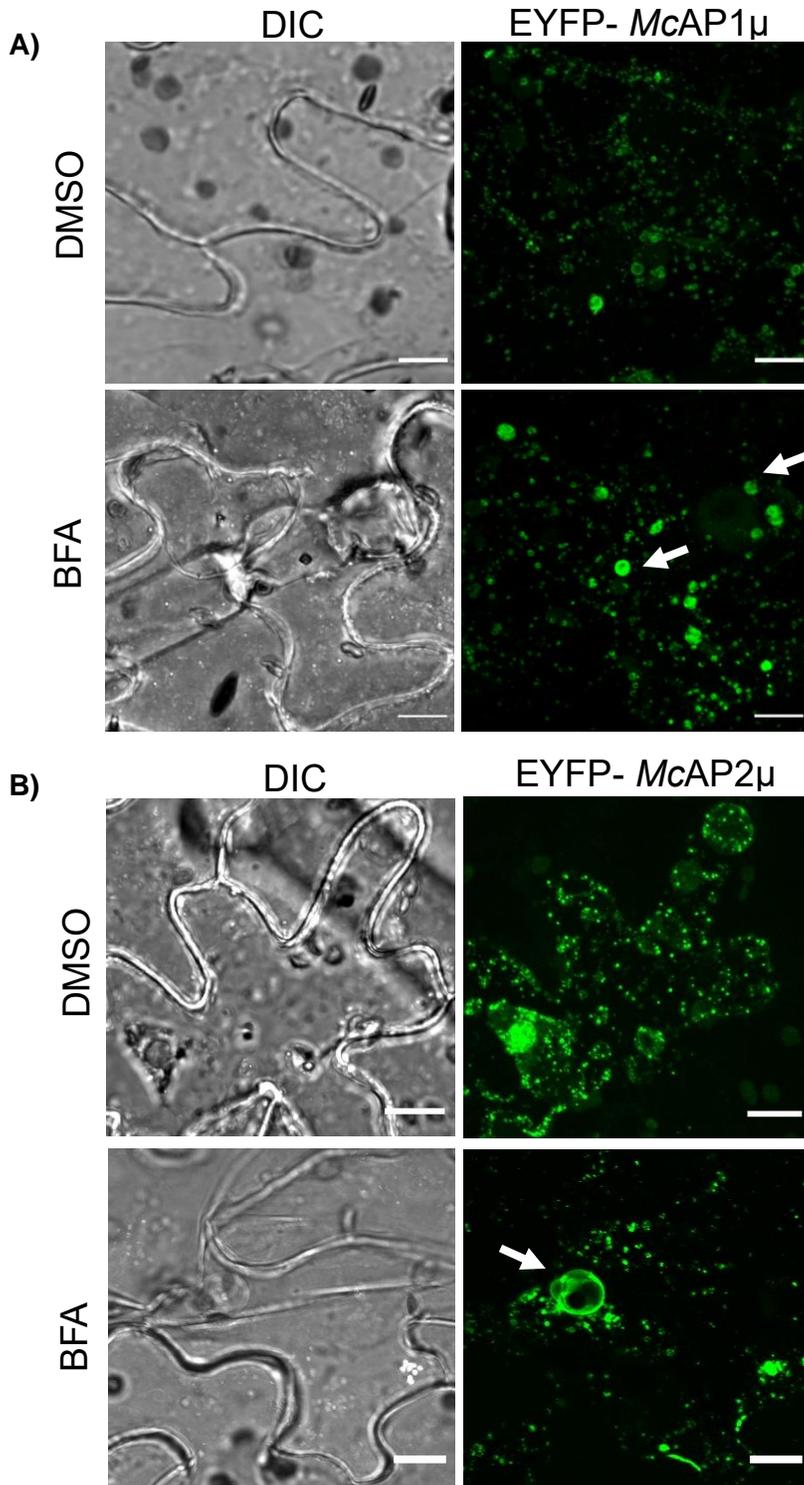


Figura 21. *McAP1μ* y *McAP2μ* participan en el tráfico post-Golgi. Proyección en Z representativa de la epidermis de *N. benthamiana* infiltrada con A) EYFP-*McAP2μ* o B) EYFP-*McAP1μ* y tratada con la toxina BFA (3 h con 90 μM) o DMSO, usado como control. Las flechas blancas indican la presencia del cuerpo de BFA. DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μm. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

VIII.4 *McPIP* se localizan en la membrana plasmática y se asocian con *McCLC*

Anteriormente se ha reportado que *McPIP* son responsivas a la salinidad (Tabla 2, Gómez-Méndez, 2015). Estas mismas *McPIP* se observaron en las preparaciones de CCV y fracciones enriquecidas de MP, durante condiciones de salinidad (Fig. 11). Indicando que las *McPIP*, utilizan la vía dependiente de CCV para localizarse en la MP. Sin embargo, para verificar que la localización de las *McPIP* se mantiene en la epidermis de *N. benthamiana*, utilizado en este trabajo como sistema heterólogo de expresión. Inicialmente se analizó la localización y distribución subcelular de *McPIP1;4* y *McPIP2;1* fusionadas a mCherry. Ambas *McPIP* se encontraron distribuidas en puntos discretos en el citosol (Fig. 22, puntas de flecha) y también en la periferia de la célula, lo que sugiere una asociación con la MP (Fig. 22, flechas).

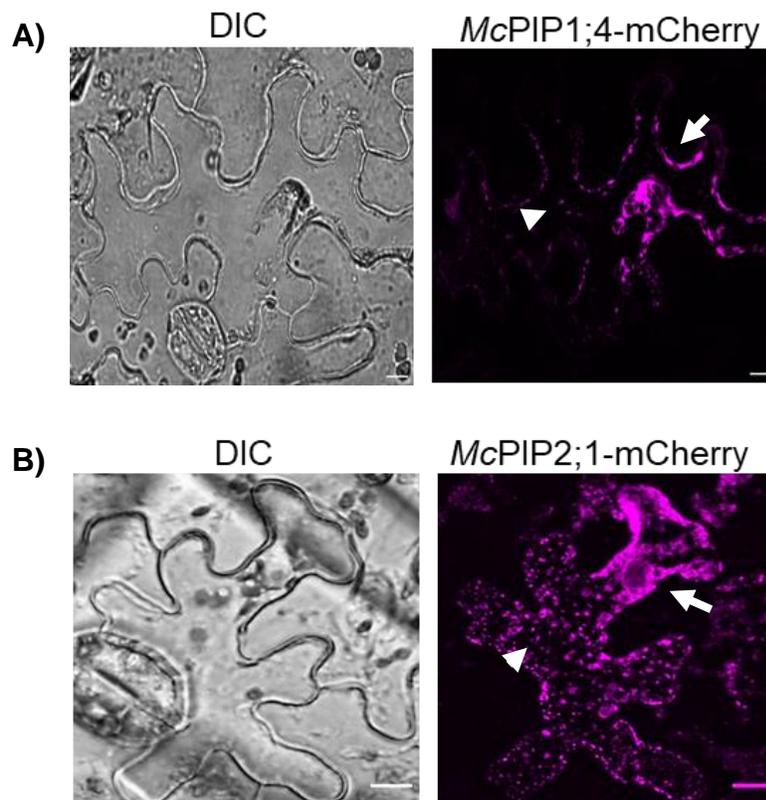


Figura 22. Localización de *McPIP1;4* y *McPIP2;1* en *N. benthamiana*. Imágenes representativas de una proyección en Z de células transformadas con: **A)** *McPIP1;4*-mCherry y **B)** *McPIP2;1*-mCherry. La flecha indica señal en la MP y la cabeza de flecha indica señal intracelular. DIC Imagen de contraste. Barra de escala= 10 μm.

Para verificar la asociación de ambas *McPIP* a la MP, se indujo la plasmólisis de las células transformadas, para observar los filamentos de Hecht, que son extensiones de la MP que conectan el protoplasto con la pared celular (Oparka, 1994). En este ensayo se observó tanto a *McPIP1;4-mCherry* como a *McPIP2;1-mCherry* en los filamentos de Hecht (Fig. 23, recuadro). Resultados que demuestran que en *N. benthamina*, *McPIP1;4* y *McPIP2;1* mantienen su localización en la MP.

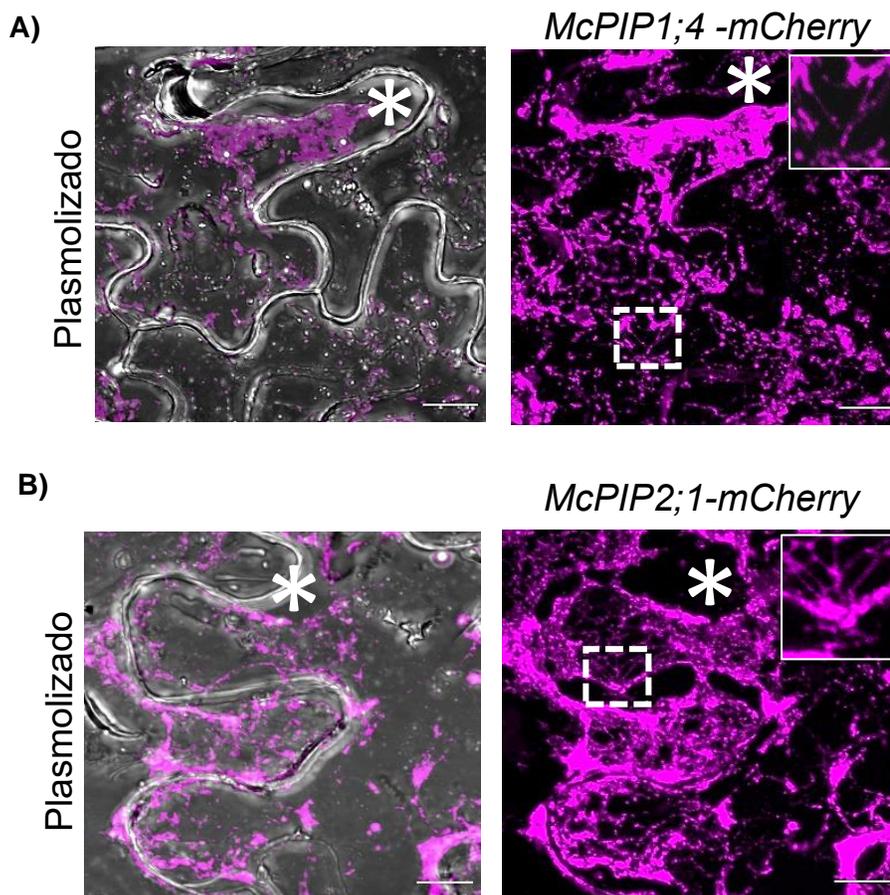


Figura 23. *McPIP1; 4* y *McPIP2; 1* están presentes en los filamentos de Hecht. Imágenes representativas de un corte confocal de células transformadas con: **A)** *McPIP1;4-mCherry* y **B)** *McPIP2;1-mCherry*. La presencia de los filamentos de Hecht se produjo plasmolizando las células con 1 M de NaCl antes de observar al microscopio. Los asteriscos muestran la retracción del protoplasto desde la pared celular y los recuadros áreas de mayor aumento, evidenciando la presencia de ambas *McPIPs* en los filamentos de Hecht. DIC Imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m.

Una vez que se confirmó la localización de ambas *McPIP* en la MP, se realizó un análisis de colocalización de ambas *McPIP* con *McCLC*, con el objetivo de determinar si ambas señales se asocian, y poder demostrar por medio de microscopía el tráfico intracelular de las *McPIP* por CCV. El análisis de colocalización entre *McPIP1*;4-EYFP y *McCLC*-mCherry (Fig. 24) o *McPIP2*;1-EYFP y *McCLC*-mCherry (Fig. 25), reveló que ambas *McPIP* colocalizan con *McCLC* cerca de la MP y al realizar el análisis de colocalización se obtuvieron valores de *rp* y *rs* superiores a 0.5, confirmando ambas proteínas se asocian cerca de la MP y, por consiguiente, la función de *McCLC* podría participar en el tráfico vesicular de las *McPIP*.

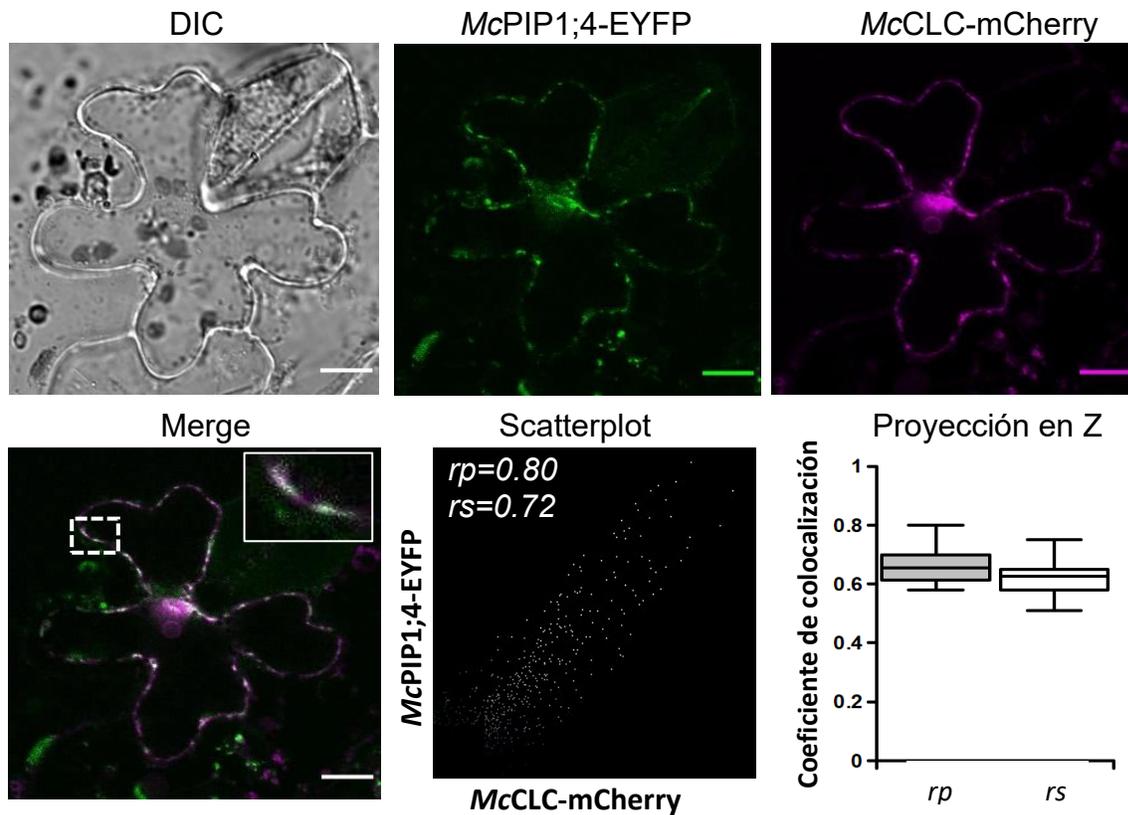


Figura 24. McCLC-mCherry colocaliza con McPIP1;4-EYFP. Imagen representativa de un corte confocal de células de la epidermis de una hoja de *N. benthamiana* coinfiltrada con McPIP1;4-EYFP y McCLC-mCherry. La imagen superpuesta (“Merge”), muestra la región de interés (ROI) encerrada con un recuadro blanco y mostrada como área de mayor aumento. Para calcular los índices de colocalización se utilizó el Plugin PSC (French *et al.*, 2008). Los valores de correlación rp y rs se muestran en el diagrama de dispersión (“Scatterplot”). DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

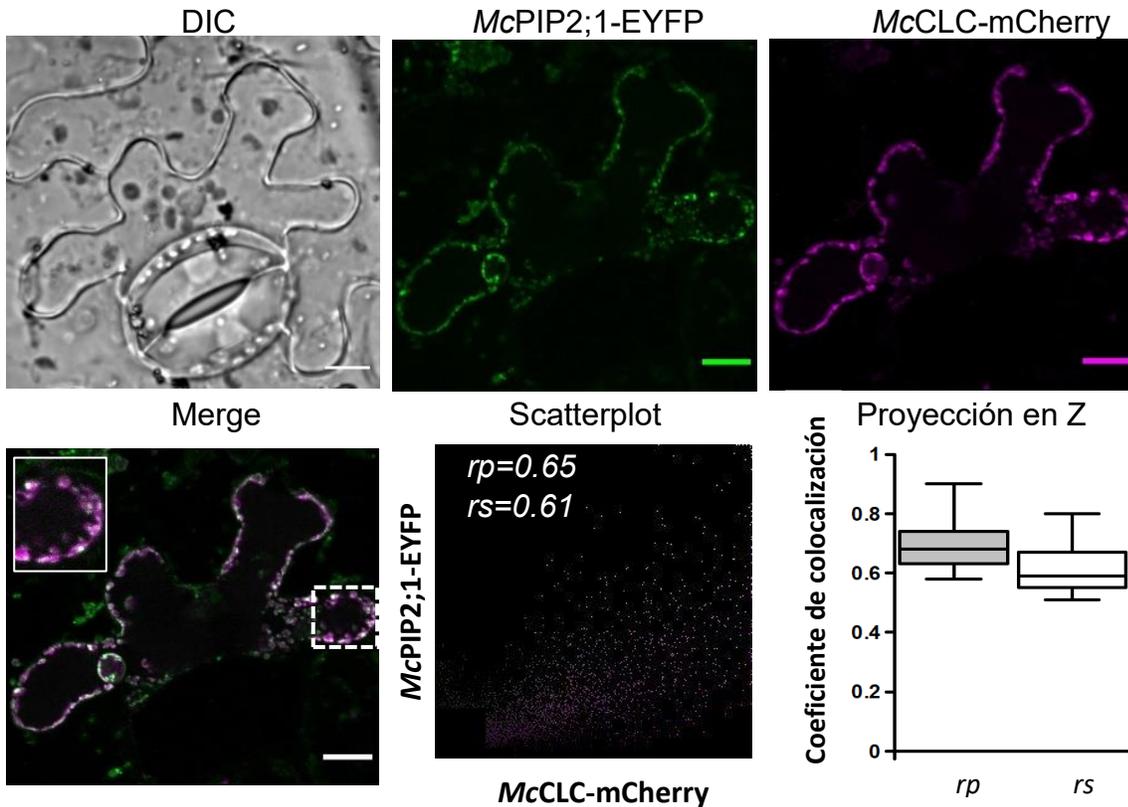


Figura 25. McCLC-mCherry colocaliza con McPIP2;1-EYFP. Imagen representativa de un corte confocal de células de la epidermis de una hoja de *N. benthamiana* coinfiltrada con McPIP2;1-EYFP y McCLC-mCherry. La imagen superpuesta (“Merge”), muestra la región de interés (ROI) encerrada con un recuadro blanco y mostrada como área de mayor aumento. Para calcular los índices de colocalización se utilizó el Plugin PSC (French *et al.*, 2008). Los valores de correlación rp y rs se muestran en el diagrama de dispersión (“Scatterplot”). DIC, imagen de contraste. Barra de escala=10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

VIII.5 Las McPIP establecen interacciones diferenciales con las proteínas McAP μ

Los complejos AP están involucrados en el ensamblaje y reclutamiento de las proteínas a cargar en las CCV, cuya función no es redundante, ya que cada uno participa en diferentes vías de transporte intracelular (Larson *et al.*, 2017; Robinson y Pimpl, 2014). Con el objetivo de determinar si las McAPs se asocian diferencialmente o no a las McPIP, se llevó a cabo un análisis de colocalización entre estos dos tipos de proteínas. En estos ensayos, se encontró que McPIP1;4-mCherry y EYFP-McAP1 μ colocalizaron

particularmente en estructuras intracelulares, con muy poca señal asociada a la MP (Fig. 26, punta de flecha), lo que indica una posible influencia de *McAP1 μ* en la localización de *McPIP1;4* (Fig. 26, $rp=0.97$ y $rs=0.96$). *McPIP1;4*-mCherry también se colocalizó con EYFP-*McAP2 μ* , sin embargo, la señal asociada a ambas se ubicó tanto en la periferia de la célula, como en vesículas intracelulares (Fig. 27; $rp = 0.93$; $rs = 0.87$). De manera similar, también se observó colocalización entre *McPIP2;1*-mCherry y EYFP-*McAP1 μ* en la periferia de las células y, en menor medida, en vesículas intracelulares (Fig. 28; $rp = 0.88$; $rs = 0.88$); mientras que la colocalización entre *McPIP2;1*-mCherry y EYFP-*McAP2 μ* se observó cerca de la MP (Fig. 29; $rp=0.71$; $rs=0.73$). Estos resultados indican que las dos *McPIP* colocalizan con *McAP1 μ* o *McAP2 μ* , y se asocian en compartimentos subcelulares (cerca de la MP o en vesículas intracelulares). Lo cual indica que la función de ambos *McAP μ* , es necesaria para el tráfico vesicular y la localización final de las *McPIP* en la MP.

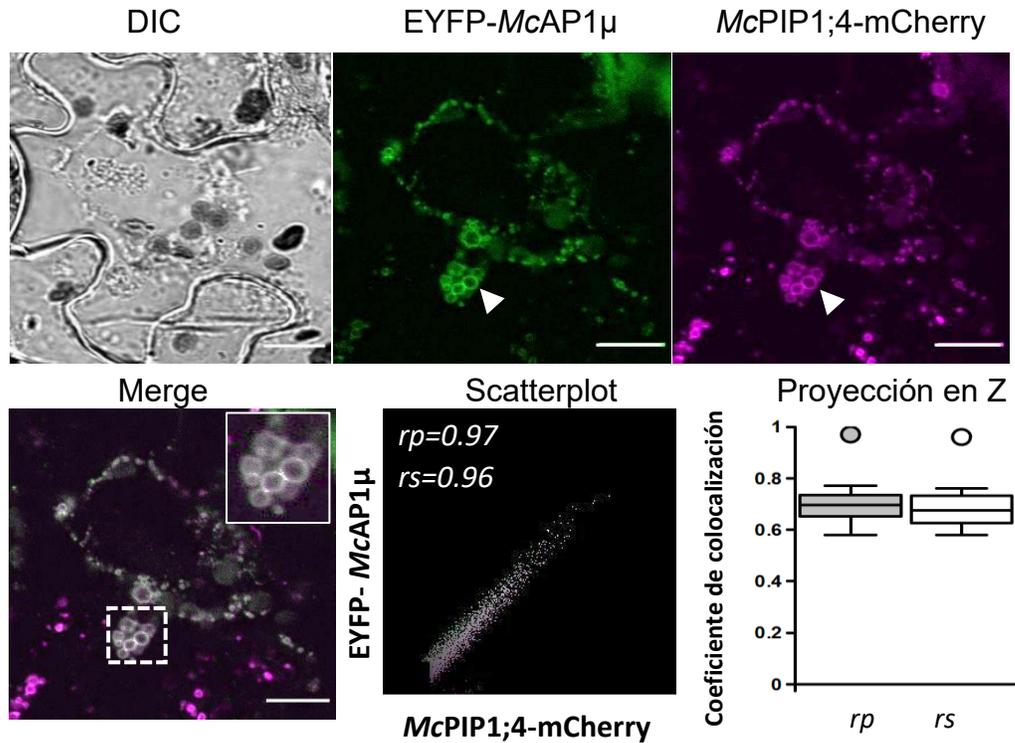


Figura 26. McPIP1;4-mCherry colocaliza con EYFP-McAP1 μ . Imagen representativa de un corte confocal de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con McPIP1;4-mCherry y EYFP-McAP1 μ . El análisis de colocalización se realizó en una región de interés (ROI) encerrada en un recuadro de líneas punteadas y muestra un área de mayor aumento en la imagen sobrepuesta ("Merge"). El Plugin PSC se utilizó para calcular los índices de colocalización (French *et al.*, 2008). Los valores obtenidos para rp y rs se muestran en el diagrama de dispersión correspondiente ("Scatterplot"). Las puntas de flecha indican la asociación de la señal a la MP o vesículas intracelulares, respectivamente. DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

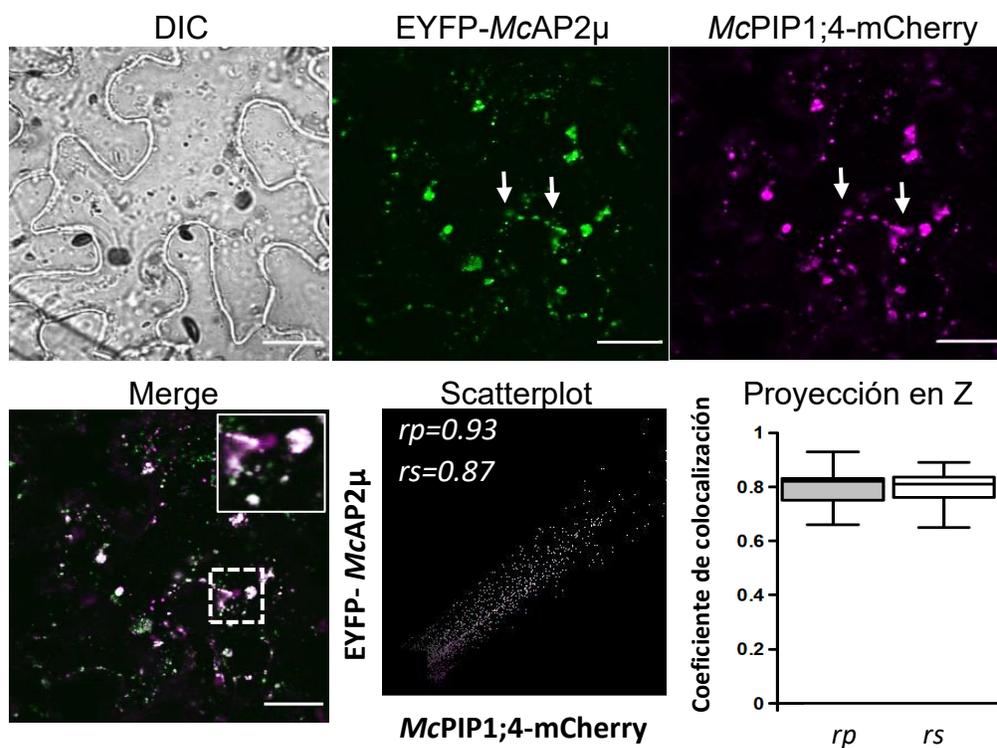


Figura 27. *McPIP1;4-mCherry* colocalizan con *EYFP-McAP2μ*. Imágen representativa de un corte confocal de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con *McPIP1;4-mCherry* y *EYFP-McAP2μ*. El análisis de colocalización se realizó en una región de interés (ROI) encerrada en un recuadro de líneas punteadas y muestra un área de mayor aumento en la imagen sobrepuesta (“Merge”). El Plugin PSC se utilizó para calcular los índices de colocalización (French *et al.*, 2008). Los valores obtenidos para *rp* y *rs* se muestran en el diagrama de dispersión correspondiente (“Scatterplot”). La flecha indica la asociación de la señal a la MP. DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

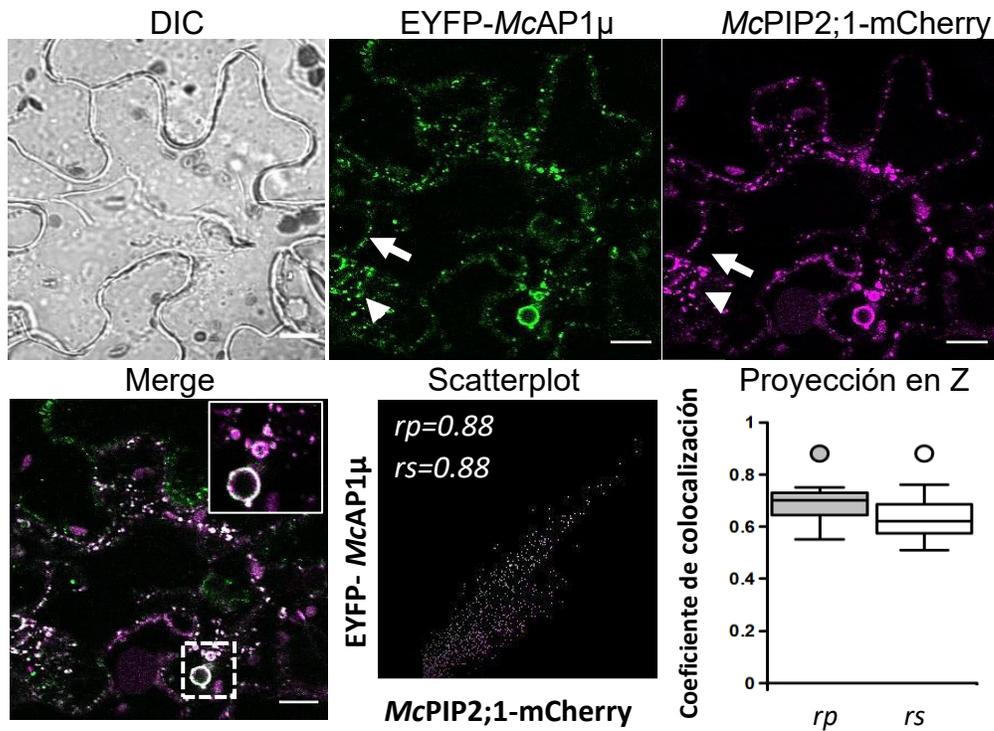


Figura 28. McPIP2;1-mCherry colocaliza con EYFP-McAP1 μ . Imagen representativa de un corte confocal de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con McPIP2;1-mCherry y EYFP-McAP1 μ . El análisis de colocalización se realizó en una región de interés (ROI) encerrada un recuadro de líneas punteadas y muestra un área de mayor aumento en la imagen sobrepuesta ("Merge"). El Plugin PSC se utilizó para calcular los índices de colocalización (French *et al.*, 2008). Los valores obtenidos para rp y rs se muestran en el diagrama de dispersión correspondiente ("Scatterplot"). La flecha y las puntas de flecha indican la asociación de la señal a la MP o vesículas intracelulares, respectivamente. DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

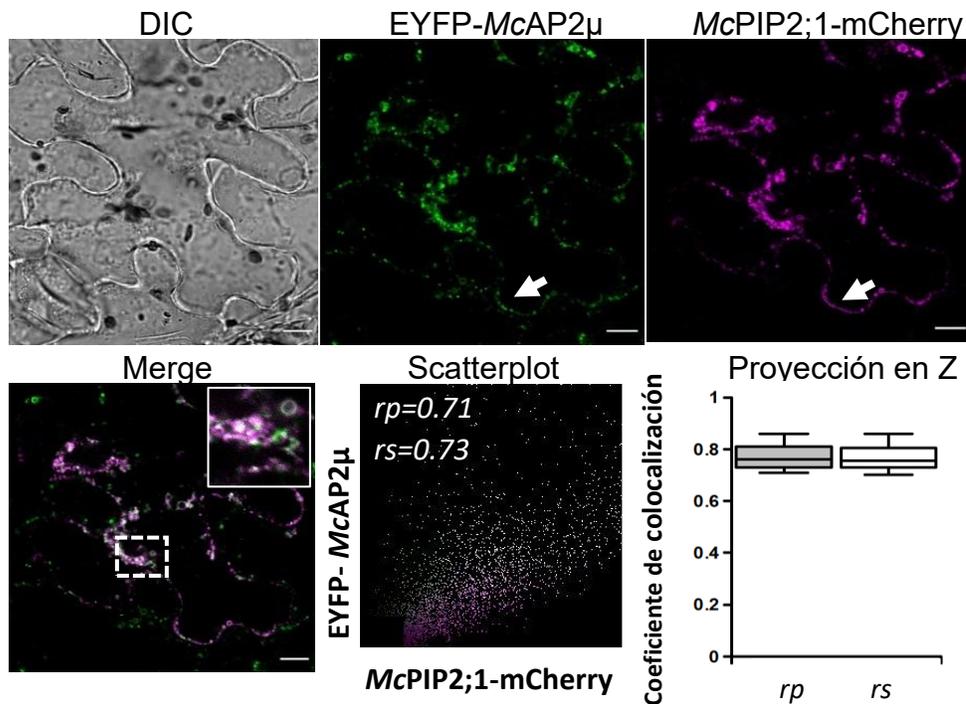


Figura 29. McPIP2;1-mCherry colocaliza con EYFP-McAP2 μ . Imagen representativa de un corte confocal de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con McPIP2;1-mCherry y EYFP-McAP2 μ . El análisis de colocalización se realizó en una región de interés (ROI) encerrada en un recuadro de líneas punteadas y muestra un área de mayor aumento en la imagen sobrepuesta (“Merge”). El Plugin PSC se utilizó para calcular los índices de colocalización (French *et al.*, 2008). Los valores obtenidos para *rp* y *rs* se muestran en el diagrama de dispersión correspondiente (“Scatterplot”). Las flechas indican la asociación de la señal a la MP. DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

En mamíferos se conoce que la interacción entre las AQP y la subunidad μ ocurre a través del motivo YXXØ localizado en el C-terminal de las AQP (Larson *et al.*, 2017; Madrid *et al.*, 2001). Al realizar un alineamiento del C-terminal de las McPIP de *M. crystallinum*, fue posible identificar el motivo YHQYI en McPIP2;1, McPIP2;2, y McPIP2;8. Para McPIP1;4 se identificó el motivo YHVVV y para McPIP1;2 YHTIV (Fig. 30A). Estos motivos cumplen con las características del motivo YXXØ, por lo tanto, a través de ellos se podrían establecer interacciones proteína-proteína con McAP1 μ y/o McAP2 μ . Para evaluar esta posibilidad se empleó el sistema de dos híbridos con base a la ubiquitina dividida (mbSUS). El mbSUS permite evaluar la capacidad de interacción de dos proteínas de membrana fusionadas cada una al N-terminal (Nub) o C-terminal (Cub) de la ubiquitina. Si ambas proteínas interactúan, la ubiquitina se reconstituye y permite la liberación de un factor de transcripción que induce la expresión de genes necesarios para el crecimiento de la levadura diploide en un medio de selección. Al evaluar los resultados del mbSUS, se observó crecimiento de las células diploides entre las combinaciones McPIP1;4-Cub y McAP2 μ -Nub, así como entre McPIP2;1-Cub y McAP1 μ -Nub (Fig. 30B, 0 μ M), indicando la interacción entre estas proteínas. Sin embargo, el crecimiento de la levadura se inhibió en presencia de 500 μ M de metionina (Fig. 30B, 500 μ M), lo que indicó que la interacción es débil, debido a que la metionina es un regulador negativo de la expresión de la proteína fusionada al extremo Cub, provocando menos disponibilidad de McPIP-Cub. A pesar de ser una interacción débil, la interacción se confirmó por medio del ensayo de LacZ, el cual produjo una coloración azul ligera en presencia de X-Gal, en comparación con el control negativo o NubG (Fig. 30B, Lac Z). Estos datos establecen que McPIP1;4 y McAP2 μ , así como McPIP2;1 y McAP1 μ tienen la capacidad de interactuar directamente, y por lo tanto nos permite concluir que los complejos AP1 y AP2 regulan el tráfico vesicular de las McPIP.

A)

```

                260                               280                               300
McPIP2;1  I N P A R S F G A A V I Y N Q Q K A W D D H W I F W V G P F I G A A I A A Y H Q Y I R A A A I K A L G S F R S S A . . . 287
McPIP2;2  I N P A R S L G A A V I Y N N N K A W D D Q W I F W V G P F I G A A I A A Y H Q Y I R A G F I K A L G S F R S S T S N V 291
McPIP2;8  I N P A R S F G A A V I F N S K K N W D D H W I F W V G P M V G A L A A A Y H Q Y I R A A A I K A L G S F R S N P T N . 284
McPIP1;4  I N P A R S L G A A I I Y N R P H A W A D D H W I F W V G P F I G A A L A A I Y H V V V I R A I . . . . . P F K S K . . . . 283
McPIP1;2  I N P A R S L G A A I I F N K G H A W D D H W I F W V G P F I G A A L A A I Y H T I V I R A I . . . . . P F K S R A . . . 285
  
```

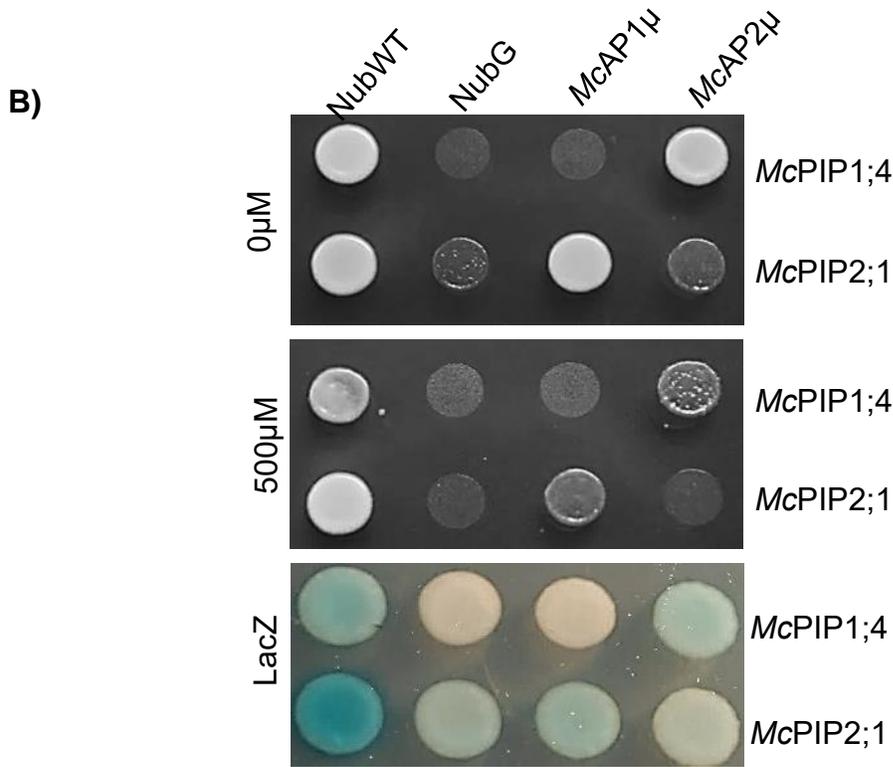


Figura 30. Las acuaporinas *McPIP1;4* y *McPIP2;1* interactúan con *McAP2 μ* o *McAP1 μ* , respectivamente. A) El extremo carboxilo de las PIP de *M. crystallinum* posee un motivo de unión a AP μ . Alineación de secuencias del extremo carboxilo terminal de diferentes *McPIP* que muestra la presencia del motivo YXX \emptyset marcado con un recuadro. Los residuos conservados se muestran en azul. La alineación se realizó en CLC-main Workbench 21.0.4 **B)** La interacción proteína-proteína entre *McPIP1;4* o *McPIP2;1* con *McAP1 μ* y/o *McAP2 μ* se analizó mediante el mbSUS y se reveló por el crecimiento celular en el medio selectivo en ausencia (0 μ M) o en presencia de metionina (500 μ M). Las interacciones se confirmaron mediante la activación de LacZ y se reveló con X-Gal como sustrato (LacZ). NubWT y NubG se utilizaron como controles de falsos negativos y falsos positivos, respectivamente.

VIII.6 *McPIP1;4* y *McPIP2;1* forman hetero-oligómeros.

Anteriormente se evaluó la capacidad de *McPIP1;4* y *McPIP2;1* para afectar la P_f de la membrana de ovocitos de *X. laevis* inyectados con los RNA mensajeros de una o ambas *McPIP* (Hernández-Domínguez, 2008). Estos resultados indicaron que *McPIP1;4* y *McPIP2;1* podrían formar hetero-oligómeros funcionales con mayor permeabilidad al agua. Para confirmar a nivel estructural la capacidad de interacción entre estas dos *McPIP*, utilizamos el ensayo mbSUS una vez más. El crecimiento de las levaduras diploides en el medio de selección (Fig. 31, 0 μ M Metionina) indicó que *McPIP1;4* y *McPIP2;1* forman fuertes interacciones, las cuales son estables, incluso en presencia de metionina (Fig. 31, 500 μ M Metionina). Además, la interacción se corroboró usando la actividad del reportero LacZ en las células diploides, las cuales desarrollaron una fuerte señal azul en presencia de X-Gal (Fig. 31, LacZ). Así mismo, la interacción entre *McPIP1;4* y *McPIP2;1* es altamente específica, debido a que al evaluar la capacidad de reconstitución de la ubiquitina entre *McPIP* y *McTIP1;2* que es una AQP de la subfamilia intrínseca del tonoplasto, el crecimiento de la levadura no ocurrió (Fig. 31, *McTIP1;2*). En conjunto estos datos corroboran que *McPIP1;4* y *McPIP2;1* forman heteroligómeros, que poseen mayor permeabilidad al agua.

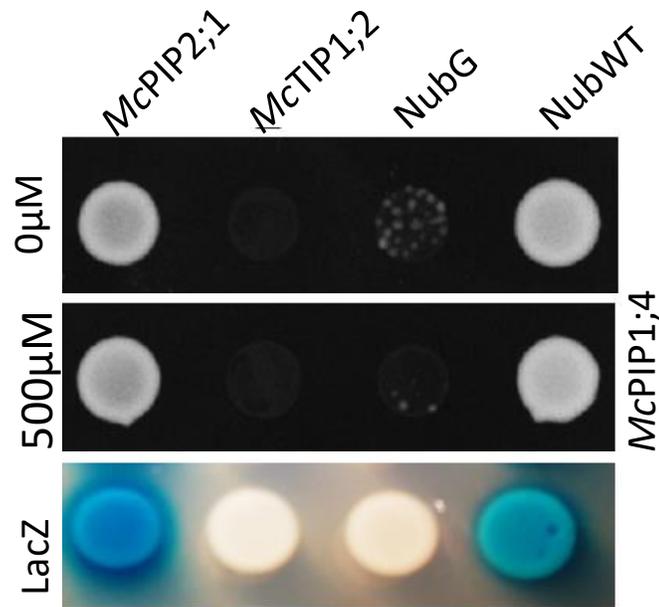


Figura 31. Las acuaporinas *McPIP1;4* y *McPIP2;1* forman heterolímeros. La interacción proteína-proteína entre *McPIP1;4* y *McPIP2;1* mediante mbSUS se identificó mediante el crecimiento celular en el medio selectivo en ausencia (0 μ M) o en presencia de metionina (500 μ M). Las interacciones se confirmaron mediante la activación de LacZ revelado con X-Gal como sustrato (LacZ). NubWT y NubG se utilizaron como controles de falsos negativos y falsos positivos, respectivamente. La ausencia de crecimiento con *McTIP1;2* demuestra la especificidad de la interacción entre *McPIP1;4* y *McPIP2;1*.

Anteriormente la presencia de los heterolímeros entre isoformas de la familia PIP1 y PIP2, se ha identificado como una manera de modular no solo la permeabilidad al agua, sino también como una plataforma que permite regular la localización subcelular (Shibasaka *et al.*, 2020). Para determinar si la formación de heterolímeros impacta en la localización de las *McPIP*, se decidió coexpresar en *N. benthamiana* a *McPIP1;4*-mCherry y EYFP-*McPIP2;1*. Interesantemente, la señal de ambas *McPIP* se vio altamente asociada a la periferia de las células y con poca localización puntual intracelular (Fig. 32, “Merge”), si se compara al expresar individualmente cada una (Fig. 22). Al cuantificar el nivel de colocalización entre ambas *McPIP* se obtuvieron los coeficientes de correlación de $r_p = 0.84$ y $r_s = 0.81$ (Fig. 32), sugiriendo que, al expresarse

conjuntamente, ambas *McPIP* se ubican preferencialmente en la MP (Gómez-Méndez, 2015).

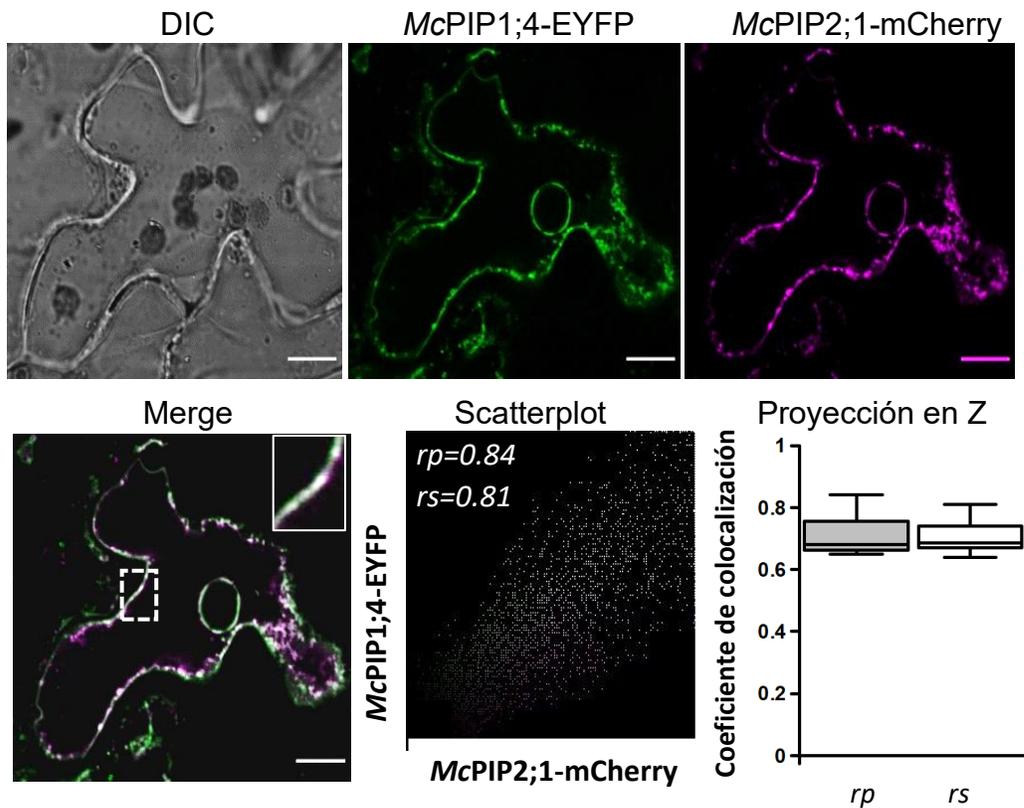


Figura 32. Las acuaporinas *McPIP1;4* y *McPIP2;1* colocalizan en la MP. Imágenes representativas de un corte confocal de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con *McPIP1;4*-mCherry y *McPIP2;1*-mCherry. El análisis de colocalización se realizó en una región de interés (ROI) encerrada en el recuadro de línea punteada y mostrada como un área de mayor aumento en la imagen sobrepuesta (“Merge”). el Plugin PSC se utilizó para calcular los índices de colocalización (French *et al.*, 2008). Los valores obtenidos para *rp* y *rs* se muestran en el diagrama de dispersión correspondiente (“Scatterplot”). DIC, imagen de contraste. Barra de escala= 10 μ m. Los resultados son representativos de al menos tres réplicas independientes.

IX. DISCUSIÓN

Las células eucariontes se caracterizan por poseer un sistema endomembranal interconectado por medio del tráfico vesicular, que se encarga de mantener la homeóstasis celular. En la escala evolutiva, el sistema de endomembranal de las plantas es considerablemente más complejo que el presente en levaduras, debido principalmente a la duplicación y divergencia de genes con alta especificidad dentro del tráfico o debido a la presencia de estrategias de adaptación diferencial que han evolucionado junto con el estilo de vida sésil de las plantas (Aniento *et al.*, 2022). En *M. crystallinum* identificamos que *McCLC*, *McAP1 μ* y *McAP2 μ* son proteínas conservadas, que se asocian entre sí, indicando que participan en la formación de CCV *in planta*. Al analizar la estructura terciaria por medio de modelado de *McCLC*, *McAP1 μ* y *McAP2 μ* , identificamos que en las secuencias de *M. crystallinum* se encuentran las determinantes necesarias para su funcionamiento dentro del ensamblado de CCV. Por ejemplo, la región tipo “coiled-coiled”, característica de los homólogos a CLC e importante para la interacción con CHC en *McCLC* (Scheele *et al.*, 2002). Sin embargo, no se puede excluir que existan otras isoformas de *McCLC*. Por ejemplo, en *A. thaliana* se presentan tres isoformas para CLC, que tienen un 55% de identidad entre ellos y 30% de homología con las isoformas CLCa y CLCb de mamíferos (Wang *et al.*, 2013). Dado a que el genoma de *M. crystallinum* ha sido recientemente publicado (Shen *et al.* 2022), estudios posteriores son necesarios para identificar otros genes parálogos a *McCLC*. De manera similar *McAP1 μ* y *McAP2 μ* , podrían no ser las únicas copias de estos genes en el genoma de *M. crystallinum* o bien su implicación en la formación y regulación de CCV podría estar coordinada a través de otras proteínas presentes exclusivamente dentro del tráfico vesicular de plantas. Como por ejemplo, el complejo TPLATE que funciona como una plataforma de interacción entre los triskeliones de clatrina y el complejo AP2,

promoviendo la invaginación de la membrana en contra de la presión de turgencia, y que se ha identificado exclusivamente en el genoma de plantas (Aniento *et al.*, 2022; Yperman *et al.*, 2021). Así mismo, la conservación funcional de *McAP1 μ* y *McAP2 μ* observada en *N. benthamiana* en términos de colocalización o no, con el FMA4-64 (Fig. 20) o por sensibilidad al BFA (Fig. 21), nos permite concluir que los mecanismos de respuesta de los homólogos de *M. crystallinum* son similares a los reportados para *A. thaliana*. Sin embargo, no se pueden descartar la presencia de vías alternas de regulación para *McAP1 μ* y *McAP2 μ* .

Desde la primera descripción de las AQP como canales de agua por Agre y colaboradores en 1992 (Preston *et al.*, 1992), se ha logrado evidenciar la relevancia del transporte de agua y cómo regula la homeostasis celular bajo diferentes condiciones fisiológicas a las que se exponen los seres vivos. En las plantas, la mayor parte del agua se transporta a lo largo de la vía célula-célula, por lo que el incremento en la abundancia o actividad AQP en la raíz conduce a un aumento de L_{pr} (Suku *et al.*, 2013; Gambetta *et al.*, 2017). En este trabajo identificamos que en la raíz de *M. crystallinum*, el aumento de la abundancia de PIP en la MP es parte de un proceso de adaptación provocado por la exposición al NaCl que ocurre paralelamente con un aumento en la abundancia de las *McPIP* también en las CCV (Fig. 11), lo cual indica que ambos procesos son importantes en esta halófito para incrementar el transporte de agua a través de la vía intercelular, que está acoplado a la acumulación de osmolitos intracelulares durante el estrés osmótico impuesto por la salinidad a largo plazo (Kirch *et al.*, 2000, Vaziriyeganeh *et al.*, 2018). Anteriormente se observó que el incremento en la abundancia de *McPIP* en la MP, no depende del aumento de los niveles de transcripción de las AQP (Vera-Estrella *et al.*, 2012). Respuestas a la salinidad similares ocurren en la raíz de *Brassica oleracea*, una especie moderadamente tolerante a la salinidad, donde se observó la acumulación de

PIP1 y PIP2 en la MP, independientemente del nivel de expresión de los transcritos (Muries *et al.*, 2011). Estos resultados indican que el incremento en la abundancia de las McPIP de la MP no está ligado a su regulación a nivel transcripcional, si no a regulación postraducciona, y en este caso, a través de su tráfico post-Golgi dependiente de CCV. Cambios en la abundancia de McPIP en las CCV podrían deberse no solo al proceso de endocitosis, sino también a exocitosis, lo cual impactaría sinérgicamente su abundancia en la MP. Este proceso se ha demostrado para las PIP que se encuentran bajo un proceso de reciclamiento constitutivo en respuesta a la salinidad en *A. thaliana* (Luu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). En este contexto, el reciclamiento constitutivo entre la MP y los compartimentos intracelulares es una forma de regular la abundancia de proteínas de membrana por medio de la modificación de las tasas relativas de endocitosis y exocitosis (Royle y Murrell-Lagnado, 2003).

El incremento de McPIP en la MP y en CCV en *M. crystallinum* indica que existe una regulación diferencial en el ajuste de la abundancia de las PIP de la MP entre halófitas y glicófitas durante la respuesta a la salinidad a largo plazo. En las glicófitas como *A. thaliana* se ha observado que la salinidad induce la endocitosis de las AtPIP en la MP para limitar su abundancia y así evitar la pérdida de agua por el cambio osmótico en el espacio extracelular (Boursiac *et al.*, 2008; Dhonukshe *et al.*, 2007; Ueda *et al.*, 2016). En cambio, en *M. crystallinum* el incremento en la abundancia de McPIP debe ser conectado a la acumulación de NaCl y la L_{pr} para mantener la homeostasis celular.

Demostramos que McPIP2;1 se localiza en fracciones enriquecidas en MP (Fig. 11) y también observamos que colocaliza con McPIP1;4 en la MP al expresarlas transitoriamente (Fig. 32) y formar heteroligómeros (Fig. 31). Anteriormente, en *M. crystallinum* se determinó que la fosforilación en la Ser282 de McPIP2;1 aumenta en respuesta a la salinidad solo en la MP (Amezcu-Romero, 2010, Gómez-Méndez *et al.*,

2022), interesadamente en *A. thaliana* cuando las raíces se exponen a 100 mM NaCl, se produce la defosforilación en la Ser283 de *AtPIP2;1*, lo cual funciona como una señal de endocitosis por CCV y conduce a su disminución en la MP (Park *et al.*, 2008). Esto sugiere que la capacidad de mantener la fosforilación en la Ser282 de *McPIP2;1*, podría evitar su internalización a través de las CCV durante condiciones de salinidad. Además, si comparamos el cambio en la abundancia de *McPIP1;4* y *McPIP2;1* en las CCV purificadas (3.5 y 5 veces, respectivamente) con la observada en la MP (Fig. 11 CCV 5 y 2 veces, respectivamente), podría sugerirse que el tráfico a través de CCV incrementa para las dos *McPIP*, pero impacta diferencialmente la abundancia de cada isoforma en la MP (Fig. 11, MP), lo cual indicaría que posee una regulación específica, similar a lo reportado anteriormente para otras isoformas de AQP en plantas con función y localización específica (Danielson y Johanson, 2008; Hacke y Laur, 2016). Además, debido a que *McPIP1;4* y *McPIP2;1* y *McAP μ* se asocian en los mismos compartimentos celulares (Fig. 26 a 29), pero se establecen interacciones específicas solo entre *McPIP1;4* con *McAP2 μ* y *McPIP2;1* con *McAP1 μ* (Fig. 30), y además ambas *McPIP* tienen la capacidad de interactuar entre ellas (Fig. 31), se podría hipotetizar que la presencia del heteroligómero influye en el tráfico hacia y desde la MP de cada isoforma de *McPIP*. Por lo tanto, la formación de heteroligómeros no solo puede estar involucrada en la salida de PIP1 del RE como se observó anteriormente entre miembros PIP1 y PIP2 de *Z. mays* (Fetter *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2007), sino también en el tráfico a través de CCV hacia y desde la MP a través de las interacciones específicas con AP1 μ y AP2 μ . Esta evidencia además estaría relacionada con la abundancia específica de homo o heteroligómeros en la MP y dado a que los heteroligómeros tienen una mayor permeabilidad al agua (Hernández-Domínguez, 2007), es posible que el tráfico dependiente de *McAP1 μ* durante condiciones de salinidad este favorecido hacia el

heteroligómero, y que la endocitosis por *McAP2 μ* este favorecida para el homoligómero con menor permeabilidad al agua, lo cual tendría como objetivo ajustar y eficientizar la permeabilidad al agua durante condiciones de salinidad.

X. CONCLUSIONES

- Las proteínas *McCLC*, *McAP1 μ* y *McAP2 μ* son componentes ortólogos presentes en *M. crystallinum* y conservados a nivel evolutivo y estructural.
- Las proteínas *McAP1 μ* y *McAP2 μ* participan en tráfico intracelular post-Golgi y se asocian con *McCLC*.
- Las acuaporinas *McPIP1;4* y *McPIP2;1* en respuesta a salinidad incrementan su abundancia en la membrana plasmática y en las vesículas de clatrina en la raíz de *M. crsytallinum*.
- La regulación del tráfico vesicular de *McPIP1;4* y *McPIP2;1* desde y hacia la membrana plasmática está regulado por vesículas de clatrina durante condiciones de salinidad.
- Existen interacciones proteína-proteína específicas entre *McPIP2;1/McAP1 μ* y *McPIP1;4/McAP2 μ* .
- Las acuaporinas *McPIP1;4* y *McPIP2;1* tienen la capacidad de formar heteroligómeros con mayor permeabilidad al agua y con localización preferencial en la membrana plasmática.
- Existe a diferencia de lo observado en glicófitas.

Por último, nuestros resultados demuestran que existe una regulación diferencial en las *McPIP* de la raíz de *M. crystallinum* que asegura la absorción de agua acoplada a la acumulación de Na^+ , la cual depende de la regulación selectiva de componentes

celulares conservados que conducen diferencialmente a un aumento en la abundancia de las PIP de la MP para mantener la homeostasis osmótica de acuerdo con la ecología de la especie.

XI. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar análisis adicionales para confirmar la interacción proteína-proteína de *McPIP2;1* y *McPIP1;4* *in planta*. Así mismo usar, inhibidores como TryA23, BFA y cicloheximida, para determinar las rutas de tráfico intracelular que se comparten o no, entre el heterolígmero y homolígmero. Además, para ampliar el conocimiento de los mecanismos de regulación utilizados por *M. crystallinum* en el control de la abundancia de las PIP, se requieren análisis que permitan identificar el reciclamiento constitutivo de PIP a través de CCV, durante condiciones control y de salinidad. Así mismo, son necesarios estudios comparativos entre los mecanismos celulares presentes en glicófitas y halófitas en condiciones de salinidad a corto y largo plazo, lo cual permitirá identificar procesos compartidos y/o especializados en cada tipo de planta.

XII. APÉNDICE

Tabla XII.1 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación

<i>McPIP1;4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAA AGCAGGCTTAATGGAGGGAA GGAAGAGGATG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTGCTTGGATTTGAATGGAAT TGCCCT
<i>McPIP2;1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAA AGCAGGCTTAATGACTAAGGA CGTGGAGGTG	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGT TGGGTGTGCAGAGCTCCTGAAGG AAC
<i>McCLC</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTCAT GTCTTCATTTCCCGACTCTTT	GTACAAGAAAGCTGGGTCCGCAG CCAATACGGCCTCTG
<i>McAP1μ</i>	CACCATGTCGGGAGCGGCCT C	TCACATTAGCCTCAGCTCGTACT o CATTAGCCTCAGCTCGTACT
<i>McAP2μ</i>	CACCATGCCGGTGGCTGCTTC	ATCACACCTGATCTCATATGAACC AGC o ACACCTGATCTCATATGAACCAG

XII.2 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

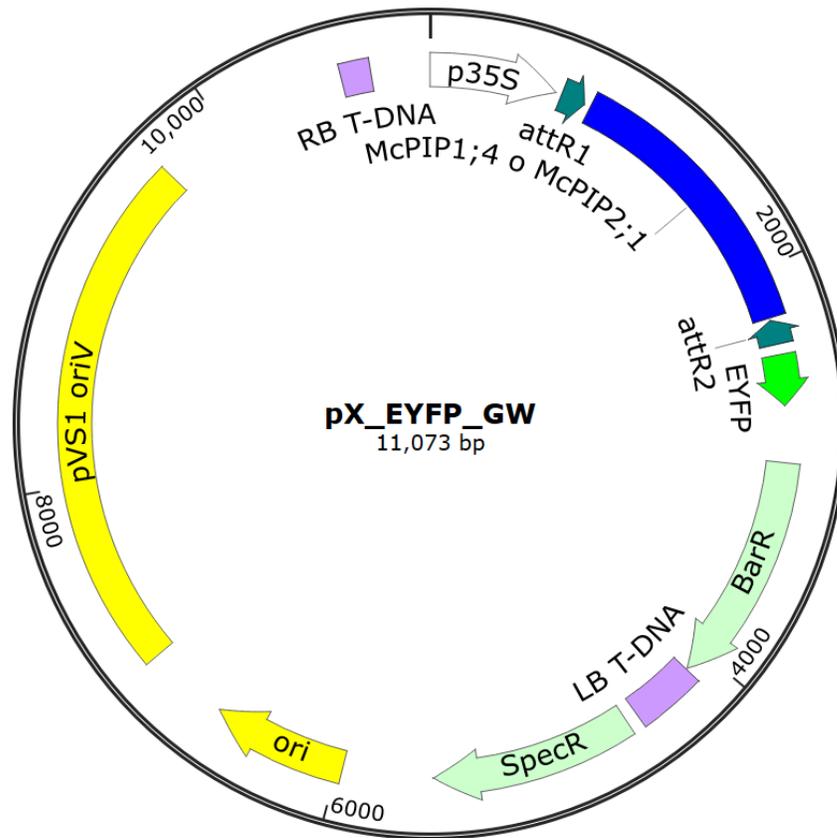


Fig. Suplementaria 1. Mapa del plásmido destino pX-EYFP-GW. Esquema del plásmido pX-EYFP-GW recombinado con los cDNA clonados de *McPIP1;4* o *McPIP2;1*. Se muestran los sitios de recombinación Gateway®, (*attR1* y *attR2*) y la fusión al C-terminal a la proteína verde fluorescente (EYFP). La expresión del casete está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del tabaco (p35S) y por los elementos regulatorios en 5' y 3' de la nopalina sintasa. El vector además contiene el gen de la fosfotricina-N-acetiltransferasa que confiere resistencia al herbicida Basta (BarR). La transferencia del casete o T-DNA, está regulado por los bordes derecho (RB T-DNA) e izquierdo (LB T-DNA). El esqueleto del vector contiene la secuencia de replicación pVS para el mantenimiento en *A. tumefaciens*, el origen de replicación pBR322 (*ori*) para producir alto número de copias en *E. coli* y el gen aminoglucósido-3-adeniltransferasa para la resistencia a espectinomicina en bacterias (SpecR), el cual funciona como marcador de selección.

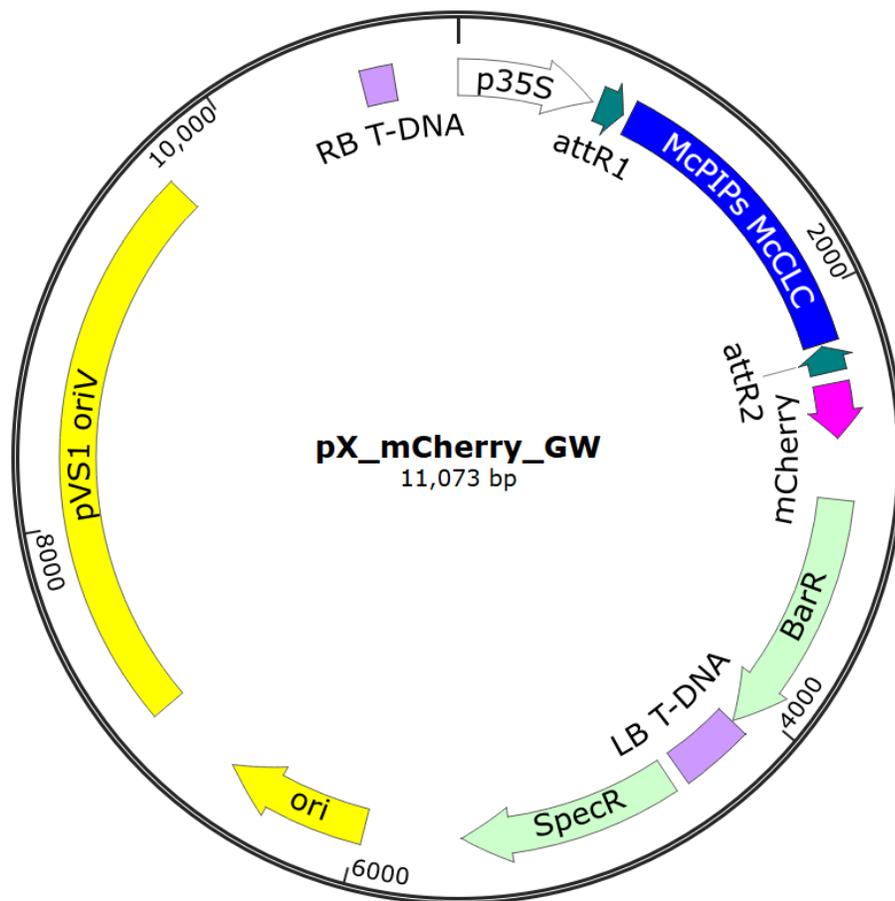


Fig. Suplementaria 2. Mapa del plásmido destino pX-mCherry-GW. Esquema del plásmido destino pX-mCherry-GW recombinado con los cDNA clonados de *McPIP1;4*, *McPIP2;1* o *McCLC*. Se muestran los sitios de recombinación Gateway®, (*attR1* y *attR2*) y la fusión al C-terminal a la proteína monomérica rojo fluorescente (*mCherry*). La expresión del casete está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del tabaco (*p35S*) y por los elementos regulatorios en 5' y 3' de la nopalina sintasa. El vector además contiene el gen de la fosfotricina-N-acetiltransferasa que confiere resistencia al herbicida Basta (*BarR*), si la transformación en plantas en estable. La transferencia del casete o T-DNA, está regulado por los bordes derecho (*RB T-DNA*) e izquierdo (*LB T-DNA*). El esqueleto del vector contiene la secuencia de replicación *pVS* para el mantenimiento en *A. tumefaciens*, el origen de replicación *pBR322* (*ori*) para producir alto número de copias en *E. coli* y el gen aminoglucósido-3-adeniltransferasa para la resistencia a espectinomicina en bacterias (*SpecR*), el cual funciona como marcador de selección.

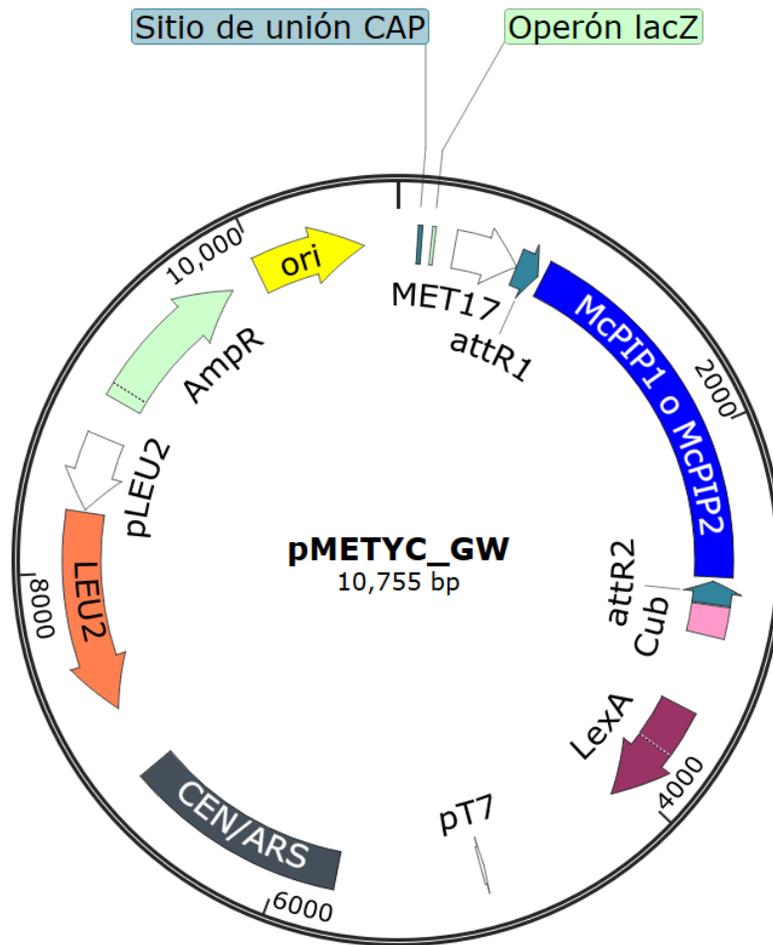


Fig. Suplementaria 3. Mapa del plásmido destino pMETYC_GW. Esquema del plásmido destino pMETYC_GW recombinado con los cDNA clonados de *McPIP1*;4 o *McPIP2*;1. La expresión de las AQP fusionadas por el extremo C-terminal al C-terminal de la ubiquitina (Cub) está bajo el control del promotor MET17, el cual se reprime en presencia de metionina. El activador transcripcional LexA, regula la transcripción del operón lacZ. El plásmido cuenta con el marcador de selección LEU2, el cual codifica para β -isopropilmalato deshidrogenasa; que cataliza el tercer paso en la ruta de biosíntesis de leucina. El elemento CEN/ARS funcionan como origen de replicación estable, sin la necesidad de integración en el genoma de la levadura. El esqueleto del vector cuenta con el origen de replicación pBR322 (ori) para producir alto número de copias en *E. coli* y el gen β -lactamasa para la resistencia a ampicilina en bacterias (AmpR).

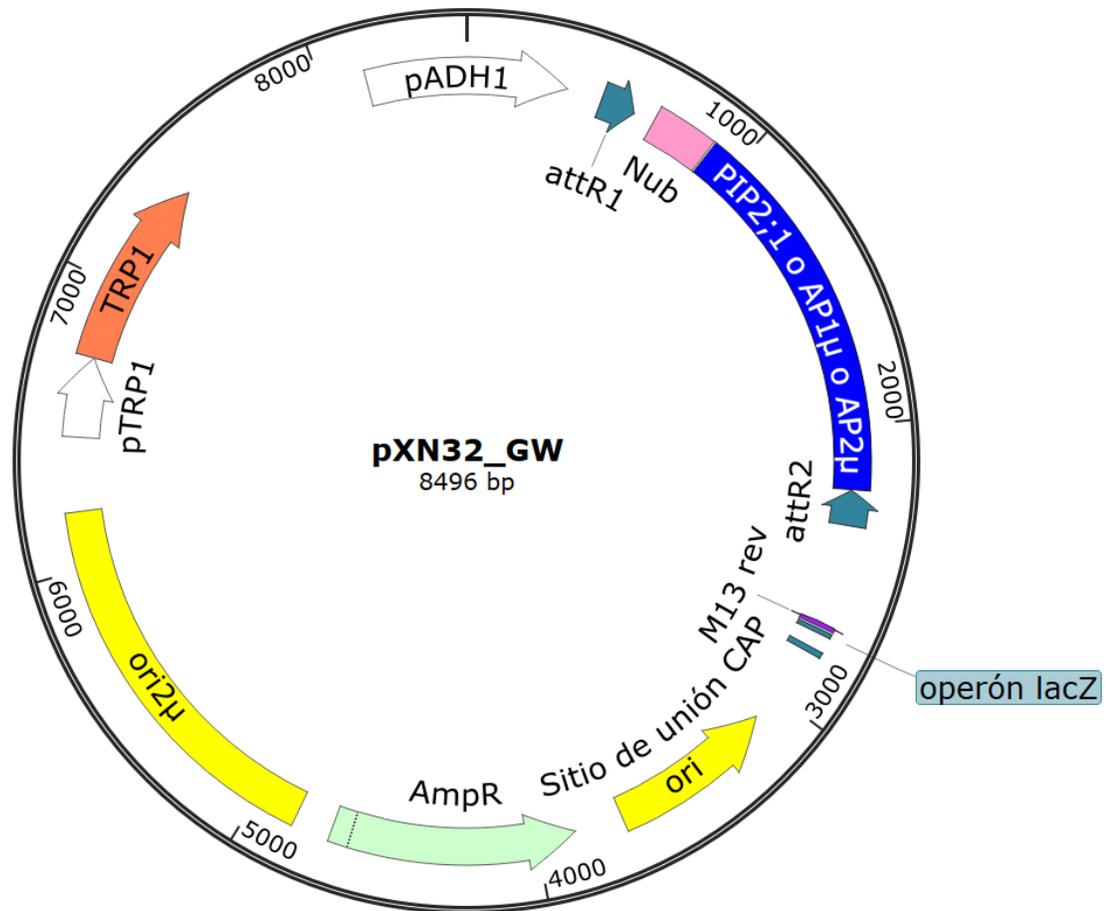


Fig. Suplementaria 4. Mapa del plásmido destino pXN32_GW. Esquema del plásmido destino pXN32_GW recombinado con los cDNA clonados de *McAP1 μ* o *McAP2 μ* por el extremo N-terminal al N-terminal de la ubiquitina (Nub) está bajo el control del promotor del alcohol deshidrogenasa 1 (pADH1). El plásmido cuenta con el marcador de selección TRP1, el cual codifica para la isomerasa de fosforribosilantranilato; que cataliza el tercer paso en la biosíntesis de triptófano. El elemento CEN/ μ 2 funcionan como origen de replicación estable de plásmido en levadura. El esqueleto del vector cuenta con el origen de replicación pBR322 (ori) para producir alto número de copias en *E. coli* y el gen β -lactamasa para la resistencia a ampicilina en bacterias (AmpR).

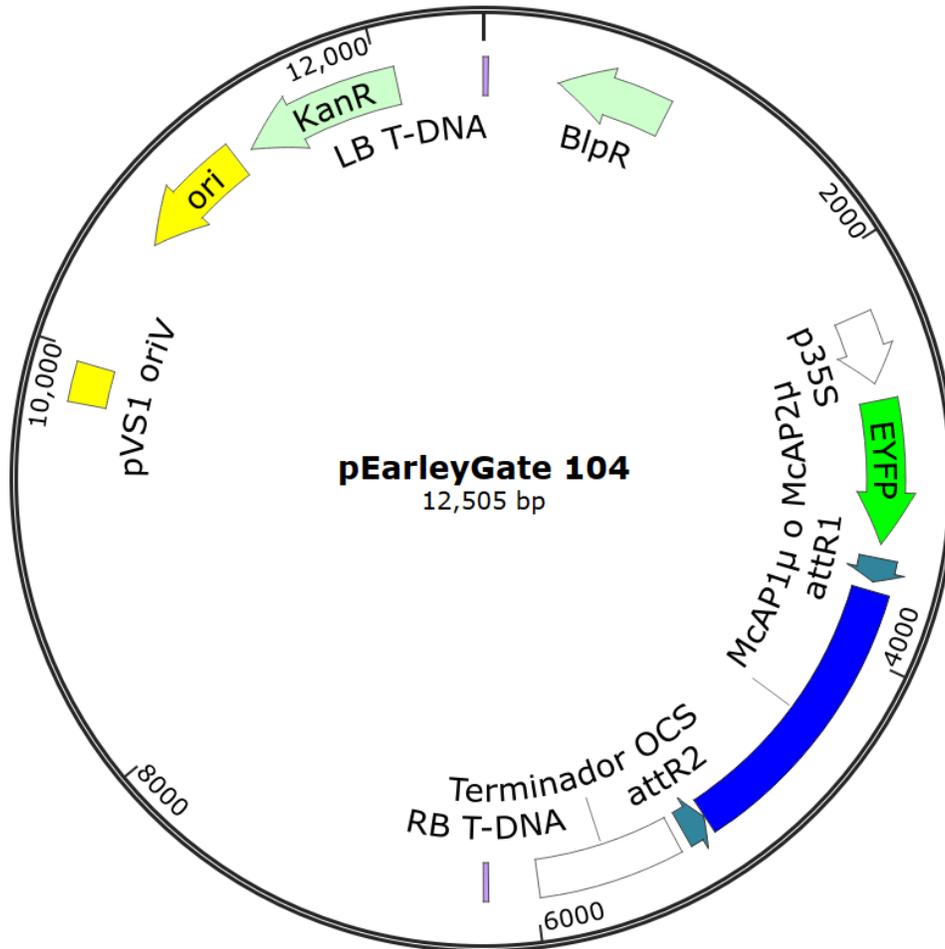


Fig. Suplementaria 5. Mapa del plásmido destino pEarleyGate-104. Esquema del plásmido destino pEarleyGate-104 recombinado con los cDNA clonados de *McAP1 μ* o *McAP2 μ* . Se muestran los sitios de recombinación Gateway®, (*attR1* y *attR2*) y la fusión al N-terminal a la proteína verde fluorescente (EYFP). La expresión del casete está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del tabaco (p35S) y por los elementos regulatorios en 5' y 3' de la octopina sintasa (OCS). El vector contiene el gen de la fosfinotricina-N-acetiltransferasa que confiere resistencia al herbicida Basta (BIPR). La transferencia del casete o T-DNA, está regulado por los bordes derecho (RB T-DNA) e izquierdo (LB T-DNA). El esqueleto del vector contiene la secuencia de replicación pVS para el mantenimiento en *A. tumefaciens*, el origen de replicación pBR322 (*ori*) para producir alto número de copias en *E. coli* y el gen aminoglucósido-3-adeniltransferasa para la resistencia a espectinomicina en bacterias (SpecR), el cual funciona como marcador de selección.

XII.3 Publicación de artículos en revistas indexadas

1. **Gómez-Méndez MF**, Amezcua-Romero JC, Rosas-Santiago P, Hernández-Domínguez EE, de Luna-Valdez LA, Ruiz-Salas JL, Vera-Estrella R, Pantoja O (2023). Ice plant root plasma membrane aquaporins are regulated by clathrin-coated vesicles in response to salt stress. *Plant Physiology* 191:199-218.
2. Rosas-Santiago P, Zechinelli-Perez K, **Gómez-Méndez MF**, Vera-Lopez Portillo F, Ruiz-Salas JL, Corboda-Martinez E, Acosta-Maspon A y Pantoja Omar (2021). A differential subcellular localization of two copper transporters from the COPT family suggests distinct roles in copper homeostasis in *Physcomitrium patens*. *Plant Physiology and Biochemistry* 167: 459- 469
3. Vera-Estrella R, **Gómez-Méndez MF**, Amezcua-Romero JC, Barkla BJ, Rosas Santiago P y Pantoja O (2017). Cadmium and zinc activate adaptive mechanisms in *Nicotiana tabacum* similar to those observed in metal tolerant plants. *Planta*, 246:433-451.

Publicaciones en revistas nacionales

1. Davila- Delgado R, **Gómez-Méndez MF**, Sanchez-Lopez, R y Vera-Estrella R. Endocitosis en plantas (parte i): inducida por factores abióticos, bióticos y hormonas (2019). *Revista de Educación Bioquímica*, 2:38-47.
2. **Gómez-Méndez MF**, Davila-DelgadoR, Sanchez-Lopez, R y Vera-Estrella R. La endocitosis en plantas (parte ii): como estudiarla utilizando inhibidores (2019). *Revista de Educación Bioquímica*, 1:14-22.

Publicaciones en revistas de divulgación

1. Vera-Estrella R, Garcia-Mariano R, **Gómez-Méndez MF**, Rosas-Santiago P, Pantoja-Ayala O. (2019). Uso de tabaco para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados. *Biotecnología en Movimiento. Revista de divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM* 17: 23-25.

XIII. LITERATURA CITADA

- Abascal F, Irisarri I y Zardoya R (2014). Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840:1468-1481.
- Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jensen RG, Bohnert HJ y Griffiths H (1998). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *The New Phytologist* 138: 171–190
- Afzal Z, Howton TC, Sun Y y Makhtar MS (2016). The roles of Aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology* 4: 9
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U y Kjellbom P (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of Aquaporins. *Plant Mol Biol* 59:469-484.
- Aniento F, Sánchez de Medina Hernández V, Dagdas Y, Rojas-Pierce M, Russinova E (2022). Molecular mechanisms of endomembrane trafficking in plants. *Plant Cell* 20:146-173
- Aroca R, Porcel R y Ruiz LM (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 63:43-57
- Asaoka R, Uemura T, Nishida S, Fujiwara T, Ueda T y Nakano A (2013). New insights into the role of Arabidopsis RABA1 GTPases in salinity stress tolerance. *Plant signaling y behavior* 8:9 e25377
- Banbury DN, Oakley JD, Sessions RB y Banting G (2003). Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem* 278:12022-8.
- Barkla B (2018). Free flow zonal electrophoresis for fractionation of plant membrane compartments prior to proteomic analysis. Edited by Mock HP Matros A, Witzel K in *Plant Membrane Proteomics. Methods in Molecular Biology* vol, 1696. Humana Press, New York, NY
- Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE y Zeuthen T (2006). Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *PNAS* 103:269-74.
- Bellati J, Alleva K, Soto G, Vitali V, Jozefkowicz C y Amodeo G (2010). Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. *Plant Mol. Biol* 74: 105–118.
- Berny MC, Gilis D, Rooman M y Chaumont F (2016). Single mutations in the transmembrane domains of maize plasma membrane aquaporins affect the activity of monomers within a heterotetramer. *Mol Plant*. doi:10.1016/j.molp.2016.04.006

Besserer A, Burnotte E, Bienert GP, Chevalier AS, Errachid A, Grefen C, Blatt MR y Chaumont F. (2012). Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell* 24:3463-81

Bienert GP, Cavez D, Besserer A, Berny MC, Gilis D, Rooman M y Chaumont F (2012). A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem Journal* 445:101-11.

Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu D.T, Tournaire-Roux C y Maurel C (2008). Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant Journal* 56: 207–218

Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N y Maurel C (2005). Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* 139: 790-805

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 7: 248-54

Byrt CS, Zhao M, Kourghi M, Bose J, Henderson SW, Qiu J, Gilliam M, Schultz C, Schwarz M, Ramesh SA, Yool A y Tyerman S (2017). Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2;1 regulated by Ca²⁺ and pH. *Plant. Cell. Environ.* 40:802–815.

Carrillo P, Grazia M, Pontecorvo G, Fuggi A y Woodrow P (2011). Salinity Stress and Salt Tolerance. *In Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations* 2:21-38

Chaumont F y Tyerman SD (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*

Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS y Richardson DC (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 1):12-21.

Chevalier AS y Chaumont F (2015). Trafficking of plant plasma membrane aquaporins: multiple regulation levels and complex sorting signals. *Plant and Cell Physiology* 56: 819-829

Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G y Lockett S (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 86:3993-4003.

Danielson JA y Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8: 45

Deepanksha Arora y Daniël Van Damme (2021). Motif-based endomembrane trafficking. *Plant Physiology* 186. 221–238

- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD y Friml J (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17: 520-527
- Feraru E, Paciorek T, Feraru MI, Zwiewka M, De Groot R, De Rycke R, Kleine-Vehn J y Friml J (2010). The AP-3 β adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 2812
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M y Chaumont F (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant cell* 16: 215–228
- Flowers TJ, Galal HK y Bromham L (2010). Evolution of Halophytes: Multiple Origins of Salt Tolerance in Land Plants. *Functional Plant Biology* 37: 604-612.
- Fox AR, Scochera F, Laloux T, Filik K, Degand H, Morsomme P, Alleva K y Chaumont F (2020). Plasma membrane aquaporins interact with the endoplasmic reticulum resident VAP27 proteins at ER-PM contact sites and endocytic structures. *New Phytologist* 228:973-988
- French AP, Mills S, Swarup R, Bennett MJ y Pridmore TP (2008). Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols* 3: 619-628
- Fuji K, Shirakawa M, Shimono Y, Kunieda T, Fukao Y, Koumoto Y, Takahashi H, Hara-Nishimura I, y Shimada T (2016). The Adaptor Complex AP-4 Regulates Vacuolar Protein Sorting at the trans-Golgi Network by Interacting with VACUOLAR SORTING RECEPTOR1. *Plant Physiology* 170: 211–219
- Fujimoto M y Ueda T (2012). Conserved and plant-unique mechanisms regulating plant post-Golgi traffic. *Front Plant Sci* 3:197.
- Gambetta GA, Knipfer T, Fricke W y McElrone AJ (2017). Aquaporins and root water uptake. Edited by Chaumont F y Tyerman SD In *Plant Aquaporins, Signaling and Communications in Plants*, Springer
- Gómez-Mendez MF (2015). Caracterización proteómica de un compartimento subcellular putativo de la raíz de la halófito *Mesembryanthemum crystallinum*. Tesis de Maestría. Progrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Gu F, Crump CM y Thomas G (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* 58:1067-84.
- Hachez C, Besserer A, Chevalier AS y Chaumont F (2013). Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends in Plant Sciences* 18:344-352
- Hacke UG y Laur J (2016). Aquaporins: Channels for the molecule of life. Edited by Chichester. In *eLS*. John Wiley y Sons
- Hashido M, Kidera A y Ikeguchi M (2007). Water transport in aquaporins: osmotic permeability matrix analysis of molecular dynamics simulations. *Biophys J* 93:373-85

Hernández-Domínguez E (2007). Distribución subcelular y caracterización fisiológica de la acuaporina McPIP1;4 de *Mesembryanthemum crystallinum*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Heymann JB y Engel A (1999). Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News in Physiological Sciences* 14: 187-193

Hirst J, Irving C y Borner GHH (2012). Adaptor proteins vcomplex AP-4 and AP-5: New players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic* 14: 153-164

Hoagland DR y Arnon DI (1938). The water culture method for growing plants without soil. *Californian Experimental Station Circular* 347: 1–39.

Horner A, Zocher F, Preiner J, Ollinger N, Siligan C, Akimov SA y Pohl P (2015). The mobility of single-file water molecules is governed by the number of H-bonds they may form with channel-lining residues. *Sci Adv* 20:1(2):e1400083.

Jensen MO, Tajkhorshid E y Schulten K (2001). The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure* (11):1083-93.

Jia X, Weber E, Tokarev A, Lewinski M, Rizk M, Suarez M, Guatelli J y Xiong Y (2014). Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *Elife* 29;3:e02362.

Jozefkowicz C, Sigaut L, Scochera F, Soto G, Ayub N, Pietrasanta LI, Amodeo G, González Flecha FL y Alleva K (2016). PIP Water Transport and Its pH Dependence Are Regulated by Tetramer Stoichiometry. *Biophys J* 110:1312-21.

Jurgens G (2004). Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:481-504.

Katzen F (2007). Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov* 2 571–589

Kirch HH, Vera-Estrella R, Goldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ y Bohnert HJ (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* 123: 111-124

Kirchhausen K, Owen D y Harrison SC (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 1;6(5):a016725.

Kovtun O, Dickson KV, Kellt BT, Owe DJ y Bringgs JG (2020). Architecture of the AP2/clathrin coat on the membranes of clathrin-coated vesicles. *Sciences advances* 6: eaba8381

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C y Tamura K (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685

- Lalonde S, Sero A, Pratelli R, Pilot G, Chen J, Sardi MI, Parsa SA, Kim DY, Acharya BR, Stein EV, Hu HC, Villiers F, Takeda K, Yang Y, Han YS, Schwacke R, Chiang W, Kato N, Loqué D, Assmann SM, Kwak JM, Schroeder JI, Rhee SY y Frommer WB (2010). A membrane protein/signaling protein interaction network for Arabidopsis version AMPv2. *Frontiers in Physiology* 1:24
- Larson ER, Van Zelm E, Roux C, Marion-Poll A, y Blatt MR (2017). Clathrin heavy chain subunits coordinate endo- and exocytic traffic and affect stomatal movement. *Plant Physiology* 175: 708-720.
- Law KC, Chung KK y Zhuang X (2022). An update on the coat protein complexes for vesicles formation in plant post-Golgi trafficking. *Front Plant Sci* 13:826007
- Läuchli A. y Grattan SR (2007). Plant growth and development under salinity stress. En *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* Springer: 1-32.
- Le SQ y Gascuel O (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1307-1320
- Lee SH y Zwiazek JJ (2015). Regulation of aquaporin-mediated water transport in Arabidopsis roots exposed to NaCl. *Plant and Cell Physiology* 56: 750-8
- Levine A (2002). Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? *Plant Physiology Biochemistry* 40: 531-535.
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu DT y Maurel C, Lin J (2011). Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* 23:3780-97.
- Luu DT, Martinière A, Sorieul M, Runions J y Maurel C (2011). Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. *Plant J* 69:894-905.
- Madrid R, Le Maout S, Barrault MB, Janvier K, Benichou S y Mérot J (2001). Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *The EMBO Journal* 20: 7008-7021
- Martina JA, Bonangelino CJ, Aguilar RC y Bonifacino JS (2001). Stonin 2: an adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *J Cell Biol* 28:1111-1120.
- Matsumoto T, Lian HL, Su WA, Tanaka D, Liu Cw, Iwasaki I y Kitagawa Y (2009). Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiology* 50:216-29
- Maurel C, Tournaire-Roux C, Verdoucq L y Santoni V (2021). Hormonal and environmental signaling pathways target membrane water transport. *Plant Physiology* 0:1-15

Mineo Shibasaka, Tomoaki Horie y Maki Katsuhara (2021). Mechanisms Activating Latent Functions of PIP Aquaporin Water Channels via the Interaction between PIP1 and PIP2 Proteins. *Plant and Cell Physiology* 62: 92–99.

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

Munns R y Termaat A (1986). Whole-Plant Responses to Salinity. *Functional Plant Biology* 13:143-160

Muries B, Faize M, Carvajal M y Martínez-Ballesta M del C (2011). Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. *Molecular Biosystem* 4:1322-35

Norambuena L, Tejos R (2017). Chemical Genetic Dissection of Membrane Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 68:197-224

Obrdlik P, El-Bakkoury M, Hamacher T, Cappellaro C, Vilarino C, Fleischer C, Ellerbrok H, Kamuzinzi R, Ledent V, Blaudez D, Sanders D, Revuelta JL, Boles E, André B y Frommer WB (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *PNAS* 101: 12242-12247

Oh DH, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Lee SY, Bohnert HJ y Dassanayake M (2015). Cell type-specific responses to salinity - the epidermal bladder cell transcriptome of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytologist* 207:627-644

Oparka KJ (1994). Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytologist* 126: 571–591

Otto B, Uehlein N, Sdorra S, Fischer M, Ayaz M, Belastegui-Macadam X, Heckwolf M, Lachnit M, Pede N, Priem N, Reinhard A, Siegfart S, Urban M y Kaldenhoff R (2010). Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J Biol Chem.* 285:31253-31260.

Ozu M, Alvear-Arias JJ, Fernandez M, Caviglia A, Peña-Pichicoi A, Carrillo C, Carmona E, Otero-Gonzalez A, Garate JA, Amodeo G y Gonzalez C (2022). Aquaporin Gating: A New Twist to Unravel Permeation through Water Channels. *International Journal of Molecular Sciences* 23(20):12317

Paraan M, Mendez J, Sharum S, Kurtin D, He H y Stagg SM (2020). The structures of natively assembled clathrin-coated vesicles. *Sci Adv* 22:eaba8397.

Park M, Song K, Reichardt I, Kim H, Mayer U, Stierhof YD, Hwang I y Jürgens G (2013). Arabidopsis μ -adaptin subunit AP1M of adaptor protein complex 1 mediates late secretory and vacuolar traffic and is required for growth. *PNAS* 10318-10323

Partlow EA, Baker RW, Beacham GM, Chappie JS, Leschziner AE y Hollopetter G (2019). A structural mechanism for phosphorylation-dependent inactivation of the AP2 complex. *Elife* 29;8:e50003.

Pertl-Obermeyer H, Wu XN, Schrodtr J, Müdsam C, Obermeyer G, Schulze WX (2016). Identification of Cargo for Adaptor Protein (AP) Complexes 3 and 4 by Sucrose Gradient Profiling. *Mol Cell Proteomics* 15:2877-2889.

Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C y Santoni V (2008). Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Molecular & Cellular Proteomics* 7: 1019-1030.

Reynolds GD, August B y Bednarek SY (2014). Preparation of enriched plant clathrin-coated vesicles by differential and density gradient centrifugation. Editor Otegui M in *Plant Endosomes. Methods in Molecular Biology*, vol 1209. Humana Press, New York, NY

Richter S, Voss U y Jürgens G (2009). Post-Golgi traffic in plants. *Traffic* 10: 819-828.

Rigal A, Doyle SM y Robert S (2015). Live cell imaging of FM4-64, a tool for tracing the endocytic pathways in Arabidopsis root cells. Edited by Estevez J. In *Plant Cell Expansion*. Humana Press, New York, NY. *Methods in Molecular Biology* 1242: 93-103

Robinson DG y Pimpl P (2014). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends in Plant Sciences* 19:134-139

Robinson DG, Langhans M, Saint-Jore-Dupas C y Hawes C (2008). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci* 13:405-408.

Roche JV y Törnroth-Horsefield S (2017). Aquaporin Protein-Protein Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 18:2255.

Rosas-Santiago P, Lagunas-Gómez D, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Lalonde S, Jones A, Frommer WB, Zimmermannova O, Sychrová H y Pantoja O (2015). Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *Journal of Experimental Botany* 66:2733-2748

Royle SJ y Murrell-Lagnado RD (2003). Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays* 25:39-46.

Sander H, Wallace S, Plouse R, Tiwari S y Gomes AV (2019). Ponceau S staining for total protein normalization. *Analytical Biochemistry* 15: 44-53

Scheele, Urte and Holstein y Susanne EH (2002). Functional evidence for the identification of an Arabidopsis clathrin light chain polypeptide. *FEBS Letters*: 514

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P y Cardona A (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9:676-682

Shen S, Li N, Wang Y, Zhou R, Sun P, Lin H, Chen W, Yu T, Liu Z, Wang Z, Tan X, Zhu C, Feng S, Zhang Y y Song X (2022). High-quality ice plant reference genome analysis provides insights into genome evolution and allows exploration of genes involved in the transition from C3 to CAM pathways. *Plant Biotechnol J*. 11:2107-2122.

Shimizu Y, Takagi J, Ito E, Ito Y, Ebine K, Komatsu Y, Goto Y, Sato M, Toyooka K, Ueda T, Kurokawa K, Uemura T y Nakano A (2021). Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. *Nature communications* 12:1901

Singh RK, Deshmukh R, Muthamilarasan M, Rani R y Prasad M (2020). Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiol Biochem.*149:178-189.

Smith SM, Baker M, Halebian M y Smith CJ (2017). Weak Molecular Interactions in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Front Mol Biosci* 4:72.

Steudle E (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 350: 1532-1542.

Sorieul M, Santoni V, Maurel C y Luu DT (2011). Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2;1 in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 12: 473–482.

Suku S, Knipfer T y Fricke W (2013) Do root hydraulic properties change during the early vegetative stage of plant development in barley (*Hordeum vulgare*). *Ann Bot* 113: 385–402

Sun TX, Van Hoek A, Huang Y, Bouley R, McLaughlin M, Brown D (2002). Aquaporin-2 localization in clathrin-coated pits: inhibition of endocytosis by dominant-negative dynamin. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F998-1011.

Sutka M, Li G, Boursiac Y, Doumas P y Maurel C (2011). Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* growth in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiology* 155: 1264-1276.

Teh OK, Shimono Y, Shirakawa M, Fukao Y, Tamura K, Shimada T y Hara-Nishimura I (2013). The AP-1 μ adaptin is required for KNOLLE localization at the cell plate to mediate cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 54: 838–847

Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N, Kuwahara M, Sasaki S y Tsuchiya T (2005). Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 15:4417-4422

Ueda M, Tsutsumi N y Fujimoto M (2016). Salt stress induces internalization of plasma membrane aquaporin into the vacuole in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 10:742-74619.

Vaziriyeganeh M, Lee SH y Zwiazek JJ (2018). Water transport properties of root cells contribute to salt tolerance in halophytic grasses *Poa juncifolia* and *Puccinellia nuttalliana*. *Plant Science* 276: 54-62

Vera-Estrella R, Barkla BJ, Amezcua-Romero JC y Pantoja O (2012). Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell & Environment* 35: 485-501

Verdoucq L, Rodrigues O, Martinière A, Luu DT y Maurel C (2014). Plant aquaporins on the move: reversible phosphorylation, lateral motion and cycling. *Current Opinion in Plant Biology* 22:101-107

Wang JG, Li S, Zhao XY, Zhou LZ, Huang GQ, Feng C and Zhang Y (2013). HAPLESS13, the Arabidopsis μ 1 adaptin, is essential for protein sorting at the trans-Golgi network/early endosome. *Plant Physiology* 162:1897-1910

Wang S, Yoshinari A, Shimada T, Hara-Nishimura I, Mitani-Ueno N, Feng Ma J, Naito S y Takano J (2017). Polar Localization of the NIP5;1 Boric Acid Channel Is Maintained by Endocytosis and Facilitates Boron Transport in Arabidopsis Roots. *Plant Cell* 29:824-842.

Wang W, Vinocur B y Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerances. *Planta* 218:1-14

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer T.A.P., Rempfer C, Bordoli L, Lepore R y Schwede T (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(W1), W296-W303.

Whelan S y Goldman N (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* 18: 691-699

Wilbur JD, Hwang PK, Ybe JA, Lane M, Sellers BD, Jacobson MP, Fletterick RJ, Brodsky FM. Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly (2010). *Dev Cell* 18:841-848.

Wudick MM, Li X, Valentini V, Geldner N, Chory J, Lin J, Maurel C y Luu DT (2015). Subcellular Redistribution of Root Aquaporins Induced by Hydrogen Peroxide. *Mol Plant* 8: 1103–1114

Yamaoka S, Shimono Y, Shirakawa M, Fukao Y, Kawase T, Hatsugai N, Tamura K, Shimada T, y Hara-Nishimura I (2013). Identification and dynamics of Arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. *Plant Cell* 25: 2958-2969

Yan X, Wang Y, Xu M, Dahhan DA, Liu C, Zhang Y, Lin J, Bednarek SY y Pan J (2021). Cross-Talk between Clathrin-dependent post-Golgi trafficking and clathrin-mediated endocytosis in Arabidopsis root cells. *The Plant Cell* 33: 3057–3075

Yanoff A, Sigaut L, Marquez M, Alleva K, Pietrasanta LI y Amodeo G (2014). Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *PNAS* 111:231-6.

Yperman K, Papageorgiou AC, Merceron R, De Munck S, Bloch, Y, Eeckhout D, Jiang Q, Tack P, Grigoryan R, Evangelidis T, Van Leene J, Vincze L, Vandenabeele P, Vanhaecke F, Potocký M, De Jaeger G, Savvides SN, Tripsianes K, Pleskot R y Van Damme D (2021). Distinct EH domains of the endocytic TPLATE complex confer lipid and protein binding. *Nat Commun* 12: 3050

Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA y Chamont F (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization *PNAS* 104:12359–12364

Zhang L, Xing J y Lin J (2019). At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytologist* 224: 1479-1489

Zhang L, Zhang H, Liu P, Hao H, Jin JB y Lin J (2011). Arabidopsis R-SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 are required for cell plate formation. *PLoS One* 6(10):e26129.