



Relaciones estructura-función del sensor de Ca^{2+} SOS3 de *Arabidopsis thaliana*

Memoria que presenta: **Elena García Martín**

para optar al título de Doctora en Ingeniería Agrónoma

Junio 2017

Relaciones estructura-función del sensor de Ca^{2+}
SOS3 de Arabidopsis thaliana

Visado en Sevilla, a de de 2017

LOS DIRECTORES

Dr D. José Manuel Pardo Prieto

Profesor de Investigación

Dr. D. Francisco Javier Quintero Toscano

Científico Titular del CSIC

EL TUTOR

Dr. D. José María Romero Rodríguez

Catedrático de Bioquímica Vegetal y Biología
Molecular de la Universidad de Sevilla

DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Relaciones estructura-función del sensor de Ca^{2+} SOS3 de *Arabidopsis thaliana*”, presentada por Dña. Elena García Martín para optar al grado de Doctora en Ingeniería Agrónoma, ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología Vegetal, bajo la dirección de los Drs. D. José Manuel Pardo Prieto y D. Francisco Javier Quintero Toscano, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a ... de de 2017

El presente trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos BIO2009-08641 y BFU2012-35060 del Plan Nacional de I+D+i, dentro del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador.

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis por el tiempo dedicado a ella y por ofrecerme sus conocimientos. A José Manuel por confiar en mí y permitirme realizar la tesis en su laboratorio. A Javier, por su paciencia conmigo, que ha sido mucha, por su apoyo y por todo lo que he aprendido en estos años, prácticamente todo lo que sé de genética y biotecnología se lo debo a él.

Quiero dar las gracias de forma especial a Irene, por ser un referente para mí en este laboratorio, por el tiempo dedicado durante los dos primeros años y por darme la base sobre la que se ha construido este trabajo. A Zaida, porque su ayuda con las imágenes del confocal ha sido imprescindible en esta tesis y por su hospitalidad en Heidelberg. A Raúl, por tu buen humor, por tu ayuda y por tu aportación a esta tesis.

A Eduardo, Imelda, Beatriz y M^a Ángeles por vuestra disponibilidad siempre que he necesitado vuestra ayuda.

A Anna y Javi por aportar ese punto de alegría. A José Ramón, mi “hermano de tesis” porque aunque con puntos de vista muy diferentes siempre he sabido que había alguien capaz de entenderme. A Paula, Fran y Belén, por traer el aire fresco que tanta falta hacía y que cambió todo. Gracias a todos por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, que espero que sigan siendo muchos.

A Irene y Pili por hacer más agradable mi estancia en el centro. A Paloma, Marta y José María, porque aunque no hemos compartido laboratorio, vuestra amistad es lo mejor que me llevo de mi paso por el IRNAS.

A mis padres, por recordarme que el esfuerzo siempre merece la pena y por vuestro apoyo en todo. A Vera y Alegra, por vuestra alegría y por tanto amor.

Finalmente esta tesis es por y para Javi. Más que agradecerle debería pedirte perdón por tantos malos ratos. Por fin se cierra una etapa y empieza una nueva que seguro será mucho mejor. Gracias por ser siempre la mejor parte de mi vida durante estos 15 años.

Gracias a todos, porque a todos os pertenece una parte de este trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	17
1. El problema de la salinidad en la agricultura	17
2. Efectos producidos por el estrés salino sobre las plantas	18
2.1. Estrés osmótico	18
2.2. Toxicidad iónica.....	19
2.3. Estrés oxidativo	20
2.4. Efectos secundarios del estrés salino	20
3. Respuestas adaptativas de las plantas frente al estrés salino	21
3.1. Adaptaciones a nivel celular.....	21
3.1.1. Regulación de la homeostasis	21
3.1.2. Respuesta al estrés oxidativo	22
3.2. Adaptaciones de la planta completa	25
3.2.1 Regulación del transporte de Na ⁺	25
3.2.2. Adaptaciones morfológicas	26
3.2.3. Regulación del crecimiento de la planta	27
4. Transducción de señales en respuesta a la salinidad	28
4.1. Sensores del estrés salino	28
4.2. Mensajeros secundarios	29
4.3. Rutas de señalización mediante cascadas de fosfoproteínas	30
4.3.1. Ruta MAPKs	30
4.3.2. Ruta CDPKs	31
4.3.3. Ruta CBL/CIPKs.....	33
5. El transporte iónico en las plantas	38
5.1. Regulación del transporte y distribución de Na ⁺	40
5.1.1. Absorción del Na ⁺	40
5.1.2. Acumulación de Na ⁺ en la vacuola.....	43
5.1.3. Expulsión y transporte de Na ⁺ a larga distancia	46
6. Sistema SOS	48
6.1. El antiportador Na ⁺ /H ⁺ de membrana plasmática SOS1: Filogenia y características ..	48
6.2. Funcionamiento y regulación del sistema SOS en el transporte de Na ⁺	50
6.3. Otras funciones de los genes SOS en la homeostasis iónica	54
6.4. Sobreexpresión de los genes SOS en la mejora de la tolerancia a salinidad	55
6.5. Otras funciones de las proteínas SOS en la tolerancia a estrés salino: Su papel en el desarrollo radicular	56

II. OBJETIVOS	61
III. MATERIALES Y MÉTODOS	65
M.1. Material biológico	65
M.1.1. Bacterias.....	65
M.1.1.1. Cepas de bacterias utilizadas	65
M.1.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	65
M.1.2. Levaduras.....	67
M.1.2.1. Cepas de levaduras utilizadas	67
M.1.2.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	68
M.1.3. Material vegetal	70
M.1.3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
M.1.3.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	72
M.2. Purificación y análisis de ADN	73
M.2.1. Purificación de ADN	73
M.2.1.1. Bacteria	73
M.2.1.2. Levadura.....	75
M.2.1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
M.2.2. Cuantificación de ADN	76
M.2.3. Precipitación del ADN	76
M.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	76
M.2.5. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa	76
M.2.6. Manipulación enzimática del ADN	77
M.2.6.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción	77
M.2.6.2. Defosforilación de los extremos 5' del ADN.....	77
M.2.6.3. Generación de extremos romos del ADN	77
M.2.6.4. Ligación de fragmentos de ADN	77
M.2.6.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR con <i>Taq</i> polimerasa	77
M.2.6.6. Amplificación mediante PCR con ADN polimerasa de alta fidelidad	78
M.2.6.7. Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	78
M.2.6.8. Reacciones de secuenciación.....	78
M.3. Purificación y análisis de RNA	79
M.3.2. Electroforesis de RNA	79
M.3.3. Cuantificación de RNA	79
M.3.4. RT-PCR	80
M.4. Purificación y análisis de proteínas de levaduras	80
M.4.1. Electroforesis monodimensional de proteínas	81
M.4.2. Tinción de geles SDS-PAGE con Coomassie.....	82
M.5. Transformación de los distintos organismos utilizados.....	83

M.5.1. Transformación de bacterias.....	83
M.5.1.1. Preparación de células competentes.....	83
M.5.1.2. Transformación de células competentes	84
M.5.2. Transformación de levaduras.....	84
M.5.3. Transformación de plantas.....	85
M.5.3.1. Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante infección con <i>A. tumefaciens</i>	85
M.5.3.2. Transformación de <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante infiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
M.6. Ensayos de crecimiento en levadura	88
M.7. Sistema SRS	88
M.8. Caracterización fisiológica de plantas de <i>A. thaliana</i>	89
M.8.1. Ensayos de crecimiento en medio salino.....	89
M.9. Ensayos de localización subcelular mediante fusión a la proteína GFP	89
M.10. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC).....	90
M.10.1. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en plantas	90
M.10.1.1. Plásmidos para BiFC de plantas	90
M.10.1.2. Infiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i>	91
M.10.2. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en levaduras	92
M.10.2.1. Plásmidos para BiFC de levaduras	92
M.10.2.2. Transformación de levaduras para BiFC	92
M.11. Análisis de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases	93
M.12. Herramientas Informáticas	94
IV. RESULTADOS.....	97
CAPÍTULO I.....	97
R.1. El sensor de Ca ²⁺ SOS3 interacciona con el transportador de Na ⁺ SOS1	97
R.1.1. Interacción de SOS1 con SOS3	97
R.1.2. Localización de la interacción SOS1 con SOS3.....	102
R.1.3. Especificidad de la interacción SOS1/SOS3. Interacción con otras proteínas CBL	106
R.1.4. Caracterización funcional en <i>S. cerevisiae</i> de la interacción SOS1 y SOS3	109
R.1.5. Caracterización funcional <i>in planta</i> de la interacción SOS1/SOS3	111
CAPÍTULO II.....	114
R.2. Modificaciones postraduccionales de SOS3	114
R.2.1. Acilación y dominio de poli-Lisinas de SOS3	114
R.2.2. Fosforilación de SOS3.....	116
R.3. Consecuencias funcionales de las modificaciones postraduccionales de SOS3	117
R.3.1. Caracterización funcional en <i>S. cerevisiae</i> de los alelos mutantes de SOS3.....	117
R.3.2. Caracterización funcional en <i>A. thaliana</i> de los mutantes de SOS3.....	119

R.3.3. Localización subcelular de SOS3 y sus versiones mutantes	122
R.3.3.1. Localización subcelular de fusiones SOS3:GFP	122
R.3.3.2. Localización de SOS3 membrana plasmática; ensayos SRS	127
R.3.4. Análisis de la formación del complejo SOS2/SOS3	128
R.3.5. Análisis de la interacción de SOS3 y SOS1	130
CAPÍTULO III.....	133
R.4. Localización nuclear de SOS3; señales NES.....	133
V. DISCUSIÓN	139
D.1. SOS3 interacciona directamente con SOS1 al comienzo de su región C-terminal citosólica	139
D.2. Las modificaciones postraduccionales determinan la localización subcelular y la función de SOS3	142
D.3. Presencia de secuencias NES en SOS3.....	147
VI. CONCLUSIONES	151
VII. BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXO I: Abreviaturas.....	181
ANEXO II: Vectores utilizados.....	185
ANEXO III: Oligonucleótidos usados	187

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. El problema de la salinidad en la agricultura

La salinidad es el factor abiótico con mayores consecuencias para la producción agrícola (Allakhverdiev et al., 2000), ya que limita la producción de los cultivos e impide el potencial uso agrícola de suelos no cultivados previamente (Munns, 2002; Flowers, 2004). Según la FAO más de un 6% de la superficie terrestre estaría afectada por la salinidad.

Se considera que un suelo es salino cuando la conductividad eléctrica del extracto de saturación es de al menos 4 dS/m, lo que se corresponde con una concentración de 40 mM de NaCl (la sal más común en los suelos) y que genera una presión osmótica de 0,2 MPa (Munns y Tester, 2008). Las condiciones ambientales en constante cambio, como la temperatura y la precipitación, así como las prácticas agrícolas, provocan rápidas modificaciones en los niveles de salinidad y en los patrones de distribución de la sal. La salinización de los suelos puede deberse a causas naturales o a la actividad humana. Las principales causas naturales de salinización se deben a la meteorización de las rocas o la deposición de sales oceánicas arrastradas con el viento y el agua (Munns y Tester, 2008). Por otro lado, la actividad agraria, sobre todo el cultivo en regadío cuando se lleva a cabo con aguas de poca calidad y drenajes insuficientes, provoca la salinización de los suelos debido a la acción del hombre (Bressler y Hoffman, 1986; Ghassemi et al., 1995; Serrano, 1996). De los 1.500 millones de hectáreas dedicados a cultivos de secano, 32 millones de hectáreas (el 2%) presentan problemas de salinización, mientras que de los 230 millones de hectáreas dedicados al regadío, 45 millones (el 20%) están afectados por la salinización (Munns y Tester, 2008). Aunque la superficie destinada al cultivo en regadío representa un área relativamente pequeño, aproximadamente un 15% de la superficie cultivada, produce un tercio de la producción mundial de alimentos (Munns, 2002).

Las plantas difieren ampliamente en la tolerancia a la salinidad (Greenway y Munns, 1980; Flowers y Colmer, 2008). Según su tolerancia, podemos clasificar las especies vegetales en halófitas, que toleran concentraciones salinas de hasta 500 mM, y glicofitas, que son sensibles a la salinidad moderada/alta (no toleran más de 50-100 mM de NaCl) e incluyen a la mayoría de especies de interés agronómico (Hasegawa et al., 2000; Tester y Davenport, 2003).

El problema de la salinidad en los suelos puede corregirse mediante prácticas agronómicas adecuadas (uso de aguas de riego de alta calidad, instalación de sistemas de drenaje y lavado de suelos, rectificación de la sodicidad del suelo mediante la adición de óxido o sulfato cálcico...). No obstante, no son suficientes para erradicar el problema o son económicamente insostenibles, sobre todo en países en vías de desarrollo donde la disminución de la productividad agrícola es particularmente severa (Tester y Davenport, 2003). Así pues, una estrategia complementaria a la aplicación de sistemas de remediación de suelos sería el desarrollo de variedades halotolerantes, bien mediante técnicas de selección tradicionales o bien mediante programas basados en la ingeniería genética (Tester y Davenport, 2003). Aunque la necesidad de producir cultivares halotolerantes ha sido evidente

desde hace tiempo (Jacobson y Adams, 1958) y las posibles vías para incrementar la halotolerancia han sido extensamente estudiadas, la naturaleza cuantitativa de los factores que determinan la tolerancia a salinidad ha limitado en gran medida el desarrollo de cultivares tolerantes mediante el uso de técnicas de mejora clásica. La resistencia a la salinidad es una característica compleja, tanto genética como fisiológicamente, en la que intervienen una gran cantidad de genes en distintos procesos fisiológicos (Flowers, 2004).

En la actualidad, las investigaciones dirigidas a mejorar el crecimiento de las plantas en presencia de salinidad están orientadas a la mejor comprensión de los efectos causados por el estrés salino, tanto a nivel celular como a nivel de organismo, así como de los mecanismos de respuesta y adaptación frente a dicho estrés (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001), por lo que es necesario identificar claramente tanto los componentes que determinan la tolerancia a salinidad como sus elementos reguladores (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001).

2. Efectos producidos por el estrés salino sobre las plantas

El estrés salino provoca una serie de efectos sobre los procesos fisiológicos y metabólicos de la planta que, en función de la gravedad y duración del estrés, conllevan una disminución en la productividad, ya que afectan a su estado hídrico, a la adquisición de nutrientes y a sus rutas metabólicas (Munns y Tester, 2008; Kronzucker y Britto, 2011). La salinidad afecta a las plantas de dos maneras. En primer lugar, una alta concentración de sales en el suelo dificulta la obtención de agua por parte de las raíces de las plantas, produciendo un estrés osmótico, pero además, las altas concentraciones de sales dentro de la planta provocan un estrés iónico debido a la toxicidad de las mismas (Munns y Tester, 2008). Por tanto, los efectos producidos por el estrés salino se pueden dividir según si están motivados por el estrés osmótico y por la toxicidad iónica. A partir de estos efectos primarios se desencadenan una serie de efectos secundarios como son el estrés oxidativo, deficiencias en la absorción de nutrientes (principalmente de K^+), disminución del crecimiento celular, reducción de la evapotranspiración y disminución de la eficiencia fotosintética (Niu et al., 1995; Zhu, 2001a; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008).

2.1. Estrés osmótico

La acumulación de sales en el suelo provoca la disminución de su potencial hídrico que dificulta la absorción de agua por las raíces. Este menor contenido hídrico en la planta se traduce en una reducción del crecimiento de hojas y raíces a través de una serie de cambios metabólicos idénticos a los causados por el estrés hídrico (Munns, 2002). La deficiencia de agua en el citosol, necesaria para llevar a cabo reacciones metabólicas, es aportada desde la vacuola ocasionando la pérdida de turgencia celular y, en consecuencia, reduciendo la expansión celular y el crecimiento de la planta. Estos efectos también se observan cuando las

plantas son tratadas con KCl, manitol o polietilenglicol (PEG), por lo que no se deben a un efecto específico de la sal (Yeo et al., 1991; Chazen et al., 1995), sino a un efecto osmótico.

Por otro lado, ante condiciones de estrés osmótico las plantas reaccionan cerrando los estomas, evitando así la pérdida de agua por evapotranspiración. Pero a su vez, el cierre estomático conlleva una disminución en la toma de CO₂, disminuyendo en consecuencia la fijación de esta molécula por fotosíntesis (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001b; Zhu, 2002; Munns, 2002). Otro efecto casi inmediato del estrés osmótico es el aumento de los niveles de ácido abscísico (ABA) en raíces, células guarda y en el tejido vascular de las hojas, distribuyéndose por toda la planta e inhibiendo la división y la expansión celular (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001b; Munns, 2002; Wasilewska et al., 2008). El papel del ABA en el estrés hídrico y osmótico es, por un lado, el mantenimiento del balance hídrico mediante la regulación de las células guarda, y por otro lado, la inducción de genes que codifican proteínas de tolerancia a la deshidratación (Zhu, 2002).

2.2. Toxicidad iónica

Por otra parte, en los estadios iniciales del estrés salino también se observa un estado de toxicidad iónica y de desequilibrio electroquímico. En condiciones fisiológicas, las concentraciones homeostáticas de iones en el citoplasma son de 100-200 mM K⁺, 1-10 mM Na⁺ y Cl⁻, y 100-200 nM Ca²⁺ (Niu et al., 1995), un organismo tiende a mantener este estado de homeostasis interno a pesar de los cambios en su entorno.

Uno de los efectos más perjudiciales del estrés salino es la acumulación de iones de Na⁺ y Cl⁻ en los tejidos de la planta. Un exceso de sales en el medio provoca un fuerte impacto en la homeostasis iónica, que las células deben reestablecer para mantener su crecimiento y su correcto funcionamiento metabólico (Binzel et al., 1988). El medio citoplasmático tiene que mantener siempre una baja concentración de Na⁺, o lo que es quizá más importante, una baja relación Na⁺/K⁺, ya que concentraciones superiores a 100 mM de Na⁺ en el citoplasma inhiben importantes procesos bioquímicos y fisiológicos (Bhandal y Malik, 1988; Marschner, 1995; Serrano, 1996). La toxicidad metabólica del Na⁺ se debe en gran parte a su competencia con los sitios de unión de K⁺. Debido a la similitud en las propiedades fisicoquímicas entre el Na⁺ y el K⁺, el Na⁺ puede actuar como un inhibidor competitivo de los sitios específicos de más de 50 enzimas que requieren la unión de K⁺ como cofactor, y el Na⁺ no puede sustituir esta función (Bhandal y Malik, 1988).

Además, otros procesos celulares esenciales como la síntesis de proteínas, el procesado del RNA o el metabolismo de azúcares se ven drásticamente inhibidos en presencia de altas concentraciones de Na⁺ (Marschner, 1995; Blaha et al., 2000; Forment et al., 2002). Cuando las concentraciones de sales alcanzan niveles superiores a 400 mM se inhiben la mayor parte de las actividades enzimáticas ya que el exceso de cargas rompe el equilibrio electrostático necesario para el correcto mantenimiento de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas produciendo la desnaturalización de las mismas (Wyn-Jones y Pollard, 1983).

2.3. Estrés oxidativo

Uno de los efectos más importantes producidos por el estrés salino es la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Zhu, 2001b), como los radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o los radicales hidroxilo (OH^\cdot). Estas moléculas son producidas de forma natural en procesos aeróbicos como el transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias o en la oxidación de metabolitos (Smirnov, 1993; Moran et al., 1994; Borsani, 2001; Hernández et al., 2001), pero un exceso de producción de ROS debido al estrés salino puede conducir a daños oxidativos en varios componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, interrumpiendo funciones vitales para las plantas (Smirnov, 1993; Hernández et al., 2001). La capacidad de una planta para eliminar las especies reactivas de oxígeno es clave para determinar su tolerancia a la salinidad. Las plantas degradan las ROS mediante enzimas como la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa o varias peroxidasas, y otras moléculas no enzimáticas, como el ascorbato, glutatión, flavonoides, alcaloides y carotenoides (Chinnusamy et al., 2004; Apel y Hirt, 2004).

2.4. Efectos secundarios del estrés salino

El estrés generado por una alta salinidad provoca una serie de efectos secundarios, siendo quizás la deficiencia de la toma de potasio el más importante. El K^+ es un macronutriente esencial para la planta ya que interviene en procesos tan importantes como en el ajuste osmótico, regula los movimientos estomáticos y actúa como cofactor de diversas enzimas (Hasegawa et al., 2000). La similitud de las propiedades físico-químicas del K^+ y del Na^+ hacen que el Na^+ pueda competir por los sitios de unión en los sistemas de transporte de K^+ tanto de alta como de baja afinidad, contribuyendo a disminuir el cociente K^+/Na^+ de la célula (Rains y Epstein, 1967; Maathuis et al., 1996). Además, un exceso de Na^+ en la célula produce la depolarización de la membrana plasmática dificultando la entrada pasiva de K^+ a través de canales rectificadores de entrada mientras que se favorece su salida por canales rectificadores de salida. También, durante episodios de estrés salino se produce la síntesis de solutos compatibles implicados en la osmoprotección celular, lo que requiere un gran consumo de ATP, necesario para los sistemas de transporte activo de K^+ de alta afinidad (Shabala, 2003; Shabala y Cuin, 2008).

Otros efectos secundarios serían la desregulación de la fotosíntesis, el cierre estomático, la inhibición del crecimiento celular y la activación de muerte celular programada. (Serrano et al., 1999; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2003).

3. Respuestas adaptativas de las plantas frente al estrés salino

A diferencia de otros organismos pluricelulares, las plantas son organismos sésiles. La imposibilidad de escapar ante condiciones adversas les obliga a desarrollar mecanismos que les permitan la adaptación frente a cualquier tipo de estrés para asegurar su supervivencia. Las plantas son incapaces de tolerar elevadas concentraciones de sales en el citoplasma, por lo que han desarrollado una gran variedad de mecanismos moleculares y bioquímicos que se coordinan y actúan sinérgicamente en la adaptación de las plantas al estrés salino (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2003). Las respuestas adaptativas a altas concentraciones de sal se pueden estudiar a nivel celular y a nivel de planta completa.

3.1. Adaptaciones a nivel celular

3.1.1. Regulación de la homeostasis

Un factor fundamental que determina la halotolerancia de una planta es el mantenimiento de una correcta homeostasis osmótica e iónica a nivel intracelular. En condiciones fisiológicas, la membrana plasmática de las células vegetales presenta un potencial eléctrico interior negativo que oscila entre los -120 y los -200 mV y que favorece el transporte pasivo de los cationes monovalentes como el Na^+ al citosol (Niu et al., 1995). El aumento en la concentración extracelular de Na^+ , junto a esta diferencia de potencial de membrana crean un gradiente electroquímico que favorece la entrada pasiva de Na^+ en la célula pudiendo elevar extraordinariamente su concentración en el citosol, lo que incluso puede provocar la apoptosis celular si se alcanzan niveles muy altos de Na^+ (Niu et al., 1995; Serrano et al., 1999).

El restablecimiento de la homeostasis iónica requiere el funcionamiento y coordinación de dos procesos que son la compartimentación del Na^+ en la vacuola y el aumento del flujo de salida de Na^+ de la célula (Niu et al., 1995; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2003). Ambos procesos son llevados a cabo por antiportadores Na^+/H^+ ubicados en la membrana vacuolar y en la membrana plasmática, respectivamente. El transporte de Na^+ a través de los antiportadores está acoplado al gradiente electroquímico de H^+ generado por la H^+ -ATPasa de tipo V y la H^+ -pirofosfatasa en la vacuola y por la H^+ -ATPasa de tipo P en la membrana plasmática o (Lüttge y Ratajczak, 1997; Gupta y Huang, 2014).

La vacuola juega un papel clave para mantener la homeostasis, pues la acumulación de Na^+ en dicho compartimento, además de disminuir su toxicidad en el citosol, facilita el ajuste osmótico, necesario para el correcto crecimiento. Inicialmente, se creyó que AtNHX1, el primer antiportador vacuolar identificado en plantas, era responsable de este proceso (Apse et al., 1999; Gaxiola et al., 2001), pero posteriormente se descartó esta hipótesis (Leidi et al., 2010). En la actualidad, se desconoce que transportador realiza la acumulación de Na^+ en el tonoplasto. Por otro lado, la expulsión de Na^+ de la célula se lleva a cabo a través del antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1 (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002), cuya

sobreexpresión también mejora la tolerancia a salinidad en *Arabidopsis* (Shi et al., 2003; Yang et al., 2009).

La disminución del potencial osmótico en la célula debida a la acumulación de iones en la vacuola induce la síntesis de osmolitos compatibles que se acumulan en el citoplasma y permiten mantener la homeostasis osmótica a ambos lados de la membrana vacuolar (Tester y Davenport, 2003). Los osmolitos compatibles tienen la propiedad de reestablecer la turgencia celular alterada por el descenso del potencial hídrico sin alterar las reacciones normales del metabolismo celular incluso cuando se presentan en altas concentraciones (Hasegawa et al., 2000). Estos osmolitos pueden ser elementos esenciales como el K^+ , aunque la mayoría son compuestos orgánicos químicamente diversos que carecen de carga, polares y solubles tales como azúcares simples (glucosa, fructosa...), alcoholes de azúcares (glicerol e inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), derivados cuaternarios de aminoácidos (prolina, glicinabetaína, b-alanina-betaína, prolina-betaína...), aminas terciarias (ectoína) y compuestos de sulfonio (sulfato de colina, propionato de dimetilsulfonio...) (Bohnert y Jensen, 1996; Nuccio et al., 1999). La sobreexpresión de estos osmolitos compatibles en plantas transgénicas puede resultar en una mejora de la tolerancia al estrés salino y otros estreses abióticos (Vinocur y Altman, 2005).

Sin embargo, a menudo las concentraciones de osmolitos compatibles son insuficientes para ser los responsables del reajuste osmótico, por lo que parece que su función está más relacionada con la degradación de ROS y la protección de las estructuras celulares frente a daños oxidativos (Hong, 2000; Zhu, 2001a; Krasensky y Jonak, 2012).

3.1.2. Respuesta al estrés oxidativo

Las ROS se generan principalmente en el cloroplasto y en la mitocondria como productos secundarios del metabolismo aeróbico (fotosíntesis y respiración). En condiciones fisiológicas de crecimiento los niveles intracelulares de las ROS son bajos, pero como consecuencia de distintos tipos de estrés como el estrés salino, la homeostasis celular y el metabolismo aeróbico se desequilibran aumentando drásticamente la producción de ROS (Polle, 2001). Esta sobreacumulación de ROS originada por el estrés supone una amenaza para la célula, debido a que las especies reactivas de oxígeno son inestables y capaces de oxidar indiscriminadamente componentes celulares como las membranas, proteínas, enzimas o ácidos nucleicos, causando daños irreversibles que incluso podrían llevar a la destrucción oxidativa de la célula (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Dat et al., 2000; Apel y Hirt, 2004).

Las ROS se pueden detoxificar mediante la producción de enzimas o la síntesis de osmolitos protectores (Hasegawa et al., 2000). Los sistemas enzimáticos de inactivación de ROS en plantas incluyen principalmente la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o glutatión reductasa. Diversos estudios revelaron que las plantas transgénicas que sobreexpresaban genes implicados en la síntesis de algunas enzimas detoxificadoras resultó en una mejora de su tolerancia a salinidad (Allen et al., 1997; Roxas et al., 1997; Bohnert y Sheveleva, 1998).

La concentración de solutos compatibles dentro de la célula se mantiene ya sea por la síntesis irreversible de estos compuestos o por un equilibrio entre síntesis y degradación. Los sistemas de detoxificación no enzimáticos (osmolitos protectores) se sintetizan y se acumulan en cantidades variables entre diferentes especies de plantas. Su acumulación es proporcional a la osmolaridad externa y las principales funciones de estos osmolitos son proteger la estructura y mantener el equilibrio osmótico dentro de la célula (Hasegawa et al., 2000). Algunos de estos compuestos son proteínas protectoras como las osmotinas y dehidrinas, que mantienen la estructura de las proteínas a concentraciones elevadas de sal, o las LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) cuya producción se induce en episodios de estrés y que, además de participar en el equilibrio osmótico de la célula, también están implicadas en la respuesta a patógenos (Ingram y Bartels, 1996; Campbell y Close, 1997; Brini et al., 2011; Salleh et al., 2012). La sobreexpresión de proteínas LEA de cebada mejoró la halotolerancia en plantas transgénicas de arroz (Xu et al., 1996).

Otros de estos osmolitos son aminoácidos como la prolina, cuya concentración aumenta en respuesta al estrés salino (El-Shintinawy y El-Shourbagy, 2001). La prolina intracelular, que se acumula durante episodios de estrés, no solo proporciona tolerancia al estrés sino que también sirve como una reserva orgánica de nitrógeno para la recuperación de la planta ante condiciones adversas. Este aminoácido es esencial en la protección frente al daño celular, ya que además de actuar como osmolito, degrada las ROS y estabiliza la estructura de las proteínas actuando como chaperona (Hare y Cress, 1997; Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Savouré, 2010). Ben Ahmed et al. (2010) observaron que la suplementación con prolina aumentó la tolerancia a salinidad en olivo debido a la mejora de determinadas actividades enzimáticas antioxidantes, de la actividad fotosintética y del crecimiento de las plantas, así como del mantenimiento de un estado hídrico adecuado en condiciones de estrés salino. También parece que la prolina mejora la tolerancia a la salinidad en plantas de *Nicotiana tabacum* al aumentar la actividad de las enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante (Hoque et al., 2008). Deivanai et al. (2011) demostraron que las plántulas de arroz provenientes de semillas pretratadas con prolina (1 mM) mostraban una mejora en el crecimiento durante el estrés salino.

El ácido γ -butírico (GABA) es un aminoácido no proteico que se acumula en situaciones de estrés. El GABA se sintetiza en el citosol y a continuación es transportado a la mitocondria, donde se degrada a ácido succínico para incorporarse al ciclo de Krebs (Shelp et al., 1999; Fait et al., 2008). En *Arabidopsis*, la falta de función de la GABA transaminasa produjo plantas hipersensibles a estrés mientras que la pérdida de función de la semialdehído succínico deshidrogenasa produjo plantas enanas e hipersensibles a luz UV-B y estrés térmico debido a la sobreacumulación de ROS (Bouché et al., 2003; Renault et al., 2010).

Otra respuesta de las plantas frente al estrés abiótico es la producción de glicina-betaína, que es un compuesto cuaternario de amonio presente en microorganismos, animales y plantas, dentro de las cuales, se encuentra en una amplia variedad de especies pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos. Debido a sus características estructurales únicas, interactúa

tanto con los dominios hidrófobos como hidrófilos de las macromoléculas, tales como enzimas y complejos de proteínas. La glicina-betaína es un osmolito celular no tóxico que protege a la célula mediante el ajuste osmótico (Gadallah, 1999), estabiliza las proteínas (Mäkelä, 2000), protege el aparato fotosintético frente a los daños por estrés (Cha-Um y Kirdmanee, 2010) y participa en la reducción de ROS (Ashraf y Foolad, 2007; Saxena et al., 2013). Se ha observado una mejora de la tolerancia al estrés abiótico mediante la sobreexpresión de genes implicados en la síntesis de este compuesto en especies en las que no se sintetiza de forma natural (Park et al., 2007). La aplicación de glicina-betaína mediante pulverización foliar en plantas sometidas a estrés, produjo la estabilización de los pigmentos y el aumento de la tasa fotosintética y, en consecuencia de la tasa de crecimiento (Cha-Um y Kirdmanee, 2010; Ahmad et al., 2013).

La acumulación de polioles, ya sean de cadena lineal como manitol y sorbitol o polioles cíclicos como el mio-inositol y sus derivados metilados, se correlaciona con la tolerancia a la sequía y/o a salinidad (Bohnert et al., 1995). Los polioles también están implicados en la protección y estabilización de enzimas y estructuras de membrana así como en la degradación de radicales hidroxilo (Smirnoff y Cumbes, 1989; Shen et al., 1997). La sobreexpresión de enzimas de biosíntesis de mio-inositol y sus derivados cíclicos mejoró la tolerancia a salinidad en plantas transgénicas de tabaco (Sheveleva et al., 1997; Majee et al., 2004; Patra et al., 2010).

También algunos tipos de hidratos de carbono pueden actuar como osmolitos. Bajo condiciones de estrés salino se produce la acumulación de carbohidratos tales como azúcares (por ejemplo glucosa, fructosa, fructanos y trehalosa) y almidón (Parida et al., 2004). Los hidratos de carbono mitigan situaciones de estrés a través de su papel en la osmoprotección, constituyendo una reserva de carbono y participando en la degradación de ROS. Se observó que el estrés salino aumenta el nivel de azúcares reductores (sacarosa y fructanos) en diferentes especies de plantas (Kerepesi y Galiba, 2000). En plantas de tomate el contenido de sacarosa aumentó en condiciones de salinidad debido al aumento de la actividad de la sacarosa fosfato sintasa (Gao et al., 1998). Además, muchas de las angiospermas que habitan en regiones frías utilizan los fructanos como azúcares de reserva. Estos polímeros ramificados se forman por transferencia de fructosa a moléculas de sacarosa (Vijn y Smeekens, 1999). La sobreexpresión de fructosil transferasas en plantas de tabaco y arroz mejoró la tolerancia a bajas temperaturas y sequía (Pilon-Smits et al., 1995; Li et al., 2007; Kawakami et al., 2008). La trehalosa es un disacárido no reductor, cuya acumulación, además de ser una reserva de carbohidratos, protege a los organismos frente a estrés físico y químico, incluyendo el estrés salino. Este disacárido se acumula en plantas resistentes a la desecación y actúa como osmolito y protector de membranas y proteínas (Paul et al., 2008). La expresión heteróloga de genes implicados en la síntesis de trehalosa en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* aumentó la tolerancia de varias especies vegetales a sequía, salinidad y altas temperaturas (Iordachescu y Imai, 2008). La sobreexpresión en plantas de *A. thaliana* de distintas isoformas de trehalosa-6-fosfato sintasa propias o de arroz produjo plantas tolerantes a sequía, salinidad

y frío (Avonce et al., 2004; Li et al., 2011), mientras que la pérdida de función redujo su termotolerancia (Suzuki et al., 2008). Se ha observado que la hidrólisis de almidón por las α -amilasas aumenta en condiciones de estrés y que las plantas de *Arabidopsis* que tienen afectada esta ruta de degradación mostraron una mayor sensibilidad a frío y estrés osmótico (Yano et al., 2005; Valerio et al., 2011). En las raíces de arroz se ha observado que el contenido de almidón disminuyó en respuesta a la salinidad, mientras que permaneció prácticamente sin cambios en el brote. También la acumulación de rafinosa durante episodios de desecación parece participar en la protección de membranas y en la degradación de ROS (Peterbauer y Richter, 2001; Hinch, 2003; Nishizawa et al., 2008). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* capaces de producir una mayor cantidad de galactinol y rafinosa mostraron una mayor resistencia a sequía y salinidad (Taji et al., 2002; Nishizawa et al., 2008).

Un aumento en los niveles de poliaminas en plantas superiores (principalmente putrescina, espermidina y espermina) aumentó la tolerancia a estrés. Su función parece estar relacionada con la protección de membranas y la reducción del estrés oxidativo (Groppa y Benavides, 2008; Alcázar et al., 2010; Hussain et al., 2011). La pérdida de función de las enzimas ADC1 y ADC2 provocó una disminución de la producción de putrescina que redujo la tolerancia de las plantas a estrés, mientras que su sobreexpresión produjo plantas hiperresistentes a sequía, salinidad y frío (Capell et al., 2004; Urano et al., 2004; Cuevas et al., 2008; Alcázar et al., 2010).

La protección frente al daño oxidativo es clave para mejorar la tolerancia al estrés salino como se desprende de la identificación del mutante hiperresistente a estrés salino y oxidativo *pst1* de *Arabidopsis*, ya que esta mutación inhibe la activación de un regulador negativo de la respuesta a este tipo de estrés (Tsugane et al., 1999).

3.2. Adaptaciones de la planta completa

3.2.1 Regulación del transporte de Na^+

Ante condiciones de estrés salino, el transporte de Na^+ en la planta debe ser regulado de una forma precisa para evitar su acumulación en la parte aérea, para ello se deben coordinar procesos como la carga de Na^+ en el xilema desde la raíz, su transporte hasta la parte aérea para su compartimentación en las hojas y la recirculación del exceso de Na^+ de nuevo hacia la raíz a través del floema para su extrusión (Munns, 2002).

El Na^+ entra por la raíz principalmente a través de transportadores de alta afinidad como HKT y canales no selectivos de cationes (NSCC) (Rubio et al., 1995; Amtmann et al., 1999; Tyerman y Skerrett, 1998; Rus et al., 2001; Mäser et al., 2002; Zhu, 2003; Rus et al., 2004). Dentro de la raíz, el Na^+ sigue un flujo radial a través del apoplasto hasta llegar a la endodermis, donde la banda de Caspari (Niu et al., 1995; Steudle, 2000) que constituye una barrera impermeable que impide al Na^+ el paso por la vía apoplástica, obliga a los iones a continuar por la vía simplástica. No obstante, parte del flujo de iones pueden filtrarse por el apoplasto a través de pequeñas discontinuidades presentes en la endodermis, este mecanismo

tiene mayor relevancia en algunas especies vegetales como el arroz (Yeo et al., 1987; Yadav et al., 1996).

En cuanto al transporte de Na^+ en la planta, se ha establecido en modelo mediante el cual el antiportador Na^+/H^+ SOS1 sería el responsable de la carga de Na^+ en el xilema (Shi et al., 2002; Qiu et al., 2002), mientras que la descarga de Na^+ se llevaría a cabo por el transportador HKT1. Las funciones de ambos se coordinarían para redistribuir el Na^+ evitando así su acumulación en los tejidos más sensibles (Olías et al., 2009).

Otro mecanismo de las plantas para evitar la acumulación de Na^+ en el citosol de las células es la extrusión. Éste es un proceso importante para las células del ápice radical, ya que carecen de un sistema vacuolar desarrollado donde acumular el exceso de Na^+ . Se ha identificado al antiportador SOS1 como la principal proteína responsable del eflujo de este catión hacia el exterior (Wu et al., 1996; Zhu et al., 1998; Liu y Zhu, 1998; Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002; Shi et al., 2002; Qiu et al., 2003).

3.2.2. Adaptaciones morfológicas

A lo largo de la evolución vegetal, algunas especies han desarrollado estructuras morfológicas que les permiten tolerar y adaptarse a ambientes salinos, como las glándulas salinas (Tester y Davenport, 2003). Estas estructuras de diversa morfología se encargan de expulsar el exceso de sales del apoplasto foliar a la superficie de la hoja, donde la cutícula cerosa las mantiene aisladas de las células del mesófilo. La expulsión se realiza mediante el bombeo activo de las sales a un compartimento aislado del apoplasto foliar, lo que crea una drástica reducción del potencial osmótico que aumenta el influjo de agua provocando un aumento de la presión en la zona, que finalmente produce la ruptura de la débil membrana que separa dicho compartimento de la superficie foliar para liberar el contenido de sales a la superficie de la hoja (Tester y Davenport, 2003). Debido al flujo de agua necesario para el funcionamiento de este mecanismo, esta estrategia sólo es válida para plantas pertenecientes a ambientes sin restricciones en la disponibilidad de agua, como es el caso de los marjales salinos (Tester y Davenport, 2003).

Varias especies de gramíneas poseen pequeñas glándulas bicelulares en las hojas cuya capacidad secretora de sales ha demostrado una correlación directa con la halotolerancia de la planta (Marcum, 1999). Las halofitas de ambientes muy secos presentan un tipo especial de glándulas llamadas "tricomas salinos", compuestos por dos células en la superficie de la hoja, la célula exterior llamada "célula vesical" acumula sales y agua en su vacuola hasta que estalla y libera el Na^+ sin producir pérdidas de agua tan elevadas como en el caso de las glándulas salinas (Tester y Davenport, 2003).

Otro sistema de expulsión del exceso de sales es mediante la gutación a través de los hidatodos, este sistema es muy común en las hojas de cereales y se produce cuando las condiciones ambientales dificultan la transpiración foliar (Tester y Davenport, 2003).

3.2.3. Regulación del crecimiento de la planta

La reducción del crecimiento es una respuesta adaptativa de las plantas para sobrevivir ante condiciones adversas. El estrés salino, al igual que otros tipos de estrés abiótico, produce una inhibición del crecimiento que se aprovecha para ahorrar recursos energéticos que las plantas pueden utilizar para diferentes procesos que les permitan su supervivencia (Zhu, 2001b).

Una de las causas de la reducción del crecimiento se debe a la disminución de la eficiencia fotosintética provocada por el cierre estomático y, en consecuencia, por la menor toma de CO₂ (Zhu, 2001b). El cierre de los estomas es un mecanismo de protección de la planta para evitar la acumulación de Na⁺ en la parte aérea por evapotranspiración, y se ha observado que la incapacidad para cerrar los estomas es un factor clave que determina la sensibilidad de algunas especies a la salinidad (Robinson et al., 1997).

Sin embargo, la causa principal de la reducción del crecimiento en una planta sometida a estrés es la inhibición de la división y expansión celular. Incluso un estrés ligero puede provocar una drástica reducción del crecimiento y una pérdida significativa de la producción (Zhu, 2001b). Se ha descrito una importante relación entre estrés y división celular mediante la cual el ácido abscísico (ABA) acumulado ante situaciones de estrés hídrico o salino es capaz de inducir la expresión de ICK1, un inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas (Wang et al., 1998). El inhibidor ICK podría dificultar la división celular mediante la reducción de la actividad de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas, las CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*), implicadas en el desarrollo del ciclo celular (Evans et al., 1983; Francis, 2007). En *Arabidopsis* existen 7 isoformas de CDKs, denominadas con las letras A a F, y además, un grupo de proteínas similares denominadas CDKLs (Menges et al., 2005). La reducción de la actividad de las CDKs provoca la detención del ciclo celular en las interfases G1/S o G2/M, lo que implica la inhibición de la elongación y división celular (Schuppler et al., 1998; Kitsios y Doonan, 2011). En plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino, el nivel de transcrito de las CDKs de clase A y B disminuyó dando lugar a una menor producción de células y de menor tamaño en la parte aérea y el ápice radical debida a la inhibición transitoria de la mitosis (Bursens et al., 2000; West et al., 2004). La sobreexpresión de ICK1 produce plantas transgénicas más pequeñas y con alteraciones morfológicas (Wang et al., 2002). El mutante de *Arabidopsis sto1*, identificado por su mayor tolerancia a estrés salino y osmótico, presenta una menor acumulación de ICK1 en condiciones salinas (Ruggiero et al., 2004).

Por otro lado, debido al papel crucial de las hormonas en la regulación de la elongación celular, es muy probable que el estrés inhiba la expansión de las células mediante la reducción de la concentración de hormonas que promueven al crecimiento, tales como auxinas, citoquininas, giberelinas y brassinólidos (Zhu, 2001b). Las proteínas DELLA estabilizadas reprimen la señalización por giberelinas, inhibiendo el crecimiento de la planta en situaciones de estrés. Estas proteínas, pertenecen a una subfamilia de proteínas nucleares que recibe su nombre por la presencia del motivo conservado DELLA cerca de su extremo aminoterminal (Peng et al., 1997; Pysh et al., 1999). En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado 5 genes

que codifican proteínas DELLA (RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3), que reprimen las respuestas a giberelinas en condiciones de estrés (Tyler et al., 2004). Estas proteínas facilitan la aclimatación de las plantas al frío y mejoran su tolerancia a estrés oxidativo, mediante la inducción de genes de detoxificación de ROS, que protegen a la célula frente a daños oxidativos (Achard et al., 2008a; 2008b).

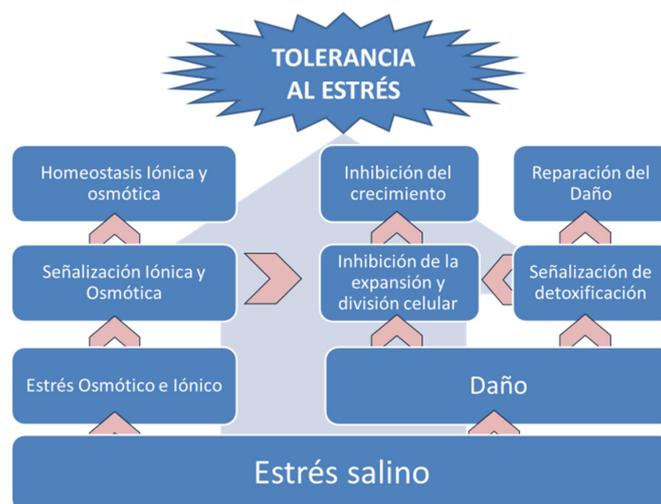


Figura I.1. Consecuencias del estrés y respuestas adaptativas de la planta. El esquema muestra de forma general los efectos del estrés y los procesos que ocurren en la planta para adaptarse a esas condiciones adversas (Zhu, 2002).

4. Transducción de señales en respuesta a la salinidad

El estrés osmótico e iónico producidos por la salinidad son reconocidos por distintos sensores, la mayoría no identificados, que activan cascadas de señalización que a su vez, ejercen un control transcripcional sobre los genes y la activación de modificaciones postranscripcionales de proteínas que median las respuestas adaptativas y/o patológicas de las plantas (Hasegawa et al., 2000). Las rutas de señalización son muy complejas y frecuentemente están interrelacionadas, resultando necesaria la adecuada coordinación de los distintos elementos para la obtención de respuestas específicas para cada tipo de estrés (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2002).

4.1. Sensores del estrés salino

En *Escherichia coli*, el estrés hipo e hiperosmótico induce cambios en la turgencia celular que provocan la estimulación mecánica de canales mecanosensibles que activan o reprimen la liberación de agua y solutos (Booth y Louis, 1999; Blount y Moe, 1999). En levadura, la ruta HOG1 es la encargada de mantener la homeostasis osmótica mediante la

detección del estrés con el sensor de baja osmolaridad SHO o el sensor de alta osmolaridad el SLN1. A continuación cada sensor actúa activando una cascada de señalización que finalmente convergen en la fosforilación de la MAPKK PBS2 (Brewster et al., 1993), que a su vez fosforila y activa a la MAPK HOG1. HOG1 inhibe por fosforilación a SKO1, represor transcripcional de la Na⁺-ATPasa ENA1, favoreciendo así el bombeo activo de Na⁺ al medio extracelular (Maeda et al., 1995; Saito y Tatebayashi, 2004). En *Arabidopsis*, se ha identificado a la histidín-quinasa ATHK1 (Urao et al., 1999) como un posible sensor osmótico, que se induce por estrés salino e hídrico y bajas temperaturas. La transformación AtHK1 en una cepa de levadura mutante en sus dos osmosensores SLN1 y SHO1 fue capaz de activar la cascada de HOG1.

Por el contrario, los mecanismos implicados en la detección específica del estrés iónico aún no están muy claros. El aumento de Na⁺ puede ser detectado a nivel extracelular, por receptores de la membrana plasmática, o bien a nivel intracelular, por proteínas de membrana o enzimas citosólicas sensibles a Na⁺. El transportador de Na⁺ de *Arabidopsis*, AtSOS1 muestra una larga cola citosólica presente en su extremo carboxiterminal que sugiere un posible papel dual como transportador y como sensor de Na⁺ (Shi et al., 2000; Zhu, 2002). Este tipo de proteína bifuncional se le denomina transceptor, y se han descrito en levadura, para los transportadores Gap1 y Pho84 (Thevelein y Voordeckers, 2009) y en *Arabidopsis*, para el caso del transportador de nitrato CHL1 (Ho et al., 2009; Vert y Chory, 2009).

4.2. Mensajeros secundarios

En una ruta de señalización genérica, tras la percepción de la señal de estrés abiótico, se desencadena la producción de segundos mensajeros, como por ejemplo hormonas, inosítoles fosfato o especies reactivas de oxígeno, que actúan modulando los niveles intracelulares de Ca²⁺, que a su vez, activan cascadas de fosforilación de proteínas (MAPKs, CDPKs, CIPKs) que tienen como diana proteínas involucradas en la adaptación al estrés o factores de transcripción que regulan la expresión de genes que finalmente actúan en respuesta a condiciones de estrés. Estos genes están relacionados con la síntesis de proteínas implicadas en el transporte de iones para la detoxificación sódica, en la producción de hormonas (ABA, etileno), de osmolitos compatibles o de agentes antioxidantes cuyos efectos se coordinan en la adaptación de la planta frente al estrés (Hasegawa et al., 2000; Xiong et al., 2002; Zhu, 2002).

El tipo de señal de Ca²⁺ varía en función del tipo de estrés, la intensidad del mismo, el tipo de tejido y la exposición previa a dicho estrés (Knight et al., 1997; Plieth et al., 1999; Keigle et al., 2000). En condiciones fisiológicas, se considera que la concentración de Ca²⁺ libre en las células se mantiene alrededor de 200 nM, aunque la concentración es mucho mayor si tenemos en cuenta la cantidad de este catión que se encuentra unida a distintas proteínas (Bush, 1995). El aumento de la concentración de Ca²⁺ citosólico induce la producción de una serie de moléculas señalizadoras secundarias, que a su vez, también pueden estimular nuevos incrementos transitorios de Ca²⁺ para la regulación de pasos previos o para la señalización

primaria de nuevas rutas (Xiong et al., 2002). El aumento de los niveles de Ca^{2+} en el citosol pueden ocurrir a través de su entrada pasiva por canales de la membrana plasmática o por su liberación desde orgánulos como el retículo endoplasmático, las mitocondrias, los cloroplastos y sobre todo la vacuola (Sanders et al., 1999).

La implicación del calcio en diversas rutas estímulo-respuesta en la célula vegetal plantea diversas cuestiones acerca de cómo distintas respuestas pueden ser reguladas por un mismo mensajero. Estas respuestas dependen de factores como la amplitud, la duración, la frecuencia de los pulsos y la localización subcelular de la señal de calcio, así como la interacción con distintos efectores celulares del Ca^{2+} , que en conjunto definen la respuesta específica de cada señal de Ca^{2+} en la planta (McAinsh y Hetherington, 1998). Existe una gran variedad de proteínas citosólicas que, en respuesta a los aumentos transitorios en la concentración de Ca^{2+} , se unen al catión para actuar como efectores celulares de esta señal.

4.3. Rutas de señalización mediante cascadas de fosfoproteínas

En plantas, la percepción del estrés abiótico se transmite mediante rutas dependientes de Ca^{2+} , como la de las proteínas CIPKs/CBLs o de las CDPKs, y mediante rutas independientes de Ca^{2+} , como las cascadas de MAP quinasas (Xiong et al., 2002).

4.3.1. Ruta MAPKs

El estrés salino puede desencadenar una serie de respuestas independientes de Ca^{2+} a través de cascadas de MAP quinasas (*Mitogen Activated Protein-Kinases*). Últimamente se han aislado gran cantidad de elementos que participan en rutas MAPK de plantas. Los estudios sobre las funciones de estos componentes han revelado que las MAPK desarrollan un papel fundamental en diferentes tipos de estrés e intervienen en los procesos de señalización de la mayoría de las hormonas vegetales y en el desarrollo. El análisis del genoma de *Arabidopsis* ha revelado la existencia de ≈ 60 MAPKKKs que detectan las señales que, a continuación son transducidas por las ≈ 10 MAPKKs a las ≈ 20 MAPKs (Ligterink y Hirt, 2001). Las MAPKKKs son quinasas que fosforilan los aminoácidos serina/treonina localizados en bucle de activación S/T-X3-5-S/T de las MAPKKs. A su vez, las MAPKKs fosforilan los residuos de treonina y tirosina presentes en los dominios conservados T-X-Y de las MAPKs (Chang y Karin, 2001). Finalmente, las MAPKs son quinasas de serina/treonina capaces de fosforilar una amplia variedad de sustratos, entre los que se encuentran otras quinasas y/o factores de transcripción.

La primera ruta de MAP quinasas identificada en *Arabidopsis* fue la de AtMEKK1, AtMEK1/AtMKK2 y AtMPK4/AtMPK6 (Ichimura et al., 2000). Se ha determinado que la expresión y actividad de AtMEKK1 y AtMPK3 se induce por sequía y elevada temperatura (Mizoguchi et al., 2000), y en el caso de AtMEKK1 también por estrés salino, mientras que AtMKK2 y sus sustratos AtMPK4 y AtMPK6 se inducen por frío (Ichimura et al., 2000; Mizoguchi et al., 2000; Teige et al., 2004). El mutante de falta de función de la proteína MPK4 en *Arabidopsis* produjo plantas insensibles a ácido jasmónico, acumulación de ácido salicílico

así como respuesta sistémica adquirida (SAR) constitutiva. Las quinasas AtMPK4 y AtMPK6 interaccionan con la fosfatasa MKP1, regulando negativamente la transcripción del antiportador catión/ H^+ CHX17 (Ulm et al., 2002). Recientemente, se ha demostrado que AtMPK6 activa y fosforila al antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1 (Yu et al., 2010).

En maíz, el estrés salino induce la cascada de MAP quinasas ZmMPK3, ZmMAPK5 y ZmSIMK1. Además, ZmMPK3 está relacionada con la respuesta a otros tipos de estrés abiótico como el estrés hídrico, ZmMAPK5 por su parte, también se induce por frío (Ding et al., 2009; Gu et al., 2010; Wang et al., 2010).

También las ROS activan cascadas de MAPKs, como por ejemplo la ruta compuesta por ANP1, AtMPK3 y AtMPK6 (Kovtun et al., 2000; Moon et al., 2003). La sobreexpresión de la MAPKKK ANP1 de *Arabidopsis* resultó en plantas más tolerantes a estrés térmico, congelación y salinidad así como en una mayor inducción de genes de respuesta a estrés oxidativo. La sobreexpresión de esta proteína en tabaco también produjo plantas más tolerantes a distintos estreses abióticos. La expresión constitutiva de NtANP1 mimetiza la señal generada por el H_2O_2 , activando una cascada de fosforilación de MAP quinasas cuyo resultado es la activación de varios genes de respuesta a estrés (Kovtun et al., 2000). Los mutantes de *Arabidopsis mpk6* y *mpk3* mostraron hipersensibilidad a ozono (Ahlfors et al., 2004; Miles et al., 2005). Las proteínas AtMKK1 y AtMPK6 están implicadas en la regulación del metabolismo de H_2O_2 mediante la activación de CAT1. Mientras que AtMEKK1 interactúa con AtMPK4 regulando la actividad de CAT2 (Xing et al., 2007; Pitzschke y Hirt, 2008).

4.3.2. Ruta CDPKs

Las CDPKs (Calcium-Dependent Protein Kinases) componen una extensa familia de serina/treonina quinasas casi exclusivas de plantas, que en *Arabidopsis* están representadas por un total de 34 isoformas (Harmon et al., 2000; Harper et al., 2004). Estas proteínas contienen 4 motivos “*EF-hand*” para la unión de Ca^{2+} en su extremo carboxiterminal. Algunas presentan una secuencia de miristoilación en su extremo aminoterminal, que sugiere una posible asociación con las membranas plasmáticas (Xiong et al., 2002). A este tipo de quinasas se las denomina “sensores efectores” porque además de funcionar como un sensor de Ca^{2+} contienen a su quinasa efectora en una misma proteína. El tamaño de esta familia de quinasas, junto con las diferentes afinidades por diferentes sustratos (Lee et al., 1998) y la diferente regulación por Ca^{2+} , sugiere que cada CDPK podría actuar descifrando las señales de Ca^{2+} e interactuando con diversos efectores específicos para generar multitud de respuestas diferentes frente a situaciones de estrés así como regular determinados aspectos del crecimiento y del desarrollo, del metabolismo y de otras funciones fisiológicas esenciales para la planta (Harper et al., 2004). Se ha observado una expresión diferencial de las CDPKs en respuesta a diversos estímulos, incluyendo ácido abscísico (ABA), frío, sequía, salinidad, calor, elicitores y patógenos (Romeis et al., 2001a; Ray et al., 2007; Li et al., 2008; Wan et al., 2007).

El papel de las CDPKs en la traducción de señales en respuesta a estrés se observó por primera vez en protoplastos de maíz. AtCPK10 y AtCPK30 fueron las primeras CDPKs identificadas y actúan como reguladores positivos del promotor del gen de cebada HVA1 inducible por estrés y ABA (Sheen, 1996). El gen de la luciferasa se expresó bajo el promotor del gen HVA1 y del gen de arroz RAB16 que se induce en respuesta a ABA y estrés osmótico y se observó que fue inducido por la quinasa AtCDPK1 de *Arabidopsis*, que participa en las rutas de señalización por estrés hídrico y salino (Sheen, 1996; Saijo et al., 2000). El homólogo de CDPK1 en *Mesembryanthemum crystallinum* se induce por estrés hídrico y salino y activa al regulador de pseudo-respuesta CSP1 en respuesta a señales de calcio. El estrés salino favorece la interacción de ambas proteínas favoreciendo su colocalización en el núcleo (Patharkar y Cushman, 2000). Como sabemos, el ABA es una hormona esencial que media las respuestas de la planta a la sequía y la salinidad. Se ha observado que CPK3 y CPK6 participan en el cierre estomático mediado por ácido abscísico (Mori et al., 2006). En experimentos con mutantes sobreexpresantes y de falta de función de CPK23 se determinó que esta quinasa estaba implicada en la señalización por ABA. En presencia de ABA, CPK23 y CPK21 pueden fosforilar al canal de salida de aniones SLAC1. La despolarización de la membrana plasmática y en consecuencia, la activación del canal de salida de K⁺ GORK produce el cierre estomático ante condiciones de estrés hídrico (Ma y Wu, 2007; Geiger et al., 2010).

El gen *AtCDPK10* constitutivamente activo induce la expresión de genes endógenos inducibles por estrés y ABA en células foliares de *Arabidopsis*. Por ejemplo, CPK10 activa la proteína HSP1 en respuesta a estrés hídrico (Zou et al., 2010). Probablemente la inducción transcripcional se produzca a través de los factores de transcripción ABFs de respuesta a ABA, identificados como sustratos *in vitro* para varios CDPKs (Choi et al., 2005; Zhu et al., 2007). AtCPK32 activa mediante fosforilación al factor de transcripción ABF4 *in vivo*, lo que resulta en la inducción de sus genes diana. La sobreexpresión de ABF4 en *Arabidopsis* produjo plantas hipersensibles a ABA y estrés salino, demostrando su papel en la señalización mediada por ABA (Choi et al., 2005). AtCPK4 y AtCPK11 regulan los factores de transcripción ABF1 y ABF4 que a su vez inducen la expresión de ciertos genes varias horas después de la señal de ABA, lo que sugiere un papel en la adaptación a largo plazo. Esta expresión génica modificada se correlaciona con la hipersensibilidad a ABA y al aumento de la tolerancia a sequía y salinidad en plantas que sobreexpresan *AtCPK4* o *AtCPK11*, mientras que el doble mutante *cpk4 cpk11* muestra los fenotipos opuestos (Zhu et al., 2007). Por su parte CPK12 equilibra la respuesta a ABA ya que puede activar a ABF1 y ABF4 mediante fosforilación así como al regulador negativo ABI2 (Zhu et al., 2007; Zhao et al., 2011a). Resultados similares se observaron en plantas transgénicas de arroz que sobreexpresaban *OsCPK21* (Asano et al., 2011) y *OsCPK13* (*OsCDPK7*) (Saijo et al., 2000). El gen *OsCDPK7* de arroz, cuya expresión se induce a bajas temperaturas y salinidad, induce la expresión de genes que responden a estrés salino e hídrico, mientras que no se inducen por frío (Saijo et al., 2000). En conjunto, estos estudios indican que la reprogramación transcripcional inducida por ABA a través de los factores de

transcripción ABFs es una característica clave de las rutas de señalización de las CDPKs tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas.

4.3.3. Ruta CBL/CIPKs

Los sensores de Ca^{2+} de plantas CBLs (*Calcineurin B-like Proteins*) interactúan específicamente con un grupo muy concreto de proteínas quinasas, denominadas en consecuencia CIPKs (*CBL Interacting Protein Kinase*), constituyendo uno de los módulos reguladores dependientes de Ca^{2+} más importantes inducidos por diferentes estreses ambientales (Shi et al., 1999; Halfter et al., 2000). El sistema CBL/CIPK de *Arabidopsis* proporciona una combinación de 10 sensores y 26 quinasas efectoras (Albrecht et al., 2001; Kolukisaoglu et al., 2004; Batistič y Kudla, 2009), donde factores como su expresión génica, su localización subcelular, su afinidad por calcio y la especificidad de la interacción CBL/CIPK, juegan un papel esencial en la descodificación de cada señal específica de calcio. Las funciones fisiológicas de la interacción CBL/CIPK fueron descubiertas en primer lugar en la ruta SOS (Qiu et al., 2002), desde entonces se han descrito funciones en la regulación de otros sistemas de transporte de nutrientes como K^+ (Li et al., 2006; Xu et al., 2006), Mg^{2+} (Tang et al., 2015), nitrato (Ho et al., 2009; Leran et al., 2015), amonio (Straub et al., 2017) y en la homeostasis de protones (Fuglsang et al., 2007).

Las proteínas CIPKs constituyen un grupo de quinasas de serina/treonina específicas de plantas que poseen similitud estructural con la quinasa SNF1 (*Sucrose Non-fermenting*) de levadura y con las quinasas dependientes de AMP, AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) de animales (Albrecht et al., 2001; Luan et al., 2002). Las proteínas CIPKs se incluyen en la superfamilia de quinasas SnRK (*Snf1-related Protein Kinases*), dentro del subgrupo denominado SnRK3 (Batistic and Kudla, 2009).

Estudios bioquímicos y estructurales han permitido identificar dos dominios en la estructura molecular de las CIPKs, un extremo aminoterminal que contiene un dominio catalítico similar a los dominios presentes en las quinasas de tipo SNF1 y que está muy conservado entre las distintas isoformas (51-90% residuos aminoacídicos idénticos) y un extremo carboxiterminal regulatorio que presenta una mayor variabilidad entre las distintas isoformas (24-58%) y que no se encuentra en otras quinasas de tipo SNF1 (Guo et al., 2001; Kolukisaoglu et al., 2004; Akaboshi et al., 2008; Sánchez-Barrena et al., 2007a; Sánchez-Barrena et al., 2007b). En condiciones fisiológicas normales, las CIPKs se encuentran autoinhibidas mediante la interacción del dominio aminoterminal catalítico con el carboxiterminal regulador. El dominio catalítico de las proteínas CIPKs contiene un bucle de activación con un residuo de treonina situado entre los motivos conservados Asp-Phe-Gly (DFG) y Ala-Pro-Glu (APE). A menudo, la fosforilación del residuo de treonina por otras quinasas es necesaria para la activación de estas proteínas. Estos resultados sugieren la existencia de otras proteínas quinasas que regulen la actividad de las CIPKs, lo que proporcionaría un nivel de regulación adicional que les permitiría interactuar con otros elementos de señalización celular, como ocurre en el caso de las CDPKs, que también

requieren de la transfosforilación por quinasas para desarrollar su completa actividad quinasa (Romeis et al., 2001b).

El dominio regulatorio de las CIPKs se puede dividir funcionalmente y estructuralmente en un dominio de 21 aminoácidos denominado FISL, también llamado NAF debido a los aminoácidos Asn(N)-Ala(A)-Phe(F) altamente conservados que incluye, y un dominio PPI. El dominio FISL fue identificado como necesario y suficiente para mediar la interacción con el sensor CBL (Albrecht et al., 2001; Guo et al., 2001). La interacción entre CBLs y CIPKs depende de interacciones de naturaleza hidrofóbica que se establecen entre aminoácidos del dominio FISL/NAF y de la superficie de contacto de la CBL (Sánchez-Barrena et al., 2007b; Akaboshi et al., 2008). A pesar de que el dominio regulatorio de las CIPKs presenta una gran variabilidad entre los distintos miembros de esta familia, el dominio NAF/FISL está muy conservado en todas las quinasas de tipo CIPKs y en consecuencia se define a estas proteínas quinasas como dianas de las señales de calcio transmitidas por los sensores de calcio CBL. Además, el dominio NAF ha demostrado ejercer una actividad autoinhibitoria sobre la actividad quinasa, ya que la delección de este dominio resulta en una quinasa constitutivamente activa e independiente de CBL (Guo et al., 2001). Debido a que el dominio NAF por sí solo no define la especificidad de la interacción con el sensor, otras regiones de la proteína deben ser las responsables del alto grado de especificidad de las interacciones entre CBLs y CIPKs (Kim et al., 2000; Albrecht et al., 2001).

El dominio PPI (*Protein Phosphatase Interaction*) se identificó como responsable de la interacción entre las proteínas CIPK y las proteínas fosfatasa de tipo 2C, ABI1 y ABI2, observándose que las distintas isoformas de CIPKs muestran diferentes afinidades hacia las fosfatasas ABI1 y ABI2 (Ohta et al., 2003). El dominio PPI se localiza en el extremo carboxiterminal de la quinasa y está constituido por 37 aminoácidos con cierta homología con la quinasa CHK1, implicada en la reparación del ADN.

Las proteínas CBLs (*Calcineurin B-like Proteins*), inicialmente designadas como proteínas SCaBPs (*Small Ca²⁺ Binding Proteins*), constituyen una familia de sensores de calcio que muestran una gran similitud con la subunidad reguladora B (CNB) de la fosfatasa calcineurina y con los sensores neuronales de Ca²⁺ de animales (NCS) (Liu y Zhu, 1998; Kudla et al., 1999). Las proteínas CBL fueron identificadas inicialmente en *Arabidopsis thaliana*, donde existen 10 miembros, que pese a su elevada identidad genética presentan funciones diferenciables (Kolukisaoglu et al., 2004; Pandey et al., 2004). Con el fin de obtener información acerca de la evolución y distribución de las CBLs dentro del reino vegetal, se realizaron estudios a partir de las bases de datos de los genomas de plantas publicados, que revelaron la existencia de un gen CBL en las algas verdes *Ostreococcus lucimarinus* y *Chlorella* sp. NC64A, y cuatro genes que codifican proteínas CBL en el musgo *Physcomitrella patens*, así como en el helecho *Selaginella moellendorffii* (Batistič et al., 2010).

Basándose en un análisis filogenético, las CBLs de *Arabidopsis* se dividieron en tres grupos. El grupo I está constituido por un único miembro, CBL10, que contiene un largo extremo N-terminal. Al igual que otras CBLs de plantas, CBL10 de *Arabidopsis* contiene en su

extremo N-terminal una hélice hidrofóbica que le permite asociarse a membranas y que está muy conservada (Batistič et al., 2010; Sánchez-Barrena et al., 2013). Análisis de microscopía confocal de fluorescencia indican que AtCBL10 se localiza en el tonoplasto y la membrana plasmática (Quan et al., 2007; Batistič et al., 2010). El grupo II está formado por 5 miembros (CBL1, 4, 5, 8 y 9) que se caracterizan por un extremo N-terminal mucho más corto. La mayoría de ellos posee la secuencia conservada MGCXXS/T, que determina la modificación lipídica de estas proteínas para permitir su anclaje a la membrana (Weinl y Kudla, 2009; Batistic et al., 2008). Por último el grupo III, que incluye a CBL2, CBL3, CBL 6 y CBL7, presentan un extremo N-terminal relativamente largo que, excepto en el caso de CBL7, alberga una secuencia característica de direccionamiento al tonoplasto, importante para la localización de las proteínas CBL2, CBL3 y CBL6 (Batistič et al., 2010; Sánchez-Barrena et al., 2013).

Estas proteínas contienen 4 dominios “*EF-hand*”, al igual que las calmodulinas (Guo et al., 2001; Luan et al., 2002; Kolukisaoglu et al., 2004). Un dominio “*EF-hand*” canónico está formado por una estructura hélice-bucle-hélice, en cuya zona central aparece una secuencia conservada, generalmente de 12 residuos, con el patrón “X•Y•Z•-Y•-X••-Z”, donde X, Y, Z, -X, -Y y -Z son los ligandos que participan en la coordinación del ión Ca^{2+} y los puntos son otros residuos intervinientes (Lewit-Bentley y Réty, 2000). Según el grado de conservación en la secuencia de aminoácidos de estos dominios respecto a la secuencia canónica, las CBLs se pueden clasificar en proteínas con un dominio “*EF-hand*” canónico (AtCBL6, 7, 8, 10), con dos dominios “*EF-hand*” canónicos (AtCBL1, 9) y con ningún dominio “*EF-hand*” canónico (AtCBL2, 3, 4, 5) (Kolukisaoglu et al., 2004). Al igual que en las proteínas NCS, el primer dominio “*EF-hand*” de todas las isoformas CBL parece ser incapaz de unir Ca^{2+} . En la mayoría de los casos, se debe a cambios en los residuos de enlace a calcio localizados en los sitios 1(X) y/o 3(Y) por aminoácidos carentes de oxígeno como Ala, Val, Ile o Cys (Kolukisaoglu et al., 2004). Las diferencias en la composición aminoacídica de los dominios “*EF-hand*” pueden producir diferentes afinidades, e incluso diferentes mecanismos, de unión a Ca^{2+} .

Debido a que el número de dominios “*EF-hand*”, así como el espaciamiento entre ellos, está totalmente conservado en todas las isoformas de CBL (Kolukisaoglu et al., 2004), se puede sugerir una estructura tridimensional común en todas las CBLs de plantas. La resolución de las estructuras cristalinas de AtCBL2 y SOS3(AtCBL4) mostró unas estructuras con un plegamiento global similar a la de las proteínas CNB y NCS (Nagae et al., 2003). Una diferencia destacable al comparar estas estructuras fue su capacidad de unión a Ca^{2+} , mientras que AtCBL2 posee dos iones Ca^{2+} , coordinados en el primer y el cuarto dominio “*EF-hand*”, la molécula de SOS3 cristalizó con iones de Ca^{2+} saturando los cuatro dominios “*EF-hand*”. Curiosamente, al determinar las estructuras cristalinas de los complejos formados por estas mismas CBLs y el fragmento C-terminal de su correspondiente CIPK se observaron cambios de nuevo en su contenido de Ca^{2+} . El complejo SOS3/SOS2(CIPK24)Ct tiene solo dos iones de Ca^{2+} en los dominios “*EF-hand*” 1 y 4, respectivamente, y por el contrario, el complejo AtCBL2/CIPK14Ct tiene 4 iones Ca^{2+} alojados en sus 4 dominios “*EF-hand*” (Sánchez-Barrena et al., 2007b, Akaboshi et al., 2008). Esta variabilidad sugiere que solo señales de Ca^{2+}

específicas son capaces de promover el cambio conformacional requerido en la molécula de CBL para interactuar con su correspondiente CIPK. Una CBL podría interactuar con diferentes CIPK dependiendo del número de cationes de Ca^{2+} ligados, lo que a su vez dependería de las características de la señal de Ca^{2+} .

Como se ha mencionado anteriormente, algunos sensores de Ca^{2+} CBL contienen secuencias características que determinan su localización subcelular y les permiten llevar a cabo su función en diferentes compartimentos subcelulares. En animales, tanto calcineurina B, como casi todos los NCS presentan al inicio de la proteína la secuencia consenso MGXXS/T que determina la unión de ácido mirístico al residuo de glicina (Farazi et al., 2001). En las CBLs el consenso es MGCXXS/T, por lo que además de la miristoilación de la glicina, probablemente ocurre la S-palmitoilación de la cisteína, como se ha demostrado para CBL1 de *Arabidopsis* (Batistic et al., 2008). Un análisis filogenético demuestra que las proteínas CBL de algas y también algunos miembros de la familia de proteínas CBL de helecho y musgo albergan este consenso para acilación. Esta característica estructural no aparece en dos proteínas CBL del musgo, tres proteínas CBL de helecho, y seis proteínas CBL de *Arabidopsis* y arroz, respectivamente. Estos datos sugieren la hipótesis de que las CBLs originales contenían este motivo de modificación lipídica, y que durante la evolución, se produjo una diversificación estructural de las proteínas CBL, dando lugar a nuevas CBL que no comparten este motivo original, lo que pudo haber resultado en localizaciones subcelulares alternativas (Batistič y Kudla, 2009).

La miristoilación juega un papel esencial en la interacción proteína-proteína así como en la unión o asociación de la proteína a las membranas biológicas (Resh, 1999). No obstante, la miristoilación puede no proporcionar la hidrofobicidad requerida para permitir el anclaje de las proteínas miristoiladas a las membranas y se precisan otros eventos que permitan estabilizar dicha unión (Batistic et al., 2008). Este es el caso de la S-palmitoilación, la unión covalente de un ácido palmítico a un residuo de cisteína adyacente a la glicina miristoilada, lo que aumenta su hidrofobicidad y permite una unión más robusta de la proteína a la superficie citoplasmática de las membranas (Bijlmakers y Marsh, 2003; Huang y El-Husseini, 2005). En todas las CBLs que poseen el dominio de miristoilación, se observa un residuo de cisteína tras el residuo conservado de glicina, lo que sugiere que las CBLs miristoilables son susceptibles de ser palmitoiladas. Esta doble modificación lipídica de las proteínas CBLs puede desempeñar un papel determinante en la localización en la membrana de estos sensores, así como de las proteínas quinasas con las que interactúan, permitiendo así la fosforilación de proteínas sustrato asociadas a la membrana. Además, la palmitoilación es una modificación reversible, por lo que podría proporcionar un nivel adicional de regulación mediante la asociación temporal a las membranas (Bijlmakers y Marsh, 2003).

Las características del sistema CBL/CIPK sugieren en un principio un número elevado de combinaciones posibles. Sin embargo, se ha demostrado la formación preferencial de complejos entre determinadas CBLs y CIPKs, hecho que se ha interpretado como uno de los principales mecanismos de especificidad en este tipo de vías de señalización (Guo et al., 2001;

Albrecht et al., 2001). Estos resultados demuestran que, si ante una determinada situación una célula vegetal tuviera que procesar de manera simultánea distintas señales de calcio, la selectividad en la formación de los complejos CBL/CIPK permitiría mantener la especificidad en la transmisión de la señal.

La localización temporal y espacial de las CBLs y las CIPKs tanto a nivel celular como en la planta completa difiere significativamente de unas a otras, de manera que la presencia y la localización de los elementos implicados en la transmisión de una determinada señal de Ca^{2+} es crucial para su correcta decodificación. Un ejemplo que muestra la capacidad del sistema CBL/CIPK para generar especificidad se observa en los sensores CBL1 y CBL9, ambas proteínas comparten el 90% de su secuencia de aminoácidos, sin embargo, los diferentes fenotipos observados en sus mutantes de falta de función revelan funciones distintas. CBL1 y CBL9 se expresan en la estela del cilindro vascular y en el ápice de la raíz (Pandey et al., 2004a), pero mientras que la expresión de CBL1 se induce por estrés hídrico, salino y frío y es independiente del ABA (Albrecht et al., 2003), la expresión de CBL9 se induce específicamente por ácido abscísico (Pandey et al., 2004a). A pesar de las diferencias observadas entre los patrones de expresión de CBL1 y CBL9, ambas son capaces de activar la quinasa CIPK23 regulando finalmente a los transportadores de K^+ AKT1 y HAK5 (Li et al., 2006a; Xu et al., 2006; Ragel et al., 2015; Scherzer et al., 2015). Por otro lado, se ha determinado que CIPK9 se expresa de manera ubicua en los tejidos de la planta excepto en raíces y se induce principalmente por ABA y débilmente por estrés salino e hídrico (Gong et al., 2002a), mientras que la expresión de CIPK8 se localiza principalmente en la raíz y no se induce por ningún tipo de estrés (Gong et al., 2002b). Estos ejemplos nos muestran que la especificidad en la expresión de las distintas isoformas de CBLs y CIPKs y su solapamiento diversifican y mejoran las posibilidades del sistema para responder de una forma dinámica ante las condiciones ambientales y las necesidades del desarrollo.

Por otra parte, las diferencias observadas en cuanto a las funciones llevadas a cabo por proteínas CBLs estructuralmente muy parecidas, apuntan a la existencia de niveles adicionales de regulación funcional mediante modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o acilación (Batistic y Kudla, 2009). Algunas CBLs presentan sitios de miristoilación que les permiten asociarse a determinados compartimentos subcelulares como la membrana plasmática (Batistic y Kudla, 2004), dirigiendo asimismo la localización de su complejo CBL/CIPK. Esta especificidad en la localización de las proteínas CBL proporciona la separación espacial necesaria de los procesos de señalización en respuesta a diferentes estímulos para que puedan ser procesados al mismo tiempo.

Por el contrario, la secuencia de las CIPKs no presentan señales que determinen su localización subcelular (Kolukisaoglu et al., 2004) por lo que ésta dependerá del sensor CBL con el que interaccionen. En cuanto a la localización de los complejos CBL/CIPK, se han determinado patrones de expresión específicos según el tejido y el estado de desarrollo que sugieren distintas funciones para un mismo complejo CBL/CIPK dependiendo del órgano donde

se exprese, así como una misma función para distintos complejos que se expresan en el mismo tejido.

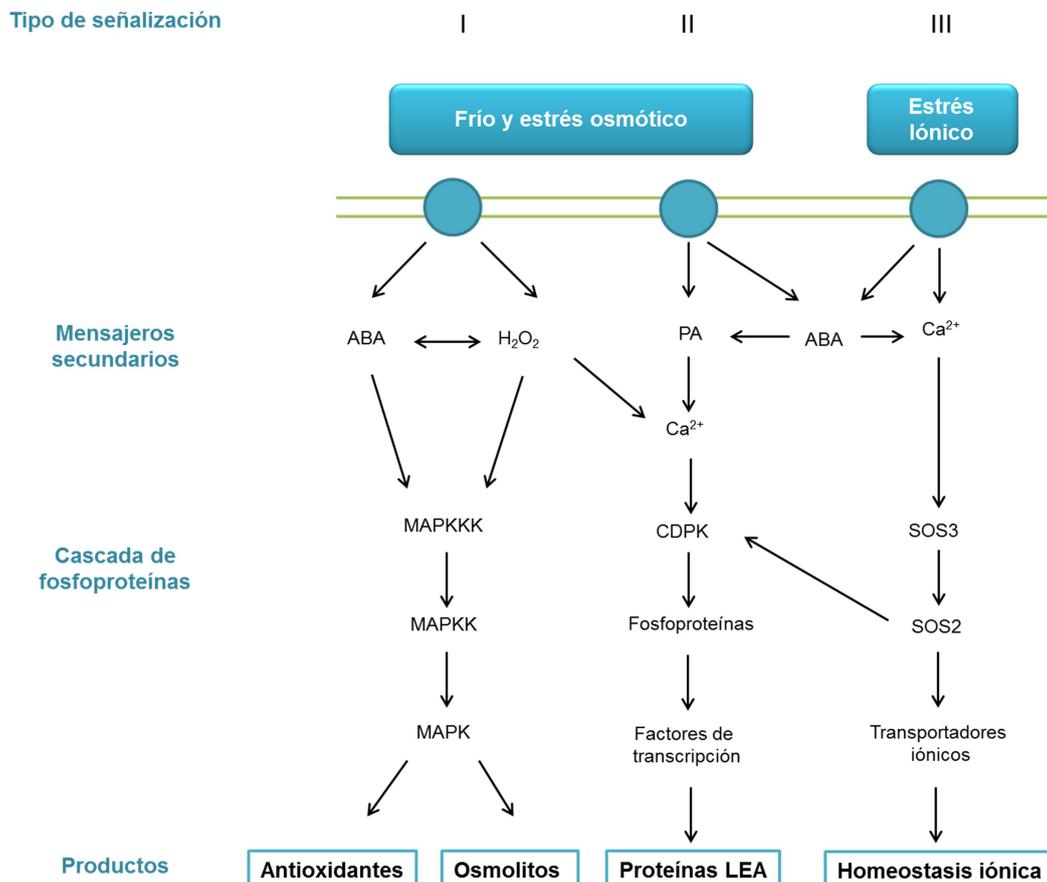


Figura I.2. Principales rutas de señalización en plantas durante el estrés abiótico. Se representan las moléculas señalizadoras, cascadas y productos de los tres tipos principales de rutas de señalización en plantas. El tipo I representa la ruta de señalización de las cascadas de MAP quinasas implicadas en la producción de osmolitos y en la degradación de ROS. El tipo II representa la ruta de señalización dependiente de Ca²⁺ mediada por las proteínas quinasas CDPKs que tiene como resultado la producción de proteínas de respuesta a estrés, como es el caso de las proteínas LEA. El tipo III se corresponde con la ruta de activación de transportadores iónicos mediante la formación de complejos CBL/CIPK, que en este caso está representada por la ruta SOS (Adaptado de Xiong et al., (2002)).

5. El transporte iónico en las plantas

La nutrición mineral de las plantas tiene lugar a través de la actividad de los transportadores iónicos, encargados de absorber los elementos nutritivos desde el sustrato y de su distribución intra e intercelular en la planta, así como la expulsión de productos de desecho de las rutas metabólicas y de otras sustancias tóxicas (Saier, 2000).

Se han identificado más de 800 genes en el genoma de *Arabidopsis* que codifican proteínas de membrana, de las cuales el 65% funcionan como transportadores de iones y compuestos orgánicos (Saier, 2000). Las proteínas encargadas del transporte iónico se pueden clasificar, según las necesidades energéticas, en bombas, canales y transportadores (Sussman y Harper, 1989). Los canales realizan un transporte rápido y pasivo a favor del gradiente, en este caso el coste energético es nulo. Las bombas utilizan directamente la energía obtenida a través de la hidrólisis de ATP o del pirofosfato para el transporte de iones en contra del gradiente electroquímico. Sin embargo, a diferencia de las levaduras, las plantas vasculares no pueden expulsar Na^+ directamente a través de bombas ATPasa (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001). Los transportadores llevan a cabo un transporte activo que se realiza a expensas de un gradiente de H^+ (potencial electroquímico de protones) creado a ambos lados de la membrana, pueden ser uniportadores, que transportan una molécula a favor de gradiente, o antiportadores y simportadores, que mueven simultáneamente dos moléculas, una a favor y otra en contra de gradiente, en dirección opuesta o en la misma dirección respectivamente (Chrispeels et al., 1999). En plantas los transportadores que participan en el transporte de Na^+ son antiportadores catión/ H^+ , canales y uniportadores/simportadores.

Estudios filogenéticos del genoma de *Arabidopsis* han permitido identificar una amplia familia de transportadores catión/ H^+ que se ha clasificado en cuatro subfamilias con afinidad por Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y Mg^{2+} (CaCA, NhaD, CPA1 y CPA2) (Mäser et al., 2001).

- Subfamilia CaCA: Está formada por 11 intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ llamados CAX1-11. Algunos de los miembros de esta subfamilia también pueden transportar Mn^{2+} y Cd^{2+} (Cheng et al., 2002).
- Subfamilia NhaD: Está compuesta únicamente por dos miembros (NHD1 y NHD2) que muestran cierta similitud con antiportadores Na^+/H^+ bacterianos (Pardo et al., 2006; Furumoto et al., 2011).
- Subfamilia CPA1: Está compuesta por 8 miembros NHX1-6, SOS1(NHX7) y NHX8. Los antiportadores catión/ H^+ NHX1-6 son antiportadores vacuolares, SOS1 es un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática y NHX8 es un antiportador Li^+/H^+ de membrana plasmática (Blumwald, 2000; Qiu et al., 2002, An et al., 2007; Barragan et al., 2012).
- Subfamilia CPA2: Esta subfamilia incluye 28 intercambiadores catión/ H^+ CHX y 5 homólogos del antiportador K^+/H^+ AtKEA1 (Pardo et al., 2006).

Los miembros de la familia HKT pertenecen a la superfamilia de transportadores de K^+ SKT presentes en bacterias, arqueas, hongos y plantas (Levin y Zhou, 2014) y pueden presentar dos tipos diferentes de transporte, un simporte de K^+ y Na^+ de alta afinidad o un uniporte de Na^+ de baja afinidad, habiéndose propuesto también su papel en la toma de Na^+ y su recirculación en plantas sometidas a estrés salino (Rubio et al., 1995; Rus et al., 2001; Laurie et al., 2002; Apse y Blumwald, 2007). Los distintos transportadores HKT muestran selectividad iónica variable cuando se expresan en sistemas heterólogos. El análisis

filogenético realizado mediante la comparación de secuencias de aminoácidos en distintos transportadores HKT de mono y dicotiledóneas llevó al establecimiento de 2 subfamilias (Platten et al., 2006). Los miembros de la subfamilia 1 (HKT1;n) se encuentran representados tanto en mono como en dicotiledóneas y muestran especificidad por Na^+ , posiblemente debido a la presencia de una serina en el primer bucle del poro. Los transportadores de la subfamilia 2 (HKT2;n) pertenecen exclusivamente a monocotiledóneas, transportan Na^+ y K^+ , y la serina típica de la subfamilia 1 se encuentra sustituida por una glicina (excepto en OsHKT2;1, que funciona como uniportador de Na^+). Se ha sugerido que la principal función del único miembro de esta familia en *Arabidopsis*, AtHKT1 (o AtHKT1;1), es el transporte a larga distancia de Na^+ . En presencia de estrés salino, AtHKT1 descargaría Na^+ del xilema y favorecería la acumulación preferente de este catión en raíz, protegiendo así al tejido foliar de los daños causados por su excesiva acumulación en la parte aérea. Además, de forma indirecta, favorece la acumulación de K^+ en parte aérea mediante la activación por despolarización celular de canales de salida de K^+ (Rus et al., 2004; Sunarpi et al., 2005; Davenport et al., 2007; revisado en Horie et al., (2009); Yao et al., 2010).

Los canales no selectivos de cationes (NSCC, del inglés *Non-Selective Cation Channels*) se encuentran tanto en membrana plasmática como en tonoplasto, habiéndose identificado 40 posibles miembros de este grupo en el genoma de *Arabidopsis* (Mäser et al., 2001; Shabala et al., 2007). Muestran gran afinidad por cationes frente a aniones pero no discriminan entre Na^+ y K^+ , aceptándose su papel como principales causantes de la entrada de Na^+ en la planta, así como en la pérdida de K^+ inducida por NaCl (Shabala et al., 2006; Demidchik y Maathuis, 2007). Se incluyen en esta familia los canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CNGC) y los receptores de glutamato (GLRs) (Leng et al., 2002; Demidchik et al., 2004).

5.1. Regulación del transporte y distribución de Na^+

Para lograr la homeostasis global, la planta debe regular de una forma precisa el transporte de Na^+ a través de procesos como la carga en el xilema desde la raíz, la descarga en hojas para su compartimentación o la recirculación desde la parte aérea a la raíz para su expulsión (Munns, 2002; Berthomieu et al., 2003) y coordinar estos procesos con los mecanismos reguladores de los niveles de Na^+ intracelular, evitando así que alcance niveles tóxicos que puedan interferir con procesos celulares vitales como la fijación del carbono y la asimilación de nutrientes.

5.1.1. Absorción del Na^+

Dado que las raíces son el sitio de contacto de la planta con el medio ambiente, su respuesta y comportamiento adaptativo forman la primera línea de defensa contra el daño por estrés salino. La absorción de Na^+ tiene lugar inicialmente a nivel de las células epidérmicas y corticales de la raíz. El Na^+ es transportado en un flujo radial por el córtex de la raíz, a través de

las vías apoplástica y simplástica, hasta llegar a la endodermis, donde se encuentra con una barrera impermeable formada por la banda de Caspari, que obliga al flujo a seguir por la vía simplástica. El estrés salino favorece la rápida maduración de la banda de Caspari en raíces de algodón, mientras que el crecimiento en condiciones de alta humedad y baja transpiración produce la formación de raíces con endodermis más permeables (Hose et al., 2001; Enstone et al., 2002). Sin embargo, una parte del flujo puede continuar por la vía apoplástica gracias a las discontinuidades que presenta la endodermis en los ápices radicales y en las zonas de emergencia de las raíces secundarias (Tester y Leigh, 2001). En base a estudios bioquímicos y electrofisiológicos, Tester y Davenport (2003) clasificaron las vías de entrada de Na^+ por la raíz en tres grupos: simplásticas sensibles a Ca^{2+} , simplásticas independientes de Ca^{2+} y apoplástica. La contribución de cada una de estas vías de absorción varía en función de la especie y las condiciones de cultivo.

- Transporte simplástico dependiente de Ca^{2+} : Se ha observado que los efectos tóxicos producidos por el Na^+ se pueden aliviar mediante la adición de hasta 10 mM de Ca^{2+} a la solución externa (Cramer et al., 1985). Este efecto se debe en parte a la activación del Ca^{2+} de la ruta SOS (Liu y Zhu, 1998) pero también a la inhibición del flujo de entrada de Na^+ (Davenport y Tester, 2000), siendo los canales no selectivos de cationes (NSCCs) la vía más probable de entrada de Na^+ sensible a Ca^{2+} (Amtmann et al., 1999; Tyerman y Skerrett, 1998; Zhu, 2003; Rus et al., 2004). Los NSCCs se caracterizan por su escasa discriminación entre cationes monovalentes, incluso algunos de estos canales también son permeables a cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} (Demidchik y Tester, 2002). En *Arabidopsis* existen dos grandes familias de NSCCs, los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) y los canales activados por glutamato (GLRs) (Lacombe et al., 2001; Leng et al., 2002). La familia de canales CNGC de *Arabidopsis* incluye 20 miembros (Talke et al., 2003) de los cuales 5 han sido caracterizados (*AtCNGC1*, 2, 3, 4 y 10) (Leng et al., 2002; Balagué et al., 2003a; Li et al., 2013; Gobert et al., 2006). Se ha demostrado que bajo condiciones de estrés salino se induce la expresión de *AtCNGC1*, *AtCNGC19* y *AtCNGC20* en raíz y de *AtCNGC3*, *AtCNGC8* y *AtCNGC19* en la parte aérea de la planta (Maathuis, 2006). Además, la inhibición del flujo de entrada de Na^+ en la planta tras la adición de análogos de nucleótidos cíclicos sugiere la importancia de los CNGCs en la tolerancia a salinidad (Maathuis y Sanders, 2001). Probablemente, la inhibición por Ca^{2+} de los canales NSCC disminuya la adquisición de Na^+ en los mutantes *sos* y alivie el fenotipo de deficiencia de K^+ en medios pobres en este nutriente (Pardo et al., 2006). Sin embargo, los efectos inhibidores de los nucleótidos cíclicos observados en plantas están en contraste con los resultados obtenidos cuando se expresaron estas proteínas de plantas en sistemas de expresión heterólogos, como oocitos de *Xenopus* y levaduras, en los que los nucleótidos cíclicos activaron corrientes de cationes no selectivas. Estos resultados indican que la mejora de la halotolerancia producida por la adición de nucleótidos cíclicos parece deberse más bien a la activación de alguna otra proteína que a la activación de los CNGCs. Un posible candidato es el antiportador Na^+/H^+ SOS1, ya que entre

los aminoácidos 745 y 997 contiene un dominio putativo de unión a nucleótidos cíclicos (Quintero et al., 2011). Por otra parte, también se ha sugerido la implicación de los canales activados por glutamato (GLRs) en la entrada de Na^+ , debido a que la adición de glutamato produjo un aumento de la toma de este catión en plantas. Además, estas proteínas muestran una gran similitud con los receptores ionotrópicos de glutamato presentes en las neuronas de animales vertebrados (iGLRs), que controlan la transmisión del impulso nervioso mediante el transporte de cationes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Lam et al., 1998). Sin embargo, los GLRs caracterizados hasta la fecha muestran actividad nula o una actividad independiente de glutamato (Tester y Davenport, 2003). Estos resultados, junto con el incremento transitorio del nivel de Ca^{2+} en el citosol en presencia de glutamato en *Arabidopsis*, sugieren la implicación de estas proteínas en la entrada de Ca^{2+} y no Na^+ en la célula (Demidchik et al., 2004; Qi et al., 2006).

- Transporte simplástico independiente de Ca^{2+} : La entrada de Na^+ insensible a Ca^{2+} está causada, al menos en parte, por el componente insensible a Ca^{2+} de los NSCC (Tester y Davenport, 2003), sin embargo, otra parte del influjo de Na^+ podría deberse a la entrada a través de transportadores HKT. El primer transportador de este tipo, *TaHKT1*, se aisló de una biblioteca de cDNA de trigo por su capacidad de complementar el fenotipo de deficiencia de K^+ de una cepa mutante de *S. cerevisiae* carente de los transportadores endógenos de K^+ *Trk1* y *Trk2*, por lo que inicialmente se pensó que participaba en la nutrición de K^+ como simporte K^+/H^+ (Schachtman y Schroeder, 1994). Posteriormente, estudios más detallados en oocitos de *Xenopus* y en levaduras, demostraron que *TaHKT1* cataliza un simporte de alta afinidad de Na^+ y K^+ y, a concentraciones más elevadas de Na^+ , se comporta como uniporte de Na^+ de baja afinidad, siendo este flujo aparentemente insensible a Ca^{2+} (Rubio et al., 1995; Tyerman y Skerrett, 1998). En monocotiledóneas, los transportadores HKT está representados por un número variado de genes, mientras que dicotiledóneas suelen existir sólo uno o dos genes de este tipo. Los genes *Kna1*, *Nax1* y *Nax2* de trigo, seleccionados por su capacidad para conferir tolerancia a salinidad, resultaron codificar transportadores HKT. El papel de estos loci de trigo consiste en mantener un bajo contenido de Na^+ y un alto cociente K^+/Na^+ en las hojas (Gorham et al., 1990; James et al., 2006; Byrt et al., 2007). En *Arabidopsis*, el único representante de esta familia es el gen *AtHKT1*. Análisis genéticos y electrofisiológicos indican que esta proteína es un transportador específico de Na^+ . Su expresión en oocitos de *Xenopus* y levadura muestra que actúa como un uniportador específico de Na^+ (Uozumi et al., 2000), aunque por razones que se desconocen también en puede complementar a un mutante de *E. coli* deficiente en la toma de K^+ . Los mutantes *hkt1* de *Arabidopsis* son sensibles a estrés salino y muestran una mayor acumulación de Na^+ en la parte aérea y un menor contenido en la raíz con respecto a la planta silvestre (Rus et al., 2001; Mäser et al., 2002; Berthomieu et al., 2003; Rus et al., 2006), esta diferencia no se debe a una reducción significativa en la absorción de Na^+ por las raíces por la ausencia de *AtHKT1* (Essah et al., 2003), como se postuló inicialmente, cuando se aisló el mutante *hkt1* como un supresor parcial de la hipersensibilidad a Na^+ del mutante *sos3* (Rus

et al., 2001). Puesto que la expresión de AtHKT1 se localiza en las células parenquimáticas del xilema y del floema, se sugirió que su función estaría relacionada principalmente con el transporte a larga distancia, recirculando el Na^+ desde el floema. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la función promordial de AtHKT1 consiste en descargar el Na^+ del xilema a las células del parénquima, lo que explica la distribución anómala de este catión en el mutante *hkt1*. La acción de AtHKT1 se ha de coordinar con el flujo de descarga de Na^+ hacia el xilema mediado por SOS1 (Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005; Rus et al., 2006; Davenport et al. 2007; Olías et al. 2009).

Se ha sugerido que AtHKT1 regularía la distribución de K^+ en la planta, favoreciendo una mayor acumulación en parte aérea y menor en la raíz, pero dado que este transportador no muestra afinidad por el K^+ , se debería a un efecto indirecto provocado por la acumulación de Na^+ en las células parenquimáticas del xilema, que activaría por despolarización a los canales de salida de K^+ (Rus et al., 2004; Sunarpi et al., 2005; Møller et al., 2009; Xue et al., 2011).

- Vía apoplástica: La endodermis suele presentar discontinuidades en zonas como el ápice de la raíz o el inicio de raíces secundarias, que son aprovechadas para la entrada de Na^+ a través de la vía apoplástica. Este mecanismo es particularmente relevante en algunas especies como el arroz (Yeo et al., 1987; Yadav et al., 1996), mientras en el resto la entrada de iones en el periciclo de la raíz se produce mayoritariamente por la vía simplástica. En plantas de arroz, la tolerancia a Na^+ es independiente de Ca^{2+} y se ha observado una correlación entre toma de Na^+ y flujo apoplástico (Yadav et al., 1996; Yeo et al., 1999). Estos datos sugieren que en arroz la principal ruta de entrada de Na^+ no es a través de la vía simplástica, sino de discontinuidades en la endodermis en ápices radiculares o puntos de emergencia de raíces secundarias. La contribución de esta vía de entrada de Na^+ varía mucho en función de las especies, por ejemplo en trigo, la entrada de Na^+ a través de la vía apoplástica es diez veces menor que en arroz (García et al., 1997). En *Arabidopsis*, la contribución de cada una de estas tres vías a la toma de Na^+ es similar, cuando se cultivaron en medios con bajas concentraciones de Ca^{2+} (Essah et al., 2003).

5.1.2. Acumulación de Na^+ en la vacuola

La compartimentación del exceso de Na^+ en las vacuolas es un mecanismo adaptativo de vital importancia en la tolerancia de las plantas al estrés salino, siendo una manera eficaz de evitar los efectos tóxicos de la presencia de Na^+ en el citosol. Además de evitar la toxicidad, la compartimentación en la vacuola permite su ajuste osmótico, facilitando la toma de agua (Hasegawa et al., 2000; Blumwald, 2000). El transporte de Na^+ a la vacuola se lleva a cabo mediante antiportadores vacuolares Na^+/H^+ . La energía necesaria para el transporte de Na^+ a través del tonoplasto proviene del gradiente electroquímico de protones generado por la H^+ -ATPasa (V-ATPasa) y la H^+ -pirofosfatasa (V-PPasa) (Lüttge y Ratajczak, 1997; Blumwald, 2000; Gupta y Huang, 2014). La compartimentación de Na^+ en la vacuola tiene lugar en todos

los tejidos de la planta y constituye un mecanismo esencial para el ajuste osmótico y para evitar la toxicidad iónica en el citosol.

El primer intercambiador cation/ H^+ vacuolar de plantas identificado fue AtNHX1 (Gaxiola et al., 1999). Los transportadores de la familia NHX se pueden clasificar en dos grupos: los de clase I (AtNHX1-4) se localizan en la vacuola y catalizan intercambio Na^+/H^+ y K^+/H^+ con la misma afinidad, mientras que los de clase II (AtNHX5 y 6) son endosomales y muestran preferencia por el K^+ (Yokoi et al., 2002; Venema et al., 2003; Pardo et al., 2006; Jiang et al., 2010; Bassil et al., 2011a). Varios estudios indican que la sobreexpresión constitutiva de los transportadores vacuolares aumenta la halotolerancia de varias especies vegetales, como es el caso del antiportador AtNHX1 de *Arabidopsis*, cuya sobreexpresión constitutiva aumenta considerablemente la tolerancia a salinidad en levadura (Aharon et al., 2003), en *Arabidopsis* (Apse et al., 1999), en tomate (Zhang y Blumwald, 2001), en *Brassica napus* (Zhang et al., 2001) y en algodón (He et al., 2005), además de un aumento en el contenido de Na^+ en sus tejidos (Apse et al., 1999; Zhang y Blumwald, 2001; Zhang et al., 2001; Agarwal et al., 2013). Por otro lado, el mutante *atnhx1* de *Arabidopsis* mostró una mayor sensibilidad a Na^+ y una actividad antiportadora Na^+/H^+ en la vacuola significativamente menor (Apse et al., 2003). Estas observaciones, junto con el hecho de que la expresión de AtNHX1 en el sistema de expresión heteróloga de levadura suprimió el fenotipo de sensibilidad a Na^+ y Li^+ de la cepa mutante *nhx1* (Gaxiola et al., 1999; Quintero et al., 2000), sugirieron inicialmente un papel de las proteínas NHX en la compartimentación vacuolar de Na^+ en plantas sometidas a condiciones de estrés salino. Sin embargo, las medidas de los contenidos iónicos no mostraron una correlación definitiva entre la mayor tolerancia a salinidad y una mayor acumulación de Na^+ en la vacuola (Pardo et al., 2006; Rodríguez-Rosales et al., 2008; Jiang et al., 2010). Diversos ensayos de transporte concluyeron que el transportador de *Arabidopsis* AtNHX1 cataliza los antiportes Na^+/H^+ y K^+/H^+ con la misma afinidad (Zhang y Blumwald, 2001; Venema et al., 2002; Hernández et al., 2009). Por otro lado, Leidi et al. (2010) determinaron que la sobreexpresión de AtNHX1 en plantas de tomate produjo plantas más tolerantes al estrés salino y con una mayor acumulación de K^+ en la vacuola, mientras que los contenidos de Na^+ permanecieron inalterados. Estos datos apuntan a que la función fisiológica de AtNHX1 sería el transporte de K^+ a la vacuola, estimulando de manera indirecta la absorción de K^+ por las raíces, los iones de K^+ pueden recircular entre el citoplasma y la vacuola, mientras que el Na^+ quedaría secuestrado en la vacuola (Jiang et al., 2010). También la sobreexpresión de LeNHX2 en plantas de tomate dio lugar a unas plantas más tolerantes a salinidad, con una mayor acumulación de K^+ pero no de Na^+ en sus tejidos, sugiriendo que el incremento de tolerancia podría estar determinado por una mejora en la homeostasis de K^+ (Huertas et al., 2013).

La selectividad de cationes de AtNHX1 parece estar regulada por su extremo C-terminal, a través de la unión con una proteína similar a la calmodulina, AtCaM15, la cual interacciona con el C-terminal de AtNHX1 de una manera dependiente de Ca^{2+} y de pH (Yamaguchi et al., 2005). La interacción con AtCaM15 disminuye la actividad transportadora de Na^+ de AtNHX1, mientras se mantiene la actividad de transporte de K^+ . Dado que, en

condiciones fisiológicas normales, la vacuola mantiene una alta concentración de Ca^{2+} y un pH ligeramente ácido, la interacción con AtCaM15 y AtNHX1 favorecería el intercambio K^+/H^+ . Sin embargo, bajo condiciones de estrés salino, que a menudo conlleva la alcalinización vacuolar (Okazaki et al., 1996; Gruwel et al., 2001), la disociación de AtCaM15 resultaría en un aumento de la actividad antiportadora Na^+/H^+ de AtNHX1 y la promoción de la compartimentación de Na^+ en las vacuolas (Yamaguchi et al., 2005).

La proteína AtNHX2 presenta una homología del 87,5% con AtNHX1, ambas muestran una expresión ubicua en la planta que se induce por estrés salino, estrés osmótico, KCl, y ABA. Se ha sugerido que debido a las similitudes entre ambas proteínas pudiera existir un solapamiento funcional (Quintero et al., 2000; Shi y Zhu, 2002; Yokoi et al., 2002b; Li et al., 2004; Bassil et al., 2011b; Barragán et al., 2012). En ausencia de estrés, los mutantes simples *nhx1* y *nhx2* no mostraban ningún fenotipo, mientras que a altas concentraciones salinas mostraron una ligera reducción de la germinación, menor acumulación de Na^+ en la parte aérea y mayor en la raíz, además mostraron hipersensibilidad a concentraciones extremas de K^+ . Estos resultados de nuevo sugieren la implicación de estas proteínas en la homeostasis de K^+ en la planta (Barragán et al., 2012). El doble mutante *nhx1 nhx2* mostró importantes defectos en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas, que parecen estar más relacionados con el papel de estos transportadores en la homeostasis de K^+ que en la homeostasis del Na^+ , ya que los mutantes *nhx1 nhx2* muestran una menor concentración de K^+ en las vacuolas que las plantas silvestres, además de un pH más ácido que éstas y una menor actividad transportadora K^+/H^+ en el tonoplasto y un mayor contenido de K^+ en el citosol, donde se acumuló al no poder ser importado a la vacuola, además se observó la presencia de estomas aberrantes (Bassil et al., 2011; Barragan et al., 2012; Andrés et al 2014).

En cuanto a otros transportadores NHXs que se localizan en el tonoplasto, se observó que los mutantes *nhx3* presentaron un menor crecimiento ante medios deficientes en K^+ y una menor acumulación de este catión así como concentraciones más elevadas de Na^+ en comparación con las plantas silvestres (Liu et al., 2010). Mientras que en condiciones de estrés salino, la sobreexpresión de NHX3 produjo plantas con una mayor capacidad antiportadora K^+/H^+ y mejor germinación y crecimiento. Por otro lado, los mutantes de pérdida de función *nhx4* muestran una mayor tolerancia a altas concentraciones de Na^+ y una menor acumulación de este catión, además, la expresión de NHX4 en *E. coli* aumenta su sensibilidad a Na^+ , efecto que se hace más patente cuando se utiliza la proteína truncada en su extremo C-terminal, que parece actuar como un dominio regulador. Estos resultados sugieren la importancia de estas proteínas en la regulación de la homeostasis de K^+ y Na^+ respectivamente (Wang et al., 2007; Li et al., 2009; Liu et al., 2010).

Hasta la fecha, no se ha identificado ningún transportador vacuolar específico para Na^+ ; por lo que aún se desconoce la proteína responsable de la acumulación de este catión en dicho compartimento. Además de la existencia de un transportador vacuolar específico, conviene considerar la posibilidad de que la carga de Na^+ a la vacuola esté mediada por procesos de

pinocitosis, en el que vesículas derivadas de la membrana plasmática, cargadas de Na^+ , terminen fusionándose a la vacuola, liberando el catión en el lumen (Balnokin et al., 2007).

Debido a que la sal más abundante presente en el suelo está en forma de NaCl , la mayoría de los estudios se basan en el transporte y compartimentación de Na^+ , pero también la compartimentación de los iones de Cl^- es un factor clave para la tolerancia a salinidad, ya que concentraciones elevadas de este anión en el citosol pueden ser perjudiciales, especialmente en determinados cultivos como los cítricos (Xu et al., 1999). Los aniones de Cl^- llegan a la vacuola a través de canales iónicos y se han detectado varios canales de aniones dependientes de voltaje pertenecientes a la familia CLC en el tonoplasto de varias especies vegetales. Diédhiou y Gollack (2006) observaron una regulación coordinada en la homeostasis de aniones y cationes en plantas de arroz sometidas a estrés salino y sugirieron que OsCLC está relacionado con el ajuste osmótico en condiciones de alta salinidad. Diversos estudios sugieren que los canales aniónicos de tipo CLC son importantes mediadores de la compartimentación de Cl^- en la vacuola.

5.1.3. Expulsión y transporte de Na^+ a larga distancia

Una vez que el Na^+ es absorbido, debe ser excluido del citosol para evitar su toxicidad. En células maduras, el exceso de Na^+ que se acumula en el citoplasma de las células se elimina por extrusión o mediante compartimentación vacuolar, ambos mecanismos se coordinan para que la entrada de Na^+ no supere la capacidad de almacenamiento. Las células meristemáticas carecen de un sistema vacuolar desarrollado, por lo que para ellas el mecanismo más eficiente de exclusión del Na^+ es la extrusión. El flujo de Na^+ hacia el exterior a través de la membrana plasmática de las células de la raíz es un mecanismo del que aún se desconocen muchos detalles, no obstante, este mecanismo se ha considerado hasta este momento como la principal vía para evitar la acumulación de Na^+ en el citosol de las células radiculares (Britto y Kronzucker, 2015). Sin embargo, la literatura muestra datos contradictorios en cuanto a la idea de que una alta tasa de extrusión se relaciona con plantas más tolerantes a salinidad. Por ejemplo, las plantas halófitas no muestran una mayor tasa de extrusión de Na^+ que las plantas glicófitas (Britto y Kronzucker, 2015), mientras que algunos autores sugieren que la sensibilidad al estrés salino del maíz está relacionada con su capacidad de extrusión de Na^+ desde la raíz (Schubert y Läuchli, 1986).

La extrusión del Na^+ desde una célula podría afectar a las células adyacentes, por lo que para evitar los efectos tóxicos su distribución por la planta debe llevarse a cabo de una forma coordinada a través del xilema y el floema (Tester y Davenport, 2003). En condiciones fisiológicas, el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática establece que el influjo de este ión es pasivo y no precisa energía, en cambio, su eflujo se realiza en contra de dicho gradiente y por consiguiente requiere un gasto de energía. Las plantas vasculares, a diferencia de los hongos y plantas no vasculares, carecen de ATP asas de Na^+ (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003), por lo que la extrusión de Na^+ del citosol se alcanza

mediante la actividad de antiportadores Na^+/H^+ de la membrana plasmática, que actúan expulsando el exceso de Na^+ citosólico de manera acoplada a la disipación del gradiente de protones generado por las H^+ -ATPasas de la membrana plasmática. Basado en ensayos de transporte, en su patrón de expresión y en el fenotipo de los mutantes de pérdida de función, se ha identificado al antiportador Na^+/H^+ SOS1 como la principal proteína implicada en el eflujo de Na^+ (Wu et al., 1996; Zhu et al., 1998; Liu y Zhu, 1998; Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002; Shi et al., 2002; Qiu et al., 2003). Se ha determinado que SOS1 desarrolla un papel fundamental en la extrusión de Na^+ en el ápice radical, debido a que las células epidérmicas no están diferenciadas y carecen de un sistema vacuolar maduro que les permita acumular el exceso de Na^+ , la extrusión de este catión resulta de vital importancia para la planta (Shi et al., 2002). Además de la expresión de SOS1 en las células del ápice radical, la fusión con el gen reportero *GUS* también reveló su expresión en las células del parénquima que rodean al xilema en raíces y tallos, lo que sugiere su participación en el transporte de Na^+ a larga distancia. Ante condiciones de salinidad moderada y baja transpiración, SOS1 actúa cargando Na^+ en el xilema para su translocación al tallo y el almacenamiento en células de mesófilo foliar (Ding y Zhu, 1997). Sin embargo, frente a un estrés salino severo (100 mM de NaCl), se observó que el contenido de Na^+ en el xilema de plantas silvestre era menor que en plantas mutantes *sos1* (Shi et al., 2002), por lo que en estas condiciones de alto estrés, SOS1 funcionaría de un modo aparentemente contradictorio evitando que el Na^+ se acumulase rápidamente en el tallo excediendo la capacidad de las células del mesófilo para compartimentalizar iones en las vacuolas.

Por otro lado, se ha demostrado que el transportador HKT1 participa en la descarga de Na^+ desde xilema hacia las células del parénquima, esta acción podría coordinarse con la carga de este catión en el xilema por SOS1, estableciendo un modelo más completo en el que las proteínas SOS1 y HKT1 coordinarían sus flujos de carga y descarga de Na^+ en el xilema para regular su homeostasis en la planta (Rus et al., 2001; Berthomieu et al., 2003; Sunarpi et al., 2005; Pardo et al., 2006; Davenport et al., 2007; Olías et al., 2009). Se ha establecido un modelo en el que los ortólogos en tomate de SOS1 y HKT1 parecen coordinar sus funciones de manera que el Na^+ que entra en la raíz es cargado al xilema por SISOS1 y a continuación, el ortólogo de HKT1 se encargaría de su descarga en el tallo, evitando así la acumulación de Na^+ en los tejidos más sensibles. Al mismo tiempo, SOS1 podría contribuir a la exclusión de Na^+ del citosol de las hojas jóvenes hacia el apoplasto de la hoja, evitando la acumulación de Na^+ intracelular en células que carecen de un sistema vacuolar bien desarrollado, mientras que HKT1 podría actuar descargando el Na^+ en hojas maduras, con un buen sistema vacuolar donde se puede acumular el exceso de Na^+ . Las acciones coordinadas de estos transportadores determinarían, en última instancia, la cantidad de Na^+ que se acumula en las raíces, que se retiene en el tallo o se transfiere a las hojas (Olías et al., 2009).

Se ha sugerido que la sobreacumulación de Na^+ observada en las células parenquimáticas del xilema de plantas de *Eutrema salsuginea* donde se suprimió la expresión de SOS1 (Oh et al., 2009), podría interferir con la toma de K^+ en el xilema para su translocación

al tallo, lo que explicaría el fenotipo de falta de crecimiento del mutante *sos1* en bajo K^+ (Wu et al., 1996).

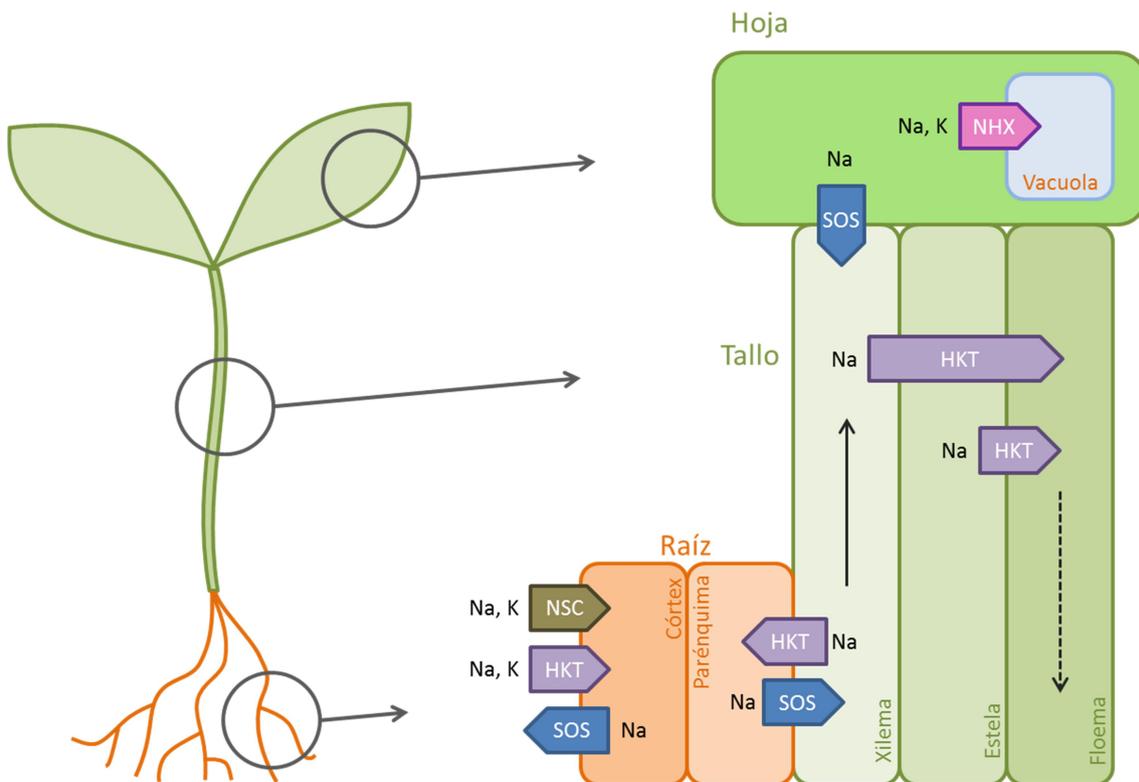


Figura I.3. Esquema del modelo de transporte de Na^+ en plantas. El sodio entra en la planta a través de los canales de cationes no selectivos (NSC) y otros transportadores de cationes. Parte del sodio se excluye mediante el antiportador Na^+/H^+ SOS1 hacia la superficie de las raíces, mientras que en las células parenquimáticas del xilema este antiportador funciona cargado el Na^+ en el xilema, donde el transportador HKT1 actúa de manera contraria descargando el Na^+ del xilema para evitar su sobreacumulación en los tejidos fotosintéticos. Esta actuación coordinada de SOS1 y HKT1 resulta fundamental para mantener una distribución adecuada del Na^+ en la planta. El Na^+ del xilema puede volver a la raíz mediante su difusión o transporte al floema. Además el Na^+ se puede acumular en la vacuola (Pardo, 2010).

6. Sistema SOS

6.1. El antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1: Filogenia y características

La proteína SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*) pertenece a la subfamilia NhaP de antiportadores Na^+/H^+ , un subgrupo de la familia de antiportadores de cationes CPA1 (Saier, 2000). Inicialmente se incluyó a SOS1 en la subfamilia NHX/NHE de antiportadores Na^+/H^+ con el nombre de NHX7, debido a las similitudes que presenta con esta familia de transportadores

(Mäser et al., 2001), pero más tarde, un estudio filogenético más extenso con proteínas NhaP de varios organismos aumentó la sensibilidad del estudio y pudieron definirse dos clados claramente diferenciados: el que incluye a NhaP/SOS1 y la subfamilia NHX/NHE (Brett et al., 2005). Por lo que se propuso no aplicar el nombre NHX7 a SOS1 (Pardo et al., 2006). La subfamilia NhaP/SOS1 está presente en bacterias, protozoos y plantas, pero no en animales (Brett et al., 2005). Las proteínas de esta familia poseen una región aminoterminal transmembrana seguida por una larga cola carboxiterminal hidrofílica (Pardo et al., 2006), que en el caso de los homólogos NhaP eucarióticos es extremadamente larga, con más de 600 residuos. A diferencia de las proteínas NHX, localizadas principalmente en las membranas intracelulares (Pardo et al., 2006), la proteína SOS1 se localiza en la membrana plasmática (Quintero et al., 2002; Shi et al., 2002). El patrón de expresión de SOS1 se ha analizado mediante la fusión de su promotor al gen reportero *GUS*, este estudio reveló la expresión de SOS1 en los tejidos internos que rodean al sistema vascular de toda la planta. En la raíz, se detectó expresión principalmente en el periciclo y en las células del parénquima situadas alrededor de los vasos del xilema. También se detectó la expresión de SOS1 en células epidérmicas de los ápices radicales (Shi et al., 2002). SOS1 codifica un antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática que desempeña un papel crítico en la extrusión de sodio y en el control del transporte de Na^+ a larga distancia desde la raíz hasta la parte aérea (Shi et al., 2000, 2002).

Se han identificado homólogos de SOS1 en los genomas de especies vegetales como arroz (Martinez-Atienza et al., 2007), *Populus euphratica* (Wu et al., 2007), trigo blando (Xu et al., 2008), tomate (Olías et al., 2009) *Eutrema salsuginea* (Oh et al., 2009), trigo duro (Feki et al., 2011) y *Chrysanthemum crassum* (Song et al., 2012) y todo indica que esta familia de transportadores está ampliamente distribuida en el reino vegetal. En el genoma de *Arabidopsis* también se identificó el gen *NHX8*, que codifica un transportador que muestra una gran similitud con SOS1, presentando una identidad de aproximadamente el 88% de la región hidrofóbica, sin embargo, la proteína NHX8 presenta un extremo carboxiterminal 400 aminoácidos más corto que el de SOS1. NHX8 es un antiportador Li^+/H^+ localizado en la membrana plasmática que no transporta otros cationes monovalentes como Na^+ , K^+ o Cs^+ . Esta proteína se expresa principalmente en el tejido vascular de las hojas y en los pelos radicales, siendo su expresión constitutiva y no inducida por estrés, ni por altas concentraciones de Li^+ (An et al., 2007).

La búsqueda en bases de datos reveló grandes similitudes de SOS1 con antiportadores Na^+/H^+ de animales y microbianos (Shi et al., 2000). La familia de genes *NHE* (*Na^+/H^+ Exchangers*) se ha conservado evolutivamente y se han identificado genes que codifican para NHEs en toda clase de organismos vivos, tanto procariontes como eucariotes (Counillon y Pouysse, 2000; Putney et al., 2002). En mamíferos, esta familia incluye diez isoformas (NHE1-NHE10) que funcionan como intercambiadores electroneutros de H^+ intracelular por Na^+ extracelular. Todas las isoformas de NHE comparten una topología similar: un N-terminal formado por 12 α -hélices transmembrana que llevan a cabo el intercambio iónico, y un dominio

C-terminal citoplásmico que regula la actividad transportadora del dominio transmembrana. NHE1 ha sido la isoforma estudiada de forma más extensa, se localiza en la membrana plasmática de las células animales donde desempeña un papel crítico en procesos vitales que dependen del intercambio iónico a través de la membrana tales como homeostasis, regulación del pH intracelular, volumen, adhesión, determinación de la forma, migración y proliferación celular (Putney et al., 2002). Las señales extracelulares, mediadas por diversas clases de receptores de la superficie celular, regulan la actividad NHE1 a través de distintas redes de señalización que convergen para modificar directamente el dominio regulador C-terminal. Las modificaciones en el extremo carboxilo, como la fosforilación o la unión a proteínas reguladoras controlan la actividad transportadora de NHE1 (Putney et al., 2002). Es importante destacar que esta regulación de NHE1 es atribuible a un cambio en la afinidad por H^+ intracelular (Ammar et al., 2006). NHE1 desempeña un importante papel en respuesta a las condiciones fisiológicas del estrés que, además de la contracción celular y la acidificación, incluyen hipoxia y estímulos mecánicos, tales como el alargamiento celular (Vallés et al., 2015). Se sabe que NHE1 se activa rápidamente en respuesta a diversos estímulos extracelulares, como hormonas, factores de crecimiento y factores de estrés mecánicos (Wakabayashi et al., 1997; Orłowski y Grinstein, 2004). La gran cantidad de estudios existentes acerca de este antiportador y su similitud con SOS1, suponen una valiosa fuente de información a tener en cuenta en el estudio de la regulación de este transportador de plantas.

6.2. Funcionamiento y regulación del sistema SOS en el transporte de Na^+

El gen *SOS1* codifica una proteína de 127 kDa con 12 dominios transmembrana en el extremo aminoterminal y una larga cola hidrofílica (de aproximadamente 700 aminoácidos) localizada en el citoplasma en el extremo carboxiterminal. Tanto la cola como la región transmembrana son necesarias para la correcta función de SOS1 en la tolerancia a salinidad (Shi et al., 2000). La región carboxiterminal de muchos transportadores ha demostrado tener una función regulatoria (Putney et al., 2002), en este caso, la longitud de este fragmento sugiere una regulación bastante compleja. Análisis estructurales han revelado que AtSOS1 se une formando homodímeros (Núñez-Ramírez et al., 2012).

SOS1 es un antiportador Na^+/H^+ electroneutro que muestra poca afinidad por otros cationes monovalentes como Li^+ o K^+ (Qiu et al., 2002; Shi et al., 2002; Quintero et al., 2002; Qiu et al., 2003). La actividad antiportadora de SOS1 se detectó en vesículas de membrana plasmática aisladas de plantas de *Arabidopsis* sometidas a un tratamiento salino pero no en las plantas control, lo que indica que la actividad de SOS1 se induce por estrés salino (Qiu et al., 2002). Los mutantes *sos1* se identificaron en un rastreo de semillas mutagenizadas con etilmetanosulfonato (EMS) por mostrar hipersensibilidad a Na^+ . Estos mutantes también mostraron sensibilidad a Li^+ y una reducción del crecimiento en medios deficientes en K^+ (Wu et al., 1996).

La activación de SOS1 se produce mediante la activación directa de su función antiportadora Na^+/H^+ y a través de la estabilización de su transcrito (Halfter et al., 2000; Guo

et al., 2001; Qiu et al., 2002, Quintero et al., 2002; Shi et al., 2003; Guo et al., 2004; Chung et al., 2008). Diversos estudios mostraron que la sobreexpresión de SOS1 mejora la tolerancia a salinidad de las plantas (Shi et al., 2003; Yang et al., 2009), sin embargo, las plantas sobreexpresantes solo mostraron un aumento en el nivel de transcrito respecto a las plantas silvestres cuando se sometieron a estrés salino (Shi et al., 2003), estos resultados sugieren que la salinidad induce la estabilización postranscripcional del mRNA de SOS1. Se ha demostrado que la acumulación del transcrito de SOS1 también puede ser inducida mediante tratamientos con KCl, LiCl, ligeramente por ABA y sorbitol y estrés hídrico, mientras que no parece que se induzca por frío (Chung et al., 2008). El tratamiento con agentes que degradan o inhiben la producción de ROS, como dimetil tiourea, deferoxamina o yodonio de difenileno, redujo la estabilidad del mRNA de SOS1 durante el tratamiento salino, lo que sugiere que las ROS producidas ante condiciones de estrés salino favorecen la estabilización del transcrito de SOS1 (Chung et al., 2008).

La actividad transportadora de SOS1 está regulada mediante la interacción con el complejo formado por la proteína quinasa SOS2(CIPK24) y el sensor de Ca^{2+} SOS3(CBL4) (Qiu et al., 2002). Plantas de *Arabidopsis* mutantes de SOS2 y SOS3 muestran fenotipos de hipersensibilidad similares a los observados en los mutantes *sos1* cuando crecieron en medios con altas concentraciones de Na^+ o deficientes en K^+ , lo que sugiere su participación en una ruta común (Zhu, 2000).

SOS2(CIPK24) codifica una proteín-quinasa de serina y treonina de 51 kDa, cuyo dominio quinasa se encuentra en el extremo aminoterminal y muestra gran similitud con el de la proteína quinasa de levadura SNF1 y con las quinasas dependientes de AMP de mamíferos (Liu et al., 2000). Su dominio aminoterminal se encuentra bloqueado mediante la interacción con el dominio regulador carboxiterminal, que alberga un dominio autoinhibitorio de 21 aminoácidos (denominado dominio FISL o NAF). El estrés salino provoca un aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico que es detectado por el sensor SOS3. Los datos obtenidos de la cristalización de SOS3 muestran que, tras la unión a Ca^{2+} , SOS3 experimenta un proceso de dimerización que modifica la conformación superficial de la proteína quedando expuesta una zona hidrofóbica que facilitaría la interacción con SOS2 (Sánchez-Barrena et al., 2005). La presencia de Ca^{2+} es un requisito necesario para la unión de SOS3 al dominio FISL de SOS2, liberándolo así de su autoinhibición para posteriormente dirigirlo a la membrana plasmática, donde actúa activando la función antiportadora Na^+/H^+ de SOS1 (Halfter et al., 2000; Guo et al., 2001; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002; Guo et al., 2004). SOS2 activa a SOS1 a través de la fosforilación de la serina localizada en la posición 1138, además esta fosforilación requiere la presencia del residuo de serina localizado en la posición 1136, que también podría ser fosforilada o simplemente puede ser necesaria para el reconocimiento de SOS1 como sustrato por parte de la quinasa SOS2. SOS1 contiene un dominio autoinhibitorio en su extremo carboxiterminal que comprende los aminoácidos 1005 y 1047, cuya delección produce una proteína hiperactiva e independiente de la interacción con el complejo SOS2/SOS3 (Quintero et al., 2011). Justo antes de esta región, entre los aminoácidos 742-998, se encuentra un

posible dominio de unión a nucleótidos cíclicos. Estudios en levadura sugieren la existencia de una interacción de este dominio con el extremo C-terminal que mantiene a SOS1 en un estado inactivo, del que se libera mediante la fosforilación por SOS2 (Quintero et al., 2011).

La delección del dominio FISL de SOS2 resulta en una quinasa constitutivamente activa e independiente de SOS3, al igual que la mutación a ácido aspártico (que mimetiza la fosforilación) de la treonina localizada en la posición 168, siendo ambos efectos aditivos (Guo et al., 2001, 2004). También se ha identificado a la serina 223, como un punto de autofosforilación determinante para la tolerancia a salinidad proporcionada por SOS2 (Fujii y Zhu, 2009). Entre los aminoácidos 333 y 369 situados en el extremo carboxiterminal de SOS2 se encuentra el dominio PPI de unión a fosfatasa del tipo 2C, tales como ABI1 y ABI2. Se ha demostrado que la fosfatasa ABI2 interacciona con CIPK24 (Ohta et al., 2003) y se han identificado dos residuos que se encuentran muy conservados en los dominios PPI de todas las CIPKs, la arginina 340 y la fenilalanina 341, la mutación de uno o ambos residuos suprime la interacción SOS2/ABI2. El mutante *abi2* muestra un fenotipo tolerante a NaCl que sugiere que la fosfatasa ABI2 puede actuar como un regulador negativo de CIPK24 en la ruta SOS (Ohta et al., 2003). La cristalización de la estructura del complejo Ca^{2+} -SOS3 con el dominio regulador de CIPK24/SOS2 ha revelado datos importantes respecto al mecanismo de activación de las CIPKs y la doble función de CIPK24 como quinasa y como proteína de unión con fosfatasas (Sánchez-Barrena et al., 2013). La estructura muestra que la unión del dominio autoinhibitorio FISL de SOS2 a SOS3 deja inaccesible el dominio quinasa, lo que demuestra que las interacciones SOS2/SOS3 y SOS2/ABI2 son mutuamente excluyentes, por lo que la actividad quinasa de SOS2 no puede llevarse a cabo junto con su actividad fosfatasa (Sánchez-Barrena et al., 2007a; Sánchez-Barrena et al., 2007b). Sin embargo, parece que ni SOS2 actúa fosforilando a ABI2 ni ésta desfosforilando a SOS2 por lo que, debido a la proximidad del dominio PPI al dominio FISL de interacción con SOS3, se postuló que SOS3 podría regular tanto a SOS2 como a ABI2, de manera que la combinación de ambas quinasas podría actuar como un interruptor que controlaría la fosforilación y desfosforilación de los mismos sustratos (Ohta et al., 2003).

El gen SOS3(CBL4) codifica una proteína con 4 dominios de tipo “*EF-hand*” de unión a Ca^{2+} similares a la subunidad B reguladora de la fosfatasa calcineurina y a los sensores neuronales de Ca^{2+} en animales (Liu et al., 2000). Se ha determinado que la miristoilación de la glicina localizada en la segunda posición del extremo N-terminal de SOS3 es un requisito imprescindible para su función y para el direccionamiento del complejo SOS2/SOS3 a la membrana plasmática (Ishitani et al., 2000; Pardo et al., 2006). El mutante *sos3-1* se aisló por su sensibilidad a NaCl mediante un rastreo de semillas mutagenizadas con neutrones rápidos. Las plantas mutantes *sos3-1* mostraban déficit de crecimiento en medios pobres en K^+ y ricos en Na^+ , estos fenotipos de sensibilidad podían ser parcialmente suprimidos aumentando la concentración de Ca^{2+} en el medio (Liu y Zhu, 1998). La mutación *sos3-1* consiste en la delección de nueve nucleótidos que se traduce en la pérdida de tres aminoácidos conservados

en el tercer dominio “*EF-hand*”, afectando a la capacidad de unión a Ca^{2+} e impidiendo su interacción con la quinasa SOS2 (Liu y Zhu, 1998; Ishitani et al., 2000).

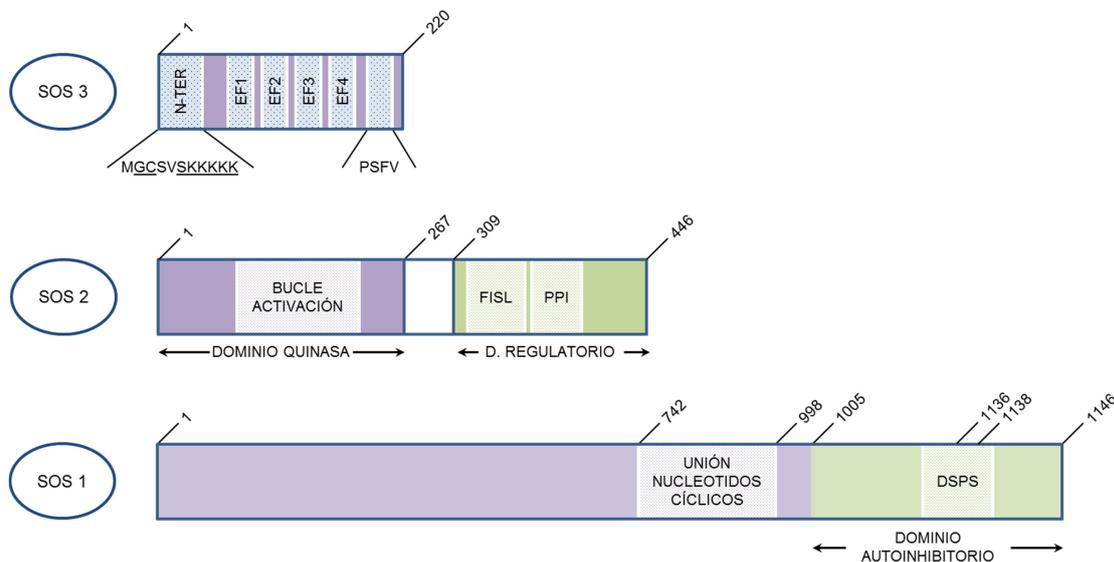


Figura I.4. Esquema de los dominios identificados en cada una de las proteínas de la ruta SOS (SOS1/SOS2/SOS3). En SOS3 se muestra el dominio N-terminal (MGCSVSKKKKK) donde se localiza la secuencia consenso para la miristoilación (Liu y Zhu, 1998) y un residuo de cisteína adyacente candidato para la palmitoilación, seguido por el dominio de polilisinas. En la región C-terminal, se señala la secuencia conservada PSFV, en cuyo residuo de serina se fosforila SOS3 por SOS2. En SOS2 se han señalado el dominio autoinhibitorio NAF/FISL, necesario para la unión con SOS3, y la secuencia PPI de unión a fosfatasa. En el extremo C-terminal de SOS1 se encuentra el dominio DSPS, la primera serina se corresponde con el residuo 1136 y la segunda serina con el residuo 1138, donde SOS2 fosforila a SOS1 activándolo.

Mientras que SOS1 y SOS2 muestran una expresión ubicua en la planta, SOS3 solo se expresa en raíz. Este hecho sugiere la existencia de otro sensor capaz de formar un complejo con SOS2 para activar a SOS1 en la membrana plasmática de las células de la parte aérea. Quan et al. (2007) determinaron que CBL10 interactúa con SOS2 y la formación de este complejo es capaz de activar la función antiportadora de SOS1. Al igual que la interacción SOS2/SOS3, la formación del complejo SOS2/CBL10 requiere la presencia de Ca^{2+} y la interacción se produce a través del dominio FISL de SOS2, además, la fosforilación por parte de SOS2 de la serina que ocupa la posición 237 en CBL10 parece necesaria para la formación del complejo y para el direccionamiento del mismo a la membrana plasmática (Quan et al., 2007; Lin et al., 2009). Los mutantes en la proteína CBL10 de *Arabidopsis* también mostraron sensibilidad a NaCl, observándose un efecto aditivo en el doble mutante *sos3 cbl10*. Sin embargo, la expresión de SOS3 no complementó el fenotipo de sensibilidad a Na^+ del mutante *cbl10* y la sobreexpresión de *CBL10* sólo suprimió parcialmente el fenotipo de los mutantes

sos3-1. Estos resultados sugieren que las funciones de SOS3 y CBL10 solo solapan parcialmente y no pueden ser sustituidos uno por otro en sus funciones (Quan et al., 2007).

De esta manera, se establece un modelo en el que la función antiportadora Na^+/H^+ de SOS1 se activaría mediante el complejo SOS2/SOS3 en la raíz mientras que, de manera similar, la activación de SOS1 en la parte aérea estaría regulada por SOS2/CBL10.

6.3. Otras funciones de los genes SOS en la homeostasis iónica

Parece que la actividad inducida por Na^+ de SOS1 no depende únicamente del complejo SOS3/SOS2 (Shabala et al., 2005), de hecho, SOS1 es un objetivo de la ruta de señalización de la fosfolipasa D (PLD) involucrada en la detección de iones y en la homeostasis bajo condiciones de estrés salino (Yu et al., 2010). La exposición a altas concentraciones de sal provoca un aumento de la actividad enzimática de PLD α 1 en *Arabidopsis*, dando como resultado una acumulación rápida y transitoria de ácido fosfatídico (PA), un lípido que actúa como segundo mensajero activando a su vez a la quinasa MPK6, que puede fosforilar directamente a SOS1. La pérdida de función de los mutantes de PLD α 1 y MPK6 provoca la acumulación de Na^+ en la parte aérea y un aumento de la sensibilidad al estrés salino. Aunque la ruta de señalización de PLD media la exclusión de iones y el mantenimiento homeostático a través de SOS1, parece funcionar de manera paralela al complejo SOS3/SOS2 (Yu et al., 2010). Estos datos muestran que los mecanismos reguladores del flujo de Na^+ y la homeostasis iónica parecen ser mucho más sofisticados de lo que conocíamos hasta ahora y parece que la ruta lineal SOS3/SOS2/SOS1 no es el único proceso regulador de la exclusión de Na^+ en la célula.

Varias líneas de investigación sugieren que SOS2, también regula la actividad intercambiadora Na^+/H^+ en el tonoplasto. Se ha demostrado que SOS2 interactúa y modula la actividad de proteínas localizadas en el tonoplasto como el antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ CAX1 y la H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa), lo que indica que SOS2 desempeña un papel central como regulador del transporte vacuolar (Cheng et al., 2004; Batelli et al., 2007). Ensayos de transporte en vesículas de tonoplasto de *Arabidopsis* han demostrado que la actividad de intercambio Na^+/H^+ se reduce considerablemente en los mutantes *sos2*, activándose este intercambio mediante la adición de la proteína SOS2 activada, lo que demuestra la implicación de la ruta SOS en el transporte Na^+/H^+ en el tonoplasto (Qiu et al., 2004). Estos resultados se han confirmado recientemente en tomate. Plantas transgénicas que sobreexpresan el homólogo en tomate de SOS2 muestran una mayor actividad antiportadora Na^+/H^+ y K^+/H^+ en la raíz, así como una mayor expresión de LeNHX2 y LeNHX4, lo que sugiere que la regulación de la actividad de NHX por los genes SOS puede ser un mecanismo conservado (Huertas et al., 2012).

Un estudio reciente ha demostrado que la proteína Gigantea (GI), que actúa como “interruptor” del reloj circadiano y la ruta fotoperiódica, es un regulador negativo de la ruta SOS. GI interacciona físicamente con SOS2 secuestrándolo y evitando así la activación de SOS1 en ausencia de estrés (Kim et al., 2013).

6.4. Sobreexpresión de los genes SOS en la mejora de la tolerancia a salinidad

Una de las principales estrategias para mejorar la tolerancia a la sal de las plantas es la sobreexpresión de genes que son inducidos por el estrés salino y/o han demostrado estar relacionados con la tolerancia de las plantas. Como se ha comentado anteriormente, la sobreexpresión en plantas de genes implicados en la síntesis o acumulación de osmolitos, de enzimas relacionadas con la protección oxidativa o de genes que participan en rutas de señalización (como factores de transcripción o proteínas quinasas), produjeron una mejora de su tolerancia a salinidad. Pero es la regulación de la homeostasis iónica el mecanismo más importante de la planta para aumentar la tolerancia a salinidad. Se ha descrito que la sobreexpresión de varios genes que regulan la homeostasis iónica, como *SOS1* (Shi et al., 2003), *AtNHX1* (Apse et al., 1999; Zhang et al., 2001) y *AVP1* (Gaxiola et al., 2001) producen una mejora de la halotolerancia, aunque a menudo los resultados obtenidos en estos trabajos son contradictorios. En *Arabidopsis*, la homeostasis iónica está regulada principalmente por la ruta SOS. Como sabemos, SOS1 es activado por el complejo SOS2/SOS3, pero también se ha demostrado que la actividad de AtNHX1 puede ser controlada por la ruta SOS (Qiu et al., 2004).

La coexpresión de los tres genes que conforman la ruta SOS de plantas en una cepa de levadura carente de los transportadores de Na⁺ endógenos suprime su fenotipo de halosensibilidad hasta un nivel muy superior al alcanzado mediante la expresión de SOS1 solo. Por su parte, SOS2 activa solo parcialmente a SOS1 mientras que SOS3 es incapaz de activar la función transportadora de SOS1 por sí solo (Quintero et al., 2002). Dado que la coexpresión de los genes *SOS1/SOS2/SOS3* mejoró sustancialmente la tolerancia a NaCl en levadura y que la proteína SOS1 truncada en el dominio autoinhibitorio de su extremo C-terminal produce una proteína hiperactiva, cuya expresión es capaz de conferir un nivel de tolerancia similar a la levadura que expresa los tres genes SOS, se sugirió que únicamente la activación de la actividad transportadora de SOS1 parece necesaria para aumentar la tolerancia a salinidad en levadura (Quintero et al., 2002). Sin embargo, no se observó un aumento significativo en la tolerancia a salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban SOS1, SOS2 y SOS3 en comparación con las plantas que solo sobreexpresan SOS1 o SOS3 (Yang et al., 2009). Según este resultado, la activación *in planta* de SOS1 mediante la sobreexpresión de SOS2 y SOS3 parece insuficiente para producir una fuerte tolerancia a salinidad en *Arabidopsis*.

Las plantas transgénicas que sobreexpresan solamente SOS3 mostraron una mejora de la tolerancia a NaCl, esta mayor tolerancia podría deberse a la regulación de otros elementos aguas arriba en la ruta SOS (Yang et al., 2009). Sin embargo, no se pueden descartar funciones adicionales de SOS3 que podrían ser independientes de sus funciones conocidas en la ruta SOS. Además, la cantidad de elementos reguladores identificados en la secuencia de la proteína SOS3 también sugieren una regulación compleja y su participación en procesos diversos. Esto hecho nos lleva a la necesidad del estudio en profundidad del sensor

de Ca^{2+} SOS3, para determinar la existencia de otros posibles mecanismos implicados en su papel en la regulación del transporte de Na^+ .

En este sentido, es posible que la tolerancia a salinidad a nivel de la planta completa necesite otros mecanismos o elementos no identificados hasta el momento que cooperen con los genes SOS en la respuesta al estrés salino.

6.5. Otras funciones de las proteínas SOS en la tolerancia a estrés salino: Su papel en el desarrollo radicular

La plasticidad en el desarrollo postembrionario de raíces bajo condiciones adversas parece ser un mecanismo de tolerancia a salinidad, capaz de controlar tanto la emergencia como el crecimiento de raíces laterales (Huh et al., 2002; Zolla et al., 2010). Los niveles de salinidad en el suelo son altamente variables, por lo que las plantas han desarrollado un mecanismo mediante el cual pueden regular la dirección de crecimiento de las raíces con el fin de evitar el daño producido por la sal (Li y Zhang, 2008; Sun et al., 2008). Este tropismo de evitación se logra interrumpiendo el gravitropismo y modificando la distribución de auxinas en las raíces. En un ambiente salino uniforme, las raíces de las plantas han desarrollado estrategias alternativas de protección, como la reducción en el número y longitud de los pelos radiculares, lo que supone una menor superficie expuesta al Na^+ externo.

El papel de la ruta SOS en la regulación del desarrollo de las raíces durante la adaptación al estrés salino ha sido estudiado en diversos trabajos. El estudio de Sun et al. (2008) mostró que en los mutantes *sos* sometidos a estrés salino, tanto la percepción de la señal gravitropica como la distribución de auxinas en las raíces se encuentran alterados. La pérdida de función de los genes SOS resultó en el fracaso de la rápida degradación de amiloplastos en las células de la columela y un crecimiento gravitropico negativo en respuesta al estrés salino (Sun et al., 2008). Además, se observaron defectos en el desarrollo en los pelos radiculares en mutantes individuales de los genes SOS (Wang et al., 2008).

Sabemos que la modificación de la arquitectura del sistema radicular es una forma importante de minimizar los efectos negativos del estrés abiótico en las plantas. La remodelación de la distribución de las raíces en el suelo permite a las plantas optimizar la absorción de agua y nutrientes (Benjamin y Nielsen, 2006; de Dorlodot et al., 2007; Postma y Lynch, 2011). En respuesta a estrés salino, se inhibe la elongación de la raíz primaria mientras que el efecto sobre la formación de raíces laterales parece variar dependiendo de la intensidad del estrés, concentraciones altas de NaCl inhiben la formación de raíces laterales mientras que concentraciones más bajas de sal estimulan su proliferación de una forma dependiente de auxinas (Wang et al., 2009; Zolla et al., 2010). Un estudio reciente reveló el papel de la ruta SOS en el desarrollo de las raíces laterales y en la arquitectura del sistema radicular bajo un estrés salino leve, mostrando el papel de SOS3 como regulador positivo del desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis* bajo estrés salino leve (Zhao et al., 2011b). La pérdida de función de SOS3 produjo una reducción de aproximadamente 50% en la activación de los primordios de las raíces laterales, mientras que se eliminó por completo la emergencia de

raíces laterales, lo que sugiere que SOS3 es crítico para la activación de los primordios laterales de la raíz y requerido para la emergencia de raíces laterales bajo estrés salino. Análisis moleculares y fisiológicos revelaron que SOS3 es necesario para la biosíntesis y el transporte polar de auxinas hacia las raíces estresadas así como para la formación y mantenimiento de un gradiente de auxinas. Los hallazgos descritos anteriormente han descubierto una nueva función de SOS3 más allá de su papel en la regulación de la actividad de SOS1 y, por tanto, de la extrusión de Na^+ de la célula. Sin embargo, queda por determinar si la regulación del desarrollo de las raíces laterales por SOS3 requiere de la interacción con SOS2 y cómo SOS3 media la biosíntesis de auxinas y su patrón de distribución en primordios y raíces emergentes en respuesta al estrés salino leve.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El mantenimiento de una correcta homeostasis iónica es crucial para la adaptación de las plantas a ambiente salino. La ruta SOS (SOS1/SOS2/SOS3) juega un papel esencial en este proceso. Se ha propuesto un modelo sencillo que sugiere que el sensor de Ca^{2+} SOS3 interacciona con la quinasa SOS2 y la dirige a la membrana plasmática donde fosforila al antiportador SOS1 activando el transporte de Na^+ (Halfter et al., 2000; Guo et al., 2001; Guo et al., 2004; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002). Sin embargo, hay evidencias que apuntan a que el funcionamiento de esta ruta debe ser más complejo. La sobreexpresión individual de los genes SOS o incluso de los tres genes conjuntamente no confiere una mejora significativa de la halotolerancia de las plantas (Yang et al., 2009), lo que indica que el aumento de los niveles de proteína SOS no es suficiente para mejorar la homeostasis iónica y por ende la tolerancia a Na^+ . Es posible que se requiera la participación de otros elementos no identificados hasta el momento o bien que las proteínas SOS están sometidas a procesos de regulación que son limitantes.

En este trabajo se ha querido profundizar en el conocimiento de las características funcionales y estructurales de SOS3, planteando los siguientes objetivos:

- Identificación y análisis de la posible interacción entre las proteínas SOS3 y SOS1 de *Arabidopsis thaliana* y sus consecuencias funcionales.
- Estudio del efecto de las modificaciones postraduccionales de SOS3 en su localización y función.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

M.1. Material biológico

M.1.1. Bacterias

M.1.1.1. Cepas de bacterias utilizadas

Escherichia coli

Para la propagación de plásmidos se usaron las siguientes cepas de *E. coli*:

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), 80 <i>lacZ</i> M15, <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>ara139</i> , (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (<i>StrR</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> >	Invitrogen™ Life Technologies
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (nal ^R), <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15], <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)	Stratagene™

Agrobacterium tumefaciens

Se usó *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de *Arabidopsis thaliana* y para los experimentos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
GV3101	Rif ^R , pMP90 (pTiC58DT-DNA)	(Koncz y Schell, 1986)
p19	pBin61-p35S:p19	(Voinnet et al., 2003)

M.1.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Escherichia coli

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó medio LB (*Lysogenic Broth*) suplementado con antibióticos para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, 100 mg/l de ampicilina o 50 mg/l de kanamicina. Las bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Medio LB:

Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
Bacto-triptona	1 % (p/v)
KCl	1 % (p/v)

Para preparar LB sólido se añadió 1.5% (p/v) de bacto-agar.

Para la preparación de células de *E. coli* competentes se usaron los medios SOB y SOC.

Medio SOB:

Bacto-triptona	2 % (p/v)
Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM

Medio SOC:

Bacto-triptona	2 % (p/v)
Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

Agrobacterium tumefaciens

Para el crecimiento de *Agrobacterium* se utilizó medio YEP suplementado con los correspondientes antibióticos, 50 mg/l de rifampicina, 20 mg/l de gentamicina y 50 mg/l de kanamicina o 25 mg/l de higromicina. Las bacterias se incubaron durante 48 horas a 30 °C.

Medio YEP:

Extracto de levadura	1 % (p/v)
Bacto peptona	1 % (p/v)
KCl	0.5 % (p/v)

Para preparar YEP sólido se añadió 1.5% (p/v) de bacto-agar.

M.1.2. Levaduras

M.1.2.1. Cepas de levaduras utilizadas

Saccharomyces cerevisiae:

Nombre de la cepa	Genotipo
AXT3K	$\Delta ena1::HIS3::ena4$, $\Delta nha1::LEU2$, $\Delta nhx1::KanMX4$; (Quintero et al., 2002). Deriva de la estirpe silvestre W303-1B ($MAT\alpha$ <i>ura3-1 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>).
ANT5	$MAT\alpha$ <i>ura3-1 leu 2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, nha1, ena1-4::loxP, nha::hisG</i> . Deriva de la estirpe AXT3K.
YP890	$MAT\alpha$ $\Delta ena1::HIS3::ena4$, $nha1::LEU2$, $nhx1::KanMX$ <i>ura3-1 ade2-1 can1-100 CYC1::[PGK1:SOS1:CYC1]</i> . Deriva de la estirpe silvestre W303-1B.
Cdc25-2	$MAT\alpha$, <i>cdc25-2, ade2, his3, leu2, lys2, trp1, ura3</i> .
GRF167	$MAT\alpha$, <i>ura3, his3, GAL+</i>

Las estirpes AXT3K y ANT5 muestran un fenotipo severo de sensibilidad a NaCl ya que carecen de los principales transportadores endógenos de transporte de sodio: las ATPasas de Na^+ ENA1-4, el antiportador $Na^+(K^+)/H^+$ NHA1 de la membrana plasmática (Haro et al., 1991; Wieland et al., 1995; Bañuelos et al., 1998), y el antiportador endosomal $K^+(Na^+)/H^+$ NHX1 (Nass et al., 1997; Darley et al., 2000; Quintero et al., 2000), por lo que han resultado de gran utilidad para la caracterización funcional de los transportadores de Na^+ de plantas (Dreyer et al., 1999).

M.1.2.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Se siguieron las técnicas de manipulación y crecimiento de levaduras descritas por (Guthrie y Fink, 1991) y (Ausubel et al., 1994). Se incubaron a 30 °C, utilizándose medio YPD para su crecimiento rutinario.

Medio YPD:

Extracto de levadura	1 % (p/v)
Bacto peptona	2 % (p/v)
Glucosa	2 % (p/v)

Para preparar YPD sólido se añadió un 2 % (p/v) de bacto-agar.

Para el cultivo de levaduras en medio selectivo, se utilizó el medio mínimo YNB suplementado con los aminoácidos correspondientes para cada cepa.

Medio YNB:

YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) sin aminoácidos	0.17 % (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 % (p/v)
Glucosa	2 % (p/v)

Para preparar YNB sólido se añadió un 2 % (p/v) de bacto-agar y se ajustó al pH a 6.5 con KOH.

Para realizar los ensayos de tolerancia a Na⁺ se utilizó el medio libre de cationes alcalinos AP, descrito por (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984).

Medio AP:

H ₃ PO ₄	8 mM
L-arginina	10 mM
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0.2 mM

KCl	1 mM
Glucosa	2 % (p/v)
Oligoelementos	1 % (v/v)
Vitaminas	1 % (v/v)

El pH del medio se ajustó a 6.5 con L-arginina

Composición de la solución stock de oligoelementos (100x):

H ₃ BO ₃	50 mg/l
CuSO ₄	4 mg/l
KI	10 mg/l
FeCl ₃	20 mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	40 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	20 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg/l

Para evitar la contaminación de la solución stock de oligoelementos se añadieron varias gotas de cloroformo.

Composición de la solución stock de vitaminas:

Biotina	1ml (0.2 mg/ml en etanol)/100 ml
Niacina	4 mg/100ml
Piridoxina	4 mg/100ml
Tiamina	4 mg/100ml
Ácido pantoténico	4 mg/100ml

La solución de vitaminas se esterilizó mediante filtración.

Para realizar ensayos de tolerancia a salinidad, se añadió 1 mM de KCl y se suplementó con NaCl a las concentraciones indicadas en cada caso, así como con los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarios para cada cepa.

M.1.3. Material vegetal

M.1.3.1. *Arabidopsis thaliana*

Línea	Procedencia
Col-0 <i>gl1</i>	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center (ABRC, Ohio State University, Ohio, EE.UU)
<i>sos3-1</i>	Laboratorio de Jian-Kang Zhu (Universidad de California, Riverside) (Liu y Zhu, 1997)

M.1.3.1.1. Condiciones de cultivo de *Arabidopsis thaliana*

En función de los requerimientos de cada experimento se emplearon dos formas distintas de cultivo de *A. thaliana*, cultivo en suelo y cultivo *in-vitro*.

Cultivo de plantas en suelo:

Se empleó fundamentalmente para la propagación de plantas. Las semillas se sembraron en macetas rellenas con una mezcla 1:3 de perlita Europerl® y turba Compo® Sana Universal esterilizada a 121°C y 15 psi durante 20 minutos para prevenir la aparición de plagas. Una vez sembradas se cubrieron las macetas con film transparente para evitar la pérdida de humedad del sustrato, que se retiró cuando las plantas habían germinado. Las plantas crecieron en el invernadero en condiciones de iluminación y temperatura controladas: (día/noche): 25/20±2 °C; 40/60% RH (humedad relativa); 16 horas de luz; 150 μmol m² s⁻¹ PAR (radiación fotosintéticamente activa).

Recolección y conservación de semillas:

Tras la aparición del escapo floral, las plantas se protegieron con Aracons™ (Arasystem-Betatech, Gent, Bélgica). Una vez secas, las silicuas se recogieron y pasaron varias veces por un tamiz de acero inoxidable y a continuación se guardaron en tubos Eppendorf dentro de cajas herméticas con gel de sílice Chameleon® (VWR International) y se conservaron a 4 °C.

Cultivo de plantas *in-vitro*:

Las semillas y plantas se manipularon en cabina de flujo laminar Telstar A-H para garantizar la esterilidad. Los medios y soluciones se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las pinzas usadas en la manipulación de plántulas se esterilizaron con calor y etanol.

Esterilización de semillas:

La superficie de las semillas se esterilizó mediante lavados sucesivos con etanol al 70% durante 1 minuto, lejía comercial al 70% durante 3 minutos y finalmente 3 lavados con agua destilada estéril. Para sincronizar la germinación, las semillas una vez esterilizadas se sometieron a vernalización (48 horas a 4 °C).

Medios de cultivo:

Para el cultivo de plantas *in vitro* se utilizaron los siguientes medios:

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962):

Macronutrientes (mM)		Micronutrientes (µM)	
NH ₄ NO ₃	20.6	H ₃ BO ₃	100
KNO ₃	18.5	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	100
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	3.0	MnSO ₄ · H ₂ O	100
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.5	EDTA-Na ₂	100
KH ₂ PO ₄	1.2	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30
		KI	5
		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	1
		CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.1
		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.1

Este medio se suplementó con 30 g/l de sacarosa y 2.5 mM de MES. El pH del medio se ajustó a 5.7 con KOH. Para preparar placas de MS sólido se añadió un 1% (p/v) de bacto-agar (Difco). Para la selección de líneas transgénicas se añadió al medio una vez esterilizado y enfriado el antibiótico requerido en cada caso.

Para los ensayos de tolerancia a salinidad se suplementó el medio con la concentración de NaCl requerida en cada caso.

Medio LAK (Barragán et al., 2012):

Macronutrientes (mM)		Micronutrientes (μM)	
KH_2PO_4	1	H_3BO_3	30
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2	MnSO_4	10
MgSO_4	1	ZnSO_4	1
		CuSO_4	1
		$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.03
		Fe^{2+} (Sequestrene 138-Fe)	100

El pH de la solución se ajustó a 5.3 con KOH. Para preparar placas de MS sólido se añadió un 1% (p/v) de bacto-agar (Difco). Para los ensayos de tolerancia a salinidad se suplementó el medio con la concentración de NaCl requerida en cada caso.

M.1.3.2. *Nicotiana benthamiana*

Se usaron plantas de *N. benthamiana* para la expresión transitoria de proteínas.

1.3.2.1. Condiciones de cultivo de *Nicotiana benthamiana*

Las semillas de *N. benthamiana* se sembraron en macetas rellenas con una mezcla 1:3 de perlita Europerl[®] y turba Compo[®] Sana Universal esterilizada en el autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos para prevenir la aparición de plagas. Una vez sembradas se cubrieron las macetas con film transparente para evitar la pérdida de humedad del sustrato, que se retiró cuando las plantas habían germinado. Las plantas crecieron en el invernadero, en condiciones de iluminación y temperatura controladas: (día/noche): 25/20 \pm 2 °C; 40/60% HR (humedad relativa); 16/8 horas de luz; 150 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ PAR (radiación fotosintéticamente activa).

M.2. Purificación y análisis de ADN

M.2.1. Purificación de ADN

M.2.1.1. Bacteria

Minipreparaciones de ADN plasmídico bacteriano

Para la extracción de los plásmidos de *E. coli* y de *A. tumefaciens* se siguió el método descrito por (Sambrook et al., 1989). Se inoculó una colonia aislada en 3 ml de LB líquido suplementado con el antibiótico necesario en cada caso y se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación. Las células se recogieron en tubos Eppendorf de 1.5 ml por centrifugación a 13.000 rpm durante 1 minuto (Biofuge Pico, Heraeus) y se resuspendieron en 100 µl de la solución I. A continuación, se añadieron 200 µl de la solución II mezclándolo suavemente y se incubó 2-3 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 150 µl de la solución III y se mezcló nuevamente con suavidad. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio, se añadió 1 ml de etanol absoluto y se incubó durante 10 minutos en hielo y se centrifugó de nuevo. El precipitado obtenido se resuspendió en 100 µl de la solución IV y se añadieron 200 µl de etanol absoluto. La mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 30 µl de Tris:EDTA(10:1) pH 8,0.

Solución I/GTE:

Tris	25 mM
EDTA pH 8	10 mM
Glucosa	1% (p/v)

Solución II:

NaOH	0.2 N
SDS	10 %

Solución III:

AcNa pH 4,8	3 M
-------------	-----

Solución IV:

AcNa pH 4,8	60 mM
Tris-HCl pH 8	30 mM

Para secuenciación y otras técnicas que requirieran mayor pureza del plásmido, se utilizó el kit Nucleospin® Plasmid Kit de Macherey-Nagel (Düren, Germany), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Para obtener cantidades mayores de plásmido se usó el kit de extracción de DNA Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (BioRad, USA), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

Maxipreparaciones de ADN plasmídico bacteriano

Se inoculó una colonia de *E. coli* que contenía el plásmido de interés en 100 ml de medio LB y se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 5 ml de GTE y 0.1 ml de lisozima al 5% (p/v) y se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 10 ml de solución II recién preparada mezclándolo suavemente por inversión. La mezcla se incubó 10 minutos en hielo. Tras este tiempo se añadieron 7.5 ml de AcK 3M a pH 4.8 y se incubó durante 30-60 minutos en hielo para precipitar el SDS, las proteínas y el ADN cromosómico. La mezcla se centrifugó a 15.000 rpm 15 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante usando Miracloth (Calbiochem) y se recogió el filtrado en un tubo limpio. Se precipitó el ADN con 15 ml de isopropanol e incubándose durante 20 minutos en hielo. A continuación se centrifugó a 10.000 rpm 10 minutos a 4 °C y se eliminó el isopropanol que estaba en el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 2.5 ml de Tris:EDTA (10:1) pH 8 usando un vórtex. Para purificar el plásmido se añadieron 2.5 ml de LiCl 6 M y se incubó 15 minutos en hielo. Se centrifugó a 10.000 rpm 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le añadieron 5 ml de isopropanol. La mezcla se incubó 20 minutos en hielo. Se volvió a centrifugar a 10.000 rpm 10 minutos y se resuspendió el precipitado 750 µl de T:E (1:10) pH 8. Se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml donde se añadieron 10 µl de RNAsa al 1% (v/v). A continuación se añadieron 750 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló agitándolo en el vórtex durante 20 segundos, la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm 10 segundos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se repitió la operación, añadiendo en este caso 75 µl de AcNa 3 M y 750 µl de isopropanol a la fase acuosa. Se incubó la mezcla 20 minutos en hielo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El isopropanol se descartó y se disolvió el precipitado en 200 µl de T:E (10:1) pH 8. Se precipitó el plásmido en 700 µl de etanol absoluto:acetato amónico 7.5 M (6:1) y se incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó la mezcla, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%. Se dejó secar el ADN plasmídico y finalmente se resuspendió en 200 µl de T:E (10:1) pH 8.

M.2.1.2. Levadura

Minipreparaciones de ADN plasmídico de levadura

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de levaduras se inoculó una colonia en 10 ml de medio selectivo YNB y se incubó a 30 °C durante toda la noche en agitación. El cultivo se centrifugó a 5.000 rpm 5 minutos. Las células recogidas se resuspendieron en 0.5 ml de sorbitol 1M:EDTA 0.1 M pH 7.5 y se transfirieron a un tubo Eppendorf. A continuación se añadieron 20 µl de liticasa (5 mg/ml en KH₂PO₄ pH 7.5) y se incubó la mezcla a 37 °C durante 1 hora. Después se centrifugó a 13.000 rpm 1 minuto y se resuspendió el precipitado en 0.5 ml de Tris 50 mM EDTA 20 mM, pH 7.4 y se añadieron 0.2 ml de AcK 5 M, a continuación se incubó la mezcla en hielo durante 1 hora. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Para precipitar el ADN se añadió 1 volumen de isopropanol y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Después de una centrifugación a 13.000 rpm 1 minuto, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en TE (10:1).

M.2.1.3. *Arabidopsis thaliana*

Extracción de ADN de plantas

Para la extracción de ADN de plantas se siguió el protocolo de descrito por (Edwards et al., 1991) pero con modificaciones. Se tomaron 2 o 3 hojas de la roseta, se introdujeron en un tubo Eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido. A continuación se trituró cada muestra con un émbolo de plástico hasta convertir el material en un polvo fino y se añadieron 400 µl de tampón de extracción, incubándose la muestra 5 minutos a 65 °C. Tras esta incubación se añadieron 400 µl de cloroformo, se mezcló bien utilizando un vórtex y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se precipitó con 1 volumen de isopropanol incubándose la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 rpm 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y se secó a temperatura ambiente. A continuación se resuspendió en 50 µl de agua de calidad milli-Q con una concentración de 20 µg/ml de RNAsa A. Las muestras se conservaron a -20 °C.

Tampón de extracción:

d-Sorbitol	140 mM
Tris-HCl pH 8	220 mM
EDTA-Na ₂ pH 8	22 mM
NaCl	800 mM
CTAB	0.8% (p/v)
n-Laurilsarcosina	1% (p/v)

M.2.2. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN fue cuantificada usando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

M.2.3. Precipitación del ADN

Para concentrar el ADN se precipitó con 3.5 volúmenes de una solución de etanol-acetato de amonio (1 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 6 volúmenes de etanol absoluto). La mezcla se incubó a 0 °C durante 10-20 minutos. A continuación se centrifugó a 13.000 rpm 10 minutos, el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y una vez seco se resuspendió en el volumen conveniente en cada caso.

M.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se realizó según se describe en (Sambrook et al., 1989). El ADN se analizó en geles horizontales de agarosa (0.8-2%) preparados con TBE o TAE, añadiendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio para teñir el ADN a la luz UV. El gel se sumergió en el mismo tampón utilizado para su preparación y se aplicó un voltaje de 70-120 V. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un marcador de peso molecular comercial (1 kb DNA ladder, Invitrogen) o con ADN del fago λ digerido con *HindIII*.

Para fotografiar el gel se usó un ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad). Para los análisis de las imágenes se usó el programa Quantity One® (Bio-Rad).

TBE 10X		TAE 50X	
Tris Base	108 g/l	Tris Base	242 g/l
Ácido Bórico	55 g/l	Ácido acético glacial	5.71% (v/v)
EDTA-Na ₂ pH 8	10 mM	EDTA-Na ₂ pH 8	50 mM

M.2.5. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Las bandas de interés se recortaron del gel de TAE y se purificaron utilizando el kit NucleoSpin® Extract II de Macherey-Nagel (Düren, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

M.2.6. Manipulación enzimática del ADN

M.2.6.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las digestiones se realizaron siempre en los tampones y condiciones recomendados por el fabricante. Se prepararon soluciones de ADN a una concentración de hasta 100 ng/μl en un volumen de 20-100 μl y se añadió, al menos, 1 U de enzima por cada μg de ADN. Cuando fue necesario digerir con más de una enzima se inactivó la primera enzima utilizada y se precipitó el ADN como se describe en el apartado M.2.3.

Los productos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado M.2.4) y los fragmentos de interés se recuperaron usando un kit, como se describe en el apartado M.2.5.

M.2.6.2. Defosforilación de los extremos 5' del ADN

Se eliminaron los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonación para evitar su religación. Se añadieron 1-2 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, Roche) y se incubó la mezcla a 37 °C durante 15 minutos. Para inactivar la fosfatasa alcalina se incubó a 75 °C durante 10 minutos. Los plásmidos se purificaron precipitándolos con etanol-acetato amónico (apartado M.2.3).

M.2.6.3. Generación de extremos romos del ADN

Se usó este procedimiento para la ligación de fragmentos de ADN generados con enzimas de restricción que producen extremos incompatibles. Para convertir en romos extremos protuberantes en 5', se rellenó con la enzima Klenow (New England BioLabs®). Para los extremos protuberantes 3', se usó la polimerasa del bacteriófago T4, que presenta una fuera actividad exonucleasa 3'→5' sobre el ADN monocatenario (Sambrook et al., 1989).

M.2.6.4. Ligación de fragmentos de ADN

Para la ligación de fragmentos de ADN se preparó una reacción de 20 μl conteniendo 1 U de ligasa T4 (Invitrogen™) y 4 μl del tampón de ligación (5x) con una proporción inserto:vector de 3:1. Para las ligaciones de fragmentos con extremos romos se incubó la reacción a 14 °C durante toda la noche, en el caso de fragmentos con extremos cohesivos la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 4-5 horas. Para la transformación de bacterias se usaron 10 μl de la reacción de ligación.

M.2.6.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR con Taq polimerasa

Para cada reacción se utilizaron ≈100 ng de ADN, 0,25 μM de cada cebador, 0.2 mM dNTPS (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, Deoxynucleotides Set (5 PRIME)), 2.5-5 μl del tampón

Taq 10X y 0.5-1 U de *Taq* polimerasa en un volumen de 25 μ l o 50 μ l. En general, se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar el ADN, 25-35 ciclos con la secuencia: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50-65 °C (aproximadamente 5 °C por debajo de la T_m de los oligonucleótidos utilizados) y 1-3 minutos (1 minuto por cada kilobase del fragmento a amplificar) a 72 °C, para la síntesis de ADN y finalmente 5 minutos a 72 °C. Cuando fue necesario conservar las reacciones se guardaron a -20 °C.

Buffer 10x de Taq polimerasa:

KCl	500 mM
Tris-HCl pH 8.3	100 mM
MgCl ₂	15 mM
Gelatina	0.1% (p/v)

M.2.6.6. Amplificación mediante PCR con ADN polimerasa de alta fidelidad

Cuando se requería reacciones de PCR de alta fidelidad se usó el kit Accuzyme™ DNA polymerase (Bioline), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Esta polimerasa tiene una tasa de error muy baja debido a su capacidad de corrección de errores durante la replicación. El producto de PCR se clonó directamente con los sistemas de clonación comercial *Zero Blunt® PCR Cloning Kit* (Invitrogen) o con *pSpark® I DNA Cloning Kit*.

M.2.6.7. Mutagénesis dirigida mediante PCR

Para la realización de mutaciones puntuales se empleó la polimerasa de alta fidelidad, tal y como se indica en el apartado anterior (M.2.6.6). Se usaron los oligonucleótidos correspondientes en cada caso (la secuencia de los oligonucleótidos se describen en el Anexo III). El producto de la PCR se analizó en un gel de TAE de donde se extrajo y se purificó (ver M.2.4 y M.2.5). El amplificado se clonó en los vectores usando los sistemas de clonación comercial *Zero Blunt® PCR Cloning Kit* (Invitrogen) o con *pSpark® I DNA Cloning Kit*.

M.2.6.8. Reacciones de secuenciación

Las mutaciones realizadas mediante PCR así como las construcciones preparadas en este trabajo se secuenciaron posteriormente para verificarlas. La secuenciación se llevó a cabo por el Servicio de Secuenciación de ADN de la empresa Secugen S.L. (Madrid). Cada reacción de secuenciación de 15 μ l se preparó con una mezcla del plásmido a una concentración de 100 ng/ μ l y 1.5 μ l del oligonucleótido a 5 μ M.

M.3. Purificación y análisis de RNA

M.3.1. Extracción de RNA total de plantas

Las muestras de tejido (aproximadamente 100 mg por muestra) se introdujeron en un tubo Eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido y se trituró cada muestra con un émbolo de plástico hasta convertir el material en un polvo fino. Se añadió 1 ml de TRIsure reagent (Bioline, Londres, UK) y se homogeneizaron las muestras usando un vórtex, a continuación se incubaron durante 5 minutos a 25 °C y se centrifugaron a 12.000 rpm 10 minutos a 4 °C (Biofuge PrimoR, Heraeus) para eliminar el ADN genómico, polisacáridos y material insoluble. Se extrajo el sobrenadante y se le añadió 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), incubándose la mezcla a 25 °C durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Biofuge PrimoR, Heraeus). Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ARN con 250 µl de isopropanol. Se incubó durante 10 minutos a 25 °C y se centrifugó 10 minutos a 12.000 rpm y 4 °C (Biofuge PrimoR, Heraeus). El precipitado de RNA se lavó con etanol 70% (v/v), se secó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 10 µl de agua milli-Q previamente tratada con 0.1% (v/v) DEPC (Dietilpircarbonato). Para facilitar la resuspensión del ARN se calentaron las muestras a 55 °C durante 10 minutos.

Todas las soluciones se prepararon con agua milli-Q tratada con 0.1% DEPC (v/v) y el material utilizado se esterilizó en el autoclave dos veces. Se utilizaron guantes en todo momento. El DEPC es una sustancia muy tóxica que debe manipularse siempre en una campana de extracción de gases. Para su preparación se mantuvo durante al menos 12 horas en agitación a temperatura ambiente y posteriormente se inactivó con un ciclo en el autoclave de 20 minutos a 121°C y 15 psi.

M.3.2. Electroforesis de RNA

Para verificar la calidad del RNA, se analizó una alícuota mediante electroforesis en un gel de TAE con 0.8% de agarosa (p/v) preparado con agua milli-Q tratada con DEPC 0.1%(v/v) en una cubeta previamente lavada con 10% (v/v) SDS y tratada durante 30 minutos con 3% (v/v) de H₂O₂.

M.3.3. Cuantificación de RNA

La concentración del RNA en la solución se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook et al., 1989). Para ello se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer), de la misma forma que para la determinación de la concentración de DNA (apartado M.2.2).

M.3.4. RT-PCR

Con esta técnica se cuantificó la abundancia del RNA mensajero (mRNA). Se usó el *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante para sintetizar cDNA a partir de mRNA de plantas. El cDNA se generó utilizando la retrotranscriptasa *Quantiscript* y una mezcla optimizada de oligo-dT y cebadores aleatorios que permiten la síntesis de cDNA desde todas las regiones del mRNA, incluyendo el extremo 5'. Para comparar la acumulación del transcrito de los distintos genes en cada línea ensayada, se realizaron amplificaciones estándar por PCR usando el cDNA obtenido como molde y cebadores específicos para el gen cuyo nivel de expresión se pretendía cuantificar. Para normalizar la calidad y cantidad del cDNA obtenido, se amplificó este cDNA con oligonucleótidos específicos para los genes de expresión constitutiva en *Arabidopsis* β -TUBULINA-4 (TB4-5'/TB4-3') y ACTINA-8 (Act8_f/Act8_r).

M.4. Purificación y análisis de proteínas de levaduras

Para la purificación de la proteína SOS3 de levadura se transformó la cepa de *S. cerevisiae* GRF167 con SOS3 con una etiqueta de histidinas. A partir de un transformante se preparó un cultivo líquido. Las células se recogieron centrifugando 5 minutos a 5.000 rpm y se resuspendieron en el tampón de lisis y se rompieron mediante agitación con bolas de vidrio estériles de 0.5 mm de diámetro. A continuación, se diluyó el lisado con dos volúmenes de tampón GTED (20% glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 2 μ g/ml de quimostatina, 1 μ g/mL leupeptina). Los restos celulares junto con las bolas de vidrio se eliminaron tras separarlos por centrifugación a 3.000 rpm en un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante se centrifugó a 16.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante, que contenía la fracción de proteínas citoplasmáticas. Las proteínas etiquetadas con la cola de histidinas se purificaron por cromatografía de afinidad con la resina Ni-NTA (Qiagen) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Tampón de lisis:

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1mM

Tampón GTED:

Glicerol	20%
Tris-HCl pH 7.6	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Quimostatina	2 µg/ml
Leupeptina	1 µg/ml

M.4.1. Electroforesis monodimensional de proteínas

Para el análisis de los extractos de proteínas se prepararon geles SDS-PAGE siguiendo las instrucciones descritas en (Sambrook et al., 1989). Para la electroforesis se utilizó el sistema Mighty Small SE 250 (GE Healthcare).

Gel de acrilamida:

Reactivos	Gel separador 10% (10 mL)	Gel concentrador 5% (6 mL)
Agua Milli-Q	4 mL	4.1 mL
30% Bisacrilamida/Acrilamida	3.3 mL	1 mL
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL	----
1 M Tris pH 6.8	----	0.75 mL
10% SDS	0.1 mL	0.06 mL
10% APS	0.1 mL	0.06 mL
TEMED	0.004 mL	0.006 mL

Tampón de electroforesis:

10X Tris Base	250 mM
Glicina	1.94 M
SDS	1% (p/v)

El pH del tampón de electroforesis se ajustó a 8.3.

Tampón Laemmli 4x:

Tris-HCl pH 6.8	250 mM
SDS	4% (p/v)
B-mercaptoetanol	10% (v/v)
Glicerol	40% (v/v)
Bromofenol azul	100 µg/mL

El tampón Laemmli se conservó a -20 °C.

M.4.2. Tinción de geles SDS-PAGE con Coomassie

Las proteínas en geles de acrilamida se tiñeron en dos etapas (Bradford, 1976). En primer lugar, el gel se incubó en solución de tinción Coomassie con agitación suave a temperatura ambiente durante al menos 1 h. Una vez eliminada la solución de tinción, el gel se incubó en una solución de decoloración hasta que aparecieron las bandas nítidas de proteína sin tinción de fondo en el gel.

Solución de tinción:

Ácido acético glacial	50% (v/v)
Metanol	10% (v/v)
Azul brillante de Coomassie R-250	0.25% (w/v)

Solución de decoloración:

Ácido acético glacial	10% (v/v)
Metanol	10% (v/v)

M.5. Transformación de los distintos organismos utilizados

M.5.1. Transformación de bacterias

M.5.1.1. Preparación de células competentes

M.5.1.1.1. *Escherichia coli*

Para preparar células competentes *E. coli* One Shot® TOP10 se inoculó 1 ml del stock de células en 250 ml de medio SOB y se incubó a 20 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.3. Se centrifugó el cultivo a 3.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió cuidadosamente en 40 ml del tampón CCMB80 previamente enfriado en hielo y se incubó la mezcla en hielo durante 20 minutos. A continuación, se centrifugaron las células a 3.000 g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 5 ml del tampón CCMB80. Se midió la densidad óptica (D.O.₆₀₀) de una mezcla de 50 µL de la suspensión de células y 200 µL de medio SOC y se ajustó la D.O.₆₀₀ a 1.0-1.5 con tampón CCMB80 frío. La suspensión de células se incubó durante 20 minutos en hielo. Finalmente se dispensaron en alícuotas de 100 µl en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Tampón CCMB80:

KOAc pH 7	10 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	80 mM
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	20 mM
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	10 mM
Glicerol	10% (v/v)

El pH de la solución se ajustó a 6.4 con HCl.

M.5.1.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para preparar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* se inoculó una colonia de la cepa GV3101 en 3 ml de medio YEP suplementado con rifampicina (50 µg/ml) y gentamicina (20 µg/ml) y se incubó a 28 °C durante toda la noche en agitación. A partir de 0.5 ml de este cultivo se inocularon 100 ml del mismo medio y se incubó el cultivo a 28 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.5-1. Se recogieron las células centrifugando a 3.000 g y 4 °C y se lavaron con 1/2 volumen de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío. Se repitió la centrifugación y se resuspendieron las células en 4 ml de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío. Se volvió a centrifugar y se resuspendieron en 1.5 ml de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío. Finalmente, las células se

dispensaron en alícuotas de 50 µl en tubos de Eppendorf y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su uso.

M.5.1.2. Transformación de células competentes

M.5.1.2.1. *Escherichia coli*

Se añadieron 10-100 ng de ADN plasmídico, en un volumen máximo de 10 µl, a una alícuota de 100 µl de células competentes. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos y a continuación se aplicó un choque térmico de 42 °C durante 40 segundos. Tras el choque térmico, se incubó de nuevo la mezcla en hielo durante 1-2 minutos. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C. Las células se recuperaron centrifugando a 13.000 rpm 1 minuto y se extendieron en placas de LB suplementadas con el antibiótico apropiado con la ayuda de bolas de vidrio estériles de 4 mm de diámetro. Las placas se incubaron 24 horas a 37 °C. Los vectores utilizados en la transformación de *E. coli* se describen en el Anexo II.

M.5.1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Las células competentes de *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 se transformaron mediante electroporación. Para ello, se añadieron 50 ng de ADN plasmídico a una alícuota de 100 µl de células competentes y se incubó durante 2 minutos en hielo. A continuación, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación Gene Pulser®/MicroPulser™ (Bio-Rad) de 0.1 cm previamente enfriada en hielo y se le aplicó un pulso de 2.2 kV usando el electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad). Se recuperaron las células de la cubeta y se incubaron en 2 ml de medio YEP durante 3 horas a 30 °C. Las células se sembraron en placas de YEP suplementadas con los antibióticos apropiados usando bolas de vidrio estériles de 4 mm de diámetro. Las placas se incubaron 48 horas a 30 °C. Los vectores utilizados para la transformación de *Agrobacterium* se describen en el Anexo II.

M.5.2. Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras se usó el método de acetato de litio/PEG, como se describe en (Elble, 1992). Se inoculó una colonia en 5 ml de YPD y se incubó toda la noche a 30 °C en agitación. Se tomaron aproximadamente 2×10^8 células (una D.O.₆₀₀ 0.5 equivale a 5×10^6 células/ml), se recogieron las células centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto y se le añadió 1-2 µg de ADN plasmídico y 500 µl de PLATE. Se incubaron las células a temperatura ambiente durante 24 horas. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se extendieron las células en placas de medio YNB selectivo usando bolas de vidrio estériles de 4 mm de diámetro. Las placas se incubaron 48 horas a 30 °C.

Solución PLATE:

PEG (WM 3350) 45%	40.5% (v/v)
Acetato de litio	100 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

M.5.3. Transformación de plantas

M.5.3.1. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* mediante infección con *A. tumefaciens*

M.5.3.1.1. Preparación de células de *Agrobacterium tumefaciens*

Se siguió el protocolo descrito por (Bechtold et al., 1993). Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción deseada en 5 ml de medio YEP suplementado con rifampicina (50 µg/ml), gentamicina (20 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml), y se incubó durante 48 horas a 30 °C en agitación. Con 500 µl de este precultivo se inocularon 200 ml de medio YEP suplementado con rifampicina (50 µg/ml), gentamicina (20 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se incubó ≈16-20 horas a 30 °C en agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1.4-2. Las células se recogieron a 7.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos y se resuspendieron en 250 ml de solución de transformación (5% (p/v) de sacarosa y 0.02% (v/v) Silwet L-77) preparada recientemente.

M.5.3.1.2. Construcciones empleadas para la transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para la expresión en plantas de *Arabidopsis* de *SOS3* y los alelos mutantes *SOS3-G2A*, *SOS3-C3A*, *SOS3-KA*, *SOS3-S205A* y *SOS3-S205D* se utilizó el vector pBI321, que expresa genes bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Las construcciones se realizaron a partir de los plásmidos que expresan tanto la proteína silvestre como las mutantes en el vector pYPGE15, liberando los respectivos cDNAs con las enzimas *Xba*I/*Xho*I para insertarlos en el vector pBI321.

M.5.3.1.3. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se transformó *Arabidopsis* siguiendo el protocolo de (Clough y Bent, 1998). Las plantas crecieron en tierra en condiciones de día largo para inducir la floración. Después de un mes aproximadamente, aparecieron los primeros tallos florales que se eliminaron para favorecer el crecimiento de más tallos florales desde la roseta, aumentando así el número de primordios seminales y por tanto la eficiencia de la transformación. Las flores totalmente desarrolladas se eliminaron durante los tres días previos a la transformación, para disminuir el porcentaje de silicuas con semillas no transformadas. La agroinfección se llevó a cabo sumergiendo los primordios florales en la suspensión de *Agrobacterium*, obtenida como se describe en el

apartado anterior, durante 30 segundos. A continuación, se cubrió la parte aérea de la planta con plástico transparente para mantener la humedad en la zona agroinfectada y se trasladaron las plantas al invernadero. Después de 2 días se retiraron los plásticos y se mantuvieron las plantas en el invernadero hasta la recolección de las semillas.

M.5.3.1.4. Selección de transformantes y propagación

Las semillas transgénicas (T1) germinaron *in vitro* en placas de medio Murashige y Skoog (M.1.3.3.1) suplementado con el antibiótico correspondiente, 50 µg/ml de kanamicina o 25 µg/ml de higromicina. Las plántulas que mostraron resistencia al antibiótico (con presencia de cotiledones verdes y desarrollo de raíz) se transfirieron a macetas con tierra hasta recolectar sus semillas (T2). Las semillas segregantes T2 se sembraron en placas con medio MS suplementado con antibiótico aproximadamente 100 semillas y se seleccionaron 10 plántulas de aquellas líneas que presentaron una segregación 3:1. Estas plantas se transfirieron a tierra hasta obtener su descendencia por autofecundación T3. Se recolectaron las semillas T3 de cada una de las líneas individuales y se sembraron en MS suplementado con el antibiótico necesario, seleccionándose las líneas homocigotas por no presentar segregación en la resistencia a éste.

M.5.3.1.5. Confirmación de los mutantes *sos3-1*

El mutante *sos3-1* se seleccionó por su deficiente halotolerancia de una colección de semillas silvestres (*Col gl1*) mutadas mediante bombardeo con neutrones rápidos (Liu y Zhu, 1997). Su mapeo genético indicó que se trata de un mutante por delección de 9 pb desde el nucleótido 759 a partir del codón de inicio de *SOS3* (Liu y Zhu, 1998). Para la confirmación de mutantes *sos3-1* mediante PCR de ADN genómico se usaron tres cebadores: uno en antisentido, *sos3-1_r*, y dos en sentido, *sos3-1A_f* y *sos3-1B_f*, que se diferenciaban en las últimas 9 pb del extremo 3', las mismas de la delección del mutante *sos3-1*, de manera que el ADN genómico de una planta silvestre amplificaría una banda de 419 únicamente con la pareja de oligos *sos3-1B_f* y *sos3-1_r* mientras que el mutante solo amplificaría una banda de 410 pb con la pareja de oligos opuesta (*sos3-1A_f* y *sos3-1_r*). Las temperaturas de anillamiento de ambas parejas de cebadores se optimizaron previamente mediante ensayos con ADN de plantas mutantes *sos3-1* y silvestres en un termociclador con gradiente de temperaturas (Biometra® T-gradient).

M.5.3.1.6. Presencia y expresión del transgén

Para determinar la presencia del transgén, se tomaron 1 o 2 hojas de la roseta basal de la planta y se realizó una extracción de ADN como se describe en el apartado M.2.1.3. Éste se utilizó como molde para reacciones de PCR con oligonucleótidos propios del transgén y del gen *NPTII*, que confiere resistencia a kanamicina.

Para determinar de forma cualitativa la expresión del transgén, se tomaron 1 o 2 hojas de la roseta basal de la planta y se realizó una extracción de RNA como se describe en el apartado M.3.1. Se generó cDNA a partir del RNA obtenido (ver M.3.4.) y se empleó como molde en reacciones de RT-PCR con oligonucleótidos propios del transgén. Para evaluar la cantidad y calidad del cDNA de las distintas líneas se utilizaron oligonucleótidos que amplificaban fragmentos de los genes de expresión constitutiva en *Arabidopsis* como los de la *TUBULINA 4*.

M.5.3.1.7. Fijación de líneas transgénicas homocigotas

Una vez comprobada la presencia del transgén en las distintas líneas, se procedió a la fijación de líneas homocigotas. Las semillas segregantes T2 se sembraron en medio MS suplementado con kanamicina o higromicina, seleccionándose 7-10 plantas resistentes por cada línea. Estas plantas se transplantaron a tierra, donde se dejaron crecer hasta obtener su descendencia por autofecundación (T3). Se recolectaron las semillas T3 de cada una de las líneas individuales y se sembraron en MS suplementado con el antibiótico necesario, seleccionándose las líneas homocigotas por no presentar segregación en la resistencia a éste.

M.5.3.2. Transformación de *Nicotiana benthamiana* mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*

Para la agroinfiltración de *N. benthamiana* se siguió el protocolo de (Waadt y Kudla, 2008). Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés en 5 ml de medio YEP suplementado con los antibióticos necesarios y se incubó durante toda la noche a 30°C. Se midió la D.O.₆₀₀ y se calculó el volumen necesario para obtener una D.O.₆₀₀ de 0.5 según la fórmula $V = (V_{\text{final}} \times 0.5) / D.O._{600}$. La cepa p19 (apartado M.1.1.1) se ajustó a una D.O.₆₀₀ de 0.3. Los volúmenes calculados de cada cepa de *Agrobacterium* de interés se mezclaron en un tubo Falcon y se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen final de tampón de activación. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 3 horas hasta la infiltración. Finalmente, se infiltró la mezcla con la ayuda de una jeringuilla a través del envés de las hojas de plantas de 5 o 6 semanas convenientemente regadas.

Tampón de activación:

MES	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Acetosiringona	150 µM

M.6. Ensayos de crecimiento en levadura

Para la expresión en levadura de los alelos mutantes *SOS3-C3A* y *SOS3-KA*, se realizaron mutaciones puntuales en el cDNA de *SOS3* mediante PCR. Para la mutación C3A se usó la pareja de oligos C3A *Xba*I/*SOS3 Xho*I R. Para la mutación KA se amplificó con los oligos KA *Xba*I/*SOS3 Xho*I R. Los cDNAs resultantes portadores de la mutaciones se clonaron en el vector pYPGE15 como fragmentos *Xba*I/*Xho*I. El mutante G2A se obtuvo clonando el fragmento *Xba*I/*Xho*I del plásmido pET::*SOS3-G2A* (Ishitani et al., 2000) en el vector pYPGE15. Los plásmidos pYPGE15::*SOS3-S205A* y pYPGE15::*SOS3-S205D* provienen del laboratorio del Dr. Kudla (Universidad de Münster, Alemania).

El cDNA de *SOS3* silvestre también se clonó en el vector p425GPD como *Xba*I/*Xho*I a partir del plásmido pYPGE15.

Para la expresión del mutante de *SOS1* sin el dominio de unión a *SOS3* se insertó el fragmento *Xba*I/*Xho*I portador de la mutación del plásmido pYeBYN::*SOS1ΔS3BD* en el plásmido pYPGE15::*SOS1*.

La tolerancia a salinidad de los transformantes de levadura se caracterizó en medio sólido AP determinando su capacidad de formar colonias mediante ensayos de gotas. Se inoculó una colonia de cada transformante en 2 ml de medio YNB selectivo y se incubó en agitación a 30 °C hasta saturación (O.D.₆₀₀≈2.5). A partir de estos cultivos saturados se prepararon cuatro diluciones decimales seriadas y se dispusieron 5 µl de cada una en medio AP suplementado con las concentraciones de NaCl indicadas. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3-5 días.

M.7. Sistema SRS

El sistema SRS (*SOS Recruitment System*) de levadura se utilizó para estudiar *in vivo* el direccionamiento de *SOS3* a la membrana plasmática. *SOS3* y sus versiones mutadas (*SOS3-G2A*, *SOS3-C3A* y *SOS3-KA*) se insertaron en el plásmido pADNS para producir la fusión con la proteína hSos. La expresión de este plásmido es letal a 37°C a menos que la proteína fusionada a hSos llegue a la membrana plasmática (Aronheim et al., 1997).

Las construcciones se realizaron mediante PCR. El cDNA de *SOS3* se amplificó usando la pareja de oligonucleótidos *SOS3 Hind*III/*SOS3 hSos* a partir del plásmido pYPGE15::*SOS3*. Para insertar la mutación G2A se usó la pareja de oligos *SOS3 G_P1/SOS3 hSos*, para la mutación C3A la pareja *SOS3 C_P1/SOS3 hSos* y finalmente para la mutación KA, los oligos *SOS3 K_P1/SOS3 hSos*. El producto de cada PCR se clonó en el vector pCR Blunt® a partir de donde se clonaron los fragmentos de interés en el vector pADNS como *Hind*III/*Sma*I.

A continuación, todos los plásmidos utilizados para SRS se transformaron en la cepa *cdc25-2* de *S. cerevisiae* (Mata, *cdc25-2*, *ura3*, *lys2*, *leu2*, *trp1*, *his3* y *ade101*) (M.1.2.1), siguiendo el procedimiento como se indica en (Elble, 1992), con la modificación de que la temperatura de incubación de la cepa *cdc25-2* fue de 24°C. Las células de levadura transformadas se seleccionaron en medio YNB selectivo y se incubaron en 2 ml de medio líquido. Para los análisis de SRS, se colocaron gotas de 5 µl de cuatro diluciones seriadas 1:10 a partir del cultivo líquido saturado. Las placas se incubaron durante al menos 3 días a 24 y 37°C respectivamente. La viabilidad celular a 37°C se determinó en placas YPD.

M.8. Caracterización fisiológica de plantas de *A. thaliana*

M.8.1. Ensayos de crecimiento en medio salino

Para los análisis de tolerancia salina se usaron semillas de la generación T3 y se germinaron *in vitro* en placas de MS. Después de 7 días se transfirieron las plántulas, utilizando pinzas esterilizadas por calor, a placas de medio LAK sólido suplementadas con la concentración de NaCl indicada en cada caso. A continuación se incubaron en vertical en la cámara de cultivo *in vitro* en condiciones controladas durante 7-14 días.

M.9. Ensayos de localización subcelular mediante fusión a la proteína GFP

Localización de SOS3 y sus mutantes en el extremo N-terminal:

Para la determinación de la localización subcelular de SOS3 y las distintas versiones mutantes (G2A, C3A y KA) se fusionaron estas proteínas a la proteína GFP. Las construcciones se realizaron en el sistema de plásmidos pGreenII (John Innes Centre), que expresan la proteína bajo el promotor CaMV35S y que en cuyo extremo 3' se fusiona al cDNA que codifica la proteína verde fluorescente, GFP. El cDNA de SOS3 se obtuvo mediante PCR a partir del plásmido pYPGE15::SOS3, amplificando con la pareja de oligos SOS3 *HindIII*/SOS3 GFP 3'. Para la mutación G2A se usó la pareja de oligos SOS3 G_P1/SOS3 GFP 3'. Para la mutación C3A los oligos SOS3 C_P1/SOS3 GFP 3'. Y por último, para la mutación KA, la pareja SOS3 K_P1/SOS3 GFP 3'. Los respectivos productos de las PCRs se clonaron en el vector pCR Blunt® y finalmente se insertaron en el vector pGreenII como un fragmento *HindIII/NotI*.

Localización de los mutantes en los dominios NES de SOS3:

Por otro lado, para estudiar la influencia de los dominios NES en la localización de la proteína se fusionaron distintas mutaciones en estos dominios a la proteína GFP. En primer lugar, se eliminó todo el fragmento de la secuencia a partir del aminoácido 136, eliminando de este modo ambas secuencias NES. Para fusionar SOS3 sin los dominios NES a GFP, se

amplificó SOS3 a partir del plásmido p425GPD con la pareja de oligos SOS3::GFP R/SOS3 *Hind*III (≈400 pb) y por otro lado, se amplificó la GFP usando los oligos SOS3::GFP F/GFP *Xba*I R (≈750 pb). El producto de las PCRs se corrió en un gel de TAE (M.2.4) y las bandas se recortaron y purificaron (M.2.5) y se utilizaron como moldes para una nueva PCR con la pareja de oligos SOS3 *Hind*III/GFP *Xba*I R (≈1.8 kb). El producto de PCR se purificó de un gel de TAE y se clonó en el vector pSPARK[®]. A partir de este vector, se cortó el fragmento *Hind*III/*Xba*I y se insertó en el vector final pGreenII.

Por otro lado, se realizaron mutaciones puntuales mediante PCR en los residuos clave determinados según la secuencia consenso de la primera secuencia NES identificada, para ello se utilizó la pareja de oligos SOS3_NES1mut5-end/SOS3_NES1mut, de manera que se sustituyeron los residuos de leucina por alanina (Leu140Ala, Leu141Ala, Leu146Ala y Leu148Ala) y de igual manera se procedió con la segunda secuencia NES, con la pareja de cebadores SOS3_NES2mut5-end/SOS3_NES2mut, mutando los residuos Leu183Ala, Leu187Ala y Leu193Ala. A partir del producto de las anteriores PCRs se hizo una nueva PCR con los oligos SOS3_NES1mut5-end/SOS3_NES2mut para obtener una nueva construcción que incluyera las mutaciones en las leucinas de ambos dominios NES (Leu140Ala, Leu141Ala, Leu146Ala, Leu148Ala, Leu183Ala, Leu187Ala y Leu193Ala). Finalmente, los fragmentos portadores de las mutaciones puntuales se insertaron en el vector pGreenII.

Los plásmidos que expresaban la fusión de las proteínas de interés con la proteína verde fluorescente GFP se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* y se infiltraron en plantas de *Nicotiana benthamiana* como se detalla en el apartado M.5.3.2. Tres días después de la infiltración se cortaron discos de 1-2 cm de las hojas infiltradas y se observaron en el microscopio confocal.

M.10. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC)

Esta técnica permite la detección de la interacción entre dos proteínas *in vivo*. Esto se logra mediante la división de una proteína amarilla fluorescente (YFP) en dos fragmentos y fusionando cada uno de estos fragmentos a una proteína de interés (Hu et al., 2002). La reconstitución de la señal de YFP sólo ocurre cuando las proteínas de interés interactúan.

M.10.1. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en plantas

M.10.1.1. Plásmidos para BiFC de plantas

Para analizar la interacción entre proteínas de interés se realizaron ensayos de BiFC como se indica en Waadt et al. (2008) y para realización de las construcciones necesarias se usaron los vectores que se describen en esta publicación, siguiendo las técnicas para la manipulación del ADN explicadas en el apartado M.2.

El plásmido pSPYNE(R)::SOS2 proviene del laboratorio del Dr. Kudla. El cDNA de SOS1 se clonó en el vector pSPYNE173 como un fragmento *XbaI/KpnI* a partir del plásmido pYPGE15::SOS1. La construcción pSPYNE173::SOS1 Δ 997 se obtuvo sustituyendo el fragmento *XhoI/KpnI* del plásmido pYeBYN::SOS1 Δ 997 en el plásmido pSPYNE173::SOS1.

Todas las CBLs, excepto CBL4(SOS3) se clonaron en el vector pSPYCE(M) como *XbaI/SmaI*. SOS3 y los alelos mutantes G2A, C3A y KA se insertaron en el vector pSPYCE(M) como *XbaI/XhoI* a partir de los plásmidos correspondientes en el vector pYPGE15.

Las construcciones de interés se infiltraron en *N. benthamiana* a través de la transfección con *Agrobacterium*, como se describe anteriormente (ver apartado M.5.3), permitiendo la expresión transitoria de las proteínas fusionadas.

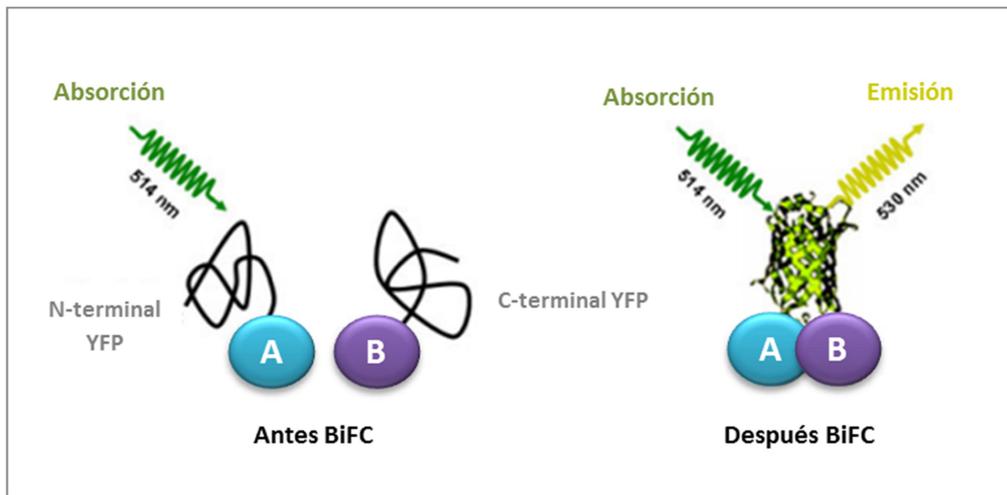


Figura M.1. Esquema del análisis de BiFC. Las proteínas A y B se fusionan a los fragmentos N- y C-terminales de YFP, respectivamente. En ausencia de una interacción entre A y B, las dos mitades del fluoróforo permanecen no funcionales. Después de la interacción entre A y B, se reconstituye el fluoróforo permitiendo la emisión de fluorescencia tras la excitación con la longitud de onda apropiada. (Imagen adaptada de Bhat et al. (2006)).

M.10.1.2. Infiltración de *Nicotiana benthamiana*

Se transformó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* (Apartado M.1.1.1.) con las construcciones para BiFC indicadas en cada caso. Estos transformantes se usaron conjuntamente con la cepa p19, para permitir la expresión transitoria de las proteínas de interés mediante su infiltración en hojas de *N. benthamiana* de 5-6 semanas como se indica en el apartado M.5.3.2

M.10.2. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en levaduras

M.10.2.1. Plásmidos para BiFC de levaduras

Para los ensayos de BiFC de levaduras se usaron los plásmidos de expresión en levaduras pYeBYN, pYeBYN(R) y pYeBYC(M) provenientes del laboratorio del Dr. Kudla.

Para la realización de la construcción pYeBYN::SOS1, el cDNA de *SOS1* se extrajo del plásmido pSPYNE173::SOS1 mediante digestión con las enzimas *XbaI/KpnI* y se clonó en el vector de expresión en levadura pYeBYN. El fragmento del cDNA de *SOS1* comprendido entre los aminoácidos 460 y 482, al que se ha denominado S3BD (*SOS3 Binding Domain*) se eliminó mediante PCR y se sustituyó esta versión modificada de *SOS1* en el plásmido pYeBYN::SOS1, para ello, a partir del cDNA de *SOS1* clonado en el vector pYPGE15, se amplificaron dos fragmentos con las parejas de oligonucleótidos SOS1_UPSBamHI/BDSOS3Rev (222 pb) y BDSOS3/SOS1KpnIR (2103 pb) (Anexo III), utilizando la polimerasa de alta fidelidad *Accuzyme*. El producto de las PCRs se corrió en un gel de agarosa (M.2.4) y las bandas se recortaron y purificaron (M.2.5) y se utilizaron como moldes para una nueva PCR con la pareja de oligos SOS1_UPSBamHI/SOS1KpnIR (≈1.8 kb). El producto de PCR se purificó de un gel de TAE y se clonó usando el *Blunt*[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen). Para la inserción de este alelo en el plásmido de BiFC de levadura pYeBYN::SOS1, se liberó un fragmento *BamHI/KpnI* de 1.8 kb portador de la mutación en el vector *PCR Blunt*[®] y se sustituyó con él el fragmento correspondiente del alelo silvestre clonado en el vector pYeBYN (ver apartados M.2.6.1. y M.2.6.4.). Del mismo modo, usando como molde el plásmido pYPGE15::SOS1 se amplificó el fragmento de *SOS1* que contenía el dominio de unión (S3BD) utilizando los oligos SOS1_UPSBamHI/SOS1_3BDRvXhoI. El producto de la PCR se purificó y se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior para clonar el fragmento S3BD en el vector de BiFC de levadura pYeBYN(R).

El cDNA de *SOS2* se clonó en el vector pYeBYN(R) a partir del plásmido pSPYNE173::SOS2.

Para la construcción que expresa *SOS1* truncado a partir del aminoácido 997, se realizó una PCR con la pareja de oligos SOS1 *XhoI/SOS1 997 KpnI R*, el producto resultante se clonó en el vector *PCR Blunt*[®], desde donde se extrajo digiriendo con las enzimas *XhoI/KpnI* y a continuación se sustituyó dicho fragmento portador de la mutación en el plásmido pYeBYN::SOS1.

M.10.2.2. Transformación de levaduras para BiFC

Para analizar la interacción entre proteínas de una forma más rápida y cómoda que mediante la expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizaron ensayos de BiFC de levaduras. Las construcciones de interés se transformaron en la cepa de *S. cerevisiae* ANT5, para lo que se siguió el mismo proceso para la transformación de levaduras que se

indica en el apartado (M.4.2). Los transformantes se seleccionaron y se incubaron en 2 ml de medio líquido durante 24 horas a 30 °C.

M.10.3. Microscopía para BiFC

Para los análisis de microscopía en planta se siguieron las indicaciones dadas en (Waadt et al., 2008). Se cortaron discos de 1-2 cm de las hojas de *N. benthamiana* 3 días después de la infiltración.

Los análisis de microscopía de levadura se realizaron a partir de cultivos de levaduras en medio líquido, para lo que se tomó una pequeña alícuota y se observó directamente en el microscopio.

Para visualizar los complejos eYFPC/eYFPN se usó el filtro de YFP. Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus) usando el láser de 515 nm y el objetivo de agua 60X y se analizaron con el programa Olympus FluoView 2.1. (Olympus). El análisis de la intensidad de la fluorescencia se realizó con el programa ImageJ.

M.11. Análisis de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases

Para el análisis del perfil de ácidos grasos, se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). La proteína purificada se dispuso en tubos de 10 ml con tapones de teflón, se congeló a -80 °C y se liofilizó. El material seco se sometió a una hidrólisis ácido-base y a transesterificación. A continuación, se añadieron 0,75 ml de NaMeO 0,5 M y la mezcla se lavó con nitrógeno, se calentó y se mantuvo a una temperatura de 80 °C durante 2 h. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 1,5 ml de H₂SO₄-MeOH al 3% (v/v) y se calentó a 80°C durante 6 h. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se añadió 1 ml de heptano (que contenía 0,05% de BHT) y 3 ml al 10% (p/v) y se mezcló vigorosamente durante 1 minuto. La fase orgánica superior, correspondiente al heptano, se recogió para los análisis de cromatografía de gases. Los FAMEs se separaron en una columna capilar de sílice fundida Supelcowax 10[®] (longitud de 30 m, i.d. 0,32 mm y d_f 0,25 μm) (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies España, Madrid, España) equipado con un detector de ionización de llama (FID), un inyector-divisor (inyector “split”) y un muestreador automático de líquidos de la serie 7683B. Se utilizó helio como gas portador con un flujo lineal constante de 1,75 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 y 260°C respectivamente. El programa de temperatura del horno empezó a 145 °C, aumentando 15°C/min hasta los 230 °C con un tiempo de retención de 10 minutos. El volumen de inyección fue de 1 μl (con un “split ratio” de de 1:50). Los ácidos grasos se identificaron por comparación con los estándares conocidos.

M.12. Herramientas Informáticas

Para la manipulación de secuencias y construcción de alineamientos, se utilizó el paquete informático *DNA Star* (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EE. UU.).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

CAPÍTULO I

R.1. El sensor de Ca^{2+} SOS3 interacciona con el transportador de Na^+ SOS1

R.1.1. Interacción de SOS1 con SOS3

La interacción física dependiente de Ca^{2+} entre la proteína sensora SOS3(CBL4) y la proteína quinasa SOS2(CIPK24) se traduce en la estimulación de la actividad quinasa de SOS2 y en su translocación a la membrana plasmática, donde el complejo SOS2/SOS3 fosforila y activa al antiportador Na^+/H^+ SOS1, permitiendo la restauración de la homeostásis iónica (Halfter et al., 2000; Guo et al., 2001; Guo et al., 2004; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002). Este proceso implica la interacción del complejo SOS2/SOS3 con el extremo C-terminal de SOS1, que actúa como dominio inhibidor. La fosforilación por el complejo SOS2/SOS3 del residuo de serina en posición 1138 situado en este dominio produce, probablemente, un cambio conformacional del C-terminal de SOS1 que libera al transportador de su estado de autoinhibición y permite el intercambio Na^+/H^+ (Quintero et al., 2011; Núñez et al., 2012).

En células animales, se ha demostrado que la actividad del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática NHE1 (*Na⁺/H⁺ Exchanger 1*), se regula mediante la interacción con múltiples tipos de proteínas, incluyendo varias clases de proteínas quinasa (Putney et al., 2002). En un llamativo paralelismo con el sistema SOS de plantas, la actividad de NHE1 se regula mediante la interacción con los tres miembros de la familia de sensores de Ca^{2+} CHP1 a 3 (*Calcineurin B Homologous Protein*). Las CHP son proteínas que unen Ca^{2+} a través de cuatro dominios del tipo “*EF-hand*” y que se miristoilan en su extremo N-terminal (en el residuo Gly2). En cuanto a su topología, la proteína CHP2 presenta una estructura similar a la observada en otras proteínas animales con cuatro dominios “*EF-hand*”, como la subunidad reguladora de la fosfatasa calcineurina (CNB) (Kissinger et al., 1995), proteínas de interacción con canales de K^+ (KChIP1) (Zhou et al., 2004), el sensor de calcio neuronal NCS-1 (Bourne et al., 2001), neurocalcina (Vijay-Kumar y Kumar, 1999) o proteínas de unión a calcio e integrinas (CIB) (Gentry et al., 2005). En plantas, las proteínas homólogas a las CHP son las pertenecientes a la familia CBL (Nagae et al., 2003). A diferencia del sistema de plantas, las proteínas CHP ejercen su acción reguladora mediante interacción directa con el transportador NHE1 y no se ha descrito la intervención de ninguna proteína quinasa (Ammar et al., 2006). Para determinar la posible existencia en planta de una regulación de SOS1 mediante interacción directa con SOS3, se realizó un ensayo de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) en células epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana*. El sistema BiFC permite la detección de la interacción entre dos proteínas *in vivo*; la proteína amarilla fluorescente (YFP) se divide en dos fragmentos que individualmente no emiten fluorescencia y se fusionan a sendas proteínas que son objeto del ensayo (Hu et al., 2002). Cuando las proteínas de interés interactúan

físicamente, se aproximan los fragmentos de la YFP, reestableciendo la emisión de fluorescencia.

Se subclonaron los cDNAs de *SOS1* y *SOS3* en los vectores para BiFC de plantas pSPYNE173 y pSPYCE(M), respectivamente. Los plásmidos pSPYNE173::*SOS1* y pSPYCE(M)::*SOS3* se coexpresaron en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración y se analizaron a los tres días en el microscopio confocal. En este ensayo, se detectó señal de fluorescencia proveniente de la membrana plasmática, observándose un peculiar patrón punteado en lugar de una línea continua de fluorescencia, lo que sugiere que la interacción entre *SOS1* y *SOS3* ocurre en zonas discretas de la membrana plasmática (Figura R.1).

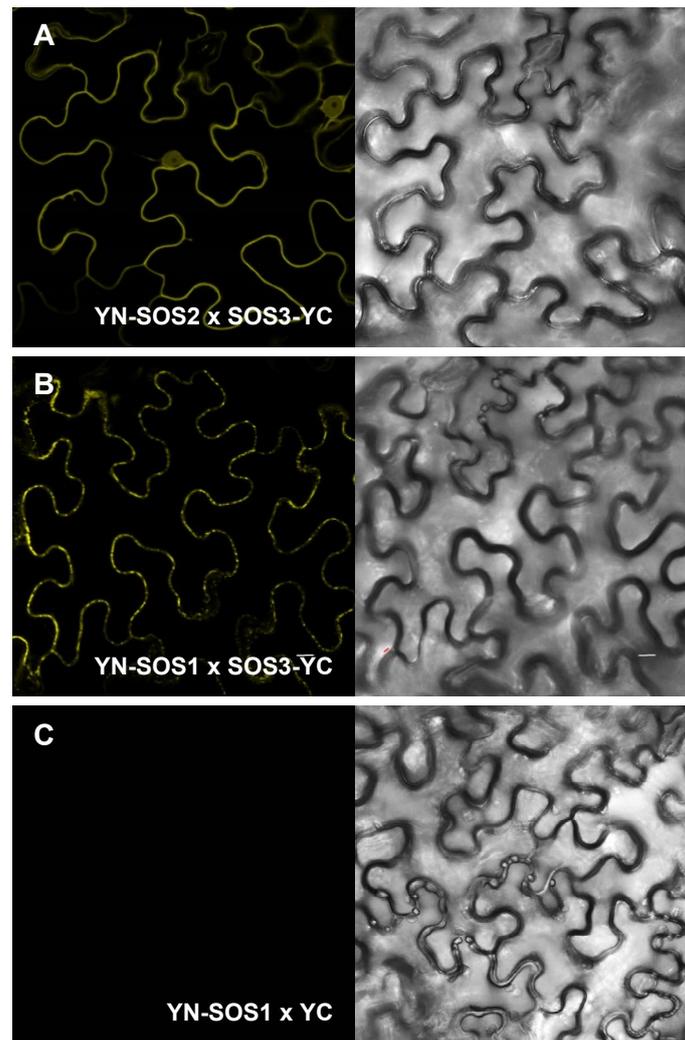


Figura R.1. Análisis de la interacción *SOS1/SOS3*. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando: **(A)** SPYNE173:*SOS2* y SPYCE(M)::*SOS3* (control positivo), **(B)** SPYNE173:*SOS1* y SPYCE(M)::*SOS3*, **(C)** SPYNE173:*SOS1* y SPYCE(M) vacío (control negativo).

Cuando se expresa la proteína SOS1 fusionada a GFP se puede observar que produce un marcado continuo de la membrana plasmática de la célula (Figura R.2A). Sin embargo, cuando se visualiza el homodímero de SOS1, utilizando la técnica de BiFC, la fluorescencia que se detecta no es uniforme, como en el caso anterior, si no que aparece en zonas aisladas de la membrana (Figura R.2B). Dada la similitud del patrón observado con la interacción SOS1/SOS3 con el que produce el homodímero de SOS1, es muy posible que SOS3 interactúe específicamente con el complejo dimérico SOS1, sugiriendo que SOS3 podría incluso a contribuir a la dimerización del transportador.

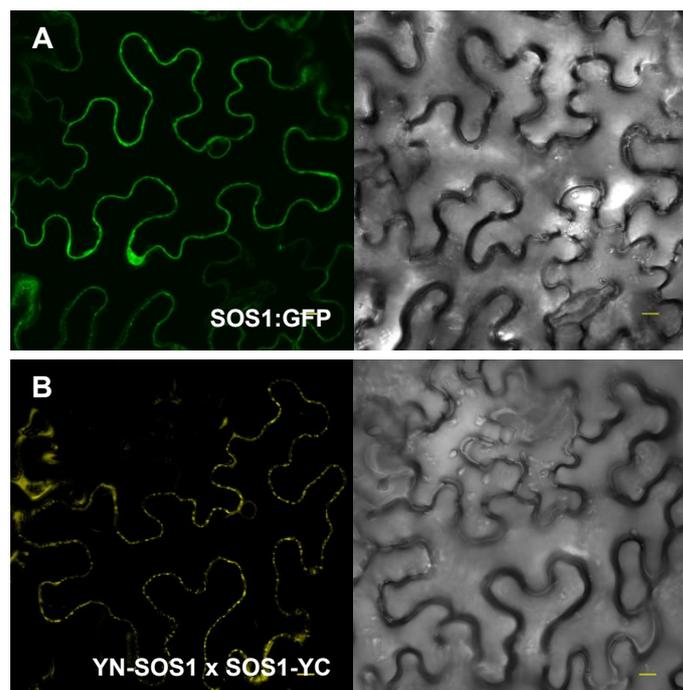


Figura R.2. Expresión y localización de la proteína SOS1 y del homo-dímero SOS1. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando: **(A)** pGPTV35S:SOS1:GFP, **(B)** SPYNE173::SOS1 y SPYCE(M)::SOS1.

Una vez demostrada la existencia de esta interacción, el siguiente paso consistió en determinar la zona de la proteína de SOS1 en la que se producía la unión a SOS3. Dado que era conocida la interacción del complejo SOS2/SOS3 con el dominio autoinhibidor de SOS1, que se localiza en los últimos 150 aminoácidos de la región C-terminal, este fragmento de la proteína era un candidato obvio como sitio de reconocimiento y unión de SOS3. En este sentido, la proteína SOS3 actuaría como nexo de unión físico, interactuando tanto con la quinasa SOS2 y como con su sustrato, SOS1.

Con objeto de demostrar esta hipótesis, se realizó un nuevo ensayo de BiFC pero en el sistema de levadura por ser este más rápido y sencillo técnicamente (M.10.2.). Para ello, se coexpresó el plásmido pYeBYC(M)::SOS3 con pYeBYN::SOS1 Δ 998, que produce una versión mutante de SOS1 carente del dominio autoinhibidor, en la cepa de levadura ANT5 (Δ ena1-4

$\Delta nha1 \Delta nhx1$). Como control positivo se incluyeron construcciones similares para detectar la interacción entre SOS2 y SOS3. Las colonias transformadas con los plásmidos para BIFC se seleccionaron en medio YNB sin leucina y sin triptófano. Las colonias obtenidas se inocularon en medio líquido y tras 24 horas creciendo a 30°C se observaron en el microscopio confocal. Como se observa en la Figura R.3, y en contra de lo esperado, se produce una clara reconstitución de la señal fluorescente, por lo que parece que la interacción de SOS1 con SOS3 es independiente del dominio autoinhibitorio de SOS1.

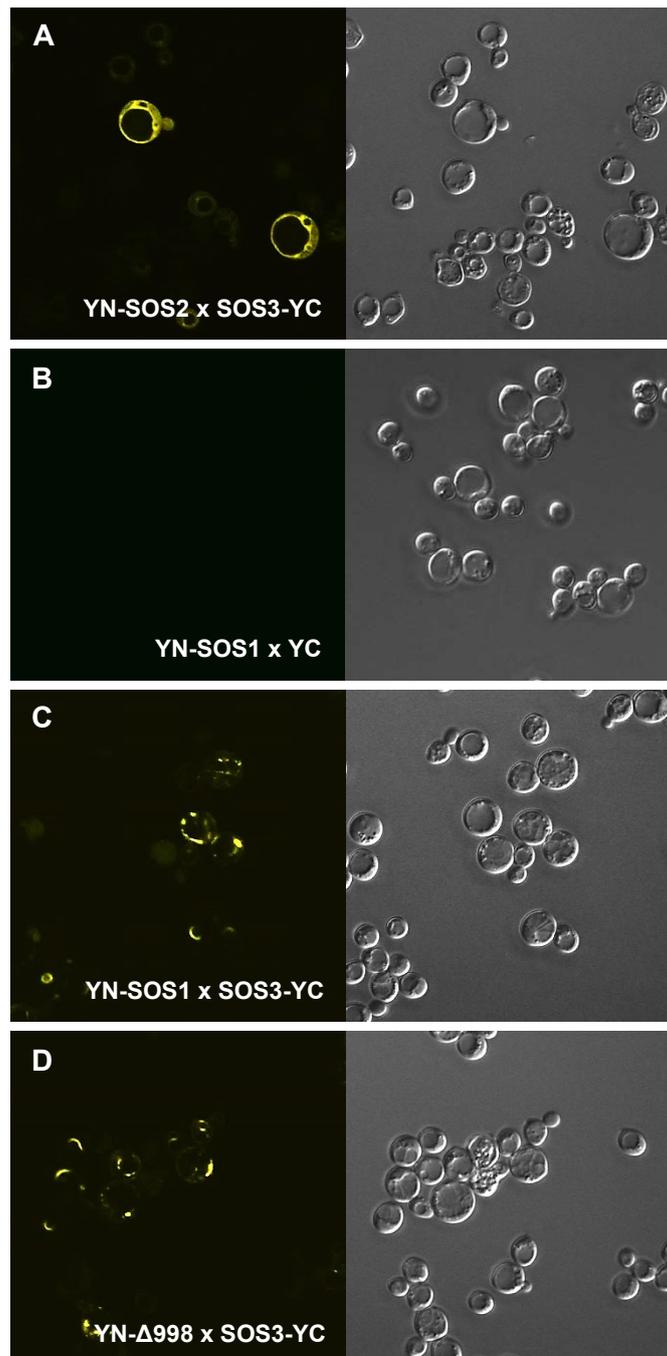


Figura R.3. Análisis de la interacción SOS1/SOS3 mediante BIFC de levaduras. Imágenes de microscopía confocal expresando: (A) pYeBYN::SOS2 y pYeBYC(M)::SOS3 (control positivo), (B)

pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M) vacío (control negativo), (C) pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M)::SOS3, y (D) pYeBYN::SOS1 Δ 998 y pYeBYC(M)::SOS3.

Debido a lo inesperado del resultado y para descartar artefactos asociados al uso de un sistema heterólogo, se repitió el ensayo de interacción *in planta*. El cDNA de *SOS1* truncado en el codón que codifica el aminoácido 998 (Q998Stop) se clonó en el vector pSPYNE173 y se coexpresó con *SOS3* clonado en el vector pSPYCE(M) en hojas de *N. benthamiana*. El resultado en plantas confirmó el obtenido en levaduras: la interacción entre *SOS1* y *SOS3* no se produce en el dominio autoinhibitorio de *SOS1*, donde sí tiene lugar la interacción con el complejo *SOS2/SOS3*, y debe ocurrir en un dominio no caracterizado (Figura R.4).

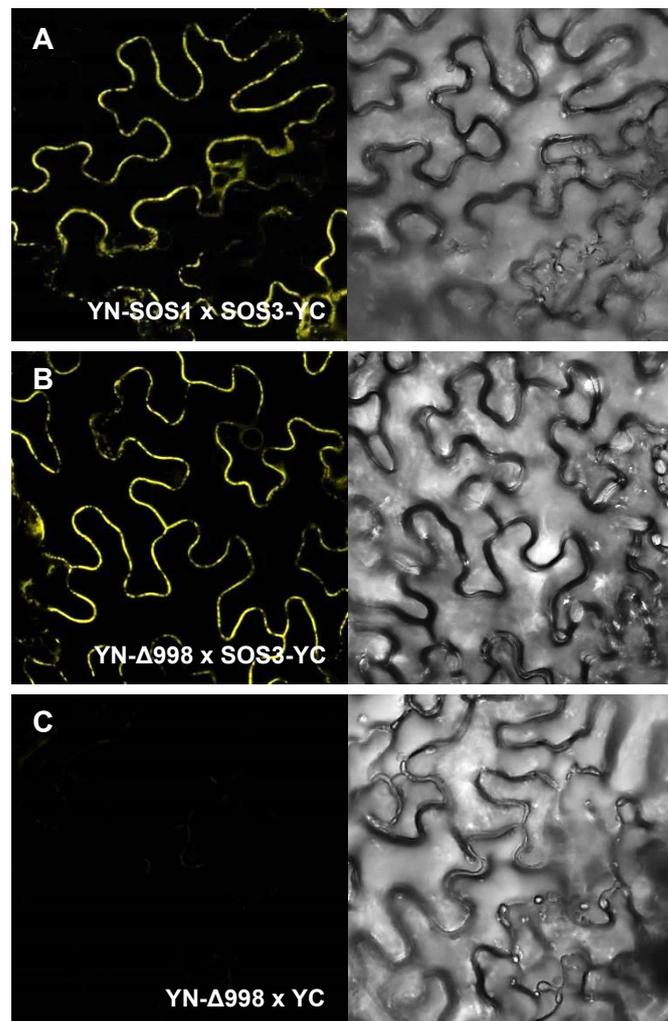
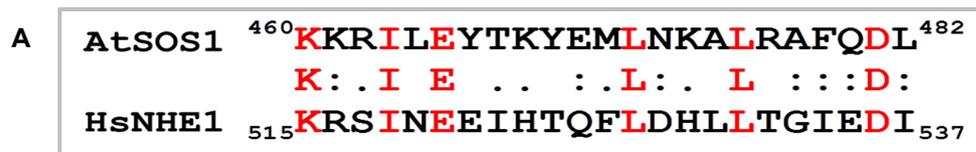


Figura R.4. Análisis de la interacción SOS1/SOS3 mediante BIFC de plantas. Imágenes de microscopía confocal expresando: (A) pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M)::SOS3 (control positivo), (B) pYeBYN::SOS1 Δ 998 y pYeBYC(M)::SOS3, (C) pYeBYN::SOS1 Δ 998 y pYeBYC(M) vacío (control negativo).

R.1.2. Localización de la interacción SOS1 con SOS3

Para determinar los mecanismos moleculares de la interacción y regulación de NHE1 por los sensores de Ca^{2+} CHP, dos laboratorios determinaron de manera independiente la estructura tridimensional del complejo formado por un fragmento de NHE1 y una proteína CHP. Ammar et al (2006) cristalizaron un fragmento de NHE1 que comprendía los aminoácidos 515 a 540 unido a CHP2, y Mishima et al (2007) resolvieron mediante resonancia magnética nuclear (NMR) la estructura formada por un segmento algo mayor de NHE1, que comprendía los aminoácidos 505 a 545, y la proteína CHP1. En ambos complejos, los residuos de NHE1 que participan en la interacción son los aminoácidos 518 a 537, los cuales forman una α -hélice que se inserta en un surco creado por los lóbulos N-terminal y C-terminal de la proteína CHP. Esta estructura se mantiene gracias a las interacciones hidrofóbicas entre ambos péptidos (Ammar et al., 2006, Mishima et al 2007). La α -hélice de NHE1 se localiza justo en el inicio de la región C-terminal citosólica y está formada por residuos hidrofóbicos que se orientan hacia una cara de la estructura y residuos con carga hacia el lado opuesto. Teniendo en cuenta esta información, se procedió a analizar la secuencia peptídica de SOS1 con objeto de identificar una región con estructura similar a la descrita en NHE1 que pudiera ser el dominio de unión a SOS3. Utilizando el programa Megalign (DNASTar) que permite hacer comparaciones de secuencias de proteínas, se detectó una región de SOS1 comprendida entre los aminoácidos 460 y 482, con una homología significativa a la α -hélice de NHE1 (Figura R.5A). Finalmente, se simuló la estructura helicoidal de este fragmento de SOS1 utilizando el programa Protean para comprobar si, al igual que en el caso de NHE1, presenta residuos hidrofóbicos orientados hacia un lateral de la hélice y residuos cargados hacia el lado opuesto. Como se puede observar en la Figura R.5B, la disposición de los aminoácidos hidrofóbicos, representados en círculos negros se localizan de una manera similar en NHE1 y en SOS1.



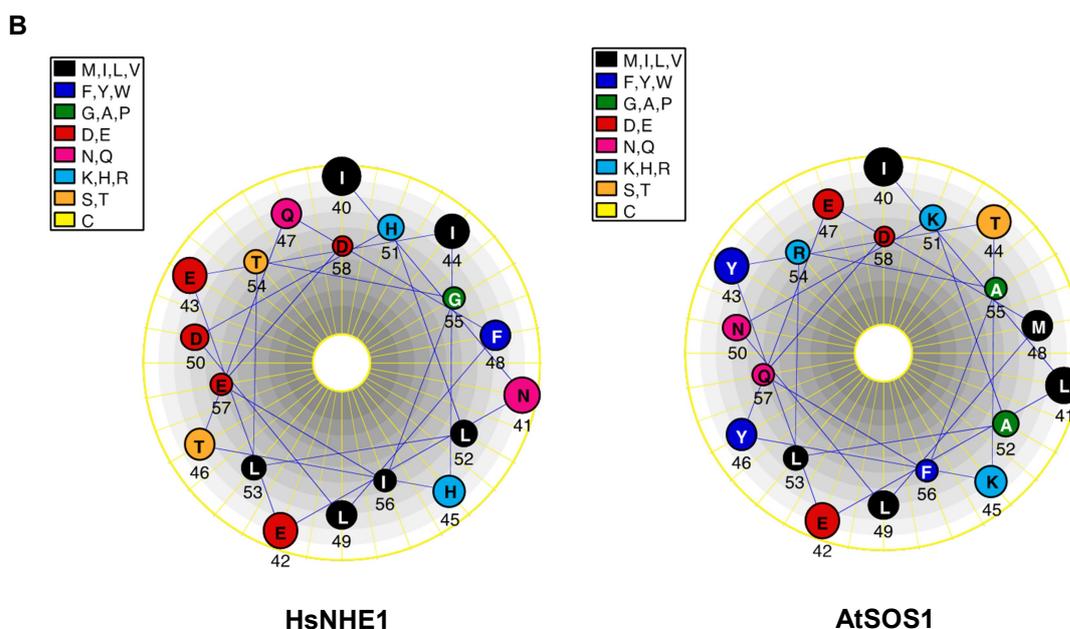


Figura R.5. Alineamiento del fragmento de unión de HsNHE1 a CHP2 y su secuencia homóloga en AtSOS1 y simulación de la disposición de estos aminoácidos en la α -hélice. (A) Los residuos conservados en las dos secuencias se destacan en rojo. Los residuos que han sido sustituidos por otros aminoácidos de propiedades similares se han señalado con dos puntos. **(B)** Simulación de la estructura helicoidal de la secuencia de aminoácidos de HsNHE1 (izquierda) y AtSOS1 (derecha).

Si la secuencia identificada es realmente la implicada en la interacción con SOS3, debería ser suficiente para reproducir la interacción y su eliminación en la proteína SOS1 haría que ésta se perdiera. Para comprobarlo, se realizaron experimentos de BiFC en levaduras. Mediante la técnica de PCR se amplificó el fragmento de SOS1 correspondiente al dominio de unión a SOS3 (*S3BD*, *SOS3 Binding Domain*) y se subclonó en el vector pYeBYN(R). Paralelamente, se eliminó, también mediante PCR, el fragmento que codifica el dominio S3BD del cDNA de *SOS1*. Este alelo mutante, denominado *SOS1 Δ S3BD*, se transfirió al vector YeBYN.

Se coexpresaron los plásmidos pYeBYN::*SOS1 Δ S3BD* (*SOS1* sin el supuesto dominio de unión a SOS3) o pYeBYN(R)::S3BD con pYeBYC::*SOS3* en la cepa de levadura ANT5 (Δ *ena1-4* Δ *nha1* Δ *nhx1*). Las células de levaduras transformadas se seleccionaron y se observaron en el microscopio confocal. Cuando eliminamos el probable dominio de unión de *SOS1* observamos que la interacción *SOS1/SOS3* se pierde, mientras que la interacción se produce cuando se expresó solo el fragmento S3BD de 23 aminoácidos fusionado al fragmento N-terminal de la YFP. Según este resultado, la secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 460 y 482 de *SOS1* es necesaria y suficiente para interactuar con *SOS3*, de forma similar al dominio de unión de *CHP* de la proteína *NHE1*.

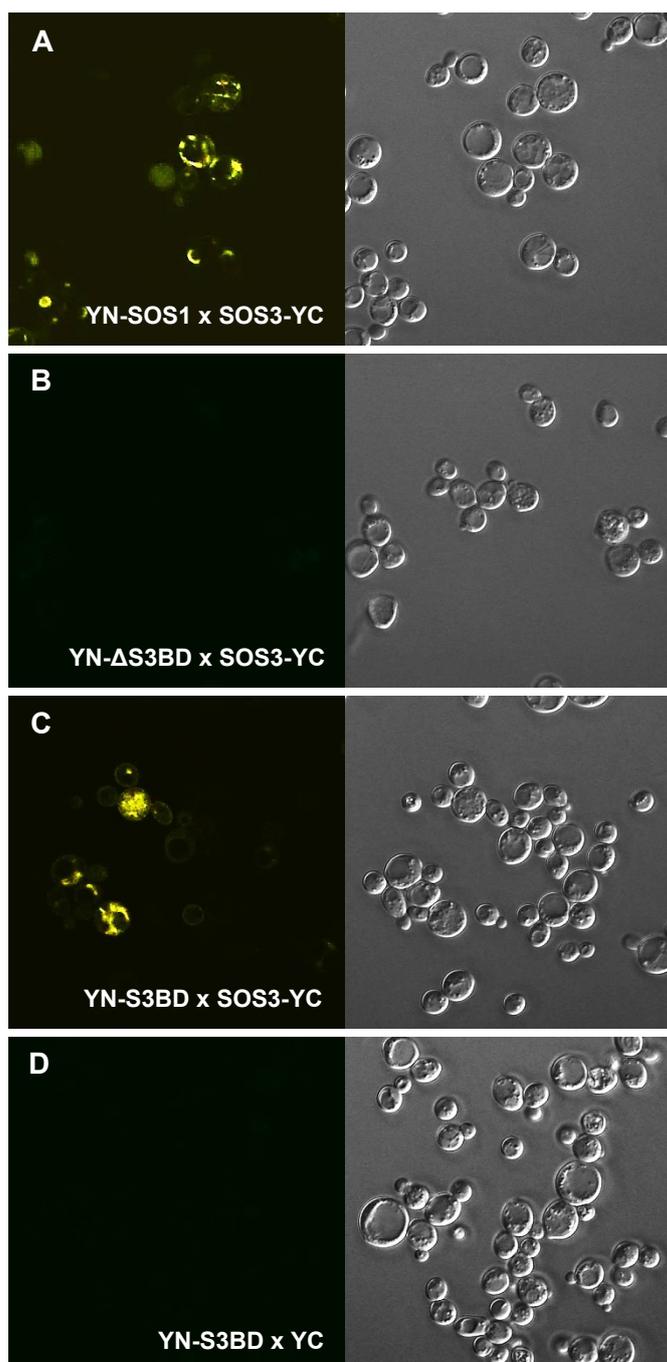


Figura R.6. Caracterización del dominio de unión de SOS3 en SOS1 mediante BIFC en levadura. Imágenes de microscopía confocal de células de la cepa ANT5 de *S. cerevisiae* expresando: **(A)** pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M)::SOS3, **(B)** pYeBYN::SOS1 Δ S3BD y pYeBYC(M)::SOS3, **(C)** pYeBYN(R)::S3BD y pYeBYC(M)::SOS3, y **(D)** pYeBYN(R)::S3BD y vector pYeBYC(M) vacío.

El resultado previo obtenido en el experimento de BiFC de levaduras se validó mediante un experimento de BiFC en plantas de *N. benthamiana*. Para ello se obtuvieron las construcciones equivalentes pSPYNE173::SOS1 Δ S3BD y pSPYNE(R)173::S3BD en vectores para plantas, que se coexpresaron con pSPYCE(M)::SOS3. El resultado de este experimento *in planta* fue idéntico al obtenido en el experimento de BiFC de levaduras. La interacción entre

SOS1 y SOS3 se perdió cuando se eliminó el dominio de unión de SOS1 a SOS3 y la expresión del dominio de unión de SOS1 fue suficiente para producir la interacción con SOS3.

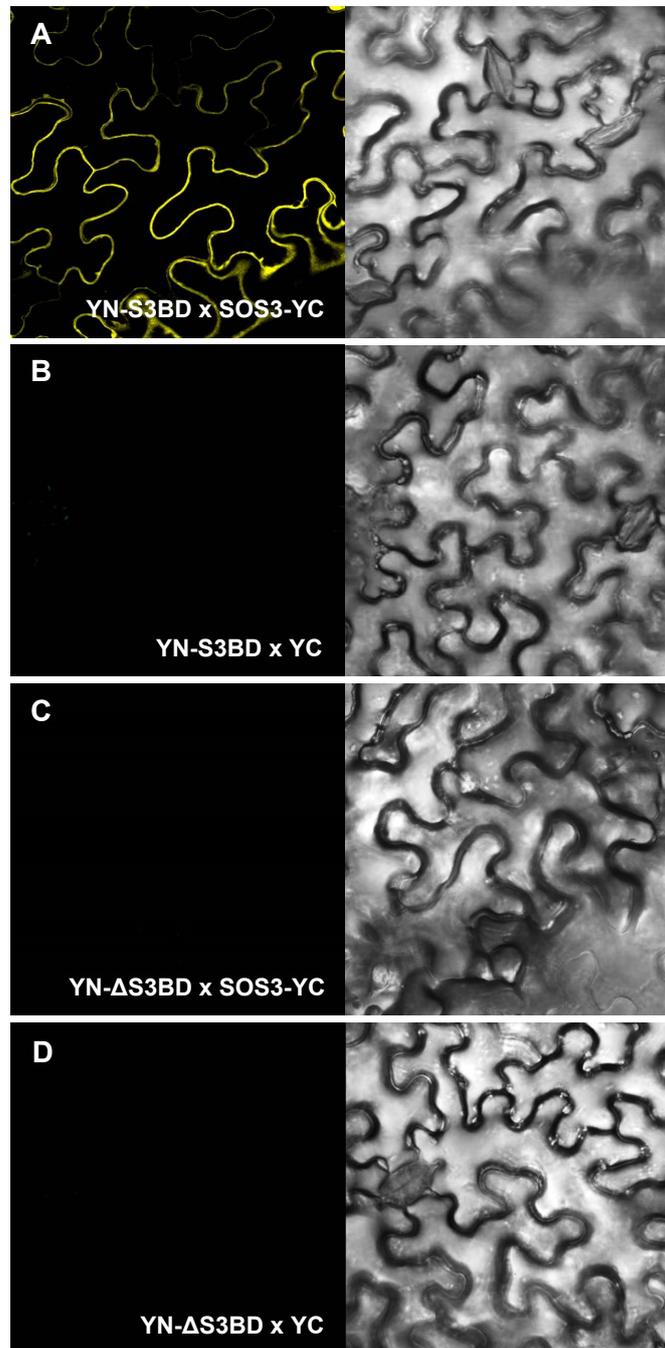
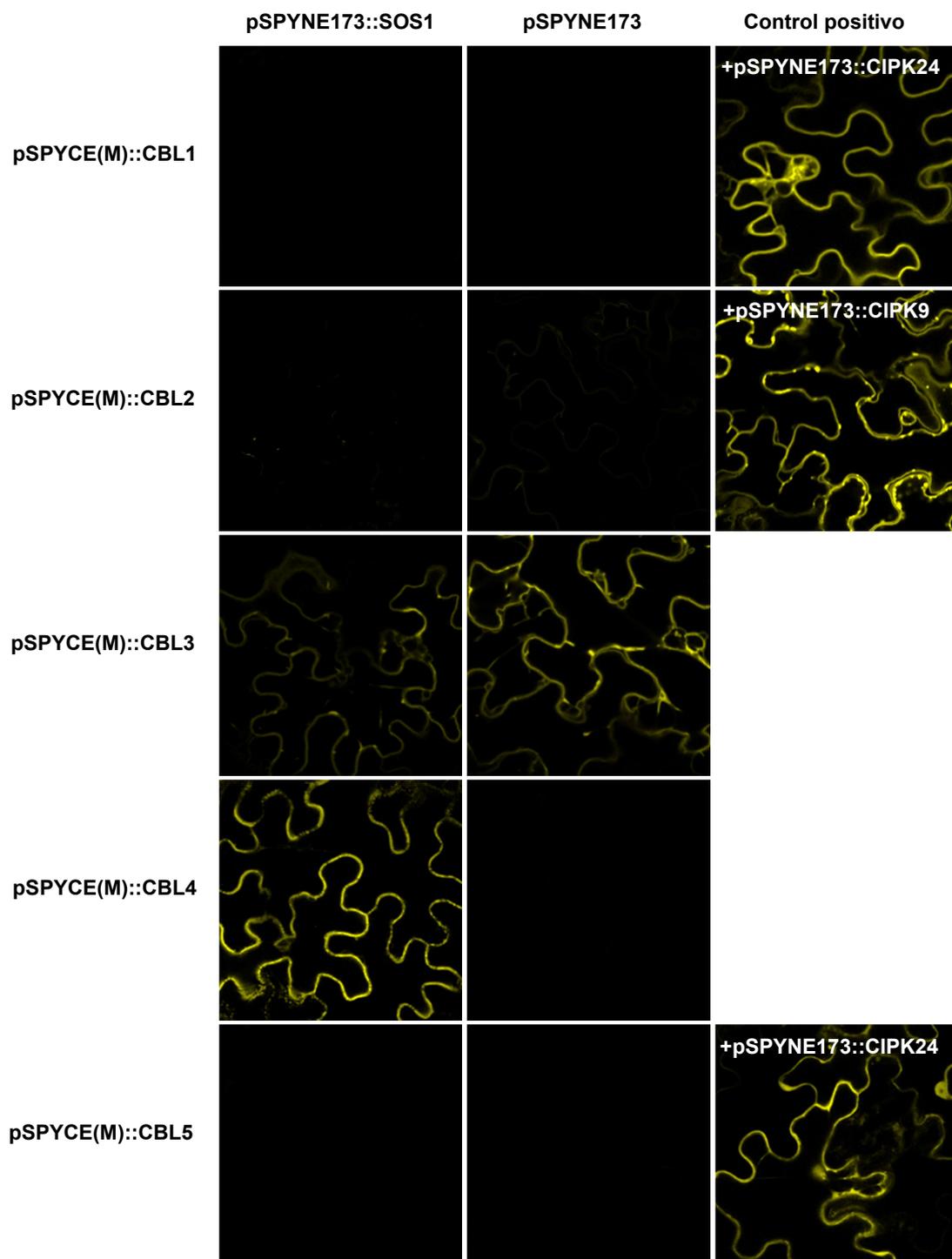


Figura R.7. Caracterización del dominio de unión de SOS3 en SOS1 mediante BIFC en planta. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando: **(A)** SPYNE173::S3BD y SPYCE(M)::SOS3, **(B)** SPYNE173::S3BD y SPYCE(M) vacío (control negativo), **(C)** SPYNE173::SOS1ΔS3BD y SPYCE(M)::SOS3, y **(D)** SPYNE173::SOS1ΔS3BD y SPYCE(M) vacío (control negativo).

R.1.3. Especificidad de la interacción SOS1/SOS3. Interacción con otras proteínas CBL

En células animales el transportador de sodio NHE1 es capaz de formar complejos con las tres proteínas que componen la familia de sensores de Ca^{2+} CHP. Para investigar si SOS1 también interacciona con el resto de proteínas de la familia CBL (10 miembros en *Arabidopsis*) se realizó un experimento de BiFC en plantas de *N. benthamiana*. Para ello se clonó cada una de las CBLs en el vector pSPYCE(M) y se coexpresaron con el plásmido pSPYNE173::SOS1. Como se muestra en las imágenes de microscopía confocal de la Figura R.8, SOS1 se unió de forma específica a CBL4(SOS3) y a CBL8. Por el contrario, no se observó interacción con CBL2, CBL5, CBL7, CBL9 y CBL10, que si interaccionaron cuando se utilizó una proteína CIPK como control positivo. En el caso de CBL3 y CBL6 el resultado no es totalmente concluyente, ya que se observa una ligera fluorescencia en presencia de SOS1, pero dado que también aparece, y con mucha más intensidad, cuando se coexpresan con el vector pSPYNE173 vacío, podría considerarse un falso positivo; no obstante habría que mejorar las condiciones de este experimento para descartar estas interacciones.

El resultado muestra que la interacción SOS1/SOS3 es muy específica y refleja probablemente una función importante de este complejo en la regulación de la homeostasis de Na^+ en planta. La otra proteína que interacciona con SOS1 es CBL8, que es el miembro de la familia de sensores de Ca^{2+} CBL con mayor similitud de secuencia con SOS3 (62,1% de identidad). Hasta la fecha se desconoce la función de CBL8, pero teniendo en cuenta la especificidad de la interacción, es muy posible que también participe en la regulación del transporte de Na^+ , quizá sustituyendo a SOS3. En este sentido es importante tener en cuenta que SOS3 se expresa de forma preferente en la raíz, mientras que SOS1 se expresa alrededor de los haces vasculares, tanto de la raíz como de las hojas.



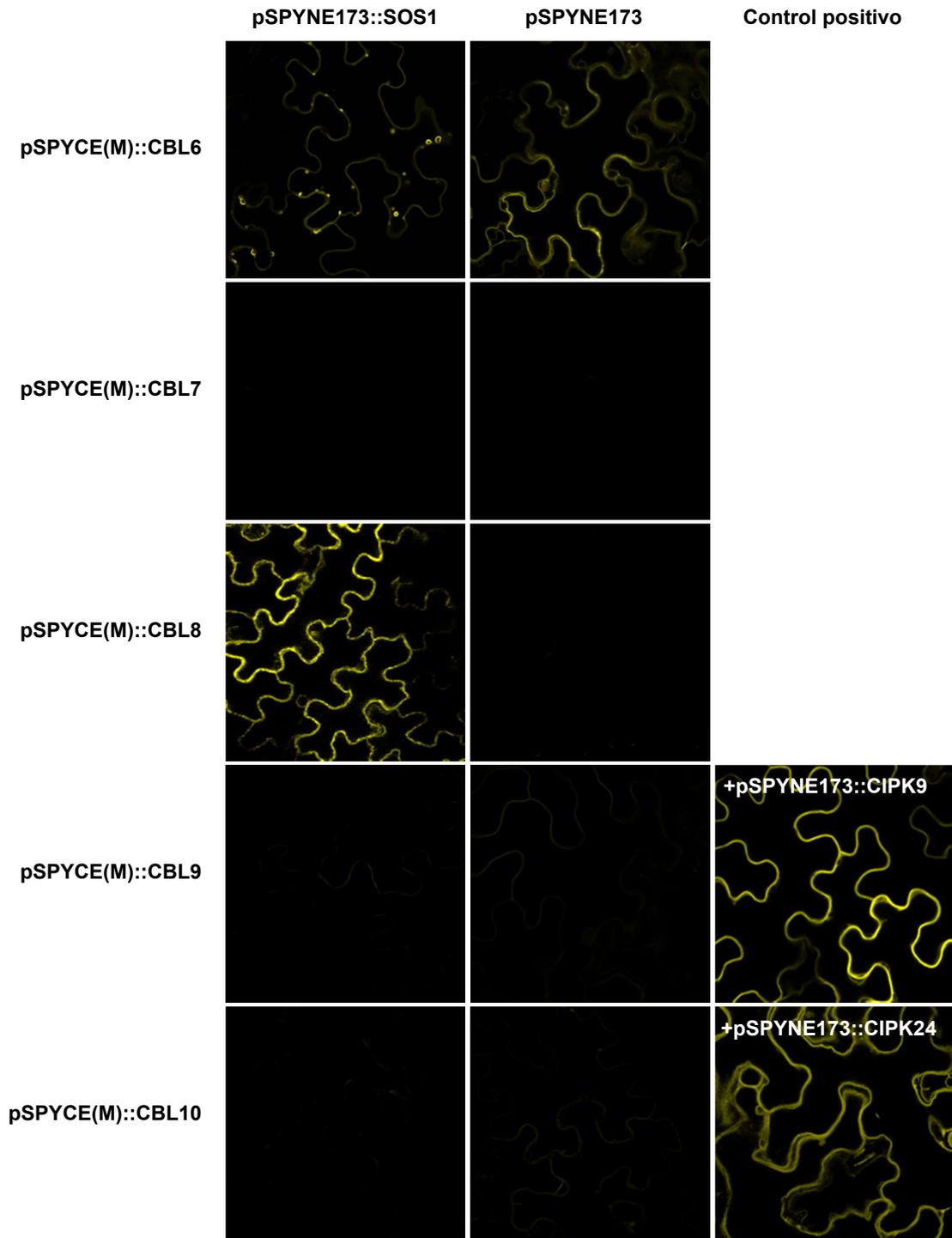


Figura R.8. Análisis de la interacción *in planta* de SOS1 con todas las proteínas de la familia CBL. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando pSPYNE173::SOS1 con cada una de las CBLs en el vector pSPYCE(M).

R.1.4. Caracterización funcional en *S. cerevisiae* de la interacción SOS1 y SOS3

El sistema de expresión en levadura ha sido de gran utilidad para el aislamiento y caracterización funcional de proteínas de varios organismos y especialmente para el estudio de proteínas de transporte en plantas (Dreyer et al., 1999). En levaduras, la extrusión de Na^+ del citosol se lleva a cabo por las ATPasas de Na^+ ScENA1-4 y el antiportador $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ ScNHA1, ambos situados en la membrana plasmática (Haro et al., 1991; Wieland et al., 1995; Bañuelos et al., 1998), mientras que el antiportador prevacuolar $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ ScNHX1 se encarga de su acumulación interna (Nass et al., 1997; Darley et al., 2000; Quintero et al., 2000). La cepa de levaduras ANT5 ($\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$, $\Delta nhx1$) carece de estos transportadores por lo que es incapaz de crecer en medios con una concentración superior a 70 mM de NaCl (Quintero et al., 2002). La expresión en esta cepa del transportador de Na^+ de la membrana plasmática SOS1 es capaz de suprimir parcialmente el fenotipo de halosensibilidad de la levadura, efecto que se incrementa considerablemente por la coexpresión con el complejo SOS2/SOS3.

Los resultados obtenidos en los experimentos de BiFC realizados en levadura y en planta, desvelan la interacción física entre SOS1 y SOS3, pero se desconoce las consecuencias funcionales de la misma. Con objeto de caracterizar la función del complejo formado por SOS1 y SOS3, se clonó el alelo mutante *SOS1 Δ S3BD* (que porta una delección del cDNA que codifica los 23 aminoácidos responsables de la interacción con SOS3) y el alelo silvestre *SOS1* en el vector de expresión en levadura pYPGE15 y ambos se coexpresaron en la cepa ANT5 de *S. cerevisiae*, en presencia y ausencia de los cDNAs que codifican SOS2 y SOS3 (Figura R.9). La expresión de la proteína mutante *SOS1 Δ S3BD* no complementó el fenotipo de halosensibilidad a 200 mM de NaCl, pero lo suprimió parcialmente a 100 mM de NaCl, efecto que se incrementó considerablemente cuando se coexpresó con el complejo SOS2/SOS3. La proteína silvestre *SOS1*, usada como control, fue incapaz de crecer a una concentración de 100 mM de NaCl, mostrando una halotolerancia comparable a la observada en los controles transformados con el vector pYPGE15 vacío. La coexpresión de *SOS1* con el complejo SOS2/SOS3 sí complementó fenotipo de halosensibilidad de la levadura como se esperaba.

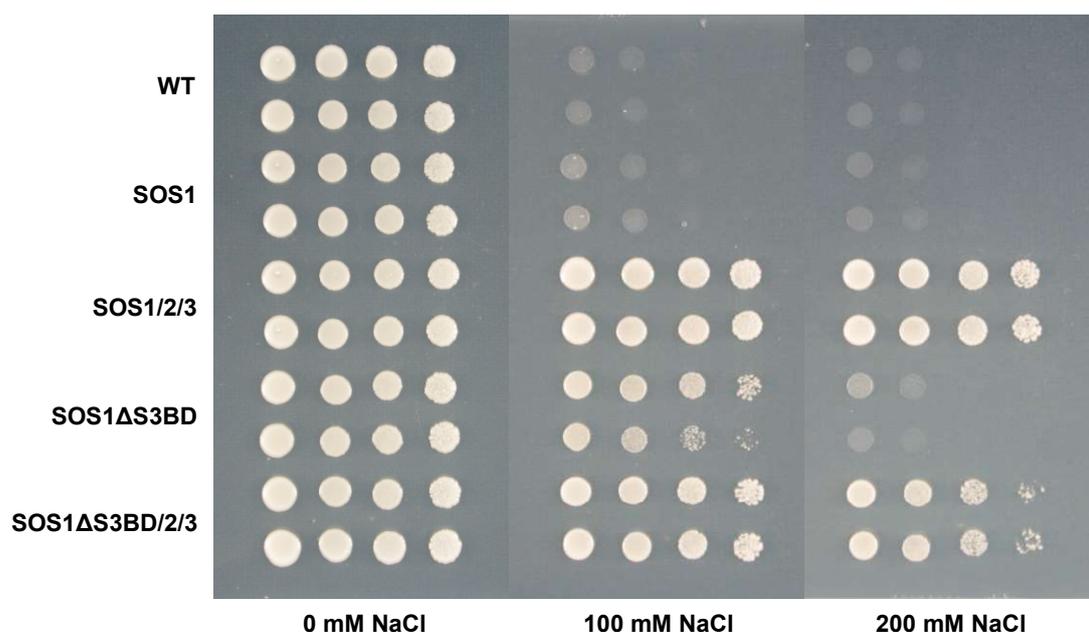


Figura R.9. Caracterización funcional de la interacción directa de SOS1 con SOS3 en levadura.

Transformantes de la cepa halosensible ANT5 de levadura expresando el alelo mutante *SOS1ΔS3BD* con y sin el complejo SOS2/SOS3. Se inocularon gotas de 5 μ l de diluciones decimales seriadas en placas con medio AP normal y suplementado con 100 y 200 mM de NaCl, y se incubaron a 28 $^{\circ}$ C.

Estos resultados indican que la ausencia del dominio de unión de SOS1 a SOS3 no afecta al proceso de activación de SOS1 por el complejo SOS2/SOS3 a concentraciones altas de NaCl. No obstante, a concentraciones bajas/moderadas de sal y en ausencia de SOS2/SOS3, la falta de este dominio sí que se traduce en una mejora de la actividad basal de SOS1, lo que sugiere un papel inhibitor del dominio S3BD.

Con el fin de comprobar si la unión a SOS3 podría restar actividad transportadora a SOS1, se realizó un experimento de complementación en levadura donde se usó la proteína silvestre y el mutante de SOS1 truncado en el aminoácido 998 (*SOS1Δ998*), que da lugar a una proteína hiperactiva e independiente del complejo SOS2/SOS3. Se clonó el cDNA de *SOS1* y del alelo hiperactivo *SOS1Δ998* en el vector de expresión en levadura pYPGE15 y se coexpresaron junto con *SOS3* clonado en el vector p425GPD en la cepa ANT5 de *S. cerevisiae*. Como puede observarse en la Figura R.10, las levaduras que expresan el alelo silvestre o el hiperactivo *SOS1Δ998* junto con *SOS3* no mostraron una menor tolerancia a sal comparadas con aquellas que expresaban solo el alelo *SOS1Δ998*. Según este resultado, no parece que la interacción directa con SOS3 se traduzca en una inhibición de la actividad transportadora de Na^+ de SOS1.

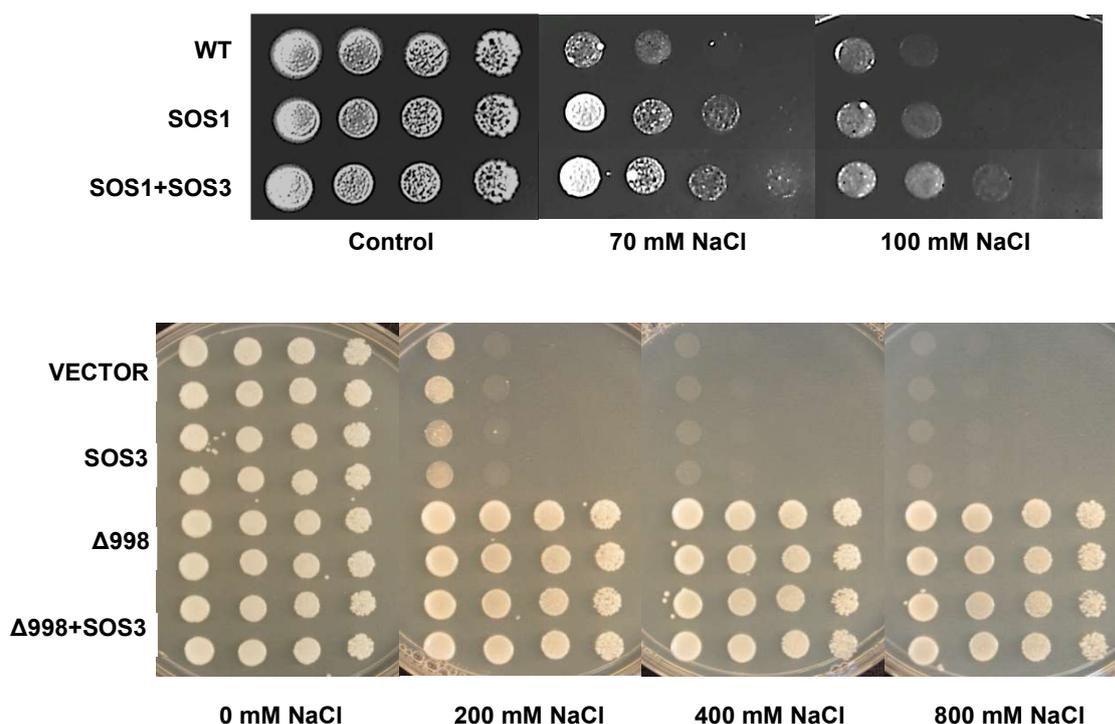


Figura R.10. Efecto de la sobreexpresión de SOS3 sobre la tolerancia a salinidad impartida por el transportador SOS1 y su versión hiperactiva SOS1 Δ 998. Transformantes de la cepa halosensible ANT5 de levadura expresando: el alelo SOS1 silvestre con y sin SOS3 en placas de medio AP normal y suplementado con 70 y 100 mM de NaCl (panel superior); y el mutante hiperactivo SOS1 Δ 998 con y sin SOS3 en placas de medio AP normal y suplementado con 200, 400 y 800 mM de NaCl (panel inferior). Se inocularon 5 μ l de diluciones decimales seriadas en las placas indicadas en cada caso y se incubaron a 28 $^{\circ}$ C.

R.1.5. Caracterización funcional *in planta* de la interacción SOS1/SOS3

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican que la interacción SOS1/SOS3 podría tener una función diferente a la regulación directa del transporte de Na⁺ de SOS1. En el caso de células animales, se ha demostrado que la interacción de CHP3 con el antiporte NHE1 promueve la maduración biosintética y la estabilidad en la membrana plasmática del transportador (Zaun et al., 2008). Si SOS3 actuase de manera similar a CHP3, podría explicar los resultados previos obtenidos en levadura. La pérdida del dominio de unión a SOS3 podría incrementar la cantidad de SOS1 que llega a la membrana, y por eso se registra un ligero incremento de la tolerancia a NaCl, mientras que el incremento de la proteína en la membrana no tiene efectos perceptibles sobre el fenotipo de tolerancia cuando se utiliza una versión hiperactiva de SOS1.

Para comprobar esta hipótesis se decidió comparar la distribución de SOS1 en la línea mutante de *Arabidopsis sos3-1* y su correspondiente silvestre. Esta planta mutante produce una proteína SOS3 no funcional debido a una deleción en el locus SOS3 que elimina tres aminoácidos esenciales del tercer dominio “EF-hand” e impiden la unión de Ca²⁺ (Liu y Zhu,

1998). La pérdida de la capacidad de sensor Ca^{2+} hace que *sos3-1* sea incapaz de interactuar con SOS2 (Ishitani et al., 2000) y presumiblemente, tampoco se uniría a SOS1. Antes de estudiar la localización de SOS1 en el fondo mutante *sos3-1*, se comprobó mediante la técnica de BiFC si la interacción de SOS1 con SOS3-1 se producía. Como muestra la Figura R.11, la proteína mutante SOS3-1 no forma complejo con el transportador SOS1.

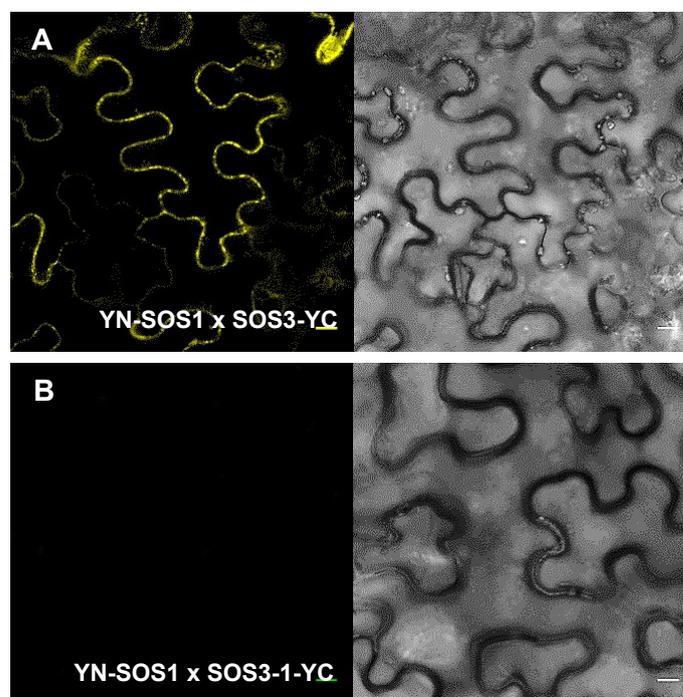


Figura R.11. Análisis de la interacción de SOS1 con la proteína mutante SOS3-1 mediante BiFC en plantas. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando: **(A)** pSPYNE173::SOS1 y pSPYCE(M)::SOS3, **(B)** pSPYNE173::SOS1 y pSPYCE(M)::SOS3-1.

Para estudiar la localización subcelular de SOS1 dependiente de SOS3, se hizo una fusión de su región codificante de la copia genómica de *SOS1* conteniendo los primeros 13 intrones al cDNA de *GFP* para conseguir una fusión traduccional SOS1:GFP. La expresión de esta fusión se puso bajo el control del propio promotor del gen *SOS1* para conseguir un patrón de expresión del transgen similar a la del gen nativo. Con esta construcción se transformaron plantas silvestres Col-0 y mutantes *sos3-1* y se obtuvieron plantas transgénicas homocigotas en ambos casos. En un primer análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia se pudo observar que la máxima señal aparecía en los meristemos apicales de la raíz, lo que coincidía con los resultados publicados para la localización de la expresión de SOS1, utilizando una fusión de su promotor al gen reportero *GUS* (Shi et al., 2002).

A continuación se estudió la localización subcelular de SOS1 en los meristemos de la raíz de plantas silvestres y mutantes *sos3-1* crecidas en medio MS1/2 en ausencia o presencia de 50 mM de NaCl. En las células silvestres, en el medio control, se observó localización de SOS1:GFP en la membrana plasmática, pero también en pequeños puntos distribuidos por el

citoplasma que tiene un patrón coincidente con la del retículo endoplásmico. En el mutante *sos3-1* la localización fue similar, quizá con menor intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática. En cambio, después de mantener las plantas en presencia de 50 mM NaCl durante dos días, se encontraron evidentes diferencias en la localización de SOS1:GFP entre el silvestres y el mutante *sos3-1*. Mientras que en las células del meristemo de las plantas Col-0, la señal de SOS1:GFP era clara en la membrana plasmática, en las células del mutante, ésta había casi desaparecido de ella. Este resultado indica que la interacción SOS1/SOS3 es necesaria para mantener al antiportador SOS1 en la membrana plasmática en condiciones de estrés salino. Queda por determinar si SOS3 confiere estabilidad a SOS1, evitando su degradación, o bien SOS3 es requerida para el tráfico de SOS1 desde el retículo a la membrana plasmática.

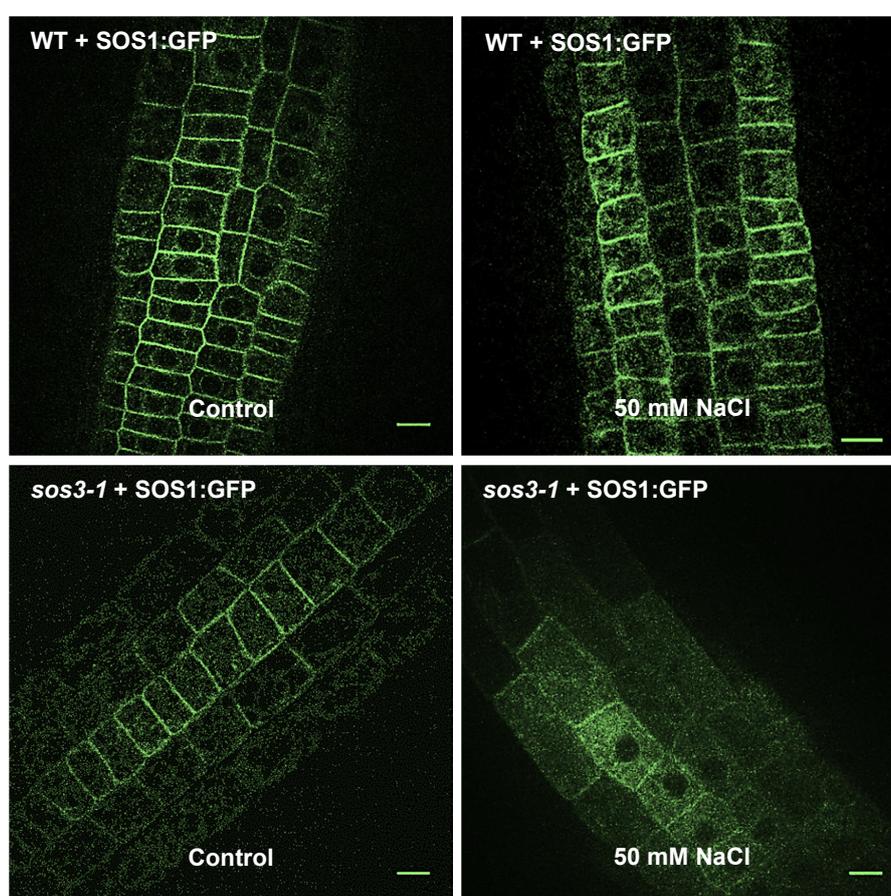


Figura R.12. Localización subcelular de la proteína SOS1 fusionada a GFP en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Las imágenes muestran raíces de plántulas silvestres y mutantes *sos3-1* transformadas con SOS1-GFP, en condiciones normales y después de un tratamiento con 50 mM de NaCl.

CAPÍTULO II

R.2. Modificaciones postraduccionales de SOS3

Las proteínas pueden sufrir numerosas modificaciones una vez sintetizadas, que se denominan modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones constituyen un mecanismo esencial de regulación de su actividad biológica ya que inducen una gran variedad de cambios estructurales y funcionales. Las modificaciones postraduccionales tienen importantes efectos moduladores y pueden conllevar a la activación o desactivación de su función, determinar su localización celular, alterar su capacidad para interactuar con otras proteínas o dictar que la proteína debe ser degradada.

La naturaleza de las modificaciones postraduccionales es muy variada. Las proteínas pueden sufrir oxidaciones, glicosilaciones, acetilaciones, proteólisis, unión de moléculas lipídicas, fosforilaciones, unión covalente de otras proteínas pequeñas, etc. Si tenemos en cuenta estas transformaciones, la variedad de estructuras y funciones de las proteínas aumenta dando lugar a una gran cantidad de especies diferentes que pueden desempeñar multitud de funciones en las células (Pérez-Sala, 2012).

Muchas de las proteínas de la familia CBL, entre ellas SOS3(CBL4), sufren modificaciones postraduccionales como la acilación (miristoilación y/o palmitoilación) (Batistic et al., 2008) o la fosforilación (Hashimoto et al., 2012), que pueden influenciar en su función biológica y su asociación con las membranas celulares. La acilación es una modificación lipídica que por lo general facilita la asociación de las proteínas con las membranas celulares y favorece que ejerzan su función en compartimentos celulares específicos. También la fosforilación de proteínas, mediada por proteínas quinasas, es una modificación postraducciona con una gran importancia reguladora, que forma parte de los mecanismos habituales para controlar el estado de funcionamiento de la proteína.

Las consecuencias de estas modificaciones sobre la función y localización de SOS3 han sido poco o nada estudiadas. Por ello, se decidió hacer un análisis detallado del efecto que tienen las acilaciones, el dominio poli-Lisinas específico de SOS3 y la fosforilación por CIPKs sobre las propiedades funcionales de SOS3.

R.2.1. Acilación y dominio de poli-Lisinas de SOS3

Se han descrito varios mecanismos que contribuyen a la asociación de los sensores de calcio con las membranas celulares. La unión a membrana puede ocurrir a través de dominios transmembrana, interacciones electrostáticas o mediante la modificación lipídica de las proteínas. Varias proteínas sensoras de calcio, como la unidad reguladora CNB de calcineurina y el grupo de los sensores de calcio neuronales (NCS), experimentan una modificación lipídica mediante miristoilación irreversible de su extremo N-terminal (Burgoyne y Weiss, 2001). La unión de un ácido mirístico suele ser suficiente para el anclaje de proteínas solubles a las membranas biológicas. Sin embargo, la asociación de las proteínas miristoiladas a la

membrana, a menudo requiere factores adicionales que permitan un contacto más cercano con la membrana plasmática. Estos factores pueden incluir la presencia de un dominio polibásico, capaz de interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos que componen las membranas celulares (Resh, 1999; Greaves y Chamberlain, 2007), la prenilación de la proteína en el extremo C-terminal o la S-acilación de la proteína (Greaves y Chamberlain, 2007). La S-acilación, más comúnmente denominada palmitoilación, implica la unión reversible de ácidos grasos, usualmente ácido palmítico, a residuos de cisteína permitiendo así el anclaje de las proteínas a la cara citoplasmática de las membranas celulares (Huang y El-Husseini, 2005). Se ha demostrado que la palmitoilación regula la actividad de varias proteínas y la localización de elementos clave de la señalización celular (Bijlmakers y Marsh, 2003; Rocks, 2005; Sorek et al., 2007).

Comparando las secuencias N-terminales de proteínas miristoiladas conocidas y estudiando la especificidad del sustrato de las miristoil transferasas, Towler et al. (1988) identificaron una secuencia consenso para la miristoilación, MGXXXS/T(K).

A diferencia de la miristoilación, no se ha definido claramente una secuencia consenso para la palmitoilación, más allá del requisito imprescindible del residuo de cisteína que sirve de aceptor. Sin embargo, un estudio reciente de Hemsley et al. (2013) identificó más de 500 proteínas objeto de palmitoilación en suspensiones de células de la raíz de *A. thaliana*, un número muy superior a las proteínas susceptibles de miristoilación identificadas en esta planta.

La proteína SOS3 posee la secuencia consenso para la miristoilación de su extremo N-terminal (**MGCSVSKKKK**) (Liu y Zhu, 1998) y un residuo de cisteína adyacente que podría ser un candidato para la palmitoilación. Estudios anteriores han demostrado que SOS3(CBL4) se miristoila *in vitro* y que esta miristoilación es necesaria para la activación de SOS1 y por tanto para la tolerancia a salinidad, aunque se desconocen las razones por las que esta acilación es esencial (Ishitani et al., 2000).

Para estudiar en detalle las modificaciones lipídicas de SOS3 *in vivo*, se realizó un análisis del perfil de ácidos grasos asociados a esta proteína. Para ello, se etiquetó la proteína SOS3 con una cola de poli-His en su extremo C-terminal y se expresó en levadura. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad y posteriormente se sometió a una hidrólisis combinada básica y ácida, para liberar los ácidos grasos que finalmente fueron metilados para su caracterización mediante cromatografía de gases. Este análisis determinó la presencia de ácido mirístico (C14:0) y de ácido palmítico (C16:0), lo que demuestra que SOS3 sufre una doble modificación lipídica, mediante miristoilación y palmitoilación. Además de ácido palmítico, se detectaron otros ácidos grasos con cadenas de 16 y 18 átomos de carbono y diferente número de insaturaciones, lo que confirma que las protein S-acyl transferasas (PATs) transfieren varios tipos de ácidos grasos C16 y C18 (Hurst y Hemsley, 2015).

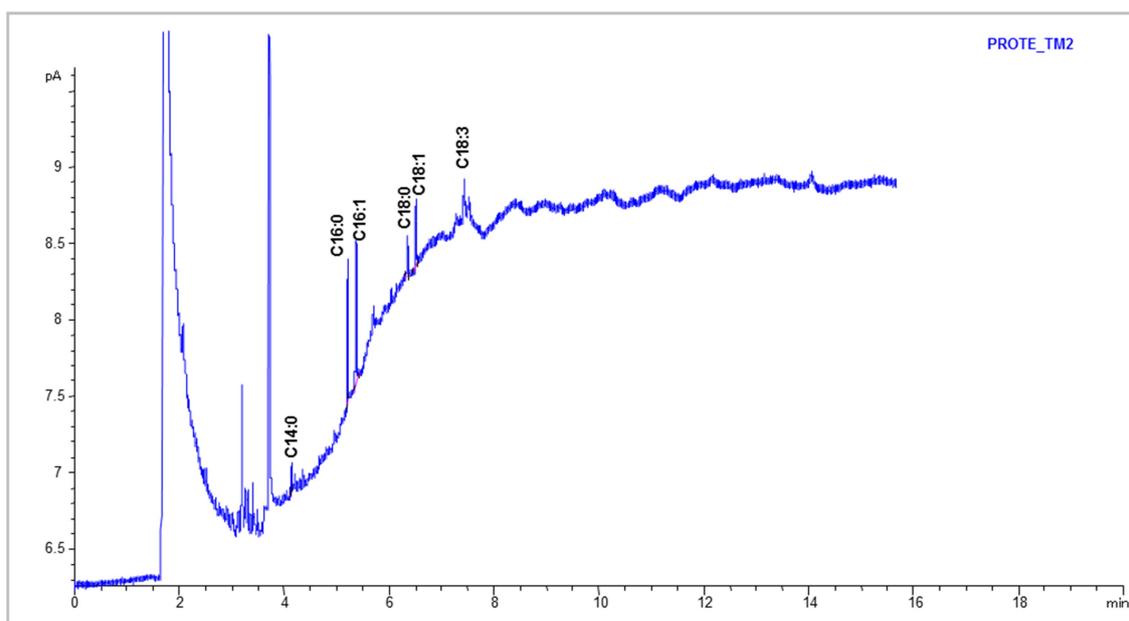


Figura R.13. Perfil de ácidos grasos de SOS3 analizado por cromatografía de gases. Las especies detectadas fueron ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido linolénico (C18:3).

Además de los motivos de acilación, SOS3 también posee una secuencia de poli-lisinas (poli-K) entre los aminoácidos 6 y 12 que no se encuentra en ninguna otra proteína de la familia CBL pero que está muy conservada en las proteínas CBL4 de varias especies vegetales. Estas lisinas pueden contribuir a la asociación de SOS3(CBL4) con membranas celulares mediante interacciones electroestáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos que la componen (Monné et al., 1998; Killian y Von Heijne, 2000).

Para determinar cómo las acilaciones de SOS3(CBL4) y su dominio de poli-lisinas afectan tanto a su función como a su localización subcelular se construyeron alelos mutantes de SOS3 que impidieran estas modificaciones. Para ello, se sustituyó la glicina en posición 2 y la cisteína en posición 3 por residuos de alanina para bloquear la miristoilación (G2A) y la palmitoilación (C3A), respectivamente, y por último, se sustituyó el dominio polibásico formado por 5 lisinas por 5 alaninas (mutante KA).

R.2.2. Fosforilación de SOS3

Las proteínas sensoras CBL interactúan con las proteínas quinasas CIPK a través del dominio NAF situado su extremo carboxiterminal regulatorio (Albrecht et al., 2001). El dominio NAF lleva a cabo una función autoinhibitoria sobre la actividad quinasa y la unión de la CBL produce un cambio conformacional que activa a la quinasa (Guo et al., 2001; Gong et al., 2002). Estudios recientes han identificado un nuevo mecanismo de regulación de los complejos CIPK/CBL mediante el cual las proteínas CBL son fosforiladas en su extremo carboxilo terminal por sus proteínas CIPKs interactoras, provocando una serie de cambios conformacionales que

incrementan la especificidad y la actividad de los complejos CIPK/CBL hacia sus proteínas diana (Lin et al 2009; Hashimoto et al., 2012). Así pues las proteínas CBL no solo regulan la actividad quinasa de las proteínas CIPK, sino que también ellas mismas son sustrato para las quinazas con las que interaccionan.

Se ha demostrado que la proteína SOS2(CIPK24) fosforila a SOS3(CBL4) y a CBL10, mientras que CIPK23 fosforila a CBL1. En los tres casos, esta fosforilación ocurre en un residuo de serina próximo al final de la proteína (Lin et al 2009; Hashimoto et al., 2012). Este aminoácido está muy conservado y aparece en 8 de las 10 proteínas que componen la familia CBL de *Arabidopsis*; en CBL5 aparece en la misma posición un residuo de treonina que también es susceptible de fosforilación. CBL6 es el único miembro de la familia que carece de un residuo fosforilable en esa posición (ver Figura R.14).

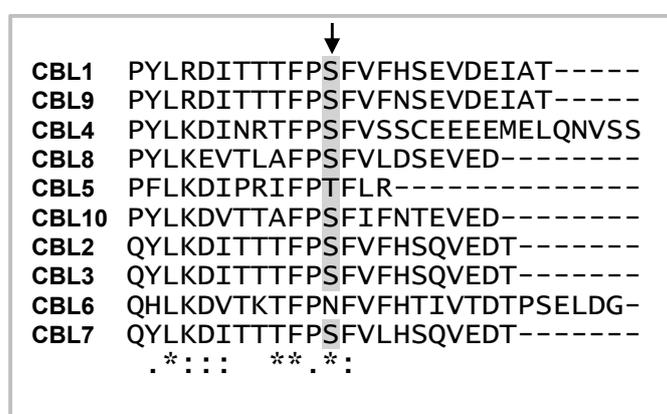


Figura R.14. Alineamiento de la región C-terminal de las proteínas CBLs de *A. thaliana*. El residuo de serina fosforilable por CIPK está señalado con una flecha. Los aminoácidos semiconservados, conservados y coincidentes en todas las proteínas CBL están señalados con un punto, dos puntos y un asterisco respectivamente.

Con el fin de determinar la importancia de la fosforilación de la proteína SOS3 para su función, se realizó una mutagénesis dirigida del cDNA de SOS3 para sustituir la serina 205 que es fosforilada por SOS2 por un aspártico (S205D), que mimetiza la fosforilación, y por una alanina, un aminoácido que impide la fosforilación (S205A).

R.3. Consecuencias funcionales de las modificaciones postraduccionales de SOS3

R.3.1. Caracterización funcional en *S. cerevisiae* de los alelos mutantes de SOS3

El sistema SOS puede ser reconstituido en una cepa de levadura halosensible, carente de sus sistemas endógenos de transporte de Na^+ , produciendo un notable aumento de su tolerancia a NaCl (Quintero et al., 2002; Quan et al., 2007; Lin et al., 2009). Este sistema

proporciona una aproximación rápida y sencilla para analizar la capacidad de los diferentes alelos mutantes de *SOS3* de reconstituir funcionalmente la ruta SOS. Las proteínas mutantes *SOS3*-G2A (no miristoilable), *SOS3*-C3A (no palmitoilable) y *SOS3*-KA (sin el dominio de polilisinas), así como los mutantes de la serina fosforilable *SOS3*-S205A y *SOS3*-S205D, se coexpresaron con *SOS2* y *SOS1* en la cepa halosensible de *S. cerevisiae* YP890 ($\Delta ena1-4$, $\Delta nha1$, $\Delta nhx1$, *SOS1::CYC1*) y se determinó su crecimiento en medio AP suplementado con NaCl.

Como puede verse en la Figura R.15, el alelo *SOS3*-C3A reconstituye completamente el sistema, mostrando una halotolerancia similar a los transformantes que expresan el alelo silvestre *SOS3*, mientras que el alelo *SOS3*-G2A muestra una complementación parcial y el mutante *SOS3*-KA no produce ninguna tolerancia a NaCl. Estos resultados demuestran la importancia del dominio polibásico y la miristoilación para el funcionamiento de la ruta SOS, al menos en el sistema de expresión en levadura. Por el contrario, la palmitoilación parece ser prescindible. Por otra parte, no se observó ninguna evidencia del papel funcional de la fosforilación de la serina 205, ya que tanto el mutante *SOS3*-S205A como el *SOS3*-S205D complementaron el fenotipo de sensibilidad a salinidad de la cepa de levadura de manera idéntica a como lo hace la proteína silvestre *SOS3*.

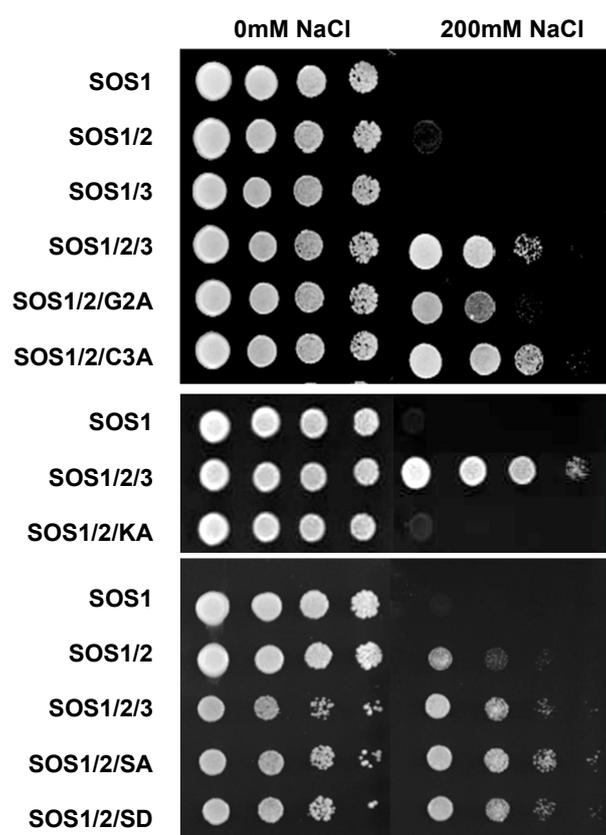


Figura R.15. Caracterización funcional de los alelos mutantes de *SOS3* en levadura. Transformantes de la cepa de levadura halosensible YP890 expresando *SOS3* y las versiones mutantes G2A, C3A, KA, S205A y S205D junto con el transportador *SOS1* y la quinasa *SOS2*. Se inocularon gotas de 5 μ l de

diluciones decimales seriadas en placas con medio AP sin NaCl y suplementado con 200 mM de NaCl, y se incubaron a 28°C.

R.3.2. Caracterización funcional en *A. thaliana* de los mutantes de SOS3

El sistema de expresión heteróloga en levadura es de gran utilidad para ensayar la función de los distintos mutantes debido a la sencillez del proceso de transformación y de la realización de los ensayos de halotolerancia, permitiendo obtener una rápida valoración. No obstante, los resultados no pueden tomarse como definitivos, ya que los componentes celulares de las levaduras pueden diferir sustancialmente de los de la célula vegetal, y no siempre las observaciones del sistema de levaduras pueden ser consideradas un fiel reflejo de lo que ocurre en la célula vegetal. Por este motivo, es necesaria la confirmación de los resultados mediante ensayos *in vivo* en plantas de *A. thaliana*.

El mutante *sos3-1* de *Arabidopsis* contiene una delección de 9 pb en la región codificante de SOS3, a partir del nucleótido 759, que se traduce en la pérdida de tres aminoácidos correspondientes al tercer dominio “*EF-hand*” que son absolutamente esenciales para la unión de Ca^{2+} . Consecuentemente la proteína SOS3-1 carece de capacidad sensora y esto se manifiesta en un fenotipo de sensibilidad extrema a la salinidad de la planta mutante (Liu y Zhu, 1997). La expresión de una copia silvestre de SOS3 en plantas *sos3-1* es capaz de revertir el fenotipo de halosensibilidad del mutante (Ishitani et al., 2000). Por tanto, con el fin de evaluar y confirmar la capacidad funcional de los diferentes alelos mutantes de SOS3 generados en este trabajo, se transformaron con ellos plantas *sos3-1* y se llevaron a cabo ensayos de tolerancia a salinidad con los transformantes para determinar su capacidad de complementar el fenotipo de halosensibilidad del mutante *sos3-1*. Para ello, se clonaron estos alelos bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S en el vector binario de plantas pBI321.

Los ensayos de halotolerancia se realizaron con plántulas T3 homocigotas de 10 días germinadas en MS que se transfirieron a medio LAK suplementado con 0, 15, 25 y 30 mM NaCl. Como control positivo se utilizaron líneas mutantes *sos3-1* complementadas con el gen silvestre SOS3 y como control negativo líneas mutantes *sos3-1* transformadas con el vector pBI321 vacío. A los 7 días, se fotografiaron las placas (Figura R.16). El alelo mutante SOS3-C3A fue capaz de complementar parcialmente el fenotipo de sensibilidad a salinidad del mutante *sos3-1*, mientras que los alelos SOS3-G2A y SOS3-KA no complementaron el fenotipo de la planta mutante, mostrando una sensibilidad similar a las plantas control, transformadas con el vector vacío. En cuanto a los mutantes del sitio de fosforilación, las líneas ensayadas que expresaban la proteína SOS3-S205A y SOS3-S205D fueron capaces de suprimir completamente el fenotipo de halosensibilidad del mutante, mostrando un crecimiento indistinguible del control transformado con la proteína silvestre SOS3.

Estos resultados corroboran, en general, los obtenidos en levadura. Hay que destacar que la capacidad de complementación del alelo SOS3-G2A en planta es mucho menor que el observado en levadura. Por tanto, la ausencia de miristoilación en *Arabidopsis* afecta a otros procesos adicionales al transporte de Na^+ , que es lo que se observa fundamentalmente en la

levadura, y que contribuyen de forma notable al fenotipo de sensibilidad a salinidad en la planta. Igualmente, la expresión del alelo *SOS3-C3A* en planta no llega a restablecer completamente los niveles de tolerancia al nivel del silvestre, poniendo de manifiesto una contribución de la palmitoilación para la correcta función de *SOS3*, aunque de mucha menor importancia que la miristoilación.

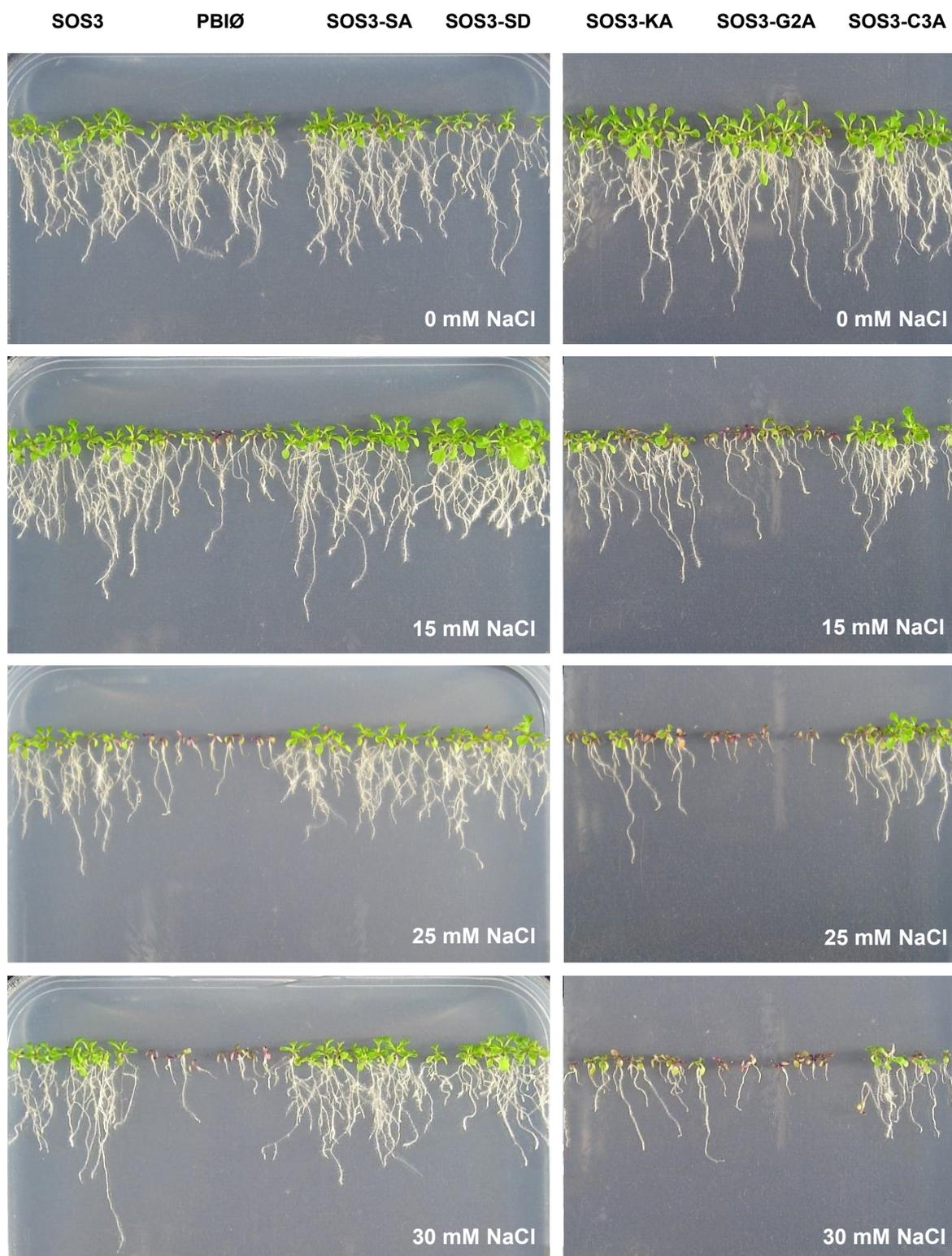


Figura R.16. Caracterización funcional de los alelos mutantes de SOS3 en planta. Complementación del fenotipo de sensibilidad a salinidad del mutante de *Arabidopsis sos3-1* con los alelos SOS3-G2A, SOS3-C3A, SOS3-KA, SOS3-S205A y SOS3-S205D. Plántulas T3 de 10 días germinadas en placas de MS se transfirieron a placas de LAK normal y suplementadas con 15, 25 o 30 mM de NaCl.

R.3.3. Localización subcelular de SOS3 y sus versiones mutantes

Los datos obtenidos en los ensayos de complementación tanto en levadura como en planta sugieren que la palmitoilación contribuye a la función de SOS3, mientras que la miristoilación y la presencia del dominio polibásico son esenciales. Estos tres factores pueden influir en la localización de la proteína, lo que a su vez puede ser determinante para la función de la misma. Por esta razón, se decidió abordar si la localización subcelular de SOS3, especialmente su asociación a las membranas, era dependiente de las acilaciones y/o del dominio de polilisinas.

R.3.3.1. Localización subcelular de fusiones SOS3:GFP

La localización subcelular se determinó fusionando el gen que codifica la proteína fluorescente GFP al cDNA del alelo SOS3 silvestre así como al de los mutantes G2A, C3A y KA. Las construcciones se realizaron en el sistema de plásmidos pGreenII (John Innes Centre), con el cDNA bajo el control del promotor CaMV35S y fusionado en su extremo 3' el gen *GFP*. Las construcciones se expresaron en planta de forma transitoria mediante agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* y pasados 3 días se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Como observamos en las imágenes de la Fig R.17, SOS3:GFP tiene una localización ubicua; aparece en el núcleo, en el citoplasma y también, probablemente, en la membrana plasmática. La expresión de las diferentes versiones mutantes SOS3-G2A, SOS3-C3A y SOS3-KA fusionadas a GFP produce diferencias en el patrón de localización con respecto al obtenido para SOS3 silvestre. Así, por ejemplo, SOS3-C3A no se acumula en el interior del núcleo y la proteína SOS3-G2A parece más abundante en el espacio citoplásmico.

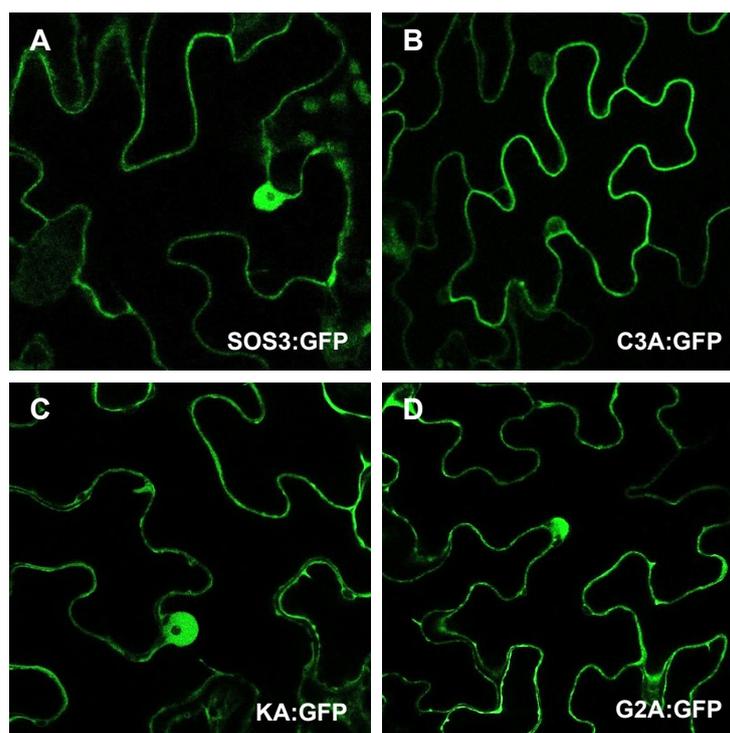


Figura R.17. Localización subcelular de SOS3 y sus versiones mutantes. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando la proteína SOS3 silvestre y las versiones mutantes fusionadas a GFP. **(A)** Expresión de SOS3 silvestre. **(B)** Expresión de la proteína no palmitoilable SOS3-C3A. **(C)** Expresión de la proteína mutante SOS3-KA. **(D)** Expresión de la proteína mutante no miristoilable SOS3-G2A.

Resulta difícil diferenciar con precisión la localización citosólica de la de membrana plasmática debido a la proximidad entre las señales provenientes de estas dos regiones subcelulares. Por ello, se usaron marcadores específicos de diferentes orgánulos de la célula. Para comprobar la localización en la membrana plasmática se decidió utilizar la proteína integral LTI6B fusionada a la proteína roja fluorescente RFP, mientras que como marcador nuclear y citoplasmático se eligió la proteína fluorescente mCherry. Se coexpresaron las diferentes versiones de la fusión SOS3:GFP con cada uno de los marcadores en células epidérmicas de *N. benthamiana* y se analizó la fluorescencia mediante microscopía confocal tres días después de la infiltración.

La distribución de la señal del marcador de membrana plasmática LTI6B:RFP mostró un alto grado de solapamiento con la señal procedente de las fusiones SOS3:GFP, SOS3-C3A:GFP y SOS3-KA:GFP, como se puede ver en la superposición de las imágenes obtenidas para cada uno de ellos (Figura R.18A; panel de la derecha). Sin embargo, como sugerían los experimentos anteriores, no se observó colocalización de la versión mutante no miristoilable (SOS3-G2A) con LTI6B:RFP.

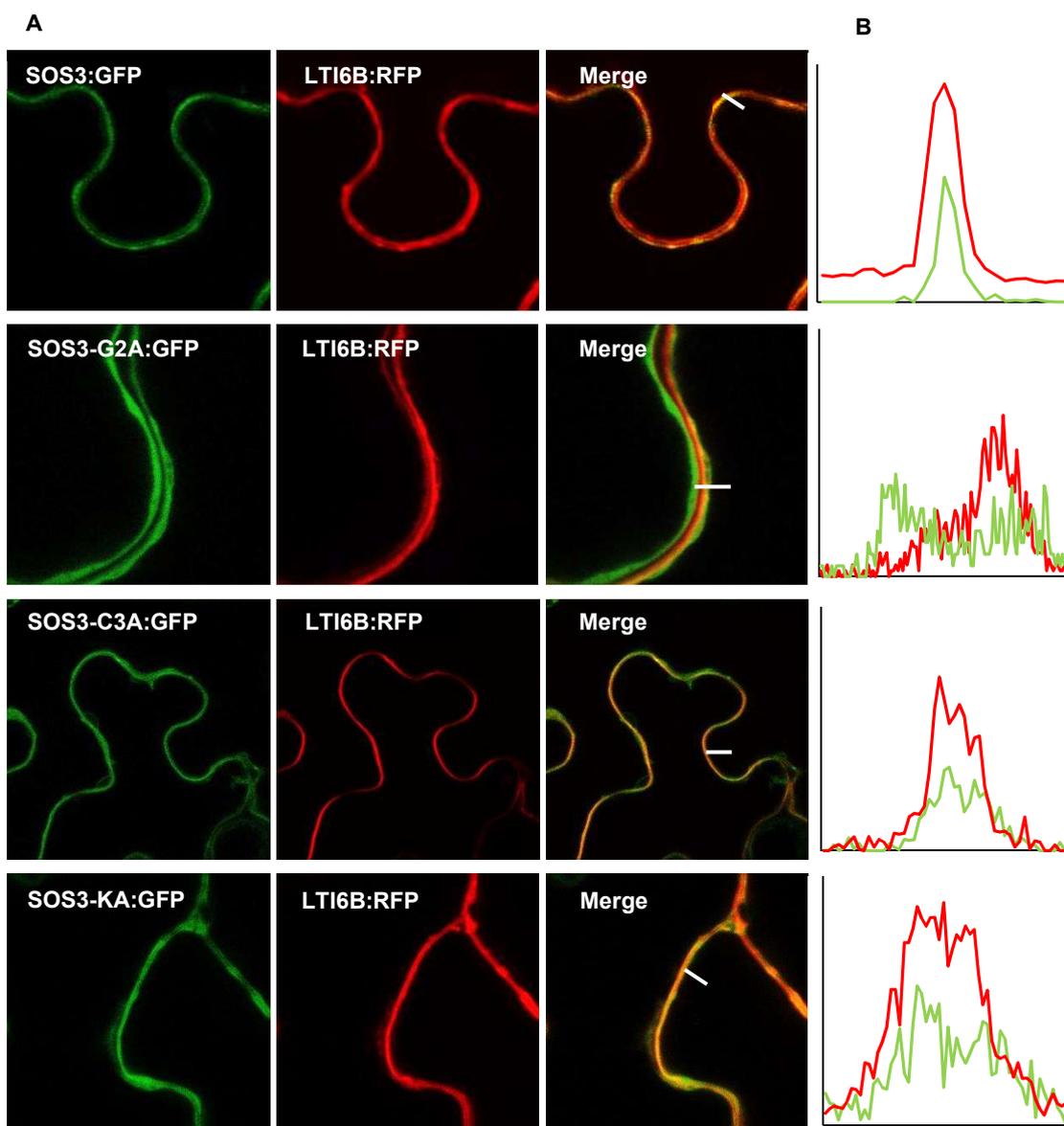


Figura R.18. Localización de la proteína SOS3 y las versiones mutantes en la membrana plasmática. (A) SOS3 silvestre y los mutantes SOS3-G2A, SOS3-C3A, y SOS3-KA fusionados a GFP y coexpresadas con el marcador de la membrana plasmática LTI6B:RFP. El mutante no miristoilable (SOS3-G2A:GFP) no colocaliza con el marcador de la membrana plasmática, como se observa en la superposición de las imágenes de cada canal (panel de la derecha). (B) Medida de la intensidad de la fluorescencia producida por la proteína GFP (verde) y la proteína RFP (roja) a lo largo de un transecto de interés (barra en color blanco), que se considera representativo.

A continuación, se repitió la coexpresión con el marcador mCherry para comprobar la localización núcleo-citoplasmática. Como se observa en la Figura R.19, la expresión de todas las fusiones GFP colocalizaron con la de mCherry en el citoplasma.

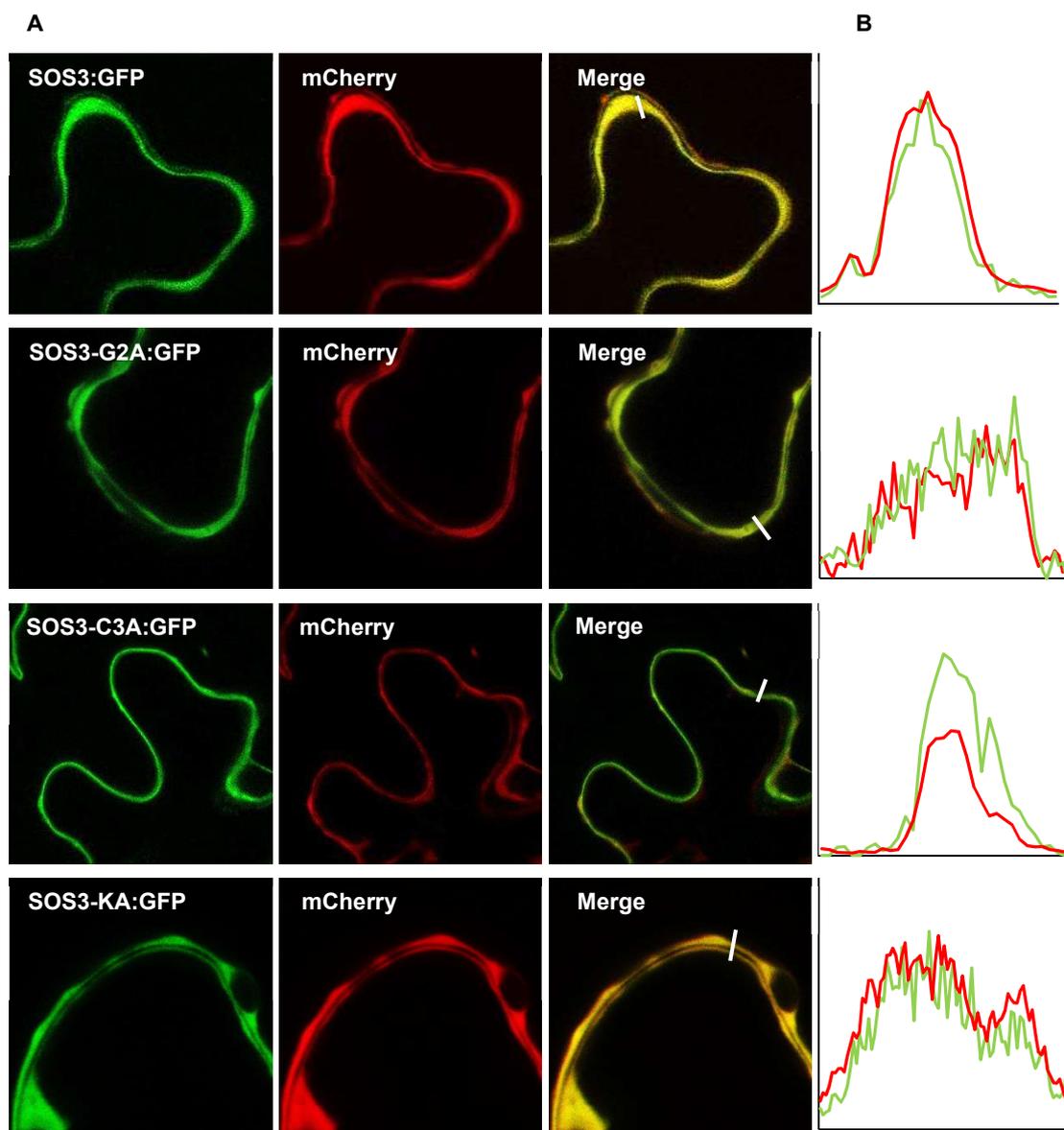


Figura R.19. Localización de SOS3 y las versiones mutantes en el citoplasma. (A) La proteína SOS3 silvestre y las mutantes, SOS3-G2A, SOS3-C3A y SOS3-KA fusionadas a GFP y coexpresadas con el marcador núcleo-citoplasmático mCherry. Las imágenes muestran la localización de todas las proteínas en el citoplasma como indica la fluorescencia amarilla observada en el panel de la derecha que representa la superposición de la fluorescencia producida por la proteína GFP y la proteína RFP. (B) Medida de la intensidad de la fluorescencia producida por la proteína GFP (verde) y la proteína RFP (roja) a lo largo de un transecto de interés (barra en color blanco), que se considera representativo.

En cuanto a la localización de SOS3 y los diferentes mutantes en el núcleo, se observó un solapamiento perfecto con la señal proveniente de mCherry, salvo en el caso de la versión no palmitoilable de SOS3 (SOS3-C3A:GFP) (Figura R.20, panel de la izquierda). La señal de proteína SOS3-C3A no colocalizaba con el marcador en absoluto. Este sorprendente resultado sugiere que la palmitoilación de SOS3 es necesaria para su importación al núcleo celular.

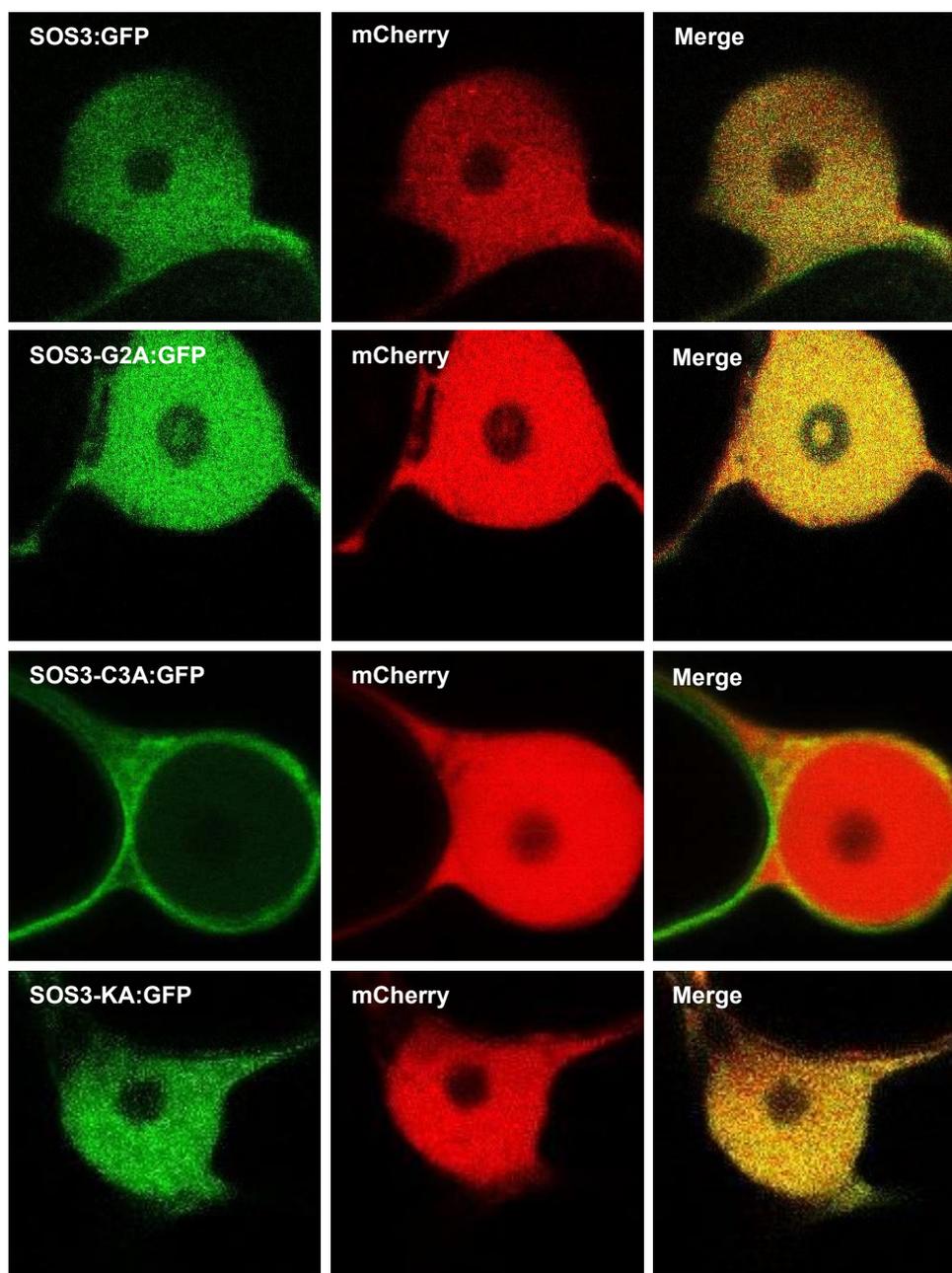


Figura R.20. Localización de SOS3 y las versiones mutantes en el núcleo. La proteína SOS3 silvestre y las mutantes, SOS3-G2A, SOS3-C3A y SOS3-KA fusionadas a GFP y coexpresadas con el marcador núcleo-citoplasmático mCherry en hojas de *N. benthamiana*. La expresión del mutante no palmitoilable (SOS3-C3A:GFP) en el núcleo es muy débil y la superposición de la fluorescencia de ambos canales muestran que esta proteína no colocaliza con el marcador en el núcleo (panel de la derecha).

R.3.3.2. Localización de SOS3 membrana plasmática; ensayos SRS

El estudio de la localización subcelular de SOS3 y sus versiones mutantes fusionadas a GFP y su comparación con la localización del marcador de la membrana plasmática LTI6B sugiere que SOS3 se asocia a esta membrana. No obstante, debido a que la expresión de este marcador en ocasiones fue demasiado débil y unido a la dificultad de discernir claramente entre la señal proveniente del citoplasma de la de membrana plasmática, se decidió usar la técnica de SRS (*Sos Recruitment System*), para obtener una información más precisa respecto a la localización de SOS3 en la membrana plasmática. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado la asociación *in vivo* de SOS3 a la membrana plasmática mediante el uso del sistema SRS en levadura (Aronheim et al., 1997; Quintero et al., 2002; Guo et al., 2004). Este sistema se basa en la vía de señalización Ras de levaduras. La actividad GTPasa de Ras es regulada por el intercambio GDP/GTP estimulado en la membrana plasmática por el factor de intercambio de guanil nucleótidos de Ras (RGEF), CDC25. La proteína CDC25 es esencial para la viabilidad de la levadura, pero el alelo mutante *cdc25-2* codifica una proteína termosensible. Por tanto, una cepa *cdc25-2* crece con normalidad a 23°C pero es incapaz de crecer a 37°C. Sin embargo, a la temperatura restrictiva la mutación *cdc25-2* puede ser complementada por hSos, un RGEF humano citosólico, si es direccionado de alguna forma a la membrana plasmática. Cuando la proteína SOS3 se fusiona con hSos, y se expresa en la cepa *cdc25-2* se complementa la deficiencia de crecimiento a la temperatura restrictiva, gracias a que SOS3 recluta a hSos a la membrana plasmática (Quintero et al., 2002).

Se realizaron fusiones en fase con los diferentes alelos de SOS3 al cDNA que codifica para el factor hSos humano y se transformaron en la cepa *cdc25-2* para ver como afectaba a su direccionamiento a la membrana plasmática. El plásmido pADNSp110_5'Sos se usó como control negativo. Como se observa en la Figura R.21, la miristoilación es determinante para la asociación de SOS3 con la membrana, ya que la proteína fusionada SOS3-G2A:hSos es incapaz de dirigirse a la membrana y por lo tanto no permite el crecimiento de la cepa *cdc25-2* a 37°C. En el caso del mutante SOS3-C3A:hSos, que tiene impedida la palmitoilación, se observa una complementación del fenotipo termosensible de la cepa, lo que indica que la proteína SOS3-C3A:hSos mantiene la capacidad de dirigirse a la membrana. Un efecto intermedio se observa en el mutante SOS3-KA:hSos, que da cierto crecimiento a 37°C, pero mucho menor que el silvestre SOS3. En resumen, los datos del ensayo SRS sugieren que la palmitoilación no es necesaria para dirigir a SOS3 a la membrana plasmática, el dominio polibásico es importante y contribuye a esta localización, y la miristoilación resulta absolutamente esencial.

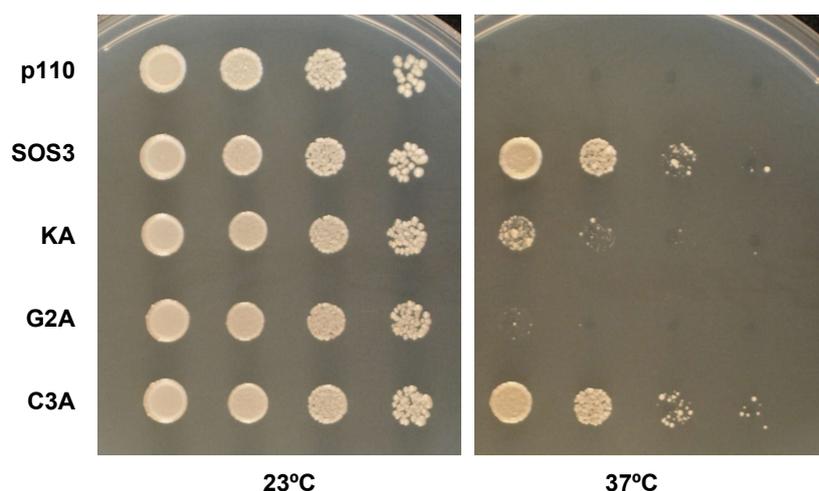


Figura R.21. Asociación de SOS3 con la membrana plasmática. Complementación de la mutación *cdc25-2* mediante la transformación con los plásmidos hSos:SOS3, hSos:SOS3-C3A, hSos:SOS3-G2A y hSos:SOS3-KA. El plásmido pADNs-ADp110_5'Sos (p110) se usó como control negativo. Se distribuyeron 5 μ l de diluciones decimales y se incubaron en placas de YPD a 24 °C y a 37 °C para identificar si las mutaciones de SOS3 afectaban a su asociación con la membrana plasmática.

R.3.4. Análisis de la formación del complejo SOS2/SOS3

De acuerdo con los resultados obtenidos en los apartados anteriores, las acilaciones que tienen lugar en el extremo N-terminal de SOS3 y el dominio poli-K parecen ser determinantes para su localización subcelular.

Además de la localización, otro aspecto esencial de SOS3 en la ruta SOS es su interacción con SOS2 para formar un complejo quinasa activo que regule positivamente al transportador SOS1. Por esta razón, se decidió investigar la capacidad de los diferentes mutantes de SOS3 para formar un complejo estable con SOS2 usando la técnica de BiFC. Para ello, se clonó el cDNA de SOS3 silvestre así como de los mutantes (G2A, C3A y KA) en el vector pSPYCE(M) y el cDNA de SOS2 en el vector pSPYNE173 y se expresaron las respectivas combinaciones mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Después de tres días, las hojas se analizaron en el microscopio confocal.

El complejo formado por SOS2 y la proteína SOS3 silvestre se detectó fundamentalmente en una fina línea periférica de la célula, sugiriendo una localización en la membrana plasmática, y también en el núcleo. Cuando se analizaron las versiones mutantes SOS3-G2A, SOS3-C3A y SOS3-KA se observó que todas ellas interactuaban con la quinasa SOS2. No obstante, se vio una clara influencia en la localización del complejo SOS2/SOS3 debido a las alteraciones provocadas por las mutaciones en la propia localización de SOS3. Así, por ejemplo, los complejos SOS2/SOS3-G2A y SOS2/SOS3-KA mostraron una mayor distribución en citoplasma que el complejo silvestre, y el complejo SOS2/SOS3-C3A no apareció en el interior del núcleo.

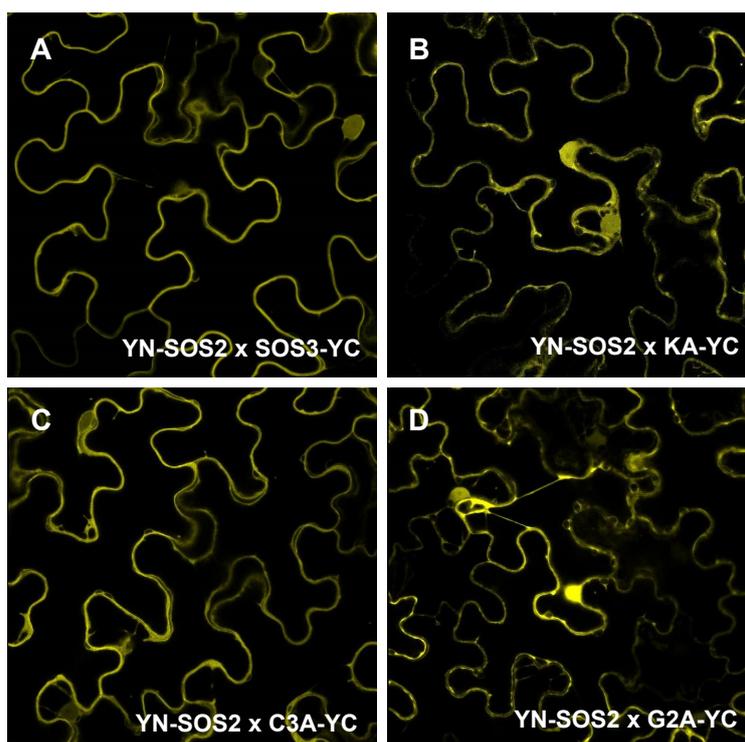


Figura R.22. Análisis de la interacción SOS2/SOS3 mediante BIFC. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando (A) SPYNE173:SOS2 y SPYCE(M):SOS3, (B) SPYNE173:SOS2 y SPYCE(M):SOS3-KA, (C) SPYNE173:SOS2 y SPYCE(M):SOS3-C3A, y (D) SPYNE173: SOS2 y SPYCE(M):SOS3-G2A.

En los experimentos de complementación de plantas y levaduras, el estado de fosforilación de SOS3 no parece tener ninguna influencia sobre la funcionalidad de la proteína. Este aspecto de la regulación de las CBLs está poco estudiado y los datos disponibles no son coincidentes. Por un lado, se ha propuesto que esta fosforilación determina la formación del complejo CIPK/CBL. Así, un mutante de CBL10 que no puede fosforilarse por SOS2(CIPK24) forma un complejo menos estable con dicha quinasa (Lin et al, 2009). Por otro lado, se ha propuesto que la fosforilación de la CBL es esencial para su capacidad de activar a la quinasa CIPK con la que forma el complejo. Un mutante de CBL1 que no se fosforila, interactúa normalmente con CIPK23 pero el complejo quinasa no es activo (Hashimoto et al 2012). Para determinar si el estado de fosforilación de SOS3 modificaba la interacción con SOS2, se realizaron ensayos de BiFC de levadura. Para ello, el cDNA de SOS3 silvestre y de las versiones mutantes en el sitio de fosforilación (SOS3-S205A y SOS3-S205D) se clonaron en el vector pYeBYC(M) y el cDNA de SOS2 en el vector pYeBYN y se expresaron las respectivas combinaciones en la cepa de levadura ANT5. Las células una vez transformadas se seleccionaron y se observaron en el microscopio confocal. Como se observa en la Figura R.23, el estado de fosforilación de SOS3 no tiene ninguna influencia en la interacción con SOS2. Tanto en el caso de la proteína no fosforilable (S205A) como en el de la proteína que simula la

fosforilación (S205D), la interacción con SOS2 se mantiene igual de intensa que con SOS3 silvestre.

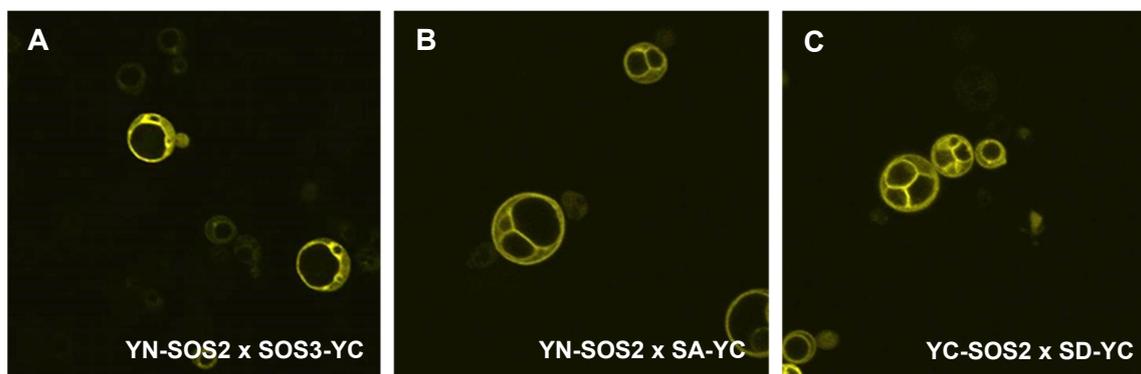


Figura R.23. Análisis de la interacción SOS2/SOS3 mediante BIFC de levadura. Imágenes de microscopía confocal de un cultivo de la cepa de *S. cerevisiae* ANT5 expresando: **(A)** pYeBYN::SOS2 y pYeBYC(M)::SOS3, **(B)** pYeBYN::SOS2 y pYeBYC(M)::SOS3-S205A, **(C)** pYeBYN::SOS2 y pYeBYC(M)::SOS3-S205D.

R.3.5. Análisis de la interacción de SOS3 y SOS1

Otro aspecto a considerar para explicar la función de SOS3 en la ruta SOS, es su interacción con el transportador SOS1. Para estudiar si las modificaciones del extremo N-terminal de SOS3 afectan a la interacción con SOS1 se realizaron ensayos de BiFC en hojas de *N. benthamiana*, del mismo modo que se hizo para estudiar la interacción con SOS2.

Apareció señal de fluorescencia en las hojas donde se expresaron los complejos formados por SOS1/SOS3-G2A y SOS1/SOS3-C3A, lo que indica que la modificación lipídica de SOS3 no es necesaria para la interacción *in planta* con SOS1. Hay que señalar que el patrón punteado que mostraba el complejo SOS1/SOS3 silvestre se hizo más difuso y continuo en los complejos SOS1/SOS3-G2A y SOS1/SOS3-C3A.

La fluorescencia no se reconstituyó cuando se coexpresaron SOS1 y SOS3-KA, lo que indica que la presencia de un dominio polibásico en el extremo N-terminal de SOS3 es esencial para que tenga lugar la formación del complejo SOS1/SOS3.

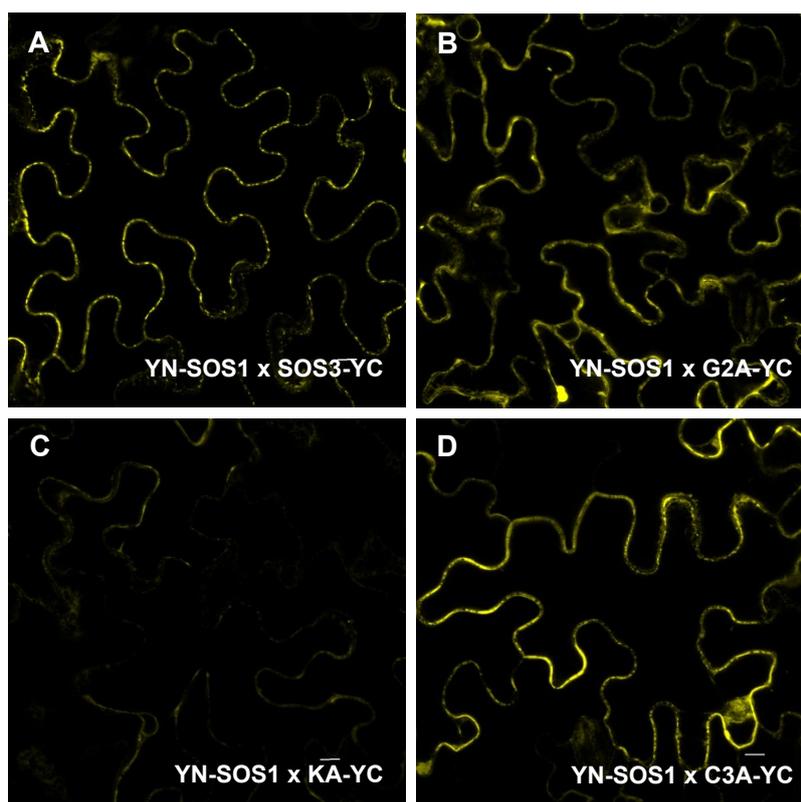


Figura R.24. Análisis de la interacción SOS1/SOS3 mediante BIFC. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando (A) SPYNE173:SOS1 y SPYCE(M):SOS3, (B) SPYNE173:SOS1 y SPYCE(M):SOS3-G2A, (C) SPYNE173: SOS1 y SPYCE(M):SOS3-KA, y (D) SPYNE173:SOS1 y SPYCE(M): SOS3-C3A.

Por último, se utilizó el sistema de BiFC de levadura para determinar si el estado de fosforilación de SOS3 influía en la interacción directa con SOS1. Para ello se coexpresaron respectivamente los plásmidos pYeBYC(M):SOS3, pYeBYC(M):SOS3-S205A y pYeBYC(M):SOS3-S205D junto con el plásmido pYeBYN:SOS1 en la cepa ANT5 y los transformantes se observaron en el microscopio confocal. De nuevo, la interacción SOS1/SOS3 se produjo independientemente del estado de fosforilación de SOS3.

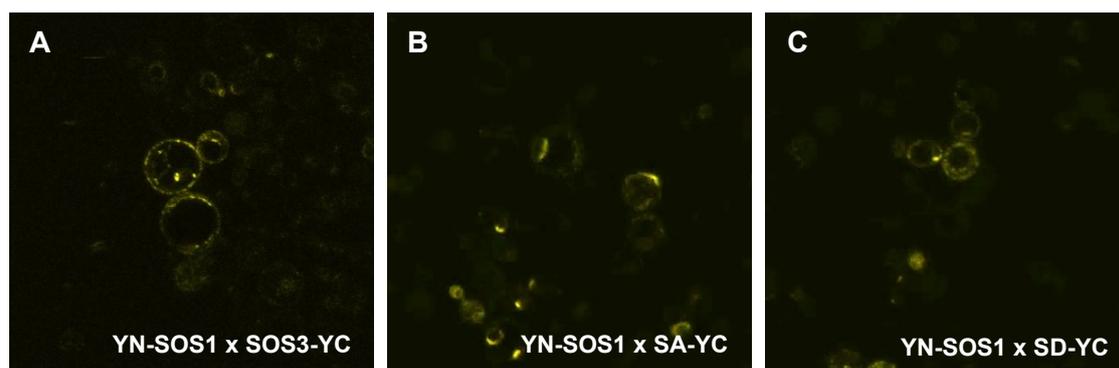


Figura R.25. Análisis de la interacción SOS1/SOS3 mediante BIFC de levadura. Imágenes de microscopía confocal de un cultivo de la cepa de *S. cerevisiae* ANT5 expresando: **(A)** pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M)::SOS3, **(B)** pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M)::SOS3-SA, **(C)** pYeBYN::SOS1 y pYeBYC(M)::SOS3-SD.

CAPÍTULO III

R.4. Localización nuclear de SOS3; señales NES

En un estudio sobre la localización subcelular de la familia de CBLs de *Arabidopsis* se determinó que estas proteínas aparecen asociadas a membranas, fundamentalmente membrana plasmática y tonoplasto, y también en el citoplasma y en el interior del núcleo (Batistič et al., 2010). Curiosamente, algunas CBLs aparecen exclusivamente asociadas a membranas, otras solo en citoplasma y núcleo, y otras son ubicuas y aparecen tanto asociadas a membranas como en citoplasma y núcleo.

Las proteínas CBLs son solubles y su asociación a membrana, como hemos visto, viene determinada por acilaciones postraduccionales que ocurren en su extremo N-terminal. La única excepción es CBL10, que se localiza en membranas insertando en ellas un dominio hidrofóbico situado en su extremo N-terminal (Quan et al., 2007).

Proteínas como CBL1 o CBL9 tienen en su extremo residuos de glicina y cisteína que son objeto de miristoilación y palmitoilación, y se localizan de forma exclusiva en la membrana plasmática (Batistic et al., 2008). Se ha demostrado que la fusión de los 12 primeros aminoácidos de CBL1, donde se encuentran estas señales de acilación, a la proteína GFP son suficientes para enviarla de forma específica a la membrana plasmática (Batistic et al., 2008). La proteína SOS3 conserva exactamente los mismos residuos de acilación que CBL1 y cuando los primeros 18 residuos de SOS3 se fusionan a GFP también hacen que esta proteína se localice de forma exclusiva en la membrana plasmática. Pero como se ha demostrado en esta Tesis, SOS3 no se localiza solo en la membrana plasmática como CBL1, sino que también aparece en el citosol y en el núcleo.

Esta diferencia en la localización de CBL1 y SOS3 sugiere la existencia de zonas específicas en la proteína SOS3 que deben ser importantes para definir su localización nuclear. Es conocido que las proteínas que tienen que ser transportadas del citoplasma al núcleo o viceversa portan señales que las identifican como sustratos de ese transporte y que permiten su reconocimiento por parte de las proteínas transportadoras o de un adaptador. Esta señal es generalmente una secuencia de aminoácidos corta que, en el caso de los sistemas de importación nuclear se denominan señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signals*) y en los sistemas de exportación nuclear se denominan señal de exportación nuclear (NES, *Nuclear Export Signals*). Las secuencias NLS están compuestas por aminoácidos de carácter básico como lisinas y argininas. Existen dos tipos de NLS: las monopartitas, que están formadas por un grupo de al menos tres residuos básicos (lisinas o argininas) precedidos de una prolina y flanqueados por residuos ácidos y neutros (Makkerh et al., 1996), y las bipartitas, formadas por dos grupos de residuos de lisinas y argininas, que generalmente siguen la disposición: KR-X(10-12)-KRRK (Fontes et al., 2000). Las señales NLS son reconocidas específicamente por la importina α para ser transportadas al núcleo. Por otro lado, mediante el análisis *in silico* de 67 secuencias NES conocidas se estableció la

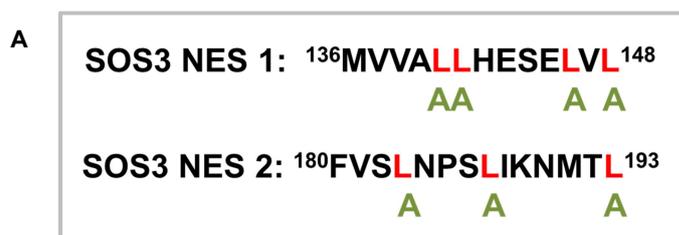
siguiente secuencia consenso como señales de exportación nuclear: L-X(2,3)-[LIVFM]-X(2,3)-L-X-[LI] (La Cour et al., 2004).

Se realizó un análisis de la secuencia de SOS3 con el objeto de encontrar posibles secuencias de señalización de tráfico nuclear. No se encontró ninguna secuencia NLS consenso de importación nuclear. Por el contrario, sí se encontraron dos secuencias tipo NES en la región carboxiloterminale de la proteína que se adaptaban a la secuencia consenso propuesta por La Cour et al. (2004) con un espaciado característico entre ellos (Figura R.26). El primer posible dominio NES identificado en SOS3 se encuentra entre los residuos 136 a 148 y el segundo entre los residuos 180 y 193.

MGCSVSKKKKKNAMRPPGYEDPELLASVTPFTVVEEVEALYELFKKLSSSIIDDGLIHKEEFQALFRNRRNRLFADRIF	80
DVFDVCRNGVIEFGEFVRS LGV FHP SAPVHEKVKFAFKLYDLRQTGFIEREELKEMVVALLHESELVLS E DMIEVMVDKA	160
	NES1
FVQADRRKNDGKIDIDEWKDFVSLNPSLIKNTLPYLKDINRTFPFVSSCEEEEMELQNVSS	222
	NES2

Figura R.26. Localización de los dominios NES en la secuencia de SOS3.

Para determinar si las secuencias NES halladas son realmente funcionales y son determinantes para la exportación nuclear de SOS3, se prepararon diversos tipos de mutantes en los posibles dominios NES. En primer lugar, se eliminó todo el fragmento de la secuencia a partir del aminoácido 136, eliminando de este modo ambas secuencias NES (Figura R.27). También se realizaron mutaciones puntuales en los residuos de leucina esenciales (Leu140Ala, Leu141Ala, Leu146Ala y Leu148Ala) determinados según la secuencia consenso de la primera secuencia NES identificada. De igual manera se procedió con la segunda secuencia NES, mutando los residuos Leu183Ala, Leu187Ala y Leu193Ala. Por último se construyó un alelo mutante que combinaba las mutaciones puntuales en las leucinas esenciales de los dos dominios NES (Figura R.27). Todos los mutantes se fusionaron al extremo N-terminal de GFP en el vector pGreenII.



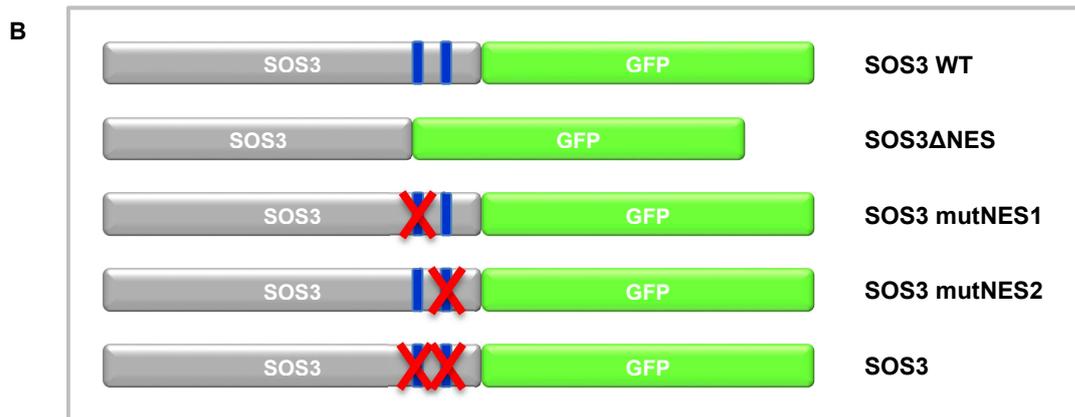


Figura R.27. (A) Secuencias NES identificadas en SOS3. Se han señalado en rojo los residuos de leucina que se mutaron a alanina para comprobar la funcionalidad de los dominios NES en SOS3. **(B)** Esquema de las construcciones realizadas para estudiar las localizaciones de los mutantes en las secuencias NES.

Estas construcciones se expresaron en planta mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Para determinar el efecto de los dominios NES en la localización de SOS3, se comparó la localización de las distintas versiones mutantes fusionadas a GFP con la localización de SOS3 silvestre.

Como se observa en las imágenes (Figura R.28), la distribución entre núcleo y citoplasma de las proteínas mutantes no cambia sustancialmente con respecto a la de SOS3:GFP silvestre, y no se observa un incremento en la señal nuclear en ninguno de los alelos mutantes, como cabría esperar debido a la ausencia o mutación de aminoácidos esenciales de las secuencias NES. Sin embargo, hay que destacar que la eliminación del fragmento C-terminal (SOS3ΔNES) así como las mutaciones puntuales en ambas secuencias NES parecen provocar la inestabilidad de la proteína, ya que se obtuvo una expresión muy débil en ambos casos comparada con la que suele producir proteína silvestre, por lo que resulta difícil realizar las comparaciones. Los alelos mutantes en los que se modificaba solo el primer dominio NES1 o solo el segundo NES se expresaron a niveles similares que la proteína silvestre, pero no puede descartarse la posibilidad de que sea necesario eliminar o anular los dos dominios NES para provocar un desequilibrio claro en la localización de SOS3 entre citoplasma y núcleo. Así pues, aunque los resultados obtenidos no apoyan que las secuencias SOS3 sean funcionales, no se pueda descartar absolutamente la hipótesis planteada.

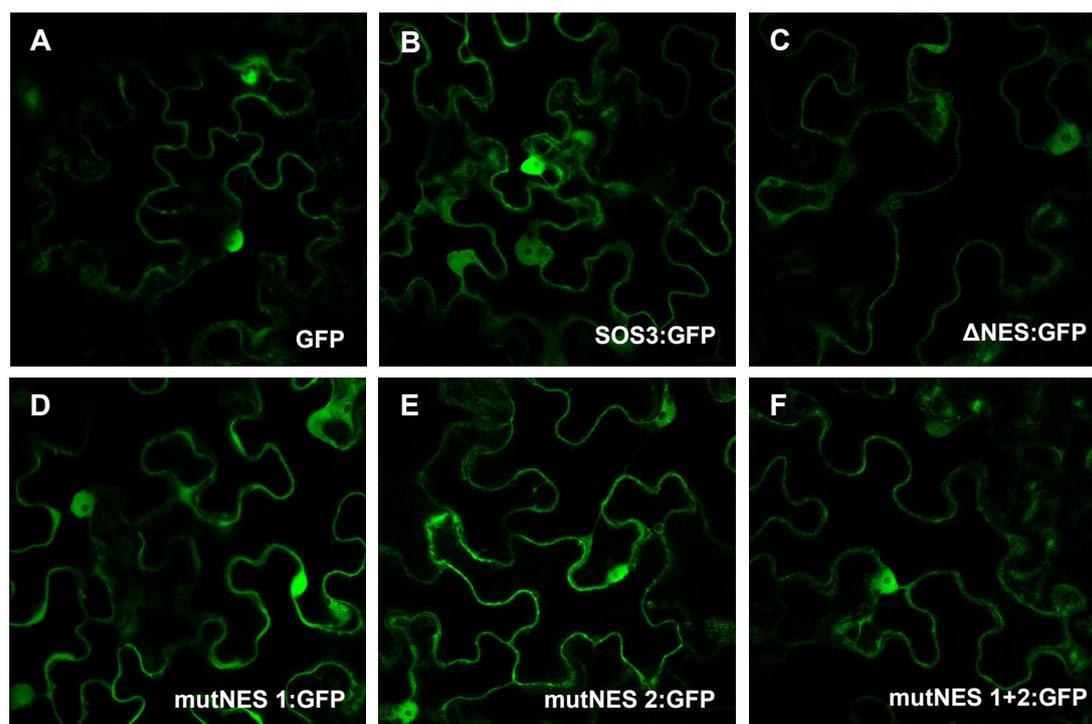


Figura R.28. Localización subcelular de la proteína SOS3:GFP y sus versiones mutantes en las secuencias NES. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hojas de *N. benthamiana* expresando SOS3 silvestre y los mutantes en los dominios NES fusionados a GFP. **(A)** Expresión de GFP. **(B)** Expresión de SOS3 silvestre. **(C)** Expresión de SOS3 sin el fragmento C-terminal donde se localizan las dos secuencias NES. **(D)** Expresión de SOS3 con mutaciones puntuales en el primer dominio NES (Leu140Ala, Leu141Ala, Leu146Ala y Leu148Ala). **(E)** Expresión de SOS3 con mutaciones puntuales en el segundo dominio NES (Leu183Ala, Leu187Ala y Leu193Ala). **(F)** Expresión de SOS3 con mutaciones puntuales en el primer y segundo dominio NES (Leu140Ala, Leu141Ala, Leu146Ala, Leu148Ala, Leu183Ala, Leu187Ala y Leu193Ala).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

D.1. SOS3 interacciona directamente con SOS1 al comienzo de su región C-terminal citosólica

Las proteínas de la denominada ruta SOS de plantas (SOS1, SOS2 o CIPK24 y SOS3 o CBL4) son las principales responsables de la tolerancia a salinidad en plantas. Desde el descubrimiento de los genes que componen esta ruta, a final de los años 1990, se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre esta ruta y se ha propuesto un modelo de funcionamiento de este sistema en el que la proteína CBL4(SOS3) responde a la señal de Ca^{2+} producida por el estrés salino interaccionando con la proteína quinasa CIPK24(SOS2) liberándola de su estado basal de autoinhibición para permitir que fosforile y active al antiportador Na^+/H^+ SOS1 (Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002; Quintero et al., 2011). En los últimos años diferentes estudios se han centrado en investigar la estructura, función y regulación de SOS1 por el complejo SOS2 y SOS3. Los datos obtenidos en estos trabajos sugieren que la regulación del sistema SOS es un proceso bastante más complejo de lo que este modelo propone. Por una parte, se han aislado nuevos elementos que participan en la ruta SOS, como el sensor de Ca^{2+} SCaBP8(CBL10) y la proteína quinasa MPK6 (Quan et al., 2007; Yu et al., 2010). Además, diversos estudios demuestran la implicación de las proteínas que forman la ruta SOS en otras funciones distintas de las ya conocidas en la tolerancia a salinidad (Katiyar-Agarwal et al., 2006; Jaspers et al., 2010; Oh et al., 2010; Kim et al., 2012). Para profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos de acción y regulación del sistema SOS; así como su interacción con otras rutas de señalización, es necesario conocer en detalle las características estructurales y funcionales de cada uno de sus componentes.

SOS1, el principal componente de la ruta SOS, presenta similitudes estructurales y funcionales con el antiportador Na^+/H^+ de células animales NHE1. La actividad de NHE1 se regula mediante la interacción con múltiples tipos de proteínas que interaccionan con diversos dominios reguladores localizados en su largo extremo carboxilo (Putney et al., 2002). La región C-terminal citosólica de NHE1 contiene una serie de residuos de serina y treonina que son fosforilados por proteínas quinasas en respuesta a estímulos como la acidosis prolongada, a señales hormonales o a factores de crecimiento (Sardet et al., 1990; Sardet et al., 1991; Haworth et al., 2003). La fosforilación de residuos en esta región modifica la actividad de transporte, mediante un cambio en la afinidad por H^+ intracelular, que hace que el intercambio sea más activo a valores de pH_i más alcalinos. Se ha determinado que NHE1 constituye una diana de múltiples vías de señalización, entre las que se incluyen las rutas activadas por los receptores de tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G y las integrinas. Varias publicaciones han revelado el papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como potenciales mediadores de la activación de NHE1 (Pedersen et al., 2007). Pero además, gran parte de la regulación de NHE1 no se debe sólo a la fosforilación, sino que también está mediada por varias proteínas reguladoras y cofactores, dentro de las que se incluyen proteínas

de unión a calcio que se asocian con el dominio regulador citosólico de NHE1. La calmodulina se une a una región situada entre los aminoácidos 636 y 700, activando NHE1 mediante el bloqueo de un dominio de autoinhibición (Amith y Fliegel, 2013). Los miembros de la familia de proteínas de unión a calcio homólogas de la calcineurina (CHP1-3) también regulan NHE1 a través de la unión a su cola citosólica, concretamente, en una región comprendida entre los aminoácidos 518 y 537 (Amith y Fliegel, 2013).

SOS3(CBL4) pertenece a la familia de sensores de Ca^{2+} de tipo CBL, que son proteínas equivalentes a los sensores de Ca^{2+} CHP de animales. La regulación del antiportador Na^+/H^+ NHE1 mediante interacción con las proteínas CHP1 a 3 en células animales sugería la posibilidad de una relación similar entre SOS1 y SOS3. Mediante experimentos de BiFC realizados en plantas de *Nicotiana benthamiana* y en *Saccharomyces cerevisiae* se comprobó la existencia de una interacción directa, no conocida hasta el momento, entre las proteínas SOS1 y SOS3. Esta regulación de SOS1 por SOS3 es independiente de la que realiza el complejo formado por SOS2 y SOS3, ya que una proteína carente del dominio autoinhibidor, que es reconocido y fosforilado por dicho complejo, interactúa perfectamente con SOS3.

Para mapear el dominio de SOS1 que interviene en la unión a SOS3 se recurrió a la información disponible sobre la caracterización estructural del complejo NHE1/CHP. Los sensores CHP animales se unen a una región localizada detrás del último segmento transmembrana de NHE1, cuyos residuos adoptan la estructura de una α -hélice en la que todos los aminoácidos de carácter hidrofóbico se encuentran alineados en una cara de la hélice (Ammar et al., 2006; Mishima et al 2007). Comparando la secuencia de aminoácidos de SOS1 y NHE1 se identificó una secuencia con una homología significativa comprendida entre los aminoácidos 460 y 482 de SOS1, curiosamente situada también justo detrás del último segmento transmembrana de SOS1. Mediante ensayos de BiFC en levaduras y en plantas, se demostró que esta región es necesaria y suficiente para que tenga lugar la interacción directa de SOS1 y SOS3, ya que la coexpresión de los 23 aminoácidos de SOS1 que forman el denominado dominio de unión (S3BD) reproducía la interacción con SOS3, mientras que la coexpresión del mutante SOS1 Δ S3BD, carente del dominio de unión a SOS3, eliminaba la interacción.

La unión de CHP2 y NHE1 da lugar a un marcado aumento en la afinidad de unión a Ca^{2+} de CHP2 y se observó que la unión de iones de Ca^{2+} a los motivos “EF-hand” 3 y 4 de CHP2 era determinante para la formación del complejo CHP2/NHE1 y para su localización en la membrana plasmática (Ammar et al., 2006). De la misma forma, en este trabajo se ha demostrado que la proteína SOS3-1, que carece de tres aminoácidos críticos del tercer dominio “EF-hand” y no une Ca^{2+} , es incapaz de unirse a SOS1. La sorprendente similitud entre las características descritas para interacción NHE1/CHP y las obtenidas en esta Tesis para la de SOS1/SOS3, sugieren que este mecanismo de regulación se ha conservado evolutivamente porque cumple una función importante para modular la actividad de los antiportadores Na^+/H^+ .

En células animales se ha demostrado que la interacción de las proteínas CHP con NHE1 regula la función de NHE1 de tres maneras distintas: incrementando la vida media de la

proteína, mediando el tráfico y maduración de NHE1 desde vesículas a la membrana plasmática y estimulando directamente la actividad transportadora de NHE1 (Di Sole et al., 2012; Kolobynina et al., 2016). Los resultados obtenidos en esta Tesis apuntan a que en células vegetales SOS3 regula la función y actividad de SOS1 a través de los dos primeros mecanismos descritos. Cuando se expresó una versión de SOS1 etiquetada con GFP en una planta mutante *sos3-1*, se observó como la señal fluorescente proveniente de la membrana plasmática desaparecía después de un tratamiento con NaCl. Este fenómeno puede ser una consecuencia de la regulación de la estabilidad de SOS1 o bien del control de la fusión de vesículas conteniendo SOS1 a la membrana plasmática. Estos procesos no son excluyentes y también podría darse una combinación de ambos. Los datos de expresión en levadura sugieren que SOS3 no regula directamente la actividad transportadora de SOS1, ya que la tolerancia a sal conferida por el antiporte no se ve afectada positiva ni negativamente en presencia de SOS3 (Quintero et al., 2002).

Es importante señalar que sensores de calcio con una alta similitud en sus secuencias pueden realizar funciones muy distintas (Pandey et al., 2004b), y la especificidad de estos sensores juega un papel crucial en la decodificación de cada señal específica de calcio (Guo et al., 2001; Albrecht et al., 2001). En este sentido, hemos comprobado que la interacción entre SOS1 y SOS3(CBL4) es muy específica. De las 10 proteínas que componen la familia de CBLs en *Arabidopsis*, sólo SOS3(CBL4) y CBL8 se unen a SOS1. Actualmente se desconoce cuál es la función de CBL8. Esta proteína es la CBL que está filogenéticamente más relacionada con CBL4, si bien carece de las secuencias consenso de miristoilación y palmitoilación encontradas en CBL4 (Batistič et al., 2010). CBL8 carece del dominio de cinco residuos de lisina agrupados que en SOS3 resulta esencial para su unión a SOS1. No obstante dentro de los primeros once aminoácidos de CBL8 hay cinco residuos con carga positiva (tres lisinas y dos argininas) que si bien no son consecutivas como en SOS3, podrían jugar un papel similar en el reconocimiento de SOS1. Además, se ha determinado que CBL8 muestra una distribución subcelular idéntica a CBL4, localizándose en el citoplasma, en el núcleo y en la membrana plasmática (Batistič et al., 2010). Es posible que CBL8 realice algún tipo de función regulatoria en la ruta SOS, quizá sustituyendo a SOS3 en algún momento en que ésta no está presente o sustituyéndola en tejidos donde no se expresa. Hay que considerar que la expresión de SOS3 no coincide totalmente con la de SOS1. La expresión del gen SOS3 se produce de manera preferente en la raíz de la planta (Quan et al., 2007). El gen SOS1 se expresa en los meristemas radiculares y alrededor de los haces vasculares tanto de la parte verde como de la raíz (Shi et al., 2002). De hecho, se ha propuesto que CBL10, otra CBL capaz de interactuar con SOS2(CIPK24), reemplaza a CBL4 como proteína activadora de SOS2 en los tejidos verdes. Sería un complejo SOS2/CBL10 el que fosforilaría y activaría a SOS1 en estas regiones de la planta (Quan et al., 2007). Por tanto, es posible que en la parte aérea de la planta, la interacción directa SOS1/CBL8 sea la equivalente a la de SOS1/SOS3 en la raíz.

D.2. Las modificaciones postraduccionales determinan la localización subcelular y la función de SOS3

La distribución subcelular es una característica importante de una proteína porque su ubicación está íntimamente relacionada con su función. Las proteínas de la familia CBL tienen un carácter predominantemente hidrofílico pero en muchas de ellas se ha detectado la presencia de una señal de miristoilación "M₁-G₂-X₃-X₄-X₅-S/T₆" en su extremo N-terminal. Además, en algunas CBLs hay un residuo de cisteína en la posición 3 de esta secuencia consenso, que es a su vez una señal de probable S-palmitoilación (Batistic et al., 2008). El caso mejor estudiado es el de la proteína CBL1, donde se ha demostrado que efectivamente la glicina en posición 2 es miristoilada y la cisteína en posición 3 es palmitoilada (Batistic et al., 2008). La acilación en proteínas de tipo soluble permite su asociación a membranas celulares. Este hecho resulta esencial para su función, puesto que muchas proteínas CBL regulan la actividad de transportadores que obviamente se encuentran inmersos en las bicapas lipídicas (Qiu et al., 2002; Shi et al., 2002; Li et al., 2006; Xu et al., 2006).

El papel fundamental de la proteína SOS3 en la ruta SOS consiste en percibir la señal de calcio citoplásmica disparada por el aumento de Na⁺ en el citosol. SOS3 unida a Ca²⁺ interacciona con la proteína quinasa SOS2, provocando un desplazamiento de su región C-terminal inhibidora y activando su actividad quinasa. Finalmente el complejo SOS2/SOS3 activo se localiza en la membrana plasmática donde fosforila a SOS1 y activa el transporte de Na⁺. La proteína SOS3 tiene conservadas las señales para miristoilación y palmitoilación. Además de esto, presenta una región con una repetición de 5 residuos de lisina (poli-K) muy próximos a los residuos acilables y que no aparece en otras proteínas del tipo CBL, pero que está muy conservada en las proteínas CBL4 de diferentes especies vegetales (Monné et al., 1998; Killian y Von Heijne, 2000). Este agrupamiento de aminoácidos con carga positiva puede colaborar en la unión a membrana de proteínas solubles. Junto con la acilación, las proteínas CBL son modificadas por fosforilación. Se ha demostrado, que existe un residuo de serina conservado en casi todas las CBLs, localizado muy cerca del extremo C-terminal y que es fosforilado por las proteínas quinasa CIPK con las que interactúan. Varios estudios han sugerido que esta modificación podría dar estabilidad al complejo CIPK/CBL (Lin et al., 2009; Du et al., 2011; Hashimoto et al., 2012). En las células animales, los sensores de Ca²⁺ CHP, equivalentes a las CBL de plantas, también presentan el mismo tipo de señal de miristoilación e igualmente están sometidas a fosforilación. La miristoilación juega un papel importante en su función, interviniendo en la interacción con sus proteínas diana, o influenciando su afinidad por Ca²⁺, por ejemplo. Sin embargo, se desconoce el papel que juega la fosforilación de las CHPs (Di Sole et al., 2012).

En este trabajo se han analizado en detalle todas las modificaciones postraduccionales que experimenta la proteína SOS3 durante su maduración y se ha investigado como pueden afectar a su función y localización subcelular mediante la obtención de mutantes específicos en cada una de ellas. Hasta el momento, se sabe muy poco sobre el impacto que tienen todas

estas modificaciones sobre la localización subcelular y la función de SOS3; solo existe un trabajo publicado sobre la miristoilación de SOS3 (Ishitani et al., 2000), donde se demuestra que la proteína silvestre puede ser miristoilada *in vitro*, pero no una versión mutante en la que se ha sustituido el residuo de gly-2 por otro de alanina. El alelo mutante SOS3-G2A no puede complementar el fenotipo de sensibilidad a sal del mutante *sos3-1*, poniendo de manifiesto que la miristoilación es esencial para la función de SOS3. Curiosamente, en ese trabajo, los autores no detectaron diferencias en la cantidad de proteína SOS3 ligada a la membrana plasmática al comparar muestras de la planta silvestre y de la línea mutante.

En esta Tesis se ha demostrado que la proteína SOS3 se miristoila y se palmitoila *in vivo*. Un análisis de los ácidos grasos presentes en una muestra purificada de SOS3, expresada con una etiqueta de hexa-histidinas, permitió detectar ácido mirístico (C14:0) y ácido palmítico (C16:0), junto con este último también se detectaron ácidos palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linolénico (C18:3). Esto coincide con lo observado en el análisis de CBL1, y con los estudios realizados sobre la especificidad de las palmitoil-acil-transferasas (PATs) que muestran como estas enzimas no son específicas para el ácido palmítico y son capaces de utilizar un amplio abanico de ácidos grasos como sustrato, e incluso pueden transferir a la misma proteína diana diferentes especies de estos ácidos, como es el caso de SOS3 (Resh, 2016).

El estudio de los efectos de estas modificaciones en la función de SOS3, mediante su expresión en levadura para reconstituir la ruta SOS y en plantas mutantes *sos3-1* para complementar el fenotipo de sensibilidad a sal, demostró que la miristoilación y el dominio de polilisinas eran ambos esenciales ya que las proteínas SOS3-G2A y SOS3-KA no complementaron en absoluto en ninguno de los sistemas ensayados. La palmitoilación contribuye a la función de SOS3 pero es dispensable. En este caso, la proteína SOS3-C3A complementó de forma parcial el fenotipo del mutante *sos3-1* de *Arabidopsis* y activó al sistema SOS en levadura al nivel de la proteína silvestre. Por último, las proteínas SOS3-S205A y SOS3-S205D, en los que se impide y mimetiza la fosforilación respectivamente, no afectaron a su función. La expresión y consiguiente complementación de ambas versiones mutantes en el sitio de fosforilación fue indistinguible de la que produjo la proteína silvestre. Aunque se ha sugerido que la fosforilación de las CBLs por sus quinasas interactoras CIPKs puede ser un hecho generalizado y se sabe que CBL1, CBL2, CBL4 y CBL10 son efectivamente fosforiladas, no están muy claras cuales son las consecuencias funcionales de esta modificación (Lin et al., 2009; Du et al., 2011; Hashimoto et al., 2012). Así, en el caso de CBL2 y CBL10, que se unen con CIPK24(SOS2), la fosforilación de la serina en posición 216 o 237, respectivamente, parece estabilizar el complejo, ya que la mutación de este aminoácido por otro no fosforilable afecta negativamente a la formación del mismo (Lin et al., 2009). En el caso de CBL1, que interacciona con CIPK23 para activar al canal de K⁺ AKT1, la fosforilación de la serina 201 no impide la formación del complejo CIPK23/CBL1, pero éste permanece inactivo ya que es incapaz de incrementar el transporte de K⁺ de AKT1 (Hashimoto et al., 2012). Por último, la

fosforilación de SOS3(CBL4) no parece afectar ni a la formación del complejo SOS2(CIPK24)/SOS3 ni a la actividad del mismo.

Para entender las bases moleculares del defecto funcional observado en las proteínas mutantes de SOS3 (G2A, C3A y delección del poli-K), se estudiaron aspectos claves para el correcto funcionamiento de la ruta SOS como son la interacción con SOS2 y SOS1 así como la propia localización subcelular de SOS3. La proteína SOS3 silvestre fusionada a la proteína verde fluorescente GFP se localizó en el citoplasma, la membrana plasmática y el núcleo, coincidiendo con los resultados obtenidos por Batistič et al. (2010). La asociación de SOS3 a la membrana plasmática se determinó de forma inequívoca, mediante el empleo del sistema de SRS (*Sos Recruitment System*) de levadura (Aronheim et al., 1997; Quintero et al., 2002; Guo et al., 2004). Si bien la distribución subcelular de SOS3 es prácticamente generalizada, la localización de los complejos con SOS2 y SOS1 apareció fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática.

Aunque en un estudio anterior no se había observado ninguna diferencia en la distribución citoplasma/membrana de la proteína no miristoilable SOS3-G2A con respecto a la silvestre (Ishitani et al., 2000), los resultados obtenidos en esta Tesis para la localización subcelular de la SOS3-G2A muestran que la señal fluorescente provenía mayoritariamente del citoplasma y del núcleo. Utilizando un marcador de membrana plasmática (LTI6B) fusionado a RFP, se comprobó que efectivamente las señales de las dos proteínas fluorescentes no solapaban. De forma paralela, los datos de SRS en levadura demostraron que la proteína SOS3-G2A no podía asociarse a la membrana plasmática.

SOS3-G2A interaccionó, de forma similar a SOS3 silvestre, con la quinasa SOS2 y el transportador de Na⁺ SOS1. No obstante, se observó que la localización del complejo SOS2/SOS3 era fundamentalmente núcleo-citoplásmica, en lugar de periférica como se observó con el complejo silvestre. Este resultado es consistente con la incapacidad que tiene la proteína no miristoilable para unirse a la membrana plasmática. Considerando todos estos resultados se puede concluir que el papel esencial que tiene la miristoilación para la función de SOS3 se debe a su capacidad para enviar a la proteína del citosol a la membrana plasmática, y con ella a la quinasa SOS2. Si este complejo formado por el sensor de Ca²⁺ y la quinasa, aunque sea estable, no llega a esta membrana no puede encontrarse con el transportador SOS1 para fosforilarlo y activarlo. Esto explicaría por qué la proteína SOS3-G2A no es funcional y no puede rescatar el fenotipo de sensibilidad a NaCl del mutante de *Arabidopsis sos3-1* ni reconstituir la ruta SOS en levadura.

Un aspecto importante a considerar sobre la miristoilación de SOS3 es que esta acilación de carácter irreversible no evita la aparición de la proteína en compartimentos claramente hidrofílicos como el citosol o el interior del núcleo. Por el contrario, otras proteínas de la familia que también se modifican por miristoilación, como CBL1 o CBL9, se localizan exclusivamente en la membrana plasmática (Batistic et al., 2010). Esta situación paradójica, también se ha observado en la familia de sensores de Ca²⁺ NCS de animales (Ames et al., 2012). La proteínas NCS1 y FRQ1 son miristoiladas y siempre aparecen localizadas en

membranas; por el contrario, recoverina, neurocalcina o hipocalcina, también se modifican por miristoilación pero aparecen en los compartimentos citosólico y nuclear (O'Callaghan y Burgoyne, 2003). El estudio comparativo de estas proteínas miristoiladas y no miristoiladas, permitió proponer un mecanismo, denominado “*calcium/myristoil switch*”, que explica como estas proteínas pueden cambiar su localización entre el citoplasma, el núcleo y la membrana plasmática. Este mecanismo se propuso originalmente para la recoverina, proteína miembro de la familia NCS (Zozulya y Stryer, 1992). En ausencia de calcio, el grupo miristoilo de la proteína permanece oculto e inaccesible al medio externo dentro de un hueco hidrofóbico localizado entre los dominios “*EF-hand*” 1 y “*EF-hand*” 2, formando una estructura compacta que es citosólica. Cuando se produce una elevación de los niveles externos de Ca^{2+} , recoverina une dos átomos de Ca^{2+} que inducen un cambio conformacional de la estructura de la proteína, de manera que el grupo miristilo quedaría expuesto al medio externo, posibilitando la unión a membrana de la recoverina. La existencia del “*calcium/myristoil switch*” ha sido poco estudiada *in vivo* y se desconoce cuántas de las proteínas que forman la familia de NCS presentan este tipo de regulación dinámica (O'Callaghan y Burgoyne, 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que este mecanismo podría existir en la proteína SOS3, permitiendo su localización y tránsito entre la membrana plasmática y el núcleo.

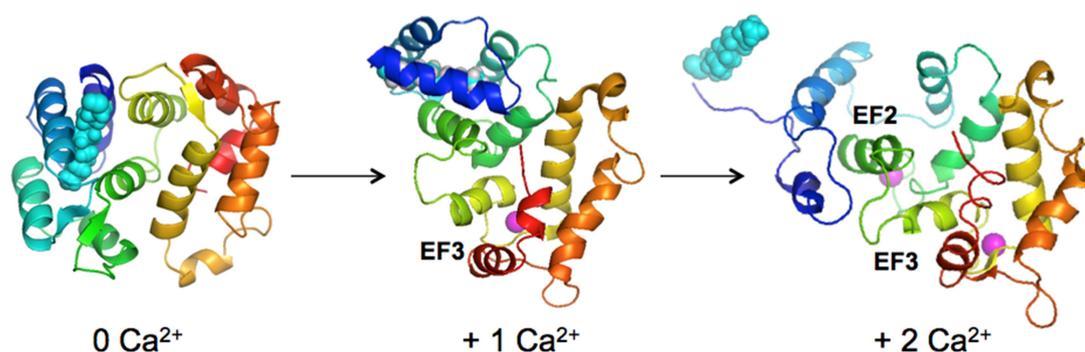


Figura D.1. Mecanismo “*calcium/myristoil switch*” de la recoverina. La proteína en estado de reposo carece de iones Ca^{2+} en su estructura y el grupo miristoilo se encuentra oculto en el interior de la molécula. Cuando se incrementa el Ca^{2+} , su dominio “*EF-hand*” 3 liga un ión Ca^{2+} , la estructura de la proteína se abre y el miristoilo empieza a salir del interior de la molécula. Finalmente, el dominio “*EF-hand*” 2 une otro ión Ca^{2+} y el miristoilo aparece completamente expuesto al medio externo. Los átomos de Ca^{2+} se muestran como esferas rosadas y la cadena carbonada de ácido mirístico aparece en color turquesa.

La proteína SOS3-KA, carente de la región de polilisinas, mostró un patrón en su localización subcelular muy similar al de la forma silvestre. Aunque en el sistema SRS de la levadura la proteína SOS3-KA no llegaba tan eficientemente a la membrana plasmática, su expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* mostró un elevado solapamiento con la señal correspondiente al marcador de membrana plasmática. En cuanto a sus relaciones funcionales

con el resto de componentes del sistema SOS, SOS3-KA formó un complejo estable con la quinasa SOS2 pero no interaccionó con SOS1. Dado que la unión de SOS3 al extremo C-terminal de SOS1 es absolutamente indispensable para mantener al transportador en la membrana plasmática durante condiciones de estrés salino, la incapacidad de SOS3-KA de asociarse con SOS1 es probablemente la causa de la falta de función de este mutante.

El efecto más llamativo de la falta de palmitoilación de SOS3 se produjo sobre su localización intranuclear. Mientras que la proteína SOS3 palmitoilada se acumulaba claramente en el interior del núcleo, la versión no palmitoilable SOS3-C3A no apareció en este compartimento celular. Este resultado es muy novedoso, y solo se ha encontrado en la literatura un precedente en el que se describa que la S-palmitoilación de una proteína sea necesaria para que ésta sea reconocida por la maquinaria de importación nuclear. La superóxido dismutasa 1 (SOD1) humana se localiza predominantemente en el citosol y en el núcleo. Esta proteína se palmitoila en un residuo de cisteína en posición 6. La sustitución de esta cisteína por una serina eliminó la palmitoilación y provocó la exclusión de SOD1 del núcleo (Marin et al., 2012). Del proceso inverso, la importación al núcleo de una proteína tras su depalmitoilación si hay ejemplos bien caracterizados. El factor de transcripción humano NFAT5a se miristoila y palmitoila, por lo que en condiciones fisiológicas normales está asociado a la membrana plasmática e inactivo. Cuando hay un estrés osmótico, NFAT5a se depalmitoila y se traslada al núcleo para activar la transcripción de los genes diana (Eisenhaber et al., 2011).

En la mayoría de las proteínas que se conocen que son palmitoiladas, esta acilación suele provocar su unión a membranas (Resh, 2016). No obstante, en nuestros ensayos de localización se observó que SOS3-C3A seguía asociada a la membrana plasmática en las células de *N. benthamiana* y en el sistema SRS de levadura. Desde el punto de vista funcional, SOS3-C3A interaccionó de forma eficiente tanto con SOS1 como con SOS2, por lo que no se obtuvo ningún resultado evidente que explicase la complementación parcial que produce SOS3-C3A al expresarse en la planta *sos3-1*. Dado que en levadura la versión no palmitoilable reconstituye el sistema SOS de forma indistinguible a SOS3 silvestre, esto sugiere que el defecto observado en planta debe ser específico y no se observa en el sistema heterólogo. Por tanto, es posible que SOS3 además de su papel en la ruta SOS tenga otras funciones que también son necesarias para conferir tolerancia a salinidad. En este sentido, la localización nuclear podría ser necesaria para que SOS3 regulase determinados factores de transcripción que controlen procesos de adaptación a salinidad. Esto es un hecho demostrado para las proteínas equivalentes de animales, CHP (Jiménez-Vidal et al., 2010), y podría ser también el caso para las proteínas CBL de plantas que, como SOS3, se localizan en el núcleo.

Finalmente los mutantes en la serina fosforilable SOS3-S205A y SOS3-S205D, interaccionaron tanto con SOS2 como con SOS1, tal como podía predecirse, ya que estas proteínas mutantes pudieron reconstituir el sistema SOS tanto en levadura como en planta.

D.3. Presencia de secuencias NES en SOS3

De las 10 proteínas CBL que componen esta familia de sensores de Ca^{2+} , cuatro de ellas, SOS3(CBL4), CBL5, CBL7 y CBL8 se localizan en el núcleo. La función que ejercen en dicho compartimento es desconocida, pero lo más probable es que actúen como reguladores de factores de transcripción, de forma análoga a los sensores de Ca^{2+} que en células de animales también aparecen localizados en el interior del núcleo (Jiménez-Vidal et al., 2010).

El paso de proteínas hacia el núcleo o desde el núcleo al exterior requiere el reconocimiento e interacción con la compleja maquinaria de importación/exportación localizada en los poros nucleares localizados en la membrana perinuclear (Bauer et al., 2015). Aunque no son universales, se han caracterizado algunos motivos conservados en algunas proteínas que están implicados en la importación y exportación nuclear.

Los dominios NLS (*Nuclear Localization Signal*) son agrupaciones de aminoácidos con carga positiva situados cerca del extremo N-terminal. SOS3 tiene un grupo de 5 lisinas al inicio de la proteína, pero no funcionan como señal NLS ya que la proteína mutante SOS3-KA es capaz de atravesar la membrana nuclear y se acumula en el interior del núcleo a niveles similares a la proteína silvestre. Asombrosamente, es la S-palmitoilación el factor que determina la entrada de SOS3 en el núcleo.

Las secuencias o señales NES (*Nuclear Export Signal*) son agrupaciones de 8 a 15 aminoácidos de carácter hidrofóbico, con abundancia de residuos de leucina, que permiten la salida de una proteína del núcleo. Se detectaron dos posibles dominios NES en la secuencia polipeptídica de SOS3. La primera señal, NES1, se localizó entre los residuos 136 y 148, al final del tercer dominio “*EF-hand*”. La segunda señal, NES2, se encuentra entre los residuos 180 y 193 al final del cuarto dominio “*EF-hand*”. Es destacable que los sensores de Ca^{2+} de animales CHP1 y CHP2 también se localizan en el núcleo y contienen señales NES localizadas en regiones equivalentes a las descritas para SOS3 (Nagita et al., 2003; Li et al., 2011). La fosfolipasa C- δ 1 también tiene una secuencia NES típica en su dominio “*EF-hand*”, situado en posiciones similares a las de CHP1 y CHP2 (Yamaga et al., 1999). Estas observaciones implican que muchas otras proteínas con dominios “*EF-hand*” también podrían poseer un dominio NES funcional como sugieren Nagita et al. (2003).

Las secuencias NES canónicas, que se encuentran en las típicas proteínas con tráfico nucleocitoplasmático como la proteína Rev (Fischer et al., 1995) y las proteínas quinasas MAPKK (Fukuda et al., 1996), son secuencias donde prevalecen los aminoácidos de leucina. Las secuencias NES que encontramos en SOS3 pertenecerían a este tipo de secuencias NES, a diferencia de las secuencias NES presentes en las proteínas CHP, que consisten principalmente en residuos hidrofóbicos distintos de leucina, como isoleucina, valina, metionina y fenilalanina (Nagita et al., 2003).

Los experimentos realizados para demostrar la funcionalidad de las señales NES encontradas en SOS3 resultaron infructuosos. Se usaron dos estrategias, por un lado se obtuvieron versiones de la proteína SOS3 fusionada a GFP en la que se habían sustituido todas las leucinas esenciales por alaninas en la señal NES1 o en la señal NES2, o bien de las

dos señales NES1 y NES2 a la vez. Por otro lado, se generó una proteína SOS3 carente del fragmento C-terminal en el que localizan las señales NES. Cuando se observó al microscopio la localización de todas estas proteínas SOS3 alteradas no se encontró ninguna diferencia en la localización nuclear con respecto a la proteína silvestre. Estos resultados fueron inesperados, ya que experimentos similares realizados con CHP2 en el que se mutaron las seis leucinas de la secuencia NES1 por alaninas, se produjo una localización predominantemente en el núcleo (Li et al., 2011b). En el caso de CHP1, fue necesario mutar las leucinas de las dos señales NES para producir un confinamiento de CHP1 en el núcleo (Nagita et al., 2003). Es importante tener en cuenta que la delección del C-terminal de SOS3, así como las mutaciones puntuales en los aminoácidos del doble mutante NES1+NES2 y, en menor medida, del mutante NES2 parecen que provocaron la inestabilidad de la proteína, puesto que los niveles de fluorescencia eran menores que los que suele producir la proteína SOS3 silvestre. También el número de células epidérmicas de *N. benthamiana* que mostraron fluorescencia fue menor. Por esta razón, estos experimentos pueden deber considerarse no concluyentes y será necesario plantear nuevos experimentos antes de descartar la posibilidad de que las señales NES de SOS3 sean funcionales. En cambio, la proteína mutante en la secuencia NES1 mostró un comportamiento similar a SOS3 silvestre. Estos resultados sugieren la importancia del dominio NES2 para la estabilidad de la proteína.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El sensor de Ca^{2+} SOS3(CBL4) interacciona directamente con el antiportador Na^+/H^+ SOS1.
2. La región de SOS1 implicada en la interacción con SOS3 está comprendida entre los aminoácidos 460 y 482, en el comienzo de la región citosólica del extremo C-terminal.
3. En condiciones de estrés salino la interacción SOS1/SOS3 es necesaria para mantener los niveles del antiportador SOS1 en la membrana plasmática.
4. La interacción SOS1/SOS3 es muy específica. De las 10 CBLs de *Arabidopsis* solo SOS3(CBL4) y CBL8 interaccionan con SOS1, siendo éstas también capaces de interaccionar con SOS2(CIPK24). Aunque se desconoce la función de CBL8, es probable que también participe en la regulación del transporte de Na^+ , quizá como sustituto de SOS3 cuando ésta no está presente.
5. La miristoilación de SOS3 en la glicina 2 es necesaria para el anclaje a la membrana plasmática del complejo SOS2/SOS3, donde fosforila y activa al transportador SOS1.
6. El dominio polibásico del N-terminal de SOS3 es esencial para la interacción directa con SOS1 y para mantener al transportador en la membrana plasmática en condiciones de estrés salino.
7. La palmitoilación de la cisteína 3 de SOS3 contribuye a la activación de la ruta SOS, pero no es esencial para la función de SOS3.
8. La entrada de SOS3 al núcleo depende estrictamente de la palmitoilación de la cisteína 3.
9. La salida del núcleo de SOS3 podría ocurrir a través de dos posibles señales de exportación nuclear (NES) localizadas cerca del extremo C-terminal de SOS3. Sin embargo, no se ha obtenido un resultado concluyente acerca de su funcionalidad.
10. La fosforilación de la serina 205 de SOS3 por SOS2 no tiene ningún efecto medible sobre la regulación y activación del antiportador SOS1 en los ensayos realizados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., y Genschik, P.** (2008a). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**: 2117-29.
- Achard, P., Renou, J.P., Berthomé, R., Harberd, N.P., y Genschik, P.** (2008b). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr. Biol.* **18**: 656-660.
- Agarwal, P.K., Shukla, P.S., Gupta, K., y Jha, B.** (2013). Bioengineering for salinity tolerance in plants: State of the art. *Mol. Biotechnol.* **54**: 102-123.
- Aharon, G.S., Apse, M.P., Duan, S., Hua, X., y Blumwald, E.** (2003). Characterization of a family of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* **253**: 245-256.
- Ahlfors, R. et al.** (2004). *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell* **16**: 1925-37.
- Ahmad, R., Lim, C.J., y Kwon, S.-Y.** (2013). Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnol. Rep.* **7**: 49-57.
- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M., y Ben Abdullah, F.** (2010). Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 4216-4222.
- Akaboshi, M., Hashimoto, H., Ishida, H., Saijo, S., Koizumi, N., Sato, M., y Shimizu, T.** (2008). The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *J. Mol. Biol.* **377**: 246-257.
- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., y Kudla, J.** (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases. *EMBO J.* **20**: 1051-1063.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, Ü., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., y Kudla, J.** (2003). The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant J.* **36**: 457-470.
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrián, M., Tiburcio, A.F., y Altabella, T.** (2010). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 547-552.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., y Murata, N.** (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* **123**: 1047-1056.
- Allen, R.D., Webb, R.P., y Schake, S.A.** (1997). Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* **23**: 473-479.
- Ames, J.B., Lim, S., y Ikura, M.** (2012). Molecular structure and target recognition of neuronal calcium sensor proteins. *Front. Mol. Neurosci.* **5**: 1-12.
- Amith, S.R. y Fliegel, L.** (2013). Regulation of the Na⁺/H⁺ Exchanger (NHE1) in breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **73**: 1259-1264.
- Ammar, Y. Ben, Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., y Wakabayashi, S.** (2006). Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH

- regulation. *EMBO J.* **25**: 2315-25.
- Amtmann, A., Jelitto, T.C., y Sanders, D.** (1999). K⁺-Selective inward-rectifying channels and apoplastic pH in barley roots 1. *Plant Physiol.* **120**: 331-338.
- An, R., Chen, Q.J., Chai, M.F., Lu, P.L., Su, Z., Qin, Z.X., Chen, J., y Wang, X.C.** (2007). AtNHX8, a member of the monovalent cation:proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li⁺/H⁺ antiporter. *Plant J.* **49**: 718-728.
- Apel, K. y Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-99.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W. a, y Blumwald, E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258.
- Apse, M.P. y Blumwald, E.** (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett.* **581**: 2247-2254.
- Apse, M.P., Sottosanto, J.B., y Blumwald, E.** (2003). Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant J.* **36**: 229-239.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J., y Karin, M.** (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3094-3102.
- Asano, T., Hakata, M., Nakamura, H., Aoki, N., Komatsu, S., Ichikawa, H., Hirochika, H., y Ohsugi, R.** (2011). Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* **75**: 179-191.
- Ashraf, M. y Foolad, M.R.** (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**: 206-216.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K.** (1994). *Current protocols in molecular biology*.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., y Iturriaga, G.** (2004). The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* **136**: 3649-59.
- Balagué, C. et al.** (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* **15**: 365-379.
- Balnokin, Y. V., Kurkova, E.B., Khalilova, L. a., Myasoedov, N. a., y Yusufov, a. G.** (2007). Pinocytosis in the root cells of a salt-accumulating halophyte *Suaeda altissima* and its possible involvement in chloride transport. *Russ. J. Plant Physiol.* **54**: 797-805.
- Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., y Potier, S.** (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**: 2749-2758.
- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., Cubero, B., y Pardo, J.M.** (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 1127-42.
- Bassil, E., Ohto, M., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T., y Blumwald, E.** (2011a). The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell* **23**: 224-39.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.-C., Ohto, M.-A., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., y Blumwald, E.** (2011b). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and

- NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell* **23**: 3482-97.
- Batelli, G., Verslues, P.E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K.S., Grillo, S., y Zhu, J.-K.** (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 7781-90.
- Batistic, O. y Kudla, J.** (2004). Integration and channeling of calcium signalling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**: 915-924.
- Batistič, O. y Kudla, J.** (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**: 985-992.
- Batistic, O., Sorek, N., Schültke, S., Yalovsky, S., y Kudla, J.** (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 1346-1362.
- Batistič, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., y Kudla, J.** (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J.* **61**: 211-222.
- Bauer, N.C., Doetsch, P.W., y Corbett, A.H.** (2015). Mechanisms regulating protein localization. *Traffic* **16**: 1039-1061.
- Bechtold, N., Ellis, J., y Pelletier, G.** (1993). In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus L Acad. Des Sci. Ser. Iii-Sciences La Vie-Life Sci.* **316**: 1194-1199.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., y Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20**: 1195-1197.
- Benito, B. y Rodríguez-Navarro, A.** (2003). Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **36**: 382-389.
- Benjamin, J.G. y Nielsen, D.C.** (2006). Water deficit effects on root distribution of soybean, field pea and chickpea. *F. Crop. Res.* **97**: 248-253.
- Berthomieu, P. et al.** (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* **22**: 2004-2014.
- Bhandal, I.S. y Malik, C.P.** (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Int. Rev. Cytol.* **110**: 205-254.
- Bhat, R.A., Lahaye, T., y Panstruga, R.** (2006). The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**: 12.
- Bijlmakers, M.J. y Marsh, M.** (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* **13**: 32-42.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M.** (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* **86**: 607-614.
- Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C.M., Agrawal, R.K., Frank, J., y Nierhaus, K.H.** (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol.* **317**: 292-309.
- Blount, P. y Moe, P.C.** (1999). Bacterial mechanosensitive channels: Integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol.* **7**: 420-424.
- Blumwald, E.** (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 431-434.

- Bohnert, H.J. y Jensen, R.G.** (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* **14**: 89-97.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., y Jensen, R.G.** (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Bohnert, H.J. y Sheveleva, E.** (1998). Plant stress adaptations making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 267-274.
- Booth, I.R. y Louis, P.** (1999). Managing hypoosmotic stress: Aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 166-169.
- Borsani, O.** (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *PLANT Physiol.* **126**: 1024-1030.
- Bouché, N., Fait, A., Bouchez, D., Møller, S.G., y Fromm, H.** (2003). Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 6843-6848.
- Bourne, Y., Dannenberg, J., Pollmann, V., Marchot, P., y Pongs, O.** (2001). Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J. Biol. Chem.* **276**: 11949-55.
- Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., y Rao, R.** (2005). The yeast endosomal $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{H}^+$ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1396-1405.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., y Gustin, M.C.** (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* (80-.). **259**: 1760-1763.
- Brini, F., Yamamoto, A., Jlaiei, L., Takeda, S., Hobo, T., Dinh, H.Q., Hattori, T., Masmoudi, K., y Hanin, M.** (2011). Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **52**: 676-688.
- Britto, D.T. y Kronzucker, H.J.** (2015). Sodium efflux in plant roots: What do we really know? *J. Plant Physiol.* **186-187**: 1-12.
- Brunelli, J.P. y Pall, M.L.** (1993). A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. *Yeast* **9**: 1299-1308.
- Burgoyne, R.D. y Weiss, J.L.** (2001). The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem. J.* **353**: 1-12.
- Bursens, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., y Verbruggen, N.** (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 632-640.
- Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 95-122.
- Campbell, S.A. y Close, T.J.** (1997). Dehydrins: Genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* **137**: 61-74.
- Capell, T., Bassie, L., y Christou, P.** (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 9909-14.
- Cha-Um, S. y Kirdmanee, C.** (2010). Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. *Turkish J. Agric. For.* **34**: 517-527.
- Chang, L. y Karin, M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40.

- Chazen, O., Hartung, W., y Neumann, P.M.** (1995). The different effects of PEG-6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant Cell Environ.* **18**: 727-735.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Shigaki, T., y Hirschi, K.D.** (2002). Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H⁺/cation antiporter. *Plant Physiol.* **128**: 1245-1254.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Zhu, J.K., y Hirschi, K.D.** (2004). The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* **279**: 2922-2926.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., y Zhu, J.K.** (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **55**: 225-236.
- Choi, H., Park, H.-J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.-Y., Seo, H.-H., Kim, Y.-W., Hwang, I., y Kim, S.Y.** (2005). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol.* **139**: 1750-61.
- Chrispeels, M.J., Crawford, N.M., y Schroeder, J.I.** (1999). Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* **11**: 661-676.
- Chung, J.S., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., y Shi, H.** (2008). Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced SOS1 mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant J.* **53**: 554-565.
- Clough, S.J. y Bent, A.F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743.
- Counillon, L. y Pouysse, J.** (2000). The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochemistry* **275**: 1-4.
- La Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., y Brunak, S.** (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**: 527-536.
- Cramer, G.R., Läuchli, A., y Polito, V.S.** (1985). Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells 1. *Plant Physiol.* **79**: 207-211.
- Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcázar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F., y Ferrando, A.** (2008). Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol.* **148**: 1094-105.
- Darley, C.P., van Wuytswinkel, O.C., van der Woude, K., Mager, W.H., y de Boer, A.H.** (2000). *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochem. J.* **351**: 241-249.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., y Van Breusegem, F.** (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 779-795.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., y Tester, M.** (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ.* **30**: 497-507.
- Davenport, R.J. y Tester, M.** (2000). A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* **122**: 823-834.
- Deivanai S, Xavier R., Vinod V, Timalata K, y Lim O.F.** (2011). Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *J. Stress Physiol. Biochem.* **7**.
- Demidchik, V., Essah, P.A., y Tester, M.** (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta* **219**: 167-175.

- Demidchik, V. y Maathuis, F.J.M.** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol.* **175**: 387-404.
- Demidchik, V. y Tester, M.** (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **128**: 379-387.
- Diédhiou, C.J. y Gollack, D.** (2006). Salt-dependent regulation of chloride channel transcripts in rice. *Plant Sci.* **170**: 793-800.
- Ding, H., Zhang, A., Wang, J., Lu, R., Zhang, H., Zhang, J., y Jiang, M.** (2009). Identity of an ABA-activated 46 kDa mitogen-activated protein kinase from *Zea mays* leaves: Partial purification, identification and characterization. *Planta* **230**: 239-251.
- Ding, L. y Zhu, J.K.** (1997). Reduced Na⁺ uptake in the NaCl-hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **113**: 795-799.
- de Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., Price, A., Tuberosa, R., y Draye, X.** (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci.* **12**: 474-481.
- Dreyer, I., Horeau, C., Lemaillet, G., Zimmermann, S., Bush, D.R., Rodriguez-Navarro, A., Schachtman, D.P., Spalding, E.P., Sentenac, H., y Gaber, R.F.** (1999). Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J. Exp. Bot.* **50**: 1073-1087.
- Du, W., Lin, H., Chen, S., Wu, Y., Zhang, J., Fuglsang, A.T., Palmgren, M.G., Wu, W., y Guo, Y.** (2011). Phosphorylation of SOS3-like calcium-binding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **156**: 2235-2243.
- Edwards, K., Johnstone, C., y Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1349-1349.
- Eisenhaber, B., Sammer, M., Lua, W.H., Benetka, W., Liew, L.L., Yu, W., Lee, H.K., Koranda, M., Eisenhaber, F., y Adhikari, S.** (2011). Nuclear import of a lipid-modified transcription factor: Mobilization of NFAT5 isoform a by osmotic stress. *Cell Cycle* **10**: 3897-3911.
- El-Shintinawy, F. y El-Shourbagy, M.N.** (2001). Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. *Biol. Plant.* **44**: 541-545.
- Elble, R.** (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**: 18-20.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., y Ma, F.** (2002). Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *J. Plant Growth Regul.* **21**: 335-351.
- Essah, P.A., Davenport, R., y Tester, M.** (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 307-318.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., y Hunt, T.** (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**: 389-396.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., y Fernie, A.R.** (2008). Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci.* **13**: 14-19.
- Farazi, T.A., Waksman, G., y J.I., G.** (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *Biochemistry* **2**: 2-5.
- Feki, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M., y Masmoudi, K.** (2011). Regulation of durum wheat Na⁺/H⁺ exchanger TdSOS1 by phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* **76**: 545-556.

- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., y Lührmann, R.** (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-83.
- Flowers, T.J.** (2004). Improving crop salt tolerance. En *Journal of Experimental Botany*, pp. 307-319.
- Flowers, T.J. y Colmer, T.D.** (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.* **179**: 945-963.
- Fontes, M.R., Teh, T., y Kobe, B.** (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.* **297**: 1183-94.
- Forment, J., Naranjo, M.Á., Roldán, M., Serrano, R., y Vicente, O.** (2002). Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J.* **30**: 511-519.
- Francis, D.** (2007). The plant cell cycle - 15 years on. *New Phytol.* **174**: 261-278.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G., y Zhu, J.-K.** (2007). *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19**: 1617-34.
- Fujii, H. y Zhu, J.K.** (2009). An autophosphorylation site of the protein kinase SOS2 is important for salt tolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2**: 183-190.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., y Nishida, E.** (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH2-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* **271**: 20024-8.
- Furumoto, T. et al.** (2011). A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* **476**: 472-475.
- Gadallah, M.A.A.** (1999). Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biol. Plant.* **42**: 249-257.
- Gao, Z., Sagi, M., y Lips, S.H.** (1998). Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Sci.* **135**: 149-159.
- García, A., Rizzo, C.A., Ud-din, J., Bartos, S.L., Senadhira, D., Flowers, T.J., y Yeo, A.R.** (1997). Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant, Cell Environ.* **20**: 1167-1174.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., y Fink, G.R.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 1480-5.
- Gaxiola, R. a, Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., y Fink, G.R.** (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 11444-11449.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A.S., Grill, E., Romeis, T., y Hedrich, R.** (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 8023-8.
- Gentry, H.R., Singer, A.U., Betts, L., Yang, C., Ferrara, J.D., Sondek, J., y Parise, L. V.** (2005). Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-

- hand* containing proteins. *J. Biol. Chem.* **280**: 8407-8415.
- Ghassemi, F., Jakeman, A.J., y Nix, H.A.** (1995). Salinisation of land and water resources: Human causes, extent, management and case studies.
- Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D., y Maathuis, F.J.M.** (2006). *Arabidopsis thaliana* Cyclic Nucleotide Gated Channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J. Exp. Bot.* **57**: 791-800.
- Gong, D., Gong, Z., Guo, Y., y Zhu, J.K.** (2002a). Expression, activation, and biochemical properties of a novel *Arabidopsis* protein kinase. *Plant Physiol.* **129**: 225-234.
- Gong, D., Guo, Y., Jagendorf, A.T., y Zhu, J.-K.** (2002b). Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol.* **130**: 256-264.
- Greaves, J. y Chamberlain, L.H.** (2007). Palmitoylation-dependent protein sorting. *J. Cell Biol.* **176**: 249-254.
- Groppa, M.D. y Benavides, M.P.** (2008). Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* **34**: 35-45.
- Gruwel, M.L.H., Rauw, V.L., Loewen, M., y Abrams, S.R.** (2001). Effects of sodium chloride on plant cells; a ³¹P and ²³Na NMR system to study salt tolerance. *Plant Sci.* **160**: 785-794.
- Gu, L., Liu, Y., Zong, X., Liu, L., Li, D.P., y Li, D.Q.** (2010). Overexpression of maize mitogen-activated protein kinase gene, *ZmSIMK1* in *Arabidopsis* increases tolerance to salt stress. *Mol. Biol. Rep.* **37**: 4067-4073.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., y Zhu, J.K.** (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383-1400.
- Guo, Y., Qiu, Q.-S., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Ohta, M., Zhang, C., Schumaker, K.S., y Zhu, J.-K.** (2004). Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 435-449.
- Gupta, B. y Huang, B.** (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J. Genomics* **2014**: 1-18.
- Guthrie, C. y Fink, G.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* **194**: 1-863.
- Halfter, U., Ishitani, M., y Zhu, J.K.** (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 3735-3740.
- Hammond-Kosack, K.E. y Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791.
- Hare, P.D. y Cress, W.A.** (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* **21**: 79-102.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., y Harper, J.F.** (2000). CDPKs-A kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci.* **5**: 154-159.
- Haro, R., Garciadeblas, B., y Rodriguez-Navarro, A.** (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**: 189-191.
- Harper, J.F., Breton, G., y Harmon, A.** (2004). Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 263-288.

- Hasegawa, P., Bressan, R., Zhu, J.K., y Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant ...* **51**: 463-499.
- Hashimoto, K., Eckert, C., Anschütz, U., Scholz, M., Held, K., Waadt, R., Reyer, A., Hippler, M., Becker, D., y Kudla, J.** (2012). Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *J. Biol. Chem.* **287**: 7956-7968.
- Haworth, R.S., McCann, C., Snabaitis, A.K., Roberts, N.A., y Avkiran, M.** (2003). Stimulation of the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway. *J. Biol. Chem.* **278**: 31676-31684.
- He, C., Yan, J., Shen, G., Fu, L., Holaday, A.S., Auld, D., Blumwald, E., y Zhang, H.** (2005). Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1848-1854.
- Hellens, R.P., Anne Edwards, E., Leyland, N.R., Bean, S., y Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 819-832.
- Hemsley, P.A., Weimar, T., Lilley, K., Dupree, P., y Grierson, C.** (2013). Palmitoylation in plants: new insights through proteomics. *Plant Signal. Behav.* **8**.
- Hernández, A., Jiang, X., Cubero, B., Nieto, P.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., y Pardo, J.M.** (2009). Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/ H^+ antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast: The endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. *J. Biol. Chem.* **284**: 14276-14285.
- Hernández, J. a, Ferrer, M. a, Jiménez, A., Barceló, a R., y Sevilla, F.** (2001). Antioxidant systems and $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* **127**: 817-831.
- Hincha, D.K.** (2003). Effects of calcium-induced aggregation on the physical stability of liposomes containing plant glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1611**: 180-186.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., y Tsay, Y.F.** (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**: 1184-1194.
- Hong, Z.** (2000). Removal of feedback inhibition of Delta 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**: 1129-1136.
- Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., y Murata, Y.** (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* **165**: 813-24.
- Horie, T., Hauser, F., y Schroeder, J.I.** (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 660-8.
- Hose, E., Clarkson, D.T., Steudle, E., Schreiber, L., y Hartung, W.** (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J. Exp. Bot.* **52**: 2245-2264.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., y Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**: 789-798.
- Huang, K. y El-Husseini, A.** (2005). Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**: 527-535.
- Huertas, R., Olías, R., Eljakaoui, Z., Gálvez, F.J., Li, J., De Morales, P.A., Belver, A., y**

- Rodríguez-Rosales, M.P.** (2012). Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant. Cell Environ.* **35**: 1467-1482.
- Huertas, R., Rubio, L., Cagnac, O., García-Sánchez, M.J., Alché, J.D.D., Venema, K., Fernández, J.A., y Rodríguez-Rosales, M.P.** (2013). The K^+/H^+ antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K^+ homeostasis in transgenic tomato. *Plant, Cell Environ.* **36**: 2135-2149.
- Huh, G.-H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M.** (2002). Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* **29**: 649-659.
- Hurst, C.H. y Hemsley, P.A.** (2015). Current perspective on protein S-acylation in plants: More than just a fatty anchor? *J. Exp. Bot.* **66**: 1599-1606.
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M., y Siddique, K.H.M.** (2011). Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol. Adv.* **29**: 300-311.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., y Shinozaki, K.** (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant J.* **24**: 655-665.
- Ingram, J. y Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 377-403.
- Iordachescu, M. y Imai, R.** (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **50**: 1223-1229.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W., y Zhu, J.K.** (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1678.
- Jacobson, T. y Adams, R.M.** (1958). Salt and silt in ancient mesopotamian agriculture. *science.* **128**: 1251-1258.
- Jaspers, P., Brosché, M., Overmyer, K., y Kangasjärvi, J.** (2010). The transcription factor interacting protein RCD1 contains a novel conserved domain. *Plant Signal. Behav.* **5**: 78-80.
- Jiang, X., Leidi, E.O., y Pardo, J.M.** (2010). How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal. Behav.* **5**: 792-5.
- Jiménez-Vidal, M., Srivastava, J., Putney, L.K., y Barber, D.L.** (2010). Nuclear-localized calcineurin homologous protein CHP1 interacts with upstream binding factor and inhibits ribosomal RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **285**: 36260-36266.
- Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J.J., Kim, K., Agarwal, M., Fu, X., Huang, A., y Zhu, J.J.** (2006). The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 18816-18821.
- Kawakami, A., Sato, Y., y Yoshida, M.** (2008). Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *J. Exp. Bot.* **59**: 793-802.
- Keigle, E., Moore, C.A., Haseloff, J., Tester, M.A.A., Knight, M.R.R., y Keigle, E.** (2000). Cell-type specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J.* **23**: 267-278.
- Kerepesi, I. y Galiba, G.** (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci.* **40**: 482.
- Killian, J.A. y Von Heijne, G.** (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 429-434.

- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Gupta, R., y Luan, S.** (2000). Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol* **124**: 1844-1853.
- Kim, W.-Y. et al.** (2013). Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **4**: 1352.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L. a, Tempczyk, a, Kalish, V.J., Tucker, K.D., Showalter, R.E., y Moomaw, E.W.** (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**: 641-644.
- Kitsios, G. y Doonan, J.H.** (2011). Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**: 204-9.
- Knight, H., Trewavas, a J., y Knight, M.R.** (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* **12**: 1067-1078.
- Kolobynina, K.G., Solovyova, V.V., Levay, K., Rizvanov, A.A., y Slepak, V.Z.** (2016). Emerging roles of the single *EF-hand* Ca²⁺ sensor tescalcin in the regulation of gene expression, cell growth and differentiation. *J. Cell Sci.* **129**.
- Kolukisaoglu, U., Weini, S., Blazevic, D., Batistic, O., y Kudla, J.** (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**: 43-58.
- Koncz, C. y Schell, J.** (1986). The promoter of *TL-DNA* gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., y Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 2940-2945.
- Krasensky, J. y Jonak, C.** (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **63**: 1593-1608.
- Kronzucker, H.J. y Britto, D.T.** (2011). Sodium transport in plants: A critical review. *New Phytol.* **189**: 54-81.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grisse, W., y Luan, S.** (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4718-4723.
- Lacombe, B. et al.** (2001). The identity of plant glutamate receptors. *Science* **292**: 1486-7.
- Lam, H.-M., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., y Coruzzi, G.** (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**: 125-126.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J., y Leigh, R.A.** (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* **32**: 139-149.
- Lee, J.Y., Yoo, B.C., y Harmon, A.C.** (1998). Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry* **37**: 6801-6809.
- Leidi, E.O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M.T., Cubero, B., Fernández, J.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quintero, F.J., y Pardo, J.M.** (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J.* **61**: 495-506.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Hua, B.-G., Fromm, H., y Berkowitz, G. a** (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* **128**: 400-410.

- Leran, S., Edel, K.H., Pervent, M., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J.N., Tillard, P., Gojon, A., Kudla, J., y Lacombe, B. (2015). Nitrate sensing and uptake in *Arabidopsis* are enhanced by ABI2, a phosphatase inactivated by the stress hormone abscisic acid. *Sci. Signal.* **8**: ra43-ra43.
- Levin, E.J. y Zhou, M. (2014). Recent progress on the structure and function of the TrkH/KtrB ion channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **27**: 95-101.
- Lewit-Bentley, A. y Réty, S. (2000). *EF-hand* calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 637-643.
- Li, A.L., Zhu, Y.F., Tan, X.M., Wang, X., Wei, B., Guo, H.Z., Zhang, Z.L., Chen, X.B., Zhao, G.Y., Kong, X.Y., Jia, J.Z., y Mao, L. (2008). Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* **66**: 429-443.
- Li, H.J., Yang, A.F., Zhang, X.C., Gao, F., y Zhang, J.R. (2007). Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase gene from *Lactuca sativa*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **89**: 37-48.
- Li, H.T., Liu, H., Gao, X.S., y Zhang, H. (2009). Knock-out of *Arabidopsis AtNHX4* gene enhances tolerance to salt stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**: 637-641.
- Li, H.W., Zang, B.S., Deng, X.W., y Wang, X.P. (2011). Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* **234**: 1007-1018.
- Li, J. et al. (2013). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* **121**: 121-5.
- Li, J.Y., Li, X., Ma, J., Zhou, J., y Zhang, F.C. (2004). Molecular cloning and expression analysis of *AtNHX2* promoter. *Prog. Biochem. Biophys.* **31**: 1114-1118.
- Li, L., Kim, B.-G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., y Luan, S. (2006). A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 12625-12630.
- Li, Q.-H., Wang, L.-H., Lin, Y.-N., Chang, G.-Q., Li, H.-W., Jin, W.-N., Hu, R.-H., y Pang, T.-X. (2011). Nuclear accumulation of calcineurin B homologous protein 2 (CHP2) results in enhanced proliferation of tumor cells. *Genes Cells* **16**: 416-26.
- Li, X. y Zhang, W. (2008). Salt-avoidance tropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **3**: 351-353.
- Ligterink, W. y Hirt, H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int. Rev. Cytol.* **201**: 209-275.
- Lin, H. et al. (2009). Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 1607-1619.
- Liu, H., Tang, R., Zhang, Y., Wang, C., Lv, Q., Gao, X., Li, W.B., y Zhang, H. (2010). AtNHX3 is a vacuolar K⁺/H⁺ antiporter required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ.* **33**: 1989-1999.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., y Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3730-3734.
- Liu, J. y Zhu, J.-K.J. (1998). A calcium sensor homologue required for plant salt tolerance. *Sci.* **280**: 1943-1945.
- Liu, J. y Zhu, J.K. (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 14960-14964.

- Luan, S., Kudla, J.J., Rodriguez-concepcion, M., Yalovsky, S., Grisse, W., Yalovsky, C.S., Grisse, W., Yalovsky, S., Grisse, W., Yalovsky, C.S., y Grisse, W.** (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell Supplement*: S389-S400.
- Lüttge, U. y Ratajczak, R.** (1997). *The plant vacuole* (Elsevier).
- Ma, S.Y. y Wu, W.H.** (2007). AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Mol. Biol.* **65**: 511-518.
- Maathuis, F., Verlin, D., Smith, F. a., Sanders, D., Fernandez, J. a., y Walker, N. a.** (1996). The physiological relevance of Na⁺-coupled K⁺-transport. *Plant Physiol.* **112**: 1609-1616.
- Maathuis, F.J. y Sanders, D.** (2001). Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol.* **127**: 1617-25.
- Maathuis, F.J.M.** (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *En Journal of Experimental Botany*, pp. 1137-1147.
- Maeda, T., Takekawa, M., y Saito, H.** (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-8.
- Majee, M., Maitra, S., Dastidar, K.G., Pattnaik, S., Chatterjee, A., Hait, N.C., Das, K.P., y Majumder, A.L.** (2004). A novel salt-tolerant L-myo-Inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) tateoka, a halophytic wild rice. Molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance. *J. Biol. Chem.* **279**: 28539-28552.
- Mäkelä, P.** (2000). Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity. *Biol. Plant.* **43**: 471-475.
- Makkerh, J.P.S., Dingwall, C., y Laskey, R.A.** (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* **6**: 1025-1027.
- Marcum, K.B.** (1999). Salinity tolerance mechanisms of grasses in the subfamily chloridoideae. *Crop Sci.* **39**: 1153-1160.
- Marin, E.P., Derakhshan, B., Lam, T.T., Davalos, A., y Sessa, W.C.** (2012). Endothelial cell palmitoylproteomic identifies novel lipid-modified targets and potential substrates for protein acyl transferases. *Circ. Res.* **110**: 1336-1344.
- Marschner, H.** (1995). *Mineral nutrition of higher plants*.
- Martinez-Atienza, J., Jiang, X., Garcideblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.-K.K., Pardo, J.M., y Quintero, F.J.** (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol* **143**: 1001-1012.
- Mäser, P. et al.** (2002). Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. **531**: 157-161.
- Mäser, P. et al.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 1646-1667.
- McAinsh, M.R. y Hetherington, A.M.** (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci.* **3**: 32-36.
- Menges, M., de Jager, S.M., Grisse, W., y Murray, J. a H.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* **41**: 546-566.

- Miles, G.P., Samuel, M.A., Zhang, Y., y Ellis, B.E.** (2005). RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environ. Pollut.* **138**: 230-237.
- Mishima, M., Wakabayashi, S., y Kojima, C.** (2007). Solution structure of the cytoplasmic region of Na⁺/H⁺ exchanger 1 complexed with essential cofactor calcineurin B homologous protein 1. *J. Biol. Chem.* **282**: 2741-2751.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Yoshida, R., y Shinozaki, K.** (2000). MAP kinase cascades in *Arabidopsis*: their roles in stress and hormone responses. *Results Probl. Cell Differ.* **27**: 29-38.
- Møller, I.S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G.M., Roy, S.J., Coates, J.C., Haseloff, J., y Tester, M.** (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2163-78.
- Monné, M., Nilsson, I., Johansson, M., Elmhed, N., y von Heijne, G.** (1998). Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *J. Mol. Biol.* **284**: 1177-83.
- Moon, H. et al.** (2003). NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 358-363.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V, Aparicio-tejo, P., Vegetal, D.D.N., Experimental, E., Dei, D.A., y Zaragoza, E.** (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 346-352.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriach, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., y Schroeder, J.I.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* **4**: 1749-1762.
- Mumberg, D., Müller, R., y Funk, M.** (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Env.* **25**: 239-250.
- Munns, R. y Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 651-681.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Nagae, M., Nozawa, A., Koizumi, N., Sano, H., Hashimoto, H., Sato, M., y Shimizu, T.** (2003). The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**: 42240-42246.
- Nagita, M., Inoue, H., Nakamura, N., y Kanazawa, H.** (2003). Two nuclear export signals specify the cytoplasmic localization of calcineurin B homologous protein 1. *J. Biochem.* **134**: 919-25.
- Nass, R., Cunningham, K.W., y Rao, R.** (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J. Biol. Chem.* **272**: 26145-26152.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., y Shigeoka, S.** (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* **147**: 1251-1263.
- Niu, X., Bressan, R. a., Hasegawa, P.M., y Pardo, J.M.** (1995). Ion homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.* **109**: 735-742.

- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., y Hanson, a D.** (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 128-134.
- Núñez-Ramírez, R., Sánchez-Barrena, M.J.O., Villalta, I., Vega, J.F., Pardo, J.M., Quintero, F.J., Martínez-Salazar, J., y Albert, A.** (2012). Structural insights on the plant Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) Na⁺/H⁺ antiporter. *J. Mol. Biol.* **424**: 283-294.
- O'Callaghan, D.W. y Burgoyne, R.D.** (2003). Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 963-965.
- Oh, D.-H. et al.** (2009). Loss of halophytism by interference with *SOS1* expression. *Plant Physiol.* **151**: 210-22.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., y Zhu, J.-K.** (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 11771-11776.
- Okazaki, Y., Kikuyama, M., Hiramoto, Y., y Iwasaki, N.** (1996). Short-term regulation of cytosolic Ca²⁺, cytosolic pH and vacuolar pH under NaCl stress in the charophyte alga *Nitellopsis obtusa*. *Plant Cell Env.* **19**: 569-576.
- Olías, R., Eljakaoui, Z., Pardo, J.M., y Belver, A.** (2009). The Na⁺/H⁺ exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na⁺ in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal. Behav.* **4**: 973-976.
- Orlowski, J. y Grinstein, S.** (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **447**: 549-565.
- Pandey, G.K. et al.** (2004). The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1912-1924.
- Pardo, J.M.** (2010). Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 185-196.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., y Quintero, F.J.** (2006). Alkali cation exchangers: Roles in cellular homeostasis and stress tolerance. En *Journal of Experimental Botany*, pp. 1181-1199.
- Parida, A.K., Das, A.B., y Mohanty, P.** (2004). Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* **42**: 213-226.
- Park, E.J., Jekncić, Z., Chen, T.H.H., y Murata, N.** (2007). The *codA* transgene for glycinebetaine synthesis increases the size of flowers and fruits in tomato. *Plant Biotechnol. J.* **5**: 422-430.
- Patharkar, O.R. y Cushman, J.C.** (2000). A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant J.* **24**: 679-91.
- Patra, B., Ray, S., Richter, A., y Majumder, A.L.** (2010). Enhanced salt tolerance of transgenic tobacco plants by co-expression of *PcINO1* and *McIMT1* is accompanied by increased level of myo-inositol and methylated inositol. *Protoplasma* **245**: 143-152.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., y Zhang, Y.** (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 417-41.
- Pedersen, S.F., Darborg, B.V., Rentsch, M.L., y Rasmussen, M.** (2007). Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1. *Arch. Biochem. Biophys.* **462**: 195-201.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., y Harberd, N.P.** (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates

- gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194-3205.
- Peterbauer, T. y Richter, A.** (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci. Res.* **11**: 185-197.
- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J., y Smeekens, S.C.M.** (1995). Improved performance of transgenic fructan accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* **107**: 125-130.
- Pitzschke, A. y Hirt, H.** (2008). Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *PLANT Physiol.* **149**: 606-615.
- Platten, J.D. et al.** (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* **11**: 372-4.
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., y Knight, M.R.** (1999). Temperature sensing by plants: The primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J.* **18**: 491-497.
- Polle, a** (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* **126**: 445-462.
- Postma, J.A. y Lynch, J.P.** (2011). Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. *Plant Physiol.* **156**: 1190-1201.
- Putney, L., Denker, S., y Barber, D.** (2002). The changing face of the Na^+/H^+ exchanger, NHE1: Structure, regulation and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 527-552.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., y Benfey, P.N.** (1999). The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J.* **18**: 111-119.
- Qi, Z., Stephens, N.R., y Spalding, E.P.** (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol.* **142**: 963-971.
- Qiu, Q.-S., Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Zhu, J.-K., y Schumaker, K.S.** (2003). Na^+/H^+ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**: 1041-52.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. a, Schumaker, K.S., y Zhu, J.-K.** (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8436-8441.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Schumaker, K.S., y Zhu, J.K.** (2004). Regulation of Vacuolar Na^+/H^+ Exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway. *J. Biol. Chem.* **279**: 207-215.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M., y Guo, Y.** (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to Protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *PLANT CELL ONLINE* **19**: 1415-1431.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R., y Pardo, J.M.** (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na^+/H^+ antiporters. *FEBS Lett.* **471**: 224-228.
- Quintero, F.J., Martinez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.-Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.-J., Zhu, J.-K., y Pardo, J.M.** (2011). Activation of the plasma membrane Na^+/H^+ antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 2611-2616.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K., y Pardo, J.M.** (2002). Reconstitution in yeast of

- the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**: 9061-9066.
- Ragel, P., Ródenas, R., García-Martín, E., Andrés, Z., Villalta, I., Nieves-Cordones, M., Rivero, R.M., Martínez, V., Pardo, J.M., Quintero, F.J., y Rubio, F.** (2015). The CBL-Interacting Protein Kinase CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K⁺ uptake in *Arabidopsis* roots. Plant Physiol.: pp.01401.2015.
- Rains, D.W. y Epstein, E.** (1967). Sodium absorption by barley roots: its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. Plant Physiol. **42**: 319-323.
- Ray, S., Agarwal, P., Arora, R., Kapoor, S., y Tyagi, A.K.** (2007). Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). Mol Genet Genomics **278**: 493-505.
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., y Deleu, C.** (2010). The *Arabidopsis* *pop2-1* mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. BMC Plant Biol. **10**: 20.
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S., y Frommer, W.B.** (1995). *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. FEBS Lett. **370**: 264-8.
- Resh, M.** (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. **1451**: 1-16.
- Resh, M.D.** (2016). Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. Prog. Lipid Res. **63**: 120-131.
- Robinson, M.F., Very, A.A., Sanders, D., y Mansfield, T.A.** (1997). How can stomata contribute to salt tolerance? Ann. Bot. **80**: 387-393.
- Rocks, O.** (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras Isoforms. Science. **307**: 1746-1752.
- Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J.** (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **159**: 940-945.
- Rodríguez-Rosales, M.P., Jiang, X., Gálvez, F.J., Aranda, M.N., Cubero, B., y Venema, K.** (2008). Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytol. **179**: 366-377.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., y Jones, J.D.** (2001a). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. EMBO J. **20**: 5556-5567.
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R., y Allen, R.D.** (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nat. Biotechnol. **15**: 988-991.
- Rubio, F., Gassmann, W., y Schroeder, J.I.** (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science **270**: 1660-1663.
- Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T.M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R. a, y Maggio, A.** (2004). Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis* 1. Plant Physiol. **136**: 3134-3147.
- Ruidang Quan, Huixin Lin, Imelda Mendoza, Yuguo Zhang, Wanhong Cao, Yongqing Yang, Mei Shang, A., Shouyi Chen, J.M.P., y Guo, and Y.** (2007). SCABP8/CBL10 , a

- putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Society* **19**: 1415-1431.
- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., y Salt, D.E.** (2006). Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **2**: 1964-1973.
- Rus, A., Lee, B., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M.** (2004). AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol.* **136**: 2500-2511.
- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B., Matsumoto, T.K., Koiwa, H., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M.** (2001). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14150-14155.
- Saier, M.H.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 354-411.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., y Izui, K.** (2000). Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* **23**: 319-327.
- Saito, H. y Tatebayashi, K.** (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* **136**: 267-272.
- Salleh, F.M., Evans, K., Goodall, B., Machin, H., Mowla, S.B., Mur, L.A.J., Runions, J., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H., y Rogers, H.J.** (2012). A novel function for a redox-related LEA protein (SAG21/AtLEA5) in root development and biotic stress responses. *Plant, Cell Environ.* **35**: 418-429.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory press.
- Sánchez-Barrena, M.J., Fujii, H., Angulo, I., Martínez-Ripoll, M., Zhu, J.K., y Albert, A.** (2007a). The structure of the C-Terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Mol. Cell* **26**: 427-435.
- Sánchez-Barrena, M.J., Martínez-Ripoll, M., y Albert, A.** (2013). Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 5734-5749.
- Sánchez-Barrena, M.J., Martínez-Ripoll, M., Zhu, J.K., y Albert, A.** (2005). The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: Molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J. Mol. Biol.* **345**: 1253-1264.
- Sánchez-Barrena, M.J., Moreno-Pérez, S., Angulo, I., Martínez-Ripoll, M., y Albert, A.** (2007b). The complex between SOS3 and SOS2 regulatory domain from *Arabidopsis thaliana*: Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**: 568-570.
- Sanders, D., Brownlee, C., y Harper, J.** (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**: 691-706.
- Sardet, C., Counillon, L., Franchi, a, y Pouysségur, J.** (1990). Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* **247**: 723-6.
- Sardet, C., Fafournoux, P., y Pouysségur, J.** (1991). α -thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J. Biol. Chem.* **266**: 19166-19171.
- Saxena, S.C., Kaur, H., Verma, P., Petla, B.P., Andugula, V.R., y Majee, M.** (2013). Osmoprotectants: potential for crop improvement under adverse conditions. *En Plant*

- Acclimation to Environmental Stress (Springer New York: New York, NY), pp. 197-232.
- Schachtman, D.P. y Schroeder, J.I.** (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655-658.
- Scherzer, S., Böhm, J., Krol, E., Shabala, L., Kreuzer, I., Larisch, C., Bemm, F., Al-Rasheid, K.A.S., Shabala, S., Rennenberg, H., Neher, E., y Hedrich, R.** (2015). Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of venus flytraps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 7309-7314.
- Schubert, S. y Läuchli, A.** (1986). Na⁺ exclusion, H⁺ release, and growth of two different maize cultivars under NaCl Salinity. *J. Plant Physiol.* **126**: 145-154.
- Schuppler, U., He, P., John, P., y Munns, R.** (1998). Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* **117**: 667-78.
- Serrano, R.** (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **165**: 1-52.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J. a, de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, a, Proft, M., Ros, R., y Montesinos, C.** (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* **50**: 1023-1036.
- Serrano, R. y Rodriguez-Navarro, A.** (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 399-404.
- Shabala, L., Cuin, T.A., Newman, I.A., y Shabala, S.** (2005). Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta* **222**: 1041-1050.
- Shabala, S.** (2003). Regulation of potassium transport in leaves: From molecular to tissue level. *Ann. Bot.* **92**: 627-634.
- Shabala, S., Cuin, T.A., Prismall, L., y Nemchinov, L.G.** (2007). Expression of animal *CED-9* anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. *Planta* **227**: 189-97.
- Shabala, S. y Cuin, T. a.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plant.* **133**: 651-669.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M., y Newman, I.A.** (2006). Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiol.* **141**: 1653-65.
- Sheen, J.** (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* (80-.). **274**: 1900-1902.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., y McLean, M.D.** (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* **4**: 446-452.
- Shen, B., Jensen, R.G., y Bohnert, H.J.** (1997). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* **113**: 1177-83.
- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J., y Jensen, R.C.** (1997). Increased salt and drought tolerance by D-Ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* **115**: 1211-1219.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., y Zhu, J.K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 6896-6901.
- Shi, H., Lee, B., Wu, S.-J., y Zhu, J.-K.** (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺

- antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 81-85.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., y Zhu, J.-K.** (2002). The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477.
- Shi, H. y Zhu, J.K.** (2002). Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **50**: 543-550.
- Shi, J., Kim, K.N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S., y Kudla, J.** (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2393-2405.
- Smirnoff, N.** (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol. Tansley re*: 27-58.
- Smirnoff, N. y Cumbes, Q.J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.
- Di Sole, F., Vadnagara, K., Moe, O.W., y Babich, V.** (2012). Calcineurin homologous protein: a multifunctional Ca^{2+} -binding protein family. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**: F165-79.
- Song, A., Lu, J., Jiang, J., Chen, S., Guan, Z., Fang, W., y Chen, F.** (2012). Isolation and characterisation of *Chrysanthemum crassum* SOS1, encoding a putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter. *Plant Biol.* **14**: 706-713.
- Sorek, N., Poraty, L., Sternberg, H., Bar, E., Lewinsohn, E., y Yalovsky, S.** (2007). Activation status-coupled transient S-acylation determines membrane partitioning of a plant Rho-related GTPase. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 2144-2154.
- Stedle, E.** (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *J. Exp. Bot.* **51**: 1531-1542.
- Straub, T., Ludewig, U., y Neuhaeuser, B.** (2017). The kinase CIPK23 inhibits ammonium transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*: tpc.00806.2016.
- Sun, F., Zhang, W., Hu, H., Li, B., Wang, Y., Zhao, Y., Li, K., Liu, M., y Li, X.** (2008). Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **146**: 178-88.
- Sunarpi et al.** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na^+ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **44**: 928-938.
- Sussman, M.R. y Harper, J.F.** (1989). Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *Pl. Cell* **1**: 953-960.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., y Mittler, R.** (2008). The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **283**: 9269-9275.
- Szabados, L. y Savouré, A.** (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**: 89-97.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K.** (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **29**: 417-426.
- Talke, I.N., Blaudez, D., Maathuis, F.J.M., y Sanders, D.** (2003). CNGCs: Prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci.* **8**: 286-293.
- Tang, R.-J., Zhao, F.-G., Garcia, V.J., Kleist, T.J., Yang, L., Zhang, H.-X., y Luan, S.** (2015). Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 3134-9.

- Teige, M., Scheickl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., y Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **15**: 141-152.
- Tester, M. y Davenport, R.** (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* **91**: 503-527.
- Tester, M. y Leigh, R. a** (2001). Partitioning of nutrient transport processes in roots. *J. Exp. Bot.* **52**: 445-57.
- Thevelein, J.M. y Voordeckers, K.** (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2407-2414.
- Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P., y Glaser, L.** (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 69-97.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., y Kobayashi, H.** (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* **11**: 1195-1206.
- Tyerman, S.D. y Skerrett, I.M.** (1998). Root ion channels and salinity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **78**: 175-235.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., y Sun, T.-P.** (2004). Della proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1008-1019.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., y Paszkowski, J.** (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *Embo J* **21**: 6483-6493.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., y Schroeder, J.I.** (2000). The *Arabidopsis* *HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae* 1. **122**: 1249-1259.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K.** (2004). *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 369-375.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., y Shinozaki, K.** (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-54.
- Valerio, C., Costa, A., Marri, L., Issakidis-Bourguet, E., Pupillo, P., Trost, P., y Sparla, F.** (2011). Thioredoxin-regulated beta-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *J. Exp. Bot.* **62**: 545-555.
- Vallés, P.G., Bocanegra, V., Gil Lorenzo, A., y Costantino, V.V.** (2015). Physiological functions and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger [NHE1] in renal tubule epithelial cells. *Kidney Blood Press. Res.* **40**: 452-466.
- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M.C., Rodríguez-Rosales, M.P., y Donaire, J.P.** (2003). A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *J. Biol. Chem.* **278**: 22453-22459.
- Venema, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M., y Donaire, J.P.** (2002). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* **277**: 2413-2418.
- Verbruggen, N. y Hermans, C.** (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*

- 35: 753-759.
- Vert, G. y Chory, J.** (2009). A toggle switch in plant nitrate uptake. *Cell* **138**: 1064-1066.
- Vijay-Kumar, S. y Kumar, V.D.** (1999). Crystal structure of recombinant bovine neurocalcin. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 80-8.
- Vijn, I. y Smeekens, S.** (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* **120**: 351-360.
- Vinocur, B. y Altman, A.** (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 123-132.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., y Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**: 949-956.
- Waadt, R. y Kudla, J.** (2008). In plant visualization of protein interactions using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *Cold Spring Harb. Protoc.* **3**.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., y Kudla, J.** (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J.* **56**: 505-516.
- Wakabayashi, S., Shigekawa, M., y Pouyssegur, J.** (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol. Rev.* **77**: 51-74.
- Wan, B., Lin, Y., y Mou, T.** (2007). Expression of rice Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Lett.* **581**: 1179-1189.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., y Fowke, L.C.** (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**: 501-510.
- Wang, J., Ding, H., Zhang, A., Ma, F., Cao, J., y Jiang, M.** (2010). A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), *ZmMPK3*, is involved in response to diverse environmental cues. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 442-452.
- Wang, W., Li, Y., Zhang, Y., Yang, C., Zheng, N., y Xie, Q.** (2007). Comparative expression analysis of three genes from the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter (*AtNHX*) family in relation to abiotic stresses. *Chinese Sci. Bull.* **52**: 1754-1763.
- Wang, Y.-H., Garvin, D.F., y Kochian, L. V.** (2002). Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol.* **130**: 1361-1370.
- Wang, Y., Li, K., y Li, X.** (2009). Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* **166**: 1637-1645.
- Wang, Y., Zhang, W., Li, K., Sun, F., Han, C., Wang, Y., y Li, X.** (2008). Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **121**: 87-96.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., Frei Dit Frey, N., y Leung, J.** (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Mol. Plant* **1**: 198-217.
- Weinl, S. y Kudla, J.** (2009). The CBL-CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol.* **184**: 517-528.
- West, G., Inzé, D., y Beemster, G.T.S.** (2004). Cell cycle modulation in the response of the

- primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol.* **135**: 1050-1058.
- Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., y Rudolph, H.K.** (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**: 3870-3882.
- Wu, S.J., Ding, L., y Zhu, J.K.** (1996). *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* **8**: 617-627.
- Wu, Y., Ding, N., Zhao, X., Zhao, M., Chang, Z., Liu, J., y Zhang, L.** (2007). Molecular characterization of PeSOS1: The putative Na⁺/H⁺ antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Mol. Biol.* **65**: 1-11.
- Xing, Y., Jia, W., y Zhang, J.** (2007). AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **58**: 2969-2981.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., y Zhu, J.** (2002). Cell Signaling during cold, drought, and salt Stress. *Plant Cell supplement*: S165-S184.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., y Wu, R.** (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249-257.
- Xu, G., Magen, H., Tarchitzky, J., y Kafkafi, U.** (1999). Advances in chloride nutrition of plants. *Adv. Agron.* **68**.
- Xu, H., Jiang, X., Zhan, K., Cheng, X., Chen, X., Pardo, J.M., y Cui, D.** (2008). Functional characterization of a wheat plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**: 8-15.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., y Wu, W.H.** (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**: 1347-1360.
- Xue, S., Yao, X., Luo, W., Jha, D., Tester, M., Horie, T., y Schroeder, J.I.** (2011). AtHKT1;1 mediates nernstian sodium channel transport properties in *Arabidopsis* root stelar cells. *PLoS One* **6**: e24725.
- Yadav, R., Flowers, T.J., y Yeo, A.R.** (1996). The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high- and low-sodium-transporting lines of rice developed through intravarietal selection. *Plant, Cell Environ.* **19**: 329-336.
- Yamaga, M., Fujii, M., Kamata, H., Hirata, H., y Yagisawa, H.** (1999). Phospholipase C-delta1 contains a functional nuclear export signal sequence. *J. Biol. Chem.* **274**: 28537-41.
- Yamaguchi, T., Aharon, G.S., Sottosanto, J.B., y Blumwald, E.** (2005). Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 16107-12.
- Yang, Q., Chen, Z.Z., Zhou, X.F., Yin, H.B., Li, X., Xin, X.F., Hong, X.H., Zhu, J.K., y Gong, Z.** (2009). Overexpression of *SOS* (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2**: 22-31.
- Yano, R., Nakamura, M., Yoneyama, T., y Nishida, I.** (2005). Starch-related alpha-glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *PLANT Physiol.* **138**: 837-846.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.-Y., Katsuhara, M., Brodsky, D.E., Wu, Y., y Schroeder, J.I.** (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiol.* **152**: 341-55.
- Yeo, A.R., Yeo, M. E., Flowers, T.J.** (1987). The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J Exp Bot* **38**: 1141-1153.

- Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N., y Flowers, T.J.** (1999). Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant, Cell Environ.* **22**: 559-565.
- Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J., y Flowers, T.J.** (1991). Short-term and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza Sativa* L). *J. Exp. Bot.* **42**: 881-889.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., y Pardo, J.M.** (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* **30**: 529-539.
- Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., y Zhang, W.** (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **188**: 762-773.
- Zaun, H.C., Shrier, A., y Orlowski, J.** (2008). Calcineurin B homologous protein 3 promotes the biosynthetic maturation, cell surface stability, and optimal transport of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 isoform. *J. Biol. Chem.* **283**: 12456-12467.
- Zhang, H.X. y Blumwald, E.** (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* **19**: 765-8.
- Zhang, H.X., Hodson, J.N., Williams, J.P., y Blumwald, E.** (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 12832-6.
- Zhao, R., Sun, H.-L., Mei, C., Wang, X.-J., Yan, L., Liu, R., Zhang, X.-F., Wang, X.-F., y Zhang, D.-P.** (2011a). The *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytol.* **192**: 61-73.
- Zhao, Y., Wang, T., Zhang, W., y Li, X.** (2011b). SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **189**: 1122-1134.
- Zhou, W., Qian, Y., Kunjilwar, K., Pfaffinger, P.J., y Choe, S.** (2004). Structural insights into the functional interaction of KCHIP1 with Shal-type K⁺ channels. *Neuron* **41**: 573-86.
- Zhu, J.-K.** (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**: 941-948.
- Zhu, J.-K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 247-273.
- Zhu, J.K.** (2001a). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 401-406.
- Zhu, J.K.** (2001b). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 66-71.
- Zhu, J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 441-445.
- Zhu, J.K., Liu, J., y Xiong, L.** (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181-1191.
- Zhu, S.-Y. et al.** (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3019-3036.
- Zolla, G., Heimer, Y.M., y Barak, S.** (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* **61**: 211-224.
- Zou, J.-J., Wei, F.-J., Wang, C., Wu, J.-J., Ratnasekera, D., Liu, W.-X., y Wu, W.-H.** (2010).

Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK10 functions in ABA and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol.*

Zozulya, S. y Stryer, L. (1992). Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 11569-11573.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

ANEXO I: Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
ABA	Ácido abcísico
AP	Medio Arginina-Fosfato
BD	del inglés, <i>Binding Domain</i>
Ca ²⁺	Calcio
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CBL	del inglés, <i>Calcineurin B-Like</i>
CDK	Kinasas dependientes de ciclinas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDPK	del inglés, <i>Calcium-Dependent Protein Kinases</i>
CIB	del inglés, <i>Calcium Integrin Binding protein</i>
CIPasa	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
CIPK	del inglés, <i>CBL-Interacting Protein Kinase</i>
CNB	Subunidad B de la calcineurina
CNGC	Canales activados por nucleótidos cíclicos
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> cv Columbia silvestre
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA o ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfato (dATP ⁺ dCTP ⁺ dGTP ⁺ dTTP)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
EMS	Etilmetanosulfonato
FAO	del inglés, <i>Food and Agriculture Organization</i>
g	Gramos
GABA	Ácido g-butírico
GFP	Proteína verde fluorescente
gl1	<i>Arabidopsis thaliana</i> mutante glabrous 1
GLR	Canales activados por glutamato
GTP	Trifosfato de guanosina
GUS	b-glucuronidasa
H	Hidrógeno o protones
HCl	Ácido clorhídrico
K ⁺	Potasio
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
l	Litros
LB	Medio de cultivo <i>Lysogenic Broth</i>

LEA	del inglés, <i>Late Embryogenesis Abundant</i>
Li ⁺	Litio
M	Molar
MAPK	del inglés, <i>Mitogen Activated Protein-Kinase</i>
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etano-sulfónico
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Medio Murashige-Skoog para el cultivo de plantas
mV	Milivoltios
Na ⁺	Sodio
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NCS	Sensor de calcio neuronal
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
NSCC	Canales de cationes no selectivos
p/v	Peso por volumen
AP	Ácido fosfatídico
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PLATE	Solución para transformación de levaduras
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
HR	Humedad relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAasa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
SDS	N-dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis con SDS-Poliacrilamida
SRS	del inglés, <i>Sos Recruitment System</i>
Taq polimerasa	Polimerasa de ADN de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampón Tris-Bórico-EDTA para electroforesis de ADN
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletenodiamida
Tm	Temperatura media de hibridación del oligonucleótido
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
V	Voltios

v/v	Volumen por volumen
YFP	Proteína amarilla fluorescente
YNB	Medio Yeast-Nitrogen-Base para el cultivo de levaduras
YPD	Medio Yeast-Peptone-Dextrose para el cultivo de levaduras
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

ANEXO II: Vectores utilizados

Vectores de clonado

Vector	Organismo	Marcador	Reference
pCR®Blunt	Bacteria	Kanamicina	Invitrogen
pSPARK®	Bacteria	Ampicilina	Canvax Biotech

Vectores de expresión

Vector	Organismo	Marcador	Reference
pDR195	Levadura/Bacteria	URA3/Ampicilina	(Rentsch et al., 1995)
pYPGE15	Levadura/Bacteria	URA3/Ampicilina	(Brunelli y Pall, 1993)
pYPGE15::SOS1	Levadura/Bacteria	URA3/Ampicilina	(Quintero et al., 2002)
pYPGE15::SOS1Δ998	Levadura/Bacteria	URA3/Ampicilina	(Quintero et al., 2011)
pYPGE15::SOS3	Levadura/Bacteria	URA3/Ampicilina	(Guo et al., 2004)
pET::SOS3-G2A	Bacteria	Ampicilina	(Ishitani et al., 2000)
p414GPD	Levadura/Bacteria	TRP1/Ampicilina	(Mumberg et al., 1995)
pFLT	Levadura/Bacteria	TRP1/Ampicilina	(Quintero et al., 2002)
p425GPD	Levadura/Bacteria	LEU2/Ampicilina	(Mumberg et al., 1995)
pADNS	Levadura	LEU2/Ampicilina	(Aronheim et al., 1997)

Vectores binarios

Vector	Organismo	Marcador	Reference
pBI321	Planta/Bacteria	Kanamicina	(Martinez-Atienza et al., 2007)
pGREENII	Planta/Bacteria	Higromicina	(Hellens et al., 2000)
pSPYNE173	Planta/Bacteria	Kanamicina	(Waadt y Kudla, 2008)
pSPYCE(M)	Planta/Bacteria	Kanamicina	(Waadt y Kudla, 2008)
pGPTVII	Planta/Bacteria	Kanamicina	(Becker et al., 1992)

ANEXO III: Oligonucleótidos usados

Se han subrayado los sitios de restricción usados para la elaboración de las construcciones.

Confirmación de mutantes *sos3-1*

sos3-1-r	5'- GTCTTTCCATTTCATCTATATCG -3'
sos3-1 A-f	5'- GTTGCTTTCAAGTTACGACAAA -3'
sos3-1 B-f	5'- GTTGCTTTCAAGTTGTACGATT -3'

Mutación Dominio de unión de SOS1 a SOS3

SOS1_UPS BamHI	5'- GGTTTGAGGGGCGCAGTGGCT -3'
BD SOS3	5'- ATTTTACCAGCCCCCAAGAAAGACGATGAGCTAGGACCT -3'
BD SOS3 Rev	5'- AGGCCTAGCTCCTCATCGTCTTTCTTGGGGGCTGGTAAAAT -3'
SOS1_3BD Rev XhoI	5'- TTTCTCGAGCTAGTCTCC -3'
SOS1 KpnI R	5'- TCCTAGATCGTTCCTGAAAAC -3'

Mutación SOS1Δ997

SOS1 XhoI	5'- CTCGGTTACATTGAAAACCTC -3'
SOS1 997 KpnI R	5'- CACGGTACCATCAGAGCTTGAGCTACG -3'

Mutaciones del extremo N-terminal de SOS3

Para su expresión en el vector pYPGE15 de levadura:

SOS3 XhoI R	5'- AGCTCGAGGTTAGGAAGATACG -3'
C3A XbaI	5'- AAATCTAGATGGGCGCCTCTGT -3'
KA XbaI	5'- GACTCTAGAATGGGCTGCTCTGTATCGGCGGCGGCGGCGGAATGCAATGCGACCAC-3'

Para su utilización en el sistema SRS:

SOS3 HindIII	5'- CGCAAGCTTATGGGCTGCTCTGTATCGAAG -3'
SOS3 hSos	5'- TACCCGGGAGAGAAGATACGTTT -3'

SOS3 C_P1	5'- GGAAGCTTATGGGCGCCTCTGTATC -3'
SOS3 G_P1	5'- GGAAGCTTATGGCCTGCTCTGTATC -3'
SOS3 K_P1	5'- GTAAGCTTATGGGCTGCTCTGTATCGGCGGCGGCGGCGGCGGAATGCAATGCGACCAC -3'

Para las fusiones con la proteína GFP:

SOS3 HindIII	5'- CGCAAGCTTATGGGCTGCTCTGTATCGAAG -3'
SOS3 GFP 3'	5'- TTGCGGCCGCGGAAGATACGTTTTGCAA -3'
SOS3 C_P1	5'- GGAAGCTTATGGGCGCCTCTGTATC -3'
SOS3 G_P1	5'- GGAAGCTTATGGCCTGCTCTGTATC -3'
SOS3 K_P1	5'- GTAAGCTTATGGGCTGCTCTGTATCGGCGGCGGCGGCGGCGGAATGCAATGCGACCAC -3'

Mutación NES de SOS3

GFP HindIII	5'- GAGAAGCTTATGGGTGTGAGCAAGGGC -3'
GFP::NES F	5'- GAGCTGTACAAGATGGTAGTAGCGCTTCTT -3'
GFP::NES R	5'- AAGAAGCGCTACTACCATCTTGACAGCTC -3'
NES XbaI	5'- GAGTCTAGATTAGGAAGATACGTTTTGC -3'
SOS3::GFP F	5'- GAATTGAAAGAGGGTGTGAGCAAGGGC -3'
SOS3::GFP R	5'- GCCCTTGCTCACACCCTCTTTCAATTC -3'
GFP XbaI R	5'- GAGTCTAGATTACTTGACAGCTC -3'
SOS3 HindIII	5'- CGCAAGCTTATGGGCTGCTCTGTATCGAAG -3'
SOS3 NES1mut 5'-end	5'- GAGATGGTAGTAGCGGCTGCTCACGAATCCGAAGC -3'
SOS3NES1mut	5'- GTAGCGGCTGCTCACGAATCCGAAGCAGTTGCTTCCGAAGATATGATTG -3'
SOS3 NES2 mut 5'-end	5'- GGAAAGACTTTGTATCCGCGAATCCATCGGCCA -3'
SOS3 NES2 mut	5'- GTATCCGCGAATCCATCGGCCATCAAGAACATGACTGCGCCATATCTAAAGG-3'