

Caracterización de dominios funcionales del antiportador KEA1 de *Arabidopsis thaliana* en levadura

Ramón González Pasayo^{1,2} & Jaime Bravo³

¹ Department of Plant Biology, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA; ² Dirección actual: Laboratorio de Cultivo *in vitro*, Grupo Papa, EEA Balcarce, INTA, Ruta 226 km 73,5 (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina, rgonzalez@balcarce.inta.gov.ar; ³ Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, Campus Andrés Bello, Colina el Pino, IV Región de Coquimbo, La Serena, 1700000, Chile.

González Pasayo, Ramón & Jaime Bravo (2011) Caracterización de dominios funcionales del antiportador KEA1 de *Arabidopsis thaliana* en levadura. Rev.Fac.Agron. Vol 110 (1): 26- 34.

Un cADN de *Arabidopsis thaliana* fue clonado y caracterizado funcionalmente utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expresión heterólogo. El cADN codifica una proteína de membrana de 618 aminoácidos que mostró una significativa homología a los transportadores de K⁺ KEFC y KEFB de *Escherichia coli* y fue denominado cADN *AtKEA1*. El cADN *AtKEA1* suprimió el fenotipo de sensibilidad a higromicina en la mutante de levadura afectada en el gen *NHX1* y aumentó la tolerancia a Na⁺ en la mutante de levadura AXT3 que carece de varios transportadores de Na⁺. La microscopía de fluorescencia de la proteína codificada por el cADN *AtKEA1* etiquetada con la proteína verde fluorescente mostró que esta proteína se localiza preferentemente en el retículo endoplasmático perinuclear de células de levadura. Estos resultados indican que el cADN *AtKEA1* codifica a un potencial antiportador que podría tener un papel en la tolerancia a salinidad en plantas.

Palabras claves: *Arabidopsis* - transportador - ion - tolerancia a salinidad – levadura

González Pasayo, Ramón & Jaime Bravo (2011) Characterization of the antiporter *KEA1* functional domains from *Arabidopsis thaliana* in yeast. Rev.Fac.Agron. Vol 110 (1): 26- 34.

A cDNA from *Arabidopsis thaliana* was cloned and functionally characterized using *Saccharomyces cerevisiae* as heterologous expression system. The cDNA encodes a predicted membrane protein of 618 amino acids that it shows significant sequence homology to *Escherichia coli* KEFC and KEFB K⁺ efflux transporters, and named *AtKEA1*cDNA. *AtKEA1*cDNA suppressed the hygromycin-sensitive phenotype of the yeast *NHX1* mutant and increased Na⁺ tolerance in the AXT3 yeast mutant that has defects in several Na⁺ transport systems. Fluorescence microscopy of green fluorescent protein-tagged *AtKEA1* showed that this protein was localized preferentially in the perinuclear endoplasmic reticulum in yeast. These results indicate that the *AtKEA1*cDNA encodes a potential antiporter that might play a role in salt tolerance in plant cells.

Keywords: *Arabidopsis* - transporter - ion - salt tolerance - yeast

Recibido: 03/06/2009

Aceptado: 16/08/2011

Disponible on line: 23/09/2011

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen una destacable capacidad de adaptación y crecimiento en suelos que contienen una amplia variedad de nutrientes esenciales e iones tóxicos. Esta plasticidad puede ser atribuida en parte al gran número de transportadores de diferente afinidad y especificidad iónica, así como a la existencia de redes de transducción de señales que regulan la actividad de cada transportador. Evidencias genéticas indican que los transportadores de plantas tienen roles en el crecimiento (Hirsch et al., 1998; Schiøtt et al., 2004), el desarrollo (Schumacher et al., 1999; Bock et al., 2006), la reproducción (Gottwald et al., 2000), así como en la adaptación y en la respuesta a estímulos ambientales (Hasegawa et al., 2000; Apse & Blumwald, 2002; Rodríguez-Rosales et al., 2008). La obtención de la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana* permitió identificar alrededor de ochocientos potenciales transportadores, los cuales han mostrado un sorprendente grado de conservación de la estructura en muchas familias de transportadores en bacterias, hongos, animales (Mäser et al., 2001). A pesar de la importancia del conocimiento de la secuencia, la función de la mayoría de estos transportadores es aún desconocida. Todavía no se conocen cuales son los sustratos, la localización, el modo de acción, la regulación ni el impacto en la función de las células y los órganos de la mayoría de los transportadores de las plantas (Mäser et al., 2001; Ward, 2001). Por este motivo, el estudio de las funciones de los transportadores es una etapa crucial en la comprensión del crecimiento y desarrollo no sólo de *Arabidopsis* sino de todas las plantas, incluyendo plantas de interés agrícola. Una vez conocida la función de los transportadores y su mecanismo regulatorio, será posible manipular la acumulación o la exclusión de iones, eventos de transducción de señales y otros factores limitantes del crecimiento vegetal.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* representa un sistema apropiado para el estudio de la expresión de genes de plantas debido a que dicho microorganismo es un eucariota unicelular de fácil manipulación en el laboratorio, caracterizado genética y fisiológicamente. Su genoma es conocido y existen o se pueden crear fácilmente mutaciones para la mayoría de sus genes. Además, la levadura produce modificaciones postraduccionales en las proteínas (glucosilación, eliminación de la metionina inicial, proteólisis de un precursor inactivo, etc) por las cuales las proteínas heterólogas pueden alcanzar su actividad biológica. Este sistema en particular, ha sido muy utilizado en el estudio de la expresión de proteínas de membrana debido a que la mayoría de las mismas presenta alto nivel de conservación en su secuencia entre levadura y planta (Sentenac et al., 1992; Haro et al., 1993; Quintero & Blatt, 1997; Hernández et al., 2009; Ariño et al., 2010). Por estos motivos, se utilizó dicho sistema de expresión para el estudio funcional del cADN KEA1.

El grupo de transportadores secundarios de *A. thaliana* (aquellos que utilizan el gradiente electroquímico de protones generado por los transportadores primarios) involucrados en el transporte de iones y metales pesados está constituido por 56 antiportadores catiónicos (proteínas transportadoras que llevan a cabo

el transporte de H⁺ y cationes en direcciones opuestas). Entre ellos, se incluye a la familia de Antiportadores Catiónicos 2 (CPA2 Cation Proton Antiporters) en la cual un número reducido de sus miembros ha sido clonado y caracterizado funcionalmente (Sze et al., 2004; Brett et al., 2005). El objetivo de este trabajo fue clonar y estudiar la función de un cADN de *A. thaliana* que codifica una proteína con significativa homología a los transportadores de K⁺ KEFC y KEFB de *Escherichia coli* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de obtener información preliminar que permita la selección de las metodologías y las condiciones particulares para su estudio en la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y medios

Se utilizaron las cepas de *S. cerevisiae* W303-B (*MATα leu2-13,112 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100*) como cepa silvestre y sus derivadas isogénicas WX1 (*Δnhx1::TRP1*) y AXT3 (*Δena1-4::HIS3 Δnha1::LEU2 Δnhx1::TRP1*) (Quintero et al., 2000) las cuales fueron obsequiadas por J.M. Pardo (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Sevilla, España). Además, la cepa de *S. cerevisiae* FY833 (*MATα URA3-52 HIS3Δ200 LEU2Δ1 LYS2Δ202 TRP1Δ63*) (Winston et al., 1995) fue utilizada para realizar la recombinación homóloga *in vivo*. Dichas cepas fueron cultivadas a 30°C en medio rico YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa). Como medio de selección de las transformaciones y para conservar las cepas mutantes, se utilizó el medio mínimo sintético SD (1.7 % de base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos y 5 % de sulfato de amonio) con 2% glucosa y con el suplemento de aminoácido apropiado. Para preparar medio sólido, al medio SD se le agregó 20% de bacto-agar antes de autoclavar.

Para analizar la tolerancia a higromicina B, se agregó 0.25 mg/l de dicho antibiótico al medio YPD. Para analizar la tolerancia a cationes, se utilizó el medio mínimo AP (8 mM ácido fosfórico, 10 mM L-arginina, 2 mM MgSO₄, 0.2 mM CaCl₂, 2% glucosa, más vitaminas y trazas (Rodríguez-Navarro & Ramos, 1984) suplementado con 1mM KCl. Para preparar medio sólido, al medio AP se le agregó 20% de agar purificado (A7049, Sigma-Aldrich, USA) antes de autoclavar.

Clonación *in vivo* del cADN AtKEA1

La secuencia codificadora del cADN AtKEA1 de 618 aa (No. de acceso GenBank AAF78418) fue obtenida por PCR utilizando como templado una biblioteca de expresión de plántulas de *A. thaliana* (Col-0) cultivadas en condiciones de estrés. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial 94°C, 2 min; 35 ciclos de 94°C, 30 seg (desnaturalización); 50°C, 30 seg (alineación); 72°C, 120 seg (extensión) y una extensión final de 72°C durante 10 min con cebadores específicos que se describen a continuación. El cebador delantero KEA1Fin (5'TGGATCCCCCGGGCT GCAGGAATTCATGATCCCTCACCAGGAGGTCAATG AGG3') contiene aproximadamente la mitad de su secuencia homóloga a la secuencia río arriba del sitio EcoRI del vector (subrayado) y la otra mitad homóloga a la secuencia próxima al ATG de KEA1. En el caso del

cebador reverso KEA1Rin (5'GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCAGATTACGACTGTGCC3'), su secuencia contiene aproximadamente la mitad homóloga a la secuencia próxima al TGA de *KEA1* y la otra mitad homóloga a la secuencia río abajo del sitio *EcoR1* del vector (subrayado). El fragmento amplificado fue clonado en el vector de expresión en levadura pDR196 (Rentsch et al., 1995) por recombinación homóloga *in vivo* en la cepa silvestre FY833 de *S. cerevisiae*. Brevemente, se tomó 0.1 ml de un cultivo en YPD de 16-18 hs de la cepa a transformar, se centrifugó por 2 min y se extrajo el sobrenadante. Se agregaron 5 µl de ADN carrier desnaturalizado (50 µg de ADN de esperma de salmón) y 1 µg de ADN transformante (fragmento de PCR con cADN *AtKEA1* + vector linealizado, 1:3) y se mezcló en el vortex por 10 seg. Posteriormente, se agregó 0.1 ml de la mezcla PEG/acetato de Li/TE (Elble, 1992) y se mezcló en el vórtex por 10 seg. La mezcla se incubó por 15 min a 42°C y luego, durante una noche a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó 2 min, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió la masa de células con 2 gotas de H₂O estéril. Se extendió una alícuota de las células resuspendidas en cajas de Petri con medio selectivo SD (-URA) las cuales se incubaron por 2-4 días a 30°C. La homología en las secuencias entre el fragmento de PCR obtenido y la secuencia del vector posibilita la recombinación en levadura (Fig. 1). Los clones conteniendo el vector recircularizado y el vector con el con el fragmento clonado son capaces de crecer en medio SD (-URA). Estos últimos fueron identificados por reacciones de PCR con los cebadores delantero (5'CTCTCTTTTATACACACATTC3') y reverso (5'ACTTGACCAAACCTCTGG3') del vector pDR196 y el ADN de los clones cultivados en SD (-URA). Después de realizada la clonación *in vivo*, se aisló el ADN total de levadura (Hoffman & Winston, 1987) y se transformó *E. coli* DH5α. Luego, se aisló el ADN plasmídico (Qiagen Miniprep Kit, USA) y se caracterizó con los sitios de restricción esperados en base a la secuencia de bases conocida. Finalmente, se secuenció el marco de lectura completo para confirmar la ausencia de errores y se denominó pDR196-*AtKEA1*. Para obtener una fusión traduccional entre la proteína verde fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) y el extremo C-terminal del cADN *AtKEA1*, se amplificó por PCR la región codificadora del gen *GFP* con los cebadores: KEA1GFPF (5'GGAGGCACAGTCGTAATCTCAATGGT GAGCAAGGGCGAGGAG3') y KEAGFPR (5'CCTCG AGGTCGACGGTATCGTTTGTATAGTTCATCCATGCC 3') utilizando como templado al gen *GFP* contenido en el plásmido pGFP10.1 (Chalfie et al., 1994). El fragmento de PCR obtenido con el gen *GFP* que posee la secuencia homóloga a *AtKEA1* en el extremo 5' y la secuencia homóloga al pDR196 en el extremo 3' fue clonado por recombinación homóloga *in vivo* en el plásmido pDR196-*AtKEA1* linealizado en el sitio de restricción *ClaI* obteniéndose el plásmido pDR196-*AtKEA1-GFP*. La región codificadora del gen *GFP* posee el mismo marco de lectura que *AtKEA1* la cual fue confirmada por secuenciación.

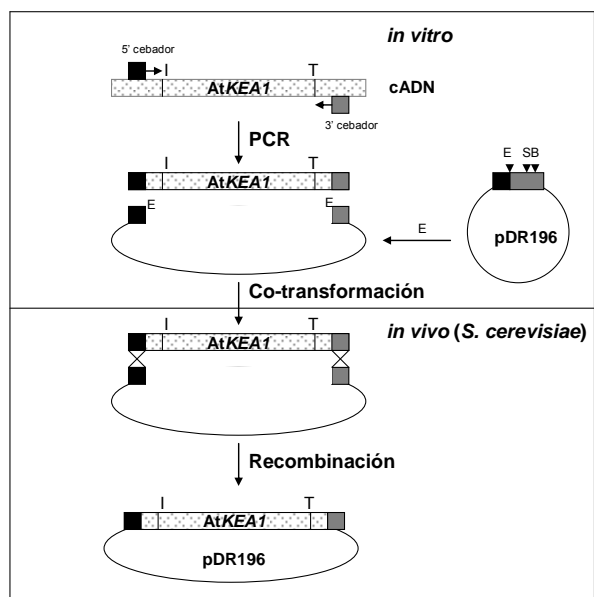


Figura 1. Esquema de la clonación del cADN *AtKEA1* mediante recombinación homóloga *in vivo* en *S. cerevisiae*. El cADN *AtKEA1* fue amplificado por PCR utilizando cebadores con secuencias homólogas a los extremos del plásmido linealizado. El producto de PCR fue mezclado con el plásmido linealizado y co-transformado en la levadura en donde ocurre la recombinación homóloga del que resulta un plásmido conteniendo el cADN *AtKEA1*. Abreviaturas: I, codón de iniciación; T, codón de terminación; B, sitio *BamHI*; E, sitio *EcoRI*; S, sitio *SmaI*.

Figure 1. Scheme of the cloning of the *AtKEA1* gene by *in vivo* homologous recombination in *S. cerevisiae*. The *AtKEA1* gene was amplified by PCR using primers containing sequences homologous to a linearized plasmid. The PCR product was mixed with the linearized plasmid and co-transformed into yeast cells, in which homologous recombination occurred to produce a plasmid containing the *AtKEA1* gene. Abbreviations: I, initiation codon; T, termination codon; B, *BamHI* site; E, *EcoRI* site; S, *SmaI* site.

Expresión de *AtKEA1* en levadura

Con el fin de evaluar la función del cADN *AtKEA1* en levadura, dicho cADN fue clonado en el vector de expresión en levadura pDR196 donde se encuentra bajo el control del promotor constitutivo PMA1 de la ATPasa (Römer et al., 2004) y el terminador ADH1. Los plásmidos pDR196-*AtKEA1* y pDR196 fueron introducidos en las cepas W303 (wt), WX1 y AXT3 utilizando el método de acetato de litio (Elble, 1992) con algunas modificaciones como se ha descrito en Clonación *in vivo*. En este caso, se utilizaron las construcciones obtenidas después de haber confirmado que su secuencia no presentaba errores.

Para el ensayo de crecimiento en diferentes condiciones, las cepas fueron cultivadas hasta la fase logarítmica en YPD, se tomó 0.5 ml de cada uno de los cultivos, se centrifugó, se resuspendió la masa de células con 0.5 ml de H₂O destilada estéril y se tomó

una alícuota de 0.1 ml para medir su densidad óptica a 660 nm (DO_{660nm}). En base a la DO_{660nm} obtenida, se corrigieron los volúmenes de las células resuspendidas en H_2O para obtener la misma DO_{660nm} . Luego se prepararon diluciones seriales (1:1, 10, 100 y 1000) y de cada una de estas diluciones, se depositaron 10 μ l por goteo en el medio a ensayar. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 3 días y fotografiadas.

Localización de AtKEA1 en levadura

Para confirmar la expresión y la localización subcelular de la proteína codificada por el cADN *AtKEA1*, los

plásmidos pDR196-*AtKEA1-GFP* y pDR196-*GFP* fueron introducidos en la cepa mutante AXT3. La mutante transformada de forma independiente con los plásmidos mencionados se cultivó en medio YPD hasta llegar a la fase logarítmica temprana. Las células fueron observadas con un microscopio Nikon C1 Spectral Imaging Confocal (Nikon USA, Melville, NY) usando 488 nm para la excitación, 505-535 nm para la emisión (GFP). La señal de fluorescencia fue capturada con un objetivo de inmersión 60 x y las secciones obtenidas fueron procesadas con el paquete Nikon C1 version 3.6 e ImageJ 1.41 (NIH).

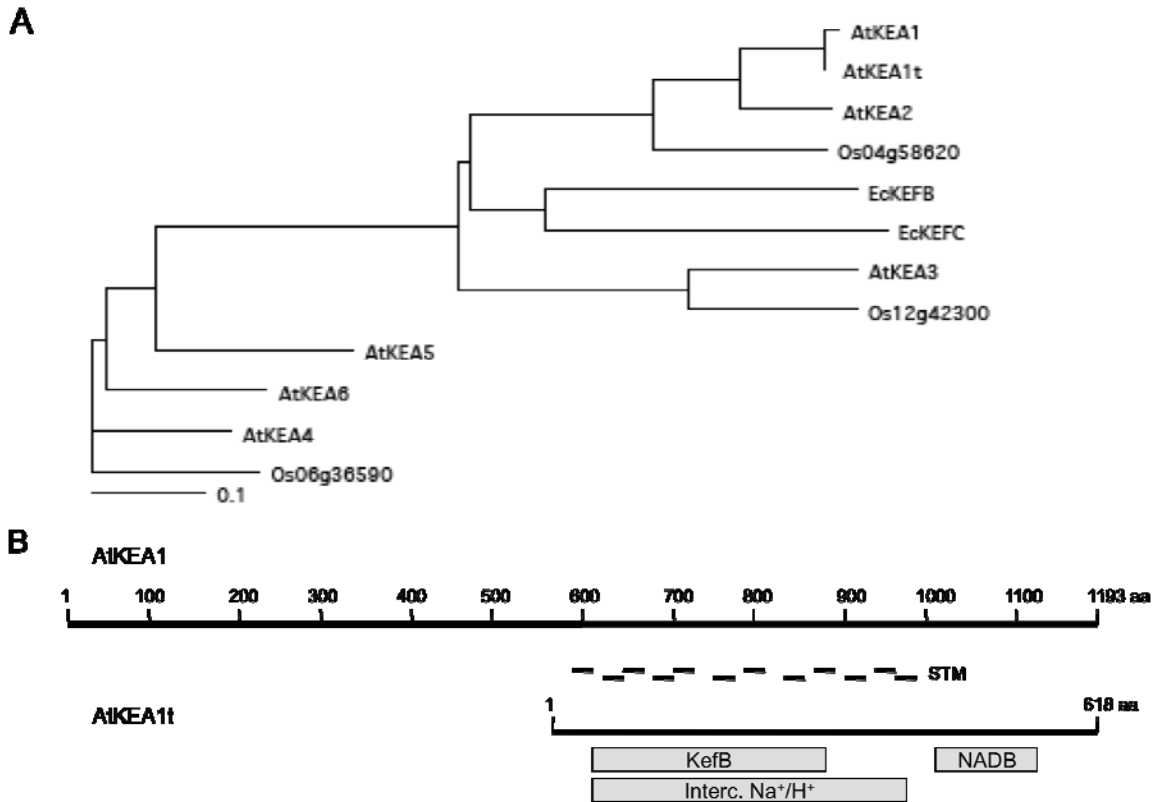


Figura 2. Árbol filogenético de los genes homólogos a *AtKEA1* y estructura de *AtKEA1*. A. El árbol filogenético de las secuencias proteicas homólogas a *AtKEA1* fue dibujado usando TreeView X (Page, 1996) con parámetros estándar después del alineamiento de las secuencias usando el método Clustal X 2.0.10 (Thompson et al. 1997). Los número de acceso de las secuencias proteicas son Arabidopsis *AtKEA1* (NM_100062.3), *AtKEA1t* (GB AAF78418), *AtKEA2* (At4g00630), *AtKEA3* (At4g04850), *AtKEA4* (Atg219600), *AtKEA5* (At5g51710), *AtKEA6* (At5g11800); *Oriza sativa* Os04g58620, Os12g423300, Os06g36590. Las secuencias de *E. coli* EcKEFB y EcKEFC se utilizaron como grupo de comparación externa. B. Diagrama comparativo de *AtKEA1* (GB AAF78418, 618 aa) y *AtKEA1t* (NM_100062.3, 1193 aa). Los potenciales 12 segmentos transmembranales (STM) están indicados con líneas negras entre las secuencias. Las secuencias consenso conteniendo el dominio característico del intercambiador Na^+/H^+ de Eucariotas (Interc. Na^+/H^+), la secuencia consenso de la familia KefB (KefB) y el dominio Rossmann de unión a dinucleótidos activadores como NAD(P) (NADB) se indican como cajas grises.

Figure 2. Phylogenetic tree of *AtKEA1* homolog genes and structure of *AtKEA1*. A. The phylogenetic tree of *AtKEA1* homolog protein sequences was drawn using Treeview program (Page, 1996) with standard settings after alignment of the sequences with Clustal X 2.0.10 program (Thompson et al., 1997). The accession numbers for the protein sequences are Arabidopsis *AtKEA1* (NM_100062.3), *AtKEA1t* (GB AAF78418), *AtKEA2* (At4g00630), *AtKEA3* (At4g04850), *AtKEA4* (Atg219600), *AtKEA5* (At5g51710), *AtKEA6* (At5g11800); *Oriza sativa* Os04g58620, Os12g423300, Os06g36590. *E. coli* EcKEFB and EcKEFC sequences were used as an outgroup external control. B. Comparative diagram of *AtKEA1* (NM_100062.3, 1193 aa) and *AtKEA1t* (GB AAF78418, 618 aa). The 12 putative transmembrane segments (STM) are depicted as thick black lines between the sequences. The consensus sequences for the Na^+/H^+ Eukaryotic Exchanger (Interc. Na^+/H^+), the KefB consensus sequence family (KefB), and the Rossmann NAD(P)-binding proteins domain (NADB) are indicated as grey boxes.

RESULTADOS

Identificación y descripción de cADN *AtKEA1*

La secuencia deducida de aminoácidos del cADN *AtKEA1* clonado está compuesta de 618 aa (MW 64.965 KDa) y presenta alta similitud en toda la extensión de su secuencia a varios presuntos antiportadores de plantas, los cuales no han sido caracterizados funcionalmente y posee significativa similitud con antiportadores de bacterias KEFC y KEFB de *E. coli* (36 % y 34 % de identidad; 54 % y 55 % de similitud, respectivamente). EcKEFB y EcKEFC codifican un sistema de eflujo de K^+ regulado por glutatión (Munro et al., 1991; Epstein, 2003; Brett et al., 2005). Posteriormente a la caracterización aquí presentada, se reportó una versión modificada de *AtKEA1* de 1193 aa (NM_100062.3) la cual contiene 575 aa adicionales localizados río arriba del extremo N-terminal respecto a la secuencia aminoácídica de 618 aa del cADN estudiado (Weber et al., 2007). El análisis filogenético realizado con las secuencias aminoácídicas para la versión larga *AtKEA1*, corta *AtKEA1t*, los presuntos transportadores de la familia KEA de *Arabidopsis* *AtKEA2*, *AtKEA3* y de arroz Os04g58620, Os12g423300 permite incluirlos en un mismo clúster (Fig. 2 A) debido a la presencia de regiones muy conservadas, lo cual sugiere que las funciones biológicas para estas proteínas son básicas y evolutivamente significativas en genomas de plantas mono y dicotiledóneas. Dicho clúster no incluye a *AtKEA4-6* ni a Os0636590 las cuales se agrupan entre sí de forma separada. El análisis del perfil de hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982) mostró que la proteína codificada por cADN *AtKEA1* presenta 12 segmentos transmembranales hidrofóbicos (Fig. 2 B) y análisis utilizando el programa PSORT (Nakai & Kanehisa, 1992) para predecir la localización a nivel celular de la proteína bajo estudio, indicó que formaría parte de membranas involucradas con el tráfico vesicular, probablemente en el retículo endoplásmico (RE). Si bien el objetivo de este trabajo no fue el estudio de una versión truncada del antiportador *AtKEA1*, el cADN *AtKEA1* aquí estudiado presenta características necesarias para su funcionamiento como una proteína integral de membrana involucrada en el intercambio de cationes y protones como el dominio característico del intercambiador Na^+/H^+ de Eucariotas, la secuencia consenso KefB presente en sistemas de transporte de K^+ y el dominio Rossmann de unión a dinucleótidos activadores como NAD(P) (Marchler-Bauer et al., 2011) (Fig. 2 B).

Expresión del cADN *AtKEA1* en levadura

Para investigar la función de la proteína codificada por el cADN *AtKEA1* se utilizó el sistema de expresión heterólogo en levadura. Las dos mutantes utilizadas, WX1 Y AXT3, no presentan diferencias en el crecimiento en medio YPD cuando se las compara con la cepa silvestre (resultado no mostrado). Para determinar si los cationes tóxicos se acumulan intracelularmente en respuesta al gradiente electroquímico de H^+ , se estudió la tolerancia a higromicina B (McCusker et al., 1987). En la cepa WX1 (presenta una delección en el gen que codifica al antiportador NHX1 de la membrana vacuolar), la

reducción del secuestro de la higromicina B en la vacuola debido a la ausencia del antiportador ScNHX1 funcional, impide su crecimiento por el efecto tóxico de la higromicina en el citosol (Gaxiola et al., 1999). El cADN *AtKEA1* suprime el fenotipo de sensibilidad a higromicina de la mutante de levadura en el gen *NHX1* permitiendo su crecimiento (Fig. 3A) ya que restituiría el gradiente de H^+ en las membranas internas permitiendo la salida de la higromicina del citosol y poniendo en evidencia su función como antiportador al complementar la función alterada por la delección de ScNHX1.

En el caso de la tolerancia a cationes, se realizaron ensayos previos de complementación utilizando concentraciones tóxicas de K^+ , Na^+ y Li^+ a distintos pH con cepas mutantes con y sin el pDR196-*AtKEA1* en los cuales no fue posible encontrar claras y repetibles diferencias en el crecimiento excepto cuando se utilizó la cepa AXT3 (contiene 3 delecciones en los genes que codifican al antiportador de la membrana plasmática NHA1, al antiportador NHX1 y a la V-ATPasa) la cual presenta limitado crecimiento en medios con altos niveles de NaCl o KCl. La expresión del cADN *AtKEA1* aumenta la tolerancia a Na^+ en la mutante de levadura AXT3 en medio mínimo AP suplementado con 100 mM NaCl a pH 5.5 comparado con el crecimiento de la misma mutante con el vector (Fig. 3B).

Localización de *AtKEA1* en levadura

La localización subcelular de la proteína *AtKEA1* se determinó en la mutante AXT3 con la fusión cADN *AtKEA1-GFP* que mostró una fuerte señal fluorescente en el RE perinuclear (región integrante del sistema de endomembranas) comparada con la misma mutante conteniendo solo *GFP* al ser observada mediante microscopía confocal (Fig. 4). En la mutante AXT3 con la proteína de fusión *KEA1-GFP* se ha observado la complementación de la tolerancia a NaCl indicando que la proteína de fusión *AtKEA1-GFP* es funcional (resultado no mostrado). Este resultado indica que el cADN *AtKEA1* se expresa en levadura y sería el responsable de los fenotipos de complementación encontrados en WX1 y AXT3.

DISCUSION Y CONCLUSION

Las plantas han desarrollado mecanismos para controlar la entrada, la salida y la compartimentalización de iones, los cuales posibilitan su adaptación a las distintas condiciones medioambientales. En el genoma de *A. thaliana* se han identificado tres familias de potenciales transportadores de K^+ . La familia HKT (1 gen) que interviene en la incorporación de Na^+ y no de K^+ (Uozumi et al., 2000), la familia KT-HAK-KUP (13 genes) que ha mostrado afinidad por K^+ en algunos de sus miembros (Quintero & Blatt, 1997; Fu & Luan, 1998; Kim et al., 1998; Rubio et al., 2000; Haro et al., 2005) y la familia KEA (6 genes), cuyos integrantes no han sido caracterizados funcionalmente y presentan significativa homología con antiportadores K^+/H^+ originalmente descritos en bacterias (Mäser, 2001; Gierth & Mäser, 2007). En base al análisis de la secuencia deducida, se ha propuesto que los genes *KEA* codificarían transportadores involucrados, con mayor o menor

selectividad y afinidad, en la entrada o salida de K^+ de la célula o la distribución de dicho ion en las organelas (Mäser, 2001; Gierth & Mäser, 2007). Además, Sze et al. (2004) utilizando el análisis bioinformático y de expresión por microarreglos, reportaron mediana y alta expresión de AtKEA1 en los tejidos vegetativos y en el gametofito masculino sin observar expresión específica de tejido y proponen que el gen objeto de este estudio mediaría en el transporte de $K^+(Na^+)/H^+$ en la membrana plasmática, las membranas de la mitocondria, de los plástidos o las endomembranas del

sistema secretor ya que procesos como la fotosíntesis, respiración, osmoregulación, mantenimiento del potencial de membrana y secreción requieren del transporte mencionado. De esta forma, los transportadores KEA de *A. thaliana* podrían estar involucrados en la regulación del pH interno, la homeostasis de iones, el volumen celular y la tolerancia a estreses medioambientales. En el presente estudio, un nuevo antiportador de *A. thaliana* fue clonado y caracterizado funcionalmente en mutantes de *S. cerevisiae*.

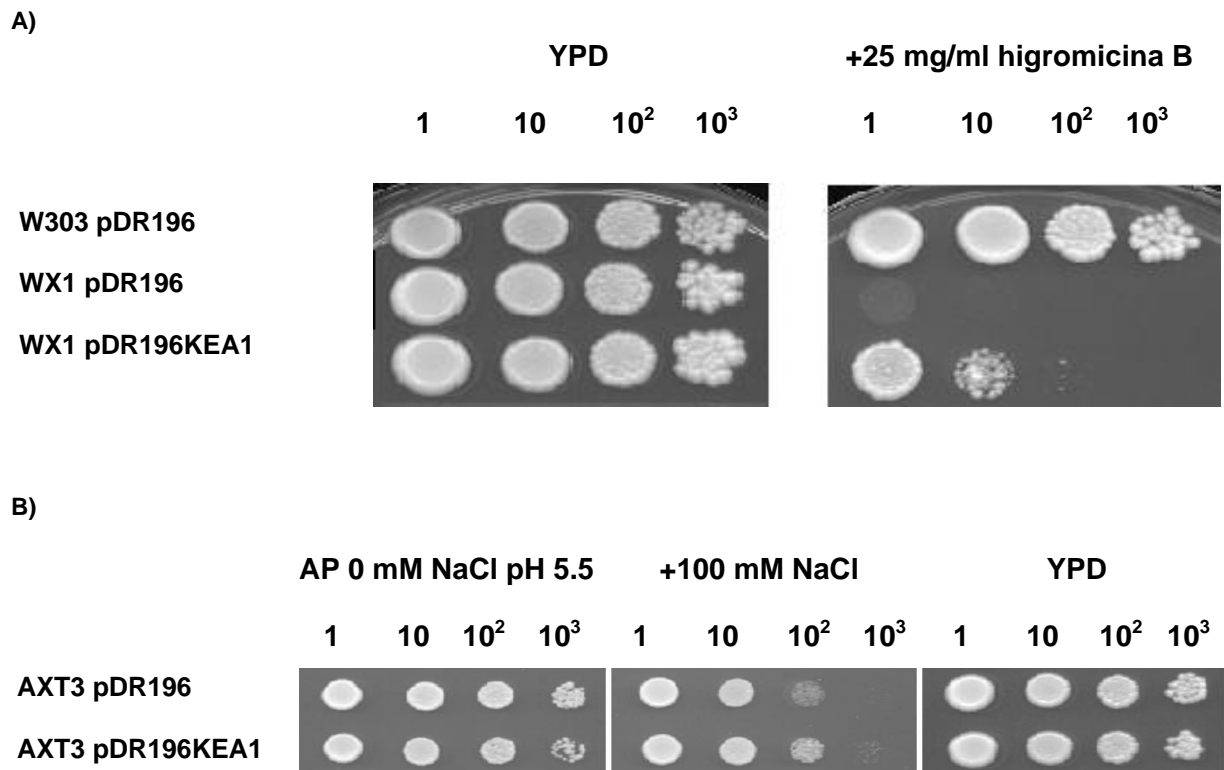


Figura 3. Expresión del cADN AtKEA1 en mutantes de *S. cerevisiae*. A) Los plásmidos pDR196 y pDR196-AtKEA1 fueron introducidos en la mutante WX1 ($\Delta nhx1$) y AXT3 ($\Delta ena1-4 \Delta nha1 \Delta nhx1$). El plásmido pDR196 fue introducido en la cepa silvestre W303 como control. Las cepas fueron cultivadas en medio YPD y YPD con 25 mg/ml de higromicina B. B) Los plásmidos pDR196 y pDR196-KEA1 fueron introducidos en la mutante AXT3. La cepa fue cultivada en medio AP, AP con 100 mM de ClNa a pH: 5.5 y en YPD como control. En todos los casos las cepas fueron cultivadas hasta la fase logarítmica (DO_{600nm} 0.6 aprox.) en YPD. Se prepararon diluciones seriales (1:1, 10, 100 y 1000) y de cada una de estas diluciones, se depositaron 10 μ l por goteo en el medio a ensayar. Las fotos fueron tomadas después de 3 días de incubación a 30°C. En A) y B) el experimento fue repetido tres veces con resultado similar y se muestra uno representativo.

Figure 3. Expression of AtKEA1 gene in *S. cerevisiae* mutants. A) The plasmids pDR196 and pDR196-AtKEA1 were introduced into the WX1 mutant ($\Delta nhx1$) and the AXT3 mutant ($\Delta ena1-4 \Delta nha1 \Delta nhx1$). The plasmid pDR196 was introduced into the wild type W303 as a control. The yeast strains were grown on YPD or YPD containing 25 mg/ml hygromycin B medium. B) The plasmids pDR196 and pDR196-KEA1 were introduced into the AXT3 mutant. The yeast strain were grown on AP, AP supplemented with 100 mM ClNa pH: 5.5 and YPD medium as a control. Every strain was grown until the logarithmic phase (DO_{600nm} 0.6 approx.) on YPD. Ten-fold serial dilutions were prepared (1:1, 10, 100 and 1000) and 10 μ l of each of them were spotted on the different media. Photos were taken after 3 days of growth at 30°C. In A) and B) the experiment was repeated three times with similar result and a representative one is shown.

La secuencia aminoacídica deducida de cADN *AtKEA1* de 618 aa (GenBank AAF78418) presenta los 12 segmentos transmembranales de la versión completa del gen *KEA1* de 1193 aa (NM_100062.3), los cuales están conservados con respecto a las secuencias de los antiportadores de *E. coli* KEFC y KEFB (Epstein, 2003; Brett et al., 2005). Además, fue posible identificar un dominio característico del intercambiador Na^+/H^+ de Eucariotas y la secuencia consenso KefB presente en sistemas de transporte de K^+ en la región N-terminal, así como el dominio Rossmann de unión a dinucleótidos activadores como NAD(P) en la región C-terminal. Este resultado sugiere que el cADN *AtKEA1* corresponde a una versión truncada del gen *KEA1* (Weber et al., 2007) que contiene los dominios funcionales mencionados de los genes de *E. coli* y de Eucariotas, los cuales permiten incluirlo dentro del grupo de los antiportadores. Si bien las similitudes en la secuencia son útiles para predecir la función de una proteína, la evidencia experimental es esencial para asignar una función. Con el fin de obtener tales evidencias, se utilizó el sistema de expresión heterólogo en levadura. Para tal efecto, se estudió la supresión del fenotipo de sensibilidad a higromicina B al expresar cADN *AtKEA1* en la mutante WX1. Los resultados sugieren, que la proteína codificada por el cADN *AtKEA1* colabora en la detoxificación de higromicina B al influir en el gradiente electroquímico de H^+ y secundariamente en la exclusión de higromicina del citosol de la misma forma en que fue observado en diversos casos de antiportadores localizados en endomembranas (Gaxiola et al., 1999; Maresova &

Sychrova, 2005) sugiriendo que formas truncadas del gen *KEA1* contienen los dominios necesarios para detoxificar las células eucariotas. Además, es probable que estas formas truncadas sean producto de un procesamiento alternativo del transcrito de *KEA1* y/o el reconocimiento de más de un sitio de iniciación. Este tipo de control incluye retención de intrones y genera polipéptidos más pequeños los que podrían desempeñar funciones biológicas importantes particularmente en eventos de estrés abiótico (Mazzucotelli et al., 2006).

La secuencia deducida de cADN *AtKEA1* predice selectividad por iones K^+ , sin embargo, hasta el presente, no se han encontrado evidencias al respecto. Después de realizar diversos experimentos con diferentes iones a distintos pH utilizando varias mutantes, se ha observado el aumento de la tolerancia a Na^+ al expresar el cADN *AtKEA1* en la mutante AXT3 de levadura. Este resultado se explicaría por la reducción de la concentración tóxica del Na^+ debido a la exclusión del citosol de dicho ion. Se han reportado numerosos antiportadores, como NHXs, los cuales no son capaces de discriminar entre K^+ y Na^+ por su alto grado de similitud presentando una selectividad catiónica variable según las condiciones experimentales tanto en sistemas heterólogos o en el organismo de origen que no coincide con la selectividad sugerida por la secuencia (Gierth & Mäser, 2007 y sus referencias, Hernández et al., 2009). El resultado obtenido no descarta que cADN *AtKEA1* pueda intercambiar K^+/H^+ en ciertas condiciones aún no determinadas.

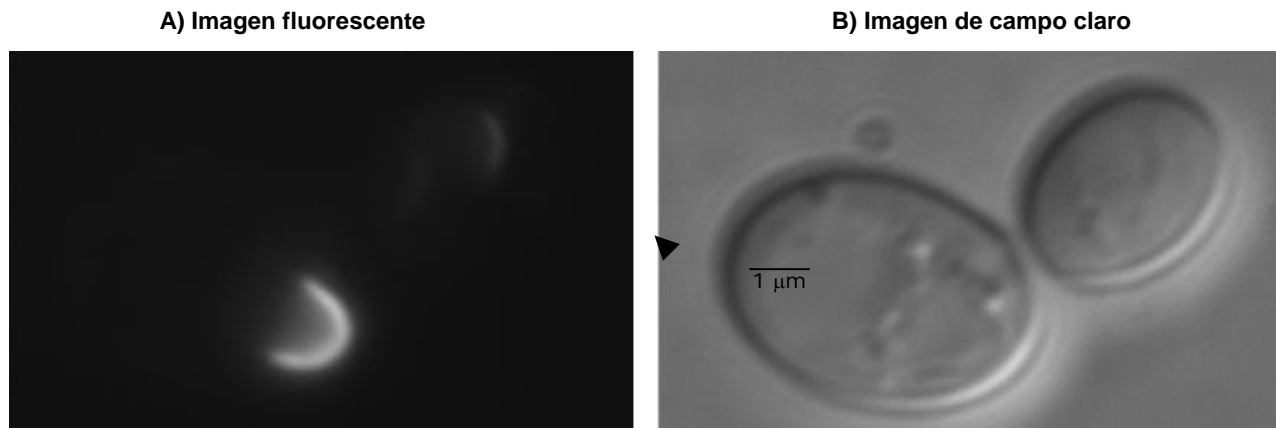


Figura 4. Localización subcelular de la proteína cADN *AtKEA1* en *S. cerevisiae*. La fusión PMA1-*AtKEA1*-GFP fue introducida en la mutante AXT3 de *S. cerevisiae*. Esta mutante fue cultivada hasta la fase logarítmica temprana en medio YPD y fue observada utilizando un microscopio Nikon C1 Spectral Imaging Confocal. A) Imagen fluorescente; B) Imagen de campo claro. La flecha señala la región con fluorescencia. El tamaño de la barra corresponde a 1 μm . Resultados similares fueron obtenidos en dos experimentos adicionales.

Figure 4. Subcellular localization of cDNA *AtKEA1* in *S. cerevisiae*. The plasmid pDR196-*AtKEA1*-GFP was introduced into the *S. cerevisiae* AXT3 mutant. This mutant strain was grown until the early logarithmic phase on YPD medium and the cells were observed by confocal fluorescence microscopy (Nikon C1 Spectral Imaging Confocal Microscope). A) Fluorescent image; B) DIC image. The arrow points to the fluorescent region. The size bar corresponds to 1 μm . Similar results were obtained for two additional experiments.

Al utilizar la fusión cADN *AtKEA1-GFP* para determinar la localización de la proteína de *A. thaliana* en levadura usando microscopía confocal, se observó fluorescencia en la región perinuclear, probablemente en membranas de RE. No se observó fluorescencia en la región de la membrana plásmática. La localización observada sugiere que la proteína codificada por el cADN *AtKEA1* podría estar involucrada en la homeostasis del pH y/o en la detoxificación de Na^+ . Se ha reportado el aumento del tamaño del RE en células parenquimáticas del xilema de raíz de *Phaseolus coccineus* y se ha sugerido que dichas células podrían reabsorber Na^+ de los vasos y excluirlo por este proceso, al menos parcialmente, reduciendo la sensibilidad a la sal (Kramer et al., 1977).

En conjunto los resultados obtenidos, coherentes con algunas de las predicciones, sugieren que el cADN *AtKEA1* codifica a un antiportador que podría mediar la exclusión de cationes como Na^+ del citoplasma y tener un papel en la homeostasis de cationes, control del pH y/o tolerancia a salinidad en alguna organela intracelular, probablemente RE. El estudio de la actividad, la dirección del transporte y la localización junto con el análisis del fenotipo de la planta con dicho gen mutado y sobreexpresado aportarán información que permitirá dilucidar su función con mayor precisión.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado durante la estancia postdoctoral de RAGP en el laboratorio del Dr. John Ward (Departamento de Biología de Plantas, Universidad de Minnesota) y fue financiado por la National Science Foundation Grant No. 0209792 (USA).

BIBLIOGRAFIA

Apse, M.P. & E. Blumwald. 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol* 13:146-150.

Ariño, J., Ramos, J. & H. Sychrová. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74:95-120.

Bock, K.W., D. Honys, J.M. Ward, S. Padmanaban, E.P. Nawrocki, K.D. Hirschi, D. Twell & H. Sze. 2006. Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. *Plant Physiol* 140:1151-1168.

Brett, C.L., M. Donowitz & R. Rao. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:223-239.

Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward & D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.

Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13:19-20.

Epstein, W. 2003. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 75:293-320.

Fu, H.H. & S. Luan. 1998. AtKuP1: a dual-affinity K^+ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:63-73.

Gaxiola, R.A., R. Rao, A. Sherman, P. Grisafi, S.L. Alper & G.R. Fink. 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in

cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1480-1485.

Gierth, M. & P. Mäser. 2007. Potassium transporters in plants--involvement in K^+ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Lett* 2007 581:2348-2356.

Gottwald, J.R., P.J. Krysan, J.C. Young, R.F. Evert & M.R. Sussman. 2000. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97:13979-13984.

Haro, R., M.A. Bañuelos, F.J. Quintero, F. Rubio & A. Rodríguez-Navarro. 1993. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiologia Plantarum* 89:868-874.

Haro, R., M.A. Bañuelos, M.E. Senn, J. Barrero-Gil & A. Rodríguez-Navarro. 2005. HKT1 Mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* 139:1495-1506.

Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, J.K. Zhu & H.J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:463-499.

Hernández, A., X. Jiang, B. Cubero, P.M. Nieto, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa & J.M. Pardo. 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.

Hirsch, R.E., B.D. Lewis, E.P. Spalding & M.R. Sussman. 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280:918-921.

Hoffman, C.S. & F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.

Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N. & J.I.Schroeder. 1998. AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10:51-62.

Kramer, D., A. Lauchli, A.R. Yeo & J. Gullasch. 1977. Transfer cells in roots of *Phaseolus coccineus*: ultrastructure and possible function in exclusion of sodium from the shoot. *Ann Bot* 41:1031-1040.

Kyte, J. & R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.

Maresova, L. & H. Sychrova. 2005. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol* 55:588-600.

Mäser, P., S. Thomine, J.L. Schroeder, J.M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I.N. Talke, A. Amtmann, F.J. Maathuis, D. Sanders, J.F. Harper, J. Tchieu, M. Gribskov, M.W. Persans, D.E. Salt, S.A. Kim & M.L. Gueriot. 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:1646-67.

Marchler-Bauer, A., S. Lu, J.B. Anderson, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, et al. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue):D225-9.

Mazzucotelli, E., A.M. Mastrangelo, C. Crosatti, C., D. Guerra, A.M. Stanca & L. Cattivelli. 2006. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science* 174: 420-431.

- McCusker, J.H., D.S. Perlin & J.E. Haber.** 1987. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 4082-4088.
- Munro, A.W., G.Y. Ritchie, A.J. Lamb, R.M. Douglas & I.R. Booth.** 1991. The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium efflux system KefC of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:607-616.
- Nakai, K. & M. Kanehisa.** 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14:897-911.
- Page, R.D.M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Quintero, F.J. & M.R. Blatt.** 1997. A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Lett* 415:206-211.
- Quintero, F.J., M.R. Blatt & J.M. Pardo.** 2000. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett* 471:224-228.
- Rentsch, D., M. Laloi, I. Rouhara, E. Schmelzer, S. Delrot & W.B. Frommer.** 1995. NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 370:264-8.
- Rodríguez-Navarro, A., & J. Ramos.** 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159:940-945.
- Rodríguez-Rosales, M.P., X. Jiang, F.J. Gálvez, M.N. Aranda, B. Cubero & K. Venema.** 2008. Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol* 179:366-77.
- Römer, U.H., Schrader, N., Günther, N., Nettelstroth, W.B. Frommer & L. Elling,** 2004. Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrate engineering. *J Biotechnol* 107:135-149.
- Rubio, F., G.E. Santa-María & A. Rodríguez-Navarro.** 2000. Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol Plantarum* 109:34-43.
- Schiøtt, M., S.M. Romanowsky, L. Baekgaard, M.K. Jakobsen, M.G. Palmgren & J.F. Harper.** 2004. A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9502-9507.
- Schumacher, K., D. Vafeados, M. McCarthy, H. Sze, T. Wilkins & J. Chory.** 1999. The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev* 13:3259-3270.
- Sentenac, H., N. Bonneaud, M. Minet, F. Lacroute, J.M. Salmon, F. Gaymard & C. Grignon.** 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256 663-665.
- Sze, H., S. Padmanaban, F. Cellier, D. Honys, N.H. Cheng, K.W. Bock, G. Conejero, X. Li, D. Twell, J.M. Ward & K.D. Hirschi.** 2004. Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development. *Plant Physiol* 136:2532-2547.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins.** 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.
- Uozumi, N., E.J. Kim, F. Rubio, T. Yamaguchi, S. Muto, A. Tsuboi, E.P. Bakker, T. Nakamura & J.I. Schroeder.** 2000. The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in xenopus laevis oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 122:1249-1259.
- Ward, J.M.** 2001. Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 17:560-563.
- Weber, A.P.M., K.L. Weber, K. Carr, C. Wilkerson & J. B. Ohlrogge.** 2007. Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing. *Plant Physiol.* 144:32-42.
- Winston, F., C. Dollard & S.L. Ricupero-Hovasse.** 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11:53-55.