

Índice de Materias

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. Introducción.....	1
1. 1 Formulación del Marco Teórico y Antecedentes Bibliográficos.....	1
1.1.1 Consideraciones generales.....	1
1.1.2 Diferencias en la activación por voltaje y por K_{ext} entre los canales K_{in} y K_{out}	7
1.1.3 Diferencias en la activación mediada por H_{ext} en los canales K_{in}	9
1.1.4 Rol fisiológico de los canales modelos KAT1 (K_{in}) y SKOR (K_{out}) de <i>Arabidopsis thaliana</i> en condiciones de estrés abiótico.....	16
1.2 Planteamiento de los problemas.....	16
1.3 Formulación de las hipótesis.....	16
1.4 Objetivos generales.....	16
1.5 Objetivos específicos.....	16
2. Materiales y Métodos.....	18
2.1 Modelado por Homología y Simulación Molecular.....	18
2.1.1 Modelado por homología de la subunidad- α de KAT1 y SKOR.....	18
2.1.2 Simulaciones de Dinámica Molecular de los sistemas KAT1, SKOR, KAT1-N297A y SKOR-312NLG.....	21
2.2 Herramientas de Análisis de las Dinámicas Moleculares.....	23
2.2.1 RMSD.....	23
2.2.2 HOLE.....	24
2.3 Mutagénesis sitio-dirigida.....	25
2.4 Electrofisiología y análisis de los datos obtenidos.....	33
2.5 Análisis fenotípico de plantas silvestres y <i>skor-1</i>	34
3. Resultados y Discusión.....	37
3.1 Validación de los modelos por homología.....	37
3.2 Evaluación de las dinámicas moleculares.....	40
3.3 Análisis de las dinámicas moleculares.....	41
3.3.1 Cálculos de RMSD.....	41
3.3.2 Cálculos de HOLE.....	45
3.4 Análisis de las mutaciones KAT1-N297A y SKOR-312NLG.....	50

3.4.1 KAT1-N297A.....	50
3.4.2 SKOR-312NLG.....	52
3.5 Análisis de otros residuos relevantes en el canal SKOR.....	57
3.6 Análisis del sensor de pH extracelular de KAT1.....	60
3.7 Efectos fenotípicos de la ausencia del canal SKOR en el crecimiento y desarrollo de plantas de <i>A. thaliana</i>	62
4. Resultados más relevantes.....	72
5. Conclusiones.....	75
6. Referencias bibliográficas.....	76
7. Material Suplementario.....	85
APÉNDICE I (Publicaciones generadas durante la Tesis Doctoral relacionadas directamente con el tema de tesis).....	92
APÉNDICE II (Publicaciones generadas durante la Tesis Doctoral relacionadas indirectamente con el tema de tesis).....	93

Índice de Figuras

1. Estructura de los canales de K^+	2
2. Dependencia corriente (I) versus voltaje (V) en los canales de K^+ de plantas.....	3
3. Canales tipo <i>Shaker</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
4. Semejanzas entre los canales tipo <i>Shaker</i> de <i>Arabidopsis</i>	6
5. El canal K_{in} KAT1 y el canal K_{out} SKOR se diferencian en su dependencia de la concentración de K^+ extracelular (K_{ext}).....	7
6. El centro del segmento S6 es una huella diferencial entre los canales K_{in} y K_{out}	9
7. Sensor de pH extracelular de los canales K_{in}	12
8. Los canales tipo <i>Shaker</i> de los estomas de las plantas están relacionados con los cambios de turgencia en las células guardianas.....	13
9. Expresión de los genes <i>GORK</i> y <i>SKOR</i> en la raíz.....	14
10. Silenciamiento del gen <i>SKOR</i> en el knockout homocigótico <i>skor-1</i>	15
11. Alineamiento de la región transmembrana de KAT1, SKOR y $K_v1.2$	20
12. Cálculo de RMSD del modelo (M) versus la estructura de referencia (E_r).....	20
13. Propiedades de los sistemas KAT1, SKOR, KAT1-N297A y SKOR-312NLG.....	22
14. Cálculo de RMSD del sistema abierto (A) versus el sistema cerrado (C) por aminoácido.....	24
15. Relación utilizada por el algoritmo de HOLE para el cálculo de la superficie interna del canal.....	24
16. Los aminoácidos D89, E161, D221, E240 y D277 se exponen hacia el lado extracelular en KAT1.....	25
17. Alineamiento de los aminoácidos del vestíbulo extracelular del poro de los canales K_{in}	26
18. Procedimiento para generar las mutaciones KAT1-D89N, KAT1-E240Q, KAT1-D277N y KAT1-F266L-H267R.....	29
19. Obtención de la cuádruple mutante KAT1-E161R-D221N-E240Q-D277N.....	31
20. Algunos parámetros que se toman en cuenta para el ajuste de la $I_T(V)$	34
21. Mezcla basal de sales Murashige & Skoog sin potasio.....	35
22. Perfil de hidrofobicidad de la subunidad- α de los canales $K_v1.2$, KAT1 y SKOR.....	38
23. Cálculo de RMSD de los modelos de KAT1 y SKOR versus la estructura de referencia $K_v1.2$	39

24. Gráficos de Ramachandran para los modelos de SKOR (izquierda) y KAT1 (derecha) en estado abierto.....	39
25. Parámetros estereoquímicos de Ramachandran, para los modelos de KAT1, SKOR, KAT1-N297A y SKOR-312NLG.....	40
26. Parámetros considerados para determinar el equilibrio termodinámico del sistema molecular durante 1 ns de DM.....	41
27. Residuos que muestran diferencias significativas durante la apertura en SKOR y KAT1.....	43
28. Quimeras realizadas entre KAT1 y SKOR.....	44
29. Dimensiones del poro de los canales KAT1 y SKOR calculadas durante 1 ns de DM.....	47
30. El residuo N297 tiene un efecto dominante al intercambiar el extremo C-terminal del segmento S6 del canal KAT1.....	49
31. Interacciones del residuo N297 en KAT1 silvestre, observadas desde el citoplasma...50	
32. Cambios en el diámetro del poro en el canal mutante KAT1-N297A respecto a KAT1 y SKOR silvestres.....	51
33. El intercambio del centro de S6 de SKOR (residuos DMI) por su contraparte en KAT1 (residuos NLG), elimina la interacción con el extremo citosólico de S5 en el estado cerrado.....	53
34. En la mutante SKOR-1* no se observan relajaciones cinéticas normalmente asociadas con la de-activación del canal SKOR.....	54
35. La sustitución adicional de la región 1* puede rescatar quimeras no funcionales en SKOR.....	55
36. Modelo de SKOR en el estado abierto para mostrar las zonas que interactúan.....	56
37. Cambios en el diámetro del poro en el canal mutante SKOR-312NLG respecto a KAT1 y SKOR silvestres.....	57
38. El residuo C168 de SKOR se ubica en un bolsillo acuoso accesible desde el lado extracelular en el estado abierto, pero no en la conformación cerrada.....	59
39. Dependencia de pH vs $V_{1/2}$ de las mutaciones de residuos ácidos extracelulares de KAT1.....	60
40. Dependencia de pH vs $V_{1/2}$ en la mutante KAT1-F266L-H267R.....	61
41. Análisis de los efectos en la germinación de la ausencia del canal SKOR en plantas de <i>Arabidopsis</i> bajo condiciones de estrés abiótico.....	63

42. Perfil transcripcional del gen SKOR.....	64
43. Expresión del gen <i>AKT2/3</i> en la raíz.....	66
44. Análisis de plantas silvestres y <i>skor-1</i> , crecidas bajo estrés salino, desde los 17 a los 26 días de desarrollo.....	68
45. Análisis de plantas silvestres y <i>skor-1</i> , crecidas bajo estrés salino, desde los 31 a los 40 días de desarrollo.....	68
46. Plantas crecidas en perlita + vermiculita.....	69
47. Análisis de los efectos en el desarrollo de la ausencia del canal SKOR en plantas de <i>Arabidopsis</i> bajo condiciones de estrés abiótico.....	70
48. Perfil de expresión para el gen SKOR en condiciones de estrés salino y estrés osmótico.....	71