

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS CANALES DE POTASIO TIPO SHAKER DE PLANTAS

WENDY GONZÁLEZ DÍAZ
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

RESUMEN

Los canales tipo *Shaker* son proteínas transmembranales que transportan de una manera rápida los iones potasio (K^+) en los tejidos vegetales. Los canales tipo *Shaker* de plantas están divididos en dos grandes grupos de acuerdo a su mecanismo de activación mediado por voltaje: I) Los canales de rectificación de entrada (K_{in}), que se activan por hiperpolarización de la membrana y transportan K^+ hacia dentro de la célula. II) Los canales rectificadores de salida (K_{out}), que se activan por despolarización de la membrana y transportan K^+ hacia el apoplasto. El canal KAT1 que transporta K^+ hacia el citoplasma de las células guardianas en *Arabidopsis thaliana* pertenece al grupo I. El canal SKOR que descarga K^+ desde la raíz hacia el xilema en *A. thaliana* pertenece al grupo II. A través de métodos de bioinformática estructural se compararon los canales KAT1 y SKOR con el fin de identificar los aminoácidos que confieren diversidad funcional entre los canales K_{in} y K_{out} . Se determinó que residuos emplazados en el extremo N-terminal del segmento transmembranal S5 y residuos del segmento transmembranal S6, están relacionados con las diferencias en el mecanismo de activación mediado por voltaje entre los canales K_{in} y K_{out} . Además, se describió cómo los residuos D312, M313 e I314 en SKOR son los responsables de la activación de este canal K_{out} por la concentración extracelular de K^+ , mecanismo de activación que no está presente en los canales K_{in} . Las diferencias en los mecanismos de activación también se reflejan en la activación mediada por el pH del medio. Los canales K_{in} se activan por una acidificación del apoplasto pero los residuos que sensan esta variación de la concentración extracelular de protones (H_{ext}) no están conservados entre los canales K_{in} . A través de mutagénesis sitiodirigida y electrofisiología se demostró que la acción individual de las cargas negativas extracelulares del canal KAT1 no constituye el sensor de H_{ext} y que el residuo o residuos de KAT1 que actúen como sensor del pH extracelular deberían estar situados en la región del poro del canal, muy cerca del residuo H267.

La diversidad funcional que generan las diferencias en los mecanismos de activación de los canales tipo *Shaker*, determina el rol de estas proteínas en la adaptación de las plantas al ambiente. A través de análisis fenotípicos, se estudió los efectos de la pérdida de función del canal tipo *Shaker* SKOR en la germinación y el desarrollo de plantas de *Arabidopsis* sometidas a condiciones de estrés abiótico. Se determinó que el canal SKOR es esencial VII para la germinación de las plantas bajo condiciones de estrés osmótico. El canal SKOR bajo estas condiciones podría ser activado por la unión de la especie reactiva de oxígeno H₂O₂ a una de sus cisteínas (C168).

ABSTRACT

Shaker channels are transmembrane proteins that transport potassium ions (K^+) in a fast way in plant tissues. They are divided into two big groups according to their voltage-dependent activation properties: I) Inward-rectifying channels (K_{in}) are activated by membrane hyperpolarization transporting K^+ into the cell and; II) Outward-rectifying channels (K_{out}) are activated by membrane depolarization transporting K^+ to the apoplast. The channel KAT1 transports K^+ to the cytoplasm of guard cells in *Arabidopsis thaliana* and belongs to group I. The channel SKOR releases K^+ to the xylem in *A. thaliana* and belongs to group II. Using structural bioinformatics methods we compared both channel structures in order to identify those amino acids that confer diversity between K_{in} and K_{out} channels. We found residues placed in the N-terminal part of the S5 segment and in the S6 transmembrane segment that are related to voltage-dependent activation differences between K_{in} and K_{out} channels. Besides, it was described how the amino acids D312, M313 and I314 from SKOR are responsible for the activation of this channel mediated by the extracellular K^+ concentration (K_{ext}). Activation by K_{ext} is not present in K_{in} channels. Differences in activation are also reflected in channel susceptibility to environmental pH. K_{in} channels are activated by extracellular acidification. However, the residues that sense changes of external proton concentrations (H_{ext}) are not conserved between K_{in} channels. Using site-directed mutagenesis and electrophysiology we found that individual action of extracellular negative charges of KAT1 does not constitute the sensor of H_{ext} , and residue or residues from KAT1 that act as extracellular pH sensor should be in the pore of the channel, very near to the residue H267. Functional diversity due to different activation mechanisms of K_{in} and K_{out} channels determines their role in plant-adaptation to the environmental conditions. Through phenotypic analysis we studied the effects of a loss of function of the *Shaker* channel SKOR in germination and development of *Arabidopsis* plants under abiotic stress VIII conditions. We found that this channel is essential for plant germination under osmotic stress conditions. Binding of reactive oxygen specie H_2O_2 to its C168 could activate SKOR channel under these conditions.