



Identificación de interactores del regulador de la homeostasis lipídica AtArv1: caracterización del factor de transcripción anclado a membrana maMYB de Arabidopsis

Daniel Caudepón Giménez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRE DE RECERCA EN AGRIGENÒMICA (CSIC-IRTA-UAB-UB)
GRUP DE METABOLISME I ENGINYERIA METABÒLICA

Identificación de interactores del regulador de la homeostasis
lipídica AtArv1: caracterización del factor de transcripción
anclado a membrana maMYB de Arabidopsis

Daniel Caudepón Giménez

2014

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA

Identificación de interactores del regulador de la homeostasis
lipídica AtArv1: caracterización del factor de transcripción
anclado a membrana maMYB de Arabidopsis

Memoria presentada por Daniel Caudepón Giménez para optar por el título de
Doctor por la Universidad de Barcelona.

Directores:

Autor:

Dr. Albert Ferrer Prats

Dra. Montserrat Arró Plans

Daniel Caudepón Giménez

Daniel Caudepón Giménez

2014

A mis abuelos, y en especial a mi abuelo Daniel

ÍNDICE

Índice de Tablas	xvii
Índice de Figuras	xix
Abreviaciones	xxiii
INTRODUCCIÓN	1
PARTE I	3
1. Esteroles.....	3
2. Esfingolípidos	6
3. Interacción entre esteroides y esfingolípidos	8
3.1. <i>Lipid rafts</i>	8
3.2. Regulación coordinada de la biosíntesis de esteroides y esfingolípidos	9
4. Las proteínas Arv.....	10
4.1. Primeros estudios de Arv1 en levadura: relación con el metabolismo de esteroides y esfingolípidos	10
4.2. Caracterización molecular de Arv1	11
4.3. Relación de Arv1 con el metabolismo de colesterol en mamíferos	13
4.4. Implicación de Arv1 en otros procesos biológicos relacionados con las funciones del RE	15
4.5. Nuevas perspectivas sobre la función de Arv1	18
4.6. Estudios sobre Arv en planta	20
PARTE II	25
1. Factores de transcripción en planta.....	25
2. Factores de transcripción anclados a membrana	26
3. Factores de transcripción de la familia MYB en planta	34
OBJETIVOS	39
RESULTADOS	43
PARTE I: Identificación de proteínas de <i>A. thaliana</i> capaces de interactuar con AtArv1	45
1. Análisis de la topología de las proteínas de estudio y puesta a punto de las condiciones experimentales	45
2. Análisis de la interacción entre ScArv1 y Erg11 y de la dimerización de ScArv1	47
3. Análisis de la interacción entre AtArv1 y CYP51 y de la dimerización de AtArv1	49
4. Análisis de las interacciones cruzadas de las proteínas Arv1 de levadura y Arabidopsis entre ellas y con Erg11 o CYP51	51
4.1. Análisis de la dimerización cruzada entre ScArv1 y AtArv1	51
4.2. Análisis de las interacciones cruzadas entre ScArv1–CYP51 y AtArv1–Erg11	52
5. Cribado con un banco de expresión de cDNA de Arabidopsis	54
6. Análisis de los dominios implicados en la interacción entre AtArv1 y maMYB	59
7. Análisis de la interacción entre AtArv2 y maMYB	61
8. Otros métodos para determinar interacciones entre proteínas	62
8.1. BiFC	62
8.2. Coimmunoprecipitación.....	63

PARTE II: Caracterización de maMYB (<i>membrane-anchored MYB</i>) de <i>A. thaliana</i>	65
1. La proteína maMYB se localiza en la membrana del RE	65
2. Los extremos N- y C- terminal de maMYB se proyectan hacia el citosol.....	67
3. El dominio citoplasmático de la proteína maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹) se localiza en el núcleo y el nucléolo	68
4. Expresión de la proteína maMYB en diferentes tejidos de Arabidopsis.....	72
5. Patrón de expresión del gen <i>maMyb::GUS:GFP</i> en plántulas de Arabidopsis	74
6. Identificación y caracterización de líneas mutantes con pérdida de función del gen <i>maMYB</i> por inserción de T-DNA	75
7. Silenciamiento inducible de la expresión del gen <i>maMYB</i> mediante la sobreexpresión de amiRNA.....	80
7.1. Caracterización molecular de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2	83
7.1.1. Determinación de los niveles de expresión del mRNA de <i>maMYB</i>	84
7.1.2. Análisis de la expresión de la proteína maMYB	85
7.2. Efecto del silenciamiento del gen <i>maMYB</i> sobre el fenotipo de las plántulas	86
7.2.1. Efectos sobre el desarrollo de la parte aérea y la raíz.....	86
7.2.2. Efecto sobre el desarrollo de los pelos radiculares y la estructura de la raíz primaria	88
7.2.3. Efecto sobre el perfil de esteroides	92
8. Sobreexpresión del gen <i>maMYB</i> : reversión parcial del fenotipo en el mutante de silenciamiento inducible.....	94
8.1. Caracterización molecular de los mutantes de sobreexpresión de maMYB y de los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento.....	96
8.1.1. Determinación de los niveles de expresión del mRNA de <i>maMYB</i>	96
8.1.2. Análisis de la expresión de la proteína maMYB	97
8.2. Comparación del fenotipo de los mutantes de sobreexpresión de maMYB y de los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento.....	99
8.2.1. Parte aérea.....	99
8.2.2. Raíz	102
9. Comparación de los mutantes amiRNAs del gen <i>maMYB</i> con el mutante RNAi-2: silenciamiento inducible versus constitutivo	104
10. Estudio de la escisión de maMYB <i>in vivo</i>	108
11. <i>HiSeq 2000 Illumina (RNA-Seq)</i> : Análisis transcriptómico del mutante de silenciamiento inducible amiRNA 2	111
DISCUSIÓN	121
PARTE I: Caracterización de AtArv1 a través de las interacciones que establece con otras proteínas	123
1. Similitudes y diferencias entre ScArv1 y AtArv1	124
1.1. Las proteínas ScArv1 y AtArv1 presentan la misma topología en la membrana del RE	124
1.2. AtArv1 y ScArv1 homodimerizan del mismo modo	124
1.3. AtArv1 no interacciona con CYP51 pero conserva la capacidad de interactuar con Erg11	125
2. Identificación de potenciales interactores de AtArv1	126
2.1. maMYB es capaz de interactuar con AtArv1 y AtArv2.....	127
2.2. La región N-terminal de maMYB es suficiente y el dominio AHD de AtArv1 no es necesario para la interacción	128
2.3. AtArv1 podría establecer en plántula una red de interacciones con proteínas de la membrana	

plasmática	130
PARTE II: Caracterización de maMYB	133
1. maMYB es una proteína de membrana del RE con sus extremos orientados hacia el citosol	134
2. maMYB se expresa en varios tejidos, especialmente en tejido vascular de raíz y parte aérea	135
3. El silenciamiento inducible de maMYB provoca una alteración del fenotipo y una reducción importante de los niveles de expresión de mRNA y proteína	135
3.1. El silenciamiento inducible de maMYB provoca alteraciones en el desarrollo de la raíz y la parte aérea.....	136
3.2. El silenciamiento inducible de maMYB altera la estructura de la raíz primaria y el desarrollo de los pelos radiculares.....	138
3.3. El silenciamiento inducible de maMYB provoca una reducción en los niveles de esteroides	144
4. La sobreexpresión constitutiva de maMYB y maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹ no altera el fenotipo, mientras que la sobreexpresión inducible produce alteraciones parecidas al silenciamiento de maMYB	145
5. Evidencias que apoyan la hipótesis de que maMYB es un MTF canónico perteneciente a la familia MYB.....	147
5.1. maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹ se localiza en el núcleo y el nucléolo.....	147
5.2. La reversión del fenotipo causado por el silenciamiento de maMYB mediante la sobreexpresión constitutiva del dominio citosólico maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹ demuestra su funcionalidad <i>in vivo</i>	148
5.3. Indicios sobre el procesamiento de maMYB <i>in vivo</i>	149
6. Efecto del silenciamiento de maMYB sobre el transcriptoma de Arabidopsis.....	153
CONCLUSIONES	161
MATERIALES Y MÉTODOS	167
1. Material vegetal	169
1.1. Especies vegetales empleadas.....	169
1.2. Mutantes pedidos de <i>A. thaliana</i>	169
1.3. Esterilización de semillas de <i>A. thaliana</i>	170
1.4. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. thaliana</i>	170
1.5. Cultivo en tierra de <i>A. thaliana</i>	171
1.6. Obtención de semillas de <i>A. thaliana</i>	172
1.7. Cultivo en tierra de <i>N. benthamiana</i>	172
2. Material microbiológico	172
2.1. Cepas bacterianas	172
2.2. Medios de cultivo	173
2.3. Cepas de levadura y medios de cultivo.....	174
3. Plásmidos empleados y construcciones generadas	175
3.1. Plásmidos intermediarios de clonaje.....	175
3.2. Construcciones para la expresión de proteínas en levadura.....	176
3.3. Construcciones para la expresión de proteínas en planta.....	180
3.3.1. Construcciones para la expresión de proteínas fusionadas a GFP	181
3.3.2. Plásmidos para expresar proteínas marcadoras de orgánulos en los ensayos de localización subcelular.....	183
3.3.3. Plásmidos y construcciones empleados en los ensayos BiFC	184

3.3.4. Construcción para el análisis del patrón de expresión del gen <i>maMYB</i> de Arabidopsis mediante el gen reportero <i>GUS</i>	185
3.3.5. Construcción del amiRNA de <i>maMYB</i> integrado en un pre-miRNA	186
3.3.6. Construcciones de los amiRNAs para modificar de forma inducible la expresión de <i>maMYB</i> en Arabidopsis	188
3.3.7. Construcciones para la sobreexpresión inducible de <i>maMYB</i> en Arabidopsis	190
3.3.8. Modificación del plásmido pB110Red-2844 como control del promotor inducible basado en el receptor de ecdisona	191
3.3.9. Construcciones para la expresión constitutiva de una proteína en planta	192
4. Técnicas de clonaje: manipulación de DNA y bacterias	193
4.1. PCR de alta fidelidad	193
4.2. Sistema de poliadenilación y ligación en pGEM-T Easy	194
4.3. Sistema de restricción, desfosforilación y ligación	195
4.4. Sistema de recombinación homóloga <i>Gateway</i>	196
4.5. Hibridación de oligonucleótidos.....	197
4.6. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i>	197
4.6.1. Método de cloruro de calcio.....	197
4.6.2. Método de desionización	198
4.7. Transformación de <i>E. coli</i>	198
4.7.1. Choque térmico	198
4.7.2. Electroporación.....	199
4.8. Secuenciación de DNA	199
5. Técnica del doble híbrido para identificar proteínas que interaccionen con una proteína de membrana y/o su topología	200
5.1. Reactivos y medios necesarios para los experimentos de doble híbrido	202
5.2. Transformación del plásmido cebo en la levadura NMY51	204
5.3. Análisis de la topología de las proteínas de estudio y puesta a punto de las condiciones experimentales.....	205
5.4. Transformación del plásmido presa para analizar la interacción de las proteínas cebo y presa ..	207
5.5. Transformación del banco de cDNA NubG-X de Arabidopsis y selección de interactores de AtArv1	208
5.6. Ensayos para la detección de actividad β -galactosidasa	210
5.7. Recuperación del plásmido presa de la levadura, retransformación en <i>E. coli</i> y análisis de la identidad del clon.....	211
5.8. Confirmación de las proteínas interactoras de AtArv1 positivas	212
6. Expresión transitoria de proteínas en <i>N. benthamiana</i>	213
6.1. Obtención de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> EHA105	213
6.2. Transformación de la cepa de <i>A. tumefaciens</i> EHA105.....	213
6.3. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i>	214
7. Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	215
7.1. Obtención de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101.....	215
7.2. Transformación de la cepa de <i>A. tumefaciens</i> GV3101	216
7.3. Genotipado del <i>A. tumefaciens</i> transformado	216
7.4. Transformación de <i>A. thaliana</i> vía infección con <i>A. tumefaciens</i> por el método de inmersión floral	217

7.5. Selección de plantas transgénicas hasta obtener líneas homocigotas	218
7.6. Líneas transgénicas generadas en la tesis	218
8. Generación por polinización cruzada de plantas doble mutantes <i>amiRNA1x35S::maMYB</i> y <i>amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹</i>	219
9. Técnicas con DNA en Arabidopsis	220
9.1. Extracción rápida de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	220
9.2. Extracción de DNA genómico de alta calidad en <i>A. thaliana</i>	221
9.3. Genotipado de los mutantes por inserción de T-DNA de <i>A. thaliana</i>	221
10. Análisis de la expresión del RNA mensajero en Arabidopsis.....	222
10.1. Extracción de RNA total de <i>A. thaliana</i>	222
10.2. Transcripción reversa o síntesis de cDNA para la RT-PCR.....	223
10.3. Reacción de PCR semicuantitativa del gen <i>maMYB</i> (RT-PCR).....	223
10.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	224
11. Técnicas con proteínas en Arabidopsis	225
11.1. Producción de un anticuerpo anti-péptido de maMYB	225
11.2. Extracción de proteína total de diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i> Col 0	226
11.3. Extracción de proteína total de plántulas de <i>A. thaliana</i>	226
11.4. Método de Bradford para la cuantificación de proteínas	227
11.5. <i>Western blot</i>	227
11.6. Inmunoprecipitación de maMYB y coinmunoprecipitación de maMYB y AtArv1	229
12. Métodos de histología y microscopía.....	232
12.1. Análisis de la actividad GUS	232
12.2. Obtención de cortes transversales de raíz y análisis por microscopía óptica	233
12.3. Fotografía e imagen	233
12.4. Fotografía mediante microscopía de bajo aumento	234
12.5. Microscopía óptica	234
12.6. Microscopía láser confocal.....	234
13. Análisis de esteroides.....	235
14. Análisis transcriptómico por secuenciación masiva (<i>RNA-Seq</i>).....	238
14.1. Extracción, cuantificación y comprobación de la calidad del RNA	238
14.2. Secuenciación masiva mediante la tecnología <i>Illumina RNA-Seq</i>	240
14.3. Análisis bioinformático.....	241
15. Herramientas bioinformáticas	242
BIBLIOGRAFÍA	245
PUBLICACIONES	261
ANEXOS	283
ANEXO 1	285
ANEXO 2	294
ANEXO 3	302
Agradecimientos	305

Índice de Tablas

Introducción

Tabla 1. Factores de transcripción anclados a membrana (MTTFs) caracterizados hasta la fecha en Arabidopsis.

Resultados

Tabla 2. Relación de proteínas candidatas a interactuar con AtArv1 ordenadas por la intensidad de la interacción.

Tabla 3. Selección de genes expresados diferencialmente en la raíz del mutante amiRNA 2.

Tabla 4. Selección de genes expresados diferencialmente en la parte aérea del mutante amiRNA 2.

Tabla 5. Selección de genes expresados diferencialmente comunes a ambos tejidos del mutante amiRNA 2.

Materiales y métodos

Tabla 6. Reactivos empleados para suplementar el medio MS.

Tabla 7. Reactivos empleados para suplementar los medios bacteriológicos.

Tabla 8. *Primers* empleados para generar las construcciones para la expresión de las distintas proteínas cebo y presa en levadura.

Tabla 9. *Primers* empleados para generar las construcciones necesarias para la expresión de proteínas fusionadas a GFP.

Tabla 10. *Primers* empleados para generar los plásmidos pMDC83YFN y pMDC83YFC.

Tabla 11. *Primers* empleados para generar el plásmido pCAMBIA2301maMYB::GUS::GFP.

Tabla 12. *Primers* empleados a lo largo de la tesis para secuenciar las distintas construcciones generadas.

Tabla 13. Mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas para cada tipo de *drop out*.

Tabla 14. *Primers* empleados para genotipar los distintos mutantes de inserción de T DNA.

Tabla 15. *Primers* empleados en el RT-PCR semicuantitativo.

Tabla 16. *Primers* empleados en la RT-qPCR.

Tabla 17. Condiciones excitación / emisión.

Anexos

Anexo 1. RNA-Seq. Listado de los 153 genes expresados diferencialmente en raíz ordenados por su *fold change*.

Anexo 2. RNA-Seq. Listado de los 133 genes expresados diferencialmente en la parte aérea ordenados por su *fold change*.

Anexo 3. RNA-Seq. Listado de los 29 genes comunes expresados diferencialmente en raíz y parte aérea ordenados alfabéticamente por su código.

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1. Esquema de la biosíntesis de isoprenoides a través de la vía del mevalonato y posterior biosíntesis de fitoesteroles.

Figura 2. Esquema de la estructura de los diferentes grupos de esfingolípidos sintetizados en plantas.

Figura 3. ScArv1 es una proteína transmembrana que se localiza en el RE y contiene el dominio AHD en el extremo N-terminal.

Figura 4. Modelo propuesto para explicar el papel de Arv1 en la distribución intracelular de colesterol en células de mamífero.

Figura 5. Esquema de la biosíntesis de GPI en levaduras.

Figura 6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Arv de *S. cerevisiae*, *A. thaliana* y *H. sapiens*.

Figura 7. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas de Arabidopsis que expresan los genes quiméricos *ARV1::GUS* y *AtARV1::GUS*.

Figura 8. Análisis del fenotipo causado por el silenciamiento de los genes *ARV* de Arabidopsis.

Figura 9. Relación entre las diferentes familias de factores de transcripción de Arabidopsis.

Figura 10. Ejemplos de activación de MTFs mediante procesamiento proteolítico por las vías RIP y RUP.

Figura 11. Estructuras de los 69 nuevos MTFs identificados.

Figura 12. Caracterización de los MTFs de la familia bZIP: bZIP17, bZIP28 y bZIP60.

Figura 13. Modelo propuesto del efecto de los aminoácidos NP en la conformación del primer dominio transmembrana (DTM) de SREBP-2.

Figura 14. Esquemas representativos de las distintas clases de factores de transcripción de la familia MYB en plantas.

Resultados

Figura 15. Análisis de la topología de las proteínas cebo ScArv1, AtArv1, Erg11 y CYP51 en la membrana del RE.

Figura 16. Análisis de la interacción entre las proteínas de levadura ScArv1 y Erg11, y la dimerización de ScArv1.

Figura 17. Análisis de la interacción entre las proteínas de Arabidopsis AtArv1 y CYP51 y la dimerización de AtArv1.

Figura 18. Análisis de la dimerización cruzada entre las proteínas ScArv1 y AtArv1.

Figura 19. Análisis de la interacción cruzada entre las proteínas ScArv1-CYP51 y AtArv1-Erg11.

Figura 20. Cribado con un banco de expresión de cDNA de Arabidopsis.

Figura 21. La proteína maMYB contiene el dominio R2R3-MYB y está anclada a la membrana del RE mediante dos DTMs.

Figura 22. Análisis de los dominios implicados en la interacción entre AtArv1 y maMYB.

Figura 23. Análisis de la interacción entre AtArv2 y maMYB.

Figura 24. Esquema de la proteína maMYB.

Figura 25. Expresión transitoria de la proteína GFP-maMYB en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*.

Figura 26. Análisis de la topología de la proteína cebo maMYB en la membrana del RE.

Figura 27. Expresión transitoria de la proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*.

Figura 28. Compartimentos del núcleo de una célula de planta.

Figura 29. Coexpresión transitoria de la proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ con varias proteínas marcadoras de cuerpos nucleares fusionadas a mRFP en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*.

Figura 30. Perfil de expresión de la proteína maMYB en Arabidopsis.

Figura 31. Esquema de la región genómica comprendida entre los genes At5g45430 y At5g45420 (*maMYB*).

Figura 32. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plántulas de Arabidopsis transformadas con el gen quimérico *maMyb::GFP:GUS*.

Figura 33. Genotipado por PCR de las líneas mutantes homocigotas para las inserciones de T-DNA en el gen *maMYB*.

Figura 34. Determinación de los niveles de mRNA del gen *maMYB* en los mutantes *mamyb1-1* (A), *mamyb1-2* (B) y *mamyb1-3* (C).

Figura 35. Esquema de la proteína maMYB y secuencia nucleotídica de los amiRNA empleados para silenciar la expresión del gen.

Figura 36. Esquema de la construcción para silenciar el gen *maMYB* mediante un amiRNA expresado bajo el control de un promotor inducible.

Figura 37. Análisis dosis-respuesta del inductor metoxifenocida sobre el fenotipo de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 38. Determinación cuantitativa de los niveles de mRNA de *maMYB* en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 39. Niveles de proteína maMYB en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 40. Análisis del fenotipo en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 41. Efecto del silenciamiento de maMYB sobre el desarrollo de los pelos radiculares.

Figura 42. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 43. Efecto del silenciamiento de maMYB sobre la estructura de la raíz.

Figura 44. Determinación de los niveles de escualeno y esteroides en la raíz (A) y en la parte aérea (B) del mutante amiRNA 2.

Figura 45. Determinación cuantitativa de los niveles del mRNA maMYB en los mutantes simples de sobreexpresión maMYB y los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento.

Figura 46. Niveles de proteína maMYB en los mutantes simples de sobreexpresión maMYB y los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento.

Figura 47. Comparación del fenotipo de la parte aérea en los distintos mutantes del gen *maMYB*.

Figura 48. Comparación del fenotipo de la raíz en los distintos mutantes del gen *maMYB*.

Figura 49. Determinación cuantitativa de los niveles del mRNA maMYB en los mutantes RNAi-2, amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 50. Niveles de proteína maMYB en los mutantes RNAi-2, amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 51. Determinación cuantitativa de los niveles de mRNA de *AtArv1* y *AtArv2* en los mutantes RNAi-2, amiRNA 1 y amiRNA 2.

Figura 52. Diagrama esquemático del proceso de inmunoprecipitación.

Figura 53. Análisis por *Western blot* de la existencia de la forma procesada de maMYB.

Figura 54. Diseño experimental para el análisis transcriptómico mediante RNA-Seq.

Figura 55. Resumen de los cambios transcripcionales en la parte aérea y en la raíz del mutante amiRNA 2 de silenciamiento inducible de maMYB.

Discusión

Figura 56. Árbol filogenético y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Arv de varias especies vegetales.

Figura 57. Circuito regulatorio que determina la identidad de las células epidérmicas formadoras de pelo radicular en *Arabidopsis*.

Figura 58. Árbol filogenético y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína maMYB de *Arabidopsis* y sus homólogos en varias especies vegetales.

Figura 59. Modelo propuesto sobre las implicaciones biológicas asociadas al silenciamiento de maMYB.

Materiales y métodos

Figura 60. Esquema de los plásmidos intermediarios pGEM-T Easy® (Promega) y pENTR™3C (Invitrogen).

Figura 61. Esquema de los plásmidos cebo pBT3N, pBT3C y pBT3STE para la expresión en levadura de proteínas fusionadas al dominio Cub-FT en los ensayos de doble híbrido.

Figura 62. Esquema de los plásmidos presa pPR3N y pPR3C para la expresión en levadura de proteínas fusionadas al dominio Nub en los ensayos de doble híbrido.

Figura 63. Esquema parcial de los plásmidos pMDC43 y pMDC83 para la expresión de proteínas fusionadas a GFP en el extremo N- y C-terminal, respectivamente.

Figura 64. Esquema de la construcción para expresar la proteína marcadora de RE T3RE.

Figura 65. Esquema del plásmido pCAMBIA1304.

Figura 66. Estrategia de clonaje de los amiRNAs de maMYB en el pre-miRNA *miR319*.

Figura 67. Esquema del plásmido pB110-Red-2844 con el promotor inducible basado en el receptor de ecdisona.

Figura 68. Introducción del codón de inicio de traducción en la construcción pB110 Red maMYB⁹¹⁻³⁰⁹.

Figura 69. Clonaje de las construcciones maMYB y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ en el plásmido pCAMBIA2300-MUTPA.

Figura 70. Esquema de la reacción de recombinación LR del sistema de clonaje *Gateway*.

Figura 71. Complementación de los dos dominios Cub y Nub separables de la ubiquitina.

Figura 72. Esquema representativo del empleo de la técnica *split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid* (MbYTH) para identificar proteínas que interaccionen con una proteína de membrana.

Figura 73. Esquema representativo del empleo de la técnica *split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid* (MbYTH) para determinar la orientación de una proteína en la membrana del RE.

Figura 74. Cromatograma representativo correspondiente a los esteroides identificados de la raíz (A) y de la parte aérea (B) del mutante amiRNA 2 crecido en presencia del inductor metoxifenocida.

Figura 75. Electroferograma representativo correspondiente al RNA total extraído de una réplica de la raíz (A) y de la parte aérea (B) del mutante amiRNA 2 crecido en presencia del inductor metoxifenocida.

Figura 76. Proceso de secuenciación masiva de la plataforma *HiSeq 2000 Illumina*.

Abreviaturas

2,4-D	ácido 2,4-dichlorophenoxyacetico
3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
aa	aminoácido
ABA	ácido abscísico
ACAT	Acyl-coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase
ADE2	gen involucrado en la síntesis de adenina en levadura
AHD	ARV Homology Domain
Alg5	proteína de retículo endoplasmático de levadura
amiRNA	artificial microRNA
ARE	ACAT-Related Enzymes
ARV	ARE Required for Viability
BECL	Base Esfingoide de Cadena Larga
bHLH	basic-region hélix-loop-helix
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
BSA	Albúmina Sérica Bovina
bZIP	basic leucine zipper domain
CaMV35S	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
cDNA	DNA complementario
cfu	colony-forming unit
Col 0	ecotipo Columbia 0 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
Col 3	ecotipo Columbia 3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
CsMV	promotor del virus del mosaico de la nervadura de Cassava
Cub	dominio C-terminal de la ubiquitina
CYP450	citocromo P450
DIC	Differential Interference Contrast
DMAPP	dimetilalildifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DO	Densidad Óptica
DsRed	proteína fluorescente roja de discosoma
DTM	Dominio Transmembrana
DTT	ditiotritol
EcR	receptor de ecdísoma
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FPKM	Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
FPP	farnesildifosfato
FPS	FPP sintasa

FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FT	Factor de Transcripción
GC-MS	Cromatografía de gases – espectrometría de masas
GCs	glicosil-ceramidas
gDNA	DNA genómico
GFP	Green Fluorescence Protein
GGPP	geranilgeranildifosfato
GIPCs	glicosil-inositol-fosfoceramidas
GO	Gene Ontology
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GPP	geranildifosfato
GUS	β -glucuronidasa
H3K27me3	trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
HA	hemaglutinina
HC-Pro	helper component proteinase del potyvirus Tobacco etch virus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIS3	gen involucrado en la síntesis de histidina en levadura
HMG-CoA	3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A
HMGR	HMG-CoA reductasa
hpRNA	hairpin RNA
HyPRPs	hybrid proline-rich proteins
IAA	indole-3-acetic acid
IAN	indole-3-acetonitrile
IGEPAL	octylphenoxypolyethoxyethanol
IPP	isopentenildifosfato
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
IRE1	inositol-requiring enzyme 1
kDa	kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LDL	Low Density Lipoprotein
LEU2	gen involucrado en la síntesis de leucina en levadura
lexA-VP16	factor de transcripción artificial en levadura
LT87	línea de Col 0 para cultivo celular de Toulouse de 1987
LTPs	lipid transfer proteins
maMYB	membrane-anchored MYB
MbYTH	split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid
membrane-SPINE	membrane-step-protein interaction experiment
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

Met	metoxifenocida
miRNA	microRNA
mRFP	monomer Red Fluorescence Protein
mRNA	RNA mensajero
MS	medio Murashige & Skoog
MTTF	membrane-tethered transcription factor
MVA	mevalonato
MYB	myeloblastosis
NAC	NAM (no apical meristem), ATAF (Arabidopsis transcription activation factor), CUC (cup-shaped cotyledon)
NLS	Nuclear Localization Signal
Nos Ter	Nopaline synthase Terminator
NubG	dominio N-terminal de la ubiquitina mutada puntualmente (Ile → Gly)
Nubl	dominio N-terminal de la ubiquitina wild type (Ile)
OSBPs	Oxysterol Binding Proteins
pb	pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEG	polietilenglicol
PHD	plant homeodomein
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
pre-miRNA	hairpin precursor microRNA
PSA	persulfato de amonio
PVDF	polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	PCR cuantitativa
RAM	meristemo apical radicular
rDNA	DNA ribosomal
RE	retículo endoplasmático
RIN	RNA Integrity Number
RIP	regulated intramembrane proteolysis
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA interference
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	reverse transcription PCR
RUP	regulated ubiquitin/proteasome processing
s	desviación estándar
S1P	site-1 protease
S2P	site-2 protease
SCAP	SREBP cleavage-activating protein

SD	yeast minimal media Synthetic Defined
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electrophoresis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
siRNA	small interference RNA
SMT	esterol metiltransferasa
SQE	escualeno epoxidasa
SQS	escualeno sintasa
SREBPs	Sterol Regulatory Element Binding Proteins
SPP	signal peptide peptidase
T3RE	versión DsRed.T3 con señales de localización y retención reticular
TAP	tandem affinity purification
T-DNA	Transfer DNA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
UPR	Unfolded Protein Response
URA3	gen involucrado en la síntesis de uracilo en levadura
USP	ubiquitin-specific protease
UTR	Untranslated Region
x g	unidades de fuerza centrífuga relative
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indonil β -glucurónido
YFC	región C-terminal de YFP
YFN	región N-terminal de YFP
YFP	yellow fluorescent protein

INTRODUCCIÓN

PARTE I

1. Esteroles

En plantas, los isoprenoides o terpenos constituyen un conjunto de compuestos con estructuras y funciones muy diversas. Hasta el momento se estima que solo en el reino vegetal se sintetizan al menos 30000 compuestos de esta naturaleza (Page et al., 2004). Esta amplia variedad conlleva que estos compuestos cumplan funciones muy diferentes en procesos básicos para el crecimiento y el desarrollo normal de la planta (Croteau et al., 2000), así como mediadores en las interacciones de las plantas con su entorno y contribuyen a la reproducción de las mismas. A pesar de la pluralidad de funciones y estructuras, todos los isoprenoides derivan de la misma molécula precursora de cinco carbonos (C_5), denominada isopentenildifosfato (IPP o unidad isopreno), y de su isómero dimetilalildifosfato (DMAPP). Los diferentes isoprenoides se sintetizan a través de sucesivas reacciones de adición de estas unidades isopreno (Eschenmoser and Arigoni, 2005).

El proceso de síntesis de los isoprenoides puede dividirse en tres etapas. La primera de ellas consiste en la biosíntesis de la molécula precursora común IPP y su isómero DMAPP (McGarvey and Croteau, 1995). La segunda contempla la producción de los prenildifosfatos lineales, como el geranildifosfato (GPP), farnesildifosfato (FPP) y geranilgeranildifosfato (GGPP), a partir de los cuales la vía metabólica principal se ramifica para dar lugar a los diferentes isoprenoides finales. La tercera etapa comprende todas aquellas reacciones de modificación de los esqueletos terpénicos que se producen sobre los productos anteriores, como metilaciones o desmetilaciones, ciclaciones, isomerizaciones, hidroxilaciones, acilaciones y glicosilaciones necesarias para la obtención de compuestos terpénicos más complejos (Chappell, 1995a).

En plantas superiores la síntesis de IPP se lleva a cabo a través de dos vías metabólicas: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (Lichtenthaler et al., 1997). La vía del MVA (Figura 1) se localiza en el citosol y el RE, y aporta los precursores para la síntesis de citoquininas, dolicoles, brasinoesteroides y mayoritariamente fitoesteroles o esteroles vegetales (Lichtenthaler et al., 1997; Schaller, 2004). Además, parte del IPP sintetizado por esta vía se destina a mitocondrias, donde se utiliza en la síntesis de isoprenoides involucrados en la cadena respiratoria como las ubiquinonas o el grupo hemo A de los citocromos. Paralelamente, en los cloroplastos se halla la vía del MEP, que proporciona

precursores para la producción de monoterpenos, clorofilas, tocoferoles, plastoquinonas, carotenoides y hormonas como el ácido abscísico o las giberilinas. El hecho de que las vías del MVA y del MEP se encuentren en compartimentos separados, no implica que operen de forma absolutamente independiente, sino que parece haber un intercambio limitado de intermediarios entre ambas, a través de la regulación coordinada de la biosíntesis de IPP y DMAPP (Laule et al., 2003; Rodríguez-Concepción, 2006). Hasta el momento no ha sido posible establecer el mecanismo y regulación del transporte de los compuestos entre ambas vías.

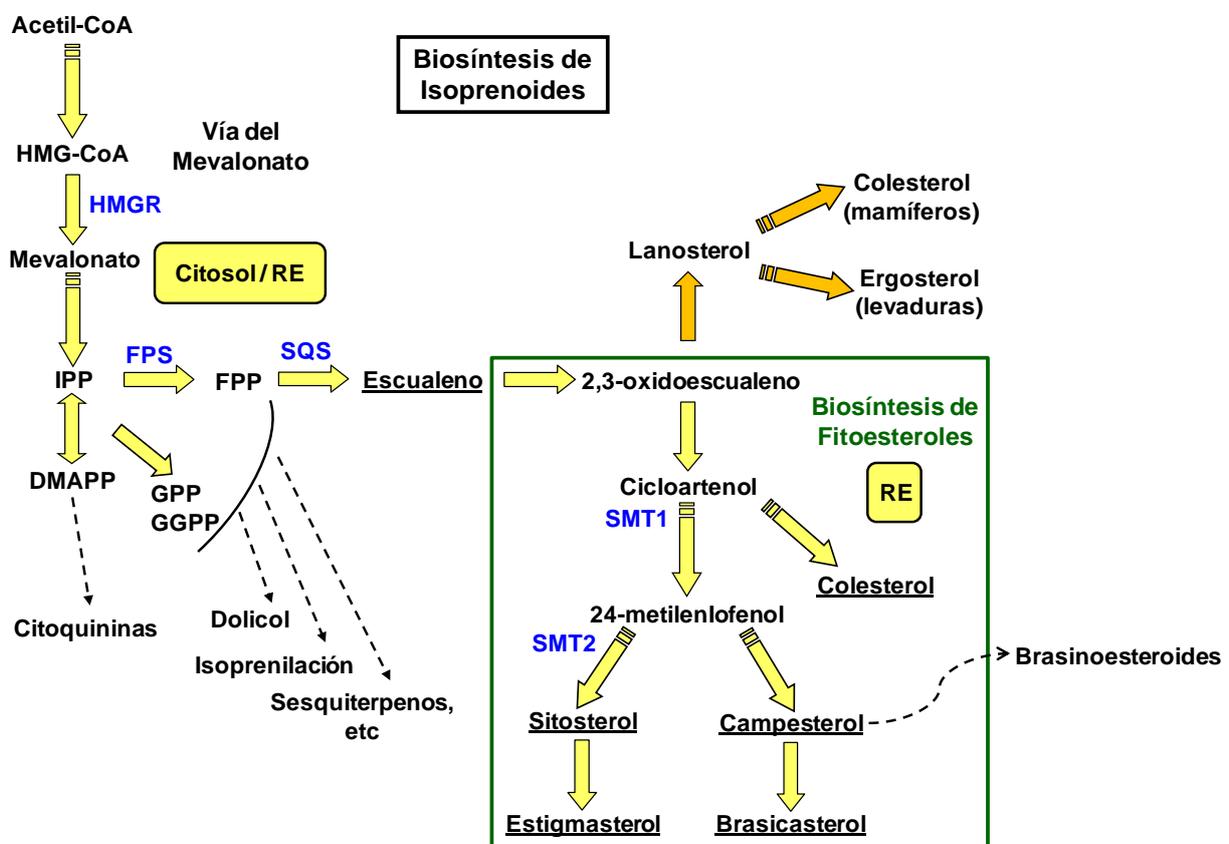


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de isoprenoides a través de la vía del mevalonato y posterior biosíntesis de esteroides vegetales (fitoesteroides). HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HMGR, HMG-CoA reductasa; IPP, isopentenildifosfato; DMAPP, dimetilalildifosfato; GPP, geranildifosfato; GGPP, geranilgeranildifosfato; FPP, farnesildifosfato; FPS, FPP sintasa; SQS, escualeno sintasa; SMT1 y SMT2, esteroil metiltransferasa 1 y 2. Las flechas simples indican una reacción, las flechas que tienen bandas en la cola indican varias reacciones sucesivas, y la flecha que tiene puntas a cada lado indica reacción de isomerización. Las flechas discontinuas negras indican otras rutas en las que se obtienen otros productos derivados de isoprenoides a partir del precursor señalado. Las enzimas en letra azul indican los principales puntos de regulación de la ruta propuestos. La síntesis de IPP a través de la vía del mevalonato y las etapas posteriores hasta la síntesis de escualeno están distribuidas entre el citosol y el RE. El escualeno es el primer precursor específico de la síntesis de esteroides vegetales (fitoesteroides), que tiene lugar en el RE. Para poder comparar entre

eucariotas, se ha añadido la ruta de síntesis de esteroides de mamíferos y levaduras (flechas naranja), que también se inicia con la oxidación del escualeno.

Los esteroides, metabolitos primarios de naturaleza isoprenoide, son sintetizados por todos los organismos eucariotas a través de la vía del mevalonato, pero con diferencias en el proceso de biosíntesis y las estructuras finales según la especie (Figura 1). Tras la oxidación del escualeno, en mamíferos y levaduras se produce un precursor denominado lanosterol, que acaba dando un único tipo de esteroide mayoritario, colesterol y ergosterol, respectivamente. En las plantas, el precursor formado tras la oxidación del escualeno se denomina cicloartenol, y posteriormente la ruta se bifurca en dos ramas: una que da lugar a los 24-etilesteroides, cuyos componentes mayoritarios son el β -sitosterol y estigmasterol, y otra que da lugar a los 24-metilesteroides, en la cual el campesterol es el compuesto mayoritario. Las plantas producen una compleja mezcla de esteroides vegetales o fitoesteroides, y a diferencia de lo que ocurre en animales, el colesterol es un componente minoritario (Benveniste, 2002). Si bien los esteroides libres constituyen la mayor parte del total de estos compuestos encontrados en las células, también es posible hallarlos en forma de ésteres de esteroides, en los que el grupo hidroxilo en C₃ está esterificado con un ácido graso, y se almacenan en forma de gotas lipídicas. La esterificación constituye una forma de regulación de los niveles de esteroides libres, ya que si se acumulan en exceso pueden llegar a ser tóxicos para la célula (Schaller, 2003).

Los esteroides son componentes lipídicos esenciales para el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas celulares. La composición de esteroides determina la fluidez y la permeabilidad de las mismas (Demel and De Kruijff, 1976; Schaller, 2004) e, indirectamente, modula la actividad y la distribución de las proteínas de membrana (enzimas, canales, receptores o componentes de las cadenas de transmisión de señales). Los fitoesteroides también desempeñan un papel esencial en la correcta construcción de la pared celular (Peng et al., 2002; Schrick et al., 2004, 2012), y en la regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (Posé et al., 2009). Además, a partir del campesterol se sintetizan los precursores de los brasinoesteroides, hormonas esteroideas vegetales que intervienen en procesos vitales de la planta como son la expansión celular, la diferenciación vascular, la etiolación y el desarrollo reproductivo (Schaller, 2004; Vriet et al., 2012). También se ha sugerido que los compuestos que quedan en la ruta de síntesis de esteroides por encima del 24-metilenlofenol (Figura 1), podrían desempeñar un papel como moléculas señal (He et al., 2003; Carland et al., 2010), como por ejemplo regulando la

correcta proliferación y diferenciación de las células que van a dar a los estomas (Qian et al., 2013).

Considerando la enorme diversidad a nivel de estructura, número y función que presentan los isoprenoides en plantas superiores, es evidente que se requiere un alto grado de regulación y coordinación entre las vías de producción a diferentes niveles. Aunque la actividad HMGR (enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa) es el principal punto de control en la vía de síntesis del MVA (Stermer *et al.*, 1994), existen otros posibles puntos de control en la síntesis de fitoesteroles: la reacción catalizada por la FPS, la reacción catalizada por la SQS (Busquets et al., 2008), y las reacciones catalizadas por las esteroil metiltransferasas (SMT1 y SMT2) (Holmberg et al., 2002). La actividad de las STMs regula las proporciones de colesterol, campesterol y β -sitosterol en la célula (Schaller, 2003).

2. Esfingolípidos

Los esfingolípidos constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo de compuestos que también son componentes ubicuos de las membranas eucarióticas, localizándose preferentemente en la membrana plasmática. En mamíferos, cumplen una función estructural, regulando la estabilidad y la permeabilidad de las membranas, y actúan como moléculas señal implicadas en el control de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular. En las plantas también ejercen estas funciones estructural y señalizadora (Karlsson and Larson, 1982; Ng et al., 2001; Worrall et al., 2008; Alden et al., 2011) y, además, se les ha implicado en procesos específicos de estos organismos, como la resistencia a agentes fitopatógenos (Sperling and Heinz, 2003; Dunn *et al.*, 2004; Raffaele *et al.*, 2009a).

Hasta la fecha se conocen al menos 500 clases de esfingolípidos diferentes (Pata et al., 2010), y se ha visto que solo *Arabidopsis* contiene unos 168 (Markham and Jaworski, 2007). Las vías de síntesis de estos compuestos son muy similares entre mamíferos, hongos y plantas. Sin embargo, cada especie presenta diferencias en las clases de esfingolípidos sintetizados y las proporciones presentes de cada uno.

BECLs es más heterogénea, siendo posible encontrar hasta 9 clases diferentes de bases. Se ha observado también una gran variabilidad a nivel de la cadena de ácido graso, por lo que existe la posibilidad de combinar las 9 BECL con 10 tipos diferentes de ácidos grasos para formar la ceramida.

La síntesis de los diferentes esfingolípidos puede llevarse a cabo *de novo* o a través de la liberación de las BECL de ceramidas o esfingolípidos más complejos. Se ha observado que, en algunas especies, las glucosilceramidas se sintetizan entre el RE y la membrana plasmática, mientras que los GIPCs se formarían en el aparato de Golgi (Bromley et al., 2003; Hillig et al., 2003; Wang et al., 2008).

3. Interacción entre esteroides y esfingolípidos

3.1 Lipid rafts

En las membranas plasmáticas de los eucariotas se han identificado microdominios lipídicos enriquecidos en esteroides y esfingolípidos en los que se concentran diversos tipos de proteínas de membrana. Estas estructuras reciben el nombre de balsas lipídicas (*lipid rafts*) y hay evidencias de que participan en procesos tan diversos como el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular, la transmisión de señales extracelulares, la secreción polarizada, la organización del citoesqueleto e incluso la penetración de agentes patógenos (Pike, 2003). También se ha demostrado la existencia de balsas lipídicas en las membranas de las células vegetales (Bhat and Panstruga, 2005; Beck et al., 2007; Cacas et al., 2012), y entre los componentes lipídicos presentes en ellas se encuentra una mezcla de esteroides libres y conjugados (esterilglucósidos acilados y no acilados), esfingolípidos como GIPCs y GCs y glicerolípidos (Simon-Plas et al., 2011).

Se ha observado que la composición proteica de las balsas lipídicas es diferente a la del resto de la membrana, que organiza dichas proteínas espacial y temporalmente en la membrana plasmática permitiendo la disposición óptima y en las proporciones necesarias para llevar a cabo su función (Bagnat et al., 2000; Diaz-Rohrer et al., 2014). Así en plantas, modificaciones en el contenido de esteroides y/o esfingolípidos de la membrana plasmática alteran las funciones de las proteínas unidas a la membrana plasmática: enzimas, canales, receptores, y otros componentes involucrados en vías de transducción de señal (Grandmougin-Ferjani et al., 1997;

Schaller, 2004), como respuesta a estrés biótico o abiótico, tránsito celular e interacciones célula-célula (Souter *et al.*, 2002; Men *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2009; Titapiwatanakun *et al.*, 2009; Raffaele *et al.*, 2009b; Pullen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Brodersen *et al.*, 2012).

3.2 Regulación coordinada de la biosíntesis de esteroides y esfingolípidos

Diversos estudios en células animales y en levaduras han demostrado la existencia de una regulación coordinada entre el metabolismo de los esteroides y el de los esfingolípidos (Swain *et al.*, 2002a; Eisenkolb *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2014; Davis, 2014). Uno de los principales mecanismos de esta regulación coordinada en mamíferos son las SREBPs (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*), cuya función es regular a nivel transcripcional el metabolismo del colesterol, así como también controlar la síntesis de varios lípidos en diferentes etapas (Worgall *et al.*, 1998, 2002). Por otra parte, en células animales y en levaduras, también se han descrito diversas proteínas que se unen a lípidos y regulan la distribución intracelular y el metabolismo de lípidos para mantener la homeostasis lipídica, como son las OSBPs (*Oxysterol Binding Proteins*) (Yan and Olkkonen, 2008; Raychaudhuri and Prinz, 2010).

En plantas se han obtenido evidencias de que también puede existir una regulación coordinada entre el metabolismo de los esteroides y el de otros lípidos. Así, se ha observado que la inhibición de la síntesis de esteroides en plántulas de puerro provoca una disminución simultánea de la síntesis del fosfolípido fosfatidilserina y del esfingolípido glucosilceramida, y un aumento de los niveles de triacilglicerol (Hartmann *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha observado que la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas de *Arabidopsis*, disminuye los niveles de esteroides totales de la planta, así como la actividad de la enzima HMGR (Nieto *et al.*, 2009). En otro estudio se ha observado que la alteración de la estabilidad de las membranas en plántulas de trigo, provoca una disminución de los niveles de esteroides totales acompañada de un aumento de los niveles de GCs (Valitova *et al.*, 2011). No obstante, los mecanismos que regulan la homeostasis lipídica intracelular en eucariotas son todavía muy desconocidos, sobre todo en plantas.

4. Las proteínas Arv

Los niveles celulares de esteroides libres deben controlarse muy estrictamente dada la toxicidad derivada de su capacidad para alterar las propiedades de las membranas. Su conversión en ésteres de esteroles permite almacenarlos de forma no tóxica en gotas lipídicas dentro de la célula. Un componente esencial para esta homeostasis es la enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT) (Chang and Doolittle, 1983; Xu and Tabas, 1991). En mamíferos, la redistribución del colesterol intracelular necesaria para evitar niveles elevados de esteroides libres, comprende respuestas como aumentar la actividad ACAT, disminuir la síntesis endógena de esteroides y ácidos grasos, y reducir la captación de lipoproteínas vía receptores de tipo LDL (Tabas et al., 1986), lo que conlleva cambios en la actividad transcripcional de diversos genes mediados por los factores de transcripción SREBP (Brown and Goldstein, 1999). Los niveles de esteroides en la membrana plasmática son más elevados que en las membranas del RE (Maxfield and van Meer, 2010; Maxfield and Menon, 2006), donde se localizan las proteínas SREBP y ACAT implicadas en el mantenimiento de la correcta proporción relativa. Los esteroides sintetizados endógenamente en el RE se transportan a la membrana plasmática (transporte anterógrado), mientras que los esteroides captados del medio externo en la membrana plasmática se transportan al RE (transporte retrógrado). Por consiguiente, el tránsito de esteroides hacia y desde el RE es un componente crítico para la homeostasis de esteroles.

4.1 Primeros estudios de Arv1 en levadura: relación con el metabolismo de esteroides y esfingolípidos

El gen *ARV1* (Are Required for Viability) de *S. cerevisiae* se identificó en un escrutinio en busca de proteínas que confieren viabilidad a una cepa mutante de levadura, *areΔ1areΔ2* (ACAT-Related Enzymes, codificadas por los genes *ARE1* y *ARE2*), que no es capaz de crecer a 37°C al estar desprovista de actividad ACAT y no poder esterificar esteroides (Tinkelenberg et al., 2000). Estos autores han demostrado que la disrupción del gen *ARV1* (mutante *arv1Δ*) altera los niveles y la distribución intracelular de esteroides. Así, el nivel de esteroides totales aumenta alrededor de un 50% y el de ésteres de esteroides alrededor de un 75%. Además, el contenido de esteroides de las membranas del retículo endoplasmático (RE) y las vacuolas aumenta, mientras que el de la membrana plasmática disminuye, lo que indica que el transporte

anterógrado estaría alterado, y esto a su vez, podría alterar la composición de las balsas lipídicas. Por otra parte, el mutante *arv1Δ* resulta sensible a la nistatina (antifúngico que permeabiliza las membranas por su unión al ergosterol) y es inviable en anaerobiosis, circunstancia en que las células necesitan obtener esteroides y ácidos grasos exógenos, lo que indica que la proteína Arv1 de levadura (*ScArv1*) también es esencial para la captación de esteroides del medio externo y el transporte retrógrado (Tinkelenberg et al., 2000).

Posteriormente, también se han aislado mutaciones en el gen *ARV1* en un escrutinio independiente en busca de mutantes de levadura defectivos en la síntesis de esfingolípidos (Swain et al., 2002b). Estos autores han demostrado que la inactivación de *ARV1* (cepa mutante YJN1756) causa una disminución de la biosíntesis de esfingolípidos complejos y un incremento de los niveles de sus precursores, las ceramidas, así como alteraciones de distinto signo en el metabolismo de fosfolípidos y una disminución de los niveles totales de ácidos grasos debido, probablemente, al aumento de los ésteres de esteroides. Respecto a los esteroides, los niveles de ergosterol y zosterol disminuyen, mientras que los de lanosterol y otros intermediarios biosintéticos no identificados aumentan (Swain et al., 2002b). Todo ello ha llevado a proponer que *ScArv1* puede ser un regulador común de la homeostasis celular de esteroides y esfingolípidos.

Por otra parte, la demostración de que *ScArv1* interacciona directamente con la lanosterol C-14 demetilasa (*Erg11*), la enzima que cataliza la transformación del lanosterol, el primer intermediario cíclico de la biosíntesis de ergosterol, en 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol (Miller et al., 2005), refuerza la relación entre *ScArv1* y el metabolismo de esteroides en levadura y concuerda con que la inactivación de *ARV1* en la cepa YJN1756 acumula el sustrato de *Erg11*, lanosterol (Swain et al., 2002b).

4.2 Caracterización molecular de Arv1

La proteína Arv1 no es exclusiva de levaduras, ya que se han identificado posibles ortólogos en otros eucariotas. Se ha demostrado que la proteína ortóloga de humanos (*HsArv1*) y *Arabidopsis* (*AtArv1* y *AtArv2*) rescatan los fenotipos del mutante *arv1Δ* (Tinkelenberg et al., 2000; Swain et al., 2002b; Forés et al., 2006). Al comparar la secuencia de aminoácidos entre la proteína Arv1 de *S. cerevisiae* y las correspondientes ortólogas de otras especies (*A. thaliana*, *C. elegans* y *H. sapiens*), se ha identificado en el extremo N-terminal un nuevo dominio, *Arv Homology Domain*

(AHD), que incluye una secuencia susceptible de formar una estructura de tipo dedo de zinc (Figura 3A), cuya secuencia C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C recuerda a los encontrados en los plegamientos tipo *zinc ribbons*. Estos motivos de unión a Zn se han descrito en factores de transcripción en los que actúan como elementos de unión al DNA o mediadores de la unión entre proteínas, por lo que Arv1 podría funcionar como un multímero y/o actuar interaccionando con otras proteínas (Tinkelenberg et al., 2000).

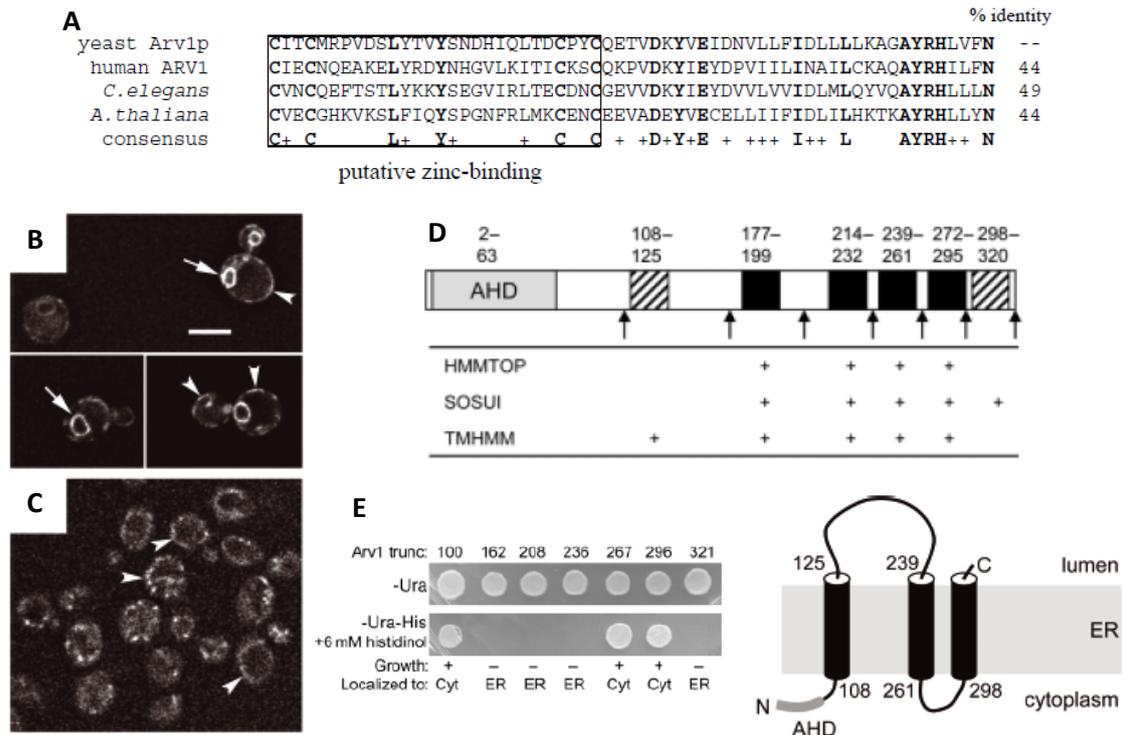


Figura 3. ScArv1 es una proteína transmembrana que se localiza en el RE y contiene el dominio AHD en el extremo N-terminal. A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio AHD del extremo N-terminal de Arv1 de levadura, humano, *C. elegans* y Arabidopsis. Debajo del alineamiento se muestran los aminoácidos conservados (negrita) y los que tienen propiedades similares (+). A la derecha se muestra el porcentaje de identidad comparado con Arv1 de levadura. El posible motivo de unión a zinc se marca con un recuadro. **B)** Localización subcelular en el RE perinuclear (flechas) y cortical (puntas de flecha) de ScArv1 en levaduras que sobreexpresan GFP-ScArv1. **C)** Localización subcelular solo en el RE cortical (puntas de flecha) de ScArv1 en levaduras con expresión atenuada de GFP-ScArv1. **D)** Predicción de los dominios transmembrana de ScArv1 según los programas bioinformáticos HMMTOP, TMHMM y SOSUI. Las cajas negras indican los dominios transmembrana identificados por los tres programas, y las cajas rayadas por un solo programa. Las flechas indican la posición de las versiones truncadas de ScArv1 fusionadas en su extremo C-terminal a Suc2-His4 empleadas en el análisis de topología. **E)** Se muestra el crecimiento de las levaduras auxotróficas en histidina que expresan una versión truncada de ScArv1 con su extremo C-terminal orientado hacia el citosol, de forma que es capaz de transformar el histidinol presente en el medio en histidina. Estos resultados condujeron a la topología

propuesta en la representación esquemática. Imágenes adaptadas de Tinkelenberg *et al.*, 2000; Villasmil and Nickels, 2011; Georgiev *et al.*, 2013.

Inicialmente se había observado que la proteína de fusión GFP-ScArv1 se localizaba en el RE o en el aparato de Golgi dependiendo, posiblemente, de la fase de crecimiento de las células (Swain *et al.*, 2002b). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado en levaduras en gemación que, mientras la sobreexpresión de GFP-ScArv1 bajo su promotor nativo en un plásmido de alto número de copias muestra una localización en el RE perinuclear y cortical (Figura 3B), la expresión a niveles fisiológicos de GFP-ScArv1 bajo su promotor nativo en un plásmido de bajo número de copias solo muestra localización en el RE cortical (Figura 3C), lo que indicaría que la sobreexpresión de ScArv1 podría resultar en su acumulación en sitios donde normalmente no se encontraría, como sería en el RE perinuclear, y que la auténtica ubicación de ScArv1 sería periférica en el RE cortical (Georgiev *et al.*, 2013). En otros organismos se ha observado que, la proteínas de fusión HsArv1-GFP en células de ovario de hámster y GFP-AtArv1 y GFP-AtArv2 en células epidérmicas de cebolla, también se localizan en el RE (Tong *et al.*, 2010; Forés *et al.*, 2006).

Según los análisis bioinformáticos, inicialmente se propuso que Arv1 de levadura y humano contenían seis secuencias de transmembrana (Figura 3D), de forma que los extremos N- y C-terminal quedarían proyectados hacia el citosol (Tinkelenberg *et al.*, 2000). Posteriormente, empleando diferentes versiones de ScArv1 fusionadas en su extremo C-terminal a Suc2-His4, se ha determinado que ScArv1 posee únicamente tres dominios transmembrana (Figura 3E), de forma que el extremo N-terminal se localizaría en la cara citosólica del RE y el extremo C-terminal se encontraría orientado hacia el lumen. Se ha determinado que el largo bucle situado entre las dos primeras secuencias de transmembrana que quedaría orientado hacia el lumen parece ser necesario para rescatar los fenotipos del mutante *arv1Δ*, quizá por su mediación en posibles interacciones proteína-proteína o proteína-lípido (Villasmil and Nickels, 2011).

4.3 Relación de Arv1 con el metabolismo de colesterol en mamíferos

La función de Arv1 en mamíferos (Tong *et al.*, 2010) se ha estudiado en células HepG2 (línea celular del carcinoma de hígado humano) y ratones, en los que se ha disminuido notablemente la expresión del gen *ARV1* empleando oligonucleótidos

antisentido específicos. Se ha demostrado que la disminución de la expresión de *ARV1* en ratón causa una acumulación de colesterol plasmático, principalmente en forma de LDL, y de ácidos biliares. En las células del hígado, donde la toxicidad del colesterol libre se puede neutralizar por esterificación, secreción en lipoproteínas y síntesis de ácido biliares, se ha observado la activación de la ACAT y de los receptores nucleares FXR implicados en la regulación de la homeostasis de los ácidos biliares, y que la expresión de los genes *CYP7 α 1* (colesterol 7 α hidroxilasa implicada en la biosíntesis endógena de ácido biliar), *NTCP* (transportador de ácidos biliares para su reabsorción del plasma al hepatocito), y *LDLR* (receptor de LDLs) se reprimen, mientras que la expresión de *ABCB11* (transportador de ácidos biliares desde los hepatocitos a la bilis) aumenta (Figura 4). A pesar de ello, tanto en hígado de ratón como en células HepG2, el colesterol se acumuló dentro de las células, debido a los defectos en el transporte del colesterol sintetizado en el RE, lo que conllevó también a la supresión de la activación del factor de transcripción SREBP que se produce cuando la concentración de colesterol en el RE es baja (Figura 4). Estos resultados demuestran que *Arv1* juega un papel crucial en el metabolismo de colesterol en los hepatocitos facilitando, al igual que ocurría en levadura, el transporte de esteroides fuera del RE (transporte anterógrado). Consecuentemente, cuando se silencia la expresión de *ARV1* se acumula colesterol en el RE, con la consecuente alteración en la homeostasis de colesterol y ácidos biliares.

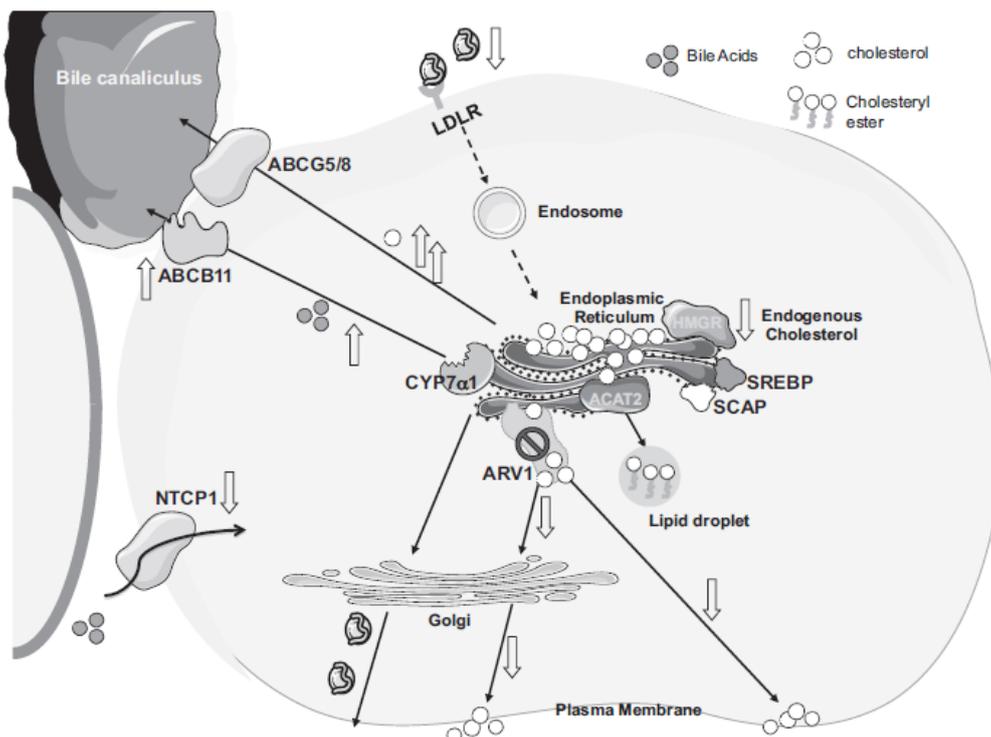


Figura 4. Modelo propuesto para explicar el papel de Arv1 en la distribución intracelular de colesterol en células de mamífero. Se propone que la proteína codificada por *ARV1* facilita el transporte vesicular y/o no vesicular del colesterol desde el RE a la membrana plasmática. Cuando se silencia la expresión de *ARV1*, el colesterol se exporta de forma poco eficiente hacia la membrana plasmática y, por lo tanto, se acumula en el interior de la célula, probablemente en el RE, lo que provoca la disminución de la expresión de SREBP, de la síntesis endógena de colesterol vía HMG-CoA reductasa y de la captación de colesterol por el receptor de LDL, y el incremento de la biosíntesis de ácidos biliales y de la secreción de colesterol y ácidos biliares en la bilis. Abreviaciones: ACAT2, acil-CoA:colesterol aciltransferasa 2; HMGR, HMG-CoA reductasa; LDLR, receptor de lipoproteínas de baja densidad; SCAP, proteína activadora por proteólisis de SREBP; CYP7 α 1, colesterol 7 α -hidroxilasa; ABCB11 y ABCG5/8, miembros de la superfamilia de transportadores de membrana tipo ABC. Imagen obtenida de Tong *et al.*, 2010.

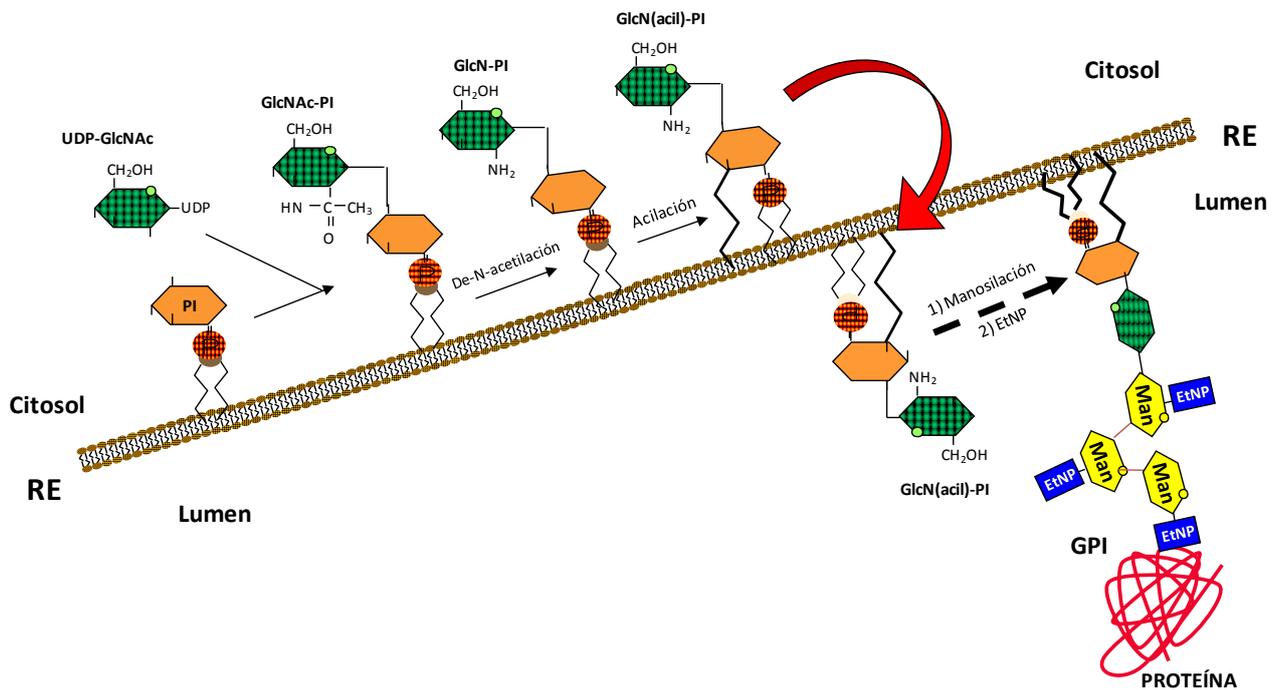
4.4 Implicación de Arv1 en otros procesos biológicos relacionados con las funciones del RE

Si bien ScArv1 había sido identificada y relacionada inicialmente con el metabolismo de esteroides y esfingolípidos, posteriormente diversos estudios han descrito su implicación en otros procesos biológicos relacionados con el RE y, en mayor o menor medida, con la actividad reguladora de ScArv1 en la homeostasis lipídica.

Por una parte, ScArv1 se ha vinculado a la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en levadura (Kajiwara *et al.*, 2008). El GPI es un glicolípido complejo presente en eucariotas, que se une covalentemente al extremo C-terminal de algunas proteínas de secreción y permite su anclaje a la membrana (Pittet and Conzelmann, 2007). La síntesis de GPI comienza en la cara citosólica del RE hasta obtener una molécula precursora de GPI, que debe ser translocada desde la cara citosólica a la luminal del RE para continuar su maduración (Figura 5).

Figura 5. Esquema de la biosíntesis de GPI en levaduras. La biosíntesis se inicia en la cara citosólica del RE con la transferencia de GlcNAc desde UDP-GlcNAc a una molécula de PI. El GlcNAc-PI es N-desacetilado y luego la molécula de inositol es acilada dando lugar a GlcN(acil)-PI. A continuación, se transloca hacia el lumen mediante la acción de una flipasa (flecha roja) donde es manosilado y posteriormente se producen modificaciones por adición de residuos de EtNP. La estructura final del GPI se une entonces a proteínas translocadas al lumen del RE que contienen en su extremo C-terminal una secuencia señal de unión a GPI, dando lugar a la proteína anclada a la membrana interna del RE, que seguirá la ruta secretora a través del aparato de Golgi hasta llegar a la membrana plasmática, en concreto en las balsas lipídicas. Abreviaciones: UDP-GlcNAc, UDP-N-acetilglucosamina; PI, fosfatidilinositol; GlcNAc-PI, N-acetilglucosaminil-PI; GlcN-PI, glucosaminil-PI; GlcN(acil)-PI, glucosaminil-acil-PI; Man,

manosa; EtNP, fosforetanolamina; GPI, glicosil-fosfatidilinositol. Figura modificada de Keim, 2012.



En este trabajo, estudios *in vitro* sobre la síntesis de GPI en membranas del mutante *arv1Δ*, donde se acumula el intermediario GlcN(acil)-PI, sugieren que ScArv1 podría actuar como una flipasa, es decir, una proteína que transloca moléculas intermediarias de la síntesis de GPI desde la cara citosólica a la luminal del RE, o bien, como una proteína reguladora que proporciona la molécula de GlcN(acil)-PI para las reacciones de manosilación posteriores en el lumen del RE. Asimismo, se observó que las alteraciones en la síntesis de GPI en el mutante *arv1Δ* afectan también a la regulación del transporte de ceramidas desde el RE al Golgi y, por tanto, la síntesis de esfingolípidos como el inositolfosforilceramida (IPC). Por otro lado, la sobreexpresión de algunos genes implicados en la síntesis de GPI consiguen rescatar el fenotipo de crecimiento a 37°C del mutante *arv1Δ*. Además, algunos de los mutantes *gpi* de levadura defectivos en la biosíntesis de GPI, presentan alteraciones en la biosíntesis de esfingolípidos y acumulan esteroides en gotas lipídicas y RE, del mismo modo que ocurría en el mutante *arv1Δ* (Beh and Rine, 2004), sugiriendo que dicha modificación en la distribución intracelular de esteroides podría deberse a un efecto indirecto derivado de la alteración en la síntesis y transporte de esfingolípidos.

En segundo lugar, se ha propuesto una relación entre la pérdida de función del gen *ARV1* y la inducción de la UPR (*Unfolded Protein Response*) (Copic et al., 2009;

Shechtman et al., 2011). La UPR es un mecanismo de respuesta a estrés celular en el RE que se activa cuando se detectan niveles altos de proteínas plegadas incorrectamente o defectuosas. Así, el mutante *arv1Δ* de levadura presenta alteraciones en el metabolismo lipídico, tales como acumulación de esteroides, expansión de las membranas intracelulares, mayor formación de gotas lipídicas y fragmentación de vacuolas (Shechtman et al., 2011). Estas alteraciones en las membranas intracelulares y en la homeostasis lipídica afectan a la integridad del RE, lo que induce la UPR a través de un mecanismo independiente del que induce la UPR en respuesta a la presencia de proteínas defectuosas. Asimismo, se ha observado que al inducir químicamente la UPR en este mutante, la respuesta fue notablemente mayor, probablemente debido a un efecto sinérgico entre las alteraciones lipídicas y la acumulación de proteínas defectuosas. Esta misma relación entre disrupción del gen *ARV1* e inducción de la UPR se ha observado en cultivos celulares de macrófagos de ratón, llegando incluso a producirse apoptosis como consecuencia del estrés prolongado en el RE.

Por otra parte, se ha demostrado la importancia de ScArv1 en el proceso de conjugación de las levaduras (Villasmil et al., 2011), que consiste en el apareamiento de células haploides de tipo sexual opuesto mediado por feromonas. El mutante *arv1Δ* presenta defectos en el proceso de conjugación al no poder formar la protuberancia celular (*shmoo*) que se elonga hacia la fuente de feromona, y que permite la posterior fusión de las células haploides de tipo sexual opuesto. Se ha propuesto que la alteración en la distribución de esteroides en las balsas lipídicas de la membrana plasmática de dicho mutante (Fei et al., 2008), afecta a la distribución polarizada del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂] en la membrana plasmática, necesaria para la localización eficiente de la proteína de anclaje Ste5 (*scaffold protein*), lo que impide la posterior activación de la señalización mediada por MAP quinasas y el consecuente inicio del arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por feromonas. También se ha observado que el dominio AHD de ScArv1 es suficiente para la correcta distribución de esteroides, permitiendo el desarrollo de la ruta de respuesta a feromona descrita que lleva a la formación del *shmoo* y a la conjugación de las células haploides de tipo sexual opuesto.

Por otro lado, se ha relacionado ScArv1 con la función de transportador de lípidos necesaria para la supervivencia celular en respuesta a diversos tratamientos antifúngicos (Gallo-Ebert et al., 2012). En este sentido, se ha demostrado que la incapacidad de inducir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol en el mutante *arv1Δ*, impide la activación de la ruta de resistencia a

fármacos, tales como los transportadores de membrana que actúan como bombas de eflujo, y consecuentemente, provoca una alta susceptibilidad del mutante a compuestos antifúngicos, como ya se había visto en trabajos anteriores (Tinkelenberg et al., 2000; Parsons et al., 2004; Thevissen et al., 2007). También se observó que el dominio AHD de ScArv1 es necesario para una susceptibilidad normal a determinados fármacos. Esta función relacionada con Arv1 y el dominio AHD se ha conservado en Arv1 del hongo patógeno *Candida albicans*, ya que es capaz de rescatar los fenotipos del mutante *arv1Δ* (Fei et al., 2008; Gallo-Ebert et al., 2012). Además, se ha demostrado que el mutante de *Candida albicans* defectivo en la expresión de Arv1 muestra el mismo fenotipo que el mutante *arv1Δ* de levadura, no presenta virulencia en ratones y muestran un retraso en la formación de la hifa.

4.5 Nuevas perspectivas sobre la función de Arv1

Muy recientemente, se ha analizado en detalle el transporte de esteroides entre el RE y la membrana plasmática (transporte anterógrado y retrógrado) en el mutante *arv1Δ* de levadura, concluyéndose que éste no se encuentra afectado (Georgiev et al., 2013). Sin embargo, el mutante *arv1Δ* presenta alteraciones en la organización de la bicapa lipídica de la membrana plasmática y en la morfología del RE, especialmente en la organización estructural del RE cortical, lo que sugiere un papel distinto de Arv1 en la homeostasis de las membranas. Además, se ha observado que la alteración en la morfología del RE altera el destino y la expresión de proteínas con un único dominio transmembrana en C-terminal, lo que sugiere que ScArv1 podría regular este tipo de inserción y anclaje en la membrana de proteínas involucradas en la homeostasis de las membranas, como ya se había visto con algunas proteínas involucradas en la UPR (Copic et al., 2009). Por otra parte, mientras la velocidad de esterificación de esteroides no se encuentra afectada, se producen un retraso en la aparición y almacenamiento de los esteres en gotas lipídicas. Teniendo en cuenta que la morfología de las gotas lipídicas también resulta afectada, podría ser que la ausencia de ScArv1 influya en el transporte de los esteres de esteroides desde el RE a las gotas lipídicas.

En contraste con estudios anteriores (Tinkelenberg et al., 2000; Swain et al., 2002b; Kajiwara et al., 2008), también se ha observado que aunque el mutante *arv1Δ* tiene mayores niveles de esteroides, esteres de esteroides y fosfolípidos, la proporción molar entre esteroides y fosfolípidos no está afectada (Georgiev et al., 2013). También se ha demostrado que el crecimiento lento en condiciones anaeróbicas no es debido a la reducción de la capacidad para incorporar esteroides del medio externo o para

transportarlos a las membranas intracelulares (transporte retrógrado). Por otra parte, el mutante *arv1Δ* posee niveles totales de ergosterol normales aunque acumula 22,23-dihidroergosterol, un intermediario en la biosíntesis de ergosterol. Esta acumulación podría ser debida a una deficiencia de la C-22 esteroles desaturasa o a que el intermediario biosintético se encontrase deslocalizado o no disponible para la enzima. En definitiva, estos autores concluyen que el mutante *arv1Δ* muestra un metabolismo aberrante de esteroides, si bien la distribución de ergosterol entre las distintas membranas celulares es normal.

En un escrutinio para identificar rutas que evitaran la muerte celular inducida por lípidos, se ha identificado el mutante *arv1Δ* de levadura como el más sensible a ácidos grasos (Ruggles et al., 2014). Además, se ha observado que la reducción de la expresión de *ARV1* en células β de páncreas de ratón y en la línea celular de riñón de embriones humanos (HEK293), provoca una disminución de la síntesis de lípidos apolares, un incremento de la sensibilidad a ácidos grasos y finalmente lipoapoptosis. En cambio, la sobreexpresión de *ARV1* de mamífero en dichas células incrementa la síntesis de triglicéridos y el número de gotas lipídicas, lo que provoca un aumento en la expresión de los genes *DGAT1* (involucrado en la biosíntesis de triglicéridos) y *CD36* (transportador de ácidos grasos). Además, *ARV1* se ha identificado como un gen diana de la proteína PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), un regulador clave en la homeostasis lipídica que también tiene como genes diana *DGAT1* y *CD36*. Estos resultados sugieren que *ARV1*, a través de la modulación de la síntesis celular de lípidos apolares, estaría implicado en procesos de protección frente a trastornos lipotóxicos causados por una alteración en el metabolismo de ácidos grasos. En este sentido, la acumulación del esfingolípido ceramida (Swain et al., 2002b) y la activación de la UPR (Shechtman et al., 2011), descritos anteriormente en el mutante *arv1Δ*, están relacionadas con procesos de lipotoxicidad y apoptosis.

En el mismo sentido que el estudio anterior, se ha encontrado el mutante *arv1Δ* en un escrutinio para identificar genes necesarios para la supervivencia celular en fase estacionaria, que se caracteriza por la restricción de nutrientes, lo que relacionaría *ARV1* con la longevidad y el envejecimiento celular (Garay et al., 2014). Además, se describe una conexión genética entre la maquinaria de autofagia y la homeostasis de lípidos, que son rutas que modulan la esperanza de vida celular. Teniendo en cuenta que la actividad de autofagia necesaria para evitar el envejecimiento celular depende de Arv1, se ha especulado que dicha proteína podría ser necesaria para el correcto anclaje en la membrana del RE del extremo C-terminal de la proteína Trs85, involucrada en el transporte vesicular necesario en la autofagia. Por otra parte, no se

puede descartar que el papel general de Arv1 en la homeostasis lipídica esté relacionado con el correcto funcionamiento de la maquinaria de autofagia.

A pesar de las diferentes funciones y procesos biológicos que se han relacionado con Arv1, hasta la fecha no se dispone de evidencias directas que permitan establecer la auténtica función bioquímica de Arv1 y cuáles serían, por lo tanto, los efectos pleiotrópicos de dicha función. Lo que sí parece confirmarse es que Arv1 es un punto de conexión que vincula procesos como la homeostasis lipídica y de membranas con la conjugación, resistencia a fármacos, lipotoxicidad, estrés de RE (UPR), apoptosis y envejecimiento, que muy posiblemente estén interconectados unos con otros.

4.6 Estudios sobre Arv en plantas

Nuestro grupo ha comenzado a estudiar las proteínas Arv de plantas empleando *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo (Forés et al., 2006). Así, se han identificado los dos únicos genes de la familia ARV de *Arabidopsis*, *AtARV1* (At1g01020) y *AtARV2* (At4g01510), que contienen 9 exones cada uno, y codifican las proteínas AtArv1 (245 aa) y AtArv2 (228 aa), respectivamente. Ambas proteínas comparten una similitud del 76% y son 32% y 33% similares a ScArv1, y 36% y 39% similares a HsArv1, respectivamente. Las proteínas AtArv también poseen el dominio AHD, correspondiente a los primeros 68 amino ácidos del extremo N-terminal, que incluye el subdominio N-terminal, con una secuencia de 28 aminoácidos rica en cisteínas (C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C) y susceptible de formar una estructura de tipo dedo de zinc (aminoácidos de posiciones 8 a 35), y el subdominio C-terminal de 33 aminoácidos (aminoácidos de posiciones 36 a 68) (Figura 6).

Figura 6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Arv de *S. cerevisiae*, *A. thaliana* y *H. sapiens*. Los aminoácidos conservados en las cuatro secuencias se muestran sobre fondo negro, mientras que aquellos conservados en tres de las cuatro secuencias se muestran sobre fondo gris. El recuadro marca la secuencia susceptible de formar una estructura de tipo dedo de zinc y las cisteínas que interaccionarían con el Zn se muestran en rojo y negrita. El dominio AHD está subrayado en azul. Los guiones indican espacios introducidos para optimizar el alineamiento de las secuencias. Imagen obtenida de Forés del Ruste, 2007.

híbrido para proteínas de membrana, se ha confirmado que la proteína AtArv1 expresada en levadura posee una topología con los extremos N- y C- terminal orientados hacia el citosol, lo que indica que posee un número par de dominios transmembrana (Keim, 2012).

El análisis de la expresión de los genes quiméricos *ARV1::GUS* y *ARV2::GUS* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ha revelado que ambos promotores dirigen patrones de expresión ampliamente solapantes, aunque no idénticos, y restringidos a meristemos radiculares primarios y secundarios, meristemo vegetativo apical, granos de polen, óvulos fecundados y tejido interno de semillas. Mediante RT-PCR se ha demostrado que ambos genes *ARV* también se expresan en células de la línea T87 de *Arabidopsis*. En conjunto, el patrón de expresión resulta coherente con el posible papel de estas proteínas en la regulación de la homeostasis de lípidos y/o membranas, ya que la expresión se detecta en tejidos donde existe una alta actividad metabólica de crecimiento y división celular, donde es previsible que se dé una síntesis activa de lípidos, por ejemplo, para la fabricación de nuevas membranas en las regiones meristemáticas y los granos de polen, o para ejercer funciones de reserva como en las semillas. La mayor diferencia entre los patrones de expresión de ambos genes puede observarse en hojas de la roseta basal, donde *ARV1* se expresa en el tejido vascular, mientras que la expresión de *ARV2* no se detecta (Figura 7) (Forés et al., 2006).

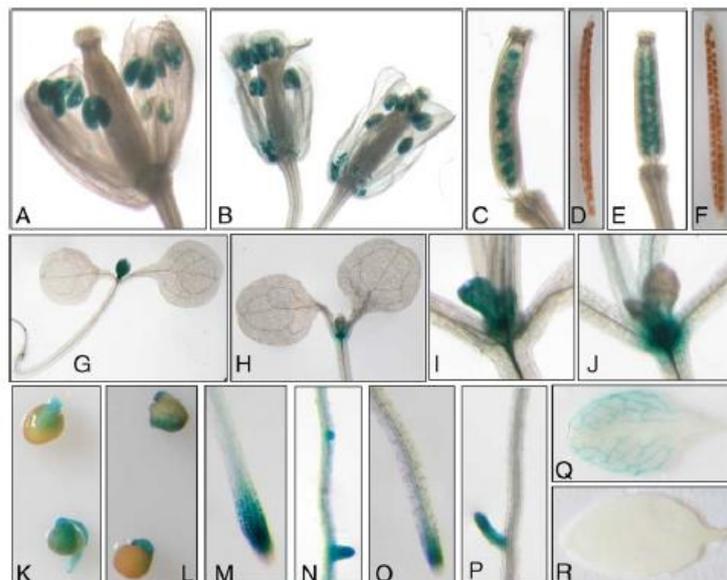


Figura 7. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los genes quiméricos *ARV1::GUS* y *AtARV1::GUS*. La expresión GUS se analizó en flores (A y B), silicuas jóvenes (C y E) y maduras (D y F),

plántulas de 3 días de edad (G y H), meristemo apical del tallo de plántulas de 6 días de edad (I y J), plántulas después de 24h de la germinación (K y L), punta de raíz primaria (M y O) y lateral (N y P), y hojas maduras de roseta basal (Q y R). Las imágenes A, C, D, G, I, K, M, N y Q pertenecen a los patrones expresados por el gen *ARV1::GUS* y las imágenes B, E, F, H, J, L, O, P y R corresponden a *ARV2::GUS*. Imagen obtenida de Forés et al., 2006.

Más recientemente, se ha observado que el silenciamiento de los genes *ARV* de *Arabidopsis* mediante la expresión inducible de un siRNA, produce una alteración notable en el fenotipo de las plántulas en las que se observa una disminución del tamaño de la parte aérea y de la longitud de la raíz primaria. Los cotiledones presentan clorosis y adoptan forma de punta de flecha, con los bordes curvados hacia el interior de la cara abaxial. Las células epidérmicas de las hojas de las plántulas muestran una morfología alterada (Figura 8) y, además, los niveles de esteroides están reducidos, especialmente los del β -sitosterol, y algunas BECLs se ven incrementadas (Keim, 2012).

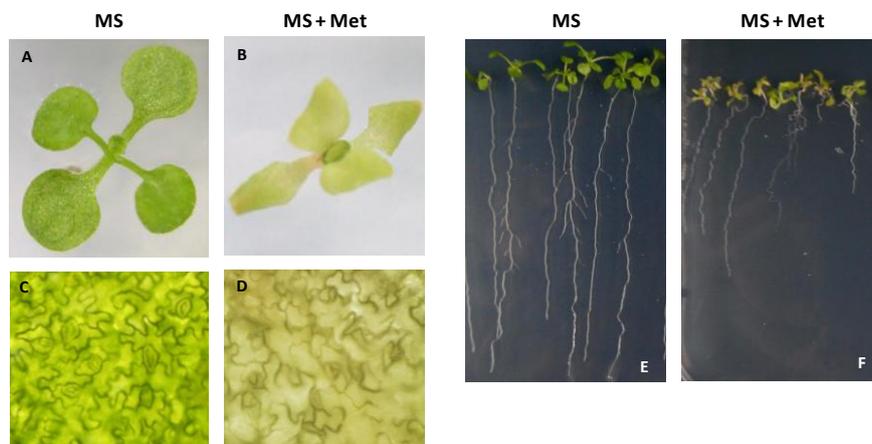


Figura 8. Análisis del fenotipo causado por el silenciamiento de los genes *ARV* de *Arabidopsis*. Los mutantes se hicieron crecer en medio MS (control) o MS suplementado con metoxyfenocida (MS + Met), compuesto que induce la expresión del siRNA provocando el silenciamiento de los genes *ARV*. Se muestran las imágenes de plántulas de 12 días de edad (A y B) y de las células de la cara abaxial de hojas de dichas plántulas (C y D), y la comparación de la longitud de la raíz primaria de plántulas de 15 días de edad (E y F). Imágenes modificadas de Keim, 2012.

En este mismo estudio, se puso de manifiesto que los niveles de expresión de los genes *BiP* y *PDI6*, que codifican proteínas que participan en procesos de respuesta a estrés de RE, no se ven alterados cuando se silencia la expresión de los genes *ARV*.

Por otra parte, tampoco se observaron alteraciones en los niveles de expresión de *ARV1* en plántulas Col0 tratadas con inductores de estrés de RE, como la tunicamicina y el ditiotreitól (Keim, 2012). Estos resultados parecen indicar que en *Arabidopsis* no existe una relación entre el proceso de UPR y los genes *ARV*, al contrario de lo que se había observado en levadura.

PARTE II

1. Factores de transcripción en plantas

Para el crecimiento y la adaptación al medio, las células dependen totalmente de los cambios en la expresión génica que son muy variados a nivel cualitativo y cuantitativo. Esto queda reflejado en el número de factores de transcripción que han evolucionado para modular la expresión génica a través de la interacción proteína-DNA, y en la complejidad de los mecanismos que controlan la actividad de estas proteínas. El gen de maíz *ZmC1* (*COLORED1*), que regula la pigmentación de antocianinas, fue el primer factor de transcripción y el primer gen *MYB* de plantas en ser clonado (Paz-ares et al., 1987). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica alrededor de 2000 factores de transcripción putativos, lo que representa aproximadamente entre 5-10% del número total de genes (~27000), que según las diferentes bases de datos, se clasifican en 50-70 familias diferentes (Figura 9) (Mitsuda and Ohme-Takagi, 2009).

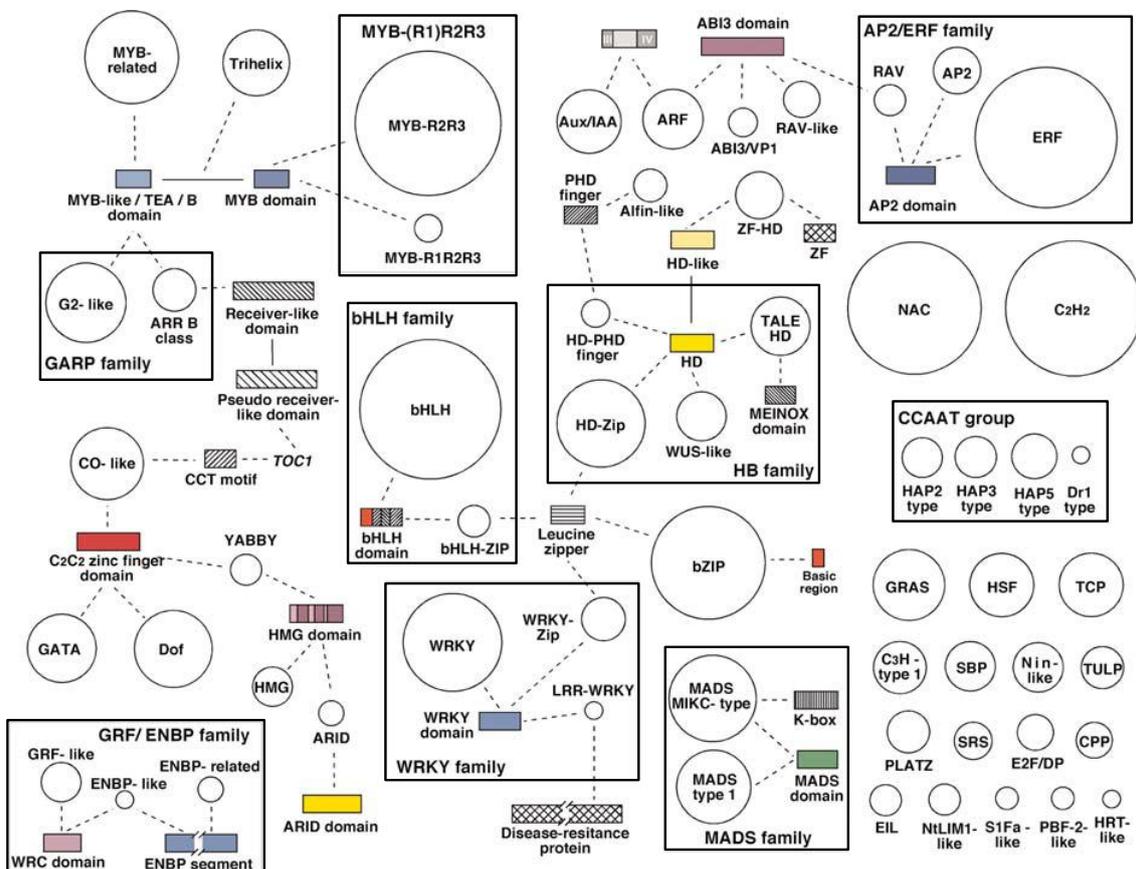


Figura 9. Relación entre las diferentes familias de factores de transcripción de *Arabidopsis*. Las familias de genes se representan por círculos, cuyo tamaño es proporcional al número de miembros en la familia. Los dominios que conectan diferentes grupos de factores de transcripción se indican con rectángulos, cuyo tamaño es proporcional a la longitud del dominio. Los dominios de unión a DNA están coloreados, mientras que otros dominios, normalmente dominios de unión proteína-proteína, se muestran rayados. Los dominios que son característicos de una familia o subfamilia quedan conectados por una línea discontinua. Los nombres de los genes se escriben en cursiva. Figura obtenida de Riechmann, 2002.

En *Arabidopsis*, los factores de transcripción específicos de plantas representan en torno al 45% del total, mientras que los restantes están presentes también en el reino animal y/o de los hongos (Riechmann, 2002). Las familias de factores de transcripción más numerosas en *Arabidopsis* son AP2-ERF (*APETALA 2 / Ethylene Responsive Factor*), bHLH (*basic-region hélix-loop-hélix*), MYB (*myeloblastosis*) y C2H2, que representan cada una de ellas entre 5-10% del total de factores de transcripción (Riechmann, 2002; Mitsuda and Ohme-Takagi, 2009).

En concreto, las familias de genes MYB y bHLH están ampliamente extendidas en plantas superiores. Así, en *Arabidopsis* se cree que hay unos 339 y 162 genes MYB y bHLH, respectivamente, y en arroz aproximadamente unos 230 y 11, respectivamente. En contraste, el genoma del género de las algas verdes *Chlamydomonas* solo contiene 38 genes MYB y 8 genes bHLH (Feller et al., 2011).

2. Factores de transcripción anclados a membrana

Durante los mecanismos de señalización que regulan el crecimiento y la supervivencia de la planta en determinadas condiciones, la actividad de los factores de transcripción se regula coordinadamente en múltiples puntos, desde transcripcional hasta post-traduccionalmente (Shinozaki et al., 2003; Vazquez, 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Xu et al., 2007; Seo et al., 2011). Muchos de los factores de transcripción requieren modificaciones post-traduccionales para pasar a ser transcripcionalmente activos (Kaffman and O'Shea, 1999; Neumann and Naumann, 2007; Kim et al., 2010; Dubos et al., 2010). En los últimos años, se ha establecido la rotura proteolítica de factores de transcripción como una nueva forma de regulación post-traducciona de la actividad de los factores de transcripción (Hoppe et al., 2001; Chen et al., 2008; Kim et al., 2010). Concretamente, los factores de transcripción que están inicialmente anclados a alguna de las membranas intracelulares (MTFFs, *membrane-tethered transcription factor*) quedan retenidos en

ellas y, por lo tanto, se les impide físicamente la entrada al núcleo (Hoppe et al., 2001; Chen et al., 2008; Seo et al., 2008). De esta forma, los MTFs permanecen inactivos hasta que su procesamiento proteolítico libera el dominio con actividad transcripcional al citosol, que posteriormente se transloca al interior del núcleo (Hoppe et al., 2001). Este proceso de regulación de la expresión génica permite una respuesta rápida frente a un estímulo medioambiental, como el estrés abiótico o biótico, o en el comienzo de una fase de desarrollo específica (Hoppe et al., 2001; Chen et al., 2008; Seo et al., 2008).

En eucariotas, el procesamiento proteolítico que resulta en la activación de los MTFs tiene lugar por una de las dos vías siguientes (Figura 10), RIP (reglulated intramembrane proteolysis) o RUP (regulated ubiquitin/proteasome processing) (Brown et al., 2000; Hoppe et al., 2001). El procesamiento tipo RIP supone la rotura, por acción de proteasas, en el interior del dominio transmembrana (DTM) del MTF, lo que provoca la liberación del dominio con actividad transcripcional al citosol (Brown et al., 2000; Hoppe et al., 2001; Selkoe and Kopan, 2003; Sannerud and Annaert, 2009). Por el contrario, el procesamiento tipo RUP emplea el proteosoma 26S, lo que resulta en la degradación parcial del MTF marcado previamente con ubiquitinas, dejando el dominio de factor de transcripción intacto y liberándolo en el citosol (Hoppe et al., 2001; Rape and Jentsch, 2004). Ambos mecanismos de activación de los MTFs se han descrito también en plantas, incluyendo arroz, soja y maíz, como una de las formas para modular la actividad de los factores de transcripción (Kim et al., 2010; Le et al., 2011).

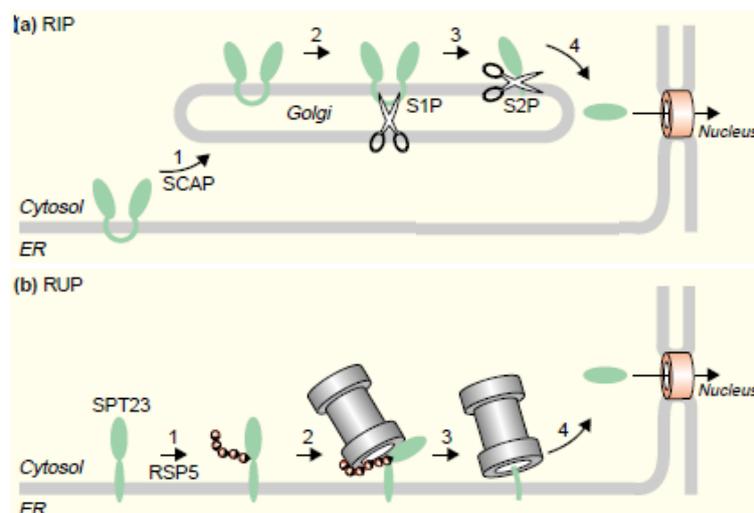


Figura 10. Ejemplos de activación de MTTFs mediante procesamiento proteolítico por las vías RIP y RUP. A) En mamíferos, el precursor inactivo SREBP se localiza en la membrana del RE con los extremos N- y C-terminal orientados hacia el citosol. La interacción de SREBP y SCAP provoca su transporte al aparato de Golgi (1), donde SREBP sufre una primera rotura proteolítica por la proteasa S1P en el bucle luminal (2), y posteriormente, una segunda rotura por la proteasa S2P en el interior del DTM (3), lo que libera el dominio con actividad de factor de transcripción en el citosol permitiendo que pueda dirigirse al interior del núcleo (4). **B)** En levadura, el precursor inactivo SPT23 se localiza en la membrana del RE a través de un DTM, quedando el extremo N-terminal orientado hacia el citosol. SPT23 interacciona con RSP5, una ligasa que une ubiquitinas (1), marcando la proteína para su procesamiento a través del proteosoma 26S (2), que degrada el extremo C-terminal (3) y libera el dominio con actividad de factor de transcripción en el citosol permitiendo que pueda migrar al núcleo (4). Figura adaptada de Hoppe et al., 2001.

En mamíferos, uno de los MTTFs mejor caracterizados es SREBP (Figura 10A), que se localiza en el RE, posee dos DTMs que orientan los extremos N- y C-terminal hacia el citosol y contiene un dominio de factor de transcripción tipo bZIP en el extremo N-terminal (Edwards et al., 2000; Hoppe et al., 2001). Cuando los niveles celulares de esteroides son bajos, la proteína SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) lleva a cabo el transporte de SREBP desde el RE al aparato de Golgi, donde se procesa proteolíticamente en dos pasos, primero por la subtilisin proteasa S1P (*site-1 protease*) en el bucle hidrofílico que se encuentra en el lumen del RE, y posteriormente, por la metaloproteasa S2P (*site-2 protease*) en el interior del primer DTM, liberando el dominio de factor de transcripción en el citosol (Edwards et al., 2000).

En Arabidopsis, inicialmente se identificaron 16 MTTFs (Kim et al., 2007; Seo et al., 2008), 3 pertenecientes a la familia bZIP (*basic leucine zipper domain*) y 13 a la familia NAC [*NAM (no apical meristem)*, *ATAF (Arabidopsis transcription activation factor)*, *CUC (cup-shaped cotyledon)*]. Sin embargo, estudios bioinformáticos posteriores han identificado 69 nuevos MTTFs (Figura 11), lo que resulta en un total de 85 posibles MTTFs en el genoma de Arabidopsis (Kim et al., 2010). El descubrimiento de una nueva familia de MTTFs (Bateman et al., 2009) hace que el número de MTTFs en Arabidopsis pueda llegar hasta 100 (Seo, 2014), lo que equivaldrían a un 5% del total de factores de transcripción de Arabidopsis, siendo la familia NAC la que presenta mayor número de factores de transcripción asociados a membrana. Por otra parte, el análisis del genoma de arroz ha permitido identificar al menos 45 posibles MTTFs, lo que equivaldría a un 2% del total de factores de transcripción (Kim et al., 2010).

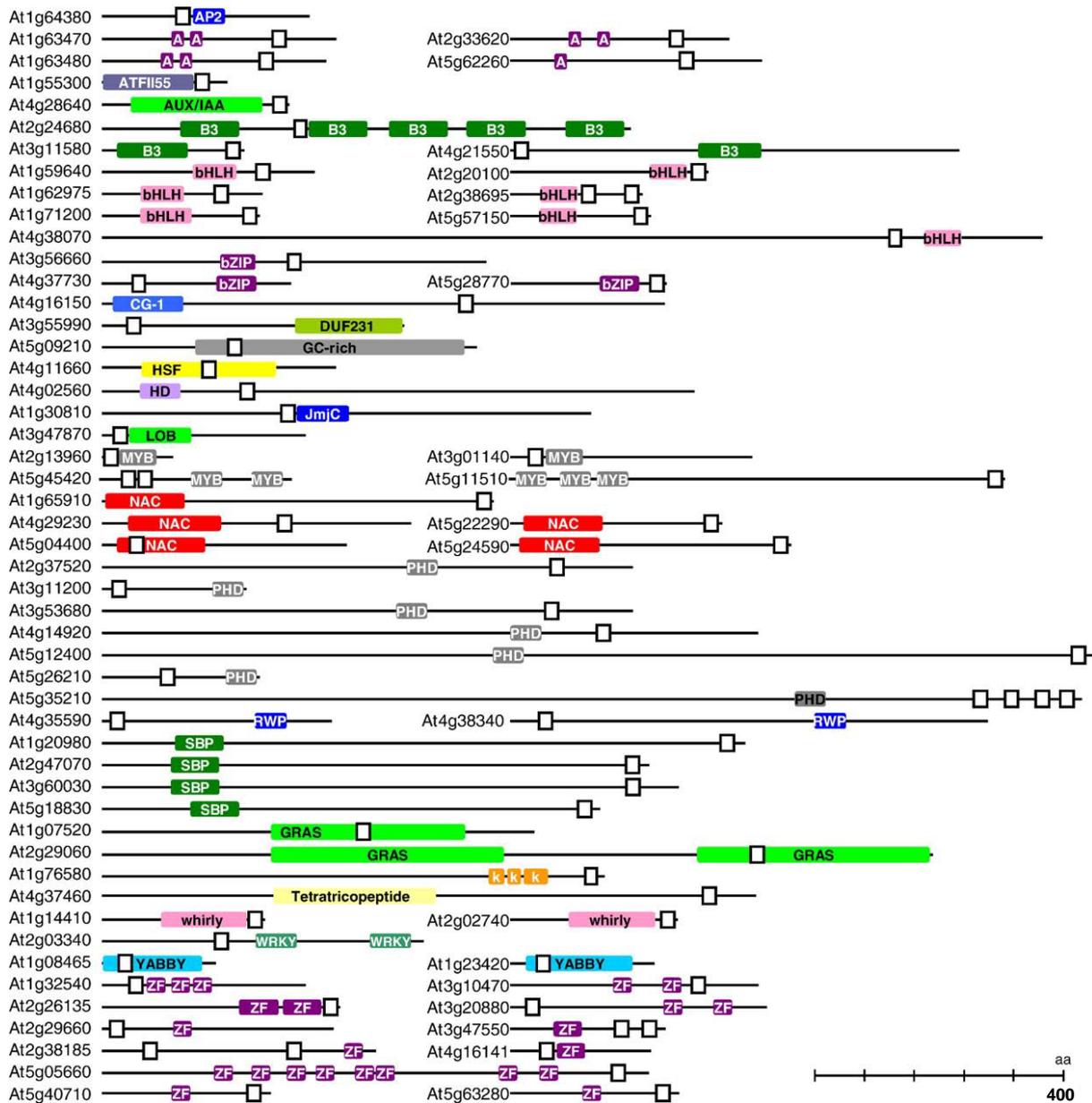


Figura 11. Estructuras de los 69 nuevos MTFs identificados. Los dominios transmembrana se muestran como cajas blancas y los distintos tipos de dominios proteicos como cajas en color. El nombre de la familia a la que pertenece el dominio de proteína se indica dentro de la caja. AP2, APETALA2; A, AT HOOK; TAFII 55, TBP associated factor II 55; bHLH, basic helix-loop-helix; bZIP, basic leucine zipper motif; HSF, heatshock protein; HD, homeodomain; JmjC, JUMONJI C domain; LOB, lateral organ boundaries; NAC, NAM/ATAF1/2/CUC2; PHD, plant homeodomain; RWP, RWP-RK; SBP, squamosa promoter-binding protein; GRAS, GAI/RGA/SCR; k, ankyrin; ZF, zinc finger. La escala indica el número de aminoácidos de las proteínas. Figura adaptada de Kim et al., 2010.

El tamaño de las 85 proteínas identificadas como MTFs varía desde 115 hasta 1595 aminoácidos, y todas poseen entre uno y dos dominios transmembrana, excepto una que posee cuatro (Figura 11). El 20% de los MTFs tienen los DTMs en

la región N-terminal, el 72% en la región C-terminal y solo el 8% en la región central (Kim et al., 2010). Aunque gran parte de los MTTFs son proteínas de membrana con un solo DTM y el extremo N-terminal orientado hacia el citosol (proteínas de membrana tipo II), la diversidad en la topología de los MTTFs indica que los mecanismos de activación de los MTTFs podrían ser muy variables (Seo et al., 2008; Kim et al., 2010). Hasta la fecha, 13 de los 85 MTTFs identificados se han caracterizado como MTTFs canónicos (Tabla 1): 3 pertenecientes a la familia bZIP (Chen et al., 2008; Seo et al., 2008), 9 a la familia NAC y 1 a la familia PHD (*plant homeodomein*) (Ng et al., 2013; Seo, 2014). De momento se ha visto que 6 de los MTTFs caracterizados son procesados por la vía RIP y uno por *splicing* alternativo. Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún MTTF en *Arabidopsis* que sea activado por la vía RUP, a pesar de que las plantas utilizan esta forma de regulación proteica en procesos específicos de planta, como la ruta de señalización por hormona y la adaptación a estreses bióticos y abióticos (Smalle and Vierstra, 2004).

Tabla 1. Factores de transcripción anclados a membrana (MTTFs) caracterizados hasta la fecha en *Arabidopsis* (Ng, 2013; Seo, 2014)

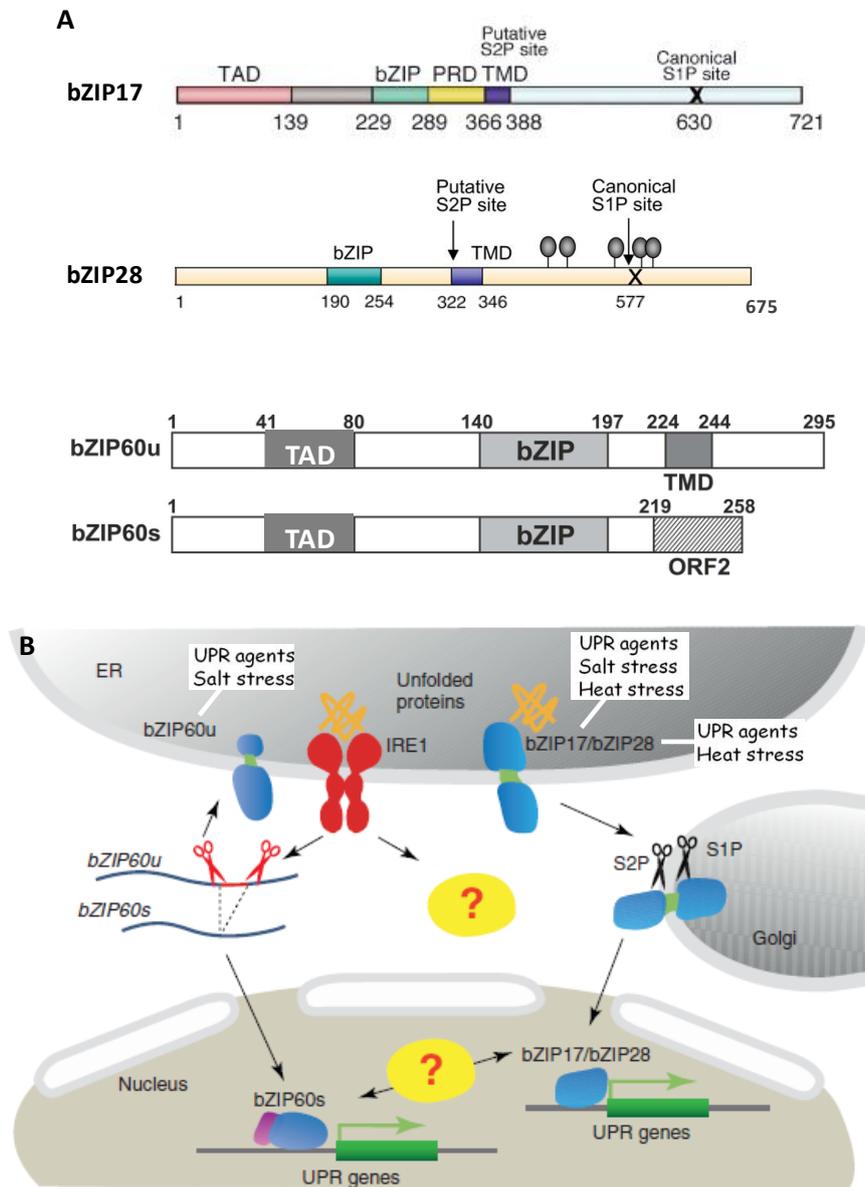
Gen	AGI	Familia	DTM	Membrana intracelular	Procesamiento	Genes diana	Respuesta / Función
<i>NTM1</i>	At4g01540	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	membrana nuclear / RE	Proteasa calpaína	<i>CDK, KRPs</i>	Señalización por citoquininas, ciclo y división celular
<i>NTM2</i>	At4g01550	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	Membrana plasmática		<i>IAA30</i>	Germinación en condiciones de alta salinidad, señalización por auxinas
<i>ANAC13</i>	At1g32870	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)				Respuesta a luz UV
<i>NTL4</i>	At3g10500	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	Membrana plasmática		<i>Atrboh</i>	Proceso de muerte celular programada (PCD) mediado por ROS en estrés por sequía y calor
<i>NTL6</i>	At3g49530	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	Membrana plasmática	Metaloproteasa / quinasa SnRK2.8	<i>COR15α, PRs</i>	Respuesta a patógenos inducida por frío, señalización por ABA
<i>NTL8</i>	At2g27300	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	Membrana plasmática	Metaloproteasa?	<i>FT</i>	Germinación, transición a floración
<i>NTL9</i>	At4g35580	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	Membrana plasmática		<i>SAGs</i>	Regulación osmótica en senescencia de hojas
<i>ANAC089</i>	At5g22290	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	trans-Golgi y RE		<i>sAPX</i>	Señalización por azúcares, señalización por ROS, transición a floración
<i>ANAC017</i>	At1g34190	NAC (N-terminal)	1 (C-terminal)	RE y actina	Proteasa romboide	<i>AOX1a</i>	Respuesta a estrés oxidativo, señalización retrógrada de la mitocondria
<i>bZIP17</i>	At2g40950	bZIP	1	RE	S1P / S2P	<i>ATHB-7</i>	UPR, respuesta a estrés salino, señalización por brasinosteroides
<i>bZIP28</i>	At3g10800	bZIP	1	RE	S1P / S2P	<i>BiPs, PDIL, CRT1</i>	UPR, respuesta a estrés por calor, señalización por brasinosteroides
<i>bZIP60</i>	At1g42990	bZIP	1	RE	IRE1 (<i>splicing</i> alternativo)	<i>BiPs, CNXs</i>	UPR, respuesta a estrés salino
<i>PTM</i>	At5g35210	PHD	4 (C-terminal)	Cloroplasto		<i>ABI4</i>	Señalización retrógrada del cloroplasto, desarrollo y mantenimiento del cloroplasto

Los tres MTFs de *Arabidopsis* pertenecientes a la familia bZIP, son los mejor caracterizados hasta la fecha y comparten funciones biológicas como reguladores de la UPR (*unfolded protein response*), si bien cada uno percibe estímulos medioambientales diferentes (Seo, 2014). El MTF bZIP28 es el responsable de la respuesta a la presencia de proteínas defectuosas provocada por estrés a calor (Gao et al., 2008), mientras que bZIP17 lo es por salinidad y calor (Liu et al., 2007b; Tajima et al., 2008), y ambos activan la señalización por brasinoesteroides en respuesta a varios estreses medioambientales (Che et al., 2010). Por otra parte, bZIP60 responde al estrés salino (Fujita et al., 2007). Todas estas observaciones implican que las respuestas a estrés de RE y medioambiental han evolucionado como sistemas regulados conjuntamente, siendo los MTFs de la familia bZIP los principales protagonistas de estas redes de señalización (Liu and Howell, 2010).

Los MTFs de la familia bZIP caracterizados poseen un DTM con el extremo C-terminal orientado hacia el lumen del RE y el extremo N-terminal, que contiene el dominio de factor de transcripción tipo bZIP, orientado hacia el citosol (Liu et al., 2007a, 2007b; Iwata and Koizumi, 2005) (Figura 12A). La proteasa AtS1P, el homólogo de la S1P de humanos mencionada anteriormente, está involucrada en el procesamiento proteolítico de bZIP17 y bZIP28, que presentan la secuencia consenso de reconocimiento canónico de S1P (RXXL o RXLX) en el extremo orientado hacia el lumen (Liu et al., 2007a, 2007b) (Figura 12B). En este sentido, también se ha visto que la rotura proteolítica de AtbZIP17 no se produce en los mutantes *ats1p* (Liu et al., 2007b).

Figura 12. Caracterización de los MTFs de la familia bZIP: bZIP17, bZIP28 y bZIP60. A) Esquema de cada una de las tres proteínas donde se muestra la localización del dominio bZIP de unión a DNA, dominio transmembrana (TMD), dominio de activación transcripcional (TAD), dominio rico en prolina (PRD), sitio canónico de corte de S1P, sitio putativo de corte de S2P y predicción de sitios de N-glicosilación (óvalos grises). bZIP60u (*unspliced* bZIP60) representa la proteína original y bZIP60s (*spliced* bZIP60) la proteína resultante del *splicing* alternativo de su mRNA, que contiene un nuevo marco de lectura en el extremo C-terminal (ORF2) perdiendo el TMD. También se indican las posiciones de los aminoácidos que limitan los diferentes dominios o sitios de corte. **B)** Modelo de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en planta. La proteína bZIP60u, traducida por el mRNA *bZIP60u*, queda retenida en la membrana del RE. Cuando la proteína IRE1 detecta proteínas mal plegadas en el lumen del RE, cataliza el *splicing* alternativo en el citosol del mRNA *bZIP60u*, resultando en la proteína bZIP60s, traducida por el mRNA *bZIP60s*, que es capaz de trasladarse al núcleo. Las proteínas bZIP17 y bZIP28 ancladas al RE, en condiciones de estrés de RE se transportan al aparato de Golgi, donde son procesadas secuencialmente por las proteasas S1P y S2P. La región citoplasmática

N-terminal de ambas proteínas queda libre para trasladarse al interior del núcleo. Aún no se han elucidado las posibles funciones alternativas de IRE1 y la posible acción coordinada entre los tres MTFs descritos en la inducción de genes de respuesta a UPR (indicado por ?). Las tijeras rojas representan actividad nucleasa y las negras actividad proteasa. Abreviaciones: bZIP, *basic leucine zipper*; IRE1, *inositol-requiring enzyme 1*; S1P, *site-1 protease*; S2P, *site-2 protease*. Figura modificada de Liu et al., 2007a, 2007b; Nagashima et al., 2011; Iwata and Koizumi, 2012.



Por otra parte, en *Arabidopsis* también se ha identificado la proteasa AtS2P, el homólogo de la S2P de humanos (Kinch et al., 2006). En los últimos años se han encontrado evidencias que demuestran la participación de AtS2P en el procesamiento de bZIP17 y bZIP28 (Che et al., 2010; Liu and Howell, 2010; Srivastava et al., 2013) (Figura 12B). Sin embargo, todavía no se ha conseguido identificar una secuencia

consenso de reconocimiento y corte para S2P (Chen and Zhang, 2010). Sin embargo, la caracterización de substratos de S2P en otros organismos ha revelado que dicho sitio de reconocimiento se encuentra normalmente en el lado citosólico del DTM y requiere, en sus proximidades, la presencia en el interior del DTM de aminoácidos poco propensos a formar hélice alfa, lo que provoca la perturbación de dicha estructura (Chen and Zhang, 2010), probablemente para permitir que la proteasa tenga acceso al sustrato en el ambiente hidrofóbico del DTM (Ye et al., 2000b). En concreto, la proteína SREBP-2 contiene una secuencia asparagina-prolina (NP) en medio del primer DTM, que es necesaria para el correcto procesamiento por S2P, además de la propia diana de reconocimiento leucina-cisteína (LC) por donde tiene lugar la rotura proteolítica (Ye et al., 2000a) (Figura 13). Recientemente, se ha visto que es necesaria la presencia de una glicina en el DTM de bZIP28 para inducir un cambio conformacional que permita el acceso de AtS2P (Srivastava et al., 2012).

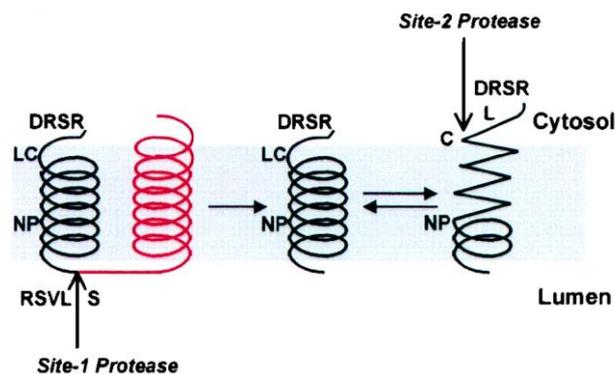


Figura 13. Modelo propuesto del efecto de los aminoácidos NP en la conformación del primer dominio transmembrana (DTM) de SREBP-2. Se muestra el primer DTM en negro y el segundo en rojo. Se indica la secuencia NP, el sitio de corte S1P (RSVL↑S), el sitio de corte S2P (L↓C), y la secuencia DRSR que se encuentra inmediatamente adyacente al primer DTM. Después de la primera rotura por S1P, el primer DTM se separa del segundo DTM, lo que permite que el extremo N-terminal de la hélice alfa de dicho DTM se relaje para formar una estructura más laxa. De esta forma, la secuencia LC queda expuesta al citosol. La secuencia NP permite el cambio conformacional de la hélice alfa en su extremo N-terminal manteniendo la estructura en su extremo C-terminal. Figura adaptada de Ye et al., 2000a.

En el caso de bZIP60, se ha visto que su procesamiento es independiente de S1P y S2P, al contrario que los otros dos MTFs de la familia bZIP (Iwata et al., 2008). La proteína IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) es un sensor del estrés de RE, que media el inusual *splicing* alternativo en el citosol, y está involucrada en la respuesta a UPR en levadura y animales (Ron and Walter, 2007). Recientemente, se ha visto que

un homólogo de IRE1 en Arabidopsis es el responsable del *splicing* alternativo del mRNA de bZIP60 removiendo 23 nucleótidos de un intrón, lo que produce una versión activa del factor de transcripción (Nagashima et al., 2011; Iwata and Koizumi, 2012) (Figura 12). De esta forma, mientras la proteólisis vía RIP de los MTTFs garantiza una respuesta rápida a estímulos externos, la activación asistida por *splicing* alternativo estaría involucrada en respuestas más tardías a estímulos internos y externos, ya que tras el procesamiento del mRNA éste debe traducirse (Nagashima et al., 2011; Iwata and Koizumi, 2012).

Los MTTFs de la familia NAC están involucrados principalmente en procesos relacionados con crecimiento y desarrollo, tales como división celular y floración, así como también en estrés abiótico (Chen et al., 2008; Seo et al., 2008; Li et al., 2010). En el genoma de soja y arroz se han identificado 152 y 110 genes de la familia NAC, de los que 11 y 5 resultan ser MTTFs, respectivamente (Seo et al., 2008; Le et al., 2011). En Arabidopsis, la mayoría de los MTTFs de la familia NAC se localizan en la membrana plasmática, a excepción de NTM1 que se localiza en el RE/membrana nuclear (Seo, 2014). Hasta la fecha, se han identificado tres tipos de proteasas que podrían estar involucradas en la activación de NTM1, NLT6 y ANAC017. En concreto, se cree que NTM1 sería procesada por una proteasa de tipo calpaína (Kim et al., 2006), NTL6 por una metaloproteasa (Seo et al., 2010) y ANAC017 por una proteasa romboide (Ng et al., 2013), lo que indica que los mecanismos de activación de los MTTFs por la vía RIP pueden llegar a ser muy diferentes dentro de la misma familia y entre familias de MTTFs. Hasta el momento de iniciar este trabajo, no se conocía la existencia de un MTTF en la familia de factores de transcripción MYB.

3. Factores de transcripción de la familia MYB en planta

La familia de proteínas MYB se encuentra presente en todos los eucariotas, aunque en comparación con los animales, ésta es enormemente extensa y funcionalmente diversa en plantas (Prouse and Campbell, 2012). La mayoría de las proteínas MYB actúan como factores de transcripción gracias a la presencia de un número variable de repeticiones de tipo MYB altamente conservadas, que les confieren la capacidad de unirse a DNA. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos presentes fuera del dominio MYB son altamente divergentes. Los dominios MYB pueden llegar a estar formados hasta por cuatro de estos tipos de secuencias (Figura 14), que consisten en repeticiones imperfectas de 50-53 aminoácidos que forman tres

hélices alfa y contienen tres triptófanos o algún otro aminoácido hidrofóbico (fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina o prolina) espaciados de forma regular, de manera que forman un núcleo hidrofóbico en la estructura tridimensional de tipo hélice-giro-hélice (HTH, *hélice-turn-helix*), compuesta por la segunda y tercera hélice de cada repetición (Ogata et al., 1996). La tercera hélice interacciona directamente con el DNA intercalándose en el surco mayor (Prouse and Campbell, 2012). Para ello, dos repeticiones tipo MYB se empaquetan de forma que las dos terceras hélices conjuntamente reconocen e interaccionan con una secuencia específica de DNA.

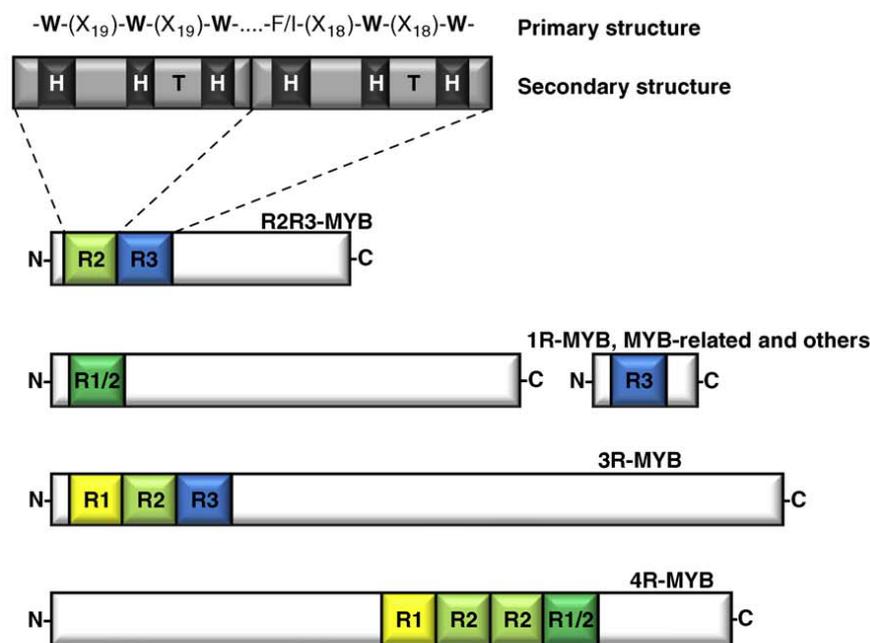


Figura 14. Esquemas representativos de las distintas clases de factores de transcripción de la familia MYB en plantas. Según el número de repeticiones adyacentes de tipo MYB (R) las proteínas MYB se clasifican en cuatro subfamilias: R2R3-MYB, 1R-MYB/MYB-related/otros, 3R-MYB y 4R-MYB. También se muestra la estructura primaria y secundaria de un dominio R2R3-MYB representativo. Abreviaciones: H, hélice; T, giro; W, triptófano; X, aminoácido cualquiera. Figura obtenida de Dubos et al., 2010.

La proteína oncogénica c-MYB de vertebrados, que fue uno de los primeros factores de transcripción de la familia MYB en caracterizarse, contiene tres repeticiones denominadas R1, R2 y R3 (Gonda, 1998). A las repeticiones presentes en otras proteínas MYB de eucariotas se les asigna el mismo nombre según la similitud con las repeticiones prototipo de c-MYB. De esta forma, dependiendo del número y tipo de repeticiones adyacentes, las proteínas MYB se pueden dividir en cuatro subfamilias diferentes: 1R-, 2R-, 3R- y 4R-MYB (Dubos et al., 2010) (Figura 14).

En plantas, donde existen miembros de las cuatro subfamilias, la familia MYB es mucho más numerosa comparada con otros organismos eucariotas, especialmente la subfamilia 2R-MYB (R2R3-MYB), lo que lleva a pensar que los miembros de dicha subfamilia cumplen funciones en procesos específicos de plantas (Jiang et al., 2004; Shiu et al., 2005). La subfamilia 4R-MYB (R1R2R2R1/2-MYB) está formada hasta la fecha por una única proteína codificada en varios genomas de plantas (Ambawat et al., 2013). La subfamilia 3R-MYB (R1R2R3-MYB), que es la mayoritaria en animales, contiene hasta cinco miembros en plantas vasculares, que se han encontrado también en la mayoría de los eucariotas, por lo que representan una subfamilia conservada a lo largo de la evolución y cuyos miembros funciones principalmente relacionadas con el control del ciclo celular (Haga et al., 2007; Ito, 2005). La subfamilia 1R-MYB (R1/2-MYB o R3-MYB) normalmente también se agrupa con otras proteínas que contienen uno o dos dominios MYB-*like* localizados en medio, en N- o en C-terminal de la proteína (subfamilia MYB-*related* y otros), por lo que conjuntamente es el grupo que presenta la mayor heterogeneidad de estructura, dando lugar a varias subclases (Dubos et al., 2010; Du et al., 2013), y presenta mayor variabilidad funcional, llegando incluso alguno de ellos a participar también como proteínas de unión a telómeros (Du et al., 2013).

En *Arabidopsis*, alrededor de 150 proteínas MYB pertenecen a la subfamilia R2R3-MYB, que contienen dos repeticiones imperfectas de tipo MYB (R2R3). Los miembros de esta familia se cree que podrían haber evolucionado de un ancestro tipo R1R2R3, el cual habría perdido la primera repetición (Braun and Grotewold, 1999), dando lugar a una mayor expansión de esta subfamilia en plantas. Los factores de transcripción R2R3-MYB contienen típicamente el dominio MYB en la región N-terminal (Dubos et al., 2010). En contraste con el dominio MYB que está altamente conservado, las otras regiones de las proteínas R2R3-MYB son altamente variables (Dubos et al., 2010), y frecuentemente contienen dominios de activación o represión transcripcional y residuos conservados de serina y treonina que corresponden a sitios de modificación post-traducciona (Feller et al., 2011). Las proteínas R2R3-MYB son factores clave en mecanismos de regulación implicados en metabolismo primario y secundario (biosíntesis de flavonoides, fenilpropanoides, componentes de la pared celular, glucosinolatos), diferenciación celular (determinación del tipo celular de la epidermis en diferentes tejidos, iniciación o ramificación de tricomas y pelos radiculares, inflorescencia, germinación), desarrollo (elongación de hipocotilo, embriogénesis, formación de meristemas, polen, estambres, hojas, raíz primaria y lateral) y respuestas a estrés biótico y abiótico (muerte celular en respuesta a

patógeno, apertura o cierre de estomas, señalización por ABA, resistencia a patógenos, insectos y herida) (Dubos et al., 2010).

Las funciones de los factores de transcripción de la familia MYB se ha visto que pueden estar reguladas post-transcripcionalmente a través de microRNAs, mediante modificaciones post-traduccionales o por interacción con otras proteínas, modulando la actividad de factor de transcripción (Dubos et al., 2010; Katiyar et al., 2012).

OBJETIVOS

Los esteroides son compuestos de naturaleza isoprenoide imprescindibles para las plantas, en las que actúan como reguladores del crecimiento y del desarrollo, y como componentes estructurales esenciales para el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas celulares. En ellas interactúan con esfingolípidos, contribuyendo a modular su fluidez, lo que a su vez regula la actividad de los distintos tipos de proteínas de membrana. Los esfingolípidos, a su vez, también pueden actuar como mensajeros secundarios. Durante los últimos años, se han acumulado evidencias sobre la regulación coordinada del metabolismo de esteroides y esfingolípidos, proceso en el cual las proteínas Arv parecen desempeñar un papel importante según se desprende de los estudios realizados en levaduras y mamíferos. Al iniciar este trabajo, nuestro grupo ya había identificado y comenzado a caracterizar los genes *AtARV1* y *AtARV2* de *Arabidopsis*, que codifican dos proteínas funcionales, AtArv1 y AtArv2, respectivamente, ancladas a la membrana del RE, que están potencialmente involucradas en el mantenimiento de la homeostasis lipídica intracelular. Dado que la gran mayoría de procesos biológicos son llevados a cabo por complejas asociaciones de proteínas, y partiendo de la hipótesis de que las proteínas AtArv interactúan con otras proteínas para poder ejercer su función biológica, se planteó este proyecto de tesis encaminado a identificar y caracterizar proteínas capaces de interactuar con Arv, con el objetivo general de comprender mejor la función biológica de estas proteínas. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un cribado de un banco de cDNA de *Arabidopsis* mediante la técnica de doble híbrido en levadura (MbYTH) para identificar proteínas solubles o de membrana capaces de establecer *in vivo* interacciones con la proteína AtArv1.
2. Caracterizar estructural y funcionalmente la/s proteína/s, y su/s correspondiente/s gene/s, cuya interacción con AtArv1 se considere biológicamente relevante.

RESULTADOS

PARTE I: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *A. thaliana* CAPACES DE INTERACCIONAR CON LA PROTEÍNA AtARV1

Hasta la fecha, en plantas solo se han caracterizado dos genes *ARV* y las correspondientes proteínas; concretamente los genes de *A. thaliana* que codifican AtArv1 y AtArv2 (Forés et al., 2006; Keim, 2012). Como parte de esta línea de investigación desarrollada por nuestro grupo y punto de partida de esta tesis, se inició un estudio basado en la técnica de doble híbrido en levadura para identificar proteínas de *Arabidopsis* que interaccionasen con AtArv1.

Teniendo en cuenta que AtArv1 es una proteína integral de membrana del retículo endoplasmático (RE) (Forés et al., 2006), fue necesario utilizar la variante de la técnica del doble híbrido en levadura *split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid* (MbYTH) (Stagljar et al., 1998; Fetchko and Stagljar, 2004), que permite identificar proteínas soluble o de membrana que interaccionan con proteínas de membrana (materiales y métodos, apartado 5).

1. Análisis de la topología de las proteínas de estudio y puesta a punto de las condiciones experimentales

En un cribado a gran escala para identificar interacciones entre proteínas de membrana en levadura, se encontró que la proteína Arv1 de *S. cerevisiae* (ScArv1) interaccionaba con Erg11, una lanosterol C-14 demetilasa implicada en la síntesis de ergosterol (Miller et al., 2005) (Introducción parte I, apartado 4.1). Dado que CYP51 es el ortólogo de Erg11 en *Arabidopsis* (Kushiro et al., 2001; Kim et al., 2005), se consideró que era un buen candidato potencial a interaccionar con AtArv1. A partir de estos antecedentes, las proteínas de levadura ScArv1 y Erg11 se escogieron como control del funcionamiento de la técnica de doble híbrido para proteínas de membrana y, en paralelo, se analizó la posible interacción de AtArv1 y CYP51. Las cuatro proteínas son proteínas integrales de la membrana del RE.

En primer lugar, las secuencias de cDNA que codifican para las cuatro proteínas se clonaron en los plásmidos pBT3N y pBT3C que permiten expresar en levadura el dominio Cub-FT fusionado a N- y C-terminal de las proteínas cebo (FT-Cub-Proteína y Proteína-Cub-FT), respectivamente. Para la expresión de AtArv1-Cub-FT se empleó el plásmido pBT3STE, que contiene una secuencia líder (*STE2*) justo después del promotor que potencia la expresión de la construcción en levadura. Para

expresar el dominio NubG fusionado a N- y C-terminal de las proteínas presa (NubG-Proteína y Proteína-NubG) se emplearon los plásmidos pPR3N y pPR3C, respectivamente.

Análisis de la topología de las proteínas estudiadas			
Crecimiento (extremo citosólico)	Alg5-Nubl	NubG	[3-AT] óptima (mM)
FT-Cub-ScArv1	+	-	1
ScArv1-Cub-FT	+	-	1
FT-Cub-Erg11	+	-	1
Erg11-Cub-FT	+	-	1
FT-Cub-AtArv1	+	-	4
AtArv1-Cub-FT	+	-	4
FT-Cub-CYP51	+	-	2
CYP51-Cub-FT	+	-	2

Figura 15. Análisis de la topología de las proteínas cebo ScArv1, AtArv1, Erg11 y CYP51 en la membrana del RE. Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de crecimiento en medio mínimo sin adenina ni histidina de las cepas de levadura NMY51 que coexpresaban las diferentes proteínas cebo fusionadas por su extremo N- y C-terminal al dominio Cub-FT y las proteínas Alg5-Nubl o NubG. En la columna de la derecha se indica la concentración de 3-AT con la que se suplementó el medio de cultivo en cada caso para evitar la aparición de falsos positivos.

A continuación, se analizó la orientación de los extremos de las proteínas de estudio y la concentración óptima de 3-AT necesaria para cada una de las proteínas cebo (materiales y métodos, apartado 5.3). Para ello, los plásmidos para expresar las proteínas cebo FT-Cub-Proteína y Proteína-Cub-FT se transformaron en la cepa NMY51, y las cepas resultantes se transformaron de nuevo con los plásmidos control para expresar Alg5-Nubl o NubG. Las levaduras que contenían cada una de las parejas de plásmidos se sembraron en una batería de placas con medio mínimo selectivo suplementado con diferentes concentraciones de 3-AT (0, 1, 2, 4 y 8 mM). Las levaduras que coexpresaban las fusiones FT-Cub-Proteína o Proteína-Cub-FT junto con NubG no pudieron crecer en el medio selectivo sin adenina ni histidina a partir de una determinada concentración de 3-AT distinta en cada caso, que fue la que

se consideró óptima para posteriores experimentos (Figura 15), ya que minimizaba los falsos positivos. Los resultados obtenidos mostraron además que los extremos N- y C-terminal de las cuatro proteínas se encuentran orientados hacia el citosol, ya que las levaduras que coexpresaban las fusiones FT-Cub-Proteína o Proteína-Cub-FT junto con Alg5-Nubl fueron capaces de crecer en el medio selectivo sin adenina ni histidina y suplementado con la concentración de 3-AT indicada (Figura 15).

2. Análisis de la interacción entre ScArv1 y Erg11 y de la dimerización de ScArv1

Para confirmar la interacción descrita previamente entre ScArv1 y Erg11 (Miller et al., 2005) en nuestras condiciones experimentales, las cepas de levadura NMY51 transformadas con los plásmidos para expresar las fusiones N- y C-terminal de ScArv1 al dominio Cub-FT (FT-Cub-ScArv1 y ScArv1-Cub-FT), se transformaron de nuevo con los plásmidos para expresar las fusiones N- y C-terminal de Erg11 al dominio NubG (Erg11-NubG y NubG-Erg11) o con los plásmidos para expresar Alg5-Nubl (control positivo) y NubG (control negativo). Las levaduras que contenían cada una de las parejas de plásmidos se sembraron en placas con medio mínimo selectivo suplementado con 1 mM 3-AT. En presencia de esta concentración de 3-AT, tanto las levaduras que coexpresaban ScArv1-Cub-FT y Erg11-NubG como las que coexpresaban ScArv1-Cub-FT y NubG-Erg11, fueron capaces de crecer en ausencia de adenina e histidina, dando lugar además a colonias blancas. La liberación de FT dependía específicamente de la interacción entre las proteínas ScArv1 y Erg11, ya que las levaduras que coexpresaban ScArv1-Cub-FT y NubG no fueron capaces de crecer en el medio selectivo (Figura 16). En cambio, las levaduras que coexpresaban FT-Cub-ScArv1 con Erg11-NubG o NubG-Erg11 no pudieron crecer en las mismas condiciones (Figura 16A), lo que parecía indicar que la fusión de FT-Cub a N-terminal de ScArv1 impedía la interacción con Erg11. Aún con todo, se consideró comprobado el correcto funcionamiento de la técnica de doble híbrido, ya que se obtuvieron resultados positivos en la interacción entre ScArv1 y Erg11.

Figura 16. Análisis de la interacción entre las proteínas de levadura ScArv1 y Erg11, y la dimerización de ScArv1. A) Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de crecimiento en medio mínimo sin adenina ni histidina y suplementado con 1 mM 3-AT de las cepas de levadura NMY51 que coexpresaban las combinaciones de proteínas indicadas. **B)** Imágenes representativas de los experimentos con resultado positivo, que muestran el crecimiento de las

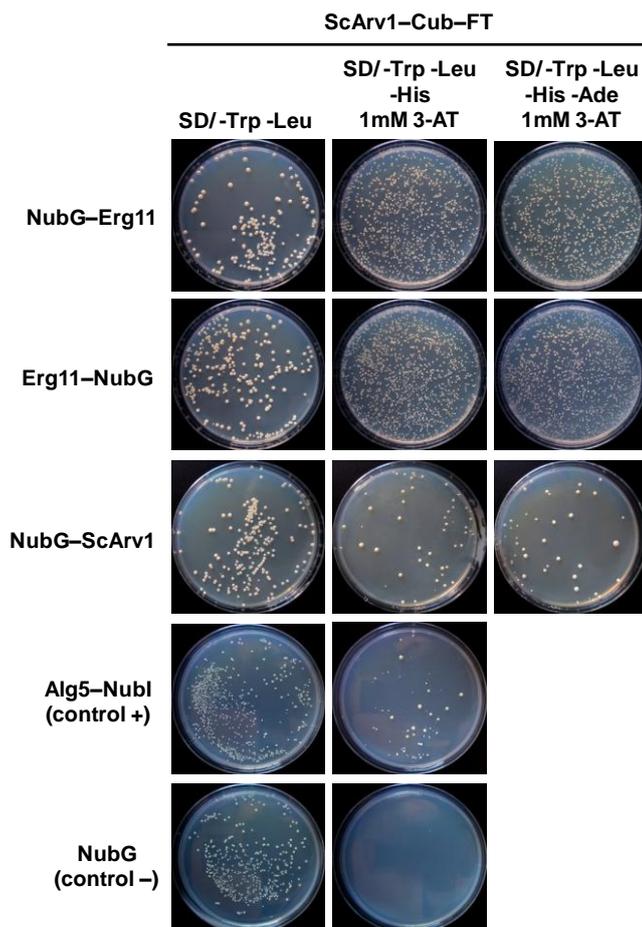
levaduras que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas en medio mínimo (SD) sin triptófano (Trp) ni leucina (Leu) (confirma la existencia de las parejas de plásmidos: columna izquierda), medio SD sin Trp, Leu ni histidina (His) y suplementado con 1mM de 3-AT (pone de manifiesto que la inducción del gen reportero *HIS3* depende específicamente de la reconstitución de la ubiquitina: columna central), y medio SD sin Trp, Leu, His ni adenina (Ade) y suplementado con 1mM de 3-AT (pone de manifiesto la activación de ambos genes reporteros *HIS3* y *ADE2*: columna derecha). Las placas se hicieron crecer a 30°C durante 2 días (columna izquierda), 4 días (columna central), y 5 días (columna derecha). La eficacia de la transformación calculada a partir de las placas de la columna de la izquierda, donde la levadura se sembró a una dilución 1:1000, fue superior en todos los casos al umbral de 2×10^4 requerido para obtener resultados significativos.

A

Análisis de la interacción entre ScArv1 y Erg11 y de la dimerización de ScArv1

Crecimiento (interacción)	Erg11-NubG	NubG-Erg11	ScArv1-NubG	NubG-ScArv1	Alg5-Nubl (control +)	NubG (control -)
FT-Cub-ScArv1	-	-	-	-	+	-
ScArv1-Cub-FT	+	+	-	+	+	-

B



En este mismo experimento también se investigó si ScArv1 podía interactuar consigo misma y formar dímeros. Para ello, las cepas de levadura NMY51

transformadas con los plásmidos para expresar las fusiones N- y C-terminal de ScArv1 al dominio Cub-FT (FT-Cub-ScArv1 y ScArv1-Cub-FT), se transformaron de nuevo con los plásmidos para expresar las fusiones N- y C-terminal de ScArv1 al dominio NubG (ScArv1-NubG y NubG-ScArv1) o con los plásmidos control para expresar Alg5-Nubl o NubG. En este caso, solo la coexpresión de ScArv1-Cub-FT y NubG-ScArv1 permitió a la levadura crecer en medio selectivo suplementado con 1 mM 3-AT, dando lugar además a colonias blancas, aunque el número de colonias obtenido fue mucho menor que en la interacción entre ScArv1 y Erg11. Del mismo modo que se argumenta en la interacción entre ScArv1 y Erg11, los resultados con el control negativo NubG demuestran que la liberación de FT dependía específicamente de la interacción entre los dos monómeros de ScArv1 (Figura 16). De nuevo, la fusión de Cub-FT a N-terminal de ScArv1 impidió la dimerización, al igual que ocurrió cuando NubG se fusionó a C-terminal de ScArv1 (Figura 16A). En definitiva, estos resultados sugieren que ScArv1 dimeriza cuando uno de los monómeros tiene libre el extremo N-terminal y el otro el extremo C-terminal, aunque dicha interacción es mucho más débil que cuando interacciona con Erg11.

3. Análisis de la interacción entre AtArv1 y CYP51 y de la dimerización de AtArv1

Los resultados descritos en el apartado anterior pusieron de manifiesto la importancia de la posición relativa de los dominios separables de la ubiquitina para visualizar una determinada interacción entre dos proteínas. Por ello, para el estudio de la interacción entre AtArv1 y CYP51 se probaron todas las combinaciones posibles, tanto las fusiones de cada proteína a los dos dominios separables de la ubiquitina como las fusiones de cada dominio de la ubiquitina a los dos extremos de las proteínas estudiadas.

Las cepas de levadura NMY51 transformadas con los plásmidos para expresar las fusiones de la proteína cebo al dominio Cub-FT (FT-Cub-AtArv1, AtArv1-Cub-FT, FT-Cub-CYP51 y CYP51-Cub-FT), se transformaron de nuevo con los plásmidos para expresar las fusiones de la proteína presa al dominio NubG (CYP51-NubG, NubG-CYP51, AtArv1-NubG y NubG-AtArv1) o con los plásmidos control para expresar Alg5-Nubl o NubG, y se sembraron en placas con medio mínimo selectivo suplementado con 4 mM 3-AT cuando la proteína cebo era AtArv1, y con 2 mM 3-AT cuando era CYP51. En ninguna de las ocho posibles combinaciones se observó crecimiento de la

levadura en medio selectivo en presencia de 3-AT (Figura 17A), lo que demostró que AtArv1 y CYP51 no interactúan cuando se expresan en levadura.

A

Análisis de la interacción entre AtArv1 y CYP51 y de la dimerización de AtArv1

Crecimiento (interacción)	CYP51–NubG	NubG–CYP51	AtArv1–NubG	NubG–AtArv1	Alg5–Nubl (control +)	NubG (control –)
FT–Cub–AtArv1	–	–	–	–	+	–
AtArv1–Cub–FT	–	–	–	+	+	–
FT–Cub–CYP51			–	–	+	–
CYP51–Cub–FT			–	–	+	–

B

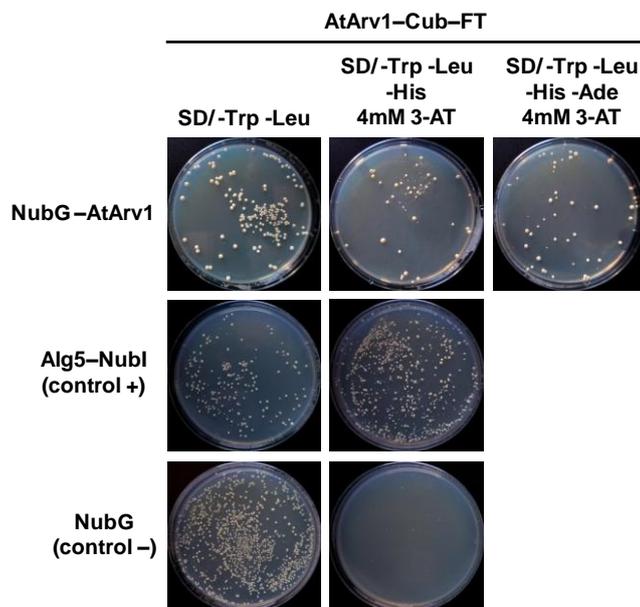


Figura 17. Análisis de la interacción entre las proteínas de Arabidopsis AtArv1 y CYP51 y la dimerización de AtArv1. A) Se indica la presencia (+) o ausencia (–) de crecimiento en medio mínimo sin adenina ni histidina y suplementado con 3-AT (4 mM cuando AtArv1 actuaba como proteína cebo y 2 mM cuando era CYP51) de las cepas de levadura NMY51 que coexpresaban las combinaciones de proteínas indicadas. **B)** Imágenes representativas del experimento con resultado positivo, que muestran el crecimiento de las levaduras que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas en los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y con la eficacia de la transformación mencionados en el pie de la figura 16.

De nuevo, este experimento se aprovechó para investigar la posible dimerización de AtArv1. En presencia de 4 mM 3-AT, solo la coexpresión de AtArv1-

Cub-FT y NubG-AtArv1 permitió a la levadura crecer en ausencia de adenina e histidina, dando lugar además a colonias blancas, aunque el número de colonias obtenido sugería que dicha interacción es débil, como ocurría en la dimerización de ScArv1. La liberación de FT dependía específicamente de la interacción entre los dos monómeros de AtArv1, ya que las levaduras que coexpresaban AtArv1-Cub-FT y NubG no fueron capaces de crecer en el medio selectivo (Figura 17). De nuevo, tanto la fusión de Cub-FT a N-terminal como la de NubG a C-terminal de AtArv1 impidieron la dimierización (Figura 17A). Por lo tanto, igual que en el caso de ScArv1, se puede afirmar que AtArv1 dimeriza cuando un monómero tiene libre el extremo N-terminal y el otro el extremo C-terminal.

4. Análisis de las interacciones cruzadas de las proteínas Arv1 de levadura y Arabidopsis entre ellas y con Erg11 o CYP51

Para analizar si los patrones de dimerización de Arv1 y de interacción entre Arv1 y las esterol-C14 demetilinas Erg11 y CYP51 se podrían haber conservado a lo largo de la evolución, se realizaron estudios de interacción combinando las proteínas ortólogas de levadura y Arabidopsis.

4.1 Análisis de la dimerización cruzada entre ScArv1 y AtArv1

Teniendo en cuenta que en nuestras condiciones experimentales Arv1 solo dimeriza cuando el dominio Cub-FT está unido al extremo C-terminal de uno de los monómeros y el dominio NubG al extremo N-terminal del otro (Figura 16 y 17), se empleó el mismo diseño experimental para comprobar si se podría dar la dimerización cruzada entre ScArv1 y AtArv1.

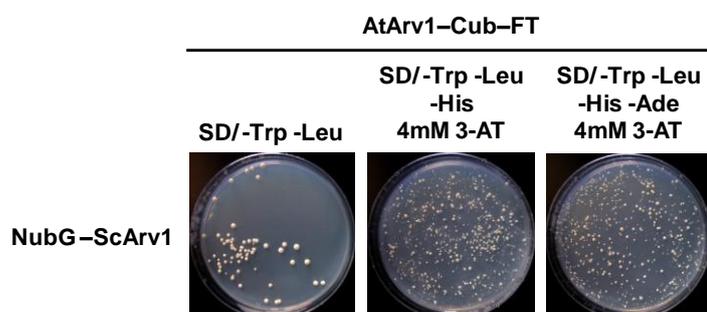
Para ello, las cepas de levadura NMY51 transformadas con los plásmidos para expresar las fusiones de proteína cebo Arv1 al dominio Cub-FT (ScArv1-Cub-FT y AtArv1-Cub-FT), se transformaron de nuevo con los plásmidos para expresar las fusiones de proteína presa Arv1 al dominio NubG (NubG-AtArv1 y NubG-ScArv1). Las levaduras que contenían cada una de las parejas de plásmidos se sembraron en placas con medio mínimo selectivo suplementado con 4 mM 3-AT cuando la proteína cebo era AtArv1, y con 1 mM 3-AT cuando era ScArv1.

Figura 18. Análisis de la dimerización cruzada entre las proteínas ScArv1 y AtArv1. **A)** Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de crecimiento en medio mínimo selectivo sin adenina ni histidina y suplementado con 3-AT (4 mM cuando AtArv1 era la proteína cebo y 1 mM cuando era ScArv1) de las cepas de levadura NMY51 que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas indicadas. **B)** Imágenes representativas del experimento con resultado positivo, que muestran el crecimiento de las levaduras que coexpresaban la combinación de proteínas en los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y con la eficacia de la transformación mencionados en el pie de la figura 16.

A

Análisis de la dimerización cruzada		
Proteína cebo	Proteína presa	Crecimiento (interacción)
ScArv1-Cub-FT	NubG-AtArv1	-
AtArv1-Cub-FT	NubG-ScArv1	+

B



Los resultados obtenidos muestran que solo la coexpresión de las proteínas AtArv1-Cub-FT y NubG-ScArv1 permitió a la levadura crecer en ausencia de adenina e histidina, dando lugar además a colonias blancas (Figura 18). Por tanto, de alguna forma la proteína AtArv1 se ha conservado a lo largo de la evolución suficientemente como para interactuar con ScArv1 de forma eficiente.

4.2 Análisis de las interacciones cruzadas entre ScArv1-CYP51 y AtArv1-Erg11

Teniendo en cuenta que ScArv1 y Erg11 interactúan cuando el dominio Cub-FT está unido al extremo C-terminal de ScArv1 (Figura 16), se empleó el mismo diseño experimental para comprobar si se podría dar la interacción cruzada entre ScArv1-CYP51 y AtArv1-Erg11.

Para ello, las cepas de levadura NMY51 transformadas con los plásmidos para expresar las fusiones de proteína cebo Arv1 al dominio Cub-FT (AtArv1-Cub-FT y ScArv1-Cub-FT), se transformaron de nuevo con los plásmidos para expresar las fusiones de proteína presa Erg11 o CYP51 al dominio NubG (Erg11-NubG, NubG-Erg11, CYP51-NubG y NubG-CYP51). Las levaduras que contenían cada una de las parejas de plásmidos se sembraron en placas con medio mínimo selectivo suplementado con 4 mM 3-AT cuando la proteína cebo era AtArv1, y 1 mM 3-AT cuando era ScArv1.

A

Análisis de las interacciones cruzadas AtArv1-Erg11 y ScArv1-CYP51

Crecimiento (interacción)	Análisis de las interacciones cruzadas AtArv1-Erg11 y ScArv1-CYP51			
	Erg11-NubG	NubG-Erg11	CYP51-NubG	NubG-CYP51
AtArv1-Cub-FT	-	+		
ScArv1-Cub-FT			-	-

B

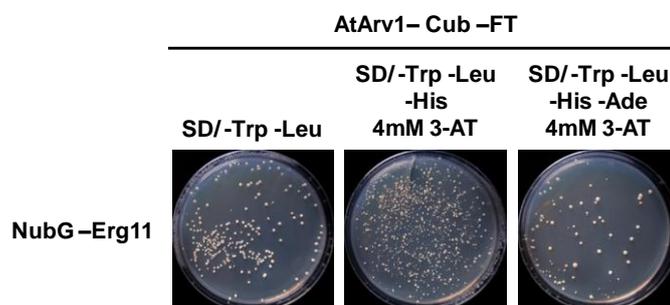


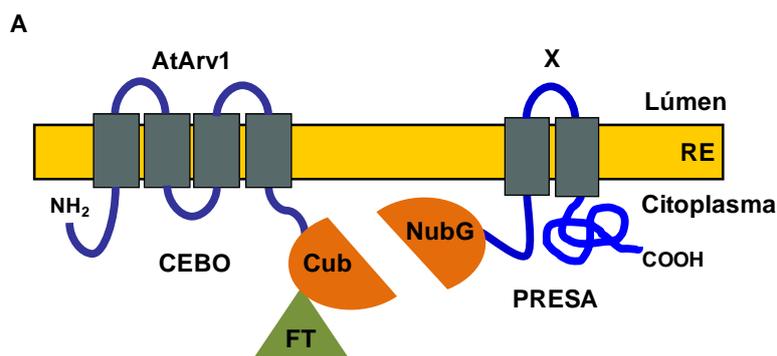
Figura 19. Análisis de la interacción cruzada entre las proteínas ScArv1-CYP51 y AtArv1-Erg11. A) Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de crecimiento en medio mínimo selectivo sin adenina ni histidina y suplementado con 3-AT (4 mM cuando AtArv1 actuaba como proteína cebo y 1 mM cuando la proteína cebo era ScArv1) de las cepas de levadura NMY51 que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas indicadas. **B)** Imágenes representativas del experimento con resultado positivo, que muestran el crecimiento de las levaduras que coexpresaban la combinación de proteínas en los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y con la eficacia de la transformación mencionados en el pie de la figura 16.

Los resultados obtenidos muestran que solo la coexpresión de AtArv1-Cub-FT y NubG-Erg11 permitió a la levadura crecer en ausencia de adenina e histidina, dando lugar además a colonias blancas (Figura 19). Sin embargo, en ninguna de las dos

combinaciones probadas, se pudo observar interacción entre las proteínas ScArv1 y CYP51. En definitiva, mientras la conservación estructural entre las proteínas AtArv1 y ScArv1 a lo largo de la evolución es suficiente como para que AtArv1 pueda interactuar con la proteína de levadura Erg11, por el contrario, el ortólogo de Erg11 en Arabidopsis, CYP51, ha divergido lo suficiente como para que no pueda interactuar con la proteína de levadura ScArv1.

5. Cribado con un banco de expresión de cDNA de Arabidopsis

A continuación, se llevó a cabo el cribado de un banco de expresión de cDNA de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* NubG-x cDNA libray, Dualsystems biotech), construido a partir de RNA total de plántulas de 6 días de edad, empleando AtArv1-Cub-FT como proteína cebo, a fin de identificar proteínas de Arabidopsis que interaccionasen con AtArv1. Se eligió esta configuración de la proteína cebo porque la disposición del dominio Cub-FT en el extremo C-terminal de AtArv1 había permitido detectar la dimerización con NubG-AtArv1 (Figura 17) y con NubG-ScArv1 (Figura 18), y la interacción cruzada con NubG-Erg11 (Figura 19). El banco de expresión de cDNA empleado se había construido en el plásmido pDSL-Nx, de forma que expresaba las proteínas presa fusionadas por su extremo N-terminal al dominio NubG (Figura 20A), reproduciendo la disposición que había permitido detectar las interacciones con AtArv1 anteriormente mencionadas.



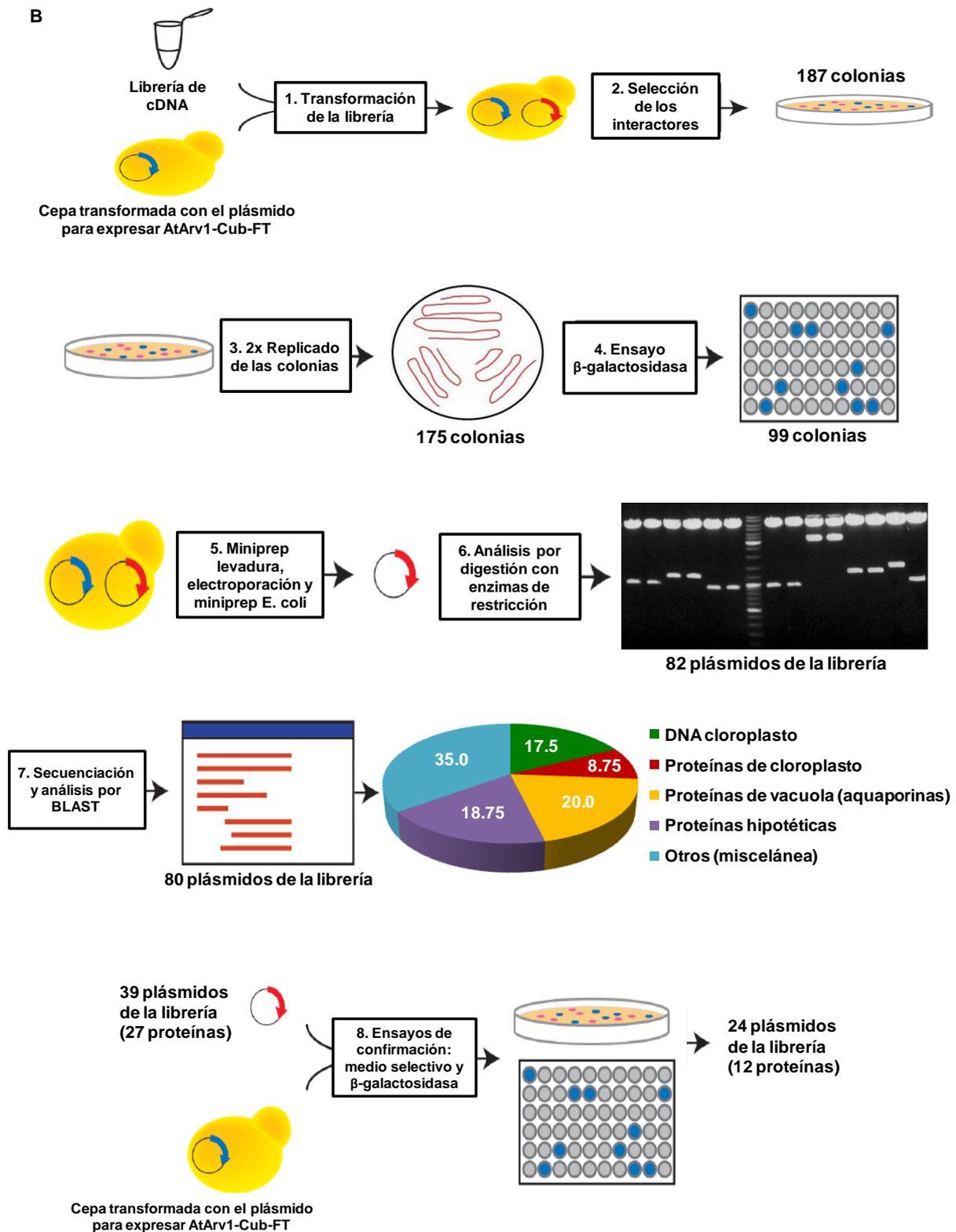


Figura 20. Cribado con un banco de expresión de cDNA de Arabidopsis. A) Esquema de la disposición de la proteína cebo (AtArv1-Cub-FT) en la membrana del RE y de una hipotética proteína presa representativa fusionada en el extremo N-terminal al dominio NubG. Las proteínas presa expresadas por la librería de cDNA podrían ser tanto proteínas asociadas a la membrana del RE como solubles. **B)** Representación de los distintos pasos del proceso de cribado del banco de expresión de cDNA de Arabidopsis. En el punto 6 se muestra un ejemplo representativo del análisis de algunos de los clones positivos por digestión con enzimas de

restricción. Se indica el número de colonias o de plásmidos provenientes de la librería que superaron cada paso del proceso. En el punto 7 se clasifican los 80 plásmidos secuenciados con un gráfico de sectores y sus respectivos porcentajes. A lo largo del punto 8 se indica el número de proteínas que representan los plásmidos seleccionados a cada paso. Figura adaptada de www.dualsystems.com.

Para proceder al cribado del banco de expresión (Figura 20B), la cepa de levadura NMY51 transformada con el plásmido para expresar AtArv1-Cub-FT se transformó de nuevo con el banco de expresión de cDNA **(1)**, y se sembró en medio mínimo selectivo suplementado con 4 mM 3-AT, obteniéndose inicialmente 187 colonias positivas **(2)**. Las colonias obtenidas se replicaron de nuevo en el mismo medio y tras crecer se replicaron de nuevo, de forma que se obtuvo crecimiento después del segundo pase en 175 casos **(3)**. Tras cuantificar la actividad β -galactosidasa en dichas colonias (materiales y métodos, apartado 5.6), y compararla con la obtenida en colonias transformadas con los plásmidos para expresar AtArv1-Cub-FT y los controles positivo (Alg5-Nubl) y negativo (NubG), se seleccionaron 99 colonias para continuar el proceso de cribado **(4)**.

Posteriormente, se aisló el DNA plasmídico de cada una de las colonias de levadura seleccionadas y para amplificarlo se retransformó en *E. coli* **(5)**. Del conjunto de colonias bacterianas obtenidas en cada evento de transformación se seleccionaron al azar dos colonias y el DNA plasmídico obtenido se analizó por digestión con enzimas de restricción **(6)**. La mayoría de las parejas de plásmidos provenientes de cada transformación contenían fragmentos de cDNA del mismo tamaño, lo que indicaba que ambas colonias bacterianas contenían el mismo plásmido, como era de esperar. Sin embargo, unas pocas parejas de colonias contenían plásmidos con insertos distintos, ya que las bandas obtenidas en la digestión diferían en tamaño, como puede verse en el ejemplo representativo del punto 6 de la Figura 20B. En el primer caso, se escogió uno de los dos plásmidos para determinar la secuencia del fragmento de cDNA clonado, mientras que en el segundo, se secuenciaron los insertos de ambos plásmidos, lo que representó un total de 82 clones procedentes del banco de cDNA secuenciados.

Las secuencias obtenidas se analizaron por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra el genoma de *Arabidopsis* **(7)**, lo que permitió establecer la identidad de la proteína presa en 80 plásmidos. Teniendo en cuenta que AtArv1 es una proteína de membrana anclada al RE (Forés et al., 2006) y que ScArv1 se ha vinculado a la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

en levadura (Kajiwara et al., 2008), se analizaron varios parámetros como la localización subcelular, el perfil de hidrofobicidad y el anclaje a GPI para reducir la lista de candidatos con los que continuar trabajando. En primer lugar, se descartaron aquellas secuencias que correspondían a DNA de cloroplastos (17.5%), y las que codificaban proteínas de cloroplastos (8.75%) y proteínas de vacuola (20.0%), mayoritariamente aquaporinas, ya que su localización subcelular hacía improbable que pudieran interactuar con AtArv1 en Arabidopsis. El resto de las secuencias correspondían a proteínas hipotéticas (18.75%) y otros tipos de proteínas (35.0%), entre las que, tras analizar los parámetros mencionados anteriormente, se escogieron 27 correspondientes a 39 plásmidos del banco de cDNA de Arabidopsis.

Potenciales interactores de AtArv1 usando un cribado en doble híbrido para proteínas de membrana

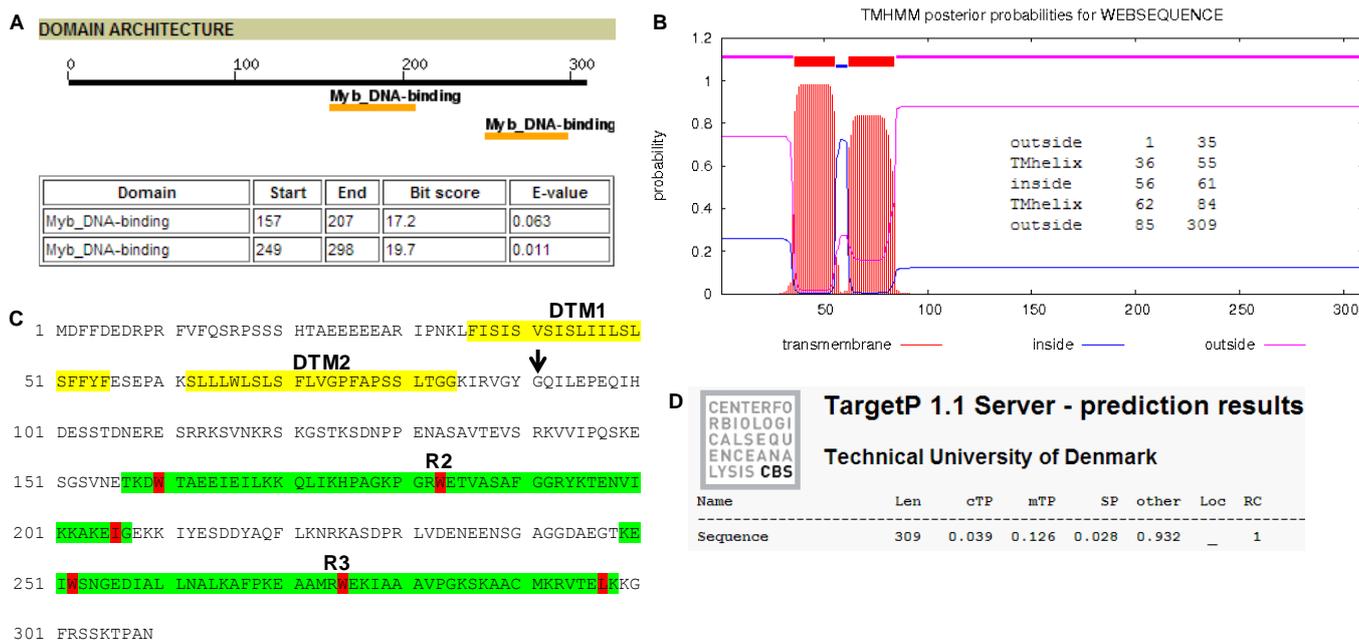
Nº Col.	AGI cod.	Nombre	Descripción	Función	Proceso	DTM	GPI	Localización
6	At5g45420	maMYB	proteína Myb-like	factor de transcripción		2 (N-term)	No	retículo endoplasmático
1	At2g01070		proteína hipotética (lung seven transmembrane receptor-like)	receptor	biosíntesis brasinosteroides	7 (C-term)	No	vía secretora
1	At4g37450	AGP18	proteína arabinogalactano 18	transducción de señal	proteína rica en lisinas que regula crecimiento y desarrollo	0	1 (C-term)	membrana plasmática / región extracelular
7	At1g22750		proteína hipotética (DUF1475)			6	No	vía secretora
1	At3g10960	AZG1	permeasa de purinas	transportador		8	3 probables	membrana
1	At3g18035	HON4	winged-helix DNA-binding	unión a histona H1/H5	ensamblaje del nucleosoma	0	No	núcleo / nucleosoma
2	At1g64650		proteína hipotética (general substrate transporter-like)	transportador	biosíntesis brasinosteroides	11 - 12	1 probable	vía secretora
1	At4g30190	AHA2	H ⁺ ATPasa 2	transportador de cationes/protones	genera gradiente de protones para el transporte activo de nutrientes	8 - 10	No	membrana plasmática
1	At2g38120	AUX1	AUXIN RESISTANT 1	transportador de amino ácidos	elongación de los pelos de raíz, formación de la raíz lateral, gravitropismo positivo, formación del sincitio	10	No	vía secretora
1	At5g10190		major facilitator protein (MFS)	transportador de carbohidratos:protón	involucrado en transporte de nitrato y cationes	10	No	proteína integral de membrana
1	At2g01660	PDLP6	proteína 6 localizada en plasmodesmo (DUF26)		proteína rica en cisteínas involucrada en el movimiento intercelular de moléculas	1 - 2	1 probable	vía secretora
1	At5g22290	ANAC089	proteína 89 con dominio NAC: no apical meristem (NAM)	factor de transcripción	regulador negativo del desarrollo floral	1 (C-term)	No	membrana

Tabla 2. Relación de proteínas candidatas a interactuar con AtArv1 ordenadas por la intensidad de la interacción. Para cada candidato se indica el número de colonias de levadura obtenidas inicialmente en el cribado, el código AGI identificativo de cada gen, y el nombre de la proteína y una breve descripción genérica de su función si se conocen. También se indica el proceso biológico en el que estaría involucrada la proteína, el número y la posición de los dominios transmembrana (DTMs), el posible anclaje a GPI y la localización subcelular.

Para confirmar la interacción de dichas proteínas con AtArv1, la cepa NMY51 transformada con el plásmido para expresar AtArv1-Cub-FT se transformó de nuevo con los plásmidos seleccionados, y se sembró en medio mínimo selectivo suplementado con 4 mM 3-AT **(8)**. Las cepas que crecieron en el medio selectivo y dieron positivo en el ensayo de actividad β -galactosidasa representaron un total de 24 plásmidos que correspondían a 12 proteínas potencialmente capaces de interactuar con AtArv1. En la Tabla 2 se muestra la lista de los candidatos ordenados en base a la intensidad de su interacción con AtArv1, definida siguiendo los criterios de número de colonias en el medio selectivo y nivel de actividad β -galactosidasa obtenidos en los ensayos de confirmación mencionados anteriormente.

De los candidatos identificados, el que se consideró más interesante fue un hipotético factor de transcripción de la familia Myb (maMYB, At5g45420) que en su extremo C-terminal contiene dos dominios de tipo Myb-like/SANT (dominio R2R3-MYB) (Figura 21A). En primer lugar, la interacción entre maMYB y AtArv1 resultó ser la más intensa en los ensayos de confirmación mencionados anteriormente (paso 8, Figura 20B). En segundo lugar, el plásmido que codifica maMYB fue el segundo más abundante en términos de número de colonias independientes de levadura obtenidas inicialmente en el cribado. Por último, el análisis *in silico* del perfil de hidrofobicidad de la proteína permitió identificar dos DTMs en su extremo N-terminal (Figura 21B), que sugerían un posible anclaje de maMYB a la membrana del RE. De hecho, la predicción de la localización subcelular de la proteína descartó la localización en el cloroplasto, la mitocondria y la vía secretora, y asignó otras localizaciones con una alta probabilidad (Figura 21D). De hecho, maMYB se había identificado en un análisis proteómico del RE de Arabidopsis realizado con anterioridad (Dunkley et al., 2006).

Figura 21. La proteína maMYB contiene el dominio R2R3-MYB y está anclada a la membrana del RE mediante dos DTMs. A) Predicción en la proteína maMYB de dos secuencias MYB de unión a DNA empleando el programa bioinformático PInTFDB. **B)** Perfil de hidrofobicidad empleando el programa bioinformático TMHMM y las posiciones de aminoácidos de la proteína maMYB donde cambia el perfil de hidrofobicidad. **C)** Secuencia de la proteína maMYB donde se marcan la posición del aminoácido 90 con una flecha, los dos DTMs de la región N-terminal (DTM1 y DTM2) en amarillo y los dos dominios MYB de la región C-terminal (R2 y R3) en verde, junto con los tres aminoácidos hidrofóbicos característicos de dichos dominios en rojo. **D)** Predicción de la localización subcelular empleando el programa bioinformático TargetP 1.1.



6. Análisis de los dominios implicados en la interacción entre AtArv1 y maMYB

Para determinar qué dominios de maMYB y AtArv1 participaban en la interacción, se analizó mediante MbYTH la interacción entre diferentes versiones de ambas proteínas delecionadas en dominios concretos. Teniendo en cuenta que las proteínas Arv1 poseen en el extremo N-terminal el dominio AHD (*Arv Homology Domain*), que incluye una secuencia susceptible de formar un dedo de zinc potencialmente implicado en establecer interacciones con otras proteínas (Tinkelenberg et al., 2000; Forés et al., 2006), se diseñaron dos versiones quiméricas de AtArv1 truncadas por su extremo N-terminal: AtArv1 Δ 35, delecionada hasta el aminoácido 35 con pérdida del dedo de zinc, y AtArv1 Δ 68, delecionada hasta el aminoácido 68 con pérdida del dominio AHD completo. Respecto a la proteína maMYB, se analizó la posible implicación de los DTMs de la región N-terminal por un lado y de la parte soluble de la región C-terminal por otro en la interacción con AtArv1. Teniendo en cuenta que el perfil de hidrofobicidad de la proteína maMYB predecía el final del segundo DTM en el aminoácido 84 (Figura 21B), se escogió el aminoácido 90 como límite entre la región transmembrana (maMYB¹⁻⁹⁰) y la región soluble (maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) de la proteína (Figura 21C).

Imitando la disposición de las proteínas cebo AtArv1-Cub-FT y presa NubG-maMYB empleadas anteriormente en el cribado, las regiones de cDNA que codifican

para las dos versiones quiméricas de AtArv1 se clonaron en el plásmido pBT3STE, mientras que las regiones de cDNA que codifican para las dos versiones quiméricas de maMYB se clonaron en el plásmido pPR3N. Posteriormente, las cepas de levadura NMY51 transformadas con los plásmidos para expresar las fusiones de la proteína cebo al dominio Cub-FT (AtArv1-Cub-FT, AtArv1 Δ 35-Cub-FT y AtArv1 Δ 68-Cub-FT), se transformaron de nuevo con los plásmidos para expresar las fusiones de la proteína presa al dominio NubG (NubG-maMYB, NubG-maMYB¹⁻⁹⁰ y NubG-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) o con los plásmidos control para expresar Alg5-Nubl o NubG, y se sembraron en placas con medio mínimo selectivo suplementado con 4 mM 3-AT.

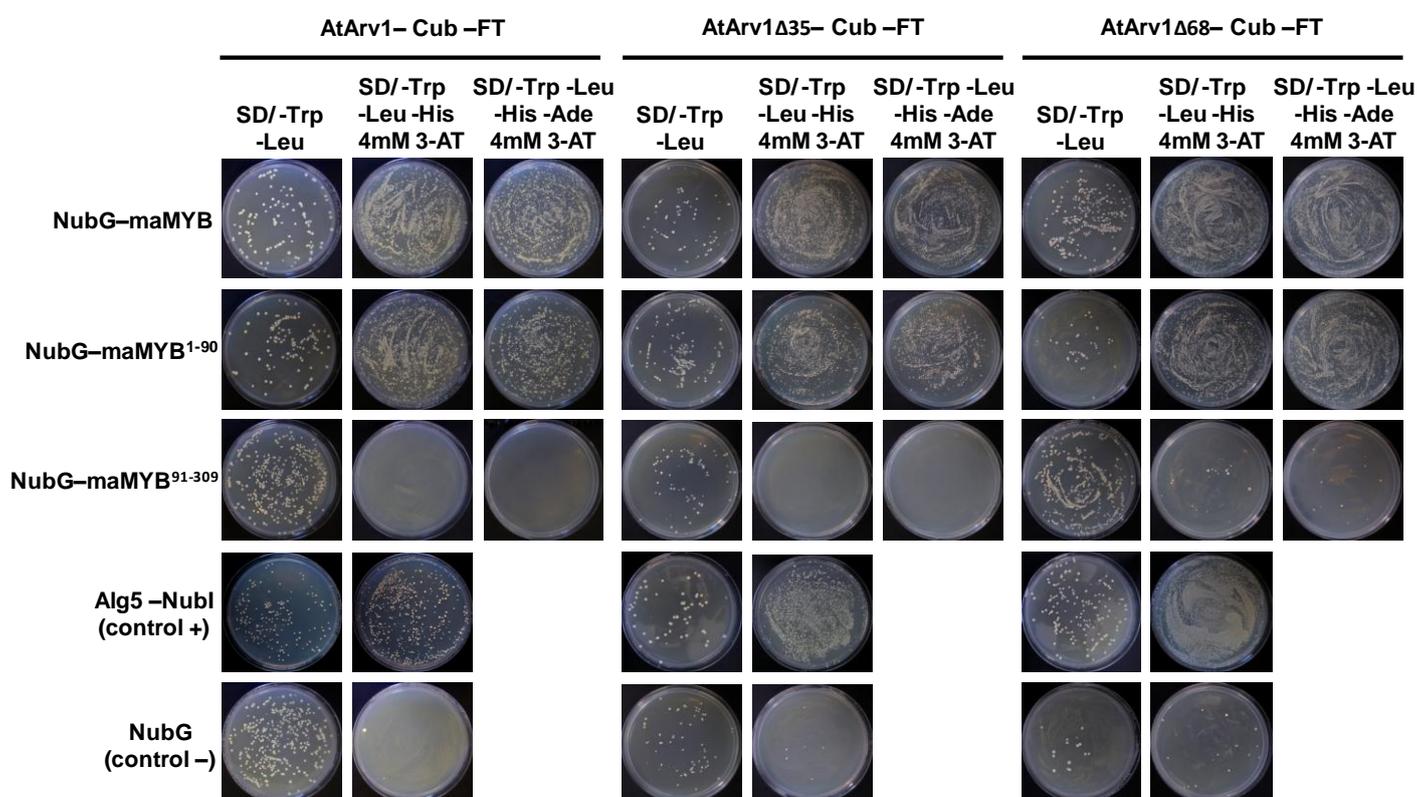


Figura 22. Análisis de los dominios implicados en la interacción entre AtArv1 y maMYB. Imágenes representativas que muestran el crecimiento de las cepas de levaduras NMY51 que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas indicadas en los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y con la eficacia de la transformación mencionados en el pie de la figura 16.

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de 3-AT las únicas levaduras que no pudieron crecer en ausencia de adenina e histidina fueron las que expresaban NubG-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, mientras que las que coexpresaban todas las demás

combinaciones de proteínas fueron capaces de crecer en esas mismas condiciones, dando lugar además a colonias blancas. La liberación de FT dependía específicamente de la interacción entre las proteínas cebo y presa ya que las levaduras que coexpresaban la proteína cebo y NubG no fueron capaces de crecer en el medio selectivo (Figura 22). En conclusión, el dominio N-terminal formado por los primeros 90 aminoácidos de maMYB es necesario y suficiente para interactuar con AtArv1 en levadura. Sin embargo, el dominio AHD, que se encuentra en la región N-terminal de AtArv1, no resultó ser necesario para establecer dicha interacción.

7. Análisis de la interacción entre AtArv2 y maMYB

Teniendo en cuenta que las dos proteínas Arv de Arabidopsis, AtArv1 y AtArv2, poseen una identidad del 66% y una similitud del 75% entre sí (Figura 6), se analizó si maMYB también era capaz de interactuar con AtArv2 empleando la misma disposición de los dominios Cub-FT y NubG y el mismo procedimiento que se había empleado para analizar la interacción con AtArv1.

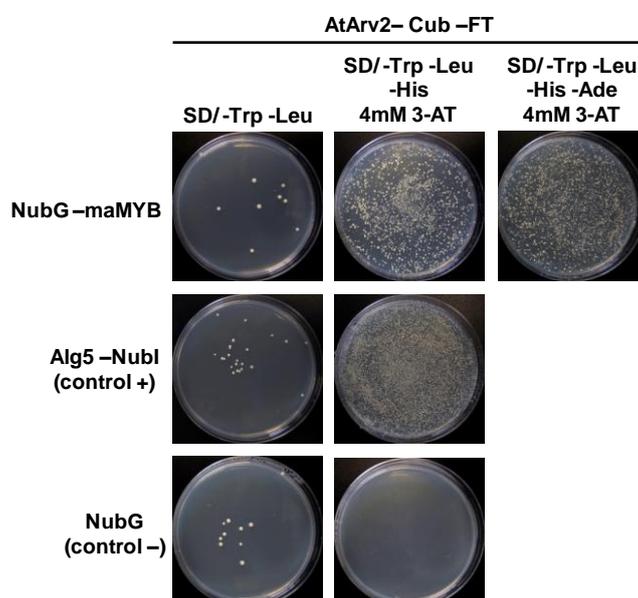


Figura 23. Análisis de la interacción entre AtArv2 y maMYB. Imágenes representativas que muestran el crecimiento de las cepas de levaduras NMY51 que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas indicadas en los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y con la eficacia de la transformación mencionados en el pie de la figura 16.

Los resultados obtenidos muestran que las levaduras que coexpresaban la pareja de proteínas AtArv2-Cub-FT y NubG-maMYB fueron capaces de crecer en ausencia de adenina e histidina, dando lugar además a colonias blancas, mientras que las levaduras que coexpresaban AtArv2-Cub-FT y NubG no pudieron crecer en esas mismas condiciones (Figura 23), lo que indicaba que la liberación de FT en el caso anterior dependía específicamente de la interacción entre los dos dominios de la ubiquitina. Así pues, empleando la técnica del doble híbrido para proteínas de membrana, la proteína AtArv2 también puede interactuar con maMYB.

8. Otros métodos para determinar interacciones entre proteínas

Los análisis de doble híbrido proporcionan información muy valiosa relativa a la interacción entre proteínas *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta técnica deben ser necesariamente validados, a poder ser en células vegetales, empleando otras aproximaciones experimentales, como por ejemplo la complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC, *bimolecular fluorescence complementation*) y la coimmunoprecipitación.

8.1 BiFC

La técnica de BiFC se basa en fusionar los fragmentos N- y C-terminal de la proteína fluorescente amarilla YFP (YFN e YFC, respectivamente) a las proteínas cuya interacción se pretende demostrar. Los fragmentos del cromóforo por separado no emiten fluorescencia. Sin embargo, cuando los dos fragmentos se aproximan a una cierta distancia gracias a la interacción entre las proteínas objeto de estudio, la fluorescencia se restablece y se puede detectar por microscopía láser confocal. La técnica BiFC permite estudiar interacciones entre proteínas integrales de membrana (Szczesna-Skorupa and Kemper, 2006).

Teniendo en cuenta que la proteína AtArv1 se encuentra en la membrana del RE (Forés et al., 2006), la reconstitución de la emisión de fluorescencia con un patrón típico de RE se consideraría indicativo de interacción *in vivo* de AtArv1 con maMYB. Para analizar dicha interacción se probaron todas las combinaciones posibles, tanto las fusiones de cada proteína a los dos fragmentos YFN e YFC como las fusiones de cada fragmento a los dos extremos de las proteínas estudiadas. Todas las proteínas resultantes se coexpresaron transitoriamente por parejas, enfrentando siempre una

quimera de AtArv1 contra otra de maMYB, en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas (Bracha-Drori et al., 2004). Sin embargo, tras el análisis por microscopía láser confocal, se pudo comprobar que ninguna de las combinaciones posibles entre AtArv1 y maMYB daba lugar a emisión de fluorescencia, por lo que no se pudo validar la interacción mediante la técnica de BiFC.

8.2 Coinmunoprecipitación

Como segunda opción para confirmar la interacción entre AtArv1 y maMYB, se decidió llevar a cabo experimentos de coinmunoprecipitación empleando anticuerpos anti-péptido maMYB, que se generaron tal y como se describe más adelante en la parte II de resultados II (Figura 24).

Con este fin, se obtuvieron líneas transgénicas T₃ homocigotas de Arabidopsis que expresaban las fusiones GFP-AtArv1 y AtArv1-GFP por separado. Tras analizar por *Western blot* extractos de plántulas de Arabidopsis de distintas líneas empleando anticuerpos anti-GFP, no se pudo identificar de forma clara las bandas que correspondían a las proteínas de fusión a GFP, lo que impidió poder llevar a cabo experimentos de coinmunoprecipitación de forma satisfactoria.

Por último, se decidió llevar a cabo experimentos de coinmunoprecipitación en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, ya que en sistema la sobreexpresión de proteínas suele ser más eficiente. Para ello se expresaron transitoriamente en hojas de *Nicotiana* las parejas de proteínas de fusión GFP-AtArv1 y maMYB-3xHA por un lado, y GFP-maMYB y AtArv1-3xHA por otro. A los tres días posteriores a la agroinfiltración, momento en el que la expresión de cada proteína de fusión se encontraba en niveles máximos, se obtuvieron extractos de proteína y se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GFP unidos a microesferas de agarosa. Los inmunoprecipitados se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se analizaron por *Western blot* usando el anticuerpo anti-péptido maMYB, el anticuerpo anti-HA, y el mismo anticuerpo anti-GFP utilizado para la inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos con los diferentes anticuerpos mostraban bastantes bandas inespecíficas y no se consiguieron identificar las proteínas de fusión, lo que de nuevo impidió validar la interacción entre AtArv1 y maMYB en estas condiciones experimentales.

PARTE II: CARACTERIZACIÓN DE maMYB (*MEMBRANE ANCHORED MYB*) DE *Arabidopsis thaliana*

Al iniciar este trabajo todavía no se disponía de ningún tipo de información experimental acerca del hipotético factor de transcripción maMYB (Figura 24). Al comparar la secuencia tanto del gen como de la proteína de maMYB contra el genoma y el proteoma de *Arabidopsis*, respectivamente, se observó que maMYB está codificado por un único gen en *Arabidopsis*. A partir de esta observación y con el fin de caracterizar la proteína maMYB, se realizaron una serie de experimentos dirigidos a analizar estructural y funcionalmente dicha proteína.

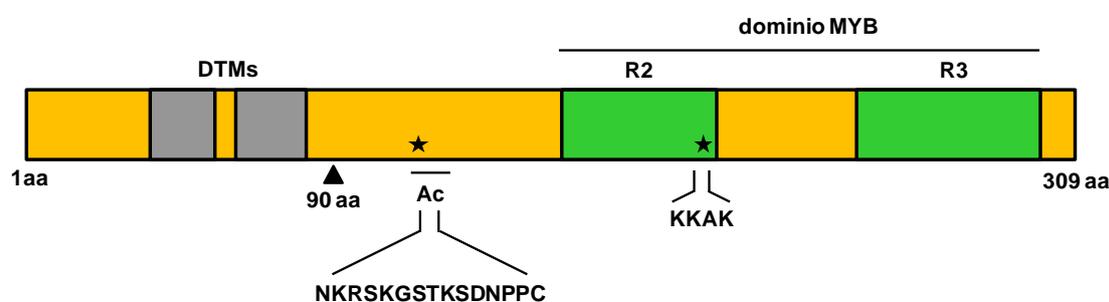
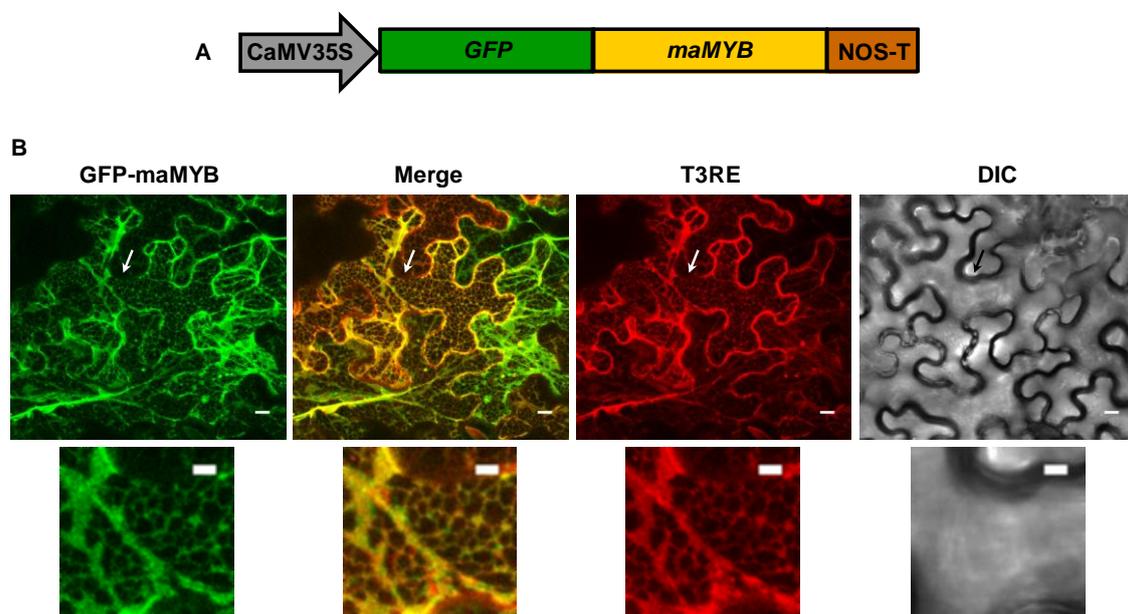


Figura 24. Esquema de la proteína maMYB. Se representan los dos dominios transmembrana (DTMs) predichos en la región N-terminal de la proteína y el dominio R2R3-MYB identificado en la región C-terminal. Se indica con un triángulo negro la posición del aminoácido 90 hasta donde se deletionó la proteína para generar una versión truncada de maMYB sin los DTMs (maMYB⁹¹⁻³⁰⁹). Se muestra la posición y la secuencia del péptido escogido para producir los anticuerpos (Ac) contra maMYB empleados en los experimentos de *Western blot* descritos más adelante. Las estrellas marcan la posición de las dos posibles señales de localización nuclear KRSK (subrayada en la secuencia del péptido) y KKAK, que se ajustan a la secuencia consenso KK/RXK/R.

1. La proteína maMYB se localiza en la membrana del RE

El análisis *in silico* del perfil de hidrofobicidad y la predicción de la localización subcelular de la proteína maMYB permitieron identificar dos DTMs en su extremo N-terminal que la anclarían al RE (Figura 21 y 24). Para demostrar experimentalmente dicha localización subcelular en el RE, se prepararon dos construcciones para expresar fusiones N- y C-terminal de maMYB con la proteína fluorescente GFP (GFP-maMYB y maMYB-GFP). Ambas fusiones se expresaron transitoriamente, bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (Figura 25A), en células epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas, junto con la proteína de fluorescencia

roja marcadora de RE, T3RE (materiales y métodos, apartado 3.3.2). Al cabo de tres días se analizaron los patrones de fluorescencia mediante microscopía láser confocal. El bajo nivel de expresión de la proteína quimérica maMYB-GFP en *N. benthamiana* impidió visualizar su patrón de fluorescencia, lo que sugería que esta versión de la proteína era inestable y/o tóxica para las células. Sin embargo, la expresión de la proteína GFP-maMYB fue claramente detectable y dio lugar a un patrón reticular que se solapaba completamente con el patrón de fluorescencia roja del marcador T3RE (Figura 25B), lo cual demuestra la localización de GFP-maMYB en el RE y confirma la predicción de que maMYB se encuentra *in vivo* en el RE.



2. Los extremos N- y C- terminal de maMYB se proyectan hacia el citosol

La predicción *in silico* de dos DTMs en la proteína maMYB (Figura 21A), sugería dos posibles topologías en la membrana del RE, dependiendo de que ambos extremos de la proteína se proyecten hacia el citosol o hacia el lumen. Teniendo en cuenta que el supuesto dominio R2R3-MYB con funciones de factor de transcripción identificado en maMYB debería liberarse y trasladarse hacia el núcleo para ejercer su función, la topología esperable sería aquella que expone ambos extremos de la proteína hacia el citosol. Para establecer experimentalmente la topología de maMYB en la membrana del RE se empleó una aproximación basada en la técnica *split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid* (MbYTH) (Stagljar et al., 1998; Fetchko and Stagljar, 2004), que permite identificar proteínas que interactúan con proteínas de membrana y también, determinar la orientación de los extremos N- y C-terminal de una proteína de membrana.

En primer lugar, la secuencia de cDNA que codifica para maMYB se clonó en los plásmidos pBT3N y pBT3C para expresar en levadura el dominio Cub-FT fusionado a N- y C- terminal de la proteína cebo (FT-Cub-maMYB y maMYB-Cub-FT), respectivamente. A continuación, para determinar la concentración óptima de 3-AT necesaria y la orientación de los extremos de maMYB (materiales y métodos, apartado 5.3), los plásmidos para expresar cada una de las proteínas cebo se transformaron en la cepa de levadura NMY51, y las cepas resultantes se transformaron de nuevo con los plásmidos control para expresar Alg5-Nubl o NubG. Las levaduras que contenían cada una de las parejas de plásmidos se sembraron en una batería de placas con medio mínimo selectivo suplementado con diferentes concentraciones de 3-AT (0, 1, 2, 4 y 8 mM). Las levaduras que coexpresaban las fusiones FT-Cub-maMYB o maMYB-Cub-FT junto con NubG no pudieron crecer en el medio selectivo sin adenina ni histidina a partir de 4 mM 3-AT, que fue la que se consideró óptima para este estudio, ya que minimizaba los falsos positivos. Los resultados obtenidos mostraron que los extremos N- y C- terminal de la proteína maMYB se encuentran orientados hacia el citosol, ya que las levaduras que coexpresaban las fusiones FT-Cub-maMYB o maMYB-Cub-FT junto con Alg5-Nubl fueron capaces de crecer en el medio selectivo sin adenina ni histidina y suplementado con la concentración de 3-AT mencionada (Figura 26). Este resultado concordaba con la predicción de que la proteína maMYB contiene dos DTMs.

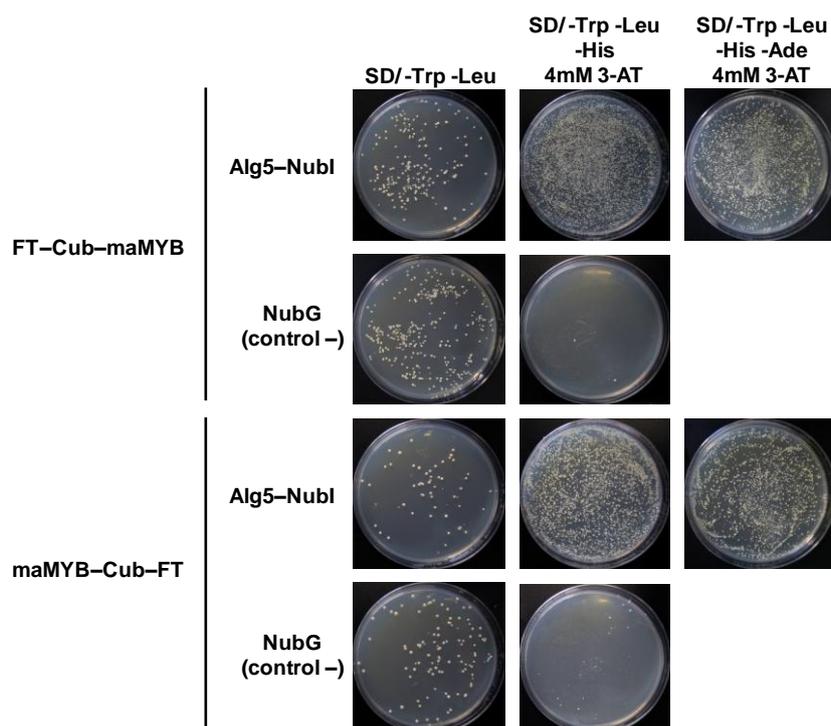


Figura 26. Análisis de la topología de la proteína cebo maMYB en la membrana del RE. Imágenes representativas que muestran el crecimiento de las levaduras que coexpresaban cada una de las combinaciones de proteínas en los medios de cultivo, las condiciones de crecimiento y con la eficacia de la transformación mencionados en el pie de la figura 16, pero suplementando el medio con 4mM 3-AT cuando era necesario.

3. El dominio citoplasmático de la proteína maMYB (maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) se localiza en el núcleo y el nucléolo

Los factores de transcripción de tipo R2R3MYB están principalmente involucrados en procesos específicos de plantas, activando o reprimiendo la expresión de los genes diana en el núcleo (Stracke et al., 2001). Como primera aproximación para obtener evidencias de la posible actividad de maMYB como factor de transcripción, se estudió la localización subcelular de una versión truncada de la proteína que carecía de los DTMs de la región N-terminal. Como se ha explicado en resultados parte I apartado 6, se diseñó una versión truncada de maMYB con una delección de los 90 aminoácidos del extremo N-terminal (maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) (Figura 24), de forma que consistía únicamente en la parte soluble de la proteína. Además, el análisis de la secuencia de aminoácidos de maMYB, había revelado la existencia de dos señales de localización nuclear (NLS) que encajan con la secuencia consenso KK/RXK/R (Chelsky et al., 1989). La secuencia KRSK (aminoácidos 118 a 121) se encuentra en la región comprendida entre el segundo DTM y el subdominio R2-MYB,

mientras que la segunda NLS (KKAK; aminoácidos 201 a 204), se encuentra al final del subdominio R2-MYB (Figura 24).

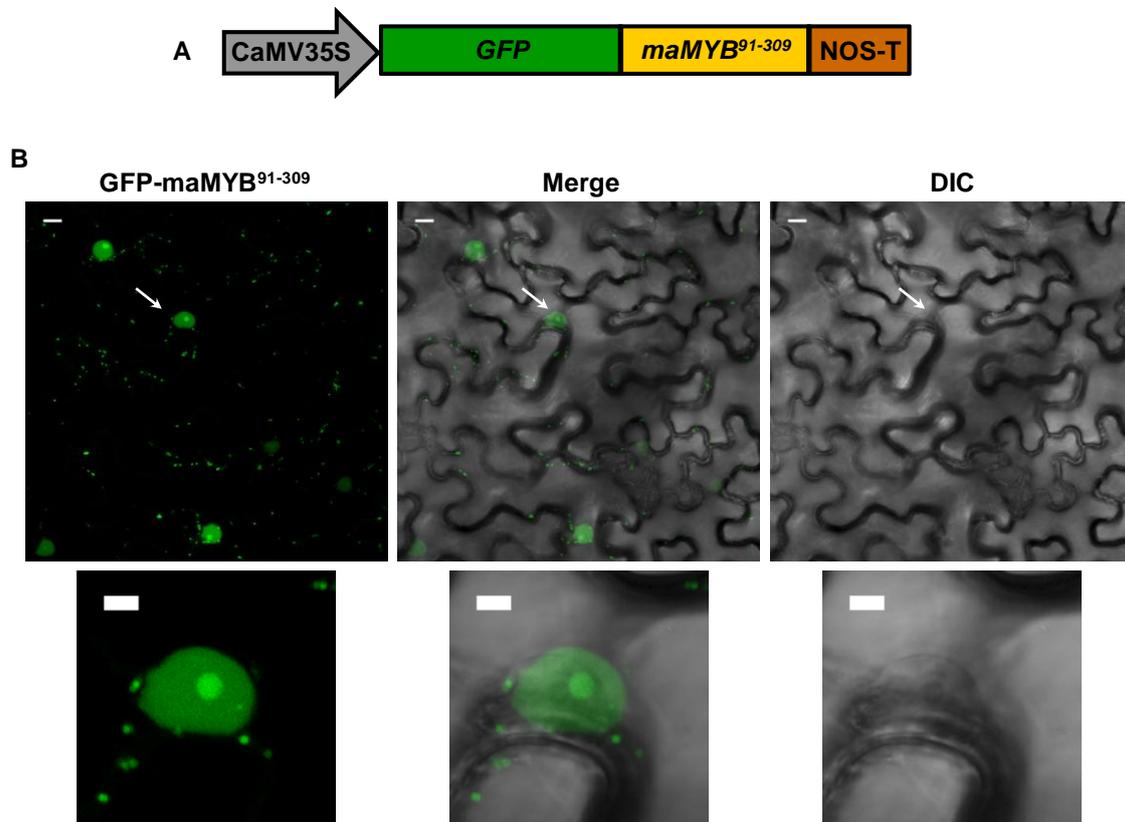


Figura 27. Expresión transitoria de la proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*. **A)** Representación del correspondiente gen quimérico que incluye el promotor constitutivo CaMV35S y el terminador Nos-T. **B)** La imagen de la izquierda, obtenida por microscopía láser confocal, muestra una localización nuclear y, dentro del núcleo, una acumulación preferente en el nucléolo, así como una acumulación en pequeñas partículas citoplasmáticas. La imagen es una proyección tridimensional de 12 secciones de 0,7 μm cada una. La imagen de campo claro en luz transmitida (DIC) se muestra a la derecha, y en la imagen central (*merge*) se muestra la superposición de ambas imágenes. Las barras de escala corresponden a 10 μm . Las flechas marcan la zona que se muestra ampliada debajo de cada imagen principal. Las barras de escala de la ampliación corresponden a 5 μm .

De igual forma a como se procedió para determinar la localización subcelular de maMYB entero (resultados parte II, apartado 1), se preparó una construcción para expresar transitoriamente en células de *N. benthamiana* la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ fusionada al extremo C-terminal de la GFP (GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹), bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (Figura 27A). A los tres días después de la agroinfiltración, se visualizaron los patrones de fluorescencia mediante microscopía

láser confocal. Como se observa en la Figura 27B, la proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ mostró una doble localización, por un lado nuclear, observándose una acumulación específica en el nucléolo, y por otro citoplasmática, en partículas de pequeño tamaño que se encontraban mayormente contorneando la membrana plasmática o alrededor del núcleo. La proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ tiene una masa molecular teórica de 53.5 kDa, por lo que su tamaño excluye la entrada inespecífica al núcleo a través de un proceso de difusión pasiva. El diámetro del canal del poro nuclear, que se estima entre 9 y 10 nm, permite la difusión pasiva de pequeñas moléculas como iones, metabolitos de bajo peso molecular y proteínas por debajo de 40 kDa. Estas pequeñas moléculas pueden atravesar libremente el complejo del poro nuclear en ambos sentidos dependiendo de su gradiente de concentración. Las proteínas de mayor tamaño no pueden pasar a través del complejo del poro nuclear por difusión simple, y se transportan de forma activa gracias a procesos mediados por señal y/o dependientes de energía si va en contra de su gradiente de concentración (Tzfira and Citovsky, 2007).

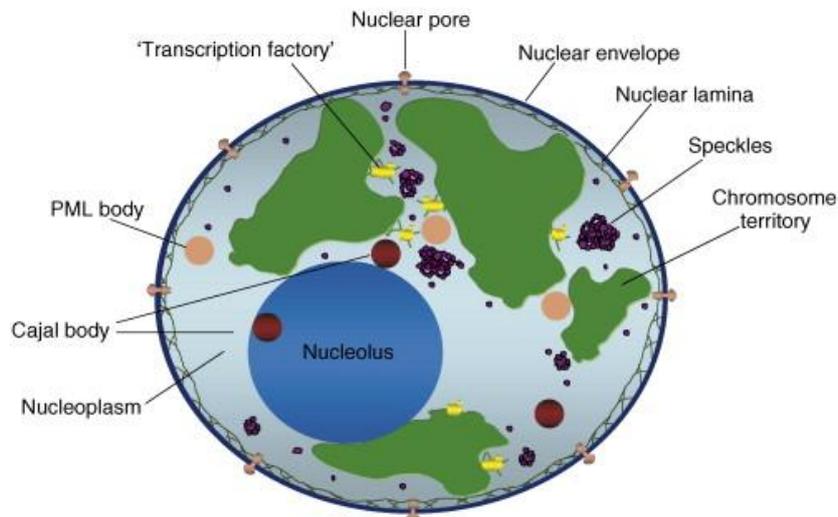
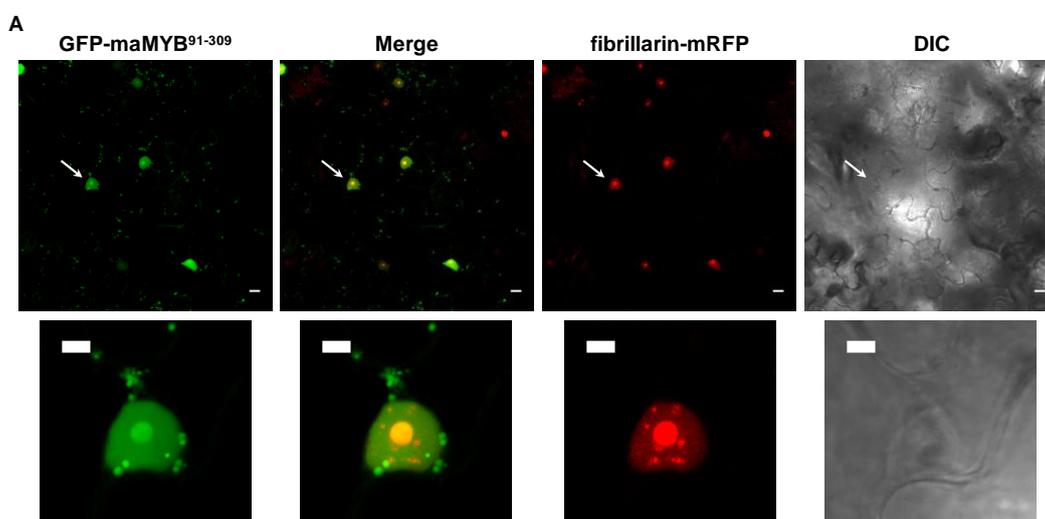
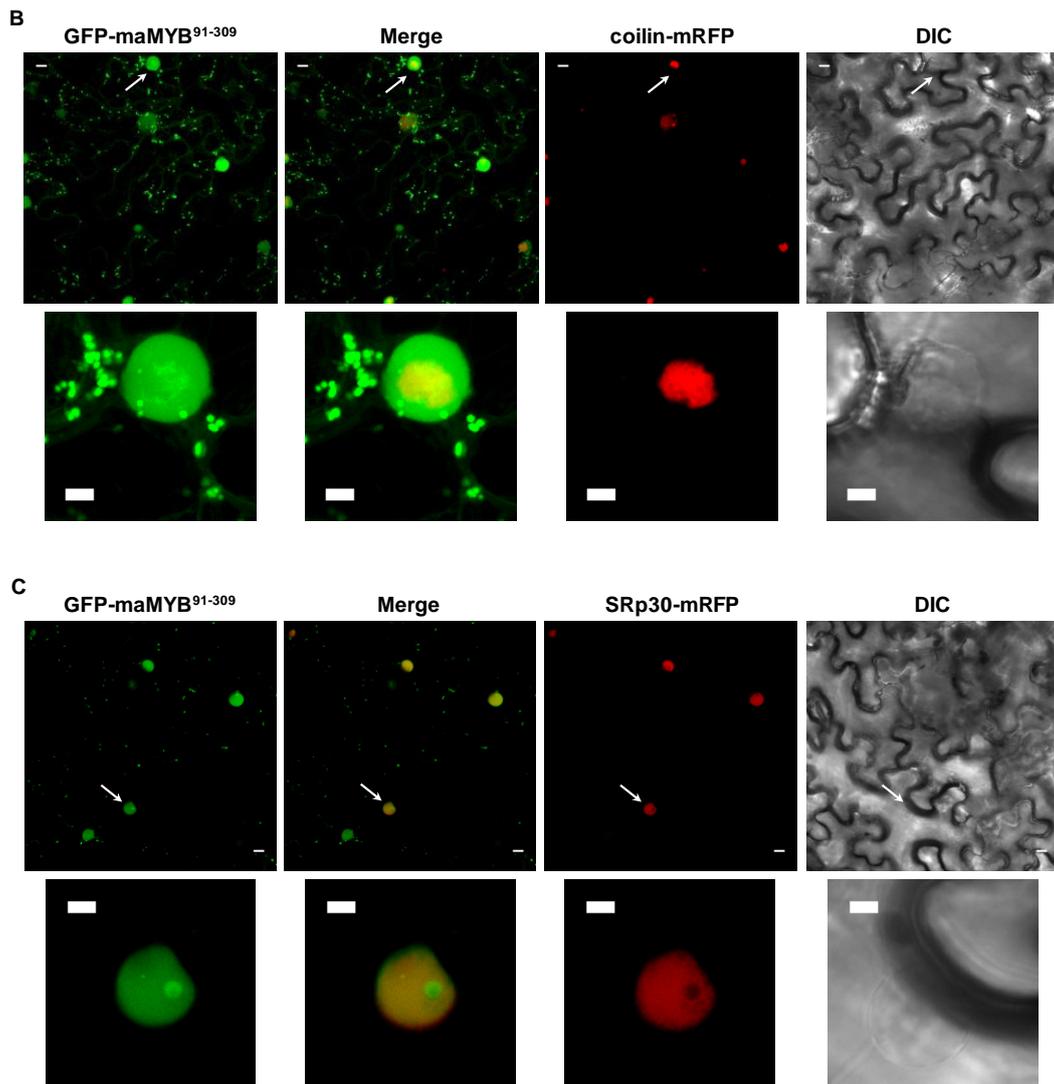


Figura 28. Compartimentos del núcleo de una célula de planta. El núcleo está envuelto por una doble membrana (*nuclear envelope*) que contiene poros (*nuclear pores*) por donde se transportan moléculas hacia y desde el citoplasma. Por debajo de la membrana nuclear se encuentra una red de proteínas estructurales (*nuclear lamina*). En el núcleo los cromosomas ocupan posiciones específicas (*chromosome territories*), y junto a ellos en el nucleoplasma se encuentran estructuras enriquecidas en factores de *splicing* donde tiene lugar el procesamiento del pre-mRNA (*splicing speckles*). Los genes que se transcriben simultáneamente tienden a agruparse en clústers ('*transcription factories*'). El nucléolo (*nucleolus*) está implicado en la biogénesis de los ribosomas y en la maduración de RNA. Los cuerpos de Cajal (*Cajal bodies*) son estructuras esféricas implicadas en varias funciones relacionadas con el procesamiento de varios tipos de RNA. Dispersas en el nucleoplasma, se encuentran unas estructuras esféricas (*PML bodies*) involucradas en la regulación de la transcripción, acumulación de virus, supresión tumoral y reparación del DNA. Figura obtenida de Pontes and Pikaard, 2008.

Para confirmar que la estructura nuclear en la que se concentraba GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ correspondía al nucléolo, esta proteína se coexpresó con varias proteínas marcadoras de cuerpos nucleares (Figura 28) fusionadas a la mRFP (*monomeric red fluorescent protein*). Concretamente, se empleó el marcador del nucléolo fibrilarina (fibrillarín-mRFP), el marcador de cuerpos de Cajal coilina (coilín-mRFP), y el marcador de *splicing speckles* SRp30 (SRp30-mRFP). Los tres marcadores fueron cedidos por el Dr. Jiří Fajkus (Dvorácková, 2010). Las proteínas quiméricas GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ y fibrilarín-mRFP colocalizaron de forma clara y consistente, lo que confirmó que los grandes cuerpos esféricos del interior del núcleo corresponden al nucléolo (Figura 29A). Sin embargo, la expresión difusa y ambigua de los otros dos marcadores, impidió encontrar una colocación concluyente con la expresión de GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, sugiriendo que la proteína no forma parte ni de los cuerpos de Cajal ni de los *splicing speckles* (Figura 29B-C).

Figura 29. Coexpresión transitoria de la proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ con varias proteínas marcadoras de cuerpos nucleares fusionadas a mRFP en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes, obtenidas por microscopía láser confocal, muestran que las acumulaciones nucleares de GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ colocalizan (*merge*) con la proteína marcadora de nucléolo fibrillarín-mRFP (A), mientras que no se encontró una colocación concluyente con la proteína marcadora de cuerpos de Cajal coilín-mRFP (B) ni con la proteína marcadora de *splicing speckles* SRp30-mRFP (C). Las imágenes son una proyección tridimensional de 14 secciones en A y C, y de 7 secciones en B de 1 µm cada una. En cada uno de los casos, a la derecha se muestra la imagen de campo claro en luz transmitida (DIC). Las barras de escala corresponden a 10 µm. Las flechas marcan la zona que se muestra ampliada debajo de cada imagen principal. Las barras de escala de la ampliación corresponden a 5 µm.





Estos resultados demuestran que los DTMs son los responsables de la retención de maMYB en el RE, y aportan la primera evidencia de que en caso de proteolizarse, el dominio citosólico de maMYB puede trasladarse al núcleo, y en particular al nucléolo, donde podría actuar regulando la expresión de determinados genes, o participar en alguno de los procesos que tienen lugar en este orgánulo nuclear.

4. Expresión de la proteína maMYB en diferentes tejidos de Arabidopsis

Para establecer dónde se expresa la proteína maMYB, se analizaron sus niveles de expresión en diferentes tejidos de Arabidopsis mediante *Western blot*,

empleando anticuerpos generados contra un péptido sintético (NKRSKGSTKSDNPP) correspondiente a la secuencia de aminoácidos de maMYB comprendida entre las posiciones 117 a 130 (Figura 24).

Con este fin, se prepararon extractos de proteína total de diferentes tejidos de *Arabidopsis* (Col 0) y de células en cultivo de la línea T87 de *Arabidopsis* en diferentes estadios de crecimiento, que se analizaron por *Western blot* empleando los anticuerpos descritos anteriormente. Como se muestra en la Figura 30, la proteína maMYB, de masa molecular teórica ~34 kDa, se detectó en todos los tejidos aunque los niveles fueron muy distintos. La proteína se expresa mayoritariamente en la raíz y, en menor medida, en la parte aérea de plántulas de 10 días de edad, inflorescencias y tallos. La cantidad de proteína detectada en silicuas, hojas caulinares y semillas fue mucho menor, y prácticamente no se detectó en hojas de roseta. Finalmente, la expresión en las células en cultivo fue muy elevada a los 3 días, para ir disminuyendo progresivamente (5 días) a medida que las células se aproximaban a la fase estacionaria (7 días), momento en el que se realiza la transferencia de las células a medio de cultivo fresco. Estos resultados pusieron de manifiesto la ubiquidad de la expresión de maMYB, si bien la función de maMYB parece desarrollarse principalmente en la raíz y en las células/tejidos que se encuentran en fase de crecimiento y división activos.

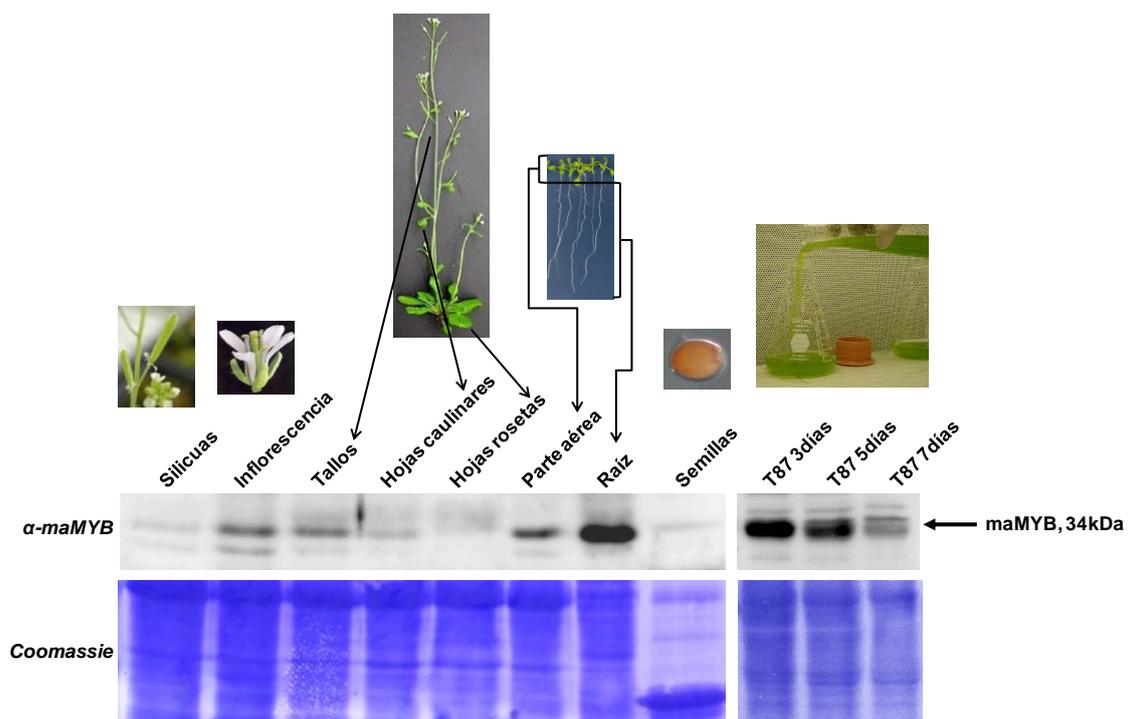


Figura 30. Perfil de expresión de la proteína maMYB en Arabidopsis. Los extractos de proteína total (15 µg) de distintos tejidos de Arabidopsis (Col 0) y de células en cultivo de la línea T87 se analizaron por *Western blot* (panel superior) usando el anticuerpo anti-péptido maMYB descrito en el texto. La posición de la banda correspondiente a maMYB se indica con una flecha. En el panel inferior se muestra la tinción con *Coomassie Blue* de las membranas analizadas. El material vegetal proviene de plántulas, plantas adultas y células en cultivo que crecieron en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad).

5. Patrón de expresión del gen *maMyb::GUS:GFP* en plántulas de Arabidopsis

Con el fin de profundizar en la localización de la expresión del gen que codifica maMYB en plántulas, que es donde se detecta mayoritariamente la proteína (Figura 30), se obtuvieron y analizaron líneas transgénicas de Arabidopsis que expresan de forma estable el gen reportero beta-glucuronidasa (GUS) bajo el control de un fragmento de 813 pb de la región 5'-flanqueante de *maMYB*. Según las anotaciones de genes de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>), dicha secuencia incluiría la región promotora (718 pb) que comparten los genes *At5g45430* y *At5g45420* (*maMYB*), la región 5'-UTR del gen *maMYB* (9 pb) y un fragmento de la región 5'-UTR del gen *At5g45430* (23 pb) (Figura 31).

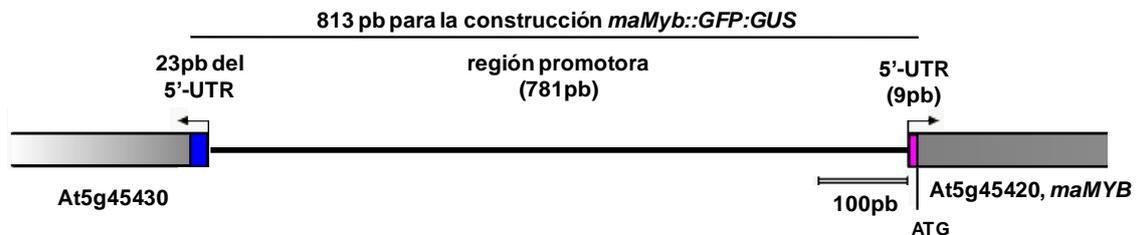


Figura 31. Esquema de la región genómica comprendida entre los genes At5g45430 y At5g45420 (*maMYB*). El promotor del gen quimérico *maMYB::GUS:GFP* consiste en un fragmento de 813 pb situado a 5' del codón ATG de inicio de traducción del gen maMYB (*At5g45420*), que incluye la región promotora compartida por los genes *At5g45430* y *At5g45420* (*maMYB*), la región 5'-UTR del gen maMYB (rosa) y un fragmento de la región 5'-UTR del gen *At5g45430* (azul).

El análisis histoquímico de la actividad GUS se realizó en plántulas transgénicas de 8 días de edad crecidas en condiciones de día largo. Como se muestra en la Figura 32, la expresión del gen *maMyb::GFP:GUS* se detectó mayormente en el tejido vascular de los cotiledones (32C), la raíz primaria (32D) y las

raíces laterales (32G). En la punta de las raíces primarias y laterales se observó expresión en la zona de maduración (región donde surgen los pelos radiculares) y en parte de la zona de elongación (región donde se produce crecimiento y elongación de las células), pero no en la zona meristemática (región donde tiene lugar la división celular para generar nueva raíz) ni en los pelos radiculares (32G-L). En la parte aérea se observó también expresión en la parte inferior del hipocotilo y en la región distal de las hojas verdaderas, así como una tinción GUS más débil en las áreas circundantes, que podría ser debida a un cierto grado de difusión de la tinción (32C). Estas observaciones en conjunto, indican que la expresión del gen *maMYB* se concentra mayoritariamente en el tejido vascular tanto en la parte aérea como en la raíz.

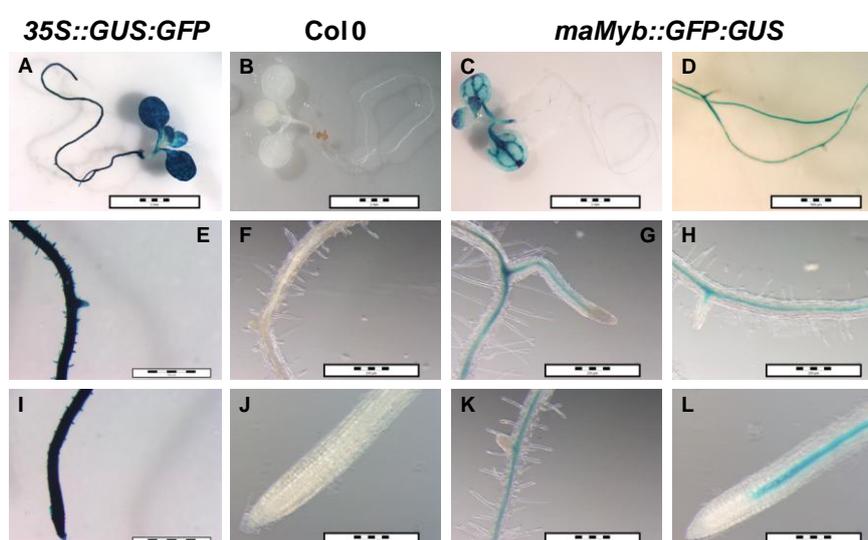


Figura 32. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plántulas de *Arabidopsis* transformadas con el gen quimérico *maMyb::GFP:GUS*. Las plántulas se hicieron crecer durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y se incubaron con el sustrato X-Gluc durante 24h. Como control positivo se usó una línea Col 0 que expresa constitutivamente el gen reportero *GUS-GFP* (cedida por el Dr. Manuel Rodríguez Concepción, y como control negativo Col 0 *wild-type*). La barra de escala corresponde a 2 mm en A, B y C; 500 μ m en D, E, I; y 200 μ m en F, G, H, J, K y L. El análisis de las plántulas se realizó mediante un estereomicroscopio Olympus SZX16 acoplado a una cámara Olympus DP71.

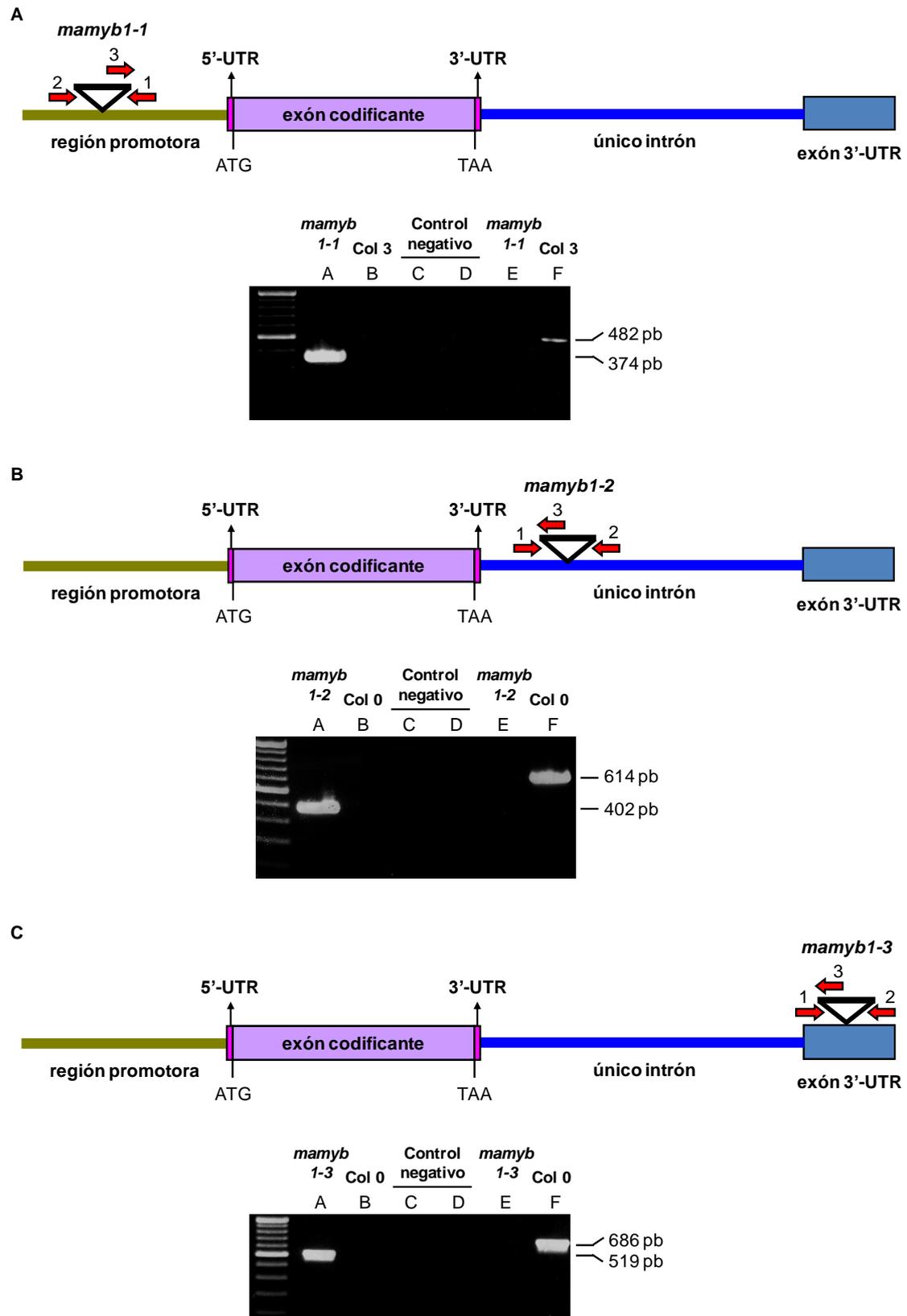
6. Identificación y caracterización de líneas mutantes con pérdida de función del gen *maMYB* por inserción de T-DNA

Para investigar la función biológica de la proteína maMYB, se buscaron mutantes con pérdida de función del gen en la base de datos T-DNA *express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Se identificaron dos candidatos

pertenecientes a la colección SAIL (*Syngenta Arabidopsis Insertion Library*) (Sessions et al., 2002; McElver et al., 2001): SAIL_423_B04 (*mamyb1-1*) y SAIL_503_C01 (*mamyb1-2*), y un candidato perteneciente a la colección GABI-Kat (Kleinboelting et al., 2012): GABI_311C08 (*mamyb1-3*).

Según la información proporcionada en las bases de datos acerca de estos mutantes, las inserciones de T-DNA se encontraban en las posiciones -475 (*mamyb1-1*), +1271 (*mamyb1-2*), y +2341 (*mamyb1-3*) respecto a la primera base del codón ATG de inicio de traducción. Con el fin de asegurar la veracidad de dicha información y de establecer la posición exacta de la inserción del T-DNA en cada mutante, se amplificó y secuenció la región genómica flanqueante del elemento de inserción (Figura 33). La posición de las inserciones era la indicada, excepto en el mutante *mamyb1-3*, en el que el T-DNA se encontraba insertado en la posición +2391. Según las anotaciones de genes de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>), el gen *maMYB* consta de dos exones separados por un único intrón, el primero codificante y flanqueado por pequeñas regiones 5' y 3'-UTR, y el segundo no codificante y por tanto conteniendo el resto de región 3'-UTR del gen. En la Figura 33 se muestra la estructura de los alelos mutantes, que en ninguno de los casos tenían el T-DNA insertado en la región codificante.

Figura 33. Genotipado por PCR de las líneas mutantes homocigotas para las inserciones de T-DNA en el gen *maMYB*. Esquema de los alelos mutantes *mamyb 1-1* (A), *mamyb 1-2* (B) y *mamyb 1-3* (C), donde se indica la posición de la inserción de T-DNA. Las flechas rojas indican la posición de los *primers* utilizados en el genotipado, cuyos resultados se muestran debajo de cada esquema. Los carriles A y B corresponden a los resultados de la amplificación empleando los *primers* 1 y 3. Se observa una banda del tamaño esperado para cada uno de los alelos mutantes (carriles A) que no se amplifica en el fondo genético *wild type* (carriles B). Los carriles E y F muestran el resultado de la amplificación de un fragmento del gen endógeno empleando los *primers* 1 y 2. Las bandas del tamaño esperado solo aparecen en los carriles correspondientes a las muestras de cada fondo genético *wild type*. Los carriles C y D corresponden a los controles negativos sin muestra de DNA empleando los *primers* 1-3 y 1-2, respectivamente.

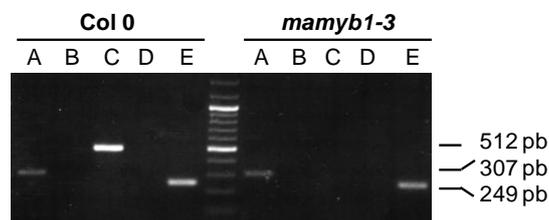
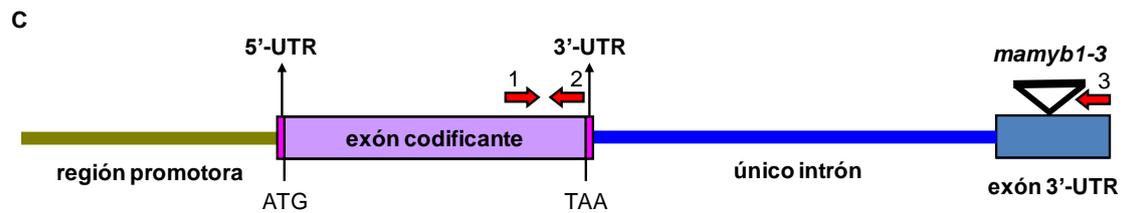
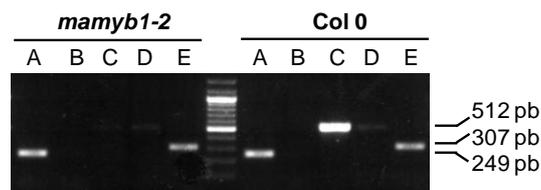
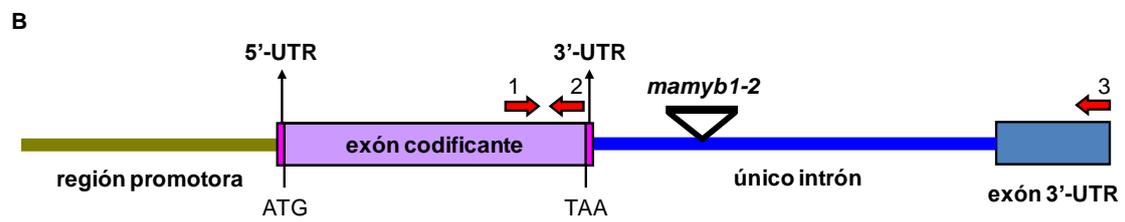
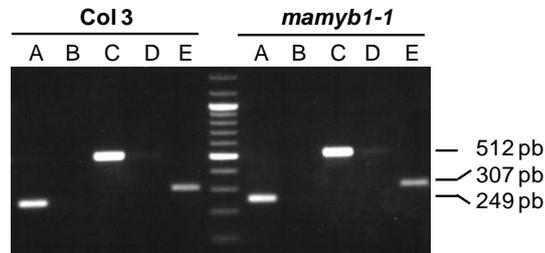
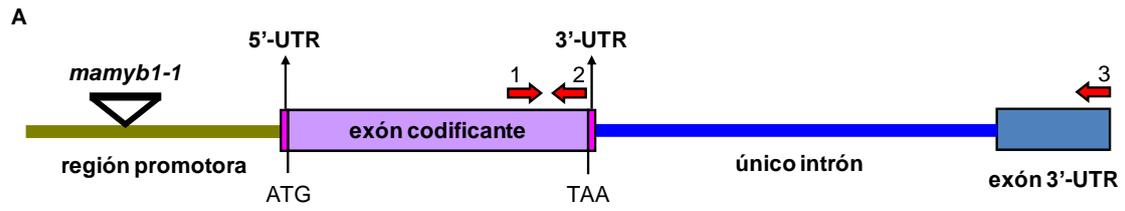


A continuación, se obtuvieron líneas homocigotas con una sola inserción de T-DNA, que se seleccionaron en base a la segregación del carácter de resistencia al

herbicida BASTA en el caso de *mamyb1-1* y *mamyb1-2*, y sulfonamida en el caso de *mamyb1-3*. Para acabar de confirmar que las líneas obtenidas eran homocigotas, se genotiparon por PCR (Figura 33).

En las tres líneas mutantes se analizó la expresión del mRNA del gen *maMYB* mediante RT-PCR semicuantitativo, comparándose el resultado con la de los correspondientes fondos genéticos *wild type* (Col 0 y Col 3). En los tres casos se emplearon las parejas de *primers* 1 y 2, que permiten amplificar un fragmento del extremo 3' del exón codificante, y los *primers* 1 y 3, que permiten amplificar un fragmento que, además del extremo 3' del exón codificante, también incluye gran parte del exón 3'-UTR. Como se puede ver en la Figura 34, solo la línea *mamyb1-1* expresó el mensajero completo, mientras que en las otras dos líneas la inserción de T-DNA impedía la expresión del extremo 3' del mRNA. A pesar de ello, en estas dos líneas mutantes se detectó la expresión del fragmento de mRNA correspondiente a la región codificante. Además, en todos los casos, los niveles del mRNA *maMYB* fueron iguales a los detectados en los correspondientes fondos genéticos *wild type*. Este resultado, unido a que el fenotipo de los tres mutantes era aparentemente normal, sugería que la función biológica de *maMYB* permanecía inalterada.

Figura 34. Determinación de los niveles de mRNA del gen *maMYB* en los mutantes *mamyb1-1* (A), *mamyb1-2* (B) y *mamyb1-3* (C). Se muestra el esquema de los alelos *mamyb* con la localización de la inserción de T-DNA en cada caso, y la posición de los *primers* 1 y 2 (situados en el exón codificante), y del *primer* 3 (situado en el exón 3'-UTR). Debajo de cada esquema se muestra el resultado del análisis por RT-PCR usando los *primers* 1-2, que permiten amplificar un fragmento de 307 pb correspondiente a la región codificante (carril A), y 1-3 (carril C) que permiten amplificar un fragmento de 512 pb que incluye los 307 pb correspondientes a la región codificante y 205 pb de la región 3'-UTR, junto al correspondiente control negativo para cada pareja de *primers* (carriles B y D, respectivamente). El carril E muestra el resultado de la amplificación de un fragmento de 249 pb correspondiente al gen que codifica para la proteína PP2AA3 (subunidad A3 de la proteína fosfatasa 2A, At1g13320).



7. Silenciamiento inducible de la expresión del gen *maMYB* mediante la sobreexpresión de amiRNA

La imposibilidad de identificar alelos mutantes por inserción de T-DNA con expresión reducida o nula de *maMYB* en las colecciones públicas, sugería que el gen *maMYB* es esencial. Por lo tanto, se planteó una estrategia alternativa para superar esta limitación, basada en el silenciamiento condicional del gen *maMYB* mediante RNA interferente (RNAi) de tipo amiRNA (*artificial microRNA*).

Para diseñar la secuencia del amiRNA se empleó la herramienta bioinformática WMD (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), que tiene en cuenta los parámetros de los miRNAs endógenos de plantas dirigidos para silenciar específicamente un gen diana (Schwab et al., 2005). En nuestro caso se escogieron dos secuencias de amiRNAs (amiRNA 1 y amiRNA 2) que hibridarían en zonas distintas del gen *maMYB* (Figura 35), para asegurarse que los efectos producidos por los amiRNAs eran específicos del silenciamiento de *maMYB*.

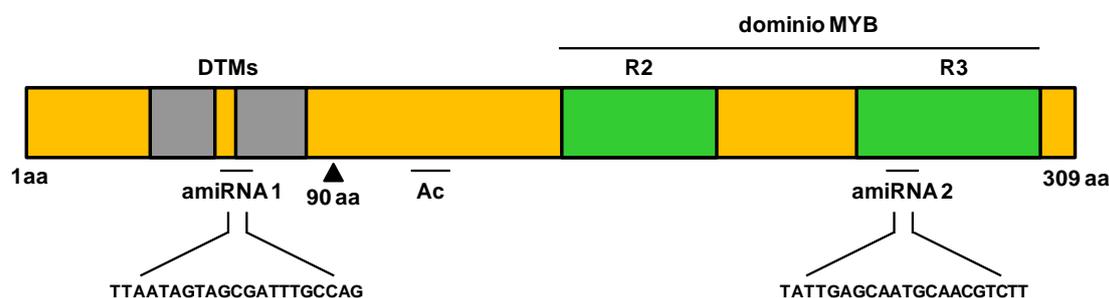


Figura 35. Esquema de la proteína *maMYB* y secuencia nucleotídica de los amiRNA empleados para silenciar la expresión del gen. Se muestran las secuencias y la posición respecto a la estructura de la proteína de los dos amiRNAs diseñados para silenciar *maMYB*. amiRNA 1 hibridaría en la región del mRNA *maMYB* que codifica los DTMs y amiRNA 2 lo haría en la región que codifica el subdominio R3-MYB. El triángulo negro indica la posición a partir de donde empieza la versión truncada de *maMYB* sin los DTMs (*maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹). También se muestra la zona en la que hibridaría el anticuerpo anti-péptido *maMYB* (Ac).

Para llevar a cabo el objetivo planteado, se utilizó un promotor inducible basado en el receptor de la hormona ecdisona de insectos, que es un miembro de la familia de receptores esteroideos (Wing, 1988). Dicho sistema, adaptado para su uso en laboratorio (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004), se activa empleando un agonista no esteroideo de la ecdisona llamado metoxifenocida, que presenta la ventaja de no

ser tóxico para la planta y ser efectivo a muy bajas concentraciones, del orden de μM (Dhadialla et al., 1998; Koo et al., 2004). El plásmido pB110-Red-2844 (Figura 36), que tiene integrado este sistema de promotor inducible, fue cedido por el Dr. Edgar B. Cahoon del Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Missouri, USA).

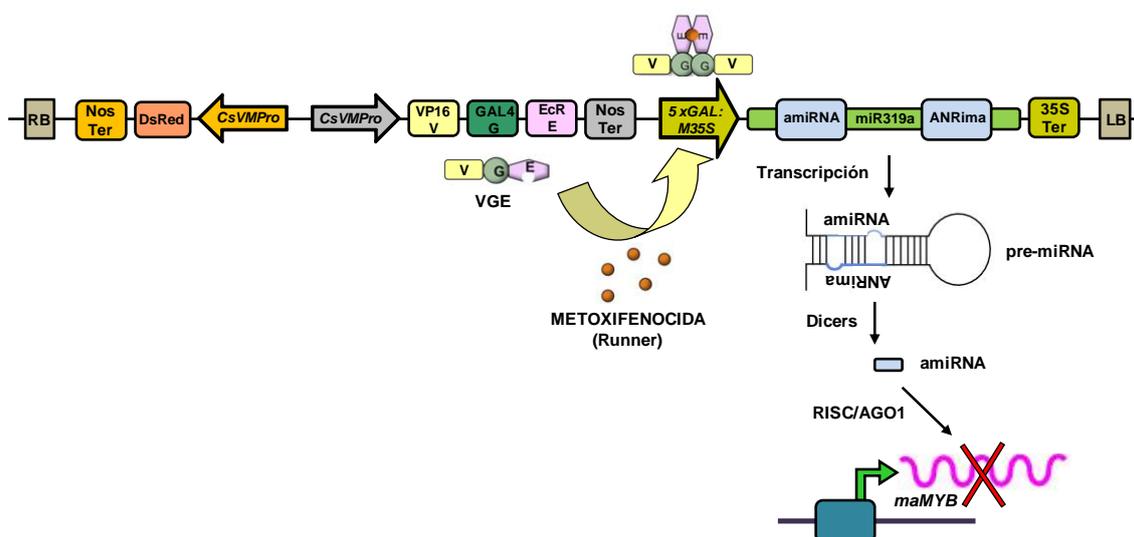


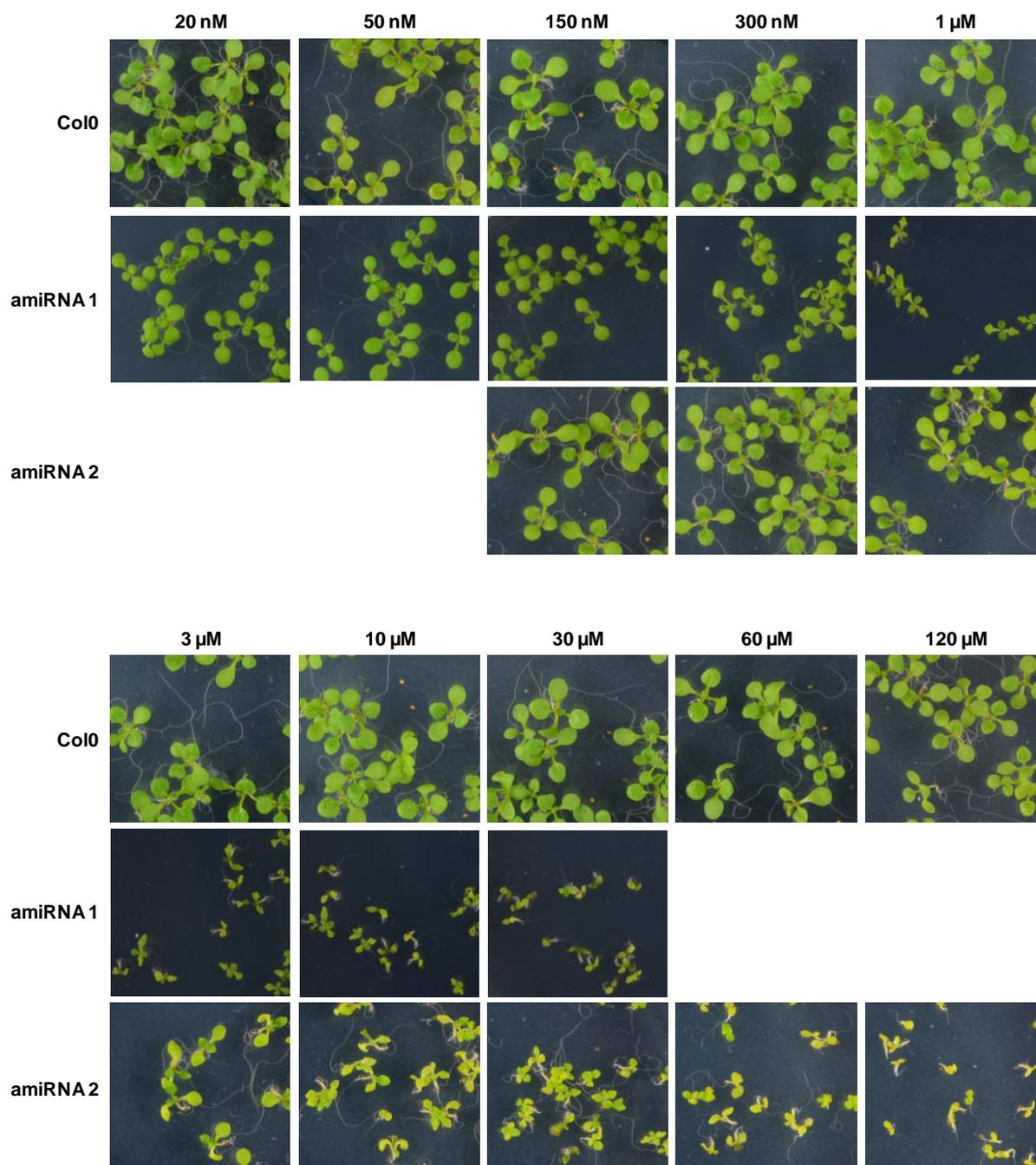
Figura 36. Esquema de la construcción para silenciar el gen *maMYB* mediante un amiRNA expresado bajo el control de un promotor inducible. El cassette del vector pB110-Red-2844 expresa de forma constitutiva, bajo el control del promotor CsVM (promotor del virus del mosaico de la nevadura de mandioca), un factor de transcripción híbrido (VGE), formado por tres dominios: el dominio de activación VP16 (V), el dominio de unión a DNA GAL4 (G), y el dominio del receptor de ecdisona EcR (E). Los amiRNA diseñados se integraron dentro del esqueleto del gen miR319a, un precursor de miRNA (pre-miRNA) endógeno de *Arabidopsis*. En presencia del inductor químico metoxifenocida (nombre comercial Runner), el factor de transcripción VGE dimeriza y se une al promotor diana 5xGAL:M35S (que contiene 5 copias del elemento de respuesta a GAL4 fusionado al promotor mínimo CaMV35S), activando la expresión del pre-miRNA. Posteriormente, la maquinaria endógena de la planta, a través de las ribonucleasas de tipo *Dicer*, genera los amiRNAs dirigidos específicamente contra el gen diana, a través del complejo de proteínas RISC (que contiene la proteína argonauta AGO1). La selección de las plantas transgénicas se realiza mediante la proteína marcadora DsRed, que permite identificar las semillas transgénicas por la fluorescencia roja que emiten. Abreviaciones: RB, *right border*; Nos Ter, terminador del gen de la nopalina sintasa; 35S Ter, terminador del gen 35S; LB, *left border*. Figura adaptada de Martínez-Andújar et al., 2011.

Después de integrar los amiRNAs diseñados en el esqueleto del pre-miRNA miR319a, usando como molde el plásmido RS300 (cedido por el Dr. Detlef Weigel; Ossowski et al., 2008), los productos resultantes se clonaron en el plásmido pB110-Red-2844 y se obtuvieron líneas transgénicas de *Arabidopsis* con los dos amiRNAs. Los transformantes se seleccionaron por medio de la detección de la fluorescencia roja

emitida por sus semillas y las líneas transgénicas se propagaron hasta obtener líneas T₃ homocigotas. Para cada amiRNA se seleccionó una línea con la que seguir trabajando, que se denominaron amiRNA 1 y amiRNA 2.

Los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 crecidos en las mismas condiciones en medio MS suplementado con 60 µM del inductor metoxifenocida, que es la concentración utilizada habitualmente (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004), mostraron una alteración del desarrollo de las plántulas con una disminución generalizada del tamaño de la parte aérea y de la raíz, siendo el fenotipo más drástico en el mutante amiRNA 1 que en el mutante amiRNA 2. Por ello, se procedió a establecer una concentración de metoxifenocida menor que provocara un fenotipo lo más homogéneo y similar posible en los dos mutantes. Para ello, plántulas amiRNA 1, amiRNA 2 y Col 0 se hicieron crecer desde la germinación en presencia de varias concentraciones de metoxifenocida (entre 20nM y 30 µM en el caso de amiRNA1, y entre 150 nM y 120 µM en el caso de amiRNA2). A partir del octavo día ya era posible ver claramente una alteración del fenotipo en las plántulas transgénicas que era, además, dependiente de la dosis del inductor, mientras que las plantas Col 0 no se veían afectadas por ninguna de las concentraciones del inductor (Figura 37). A partir de estos resultados, para estudiar los efectos derivados de la inactivación del gen *maMYB*, se decidió crecer los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad), en presencia de una concentración 30 µM de metoxifenocida desde el momento de la germinación. Esta concentración del inductor provocaba la aparición de un fenotipo claro, homogéneo y repetitivo, que al no ser excesivamente drástico, permitía obtener material vegetal suficiente para realizar los experimentos necesarios. Teniendo en cuenta que la inactivación del gen *maMYB* producía efectos en la raíz, en adelante se escogió el medio de crecimiento con mitad de concentración de sales (½ MS), ya que es el más apropiado para analizar el fenotipo de raíz.

Figura 37. Análisis dosis-respuesta del inductor metoxifenocida sobre el fenotipo de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2. Imágenes representativas de plántulas amiRNA 1, amiRNA 2 y Col 0 crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio MS suplementado con concentraciones crecientes de metoxifenocida, indicadas en la parte superior de las imágenes, desde el momento de la germinación. Las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon D7000.



7.1 Caracterización molecular de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2

Para poder comparar los fenotipos de los mutantes era necesario disponer de las correspondientes plantas control. Para ello, el cassette del vector pB110-Red-2844 sin marco de lectura abierto bajo el control del promotor inducible (materiales y métodos, apartado 3.3.8) se transformó en plantas Col 0 de *Arabidopsis* y se obtuvo una línea homocigota (vector vacío). Al crecer este control en presencia del inductor metoxifenocida, se activa el factor de transcripción híbrido VGE del mismo modo que

en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 (Figura 36), con la diferencia de que bajo el control del promotor activado por VGE no se expresa ningún gen.

7.1.1 Determinación de los niveles de expresión del mRNA de *maMYB*

Con el objetivo de analizar la eficacia del silenciamiento del gen *maMYB* en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2, se determinaron los niveles de mensajero del gen *maMYB* mediante la técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) en muestras de RNA total de plántulas de los dos mutantes, crecidas en presencia del inductor metoxifenocida según las condiciones descritas en la Figura 38.

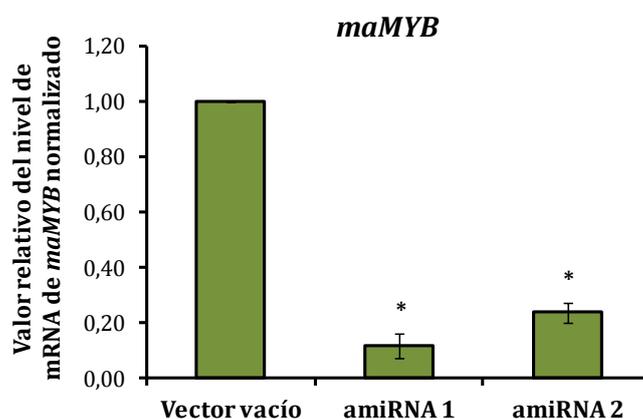


Figura 38. Determinación cuantitativa de los niveles de mRNA de *maMYB* en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2. El análisis por qRT-PCR se realizó a partir de RNA total de plántulas de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 y del control vector vacío, crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio ½ MS suplementado con 30 µM del inductor metoxifenocida. Los niveles de mRNA *maMYB* se normalizaron en relación a los niveles de mRNA del gen *PP2AA3* (At1g13320). El análisis cuantitativo se realizó mediante el método comparativo de C_t (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), que asume como 2 la eficiencia de los *primers* (Livak and Schmittgen, 2001; Wong and Medrano, 2005). Los niveles normalizados de mRNA *maMYB* se expresan en relación a la cantidad de mRNA *maMYB* en el control vector vacío, al que se le atribuyó el valor 1. Los resultados son la media de 2 replicas biológicas independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos muestran los valores que son significativamente distintos (* $p < 0.05$) cuando se comparan con el control vector vacío.

Los resultados obtenidos (Figura 38) demostraron que los niveles de expresión de *maMYB* se redujeron más de un 75% en el mutante amiRNA 2 y casi un 90% en el

mutante amiRNA 1, en comparación con los existentes en el control vector vacío, lo que puso de manifiesto la efectividad del sistema de silenciamiento empleado.

7.1.2 Análisis de la expresión de la proteína maMYB

A continuación, se analizaron los niveles de proteína maMYB en extractos de proteína total de plántulas de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 y del control vector vacío crecidas en presencia del inductor metoxifenocida según las condiciones descritas en la Figura 39. Posteriormente, las muestras se analizaron por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-péptido maMYB descrito en el apartado 4 de este bloque de resultados.

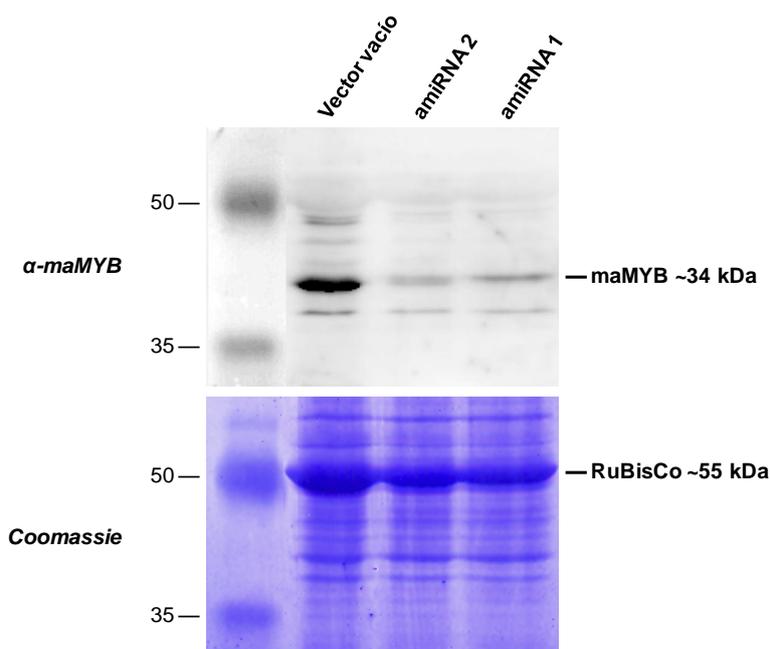


Figura 39. Niveles de proteína maMYB en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2. Extractos proteicos (15 μ g) obtenidos a partir de plántulas de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 y de plántulas control (vector vacío), crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μ M metoxifenocida, se fraccionaron por SDS-PAGE (12.5%) y se analizaron por *Western blot* (panel superior) usando el anticuerpo anti-péptido maMYB. Se indica la posición de la banda correspondiente a maMYB, cuya masa molecular teórica es de ~34 kDa. En el panel inferior se muestra la tinción con *Coomassie Blue* de la membrana analizada y se indica la posición de la subunidad grande de la RuBisCo, de masa molecular ~55 kDa.

Como se observa en la Figura 39, el silenciamiento de la expresión del gen *maMYB* provocó una disminución drástica de los niveles de proteína *maMYB* en las dos líneas *amiRNA* tratadas con metoxifenocida, en comparación con los niveles detectados en la muestra control, lo que concordaba con la menor expresión del gen observada en los análisis por qRT-PCR. Por otra parte, destaca el hecho de que *maMYB* migraba con una masa molecular aparente de ~42 kDa, que es sensiblemente superior a la masa molecular teórica calculada a partir de su secuencia de aminoácidos (~34 kDa). Ello podría deberse, por ejemplo, a que *maMYB* es susceptible de sufrir modificaciones postraduccionales que podrían modificar su capacidad de unión al detergente SDS y, en consecuencia, alterar su movilidad electroforética. A pesar de esta discordancia de tamaño, la intensa banda que detectó el anticuerpo en la muestra control y la pronunciada disminución de su intensidad en las líneas *amiRNA*, confirmaron que la banda corresponde a la proteína *maMYB* y que el anticuerpo es específico contra dicha proteína. Por último, en la tinción de la membrana con Coomassie Blue se aprecia que en las muestras de los mutantes silenciados, la cantidad de proteína correspondiente a la subunidad grande de la RuBisCo fue algo menor que en la muestra control, lo que podría ser un reflejo del fenotipo clorótico observado en hojas y cotiledones cuando se silencia la expresión de *maMYB*.

7.2 Efecto del silenciamiento del gen *maMYB* sobre el fenotipo de las plántulas

Para determinar las consecuencias del silenciamiento de *maMYB*, se comparó el fenotipo de los mutantes *amiRNA* 1 y *amiRNA* 2 crecidos en medio ½ MS en presencia (muestras problema) y en ausencia (muestras control) del inductor en las condiciones fijadas tras el análisis dosis-respuesta (Figura 37).

7.2.1 Efectos sobre el desarrollo de la parte aérea y la raíz

Al comparar los mutantes *amiRNA* 1 y *amiRNA* 2 crecidos en ausencia y en presencia de metoxifenocida en placas dispuestas en posición horizontal (Figura 40A A-D), se observó una disminución generalizada del tamaño de las plantas, tanto de la parte aérea como de la raíz. El hipocotilo era más corto y el primer par de hojas verdaderas eran más pequeñas, hasta el extremo de que en algunos casos todavía no

eran visibles al cabo de 8 días de crecimiento. Los cotiledones también se veían afectados, ya que los bordes se curvaban hacia el interior de la cara abaxial y ello hacía que adoptasen una forma en punta de flecha. En algunos casos la curvatura se producía en una zona cercana al peciolo, haciendo que gran parte del cotiledón se doblase hacia abajo. Además, tanto las hojas verdaderas como los cotiledones presentaban una ligera clorosis. Por último, las células epiteliales de la cara abaxial de los cotiledones presentaban un fenotipo bastante alterado, con un menor tamaño y unas formas desestructuradas y anómalas (Figura 40B).

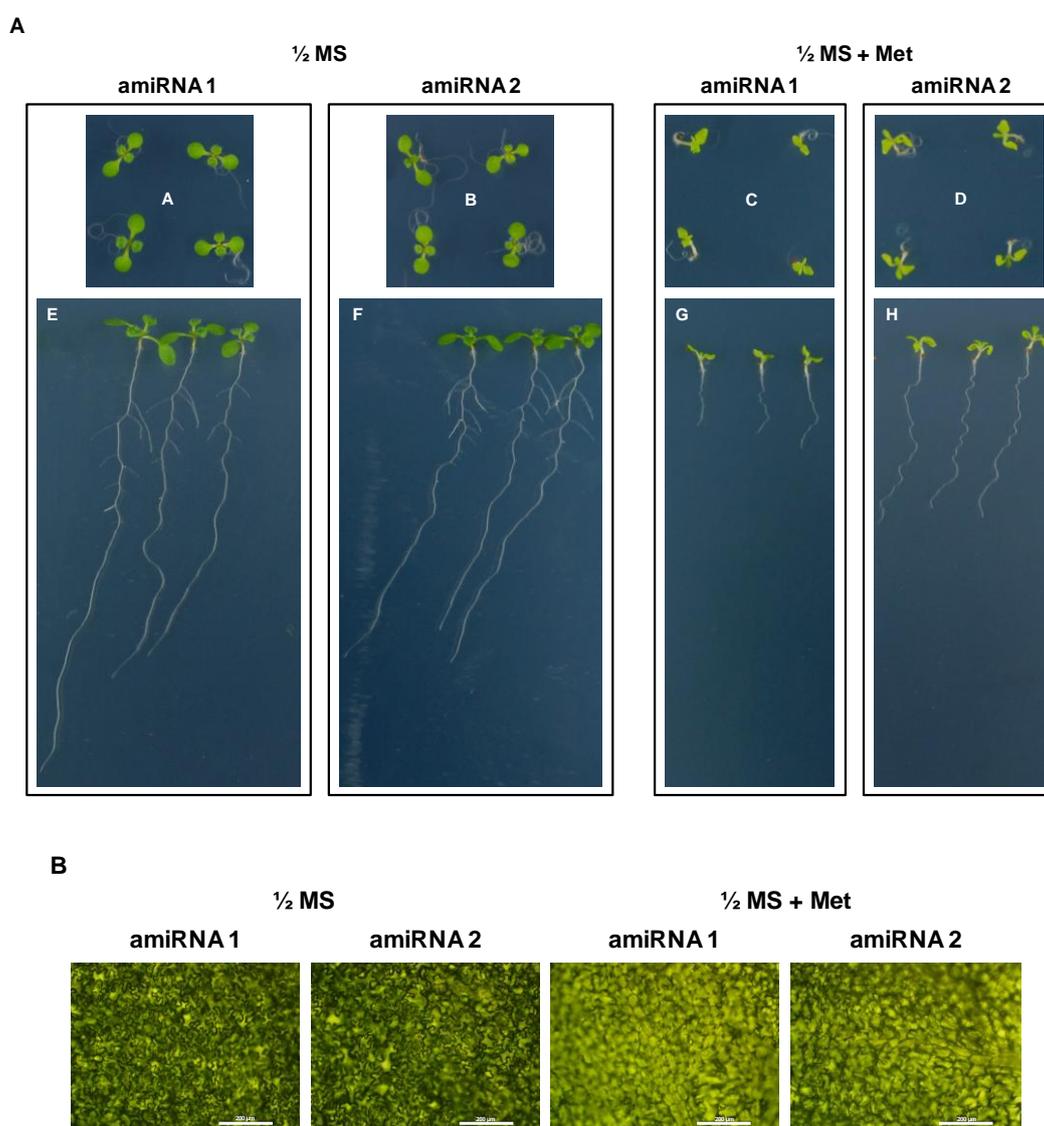


Figura 40. Análisis del fenotipo en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2. A) Imágenes representativas de plántulas amiRNA 1 y amiRNA 2, crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en placas con medio $\frac{1}{2}$ MS y medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μ M metoxifenocida ($\frac{1}{2}$ MS + Met), dispuestas en posición horizontal (A-D) y vertical (E-H). Las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon D7000. **B)** Imágenes de las células

epiteliales de la cara abaxial del cotiledón de plántulas amiRNA 1 y amiRNA 2 crecidas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio Zeiss Axiophot (objetivo 20x). La barra de escala corresponde a 200 μm .

Cuando el mismo experimento se llevó a cabo en placas dispuestas en posición vertical (Figura 40A E-H) se observó que la raíz primaria también era mucho más corta y no tenía prácticamente raíces secundarias. En definitiva, el desarrollo de la raíz, al igual que el de la parte aérea, también se mostraba más retrasado como consecuencia del silenciamiento de la expresión de *maMYB*. En todos los casos las alteraciones fenotípicas fueron más severas en el mutante amiRNA 1 que en el amiRNA 2.

7.2.2 Efecto sobre el desarrollo de los pelos radiculares y la estructura de la raíz primaria

Para profundizar en el análisis del fenotipo producido por el silenciamiento de *maMYB* en la raíz, se procedió al estudio microscópico de los pelos radiculares en las líneas amiRNA 1 y amiRNA 2 crecidas en ausencia y en presencia del inductor.

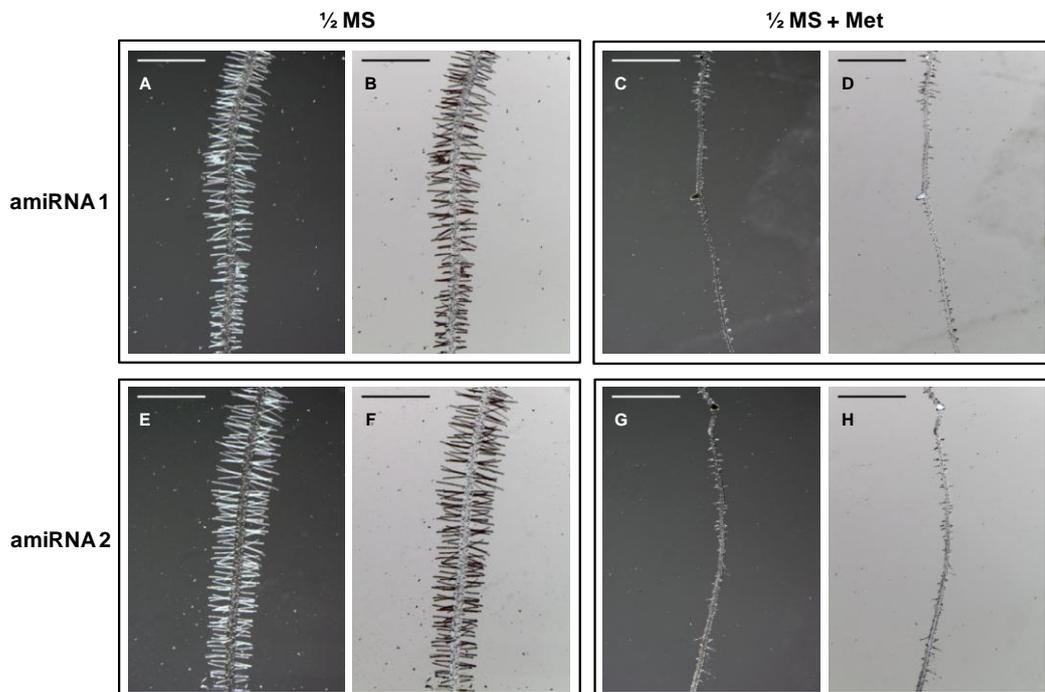


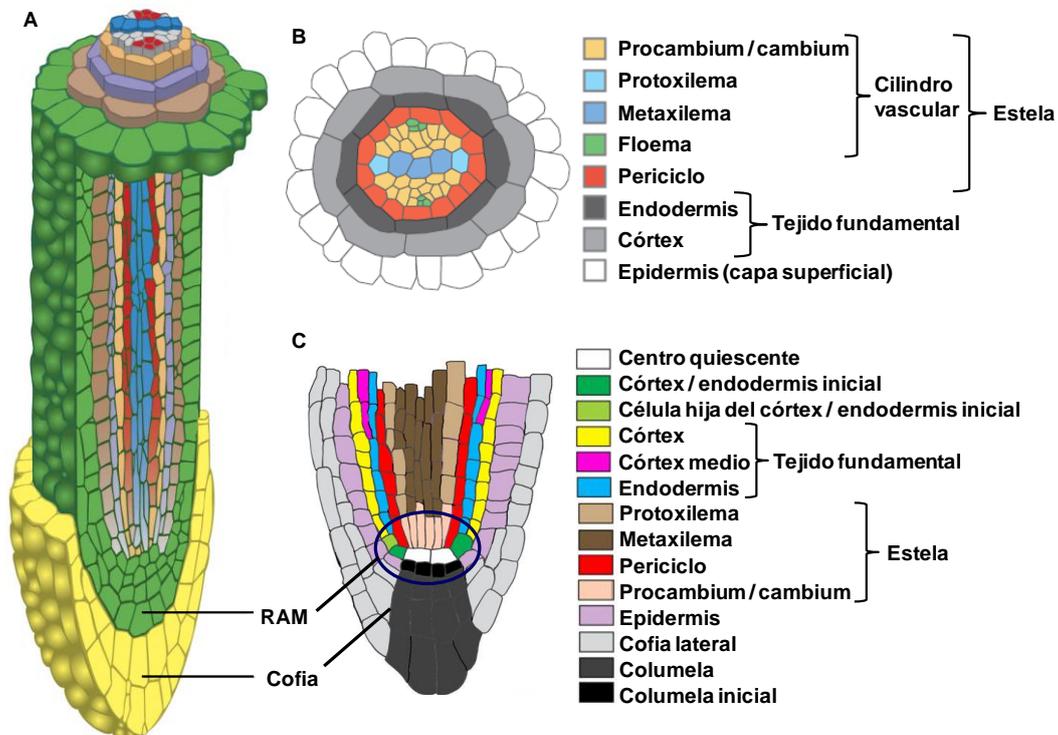
Figura 41. Efecto del silenciamiento de *maMYB* sobre el desarrollo de los pelos radiculares. Imágenes de la región situada a unos 5 mm por encima de la punta de las raíces

de los mutantes amiRNA 1 (A-D) y amiRNA 2 (E-H), crecidos durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en placas con medio ½ MS y medio ½ MS suplementado con 30 µM metoxifenocida (½ MS + Met), dispuestas en posición vertical. Dentro de cada recuadro la imagen de la derecha es la foto original y la imagen de la izquierda es su versión en negativo. Las barras de escala corresponden a 1 mm. Las imágenes se obtuvieron mediante un estereomicroscopio Olympus SZX16 acoplado a una cámara Olympus DP71.

Al comparar las raíces de las plantas crecidas en estas condiciones (Figura 41) se observó que al inducir el silenciamiento de maMYB el desarrollo de los pelos radiculares se alteraba drásticamente, observándose un acortamiento muy marcado de su longitud y la existencia de zonas de la raíz en la que éstos eran prácticamente inexistentes, lo que, consecuentemente, hacía disminuir el número de pelos radiculares a lo largo de la raíz primaria, es decir, la densidad de pelos radiculares. Estos resultados demostraron que la función maMYB es esencial para el correcto desarrollo de los pelos radiculares.

La estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* consiste en varias capas concéntricas de células (Figura 42). Una raíz madura de *Arabidopsis* está formada, de fuera hacia dentro, por la epidermis, el córtex, el córtex medio (que aparece entre los 7 y 14 días después de la germinación (Pauluzzi et al., 2012), la endodermis, el periciclo y el cilindro vascular, que está compuesto por el xilema, el floema y el procambium/cambium. La punta de la raíz está cubierta por una capucha llamada cofia, que está formada por la columela y la cofia lateral. El córtex, el córtex medio y la endodermis forman el sistema del tejido fundamental. El sistema del tejido vascular o estela incluye el cilindro vascular y el periciclo (Evert, 2006). El sistema del tejido fundamental, el sistema del tejido vascular y la capa superficial (epidermis) convergen en cuatro células que conforman el centro quiescente. El centro quiescente forma un centro organizado (Aida et al., 2004; Van Den Berg et al., 1997), que mantiene las células madre que dan lugar a las células iniciales rodeando al centro quiescente; y todo este conjunto de células forman el meristemo apical radicular (RAM, *root apical meristem*) (Evert, 2006). Cada tipo de tejido de la raíz se produce por divisiones sucesivas de una célula inicial (crecimiento primario: dirección apical). En la raíz de *Arabidopsis* existen cuatro tipos de células iniciales; una población de células iniciales producen las células de la columela, otra produce el tejido vascular (estela), una célula inicial común produce la cofia lateral y la epidermis, y una célula inicial común produce el tejido fundamental (Evert, 2006).

Figura 42. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. **A)** Proyección tridimensional de la raíz de *Arabidopsis* con un corte longitudinal en parte inferior y un corte transversal en la parte superior. **B)** Sección transversal de la raíz de *Arabidopsis* que muestra la organización y estructura de su patrón vascular. **C)** Sección longitudinal de la punta de la raíz de *Arabidopsis* que muestra la organización y estructura del meristemo apical radicular (RAM). En **B** y **C** se muestran los distintos tipos de células en distintos colores según la leyenda que aparece a la derecha de cada corte. Figura adaptada de Pauluzzi et al., 2012; Aichinger et al., 2012.



Teniendo en cuenta que el gen *maMYB* se expresa preferentemente en el tejido vascular de la raíz (Figura 32) y que la presencia de niveles normales de *maMYB* es esencial para el correcto desarrollo de la raíz y los pelos radiculares (Figura 41), se decidió estudiar los efectos del silenciamiento de *maMYB* sobre la estructura de la raíz. Para ello, muestras de raíces de los mutantes *amiRNA 1* y *amiRNA 2* crecidos en presencia y ausencia de metoxifenocida se incluyeron en bloques de historesina, a partir de los cuales se obtuvieron cortes ultrafinos (5 μM) que se tiñeron con azul de toluidina. Este colorante tiñe de color azul verdoso la pared celular secundaria que está lignificada, como es el caso de las células del xilema, mientras que el resto de células, que no presentan lignificación en la pared secundaria o presentan una capa de pectinas (laminilla media), se tiñen de color púrpura rojizo (Dolan et al., 1993).

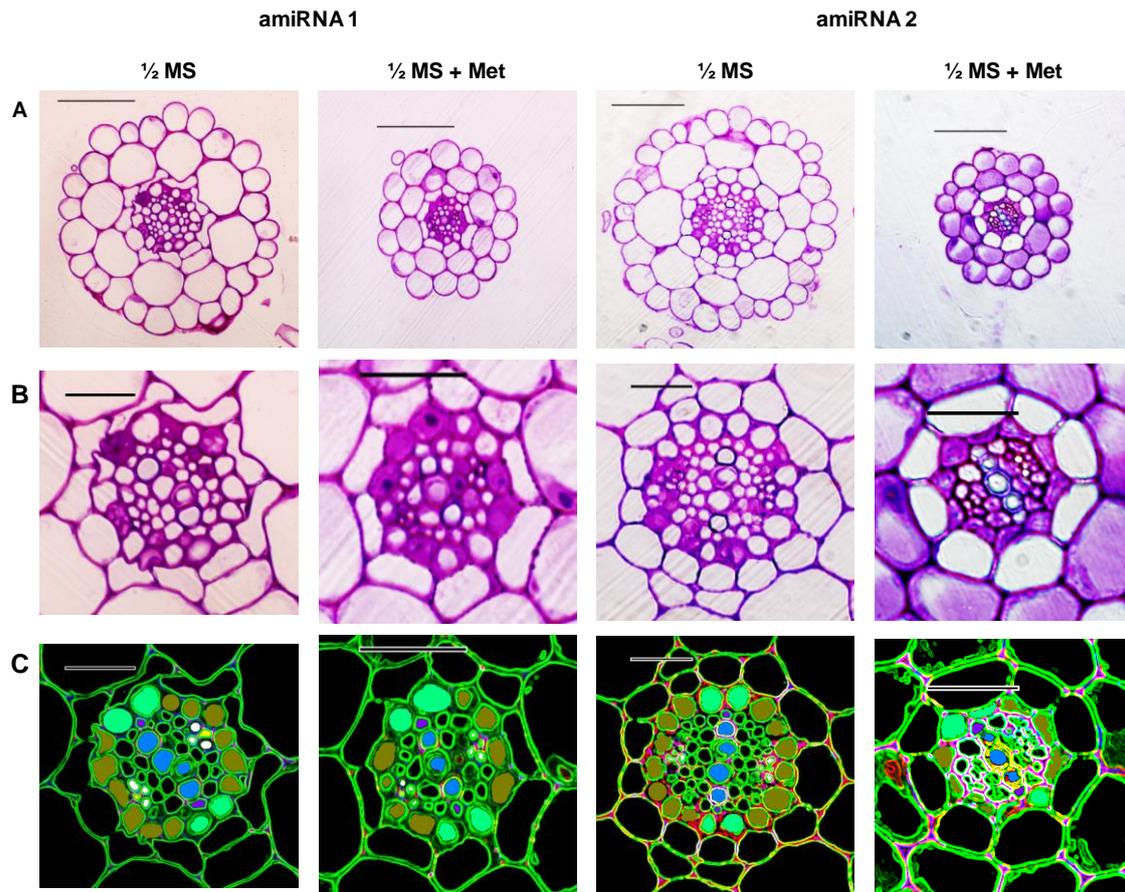


Figura 43. Efecto del silenciamiento de *maMYB* sobre la estructura de la raíz. A) Imágenes representativas de secciones transversales (50 μm) de raíz, entre la zona de elongación y la zona de maduración, de los mutantes *amiRNA 1* y *amiRNA 2*. Las plántulas se hicieron crecer durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en placas con medio $\frac{1}{2}$ MS y medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μM metoxifenocida ($\frac{1}{2}$ MS + Met), dispuestas en posición vertical. Las raíces se fijaron con glutaraldehído, se embebieron en historesina, y el bloque resultante se cortó con un micrótopo. Los cortes ultrafinos obtenidos se tiñeron con azul de toluidina para dar contraste. La barra de escala corresponde a 50 μm . Imágenes obtenidas con el microscopio Zeiss AxioPhot (objetivo 40x). **B)** Ampliación de la región de la estela de las fotos originales mostradas en A. **C)** Imágenes procesadas por el programa ImageJ de las mostradas en B en las que aparece marcado el periciclo (verde), el xilema (azul), y lo que podría ser el floema (blanco). La barra de escala corresponde a 20 μm .

En ambos mutantes, las secciones transversales correspondientes a la región comprendida entre la zona de elongación y la zona de maduración de la punta de la raíz, mostraron un diámetro menor cuando se indujo el silenciamiento de *maMYB* (Figura 43A), que se acompañaba de una modificación en la forma, tamaño y número de células de las diferentes capas de la raíz. En la epidermis eran necesarias menos células para completar la circunferencia de la raíz y en el córtex se mantenía el mismo número de células, pero éstas mostraron un tamaño mucho menor, similar al de las células epidérmicas. También se observó un retraso en el desarrollo de la raíz, ya que

mientras las raíces de los mutantes sin inducir mostraron la aparición del córtex medio, que empieza a formarse a partir del séptimo día después de la germinación (Pauluzzi et al., 2012), en los mutantes inducidos esta capa de células estaba ausente. En la endodermis se observó una reducción del número y el tamaño de sus células. Por último, el diámetro de la estela también se redujo (Figura 43B-C), debido a la disminución del tamaño y el número de las células del periciclo y del cilindro vascular. Aunque con esta tinción solo se podía distinguir el xilema del resto de células del cilindro vascular, parece claro que el número de células del procambium/cambium disminuía significativamente, y probablemente también ocurra alguna variación en el número de células del floema. En cuanto al xilema, se observó la disminución en una célula, en concreto del metaxilema.

7.2.3 Efecto sobre el perfil de esteroides

La ruta biosintética de los fitoesteroides (Figura 1) empieza con la oxidación del escualeno y posteriormente se bifurca en dos ramas: una que da lugar a los 24-esteroles, cuyos componentes mayoritarios son β -sitosterol y estigmasterol, y otra que da lugar a los 24-metilesteroides, donde el compuesto mayoritario es campesterol, a partir del cual se sintetizan los brasinoesteroides. Las plantas producen una compleja mezcla de esteroides, y a diferencia de lo que ocurre en animales, el colesterol es uno de los componentes minoritarios (Benveniste, 2002).

Teniendo en cuenta la interacción descrita entre las proteínas *maMYB* y *Arv1* (resultados parte I, apartado 5), que *Arv1* se ha postulado como un regulador de la homeostasis intracelular de esteroides (introducción parte I, apartado 4.1) y la disminución generalizada del tamaño de las plántulas al silenciar la expresión de *maMYB*, se consideró oportuno analizar el contenido de esteroides en la parte aérea y en la raíz de los mutantes *amiRNA* tratados con metoxifenocida. Debido a la cantidad de tejido necesaria para realizar el análisis de esteroides, el análisis solo se llevó a cabo con el mutante *amiRNA* 2, ya que la severidad del fenotipo de la línea mutante *amiRNA* 1, especialmente en la raíz, hacía muy difícil obtener suficiente cantidad de tejido. Tras crecer el mutante *amiRNA* 2 en ausencia y en presencia del inductor, se prepararon por separado muestras de raíz y de la parte aérea en las que se analizó el contenido de esteroides totales mediante GC-MS.

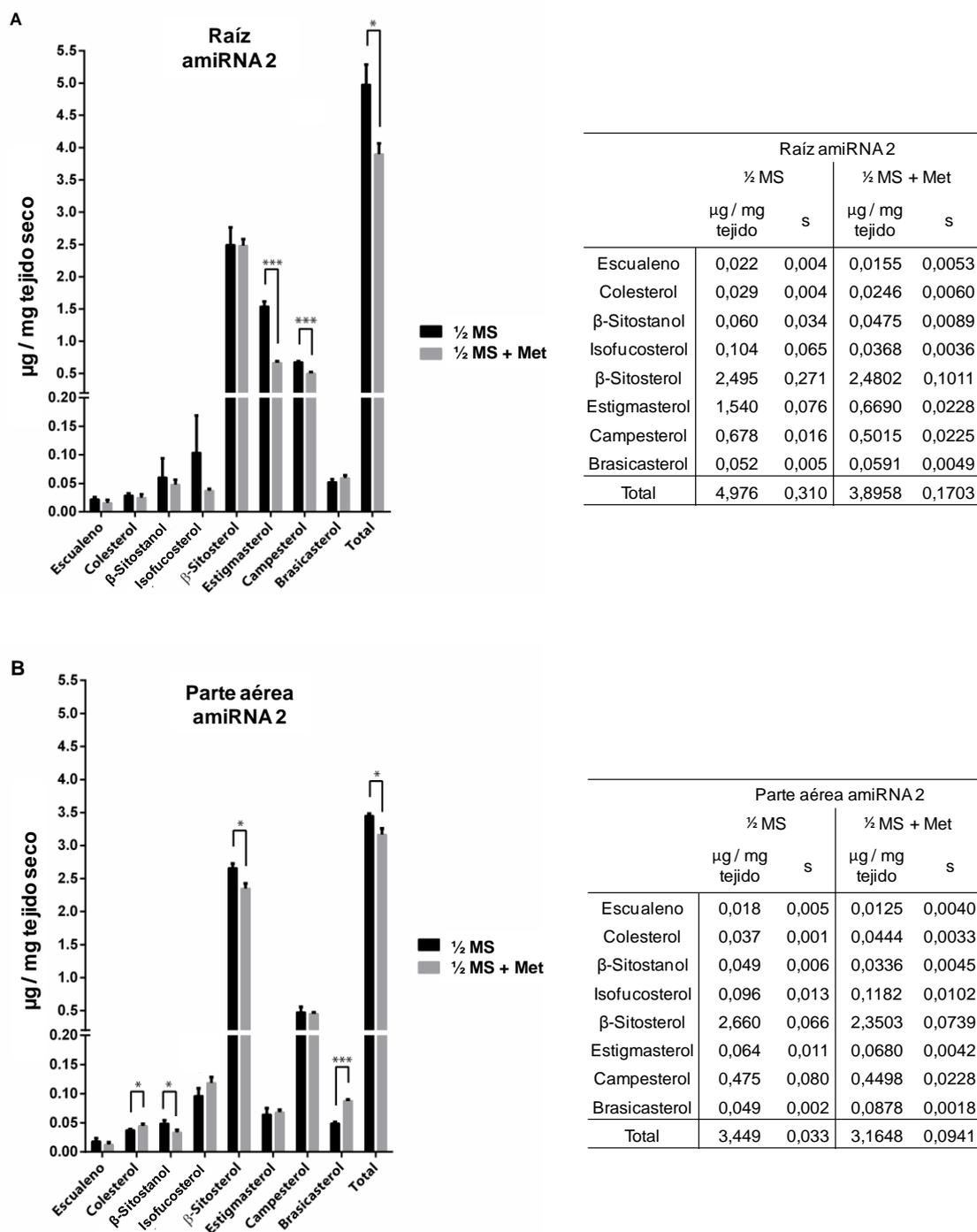


Figura 44. Determinación de los niveles de escualeno y esteroides en la raíz (A) y en la parte aérea (B) del mutante amiRNA 2. Se analizaron plántulas crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio ½ MS (barras negras) y ½ MS con 30 µM del inductor metoxifenocida (½ MS + Met, barras grises). El contenido de esteroides se analizó por GC/MS y se expresa en µg de esteroides por mg de peso seco de tejido. Los resultados son la media de triplicados biológicos independientes. Los asteriscos muestran los resultados que son significativamente distintos (*p<0.05, ***p<0.001) al comparar el mutante crecido con y sin inductor. Las tablas de la derecha muestran los datos numéricos de la cuantificación de esteroides acompañada de la desviación estándar (s), que en la gráfica se muestra mediante las barras de error.

El análisis del contenido de esteroides reveló que la cantidad total disminuía en ambos tejidos, alrededor de un 20% en la raíz y un 10% en la parte aérea, cuando se induce el silenciamiento de *maMYB* (Figura 44). Concretamente, se observó una disminución en la raíz de más del 55% en el nivel de estigmasterol y más del 25% en el de campesterol, y en la parte aérea de más del 10% en el nivel de β -sitosterol y más del 30% en el de β -sitostanol. En cambio, se observó en la parte aérea un aumento de casi el 80% en el nivel de brassicasterol y de más del 20% en el de colesterol. En definitiva, la inducción del silenciamiento de *maMYB* en el mutante amiRNA 2 provoca una alteración significativa en el perfil de esteroides tanto de la raíz como de la parte aérea de las plantas. Principalmente se ven afectados los productos finales de la ruta de biosíntesis de los fitoesteroides y sus precursores inmediatos. Estos resultados sugieren que el fenotipo de los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 podría estar relacionado y/o ser la consecuencia de la alteración en el perfil de esteroides, ya que como se describe en la introducción parte I (apartado 1.2 y 3.1) la modificación en el contenido de esteroides, especialmente en la membrana plasmática, puede alterar múltiples funciones celulares.

Teniendo en cuenta que los amiRNAs hibridan en zonas distintas del mRNA de *maMYB* (Figura 35), y que los efectos del silenciamiento del gen *maMYB* sobre el fenotipo son similares en las líneas amiRNA 1 y amiRNA 2, se puede descartar que dichos efectos sean debidos al silenciamiento inespecífico de genes distintos al gen diana (*off-targets*).

8. Sobreexpresión del gen *maMYB*: reversión parcial del fenotipo en el mutante de silenciamiento inducible

Una vez analizados los mutantes con expresión de *maMYB* disminuida, se generaron mutantes de sobreexpresión de *maMYB* entero y de la versión truncada (*maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹) que carece de los DTMs (Figura 24), en sus dos modalidades, inducible y constitutiva. Con estos mutantes se pretendía, por una parte, investigar los posibles efectos causados por la sobreexpresión de las dos versiones de *maMYB* y, por otra, analizar su capacidad para revertir los fenotipos asociados al silenciamiento de *maMYB* después de cruzarlos con los mutantes amiRNA. Esto permitiría confirmar que dichos fenotipos se debían específicamente a la pérdida de función de *maMYB* y,

llegado el caso, establecer la funcionalidad de la versión truncada de maMYB sin los dominios de unión al RE.

Para la sobreexpresión inducible se utilizó el mismo vector, pB110-Red-2844, utilizado para generar los mutantes de silenciamiento inducible. Para la sobreexpresión constitutiva, se empleó el vector pCAMBIA2300-MUTPA, que contiene el promotor 2xCaMV35S y había sido generado en nuestro laboratorio (Paola Andrade, tesis doctoral, 2014). Los transformantes se seleccionaron por medio de la fluorescencia roja emitida por sus semillas en la modalidad inducible y en base a la resistencia a kanamicina en la modalidad constitutiva, y se propagaron hasta obtener líneas T₃ homocigotas. De cada tipo de construcción se seleccionó una línea homocigota para su posterior caracterización; estas líneas se denominaron EcR:35S::maMYB y EcR:35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (sobreexpresión inducible) y, 35S::maMYB y 35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (sobreexpresión constitutiva). Las dos versiones de maMYB preparadas para ser expresadas de forma constitutiva se etiquetaron con un triple epítopo HA unido al extremo C-terminal de maMYB (maMYB-3xHA y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA).

Como línea receptora en los cruzamientos se escogió el mutante amiRNA 1, ya que esta línea expresa un micro RNA que hibrida en la región que codifica los DTMs (Figura 35). Por lo tanto, la sobreexpresión de maMYB entero debería competir con el silenciamiento mediado por el amiRNA 1, mientras que la sobreexpresión de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ no se vería afectada por la acción del amiRNA. En el caso de haber usado como línea receptora el mutante amiRNA 2, cuyo amiRNA hibrida en la región que codifica el subdominio R3-MYB (Figura 35), en los dobles mutantes resultantes del cruzamiento el amiRNA competiría tanto con la sobreexpresión de maMYB como con la de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹.

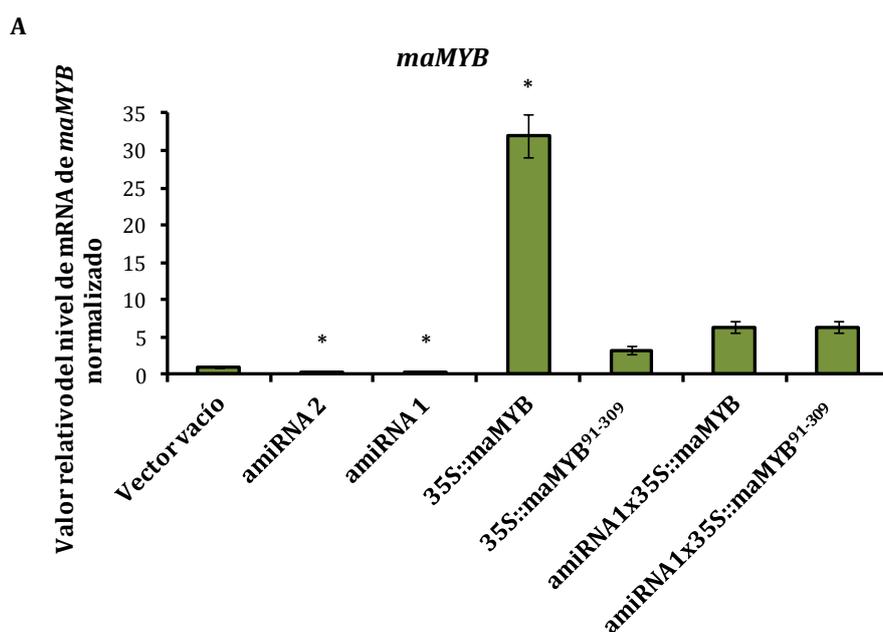
Para generar los dobles mutantes, se obtuvieron plantas adultas en fase reproductiva del mutante amiRNA 1, que se utilizaron como plantas receptoras, y plantas de los mutantes de sobreexpresión constitutiva de maMYB y de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, que se utilizaron como donadoras de polen. Las semillas resultantes del cruzamiento se seleccionaron por su fluorescencia roja (pB110-Red-2844) y en base a la resistencia a kanamicina (pCAMBIA2300-MUTPA), y se propagaron hasta obtener líneas homocigotas del doble mutante. De cada cruzamiento se seleccionó una línea homocigota, amiRNA1x35S::maMYB y amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, para su posterior caracterización.

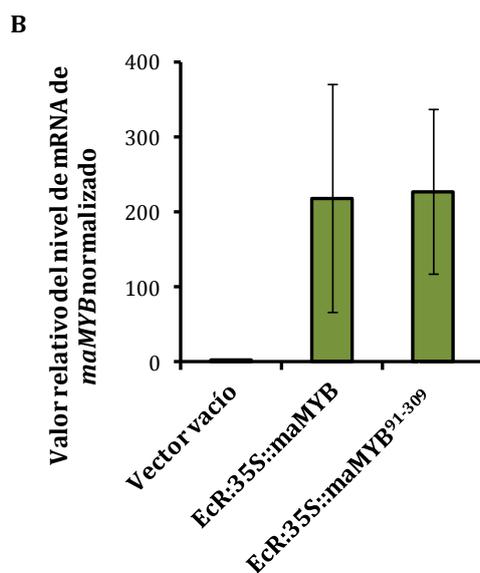
8.1 Caracterización molecular de los mutantes de sobreexpresión de *maMYB* y de los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento

8.1.1 Determinación de los niveles de expresión del mRNA de *maMYB*

Los niveles de mensajero *maMYB* se analizaron por qRT-PCR en muestras de RNA total de plántulas de los distintos mutantes de sobreexpresión de *maMYB* y de los dobles mutantes *amiRNA1x35S::maMYB* y *amiRNA1x35S::maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹ crecidas en presencia del inductor metoxifenocida (Figura 45).

Figura 45. Determinación cuantitativa de los niveles del mRNA *maMYB* en los mutantes simples de sobreexpresión *maMYB* y los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento. El análisis por qRT-PCR se realizó a partir de RNA total de plántulas crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio ½ MS suplementado con 30 µM metoxifenocida. Los niveles de mRNA se normalizaron en relación a los niveles de mRNA del gen *PP2AA3* (At1g13320). El análisis cuantitativo se realizó mediante el método comparativo de C_t (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), que asume como 2 la eficiencia de los *primers* (Livak and Schmittgen, 2001; Wong and Medrano, 2005). Los niveles normalizados de mRNA de los diferentes genes se expresan en relación a la cantidad de mRNA del control vector vacío, al que se le atribuyó el valor 1. Los resultados son la media de 2 replicas biológicas independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos muestran los valores que son significativamente distintos (* $p < 0.05$) cuando se comparan con el control vector vacío.





En los mutantes de sobreexpresión constitutiva, los niveles del mRNA *maMYB* aumentaron más de 30 veces en el mutante 35S::*maMYB*, y más de 3 veces en el mutante 35S::*maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹ (Figura 45A). Por otra parte, en los mutantes dobles *amiRNA1x35S::maMYB* y *amiRNA1x35S::maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹ se consiguió revertir el efecto del silenciamiento, llegándose incluso a alcanzar niveles de mRNA *maMYB* hasta 6 veces más elevados que el control vector vacío (Figura 45A). Los niveles de expresión de *maMYB* en los mutantes de sobreexpresión inducible aumentaron más de 200 veces respecto a los valores del control vector vacío, aunque la dispersión de los resultados fue en ambos casos muy elevada (Figura 45B). Esta dispersión es tan elevada debido probablemente a que la sobreexpresión no es tan reproducible, ya que no existe un tope al que llegar tan definido como ocurre en el silenciamiento. Además, en el silenciamiento se mide el efecto que produce la expresión inducible del *amiRNA* sobre la expresión del gen *maMYB*, mientras que en la sobreexpresión se está midiendo directamente el producto resultante de la inducción, lo que podría explicar la razón de su variabilidad.

8.1.2 Análisis de la expresión de la proteína *maMYB*

A continuación se analizaron mediante *Western blot* los niveles de expresión de la proteína *maMYB* para comprobar si los niveles de expresión del mRNA y la proteína se correlacionaban. Con este fin, se prepararon extractos de proteína total de plántulas de los diferentes mutantes del gen *maMYB* generados y del control vector vacío,

crecidos en presencia de metoxifenocida. Posteriormente, las muestras se analizaron por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-péptido maMYB.

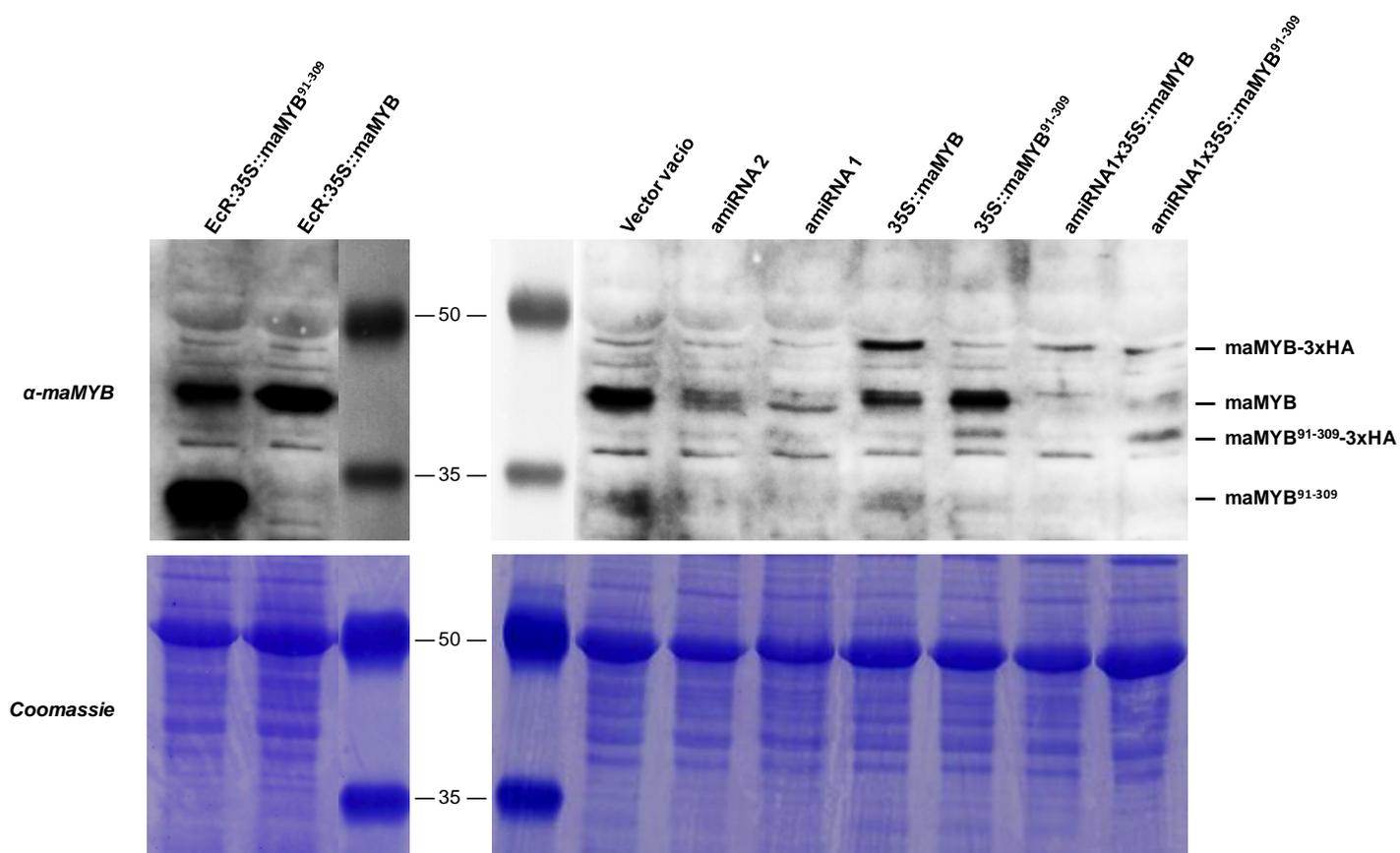


Figura 46. Niveles de proteína maMYB en los mutantes simples de sobreexpresión maMYB y los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento. Extractos proteicos (15 μ g) obtenidos a partir de plántulas crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μ M metoxifenocida, se fraccionaron por SDS-PAGE (12.5%) y se analizaron por *Western blot* (panel superior) usando el anticuerpo anti-péptido maMYB. Se indica la posición de las bandas correspondientes a las proteínas maMYB, maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, y las respectivas fusiones con el triple epítipo HA. En el panel inferior se muestra la tinción con *Coomassie Blue* de las membranas analizadas.

En los extractos de los mutantes de sobreexpresión constitutiva el anticuerpo detectó la expresión de maMYB-3xHA (masa molecular teórica ~38 kDa) y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA (masa molecular teórica ~28 kDa) aunque, de forma similar a lo observado en el caso de maMYB endógeno (apartado 7.1.2 de este bloque de resultados), las dos proteínas migraron con una masa molecular aparente superior a la teórica. En ambos casos el nivel de proteína expresada fue inferior al nivel de maMYB endógeno en el control vector vacío, siendo de destacar que en el mutante 35S::maMYB la

sobreexpresión de maMYB-3xHA provocó un cierto silenciamiento en la expresión de maMYB endógeno (Figura 46). En cuanto a los mutantes de sobreexpresión inducible, la cantidad de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (masa molecular teórica ~24 kDa) detectada al inducir la expresión en el mutante EcR:35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ fue muy elevada. En cambio, la acumulación de maMYB (masa molecular teórica ~34 kDa) en el mutante EcR:35S::maMYB fue, aparentemente, más moderada, aunque resulta difícil precisar el nivel de sobreexpresión respecto a la cantidad de maMYB endógeno porque no se puede descartar que la sobreexpresión de maMYB compense el hipotético silenciamiento de la proteína endógena que dicha sobreexpresión podría estar causando, tal y como ocurría al sobreexpresar constitutivamente maMYB-3xHA (Figura 46). El silenciamiento de la expresión de maMYB endógeno no se observó cuando se indujo la expresión de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹. En cualquier caso, los resultados indicaron que la sobreexpresión inducible era mucho más eficiente que la sobreexpresión constitutiva.

En los mutantes de cruzamiento, los niveles de expresión de maMYB endógeno resultaron casi indetectables, como era de esperar. Comparado con el mutante 35S::maMYB, en el mutante amiRNA1x35S::maMYB el nivel de expresión de maMYB-3xHA resultó mucho más bajo, ya que la expresión del amiRNA 1 también consigue silenciarlo en cierto grado (Figura 46). Por otra parte, en el mutante de cruzamiento amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, la débil expresión de la proteína maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA observada en el mutante simple 35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se mantenía y no se veía afectada por la expresión del amiRNA 1 (Figura 46).

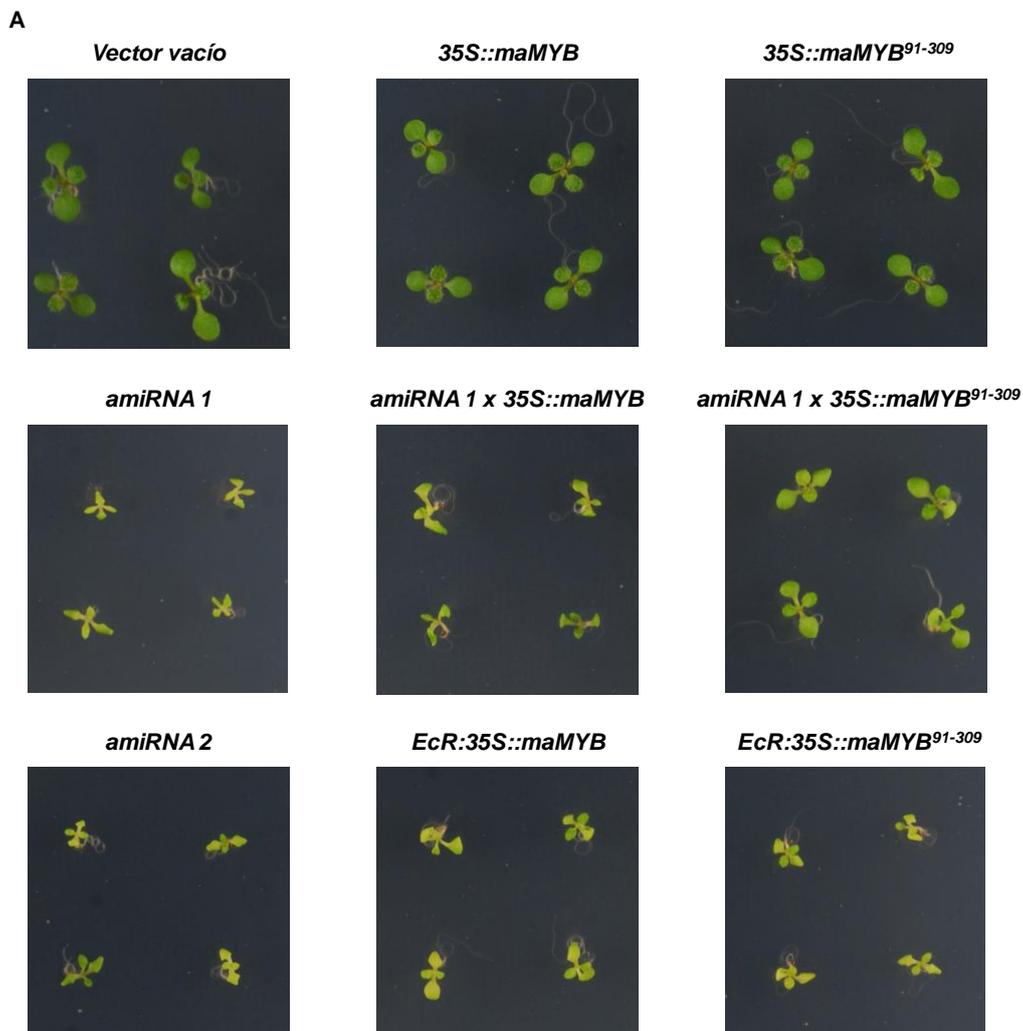
8.2 Comparación del fenotipo de los mutantes de sobreexpresión de maMYB y de los dobles mutantes de sobreexpresión y silenciamiento

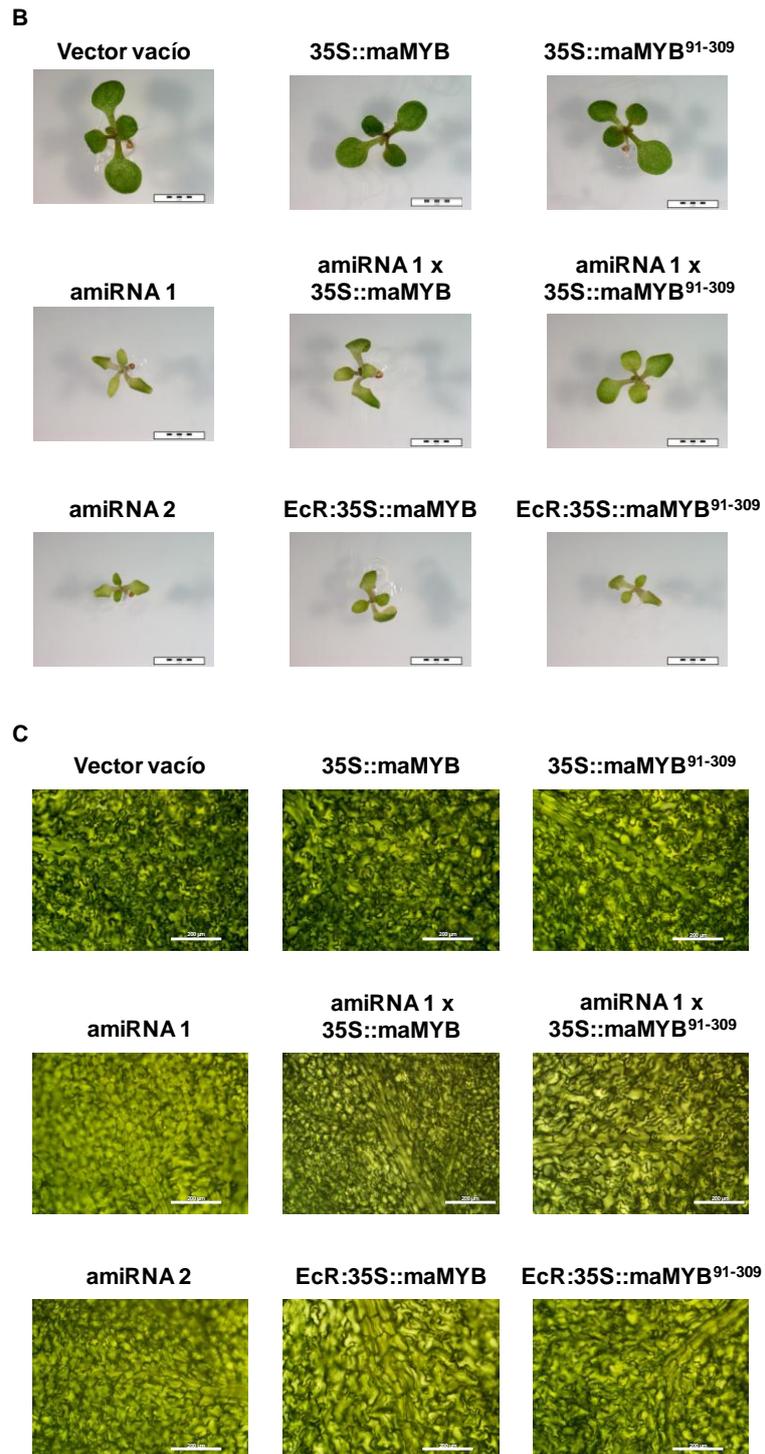
8.2.1 Parte aérea

La sobreexpresión constitutiva tanto de maMYB entero como de la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ no produjo alteración alguna en el fenotipo de la parte aérea, que mostró un tamaño, forma y coloración normales (Figura 47). Sin embargo, la sobreexpresión inducible dio lugar a un fenotipo similar al mostrado por los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 tratados con metoxifenocida. Comparado con el control vector vacío, los mutantes EcR:35S::maMYB y EcR:35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ mostraron un tamaño

menor y un desarrollo más lento de la parte aérea, una ligera clorosis en cotiledones y hojas verdaderas, cotiledones con formas en punta de flecha o curvadas, y células epiteliales de la cara abaxial con formas anómalas (Figura 47).

Figura 47. Comparación del fenotipo de la parte aérea en los distintos mutantes del gen *maMYB*. Plántulas de los mutantes indicados en las imágenes se hicieron crecer durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en placas con medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μ M metoxifenocida, dispuestas en posición horizontal. **A)** Imagen representativa de plantas de cada mutante tomada con la cámara Nikon D7000. **B)** Detalle de una planta representativa del fenotipo de cada mutante. Las imágenes fueron tomadas con un estereomicroscopio Olympus SZX16 acoplado a una cámara Olympus DP71. La barra de escala corresponde a 2 mm. **C)** Imágenes de las células epiteliales de la cara abaxial del cotiledón de los diferentes mutantes tomadas con el microscopio Zeiss Axiophot (objetivo 20x). La barra de escala corresponde a 200 μ m.





Al comparar el fenotipo del mutante amiRNA 1 con el de los mutantes dobles amiRNA1x35S::maMYB y amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (Figura 47), se observó una reversión muy ligera del fenotipo de amiRNA 1 en el primer caso y una reversión casi total en el segundo. Esto se debía, probablemente, a que el amiRNA 1 es capaz de silenciar tanto el gen *maMYB* endógeno como el sobrepresado, lo que hace que la

cantidad total de maMYB continúe siendo sensiblemente inferior a la de las plantas control (Figura 46). Sin embargo, como el amiRNA 1 no es capaz de silenciar la expresión del transgén que codifica la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (Figura 46), éste sería capaz de restituir en gran parte la función perdida de maMYB endógeno. Ello explicaría, que en el doble mutante amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, el tamaño de la plántula se asemeje bastante al control, los cotiledones muestren solo ocasionalmente alguna curvatura, las células epiteliales presenten formas y estructuras normales y el color verde de hojas y cotiledones se recupere parcialmente (Figura 47).

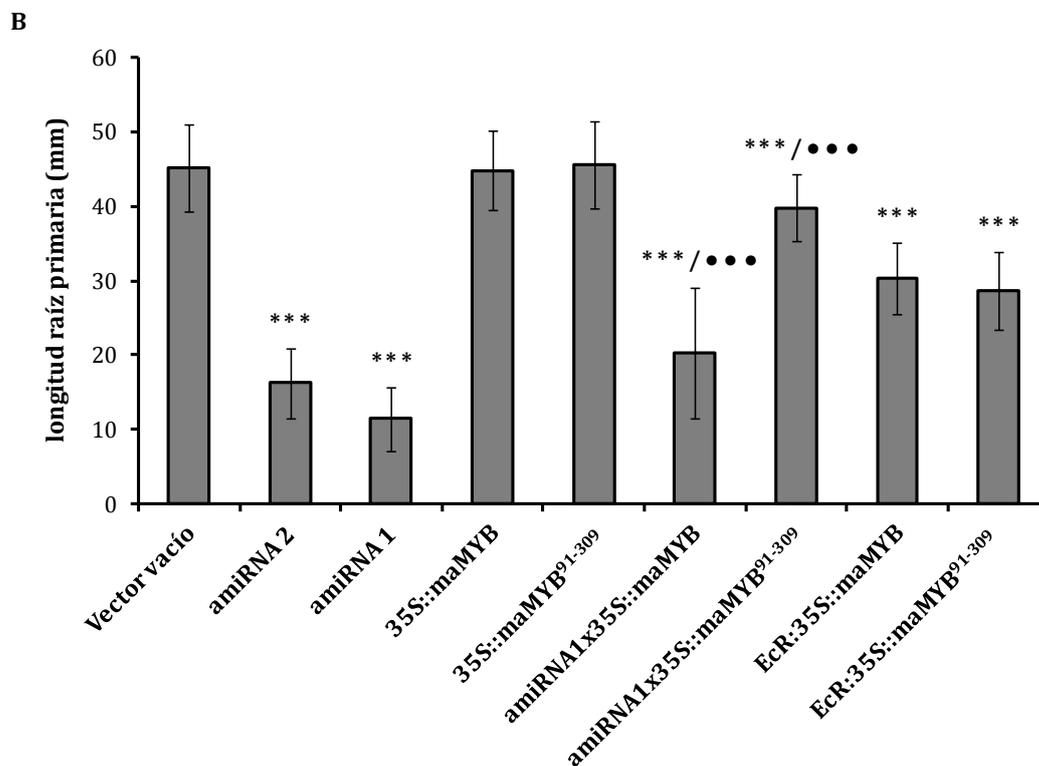
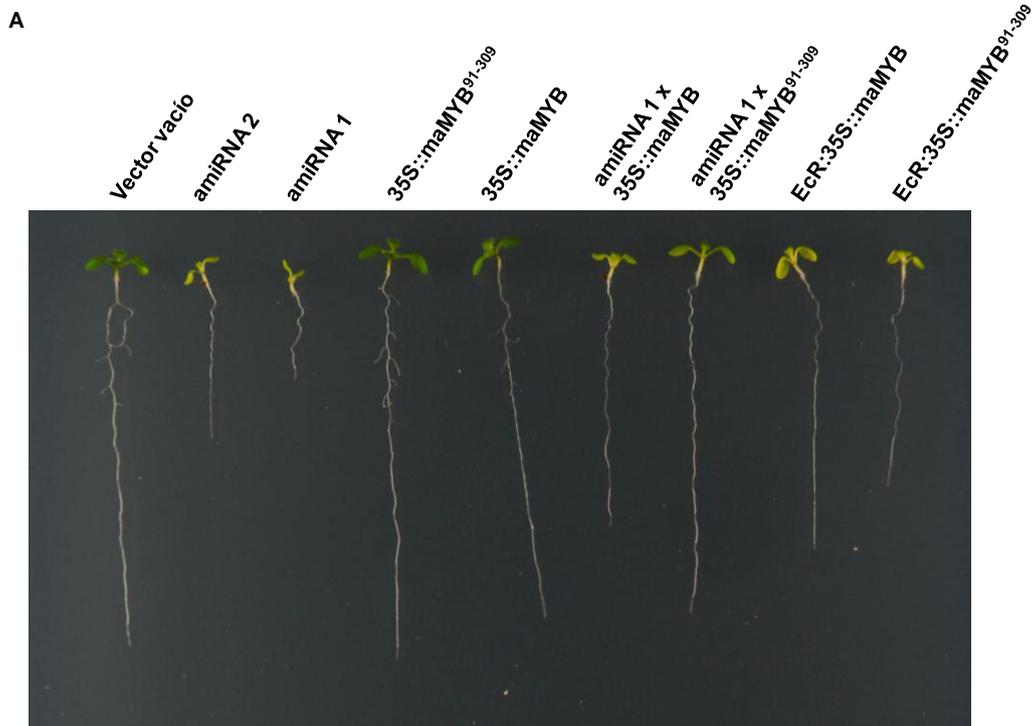
8.2.2 Raíz

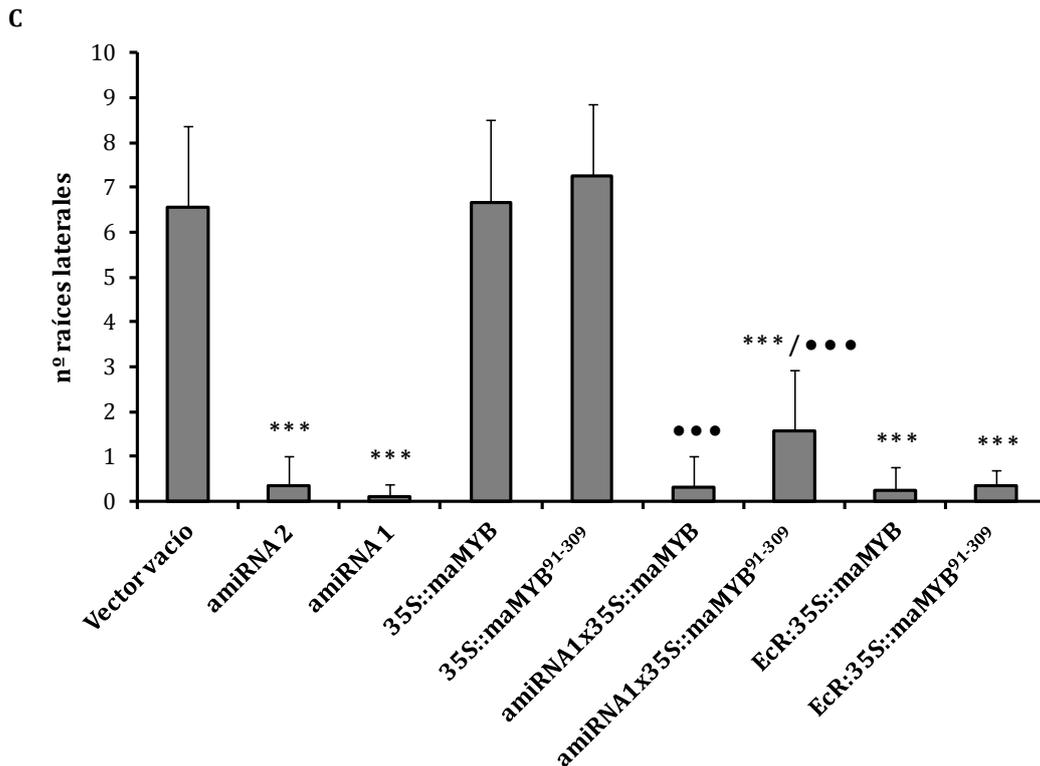
Del mismo modo que ocurría en la parte aérea, la sobreexpresión constitutiva tanto de maMYB como de la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, no alteró el fenotipo de la raíz (Figura 48). Sin embargo, la sobreexpresión inducible mimetizó parcialmente el fenotipo de los mutantes de silenciamiento inducible. La raíz primaria de los mutantes EcR:35S::maMYB y EcR:35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ tratados con metoxifenocida eran de media un 35% más cortas y tenían alrededor de un 95% menos raíces laterales que las plantas control (Figura 48). Los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 tratados con metoxifenocida mostraron una reducción de la longitud de la raíz primaria del 65-75% y tenían entre 90 y 95% menos raíces laterales, dependiendo del mutante, respecto a las plantas control.

Como también se observó en el caso de la parte aérea, mientras en el mutante doble amiRNA1x35S::maMYB el fenotipo de raíz solo se revirtió ligeramente, en el mutante doble amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ la reversión fue mucho mayor, sin llegar a ser completa. La raíz primaria del doble mutante amiRNA1x35S::maMYB fue de media un 55% más corta que la de las plantas control, mientras que la del doble mutante amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ solo fue un 15% más corta que la de las plantas control. En el caso de las raíces laterales solo en el doble mutante amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se observó una cierta reversión del fenotipo (Figura 48).

Figura 48. Comparación del fenotipo de la raíz en los distintos mutantes del gen *maMYB*. Plántulas de los mutantes indicados en las imágenes se hicieron crecer durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en placas con medio ½ MS suplementado con 30 µM metoxifenocida, dispuestas en posición vertical. **A)** Imagen de una plántula representativa del fenotipo de cada mutante tomada con la cámara Nikon D7000. **B)** Cuantificación de la longitud de la raíz primaria. **C)** Número de raíces laterales. Los resultados

son la media de un mínimo de 20 individuos de cada mutante, que fueron recolectados en al menos 3 réplicas experimentales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos muestran los valores que son significativamente distintos (***) cuando se comparan con el control vector vacío. Para los mutantes dobles se muestran los cambios significativos correspondientes a la comparación con amiRNA 1 (asteriscos) y con el control vector vacío (círculos negros).





En conclusión, mientras la sobreexpresión constitutiva de maMYB y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ no altera el desarrollo de la parte aérea y la raíz, la sobreexpresión inducible de maMYB y de la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, provoca una inhibición o ralentización del desarrollo en ambas partes de la planta. La recuperación de la función maMYB en los mutantes de cruzamiento es mayor en la parte aérea y la raíz primaria que en las raíces secundarias, y mayor con la sobreexpresión de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ que con la de maMYB. Esto no solo confirma que el fenotipo del mutante amiRNA 1 es debido al silenciamiento de maMYB, sino también que la versión truncada de maMYB es funcional, lo que constituye una evidencia que refuerza la hipótesis del procesamiento proteolítico de maMYB para cumplir su función biológica en el núcleo.

9. Comparación de los mutantes amiRNAs del gen *maMYB* con el mutante RNAi-2: silenciamiento inducible versus constitutivo

Durante el desarrollo de esta tesis se publicó el primer y, hasta la fecha, único trabajo sobre maMYB (Slabaugh et al., 2011), en el que se demostraba que el silenciamiento constitutivo de la expresión de *maMYB* mediante un hpRNA (*hairpin*

RNA) tiene como resultado una disminución en la elongación de los pelos radiculares. Los mutantes de silenciamiento inducible generados en esta tesis (amiRNA 1 y amiRNA 2), además de mostrar un fenotipo más drástico en los pelos radiculares, también presentan alteraciones de la estructura de la raíz y alteraciones fenotípicas en la parte aérea, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Para establecer las posibles causas de estas diferencias, se procedió a comparar a nivel molecular ambos tipos de mutantes de silenciamiento de *maMYB* (amiRNA vs hpRNA). De las dos líneas del mutante *knock down* descritas por Slabaugh et al., 2011, se escogió la línea denominada RNAi-2 que presentaba la menor expresión de *maMYB*.

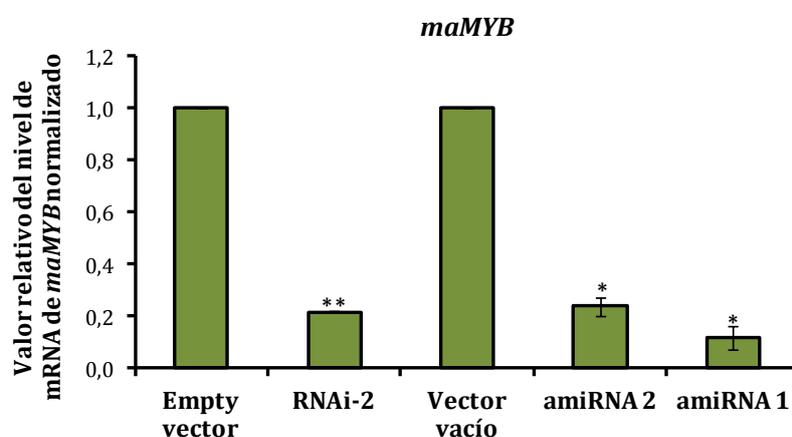


Figura 49. Determinación cuantitativa de los niveles del mRNA *maMYB* en los mutantes RNAi-2, amiRNA 1 y amiRNA 2. El análisis por qRT-PCR se realizó a partir de RNA total de plántulas crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y en medio ½ MS suplementado con 30 µM metoxifenocida. Los niveles de mRNA de los diferentes genes se normalizaron en relación a los niveles de mRNA del gen *PP2AA3* (At1g13320). El análisis cuantitativo se realizó mediante el método comparativo de C_t (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), que asume como 2 la eficiencia de los *primers* (Livak and Schmittgen, 2001; Wong and Medrano, 2005). Los niveles normalizados de mRNA de los diferentes genes se expresan en relación a la cantidad de mRNA del control *empty vector* para RNAi-2, y vector vacío para amiRNA 1 y amiRNA 2, a los que se le atribuyó el valor 1. Los resultados son la media de 2 replicas biológicas independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos muestran los valores que son significativamente distintos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) cuando se comparan con el control.

Los niveles de expresión de mRNA de *maMYB* se analizaron por qRT-PCR en los mutantes amiRNA 1, amiRNA 2, RNAi-2 y sus correspondientes controles, todos ellos crecidos en presencia de metoxifenocida, de forma análoga a como se hizo en el apartado 7.1.1. Los niveles de expresión de *maMYB* en los mutantes RNAi-2 y

amiRNA 2 fueron muy parecidos, con una disminución de la expresión de *maMYB* entre un 75 y un 80%; mientras que en el mutante amiRNA 1 la disminución fue de casi el 90% (Figura 49).

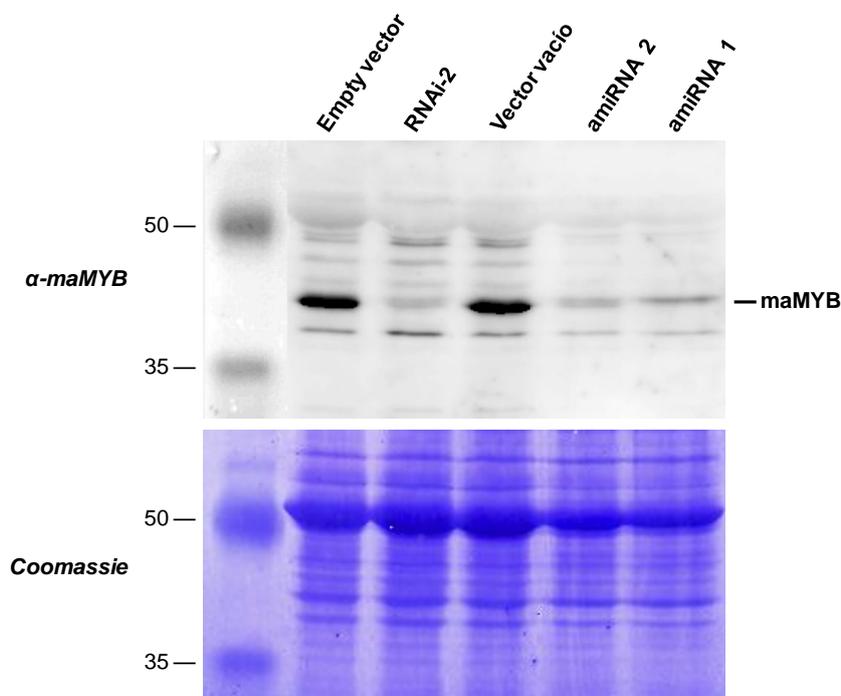


Figura 50. Niveles de proteína maMYB en los mutantes RNAi-2, amiRNA 1 y amiRNA 2. Extractos proteicos (15 μ g) obtenidos a partir de plántulas de los diferentes mutantes crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μ M metoxifenocida, se fraccionaron por SDS-PAGE (12.5%) y se analizaron por *Western blot* (panel superior) usando el anticuerpo anti-péptido maMYB. Se indica la posición de la banda correspondiente a la proteína maMYB. En el panel inferior se muestra la tinción *Coomassie Blue* de la membrana analizada.

Los niveles de expresión de la proteína maMYB se analizaron mediante *Western blot* en extractos de proteína total de plántulas de los mismos mutantes del gen *maMYB* y sus respectivos controles, crecidos en presencia de metoxifenocida según las condiciones descritas en la Figura 50. Los niveles de proteína maMYB se reducen de forma muy similar en el mutante RNAi-2 y en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 tratados con metoxifenocida, lo que concuerda con la reducción de los niveles de mRNA maMYB observada en los mismos mutantes.

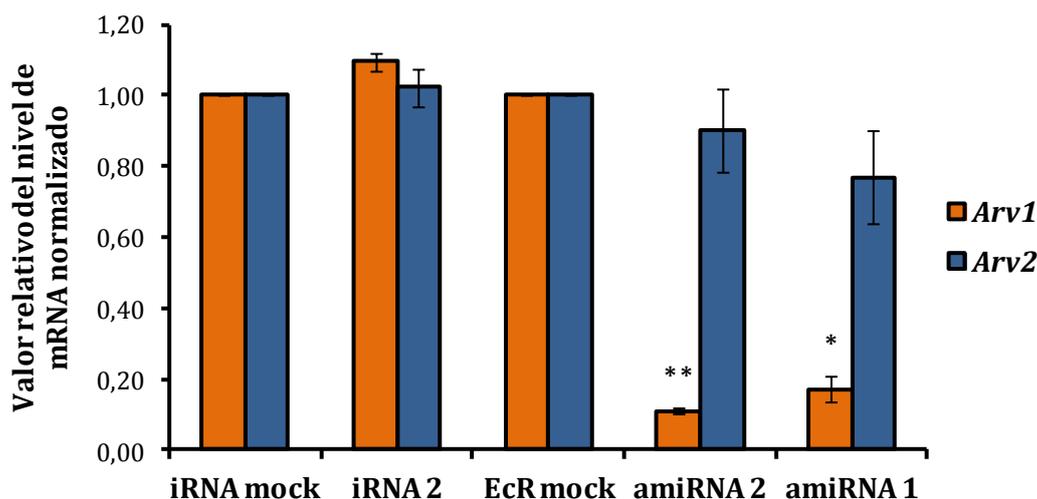


Figura 51. Determinación cuantitativa de los niveles de mRNA de *AtArv1* y *AtArv2* en los mutantes RNAi-2, amiRNA 1 y amiRNA 2. El análisis por qRT-PCR se realizó a partir de RNA total de plántulas crecidas durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y en medio ½ MS suplementado con 30 µM metoxifenocida. Los niveles de mRNA de *AtArv1* y *AtArv2* se normalizaron en relación a los niveles de mRNA del gen *PP2AA3* (At1g13320). El análisis cuantitativo se realizó mediante el método comparativo de C_t (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), que asume como 2 la eficiencia de los *primers* (Livak and Schmittgen, 2001; Wong and Medrano, 2005). Los niveles normalizados de mRNA *AtArv1* (naranja) y *AtArv2* (azul) se expresan en relación a la cantidad de cada mRNA del control empty vector para el mutante RNAi-2 y del control vector vacío para los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2, a los que se le atribuyó el valor 1. Los resultados son la media de 2 replicas biológicas independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos muestran los valores que son significativamente distintos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) cuando se comparan con el respectivo control.

Teniendo en cuenta la interacción descrita entre las proteínas maMYB y Arv1 (resultados parte I, apartado 5), se procedió a analizar por qRT-PCR los niveles de expresión de mRNA de *AtARV1* y *AtARV2* en plántulas de estos mismos mutantes del gen maMYB y sus respectivos controles. Al comparar las secuencias de los mensajeros de *AtARV1* y *AtARV2* se observó que comparten una similitud en torno al 75%. Para determinar sus niveles de expresión de forma específica, se diseñaron *primers* en las regiones 3' en torno al codón de stop de cada mensajero, ya que era donde las secuencias mostraron mayor divergencia entre sí. Los niveles de expresión del mRNA *AtARV1* disminuyeron en torno a un 85% en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 respecto al control vector vacío, mientras que en el mutante RNAi-2 no se vio alterada la expresión de *AtArv1* respecto a su control *empty vector* (Figura 51). Por el contrario, los niveles de expresión del mRNA *AtArv2* en los mutantes amiRNA 1 y amiRNA 2 disminuyeron un 23 y 10% respectivamente respecto al control vector vacío, aunque este cambio no resultó estadísticamente significativo, mientras que en el

mutante RNAi-2 permanecieron similares al control *empty vector* (Figura 51). La alteración de los niveles de expresión del mRNA *maMYB* produce una disminución pronunciada en los niveles de expresión del mRNA *AtArv1* en los mutantes *amiRNA 1* y *amiRNA2*, que no ocurre en el mutante RNAi-2. Esto podría ser una de las razones por las que el mutante de silenciamiento constitutivo solo muestra fenotipo en la elongación de pelos radiculares mientras que los de silenciamiento inducible muestran un fenotipo más drástico tanto en la parte aérea como en la raíz. Por otra parte, los resultados obtenidos en los mutantes *amiRNA 1* y *amiRNA 2* establecen una relación genética entre *maMYB* y *AtArv1* en las células vegetales que avala la interacción entre ambas proteínas, encontrada en un cribado de doble híbrido en levadura (resultados parte I, apartado 5).

10. Estudio de la escisión de *maMYB in vivo*

La localización nuclear de la proteína de fusión GFP-*maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹ (Figura 27) y la reversión del fenotipo causado por el silenciamiento de la expresión de *maMYB* observada al sobreexpresar *maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA (Figuras 47 y 48) apoyaban la hipótesis de que para ejercer su función, *maMYB* se proteoliza liberando el dominio citoplasmático MYB que se traslada al núcleo. Sin embargo, en ninguno de los análisis por *Western blot* había sido posible identificar con certeza una banda correspondiente a la forma truncada de *maMYB* (Figuras 30, 39, 46 y 50).

Asumiendo que *maMYB* se procesa *in vivo*, pero que la proteína no es detectable en nuestras condiciones experimentales, se diseñaron experimentos para intentar enriquecer la cantidad de *maMYB* procesado en los extractos proteicos, de tal manera que pudiera detectarse su presencia. Para ello, se obtuvieron extractos de plántulas de *Arabidopsis* que expresaban la proteína de fusión *maMYB*-YFP que se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GFP unidos a microesferas de agarosa. Los inmunoprecipitados se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se analizaron por *Western blot* usando el anticuerpo anti-péptido *maMYB* y el mismo anticuerpo anti-GFP utilizado para la inmunoprecipitación (Figura 52). La realización de este apartado se desarrolló en colaboración con la Dra. Erin Slabaugh del grupo de la Dra. Federica Brandizzi de la Universidad Estatal de Michigan (MSU, Michigan State University, USA), quienes nos cedieron la línea transgénica que expresa *maMYB*-YFP empleada en los experimentos de inmunoprecipitación.

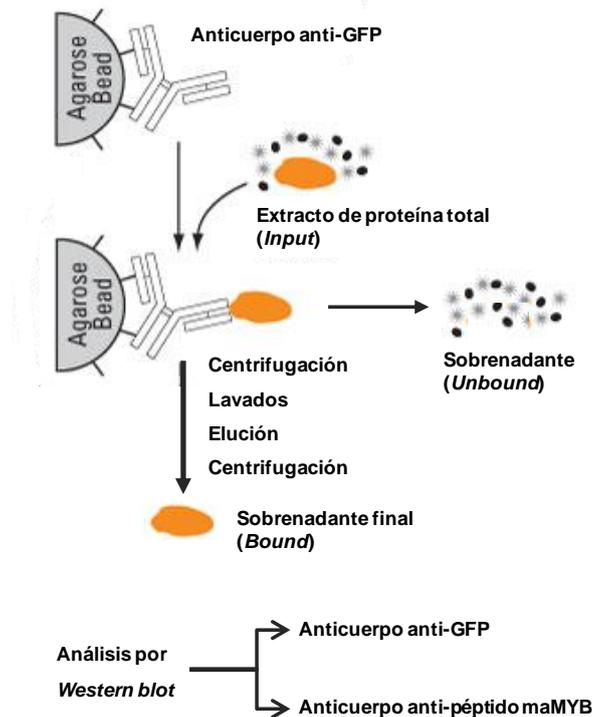
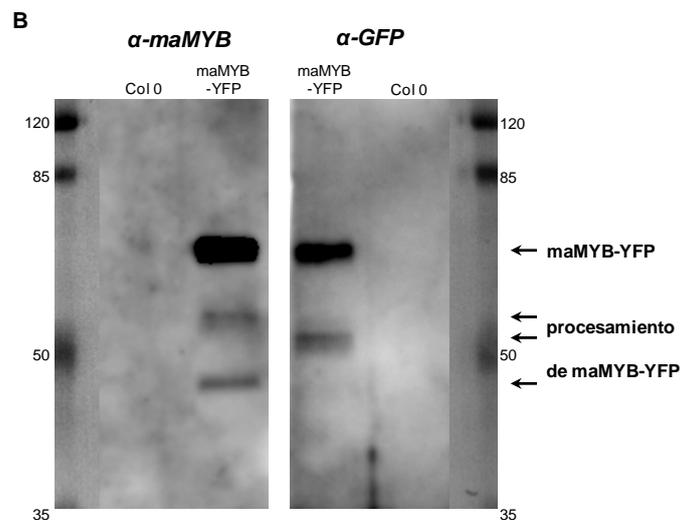
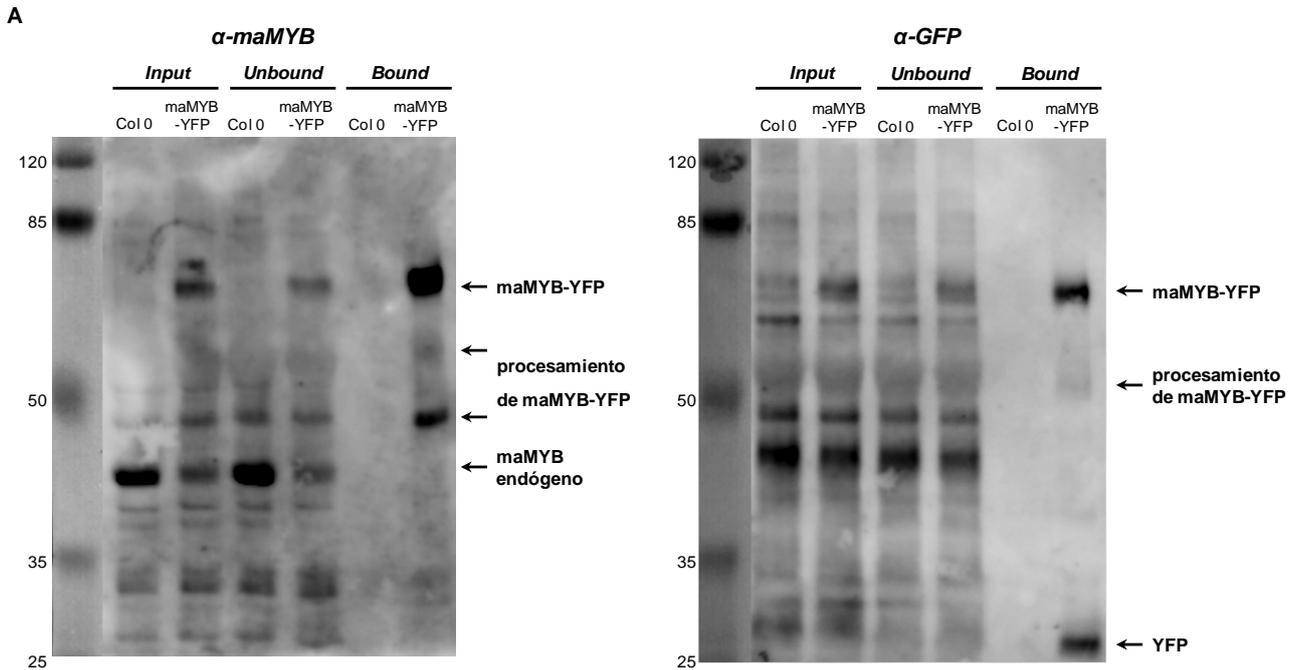


Figura 52. Diagrama esquemático del proceso de inmunoprecipitación. Las microesferas de agarosa unidas al anticuerpo anti-GFP (GFP-Trap-A, Chromotek) se incubaron con los extractos de proteína total (*input*). Posteriormente, los inmunoprecipitados se recuperaron por centrifugación obteniéndose un sobrenadante (*unbound*) y un precipitado (*pellet*), donde se encontraban las proteínas fusionadas a la YFP unidas a las microesferas a través del anticuerpo anti-GFP. El precipitado se sometió a sucesivos lavados y, tras hervirlo en presencia de SDS, las proteínas unidas al anticuerpo se eluyeron y se recuperaron por centrifugación en la fracción sobrenadante (*bound*). Finalmente, las tres muestras (*input*, *unbound* y *bound*) se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP y el anticuerpo anti-péptido maMYB.

Para la interpretación de los resultados, hay que tener en cuenta las discrepancias entre la masa molecular teórica de las distintas versiones de maMYB y la calculada a partir de su migración en SDS-PAGE (apartado 7.1.2).

Figura 53. Análisis por *Western blot* de la existencia de la forma procesada de maMYB. A partir de plántulas de *Arabidopsis* que expresan la proteína de fusión maMYB-YFP y plántulas Col 0 *wild type* como control, crecidas en medio líquido ½ MS durante 7 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y a una agitación de 80 rpm, se realizaron extractos de proteína total que se sometieron a un proceso de inmunoprecipitación, tal como se describe en la figura anterior. **A)** Las muestras recogidas durante la inmunoprecipitación (2 µL *input*, 2 µL *unbound* y 20 µL *bound*) se fraccionaron por SDS-PAGE (10%) y se analizaron por *Western blot* usando el anticuerpo anti-péptido maMYB (imagen izquierda) y el mismo anticuerpo anti-GFP (imagen derecha) empleado en la inmunoprecipitación. **B)** Las muestras *bound* (20 µL) se fraccionaron por duplicado en un mismo gel (SDS-PAGE 10%) y se analizaron por *Western blot*

usando el anticuerpo anti-péptido maMYB en una mitad de la membrana y el anticuerpo anti-GFP en la otra mitad.



En los resultados del análisis por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-péptido maMYB (Figura 53A), solo se detectó la proteína maMYB-YFP (masa molecular teórica ~61 kDa) en las muestras correspondientes a extractos de las plantas transgénicas (muestras *input*, *unbound* y *bound*), y la proteína maMYB endógena (masa molecular teórica ~34 kDa) en todas las muestras excepto en las muestras correspondientes a los inmunoprecipitados (*bound*). En este sentido, y como ya se había observado al sobreexpresar maMYB (Figura 46), la sobreexpresión de

maMYB-YFP producía un cierto silenciamiento de la expresión de maMYB endógeno (comparar muestras *input* y *unbound* de Col 0 y maMYB-YFP) (Figura 53A). En las muestras *bound*, además de detectarse maMYB-YFP, también se detectaron otras dos bandas de menor masa molecular que podían corresponder a formas procesadas de maMYB-YFP. El anticuerpo anti-GFP también detectó la fusión maMYB-YFP, una banda de menor peso molecular potencialmente atribuible a una forma procesada de maMYB-YFP y una banda correspondiente a la YFP sola (masa molecular teórica ~27 kDa) (Figura 53A). Sin embargo, al analizar con ambos anticuerpos solo las muestras inmunoprecipitadas (*bound*) fraccionadas simultáneamente en un mismo gel y transferidas a una misma membrana, se advirtió que las posibles formas procesadas de maMYB-YFP detectadas por el anticuerpo anti-péptido maMYB no coincidían con la hipotética forma procesada visualizada con el anticuerpo anti-GFP (Figura 53B). Por lo tanto, aunque se han detectado bandas candidatas a representar formas procesadas de maMYB-YFP, todavía no ha sido posible adjudicar una identidad fidedigna a cada una de ellas y, en consecuencia, demostrar el procesamiento *in vivo* de maMYB.

11. HiSeq 2000 Illumina (RNA-Seq): Análisis transcriptómico del mutante de silenciamiento inducible amiRNA 2

Tal y como se ha visto en apartados anteriores, el silenciamiento de maMYB provoca alteraciones severas en el desarrollo de la raíz y la parte aérea de las plántulas de Arabidopsis, lo que indica que maMYB podría jugar un papel clave en procesos de desarrollo y diferenciación celulares. Para intentar avanzar en el conocimiento de la función biológica de maMYB se procedió a analizar los efectos del silenciamiento del gen *maMYB* sobre el transcriptoma de Arabidopsis mediante una aproximación de secuenciación masiva (RNA-seq).

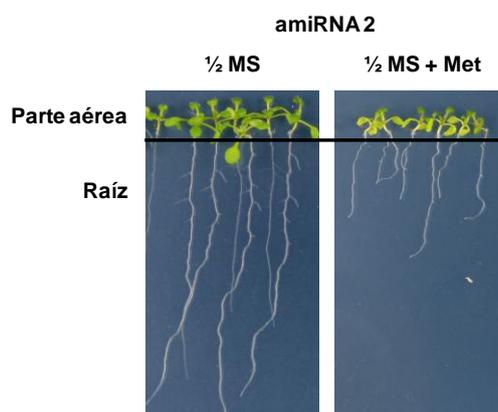


Figura 54. Diseño experimental para el análisis transcriptómico mediante RNA-Seq. El mutante de silenciamiento inducible amiRNA 2 se hizo crecer en posición vertical en medio $\frac{1}{2}$ MS y en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 μ M del inductor metoxifenocida ($\frac{1}{2}$ MS + Met) durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad). Se llevaron a cabo tres replicas biológicas independientes de ambas muestras, y en cada una se separó la raíz de la parte aérea para extraer el RNA total de ambos tejidos por separado.

Para ello, se analizó por separado el transcriptoma de la raíz y la parte aérea del mutante amiRNA 2 crecido en presencia del inductor metoxifenocida, y se comparó con el del mismo mutante crecido en ausencia del inductor durante 8 días (Figura 54). Concretamente, se empleó la técnica de secuenciación masiva de la plataforma *HiSeq 2000 Illumina*. Cada una de las muestras de RNA a analizar consistía en una mezcla equimolecular de RNA proveniente de extracciones por separado de tres réplicas biológicas independientes. Las muestras de RNA se enviaron al servicio de secuenciación masiva del CNAG (Centro Nacional de Análisis Genómico) y las secuencias obtenidas se analizaron en la unidad de bioinformática del CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica).

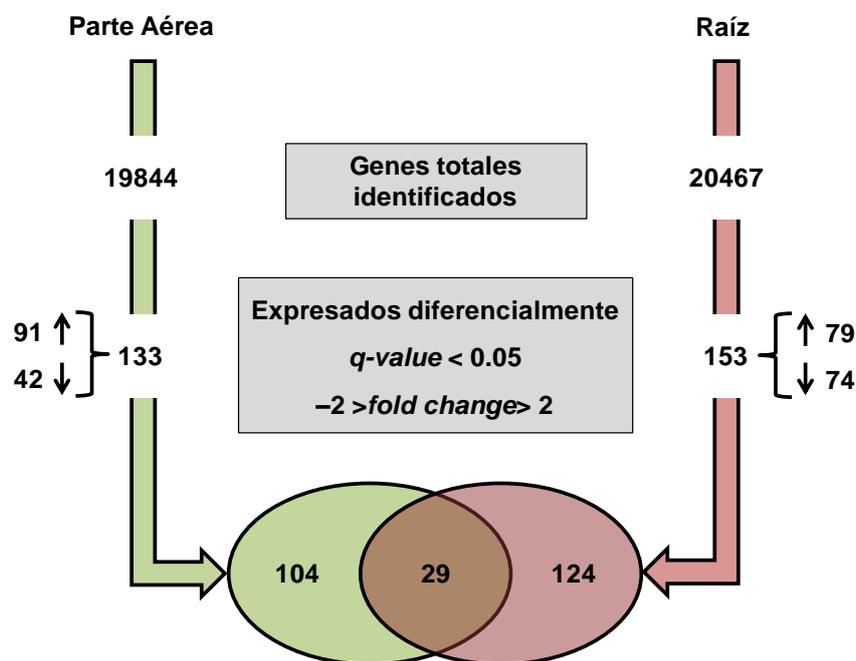


Figura 55. Resumen de los cambios transcripcionales en la parte aérea y en la raíz del mutante amiRNA 2 de silenciamiento inducible de maMYB. Los parámetros seleccionados para identificar genes expresados diferencialmente fueron el q value, que es el valor p corregido para análisis múltiples según el test estadístico Benjamini–Hochberg, y el $fold$ change, que es el número de veces que cambia un gen. Los genes expresados

diferencialmente en cada tejido quedan desglosados en los que aumenta (\uparrow) y disminuye (\downarrow) su expresión. El diagrama de Venn muestra la intersección de conjuntos de genes expresados diferencialmente entre la raíz y la parte aérea.

Según los criterios de selección descritos (materiales y métodos, apartado 14.3), de los 20.467 genes identificados y analizados en la raíz, 79 aumentaron y 74 disminuyeron significativamente su expresión al inducir el silenciamiento de *maMYB* (Anexo 1). Por otra parte, de los 19.844 genes analizados en la parte aérea, 91 aumentaron y 42 disminuyeron significativamente su expresión al inducir el silenciamiento de *maMYB* (Anexo 2). En total 133 y 154 genes se expresan diferencialmente y de forma estadísticamente significativa en la parte aérea y la raíz respectivamente (Figura 55), de los cuales 29 son comunes a ambos tejidos (Anexo 3). La expresión del gen *maMYB* disminuyó 1.7 y 2.2 veces en la raíz y la parte aérea, respectivamente, aunque esta expresión diferencial no cumplió los estrictos requisitos estadísticos definidos por el programa *Cuffdiff*, ya que el parámetro *q-value* asociado a esta expresión diferencial fue superior a 0.05.

Después de obtener los resultados de expresión diferencial significativos, se procedió a interpretar las listas de genes que modifican su expresión en un contexto biológico, para intentar establecer los mecanismos biológicos subyacentes al fenotipo de los mutantes de silenciamiento de *maMYB*. Para encontrar grupos de genes con significado biológico similar y evaluar su relevancia estadística (análisis de enriquecimiento), se emplearon descriptores y anotaciones funcionales típicamente de fuentes como Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al., 2008). Las herramientas informáticas empleadas en este trabajo que permitieron el análisis de enriquecimiento fueron GeneCodis3 (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) (Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012) y agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) (Du et al., 2010), tal como se describe en materiales y métodos (apartado 14.3).

Tabla 3. Selección de genes expresados diferencialmente en la raíz del mutante *amiRNA* 2. La tabla muestra grupos de genes con significado biológico similar según bases de datos como GO y KEGG y herramientas bioinformáticas como GeneCodis3 y agriGO. Se indica el nombre del gen en caso de que tenga, el código AGI identificativo, el número de veces que cambia la expresión del gen (*fold change*), la variación de los FPKMs entre las muestras (Δ FPKM), y una breve descripción funcional.

subgrupo	código AGI	gen	Δ FPKM	fold change	descripción
Pared celular (elongación celular, extensión de la pared celular, síntesis de lignina)					
LTPs	AT5G01870		-188,73	-4,24	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT5G59320	LTP3	-89,88	-3,63	lipid transfer protein 3
LTPs-like	AT5G55410		12,69	64,53	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
HyPRPs (LTPs)	AT4G12500		69,07	14,95	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT4G12545		-247,73	-2,63	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT4G12550	AIR1	-523,84	-3,64	Auxin-Induced in Root cultures 1
	AT4G12480	EARL1	1621,68	7,51	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT4G12490		84,01	23,45	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
Otros	AT2G18470	PERK4	-5,00	-5,02	proline-rich extensin-like receptor kinase 4
	AT1G26770	EXPA10	-6,81	-5,80	expansin A10
	AT1G76930	EXT4	1164,58	3,39	extensin 4
	AT1G12780	UGE1	-50,96	-2,61	UDP-D-glucose/galactose/UDP-D-xylose 4-epimerase 1
	AT5G56870	BGAL4	-54,69	-2,45	beta-galactosidase 4
	AT4G30140	CDEF1	-29,88	-3,39	GDSL-like Esterase/Lipase, cuticle destructing factor 1
	AT3G48350	CEP3	-9,44	-4,93	Cysteine proteinases superfamily protein
	AT5G51750	SBT1.3	-5,45	-5,04	subtilase 1.3
	AT3G09220	LAC7	-62,90	-2,25	laccase 7
	AT3G20470	GRP5	-203,38	-5,01	glycine-rich protein 5
	AT1G02640	BXL2	-22,34	-2,62	beta-xylosidase 2
	AT5G48070	XTH20	47,31	2,27	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 20
	AT4G37800	XTH7	-12,28	-5,15	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7
	AT1G61820	BGLU46	65,97	2,69	beta glucosidase 46
	AT3G62740	BGLU7	-40,65	-5,33	beta glucosidase 7
Síntesis de flavonoides / chalconas, transporte de auxinas					
	AT5G13930	TT4	229,04	2,45	Chalcone and stilbene synthase, Transparent testa 4
	AT3G55120	TT5	65,51	2,73	Chalcone-flavanone isomerase, Transparent testa 5
	AT5G08640	FLS1	61,19	3,03	flavonol synthase 1
	AT5G05270	CHIL	55,91	2,53	Chalcone-flavanone isomerase family protein
	AT4G11880	AGL14	-17,41	-7,46	AGAMOUS-like 14
Morfogénesis de pelos radiculares y otros procesos de desarrollo y crecimiento					
Síntesis talianol	AT5G48010	THAS1	-60,68	-2,52	thalianol synthase 1, oxidosqualene cyclase
	AT5G48000	THAH1	-73,22	-2,54	thalianol hydroxylase 1, CYP708A2
	AT5G47990	THAD1	-95,97	-2,90	thalian-diol desaturase, CYP705A5
Síntesis marneral	AT5G42600	MRN1	-13,50	-7,51	marneral synthase
	AT5G42580	CYP705A12	-8,71	-5,51	cytochrome P450
Otros CYP450s	AT1G67110	CYP735A2	36,27	3,31	cytochrome P450, cytokinin hydroxylase
	AT3G48520	CYP94B3	41,68	4,99	cytochrome P450
	AT4G13290	CYP71A19	-19,86	-4,18	cytochrome P450
Pared celular	AT2G18470	PERK4	-5,00	-5,02	proline-rich extensin-like receptor kinase 4
	AT5G44400		-19,28	-4,82	FAD-binding Berberine family protein
	AT5G38020		-92,99	-3,72	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase

Dentro de los genes desregulados de forma estadísticamente significativa en la raíz, se identificaron un gran número de genes que codifican proteínas involucradas en procesos relacionados con la pared celular como son la elongación celular, la extensión de la pared celular y la síntesis de lignina (Tabla 3). La desregulación de este grupo de genes podría explicar los defectos observados en el crecimiento y desarrollo de los mutantes de silenciamiento inducible de *maMYB*, tales como la disminución de la longitud de la raíz primaria y del número de raíces secundarias, el acortamiento o ausencia de los pelos radiculares y la desestructuración de las células del tejido vascular de la raíz primaria (resultados parte II, apartados 7 y 8). La expresión de la mayoría de estos genes disminuyó entre 2 y 6 veces, mientras que los genes que aumentaron lo hicieron entre 2 y 65 veces. Dentro de este bloque de genes se encontraron genes de la familia de LTPs (*lipid transfer proteins*), como el clúster de 5 genes pertenecientes a la subfamilia HyPRPs (*Hybrid proline-rich proteins*), y genes que codifican proteínas con actividades variadas, entre las que destacan xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa, expansinas, beta-glucosidasa, beta-galactosidasa, extensinas y proteasas. Por otra parte, en la raíz también se identificó un grupo de genes involucrados en la síntesis de flavonoides y chalconas, que presentaron un aumento de su expresión entre 2.5 y 3 veces (Tabla 3). En concordancia con la relación descrita en *Arabidopsis* entre la síntesis de lignina, flavonoides y chalconas y el transporte de auxinas (Besseau et al., 2007; Kuhn et al., 2011), se encontró disminuida 7.5 veces la expresión del gen AGL14 (Tabla 3), que participa en la regulación transcripcional de los transportadores de auxinas PINs (*PIN-related*) (Garay-Arroyo et al., 2013). Las auxinas son hormonas que regulan aspectos del desarrollo y crecimiento de la raíz como la longitud de la raíz primaria, la morfogénesis de las raíces laterales y los pelos radiculares, y la diferenciación celular en el tejido vascular (Tanaka et al., 2006), por lo que la alteración en su transporte podría explicar el fenotipo observado en la raíz de los mutantes *amiRNAs*. Finalmente, comparando los genes desregulados en la raíz del mutante *amiRNA 2* con estudios transcriptómicos masivos de mutantes con alteraciones en los pelos radiculares (Jones et al., 2006; Won et al., 2009), se identificaron 27 genes desregulados que están implicados en la morfogénesis de los pelos radiculares. Entre ellos, de nuevo se encontraron genes que codifican proteínas implicadas en la pared celular y cuya expresión disminuye entre 3.5 y 5 veces (Tabla 3). Además, también se identificaron tres genes del clúster de cuatro genes implicados en la síntesis de talianol y dos genes del clúster de tres genes implicados en la síntesis de marneral (Tabla 3). La expresión de los genes de estos dos clústers disminuyó entre 2.5 y 7.5 veces, lo que sugiere que los niveles de ambos triterpenos estarían reducidos en la raíz del mutante *amiRNA 2*.

Por último, se identificaron tres genes pertenecientes a la familia CYP450 (Tabla 3), que junto con los otros involucrados en la síntesis de talianol y marneral, convierte a la familia CYP450 como la más representada en el grupo de los 27 genes implicados en la morfogénesis de los pelos radiculares.

subgrupo	código AGI	gen	Δ FPKM	fold change	descripción
Pared celular (elongación celular, extensión de la pared celular, síntesis de lignina)					
LTP-like	AT3G18280		166,62	5,29	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT5G48490		-151,26	-4,58	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT5G55410		20,97	41,41	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
HyPRPs (LTPs)	AT4G12480	EARL1	1263,89	12,50	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
	AT4G12490		31,93	23,98	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
Otros	AT2G27380	EPR1	4,61	250,85	extensin proline-rich 1
	AT1G76930	EXT4	291,48	5,59	extensin 4
	AT4G14130	XTH15/ XTR7	-22,42	-8,15	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15
	AT5G65730	XTH6	-58,33	-5,67	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6
	AT3G44990	XTR8	53,67	6,96	xyloglucan endo-transglycosylase-related 8
	AT3G49120	PRXCB	142,81	5,42	peroxidase CB
	AT5G64120	PRX71	44,50	5,66	Peroxidase superfamily protein
	AT4G26260	MIOX4	30,95	12,29	myo-inositol oxygenase 4
Síntesis de fenilpropanoides					
Peroxidasas	AT3G50740	UGT72E1	83,10	4,91	UDP-glucosyl transferase 72E1
	AT1G48130	PER1	22,36	33,73	1-cysteine peroxiredoxin 1
	AT3G49120	PRXCB	142,81	5,42	peroxidase CB
	AT5G64120	PRX71	44,50	5,66	Peroxidase superfamily protein
	AT5G64100	PRX69	25,69	6,87	Peroxidase superfamily protein, peroxidase 69
	AT2G37130		137,00	7,93	Peroxidase superfamily protein
Procesos relacionados con auxina					
Síntesis de IAA	AT3G50740	UGT72E1	83,10	4,91	UDP-glucosyl transferase 72E1
	AT1G78370	GSTU20	-186,59	-4,01	glutathione S-transferase TAU 20
	AT5G10180	AST68/ SULTR2;1	-58,67	-5,71	slufate transporter 2;1
	AT3G44300	NIT2	17,13	12,10	nitrilase 2
	AT1G17745	PGDH2	24,88	6,65	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
Respuesta primaria a auxina	AT1G04240	IAA3/ SHY2	-50,01	-4,14	AUX/IAA transcriptional regulator, IAA inducible 3, short hypocotyl 2
	AT4G32280	IAA29	-13,13	-12,75	indole-3-acetic acid inducible 29
Respuesta a luz-auxina	AT1G14280	PKS2	-27,66	-5,46	phytochrome kinase substrate 2
	AT2G42870	PAR1	-56,00	-6,54	phy rapidly regulated 1
	AT1G73870	BBX16/ COL7	-12,73	-8,43	B-box type zinc finger protein with CCT domain

Transporte transmembrana (aminoácidos, iones, nitratos, otros)					
	AT1G52190	NRT1.11	-24,67	-5,28	nitrate transporter 1.11
	AT5G50200	NRT3.1/ WR3	38,15	8,13	nitrate transmembrane transporters
nitratos	AT1G12940	NRT2.5	7,69	13,65	nitrate transporter2.5
	AT1G08090	ACH1/ NRT2:1	7,34	29,29	nitrate transporter 2:1
	AT4G32650	KC1/KAT3	13,82	6,92	potassium channel in Arabidopsis thaliana 3
	AT5G52750		106,47	5,00	Heavy metal transport/detoxification superfamily
	AT3G63380	ACA12	17,45	11,58	ATPase/haloacid dehalogenase-like hydrolase, calcium-transporting
iones	AT5G10180	AST68/ SULTR2;1	-58,67	-5,71	slufate transporter 2:1
	AT1G74810	BOR5	17,04	5,02	HCO ₃ ⁻ transporter family, boron transporter 5
	AT1G64170	CHX16	12,71	6,42	cation/H ⁺ exchanger 16
	AT4G27970	SLAH2	16,32	11,25	SLAC1 homologue 2
	AT5G26340	STP13/ MSS1	94,80	5,03	sugar transport protein 13
	AT3G21080		7,53	33,56	ABC transporter-related
otros	AT5G23660	SWEET12 /MTN3	-33,20	-10,99	homolog of Medicago truncatula MTN3, bidirectional sugar transporter
	AT1G73190	TIP3;1	16,99	20,47	aquaporin-like family, α -tonoplast intrinsic protein
	AT4G17340	TIP2;2	-60,90	-5,78	tonoplast intrinsic protein 2;2
	AT2G04050		11,93	10,52	MATE efflux family protein

Tabla 4. Selección de genes expresados diferencialmente en la parte aérea del mutante amiRNA 2. La tabla muestra grupos de genes con significado biológico similar según los mismos criterios que en la Tabla 3. Se indica el mismo tipo de información que en la Tabla 3.

Dentro de los genes desregulados de forma estadísticamente significativa en la parte aérea, se identificó también un grupo de genes involucrados en procesos relacionados con la pared celular (Tabla 4), aunque en menor cantidad que en la raíz. La desregulación de este grupo de genes es coherente con los defectos observados en el crecimiento y desarrollo de los mutantes de silenciamiento inducible de maMYB, como el menor tamaño de la parte aérea y la desestructuración de las células epiteliales de los cotiledones (resultados parte II, apartados 7 y 8). La expresión de la mayoría de estos genes aumentó entre 5 y 250 veces, mientras que la expresión de los genes que disminuyeron lo hicieron entre 4.5 y 8 veces. De forma similar a como ocurría en la raíz, dentro de este bloque relacionado con la pared celular se identificaron genes de la familia de LTPs y genes que codifican proteínas con actividades variadas como xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa, extensinas y peroxidasas. Por otra parte, en la parte aérea también se identificó un grupo de genes involucrados en la síntesis de fenilpropanoides, mayoritariamente peroxidasas, con un

aumento de su expresión entre 5 y 34 veces (Tabla 4). En concordancia con la relación descrita en *Arabidopsis* entre los niveles de especies reactivas de oxígeno regulados por peroxidasas y la homeostasis de auxina (Zhang et al., 2014a), se identificó un grupo de genes implicados en la síntesis de IAA (*indole-3-acetic acid*), en la respuesta primaria a auxina y en la respuesta a luz modulada por auxina. Estos grupos de genes presentaron una disminución de su expresión entre 4 y 8.5 veces, excepto tres de los genes involucrados en la síntesis de IAA, puesto que su expresión aumentó entre 5 y 12 veces (Tabla 4), lo que podría indicar que los niveles de auxina estarían aumentados en la parte aérea. Finalmente se identificaron un gran número de genes desregulados implicados en el transporte transmembrana, especialmente de nitratos e iones, la mayoría con una expresión aumentada entre 5 y 33.5 veces, mientras que los que disminuyeron su expresión lo hicieron entre 5 y 11 veces (Tabla 4).

subgrupo	código AGI	gene	raíz		parte aérea		descripción
			Δ FPKM	fold change	Δ FPKM	fold change	
Respuesta a estrés abiótico / estímulo hormonal							
ABA	AT5G44120	CRA1/	43,30	148,03	94,51	98,24	RmlC-like cupins family
	AT3G28580		14,71	6,20	3,23	61,79	AAA-type ATPase family
herida	AT3G48520	CYP94B3	41,68	4,99	50,02	4,18	cytochrome P450
congelación, frío	AT5G40420	OLE2/ OLEO2	10,54	20,80	19,34	17,08	oleosin 2
sequía	AT3G02480		58,38	9,47	69,21	6,16	Late embryogenesis abundant
ABA, herida	AT1G76930	EXT4	1164,58	3,39	291,48	5,59	extensin 4
ABA, frío	AT4G12480	EARLI1	1621,68	7,51	1263,89	12,50	lipid-transfer protein
ABA, congelación, frío	AT4G28520	CRC/ CRU3	8,68	Infinito	21,40	197,00	cruciferin 3
ABA, sequía	AT5G26340	STP13/ MSS1	31,21	3,00	94,80	5,03	sugar transport protein 13
	AT1G48130	PER1	12,09	26,78	22,36	33,73	1-cysteine peroxiredoxin 1
	AT1G73330	DR4	-1266,18	-3,14	-20,99	-9,14	drought-repressed 4
ABA, sequía, osmosis	AT2G35300	LEA18	21,29	14,31	38,14	24,81	Late embryogenesis abundant
ABA, sequía, osmosis, frío	AT5G15970	COR6.6 / KIN2	-419,86	-3,78	-232,27	-5,20	stress/cold responsive
Pared celular / elongación celular							
LTP-like	AT5G55410		12,69	64,53	20,97	41,41	lipid-transfer protein
HyPRPs (LTPs)	AT4G12480	EARLI1	1621,68	7,51	1263,89	12,50	lipid-transfer protein
	AT4G12490		84,01	23,45	31,93	23,98	lipid-transfer protein

Tabla 5. Selección de genes expresados diferencialmente comunes a ambos tejidos del mutante amiRNA 2. La tabla muestra grupos de genes con significado biológico similar según los mismos criterios que en la Tabla 3. Se indica el mismo tipo de información que en la Tabla 3.

Por último, los 29 genes comunes a ambos tejidos se encontraron desregulados en el mismo sentido y en un grado similar tanto en la raíz como en la parte aérea, y en su mayoría son genes implicados en respuesta a ABA y a estrés abiótico, como sequía, frío, congelación, choque osmótico y herida (Tabla 5). Como ya se había visto antes, también aparecieron tres genes de la familia LTPs (Tabla 5). La mayoría de los genes seleccionados aumentaron su expresión entre 3 y 200 veces, lo que sugiere que se estaría produciendo una fuerte activación de los mecanismos implicados en respuesta a ABA y estrés abiótico tanto en la raíz como en la parte aérea del mutante amiRNA 2. Podría ser posible que la desregulación de estos genes implicados en respuesta a estrés corresponda a una respuesta secundaria derivada del silenciamiento de maMYB. Por otra parte, tampoco se puede descartar que maMYB estuviese implicado en la integración de respuestas a estímulos de desarrollo con respuestas a estrés abiótico.

DISCUSIÓN

PARTE I: CARACTERIZACIÓN DE AtArv1 A TRAVÉS DE LAS INTERACCIONES QUE ESTABLECE CON OTRAS PROTEÍNAS

Si bien la proteína Arv1 se ha identificado y caracterizado en varios organismos eucariotas, todavía hoy en día se desconoce la función bioquímica concreta que desempeña. A pesar de ello, la información publicada hasta la fecha parece indicar que Arv1 sería un punto de conexión que vincula la homeostasis lipídica y de membranas con otros procesos celulares (introducción parte I, apartado 4). Las primeras investigaciones sobre Arv1 en levadura (ScArv1) postulaban a la proteína como un regulador dual en la homeostasis conjunta de esteroides y esfingolípidos (Tinkelenberg et al., 2000; Swain et al., 2002b). Ambos compuestos lipídicos se encuentran enriquecidos en los microdominios de la membrana plasmática celular (balsas lipídicas) en una determinada proporción, lo que resulta imprescindible para la correcta localización de los diferentes tipos de proteínas de membrana que abundan en dichos microdominios (Bagnat et al., 2000; Diaz-Rohrer et al., 2014). De esta forma, dichas proteínas de membrana quedan organizadas espacial y temporalmente en la membrana plasmática permitiendo que puedan ejercer correctamente sus funciones, que están implicadas en multitud de procesos celulares (Pike, 2003). Para ello, la célula debe disponer de mecanismos que coordinen de forma precisa los niveles de esteroides y esfingolípidos. Sin embargo, estos mecanismos son todavía muy desconocidos, por lo que la caracterización de la proteína Arv1 suscitó un gran interés ante la posibilidad de poder dilucidar los mecanismos que regulan la homeostasis lipídica intracelular.

Al iniciar este trabajo, nuestro grupo ya había identificado y comenzado a caracterizar las dos proteínas Arv de Arabidopsis, AtArv1 y AtArv2 (Forés del Ruste, 2007). En este sentido, se había observado que la supresión de los genes *ARV* mediante la expresión inducible de un siRNA en plántulas transgénicas de Arabidopsis, provocaba una disminución de los niveles de esteroides, especialmente el β -sitosterol, y un aumento de algunas BECLs (Keim, 2012), indicando que la función en plantas parecía estar también involucrada en el mantenimiento de la homeostasis lipídica intracelular. Asumiendo que probablemente para que una proteína ejerza una función reguladora es necesario que interactúe con otras proteínas, y con la finalidad de comprender y dilucidar la función biológica de las proteínas AtArv en un contexto celular, se decidió abordar la identificación y caracterización de proteínas capaces de establecer interacciones con la proteína AtArv1 mediante la técnica de doble híbrido en levadura. Teniendo en cuenta que AtArv1 es una proteína integral de

la membrana del RE (Forés et al., 2006), era necesario utilizar la variante del doble híbrido *split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid* (MbYTH) (Stagljar et al., 1998; Fetchko and Stagljar, 2004), que permite identificar proteínas solubles o de membrana que interaccionen con una proteína de membrana.

1. Similitudes y diferencias entre ScArv1 y AtArv1

1.1 Las proteínas ScArv1 y AtArv1 presentan la misma topología en la membrana del RE

El estudio de la topología de las proteínas ScArv1 y AtArv1 en la membrana del RE de levadura mediante la técnica del doble híbrido ha revelado que ambas proteínas tienen los extremos N- y C-terminal orientados hacia el citosol, y por tanto contienen un número par de DTMs (Figura 15), lo que concuerda con los resultados de topología obtenidos inicialmente con la proteína ScArv1 (Tinkelenberg et al., 2000) y con AtArv1 (Keim, 2012). Sin embargo, el resultado obtenido con ScArv1 discrepa con el modelo propuesto posteriormente de tres DTMs, que presentaría el extremo N-terminal orientado hacia la cara citosólica del RE y el extremo C-terminal hacia el lumen (Villasmil and Nickels, 2011). Según los perfiles de hidrofobicidad de las proteínas Arv de levadura, humano y plantas empleando varios programas bioinformáticos, que predicen un número variable de DTMs que oscila entre cuatro y seis, se propone que las proteínas Arv contendrían un número par de DTMs con los extremos terminales orientados hacia el citosol, de forma que la topología se habría conservado a lo largo de la evolución. Teniendo en cuenta que AtArv1 y AtArv2 presentan una similitud del 76% y un perfil de hidrofobicidad similar, es probable que ambas proteínas presenten el mismo tipo de topología, aunque no se ha demostrado experimentalmente.

1.2 AtArv1 y ScArv1 homodimerizan del mismo modo

Mediante ensayos de doble híbrido también se ha determinado que tanto ScArv1 como AtArv1 interaccionan consigo mismo, por lo que es posible que sean capaces de homodimerizar e incluso que puedan formar multímeros. Se ha observado que tanto la homodimerización de ScArv1 como de AtArv1 solo ocurre en una disposición concreta de las mitades de la ubiquitina (Arv1-Cub-FT y NubG-Arv1)

(Figuras 16 y 17). A pesar de que las proteínas ScArv1 y AtArv1 presentan una similitud del 32% (Figura 6), estas proteínas también heterodimerizan en la misma disposición (AtArv1-Cub-FT y NubG-ScArv1) a la observada en la homodimerización (Figura 18), lo cual es coherente con la observación de que la proteína AtArv1 es capaz de complementar la deficiencia de ScArv1 en el mutante de levadura *arv1Δ* (Forés et al., 2006), y todo ello indica que AtArv1 se habría conservado estructural y funcionalmente. La homología entre las secuencias de AtArv1 y AtArv2 sugiere que AtArv2 también es capaz de homodimerizar y que ambas proteínas puedan heterodimerizar entre ellas, lo que podría indicar una colaboración conjunta en su función, ya que ambos genes muestran una expresión solapante (Figura 7) y ambas proteínas se localizan en el RE (Forés et al., 2006). Estas cuestiones aún sin dilucidar desvelarían una especialización funcional o no entre AtArv1 y AtArv2.

1.3 AtArv1 no interacciona con CYP51 pero conserva la capacidad de interactuar con Erg11

En un estudio en busca de interacciones entre proteínas de membrana de *S. cerevisiae* se demostró que ScArv1 interacciona con Erg11, una enzima con actividad C-14 demetilasa que cataliza la conversión del lanosterol en 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol en la vía de síntesis de ergosterol (Miller et al., 2005), lo que concuerda con la acumulación de lanosterol y la disminución de los niveles de ergosterol en el mutante de levadura *arv1Δ* (Swain et al., 2002b). *Arabidopsis* contiene una única obtusifoliol 14-demetilasa (CYP51), que es funcionalmente equivalente a Erg11 de levadura (Kushiro et al., 2001; Kim et al., 2005). Ambas enzimas pertenecen a la familia de los citocromos P450 y se localizan en la membrana del RE. En este sentido, se investigó la topología de ambas proteínas en la membrana del RE y se ha demostrado que sus extremos terminales están orientados hacia el citosol (Figura 15). A pesar de estos antecedentes, no se pudo establecer la interacción entre AtArv1 y CYP51 en ninguna de las combinaciones posibles ni en los experimentos de doble híbrido en levadura (Figura 17) ni en los de BiFC en tabaco (datos no mostrados). Aunque las proteínas Erg11 y CYP51 comparten una similitud del 49% y catalizan el mismo tipo de reacción, podría ser que realmente en plantas no se haya conservado la capacidad de interactuar de CYP51, ya que los sustratos y las posiciones relativas que ambas enzimas ocupan en la vía son distintos. Así, mientras Erg11 cataliza la etapa inmediatamente posterior a la formación de lanosterol (Figura 1), el primer intermediario cíclico de la síntesis de ergosterol, y muestra poca especificidad de

sustrato, CYP51 se localiza varias etapas más adelante a la formación de cicloartenol (Figura 1), el primer intermediario cíclico de la síntesis de fitoesteroides, y muestra una alta especificidad a su sustrato el obtusifoliol (O'Brien et al., 2005; Kim et al., 2005).

Por el contrario, mediante ensayos de doble híbrido se ha confirmado que, tal y como ya se había publicado, ScArv1 y Erg11 interactúan. En concreto, se ha observado que esta interacción ocurre en una disposición de las mitades de la ubiquitina (ScArv1-Cub-FT y NubG-Erg11 o Erg11-NubG) que imita la de la dimerización de ScArv1 (Figura 16). Las proteínas AtArv1 y Erg11 también interactúan entre ellas en la misma disposición (AtArv1-Cub-FT y NubG-Erg11) que la observada en los experimentos de dimerización (Figura 19). Este resultado vuelve a confirmar que, a pesar de compartir un 32% de similitud, las proteínas ScArv1 y AtArv1 se han conservado lo suficiente durante la evolución como para que AtArv1 interactúe de forma cruzada con Erg11.

2. Identificación de potenciales interactores de AtArv1

Con el fin de comprender mejor la función biológica de las proteínas AtArv, decidió identificar las posibles interacciones que establece la proteína AtArv1 a través de un cribado en levadura empleando la técnica del MbYTH, y un banco de cDNA comercial generado a partir de RNA de plántulas de Arabidopsis de 6 días de edad, totalmente adecuado atendiendo al patrón de expresión de AtArv1 (Figura 7) (Forés et al., 2006). Teniendo en cuenta la disposición de las mitades de ubiquitina que había permitido detectar las interacciones con AtArv1 mencionadas en apartados anteriores, en el caso concreto del cribado se escogieron las disposiciones AtArv1-Cub-FT como proteína cebo y NubG-X como proteína presa (Figura 20A).

Tras una primera fase de selección durante el cribado (Figura 20B, pasos 1 a 6), se aislaron un total de 80 clones de cDNA y se identificaron sus secuencias (Figura 20B paso 7). Inicialmente, se descartaron los clones con secuencias del genoma cloroplástico y del genoma nuclear que codificaban proteínas de cloroplasto, ya que se consideró bastante improbable su interacción con AtArv1 que se localiza en la membrana del RE (Forés et al., 2006). Sin embargo, no se puede descartar completamente que alguna de estas proteínas pudiera interactuar con AtArv1 con motivo de establecer un determinado proceso biológico entre el cloroplasto y RE, como el intercambio de precursores lipídicos, iones y otros metabolitos entre las membranas plastídicas y del RE, necesario para la biogénesis de las membranas

tilacoidales (Awai et al., 2006; Benning et al., 2006; Benning, 2008; Schattat et al., 2011). Posteriormente, se descartaron los clones con secuencias del genoma nuclear que codificaban proteínas de vacuola (mayoritariamente aquaporinas), lo que hace bastante improbable una interacción con AtArv1, aunque no puede descartarse completamente, ya que las proteínas de la membrana vacuolar siguen la ruta secretora que se inicia en el RE y pasa por el aparato de Golgi hasta llegar a la vacuola. Las proteínas vacuolares podrían interactuar con AtArv1 en el RE como parte del proceso de maduración y/o tránsito de dichas proteínas.

Finalmente, teniendo en cuenta que AtArv1 es una proteína anclada al RE (Forés et al., 2006) y que ScArv1 se ha vinculado a la biosíntesis de GPI en levadura (Kajiwara et al., 2008), se tuvieron en cuenta parámetros como la localización subcelular, el perfil de hidrofobicidad y el anclaje a GPI de las proteínas codificadas por las secuencias de los restantes clones, para definir una lista de 12 proteínas candidatas a interactuar con AtArv1 (Tabla 2)

2.1 maMYB es capaz de interactuar con AtArv1 y AtArv2

De los candidatos seleccionados se decidió continuar trabajando con maMYB, ya que fue la interacción más intensa según los ensayos de confirmación anteriormente mencionados, y la segunda que más veces se encontró, hasta en seis colonias independientes de levadura obtenidas inicialmente en el cribado (Tabla 2). maMYB es un hipotético factor de transcripción de la familia MYB con el dominio R2R3-MYB en su extremo C-terminal, y según su perfil de hidrofobicidad, contiene dos DTMs en el extremo N-terminal (Figura 21). Todo ello, junto con la identificación de maMYB en un análisis proteómico del RE de Arabidopsis (Dunkley et al., 2006), sugería que maMYB se encuentra anclado a la membrana del RE, como de hecho se ha demostrado posteriormente (Figura 25). El hecho de que maMYB tuviese características de factor de transcripción anclado a la membrana del RE y de no haber sido caracterizado hasta la fecha, lo convertía en el candidato más interesante de los 12 identificados. Por otra parte, se ha determinado mediante ensayos de doble híbrido que maMYB también es capaz de interactuar con AtArv2 en la misma disposición de las mitades de la ubiquitina (AtArv2-Cub-FT y NubG-maMYB) que la empleada con AtArv1 (Figura 23). Sin embargo, empleando la técnica BiFC en tabaco y de inmunoprecipitación en Arabidopsis y tabaco no fue posible confirmar dicha interacción en planta (resultados parte I, apartado 8). El hecho de ser ambas proteínas

de membrana dificulta en gran medida el análisis de su interacción. Por una parte, las proteínas de fusión a cromóforos sobrepresadas en tabaco deben localizarse en la membrana manteniendo el plegamiento nativo para poder interactuar. Por otra parte, la extracción de complejos proteicos durante el proceso de coimmunoprecipitación ha de efectuarse en condiciones muy particulares para mantener un ambiente hidrófobo sin romper las membranas que permiten mantener la interacción hasta el final del proceso (Geertsma et al., 2008). Por último, tampoco puede excluirse que la interacción dependa de unas determinadas condiciones biológicas aún desconocidas.

No obstante, se siguió considerando que maMYB, aunque solo fuese por sí mismo, era muy interesante y se decidió seguir con él. Así, durante el desarrollo de esta tesis se han encontrado otras evidencias que avalan la interacción entre AtArv1 y maMYB. En primer lugar, el fenotipo descrito en los mutantes de silenciamiento inducible de maMYB (amiRNA 1 y amiRNA 2) se asemeja al fenotipo del mutante de silenciamiento de los genes *ARV* mediante expresión inducible de un siRNA (Figura 8) (Keim, 2012). En segundo lugar, se ha visto que los niveles de expresión del mRNA *AtARV1* disminuyeron en torno a un 85% en los mutantes amiRNAs respecto a las plantas control (Figura 51), lo que establece una relación genética entre *maMYB* y *AtARV1*. Sin embargo, a pesar de que maMYB es capaz de interactuar con AtArv2 (Figura 23), no parece existir una relación entre ambos a nivel genético, ya que los niveles de expresión del mRNA *AtARV2* permanecieron similares o disminuyeron levemente en los mutantes amiRNAs respecto al control (Figura 51).

2.2 La región N-terminal de maMYB es suficiente y el dominio AHD de AtArv1 no es necesario para la interacción

Por un lado, se ha visto que el dominio citosólico de la proteína maMYB no está implicado en la interacción con AtArv1, mientras que el extremo N-terminal de maMYB, que contiene una pequeña región citosólica y los dos DTMs predichos, es suficiente para establecer dicha interacción (Figura 22). Por otro lado, se ha visto que las versiones de AtArv1 carentes del putativo dedo de zinc y del dominio AHD entero, continúan siendo capaces de interactuar con maMYB (Figura 22), a pesar de que el dominio AHD de las proteínas Arv está altamente conservado y se ha postulado como una región propensa a establecer interacciones entre proteínas (Tinkelenberg et al., 2000). Esto indicaría que el dominio AHD de AtArv1, que ya se había visto que no era necesario para la correcta localización de la proteína en la membrana RE (Forés et al.,

de secuencias, se han seleccionado las dos proteínas Arv de *A. thaliana* (AtArv1 y AtArv2) y las proteínas Arv de las especies vegetales *S. lycopersicum* (tomate), *V. vinifera* (vid), *P. trichocarpa* (chopo), *O. sativa* (arroz) y *Z. mays* (maíz). Enmarcados con un recuadro en el alineamiento se encuentran el dominio AHD altamente conservado en el extremo N-terminal y una nueva región bastante conservada hacia la región C-terminal de las proteínas Arv de las especies vegetales seleccionadas. Resultados obtenidos mediante el programa bioinformático ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.3 AtArv1 podría establecer en plántula una red de interacciones con proteínas de la membrana plasmática

Además de la proteína maMYB, se identificaron otras 11 proteínas como potenciales interactoras con AtArv1 (Tabla 2). Aunque estas posibles interacciones no han sido estudiadas en mayor profundidad durante esta tesis, no cabe duda que resultaría muy interesante poder comprobar si AtArv1 establece una red más amplia de interacciones que podría involucrarla en diversos procesos biológicos. En este apartado se pretende especular sobre la posibilidad de que AtArv1 pudiera interactuar con estas proteínas identificadas, basándose en criterios como localización subcelular, perfil de hidrofobicidad, patrón de expresión, anclaje a membrana por GPI o procesos biológicos en los que participan.

Entre ellas, una de las más interesantes y mejor caracterizadas es la proteína arabinogalactano 18 (AtAGP18), que resultó ser la tercera de mayor intensidad en la interacción con AtArv1 según los ensayos de confirmación anteriormente mencionados (Tabla 2). Sin embargo, empleando la técnica BiFC en tabaco no fue posible establecer dicha interacción (datos no mostrados). Entre las razones más poderosas para considerar AtAGP18 como un verdadero interactor con AtArv1, destaca que en su paso por el RE se une a una molécula de GPI que ancla a la proteína en la membrana, para posteriormente seguir la ruta secretora hasta la membrana plasmática, quedando orientado hacia la cara exterior (Yang and Showalter, 2007). Teniendo en cuenta que ScArv1 se había vinculado con la biosíntesis de GPI (Kajiwara et al., 2008), podría ser posible que AtArv1 estuviera involucrado en este proceso de anclaje a la membrana del RE de la proteína AtAGP18. Además, se ha visto que AtAGP18 se expresa abundantemente en raíz y más moderadamente en la parte aérea de plántulas (Yang and Showalter, 2007), por lo que espacialmente tiene una expresión solapante con *ARV1* (Figura 7). En concreto, se ha asociado la expresión del promotor de *AtAGP18* con el tejido vascular y el tejido joven en crecimiento (Yang and Showalter, 2007), lo que concuerda con la expresión de *ARV1* en tejidos en desarrollo con una alta tasa de

crecimiento y división celular (Forés et al., 2006). Del mismo modo, la proteína AtAGP18 se ha involucrado en una ruta de transducción de señal que regula procesos de crecimiento y desarrollo (Zhang et al., 2011a, 2011b).

En segundo lugar, se identificaron dos proteínas de membrana de función desconocida (At2g01070 y At1g64650) que probablemente seguirían la ruta secretora hasta llegar a la membrana plasmática o también quizá a la membrana vacuolar en el caso de la segunda proteína. Según la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org), ambas proteínas se relacionan con la vía de síntesis de brasinoesteroides, moléculas relacionadas con el desarrollo en plántula y que derivan de la biosíntesis de esteroides.

También se identificó otra proteína de función desconocida (At1g22750) que presentó una interacción relativamente intensa y fue la que más veces se encontró en el cribado (Tabla 2). Las predicciones bioinformáticas indican que se localizaría en la membrana plasmática siguiendo la ruta secretora.

Entre las otras proteínas identificadas que interaccionarían con AtArv1 con menor intensidad, cabe destacar:

- La proteína AtAzc1 es un transportador de membrana de ácidos nucleicos de tipo purina (adenina-guanina) (Mansfield et al., 2009).
- La proteína AHA2 es una bomba de protones de la familia AHA (Arabidopsis H⁺-ATPase) que se localiza en la membrana plasmática, y en concreto en las balsas lipídicas (Fuglsang et al., 2007). AHA2 está involucrada en la acidificación del suelo a través de las raíces en respuesta a deficiencia de hierro (Santi and Schmidt, 2009), y en la apertura de los estomas de las hojas durante la infección por patógenos (Liu et al., 2009).
- La proteína AUX1 es un transportador de auxinas (molécula clave en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta) que se localiza en la cara apical de la membrana plasmática de las células del floema, donde facilita la entrada de auxinas desde el apoplasto al citoplasma (Swarup and Péret, 2012); y en el aparato de Golgi o endosoma de la mayoría de tipos celulares (Kleine-Vehn et al., 2006). AUX1 se expresa principalmente en la raíz primaria y lateral, y en el meristemo apical del tallo (SAM, *shoot apical meristem*) (Kleine-Vehn et al., 2006; Vernoux et al., 2010). La presencia de AUX1 es esencial para el gravitropismo en raíz (Bennett et al., 1996), la iniciación y elongación de pelos radiculares, la formación de raíces laterales y el desarrollo de hojas (Swarup and Péret, 2012).

- La proteína PDLP6 pertenece a la familia de proteínas localizadas en el plasmodesmo (PDLP, *plasmodesmata-located proteins*), que forman parte del sistema de transducción de señal percibiendo señales externas para regular el tráfico molecular entre células, y podrían jugar un papel fundamental en procesos de desarrollo y patogénesis (Thomas et al., 2008; Amari et al., 2010).

De forma general, las proteínas identificadas como posibles interactoras de AtArv1 se expresan en el estadio de plántula, y especialmente en raíz, lo que solapa con el patrón de expresión de *ARV1*; y son proteínas de membrana alojadas en su mayoría en la membrana plasmática. De entre las proteínas que ya han sido caracterizadas, se observa una mayor proporción de proteínas involucradas en transducción de señal y en procesos de desarrollo y crecimiento.

PARTE II: CARACTERIZACIÓN DE maMYB

Dentro de la familia MYB de *Arabidopsis* solo se han identificado cuatro miembros en los que se ha predicho la existencia de DTMs (Figura 11) (Kim et al., 2010). Entre ellos, los codificados por los genes At3g01140 y At2g13960 que contendrían en la región N-terminal un DTM seguido de una única repetición de tipo MYB (1R-MYB). El primero estaría involucrado en el desarrollo de tricomas (Jakoby et al., 2008), mientras que el segundo permanece sin caracterizar. Por otro lado, At5g11510 codifica una proteína con un DTM predicho en el extremo C-terminal y tres repeticiones de tipo MYB en la región N-terminal (3R-MYB), y estaría involucrado en la endoreduplicación del DNA en respuesta a infección por oídio (Chandran et al., 2009). Al iniciar este trabajo todavía no se disponía de ningún tipo de información experimental acerca del cuarto factor de transcripción (At5g45420), identificado en este trabajo por su capacidad para interactuar con AtArv1 (resultados parte I, apartado 5). Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis salió a la luz la primera y única publicación hasta la fecha sobre esta proteína, a la que se le denominó maMYB (*membrane-anchored MYB*) (Slabaugh et al., 2011), por lo que a medida que se vayan discutiendo los resultados obtenidos en esta tesis, se irán comparando oportunamente con los resultados y conclusiones obtenidos en dicha publicación.

La proteína maMYB contiene dos repeticiones tipo MYB en la región C-terminal que la harían formar parte de la subfamilia R2R3-MYB. Las repeticiones R2 y R3 de maMYB contienen 51 y 50 aminoácidos con una disposición $(X_3)\text{-W}\text{-(X}_{22})\text{-W}\text{-(X}_{22})\text{-I}\text{-(X}_1)$ y $(X_3)\text{-W}\text{-(X}_{22})\text{-W}\text{-(X}_{21})\text{-L}\text{-(X}_1)$, respectivamente (Figura 21). Sin embargo, el hecho de que posea el dominio R2R3-MYB en el extremo C-terminal, en vez de en N-terminal como es habitual, y la imperfección de las secuencias de R2 y R3 respecto a la consenso, convierte a maMYB en un miembro bastante atípico dentro de la subfamilia a la que pertenece. Al comparar la secuencia tanto del gen como de la proteína de maMYB contra el genoma y el proteoma de *Arabidopsis* respectivamente, se observó que maMYB está codificado por un único gen, y por tanto es el único representante de MTTFs de la subfamilia R2R3-MYB. En esta comparación, las proteínas codificadas por los genes At5g06110 y At3g11450 resultaron ser las más similares a maMYB. Estas proteínas, denominadas proteínas *MIDA1-like* por su similitud con la proteína MIDA1 de ratón, contienen en la región N-terminal un dominio DnaJ similar al de las proteínas Zuotin de hongos, y en la región C-terminal, al igual que maMYB, dos repeticiones tipo MYB, siendo esta región C-terminal la que presenta similitud con maMYB. A pesar de la presencia de las dos repeticiones MYB, algunos autores no

consideran que dichas proteínas *MIDA1-like* formen parte de la subfamilia R2R3-MYB, sino que las clasifican en un subgrupo aislado denominado proteínas MYB inusuales (Feller et al., 2011). Estas observaciones junto con las características atípicas de la proteína maMYB descritas anteriormente, hacen replantearse si realmente maMYB pertenece a la subfamilia R2R3-MYB, tal y como se había publicado (Slabaugh et al., 2011). En cualquier caso, se ha descrito que la proteína maMYB está conservada en varias especies de plantas, con homólogos identificados en *P. patens* (musgo) pero no en *C. reinhardtii* (alga) (Slabaugh et al., 2011). Este patrón en la conservación a lo largo de la evolución, sugiere que maMYB podría haber intervenido en el proceso de colonización de las plantas terrestres, y por tanto, desempeñaría una función específica de plantas.

1. maMYB es una proteína de membrana del RE con sus extremos orientados hacia el citosol

Mediante análisis por microscopía confocal se ha observado que la expresión transitoria en tabaco de la proteína de fusión GFP-maMYB muestra un patrón reticular que colocaliza perfectamente con el marcador de RE T3RE (Figura 25), lo que indica que maMYB es una proteína de membrana del RE. De acuerdo con las predicciones bioinformáticas, la proteína maMYB posee dos DTMs en el extremo N-terminal, que la anclarían a la membrana del RE (Figura 21). Por otra parte, en un estudio proteómico de las membranas intracelulares de *Arabidopsis*, se identificó a maMYB como una proteína potencialmente asociada al RE (Dunkley et al., 2006). Esta localización subcelular de maMYB coincide con la mostrada por AtArv1 (Forés et al., 2006), lo que a nivel celular hace espacialmente posible la interacción *in vivo* de ambas proteínas. Por otro lado, mediante la variante de doble híbrido MbYTH se ha determinado experimentalmente que el extremo N- y C-terminal de maMYB están orientados hacia el citosol (Figura 26). Esta topología concuerda con la idea de que maMYB sea un MTF canónico, ya que al exponer hacia el citosol el dominio con actividad de factor de transcripción R2R3-MYB, hace posible que bajo unas determinadas condiciones biológicas este dominio se libere de la membrana y se traslade al núcleo para ejercer su función. Estos resultados coinciden con los publicados sobre la localización subcelular de maMYB-YFP en tabaco y sobre la topología de maMYB en tabaco empleando la técnica BiFC (Slabaugh et al., 2011).

2. maMYB se expresa en varios tejidos, especialmente en tejido vascular de raíz y parte aérea

Mediante análisis por *Western blot* empleando un anticuerpo anti-péptido de maMYB, se ha observado que maMYB se expresa de forma ubicua aunque a niveles muy distintos en los tejidos de *A. thaliana* Col 0, pero es en plántula donde se expresa en mayor cantidad, abundantemente en raíz y moderadamente en parte aérea (Figura 30). Además, se ha visto que en plántula la expresión del gen quimérico *maMYB::GFP::GUS* (Figura 31) queda principalmente restringida al tejido vascular de los cotiledones y de la raíz primaria y lateral, excluyendo la zona meristemática de las puntas de las raíces y los pelos radiculares (Figura 32). Este patrón de expresión coincide con el de los genes *ARV* en el caso de la raíz, por lo que parece bastante probable que sea en el tejido vascular de la raíz primaria y lateral donde se pudiera dar la interacción entre maMYB y las proteínas AtArv. Además, se ha observado que la proteína maMYB se expresa activamente cuando las células en cultivo de la línea T87 de *Arabidopsis* se encuentran en la fase de crecimiento exponencial y va disminuyendo a medida que se acerca a la fase estacionaria (Figura 30). Este patrón de expresión de la proteína maMYB coincide con el de los genes *ARV*, que mediante RT-PCR se había visto que también se expresan en células de cultivo T87 de *Arabidopsis* (Forés et al., 2006), indicando que ambas proteínas son necesarias en células con una alta actividad metabólica asociada al crecimiento y la división celular.

3. El silenciamiento inducible de maMYB provoca una alteración del fenotipo y una reducción importante de los niveles de expresión de mRNA y proteína

La imposibilidad de identificar alelos mutantes por inserción de T-DNA con expresión reducida o nula de maMYB en las colecciones públicas (Figura 34), sugería que el gen maMYB es esencial, tanto más cuanto que hay un solo gen que codifica maMYB. Por lo tanto, se planteó una estrategia alternativa para superar esta limitación, basada en el silenciamiento condicional del gen maMYB mediante RNA interferente (RNAi) de tipo amiRNA (*artificial microRNA*). La expresión del amiRNA se encuentra bajo el control de un promotor inducible, lo que permite analizar la función de genes esenciales cuya inactivación resulta letal para la planta. El sistema inducible empleado, basado en el receptor de la hormona ecdisona (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004), permite que su activación pueda controlarse muy estrictamente mediante

agonistas sintéticos de la ecdisona como la metoxifenocida. Además, y a diferencia de otras estrategias, como la basada en la inducción por estradiol que se llegó a emplear inicialmente (datos no mostrados), el sistema inducible por ecdisona resulta ser sumamente eficiente y robusto (Dietrich et al., 2008), sin que por el momento se haya obtenido una pérdida del efecto del silenciamiento a lo largo de las sucesivas generaciones.

La tecnología de amiRNA aprovecha la maquinaria endógena de la planta para producir un único miRNA dirigido específicamente contra un gen o una familia de genes diana. Así, en comparación con otras estrategias de silenciamiento basadas en el uso de *hairpins* y RNA *antisense* que generan poblaciones heterogéneas de pequeños RNAs, la tecnología de amiRNA minimiza el riesgo de silenciamiento inespecífico de otros genes distintos al gen diana (*off-targets*). Para desarrollar la estrategia de silenciamiento del gen *maMYB*, se diseñaron dos secuencias de amiRNAs para que hibridasen en zonas distintas del mRNA del gen *maMYB*; amiRNA 1 en la región de los DTMs y amiRNA 2 en la región del subdominio citosólico R3 (Figura 35), lo que obedecía a dos objetivos principales. En primer lugar, asegurar el éxito del sistema ante la posibilidad de que una de las secuencias no fuese suficientemente efectiva para silenciar el gen *maMYB*. En segundo lugar, comparar los efectos producidos por ambos amiRNAs para asegurarse de que estaban asociados específicamente al silenciamiento de *maMYB* y poder descartar efectos *off-target*. En este sentido, mediante la caracterización de los dobles mutantes amiRNA1x35S::*maMYB* y amiRNA1x35S::*maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹ se ha confirmado que el fenotipo observado al silenciar la expresión de *maMYB* era específico.

Los resultados obtenidos han demostrado que el diseño de los amiRNAs fue acertado, puesto que se consiguió una reducción entre el 75 y 90% de la expresión del mRNA *maMYB* con el consecuente descenso de los niveles de proteína (Figuras 38 y 39). De esta forma, se consiguió superar el umbral de letalidad para las plántulas, lo que permitía abordar el estudio de la función y los mecanismos de regulación en los que se encontraría implicada la proteína *maMYB*.

3.1 El silenciamiento inducible de *maMYB* provoca alteraciones en el desarrollo de la raíz y la parte aérea

Los mutantes amiRNAs muestran una alteración severa del desarrollo de las plántulas con una disminución generalizada del tamaño de la parte aérea y de la raíz,

que es donde *maMYB* se expresa en mayor medida, y especialmente se ven afectadas la longitud de la raíz primaria, la formación de las raíces laterales y los pelos radiculares y la estructura de los cotiledones y la raíz (Figura 40, 47, 48, 43 y 41). En ambos mutantes las alteraciones fenotípicas fueron idénticas, con el matiz de que fueron más severas en el mutante *amiRNA 1* que en el *amiRNA 2*. De hecho, ya se había observado en el experimento dosis-respuesta que el mutante *amiRNA 1* empezaba a mostrar fenotipo a concentraciones de metoxifenocida más bajas que en el caso del mutante *amiRNA 2* (Figura 37). Estas observaciones podrían indicar que la secuencia del *amiRNA 1* es intrínsecamente más eficaz en el silenciamiento de *maMYB* que la del *amiRNA 2*, o que el mutante *amiRNA1* expresa mayor cantidad de *amiRNA* que el mutante *amiRNA 2*. Además, teniendo en cuenta que los *amiRNAs* hibridan en zonas distintas del mRNA de *maMYB* (Figura 35), se puede asegurar que las alteraciones fenotípicas son consecuencia directa y específica del silenciamiento de *maMYB*, descartando efectos *off-target*.

La función de las proteínas R2R3-MYB está relacionada principalmente con la regulación de la morfología y el metabolismo de las plantas ante diversas condiciones medioambientales (Feller et al., 2011), lo que permitió a las plantas colonizar el espacio terrestre mediante innovadoras formas de desarrollo para sobrevivir. Estos eventos en la evolución de las plantas terrestres implican el desarrollo de complejos ciclos de vida así como de nuevos órganos, tejidos y adaptaciones morfológicas (Kenrick and Crane, 1997). Así por ejemplo, MYB62 actúa en respuesta a falta de fósforo en las hojas, y su sobreexpresión provoca una disminución de la longitud de las raíces laterales y de la cantidad total de fósforo en la parte aérea (Devaiah et al., 2009). Por otra parte, la sobreexpresión de MYB15 mejora la tolerancia a sequía y estrés salino y provoca hipersensibilidad a ABA, lo que produce una mayor inhibición de la elongación de la raíz y una mayor inducción del cierre de los estomas de las hojas en presencia de ABA (Ding et al., 2009). MYB11 se ha identificado como un modulador del crecimiento global en *Arabidopsis*, reduciendo la actividad de las células meristemáticas y retrasando el desarrollo de la planta, de modo que el silenciamiento de MYB11 provoca una mayor elongación del hipocotilo y la raíz primaria, y la formación de un mayor número de raíces laterales (Petroni et al., 2008). Respecto a MYB96, en los mutantes de sobreexpresión se potencia la resistencia a sequía a la vez que se reduce la formación de raíces laterales, y se provoca un fenotipo global de enanismo (Seo et al., 2009). En el caso de MYB77, que está implicado en la respuesta a auxinas, los mutantes de sobreexpresión muestran un retraso en el crecimiento de la raíz y la parte aérea, mientras que en los mutantes de

silenciamiento se incrementa la densidad de raíces laterales en respuesta a altas concentraciones de auxinas (Shin et al., 2007). MYB61 se ha descrito que regula coordinadamente varios aspectos de la distribución de nutrientes, moldeando el crecimiento de la planta y la progresión a lo largo de su ciclo vital, como la formación de raíces laterales y de xilema en los cotiledones e hipocotilo y el crecimiento de la raíz primaria (Romano et al., 2012). Recientemente, se ha descrito que MYB93 se expresa en algunas células de la endodermis de las raíces laterales incipientes, donde regula negativamente el desarrollo de la raíz lateral probablemente inducido por auxinas (Gibbs et al., 2014). Finalmente, MYB59 actúa como un inhibidor del crecimiento de la raíz prolongando la metafase durante la mitosis en las células de la punta de la raíz (Mu et al., 2009). De forma análoga a maMYB, estos ejemplos de factores de transcripción de la subfamilia R2R3-MYB demuestran que su actividad puede influir en la estructura de la raíz, en el crecimiento y desarrollo conjunto de la parte aérea y la raíz, y en procesos específicos de las hojas, implicando diversas rutas que podrían interconectar funciones de la raíz y de la parte aérea.

3.2 El silenciamiento inducible de maMYB altera la estructura de la raíz primaria y el desarrollo de los pelos radiculares

Los cortes transversales de la raíz primaria de los mutantes amiRNAs muestran una alteración en la forma, tamaño y número de las células de las diferentes capas de la raíz, lo que se traduce en un desarrollo más lento de la raíz y una fuerte reducción de su diámetro (Figura 43). Además, muestran una reducción severa en la longitud de los pelos radiculares, e incluso se observan zonas de la raíz en la que los pelos radiculares son prácticamente inexistentes (Figura 41), por lo que parece que maMYB es esencial para la formación y elongación de los pelos radiculares.

La estructura de la raíz de *Arabidopsis* consiste en varias capas concéntricas de células (Figura 42) que cumple funciones concretas (Dolan et al., 1993; Scheres et al., 1994). La epidermis está involucrada en la absorción de los nutrientes y en la diferenciación de los pelos radiculares. La cofia protege el crecimiento de la punta de la raíz y facilita la penetración en el suelo por la secreción de compuestos específicos. La función principal de la endodermis es prevenir el paso de iones desde el córtex a la estela por la vía del apoplasto (a través del espacio extracelular periférico a la membrana plasmática). Esto es esencial para la absorción selectiva de iones, nutrientes y agua (Evert, 2006). Las células del procambium y cambium son células

madre vasculares en dos estados de desarrollo diferentes, y producen continuamente xilema y floema (crecimiento secundario: dirección lateral), principal tejido conductivo de las plantas. El xilema es el tejido principal para el transporte de agua y minerales solubles, mientras que el floema es la ruta para la distribución de los productos fotosintéticos y diversas moléculas de señalización requeridas para el crecimiento y la defensa (Evert, 2006; Miyashima et al., 2013).

Los pelos radiculares crean una amplia superficie que permite a la planta absorber agua y nutrientes (Raven and Edwards, 2001). Para el desarrollo de los pelos radiculares, en primer lugar se determina que células de la epidermis de la raíz son formadoras de pelo radicular (tricoblasto o célula H) y cuáles no (atricoblasto o célula N), que se establece por su posición respecto al córtex (la capa celular subyacente). En segundo lugar, mediante determinadas señales se pone en marcha una red de regulación transcripcional (Lee and Schiefelbein, 2002). En concreto, se ha visto que la proteína SCM (SCRAMBLED, *leucine rich repeat receptor kinase-like protein*) podría transmitir desde el córtex a la célula H la señal responsable del patrón celular dependiente de su posición, y regularía la expresión del factor de transcripción de tipo R2R3-MYB WER (WEREWOLF) de forma positiva en las células N y de forma negativa en las células H (Kwak and Schiefelbein, 2007; Schiefelbein and Lee, 2006). De esta forma, WER activa un circuito regulatorio entre la célula N y H (Figura 57) que en última instancia inhibe y promueve la formación del pelo radicular, respectivamente (Schiefelbein and Lee, 2006).

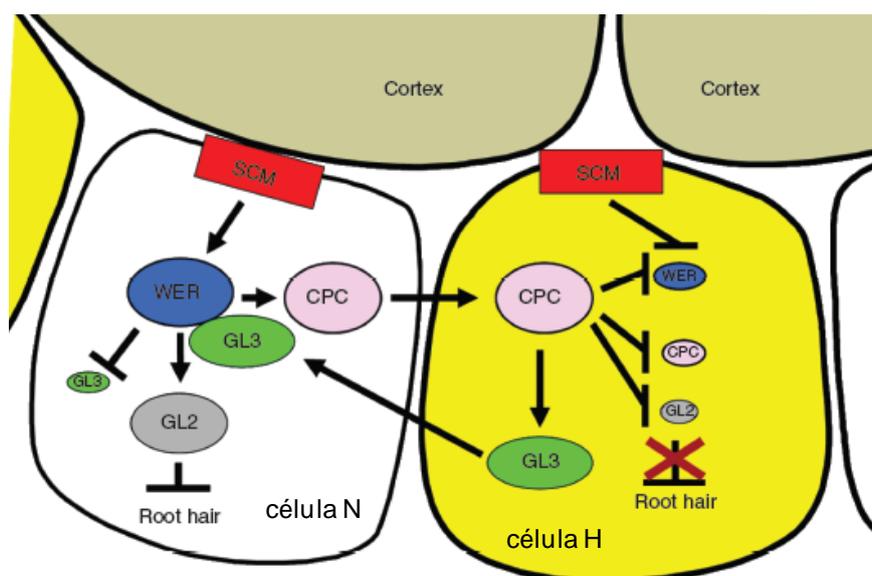


Figura 57. Circuito regulatorio que determina la identidad de las células epidérmicas formadoras de pelo radicular en *Arabidopsis*. Las flechas indican regulación positiva o movimiento proteico en el caso de CPC y GL3. Las líneas con extremos romos indican regulación negativa. En este modelo, EGL3, TRY y ETC1 no están incluidos por simplificación. La proteína EGL3 se cree que actúa del mismo modo que GL3, y las proteínas TRY y ETC1 se cree que actúan como CPC. Figura modificada de Schiefelbein and Lee, 2006.

El factor de transcripción de tipo R2R3-MYB WER participa en la determinación de las células N y H mediante la formación de un complejo de tres tipos de factores de transcripción (WD40-bHLH-R2R3-MYB) (Lee and Schiefelbein, 1999). La disrupción de este complejo proteico en los mutantes de silenciamiento de la expresión de WER hace que no se determine la identidad de las células N, lo que provoca la formación de pelos radiculares en cualquier célula de la epidermis (Lee and Schiefelbein, 1999). Recientemente, se ha visto que la interacción del fosfolípido ácido fosfatídico con la proteína WER es esencial para su localización nuclear, y por tanto, para su correcta función en la formación y elongación de los pelos radiculares (Yao et al., 2013). Además, también se ha observado que MYB23, perteneciente a la subfamilia R2R3-MYB, está regulado positivamente por WER y refuerza la determinación de la identidad de la célula N, donde realiza la misma función que WER (Kang et al., 2009).

Una vez que se ha determinado la célula formadora de pelo radicular, tiene lugar la elongación del mismo a partir de su crecimiento por la zona apical, lo que conlleva varios cambios intracelulares en dicha zona relacionados con el pH en el citoplasma y el apoplasto, los niveles de especies reactivas de oxígeno, el aporte de nueva pared celular y la formación de un gradiente de calcio (Jones et al., 2006; Libault et al., 2010). Por otra parte, el citoesqueleto también está implicado en el crecimiento del pelo radicular, ya que es necesaria la presencia de microtúbulos y actina para su correcta elongación (Sieberer et al., 2005; Pei et al., 2012; Ketelaar, 2013). Además, se ha descrito que las hormonas auxinas y etileno regulan positivamente la elongación de los pelos radiculares específicamente en eventos posteriores al circuito regulatorio transcripcional descrito anteriormente (Muday et al., 2012). A ello se suma que el ácido jasmónico y el metil jasmonato inducen la formación de pelos radiculares mediante la interacción con etileno (Zhu et al., 2006). Finalmente, también se ha visto que determinadas condiciones medioambientales afectan al desarrollo de los pelos radiculares, como por ejemplo, la deficiencia de hierro y fósforo que inducen la formación de pelos radiculares (Müller and Schmidt, 2004).

Aunque se han identificado numerosos genes involucrados en la formación y elongación de los pelos radiculares, todavía no se conoce completamente los mecanismos responsables de estos dos procesos (Jones et al., 2006; Won et al., 2009). Teniendo en cuenta la multitud de factores biológicos, medioambientales y de desarrollo que afectan al proceso de formación de pelos radiculares, resulta razonable pensar que, además de las proteínas ya conocidas, otros reguladores transcripcionales podrían también intervenir en estos procesos, como podría ser el caso de *maMYB*. Sin embargo, mediante el análisis histoquímico de la actividad GUS no se ha observado expresión del gen *maMYB* en los pelos radiculares ni en las células epiteliales, sino en el tejido vascular de la raíz, especialmente en la zona radial más interna como es la estela (Figura 32). Por lo tanto, podría ser posible que las alteraciones provocadas por el silenciamiento de *maMYB* en las células del tejido vascular, afectasen a mecanismos anteriores a los desarrollados en las células epiteliales para determinar la identidad de las células N y H, como por ejemplo, el mecanismo aún desconocido de generación de la señal percibida por la proteína SCM que define el posicionamiento de las células epiteliales respecto de las del córtex. También es posible que el silenciamiento de *maMYB* resulte en una regulación aberrante de una ruta desconocida que, en último lugar, provoque efectos pleiotrópicos que afecten al desarrollo de los pelos radiculares.

En la publicación de Slabaugh et al., 2011, el silenciamiento constitutivo de la expresión de *maMYB* mediante un hpRNA en los mutantes *knock-down* RNAi-1 y RNAi-2, provoca una disminución en la elongación de los pelos radiculares. Los mutantes de silenciamiento inducible generados en esta tesis (amiRNA 1 y amiRNA 2), además de mostrar un fenotipo más drástico en los pelos radiculares, también presentan fenotipo en el crecimiento de la raíz primaria, en la formación de raíces laterales y en la diferenciación y división celular del tejido vascular, especialmente en el procambium/cambium, además de alteraciones de desarrollo y crecimiento en la parte aérea. Estas diferencias cualitativas y cuantitativas podrían ser debidas a una mayor eficacia de la tecnología del amiRNA frente al hpRNA. Aunque los niveles de expresión de mRNA y proteína *maMYB* en ambos tipos de mutantes son muy parecidos (Figuras 49 y 50) como para poder explicar las diferencias en el fenotipo, es posible que los niveles de proteína *maMYB* en los mutantes amiRNAs se encuentren por debajo del umbral que condiciona la severidad del fenotipo, pero la sensibilidad de la técnica de *Western blot* no permitiría afinar suficiente como para visualizar dichas diferencias. Por otra parte, se ha visto que los niveles de expresión del mRNA *AtARV1* disminuyeron en torno a un 85% en los mutantes amiRNAs respecto a las plantas

control, mientras que dicho efecto no se apreció en el mutante RNAi-2 (Figura 51), lo que podría ser una de las causas de las diferencias de fenotipo entre ambos tipos de mutantes de silenciamiento de *maMYB*.

Además, en la publicación de Slabaugh et al., 2011, se vincula la función de *maMYB* en la elongación de los pelos radiculares con la señalización por auxinas, ya que se ha visto que en presencia del análogo de auxina 2,4-D (ácido 2,4-dichlorophenoxyacetico) se rescata el fenotipo en la elongación de los pelos radiculares, aunque los autores no descartan que dicho rescate ocurra mediante un mecanismo independiente de *maMYB*. También han observado que los niveles de mRNA de *maMYB* se inducen 1.4 veces en plántulas Col 0 crecidas en presencia de los análogos de auxina 2,4-D y IAA (ácido indol-3-acético), por lo que las auxinas podrían participar en la regulación de *maMYB* a nivel transcripcional (Slabaugh et al., 2011). En el caso de los mutantes amiRNAs no se ha comprobado que pase lo mismo, aunque cabe pensar que podría ser así.

Las auxinas participan en la regulación espacio-temporal del desarrollo y crecimiento de las plantas, a través de procesos como la determinación del patrón celular en la raíz, la formación de nuevos órganos como las raíces laterales y los pelos radiculares, la diferenciación celular en el tejido vascular y la modificación del crecimiento en respuesta a estímulos medioambientales (Tanaka et al., 2006). Dentro de estos tejidos existe un patrón asimétrico en la distribución de las auxinas, estableciéndose un gradiente que cambia de forma dinámica durante los diferentes procesos de desarrollo (Tanaka et al., 2006). De esta forma, las zonas de la planta en los que se inician dichos procesos de desarrollo quedan determinadas por concentraciones máximas de auxinas (Petrásek and Friml, 2009). La mayoría de las auxinas se sintetizan en la parte aérea y se distribuyen de forma direccional desde la parte aérea hasta la punta de la raíz a través del tejido vascular, en concreto de las células del floema (Tanaka et al., 2006; Petrásek and Friml, 2009). Teniendo en cuenta el tipo de alteraciones observadas en los mutantes amiRNAs y el vínculo descrito entre *maMYB* y la señalización por auxinas (Slabaugh et al., 2011), se puede especular que el silenciamiento de *maMYB* provoque efectos en el correcto transporte de auxinas por el tejido vascular, impidiendo su distribución adecuada por la plántula. Esto podría explicar la ralentización generalizada en el desarrollo de la raíz primaria y la parte aérea.

El transporte polarizado de las auxinas está mediado por los transportadores de las familias PIN, ABCB y AUX1/LAX, y gracias a su localización subcelular

polarizada en la cara apical y basal de la célula, guían la dirección del flujo de las auxinas permitiendo su entrada o salida (Tanaka et al., 2006; Petrásek and Friml, 2009). La localización de estos transportadores cambia en respuesta a señales externas y de desarrollo, regulando el flujo de las auxinas para un crecimiento ordenado de la planta (Tanaka et al., 2006). En este sentido, es posible que en los mutantes amiRNAs también se vea afectado el transporte lateral de auxinas desde el floema hasta el periciclo y la epidermis, lugares donde tiene lugar el proceso de iniciación de la raíz lateral y el pelo radicular, respectivamente. Por lo tanto, cuando se suministra exógenamente análogos de auxinas (Slabaugh et al., 2011), éstos son absorbidos directamente por las células de la epidermis y pueden rescatar el fenotipo en la elongación de los pelos radiculares.

Además, el transporte de auxinas se puede regular mediante la abundancia y actividad de los transportadores, los niveles de inhibidores endógenos, el gradiente de pH creado a través de la membrana plasmática entre el apoplasto y el citosol, la composición lipídica de la membrana plasmática y las interacciones que establecen los transportadores (Petrásek and Friml, 2009). En este sentido, la composición de la membrana plasmática provee de un entorno adecuado para establecer la correcta localización subcelular e interacciones de los transportadores (Petrásek and Friml, 2009). Teniendo en cuenta la posible interacción entre las proteínas maMYB y AtArv1, se podría pensar que el silenciamiento de maMYB altera la composición lipídica de la membrana plasmática de las células del tejido vascular, afectando al patrón de distribución de auxinas mediada por sus transportadores y la posterior transducción de su señal mediada por sus receptores. En este sentido, tampoco se puede descartar que también se vea afectada la señalización por etileno, que se ha descrito que también regula positivamente la formación de pelos radiculares y negativamente la de las raíces laterales (Muday et al., 2012).

Por otra parte, se ha visto que las auxinas juegan un papel crucial en la diferenciación del procambium/cambium, alcanzando en esta zona del tejido vascular un pico de máxima concentración (Miyashima et al., 2013). La supresión de esta señalización por auxinas reduce la división en las células del cambium, afectando el crecimiento del floema y especialmente del xilema, y el crecimiento radial de la raíz, afectando a su grosor (Miyashima et al., 2013), lo que podría explicar las alteraciones en la diferenciación y división celular observadas en la zona del procambium/cambium en los mutantes amiRNAs.

3.3 El silenciamiento inducible de maMYB provoca una reducción en los niveles de esteroides

La cantidad total de esteroides en el mutante amiRNA 2 disminuye un 20% en la raíz y un 10% en la parte aérea. En particular se modifican los niveles de los productos finales de la ruta, con una reducción en la raíz de más del 55% en el nivel total de estigmasterol y un aumento en la parte aérea de casi el 80% en el de brasicasterol. Los niveles de sus precursores inmediatos también se ven afectados, con una disminución en la raíz de más del 25% en el nivel de campesterol y en la parte aérea de más del 10% en el de β -sitosterol (Figura 44).

La principal función de los esteroides en las células vegetales es la formación y modulación de la fluidez de las membranas (Hartmann, 1998). Además, se ha demostrado que modificaciones en el contenido de esteroides de la membrana plasmática alteran las funciones y la distribución de sus proteínas (enzimas, canales, receptores o componentes de vías de transducción de señal) (Grandmougin-Ferjani et al., 1997; Schaller, 2004). El análisis de mutantes de la parte troncal de la vía de síntesis de esteroides ha revelado también un papel esencial de estos compuestos como moléculas señalizadoras en procesos esenciales para el desarrollo de las plantas, como por ejemplo, la elongación celular y la diferenciación vascular (Clouse, 2002; Lindsey et al., 2003; Schaller, 2004). Los estudios realizados en mutantes de *Arabidopsis* defectuosos en las etapas previas al intermediario 24-metilfenol (Figura 1), han revelado defectos pleiotrópicos en el desarrollo de la raíz, la parte aérea y especialmente en el tejido vascular, lo que recuerda a los fenotipos de los mutantes amiRNAs. El mutante *dry2/sqe1-5* portador de una mutación puntual en el gen escualeno epoxidasa 1 (*SQE1*), tiene alterada la composición de esteroides en la raíz pero no en la parte aérea, y muestra clorosis, una reducción en el tamaño de la parte aérea y de la raíz y una alteración en el desarrollo de los pelos radiculares (Posé et al., 2009). Otro ejemplo es el mutante *cyp51A2* afectado en la etapa de 14 α -desmetilación de la vía de esteroides, con la acumulación de su sustrato obtusifoliol y una disminución de los productos finales de la vía, lo que provoca una disminución de la longitud de las raíces (Kim et al., 2005). Los mutantes *hydra*, *hyd1* (*sterol C-8,7 isomerase*) y *hyd2* (*sterol C-14 reductase*), presentan una disminución en la concentración de los tres esteroides mayoritarios de *Arabidopsis* que parece afectar a la señalización por auxinas y etileno y/o al transporte de auxinas, y se caracterizan por un fenotipo pleiotrópico con alteraciones en el patrón celular general y en especial del tejido vascular de las plántulas, en la morfogénesis post-embionaria, y en el

crecimiento de la raíz y de los pelos radiculares (Souter et al., 2002). Por último, la pérdida de función de *SMT1* (*sterol methyl transferase 1*) provoca una alteración de la composición de esteroides, una deslocalización de las proteínas PIN1 y una reducción del transporte polar de auxinas (Diener et al., 2000; Willemsen et al., 2003).

Por otra parte, se ha descrito que los esteroides estructurales se acumulan en la membrana plasmática de los tricoblastos durante el inicio de la protuberancia de los pelos radiculares y en la región apical de los pelos radiculares durante su elongación, sugiriendo que sirven como marcadores para el inicio y la elongación de los pelos radiculares (Ovecka et al., 2010). En la raíz del mutante amiRNA 2 está significativamente disminuido el nivel de estigmasterol, que es uno de los esteroides críticos para el correcto funcionamiento de las membranas, lo que podría ser una de las causas del fenotipo en los pelos radiculares descrito en el apartado anterior.

Todos estos antecedentes sugieren que las alteraciones fenotípicas observadas en los mutantes de silenciamiento de maMYB podrían ser en parte consecuencia de la alteración de los niveles de algunos esteroides. Ello desencadenaría una serie de alteraciones en las membranas que afectarían a procesos como el transporte y la señalización por hormonas. Teniendo en cuenta la interacción observada entre maMYB y AtArv1, lo que queda por establecer es si estas alteraciones en el perfil de esteroides están mediadas indirectamente a través de AtArv1, que en levadura se ha propuesto como regulador de la homeostasis lipídica y de membranas.

4. La sobreexpresión constitutiva de maMYB y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ no altera el fenotipo, mientras que la sobreexpresión inducible produce alteraciones parecidas al silenciamiento de maMYB

En contraste con el silenciamiento, los mutantes de sobreexpresión constitutiva de maMYB entero (35S::maMYB) y del dominio citoplasmático (35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) no mostraron alteraciones visibles en el fenotipo de la parte aérea ni de la raíz (Figuras 47 y 48). La caracterización molecular de los mutantes 35S::maMYB y 35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ ha revelado que a pesar de que los niveles de mRNA de *maMYB* aumentaron más de 30 y 3 veces respectivamente (Figura 45), los niveles de las correspondientes proteínas maMYB-3xHA y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA fueron incluso inferiores al nivel de maMYB endógeno en las plantas control (Figura 46). Por otra parte, al comparar la expresión de maMYB endógeno entre el control y los mutantes de sobreexpresión, se

observó un cierto silenciamiento de la expresión de maMYB endógeno en el mutante 35S::maMYB (Figura 46), que podría ser consecuencia de la expresión de maMYB-3xHA. Estas observaciones sugieren la existencia de algún mecanismo de regulación muy sensible que actúa para que los niveles de proteína maMYB total no superen un determinado umbral, lo cual explicaría la falta de alteraciones en el fenotipo de los mutantes 35S::maMYB y 35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹. Slabaugh et al. (2011) también observaron que la sobreexpresión constitutiva en Arabidopsis de una versión truncada de maMYB, equivalente a la empleada en este trabajo pero fusionada a YFP (YFP-maMYB⁸⁴⁻³⁰⁹), tampoco daba lugar a alteraciones en el fenotipo.

Por el contrario, los mutantes de sobreexpresión inducible de maMYB entero (EcR:35S::maMYB) y del dominio citosólico (EcR:35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) sí mostraron alteraciones en la raíz y la parte aérea (Figura 47 y 48). En dichos mutantes los niveles de mRNA de *maMYB* aumentaron más de 200 veces (Figura 45), y consecuentemente también aumentaron los niveles de proteína (Figura 46). Las discrepancias observadas entre la sobreexpresión constitutiva e inducible de maMYB podrían deberse a una selección negativa de los mutantes sobreexpresores de altos niveles de maMYB en forma constitutiva, de tal manera que se favorecería la selección de aquellos mutantes que realmente expresasen de forma moderada la proteína y no alterasen el desarrollo de la planta. En contraposición, este tipo de selección negativa no es posible en el caso de la sobreexpresión inducible, lo cual permite llegar a unos niveles de sobreexpresión tóxicos. En términos de fenotipo, parece que los mutantes EcR:35S::maMYB y EcR:35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ presentan ciertas similitudes con los mutantes amiRNAs. Estos resultados indican que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión inducibles de maMYB o del dominio citosólico de maMYB provocan un desarrollo más lento y alterado en la parte aérea y raíz de las plántulas. Sin embargo, de momento no se puede determinar si dichos efectos se producen a través de los mismos mecanismos en ambos tipos de mutantes.

5. Evidencias que apoyan la hipótesis de que maMYB es un MTF canónico perteneciente a la familia MYB

5.1 maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se localiza en el núcleo y el nucléolo

Mediante la expresión transitoria en tabaco de la proteína quimérica GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se ha observado que la proteína se localiza en el núcleo (Figura 27), probablemente mediante transporte activo dirigido por la presencia de las dos señales de localización nuclear KRSK y KKAK (Figura 24). Ello demuestra que los DTMs son los responsables de la retención de maMYB en el RE, y se aporta la primera evidencia indirecta de que en caso de proteolizarse, el dominio citosólico de maMYB puede trasladarse al núcleo donde ejercería su función como regulador de la expresión génica. Resultados similares fueron obtenidos por Slabaugh et al. (2011), empleando la técnica FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) para demostrar la localización subcelular en el núcleo de la proteína quimérica YFP-maMYB⁸⁴⁻³⁰⁹.

En particular se ha observado una acumulación preferencial de GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ en el nucléolo, ya que colocaliza perfectamente con el marcador de nucléolo fibrillarín-mRFP, pero no lo hace ni con el marcador de cuerpos de Cajal coilin-mRFP ni con el de *splicing speckles* SRp30-mRFP (Figura 29). La principal función del nucléolo es la biogénesis y maduración de los ribosomas, ya que es donde se transcribe el rDNA que da lugar a los distintos rRNAs, aunque también se ha visto que en él se transcriben y maduran múltiples RNAs necesarios para el ensamblaje de otras ribonucleoproteínas (Shaw and Brown, 2012). Además, el nucléolo está involucrado en varios procesos celulares como la regulación del ciclo celular, las respuestas a estrés, la actividad telomerasa y el envejecimiento (Shaw and Brown, 2012). Estas observaciones sugieren que maMYB podría estar involucrado en alguno de estos procesos típicos del nucléolo de forma exclusiva, o conjuntamente con la regulación de la expresión génica en el nucleoplasma. No obstante, la presencia de mRNAs y siRNAs en el nucléolo, ha llevado a algunos autores a especular que éste podría estar también involucrado en la regulación de la expresión génica, posiblemente en respuesta a una determinada condición celular (Shaw and Brown, 2012). Además de la localización nuclear, GFP-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ también se encuentra en pequeñas partículas citosólicas que podrían estar reflejando el proceso de traslado de dicha proteína quimérica hacia el núcleo.

5.2 La reversión del fenotipo causado por el silenciamiento de maMYB mediante la sobreexpresión constitutiva del dominio citosólico maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ demuestra su funcionalidad *in vivo*

Mediante la caracterización de los dobles mutantes amiRNA1x35S::maMYB y amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se pretendía por un lado confirmar que el fenotipo observado al silenciar la expresión de maMYB era específico, y por otro, demostrar la funcionalidad del dominio citosólico. Como era de esperar, los niveles de proteína maMYB endógena en los dobles mutantes continuaron siendo casi inexistentes (Figura 46) debido al silenciamiento mediado por el amiRNA 1. Sin embargo, la expresión de maMYB-3xHA en el doble mutante amiRNA1x35S::maMYB sí se detectaba, aunque de forma más débil que el mutante simple 35S::maMYB porque el amiRNA también lo silencia (Figura 46). Por el contrario, la débil expresión de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA observada en el mutante simple 35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, consiguió mantenerse en el doble mutante amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (Figura 46), ya que el amiRNA 1 por su diseño no podía silenciar la expresión de este transgén. Consecuentemente, se observaron comportamientos distintos en cuanto al fenotipo de ambos mutantes de cruzamiento. El doble mutante amiRNA1x35S::maMYB mostró una reversión muy ligera del fenotipo de silenciamiento del mutante amiRNA 1, principalmente en la longitud de la raíz primaria (Figuras 47 y 48). Esto se debe a que el amiRNA 1 es capaz de silenciar tanto el gen *maMYB* endógeno como el sobreexpresado, lo que hace que la cantidad total de maMYB en el doble mutante continúe siendo sensiblemente inferior a la de las plantas control. En cambio, el doble mutante amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ presentó una reversión muy importante del fenotipo de silenciamiento tanto en la raíz como en la parte aérea, salvo en el número de raíces laterales (Figuras 47 y 48). Esto podría indicar que la expresión de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA en el doble mutante no alcanzase el nivel mínimo necesario para revertir todos los fenotipos, o que en algunos tipos celulares específicos no se alcanzase este nivel y en otros sí.

En conclusión, el análisis fenotípico del mutante amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ no solo refuerza el hecho de que el fenotipo de los mutantes amiRNAs es debido al silenciamiento de maMYB, sino también que la versión truncada de maMYB tiene función biológica *in vivo*, lo que constituye otra evidencia indirecta que apoya la hipótesis del procesamiento de maMYB de forma endógena para cumplir su función en el núcleo, comportamiento característico de los MTFs. En este sentido, a partir del análisis transcriptómico del mutante YFP-maMYB⁸⁴⁻³⁰⁹ descrito por Slabaugh et al. (2011), se ha sugerido que la versión maMYB⁸⁴⁻³⁰⁹ es capaz de regular la expresión

génica, ya que en comparación con plantas Col 0, en el mutante YFP-maMYB⁸⁴⁻³⁰⁹ se altera la expresión de dos genes que se expresan activamente en raíz: *RHS14* (*ROOT HAIR-SPECIFIC 14*) cuya expresión disminuye 1.6 veces y *PDI9* (*PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE 9*) que aumenta 1.2 veces. Aunque no han podido establecer si estos genes son dianas directas de maMYB, evidencian de una forma indirecta y un tanto cuestionable que la versión truncada maMYB⁸⁴⁻³⁰⁹ podría regular la expresión génica en Arabidopsis y funcionar como un factor de transcripción.

5.3 Indicios sobre el procesamiento de maMYB *in vivo*

Para poder clasificar a maMYB como un MTF canónico, es esencial presentar evidencias directas del procesamiento de maMYB para liberar el dominio de factor de transcripción del RE. Sin embargo, en los diferentes análisis por *Western blot* usando el anticuerpo anti-péptido maMYB, no se ha podido detectar la presencia de una posible versión truncada de maMYB en extractos proteicos (Figuras 30, 39, 46 y 50). La imposibilidad de detectar la hipotética forma procesada de maMYB podría deberse a que los niveles de dicha proteína son muy bajos en general, o porque el procesamiento solo se produce en determinadas células o en condiciones muy específicas de estímulo, o porque se degrade rápidamente debido a una alta tasa de recambio proteico, lo cual no sería extraño tratándose de una proteína con función reguladora. En cualquier caso, los niveles de la versión truncada de maMYB estarían por debajo del límite de detección del análisis por *Western blot*.

Como aproximación alternativa se planteó intentar enriquecer la cantidad de maMYB procesado en los extractos proteicos mediante ensayos de inmunoprecipitación de un mutante de Arabidopsis que sobrexpresas la proteína quimérica maMYB-YFP. Tras el análisis por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-péptido maMYB se han detectado dos bandas de masa molecular inferior a la de maMYB-YFP (~61 kDa) y superior a la de maMYB endógeno (~34 kDa) (Figura 53), lo que inicialmente las hacía candidatas a representar formas procesadas de maMYB-YFP. La banda de mayor masa molecular presenta una intensidad más débil, lo que sugiere que podría ser un intermediario del procesamiento de maMYB, mientras que la de menor masa molecular se encuentra en mayor cantidad y representaría el producto final del procesamiento. Aunque la presencia de formas intermediarias se ha documentado en la caracterización de otros MTFs (Kim et al., 2007b), tampoco se puede descartar que una de las dos bandas sea el producto de una actividad proteolítica inespecífica como consecuencia de la sobrexpresión de maMYB-YFP. Sin

embargo, empleando el anticuerpo anti-GFP se ha visualizado solo una banda, que aunque también presenta una masa molecular entre 61 y 34 kDa, no coincide con las dos bandas detectadas con el anticuerpo anti-péptido maMYB (Figura 53). Aunque estos resultados apuntan a que maMYB-YFP se procesa *in vivo*, no ha sido posible adjudicar una identidad fidedigna a cada una de las bandas detectadas con uno y otro anticuerpo y, en consecuencia, demostrar fehacientemente el procesamiento de maMYB. En cualquier caso, sería necesario abordar esta cuestión desde otras estrategias y técnicas complementarias, como podría ser el análisis por espectrometría de masas de las bandas proteicas candidatas a ser formas procesadas de maMYB, lo que permitiría esclarecer su identidad y determinar si maMYB es procesado *in vivo*. En caso afirmativo, quedaría demostrado que maMYB se proteoliza constitutivamente en plántulas jóvenes, ya sea de forma general o en algunas células específicas. Otros MTTFs de Arabidopsis caracterizados hasta la fecha son procesados típicamente en respuesta a estrés abiótico o a un estrés celular como la UPR (Hoppe et al., 2001; Chen et al., 2008; Seo et al., 2008). Sin embargo, también se ha propuesto que los MTTFs podrían estar involucrados en cómo la planta responde a estímulos de desarrollo o en como integra las respuestas primarias a estrés con las de desarrollo (Che et al., 2010; Seo, 2014). Asumiendo que maMYB se proteoliza, el punto crítico es identificar las condiciones que promueven su procesamiento.

La proteína reticular de humanos SREBP, uno de los MTTFs más conocidos y mejor caracterizados, tiene dos DTMs que orientan los dos extremos terminales hacia el citosol y un dominio de factor de transcripción tipo bZIP en su extremo N-terminal (Edwards et al., 2000; Hoppe et al., 2001). Cuando los niveles de colesterol celular son bajos, SREBP se transloca desde el RE al aparato de Golgi, gracias a la acción de la proteína SCAP, donde es procesado proteolíticamente en dos etapas, primero por la acción de la subtilisina proteasa S1P, cuya secuencia diana se encuentra en el bucle hidrofílico que enlaza los dos DTMs, y posteriormente por la de la metaloproteasa S2P, que actúa cortando en el interior del primer DTM, de manera que se libera el dominio factor de transcripción en el citosol que tiene que translocarse al núcleo donde activa la expresión de numerosos genes implicados la síntesis de colesterol (Figura 10) (Edwards et al., 2000).

La secuencia de reconocimiento de S1P se ha definido como RXXL (Duncan et al., 1998). Se ha visto que AtS1P, el homólogo de S1P en Arabidopsis, está involucrado en la activación de AtbZIP17 y AtbZIP28, dos MTTFs del RE que contienen la secuencia de reconocimiento de S1P (Figura 12) (Liu et al., 2007a, 2007b). Hasta el momento no se ha identificado una secuencia consenso de

reconocimiento de sustratos de S2P (Chen and Zhang, 2010). Sin embargo, la caracterización de sustratos conocidos de S2P en varios organismos ha revelado que el sitio de reconocimiento se encuentra normalmente en una región próxima hacia el lado citosólico del DTM y requiere, en sus proximidades, la presencia en el interior del DTM de aminoácidos poco propensos a formar estructuras tipo hélice alfa. Dichos aminoácidos distorsionan la hélice alfa permitiendo que la proteasa S2P tenga acceso al sustrato dentro del ambiente hidrofóbico del DTM (Figura 13) (Chen and Zhang, 2010; Ye et al., 2000). También se ha identificado un homólogo de S2P en *Arabidopsis*, AtS2P (Kinch et al., 2006). Recientemente, se han encontrado evidencias que demuestran la participación de AtS2P en el procesamiento de bZIP17 y bZIP28 (Che et al., 2010; Liu and Howell, 2010; Srivastava et al., 2013).

Teniendo en cuenta que maMYB no contiene la secuencia de reconocimiento RXXL de S1P, parece improbable que AtS1P intervenga en su procesamiento. Sin embargo, se ha encontrado la secuencia prolina-fenilalanina-alanina-prolina (PFAP) localizada en la región C-terminal del segundo DTM de maMYB. La secuencia PFAP parece estar conservada a lo largo de la evolución de las plantas terrestres (Figura 58), y se ajusta al criterio general identificado en los sustratos procesados por S2P. Por tanto, es posible que S2P o una metaloproteasa similar pueda estar involucrada en el procesamiento de maMYB. Los aminoácidos desestabilizadores de hélice se requieren para el procesamiento proteolítico de sustratos de varios tipos de proteasas de intramembrana, incluyendo miembros de las familias de proteasas romboide, presenilinas y SPP (*signal peptide peptidase*) (Czech et al., 2000; Urban, 2006; Tamura et al., 2009). Al igual que S2P, las SPPs y las presenilinas son proteasas de aspártico, y se ha visto que típicamente sus sustratos son proteínas integrales de membrana con un único DTM (Hemming et al., 2008; Tamura et al., 2009). Por lo tanto, es poco probable que proteasas de estas familias reconozcan como sustrato a maMYB que tiene dos DTMs, a no ser que maMYB fuese procesado proteolíticamente primero por otra proteasa que diese lugar a una forma intermedia con un único DTM, como pasa en el procesamiento de SREBP. Por otra parte, la familia de proteasas de intramembrana romboides, que son proteasas de serina, normalmente liberan sus sustratos en el espacio extracelular o luminal (Urban, 2006). De nuevo, esto hace que las proteasas romboides sean candidatos improbables a activar maMYB, ya que el dominio de factor de transcripción de maMYB tiene que liberarse en el citosol. En conclusión, aunque todavía se desconocen que secuencias de aminoácidos pueden ser importantes para el posible procesamiento proteolítico de maMYB y mucho menos su mecanismo, se propone que este proceso podría ser dependiente de la secuencia

análisis filogenético y de alineamiento de secuencias, se han seleccionado la proteína maMYB de *A. thaliana* y las proteínas homólogas de *P. pérsica* (melocotón), *P. trichocarpa* (chopo), *V. vinífera* (vid), *S. lycopersicum* (tomate), *C. melo* (melón). Enmarcados con un recuadro se encuentran la secuencia PFAP altamente conservada. Las líneas naranjas y verdes marcan las regiones de maMYB que corresponden con los DTMs y el dominio R2R3-MYB, respectivamente. Resultados obtenidos mediante el programa bioinformático ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

6. Efecto del silenciamiento de maMYB sobre el transcriptoma de Arabidopsis

Para obtener información acerca de la función biológica de maMYB se realizó un análisis transcriptómico basado en la técnica de *RNA-Seq* que permitió analizar los cambios en el transcriptoma de la raíz y la parte aérea por separado de plántulas del mutante de silenciamiento de maMYB (mutante amiRNA 2). Así, en la raíz se identificaron un total de 153 genes que se expresan diferencialmente (Anexo 1), de los cuales 79 se encontraron desregulados al alza y 74 reprimidos. En cuanto a la parte aérea, se identificaron un total de 133 genes expresados diferencialmente (Anexo 2), de los cuales 91 se encontraron desregulados al alza y 42 reprimidos. Comparando los genes expresados diferencialmente en raíz y parte aérea, se identificaron 29 genes comunes a ambos tejidos (Anexo 3), de los cuales 26 se encontraron desregulados al alza y 3 reprimidos. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de significación biológica y enriquecimiento funcional de genes expresados diferencialmente basado en fuentes como GO y KEGG, lo que permitió identificar grupos de genes implicados en procesos biológicos y funciones moleculares diversas.

Entre los grupos identificados se han identificado 8 genes en la raíz y 5 genes en la parte aérea pertenecientes a la familia de transportadores de lípidos (LTPs, *lipid transfer protein*) (Tablas 3 y 4). Dentro de esta familia, se han encontrado genes de las subfamilias LTPs propiamente dichas, LTPs-*like* y HyPRP. En este conjunto de genes LTPs se encuentran tanto genes desregulados al alza (*fold change* entre 5 y 65) como genes desregulados a la baja (*fold change* entre 2 y 5). Las LTPs de plantas son proteínas abundantes y de pequeño tamaño, y consisten básicamente en un pequeño dominio que adopta una estructura terciaria con una cavidad hidrofóbica (Kader, 1997; José-Estanyol et al., 2004), que *in vitro* es capaz de transportar fosfolípidos de una membrana a otra y unirse a ácidos grasos y esteroides (Kader, 1997; Yeats and Rose, 2008). La mayoría de las LTPs contienen un péptido señal en el extremo N-terminal que las dirige por la vía secretora hasta su destino final en la pared celular, donde se

ha postulado que participan en procesos como defensa a patógenos, señalización celular, desarrollo de la pared celular, elongación celular y crecimiento de la planta (Kader, 1997; Arondel et al., 2000; Nieuwland et al., 2005; Carvalho and Gomes, 2007; Yeats and Rose, 2008). Entre las LTPs desreguladas, la expresión de *LTP3* disminuyó en raíz más de 3.5 veces. Se ha descrito que mutantes con expresión disminuida de *LTP3* y *LTP4* presentan un fenotipo de enanismo (Yeats and Rose, 2008). Por otra parte, las HyPRPs son proteínas estructurales de la pared celular que se cree que podrían conectarse con la membrana plasmática a través de su cavidad hidrofóbica (Zhang and Schläppi, 2007; Dvoráková et al., 2012). El estudio de las proteínas HyPRPs en varias especies de planta ha revelado que su función en la elongación celular mediante la extensión de la pared celular, podría estar vinculada a procesos biológicos como la ontogenia y morfogénesis de diferentes órganos y la respuesta a múltiples factores de estrés abiótico y biótico (Dvoráková et al., 2012). En concreto, se ha descrito que EARL11, cuya expresión aumenta 7.5 veces en la raíz y 12.5 veces en la parte aérea, podría estar involucrado en la regulación de la síntesis de lignina en la pared celular, en la respuesta a desarrollo de la plántula en condiciones de bajas temperaturas y estrés salino, y en la resistencia a infección fúngica (Zhang and Schläppi, 2007; Xu et al., 2011; Shi et al., 2011; Li et al., 2012). Sin embargo, el hecho de que se desconozca la función biológica concreta que desempeña la familia LTPs y que se hayan observados cambios de su expresión en sentido opuesto, hacen difícil establecer qué tipo de respuesta se está produciendo.

También se han encontrado desregulados un grupo de genes, más numerosos en raíz que en parte aérea (Tablas 3 y 4), relacionados con la pared celular y la elongación celular, que codifican proteínas como xiloglucano endotransglucosilasas-hidrolasas, expansinas, poligalacturonasas, peroxidasas y proteasas entre otras (Irshad et al., 2008). Así, se ha visto que la expresión de *PERK4* disminuyó 5 veces en la raíz y la de *EXT4* aumentó entre 3 y 6 veces en la raíz y la parte aérea. Se ha descrito que los mutantes nulos de *PERK4* muestran menor sensibilidad a ABA y presentan defectos en la elongación celular de la raíz que afectan a su crecimiento apical (Bai et al., 2009a). Además, se ha sugerido que *PERK4* modula la expresión de genes relacionados con la elongación celular como *EXT4* (Bai et al., 2009b). Por otro lado, la familia UGEs, de la que la expresión de *UGE1* disminuyó 2.6 veces en la raíz, se ha visto que está implicada en el crecimiento de raíz y en la biosíntesis de pared celular modulando los niveles de galactano (Rösti et al., 2007), mientras que la familia BGALs, de la que la expresión de *BGAL4* disminuyó 2.5 veces en la raíz, está involucrada en procesos de extensión y remodelación de la pared celular (Albornos et

al., 2012). En cuanto a la familia BXLs, su único miembro caracterizado (BXL1) se ha descrito que se expresa en el tejido vascular de raíz y está involucrado en el metabolismo de la pared celular, en concreto de la hemicelulosa de la pared celular secundaria (Goujon et al., 2003). En nuestro caso, se ha visto que la expresión de *BXL2* disminuyó 2.6 veces en la raíz. La familia XTHs, de la que se han encontrado numerosos miembros desregulados unos al alza y otros a la baja (*XTH15*, *XTH6* y *XTR8* en la parte aérea y *XTH20* y *XTH7* en la raíz), son una clase de enzimas capaces de separar y reconectar moléculas de xiloglucano y están implicadas en la construcción y reconstrucción de la pared celular (Vissenberg et al., 2005). Respecto a la familia BGLUs, de la que se han encontrado desregulados *BGL46* y *BGL7* en la raíz, se ha propuesto que participan en la lignificación de la pared celular hidrolizando glucósidos de monolignol (Escamilla-Treviño et al., 2006). Por otra parte, el gen *CDEF1*, cuya expresión disminuyó 3.4 veces en la raíz, codifica una cutinasa perteneciente a la familia *GDSL lipase/estearase* que en la raíz degrada componentes de la pared celular para facilitar el surgimiento de las raíces laterales (Takahashi et al., 2010). Del mismo modo, el gen *CEP3*, cuya expresión disminuyó unas 5 veces en la raíz, codifica una endopeptidasa que digiere las extensinas formadoras de pared celular facilitando la aparición de raíces laterales (Helm et al., 2008). En general, hay una disminución de la expresión de genes relacionados con la pared celular, la elongación celular y la formación de raíces laterales, lo que parece ser coherente con el fenotipo observado al silenciar *maMYB*.

Por otra parte, se ha descrito que en *Arabidopsis* la represión de la síntesis de lignina conduce a la redirección del flujo metabólico de los flavonoides hacia la síntesis concreta de chalconas, lo que conduce a una inhibición del transporte de auxinas y se traduce en una disminución del tamaño de las plantas (Besseau et al., 2007; Kuhn et al., 2011). En este sentido, se ha visto que tanto en la raíz como en la parte aérea hay un aumento de la expresión de genes relacionados con la síntesis de flavonoides y una desregulación de genes implicados en el transporte, síntesis o respuesta a auxina. En la raíz se ha encontrado aumentada entre 2.5 y 3 veces la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de flavonoides/chalconas, como *TT4*, *TT5*, *FLS1* y *CHIL* (Tabla 3). De hecho, los mutantes de *Arabidopsis* de los genes *tt* (*transparente testa*), como *TT4* y *TT5* entre otros, muestran una amplia variedad de fenotipos en la arquitectura de la raíz y la parte aérea (Buer and Djordjevic, 2009). Por otra parte, la expresión de *AGL14* disminuyó unas 7.5 veces, y codifica una proteína que participa en la regulación transcripcional de los transportadores de auxinas PINs (*PIN-related*) en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* (Garay-Arroyo et al., 2013). En

la parte aérea se han encontrado fuertemente desregulados al alza genes como *UGT72E1* y los que codifican las peroxidasa *PER1*, *PRXCB*, *PRX71*, *PRX69* y *At2g37130* (Tabla 4), que están relacionados con la biosíntesis de fenilpropanoides, precursores de diversos compuestos fenólicos entre los que se encuentran los flavonoides y la lignina. Respecto a las peroxidasa, se ha descrito que influyen en la homeostasis de auxinas modulando los niveles de ROS (*reactive oxygen species*) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Zhang et al., 2014a). En este sentido, se han encontrado desregulados genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis de la auxina IAA (*indole-3-acetic acid*) o relacionados con la respuesta a auxinas (Tabla 4). Entre ellos, el gen *NIT2*, que su expresión aumentó más de 12 veces, codifica una proteína involucrada en la síntesis de IAA a partir de IAN (indole-3-acetonitrile) (Pollmann et al., 2002). Por otra parte, la expresión de los genes *IAA3* e *IAA29*, pertenecientes a la familia de genes Aux/IAA, disminuyó más de 4 y casi 13 veces, respectivamente. Las proteínas IAAs regulan negativa o positivamente la expresión de genes de respuesta a auxinas cuando la concentración de auxinas en la célula es baja; mientras que a elevadas concentraciones de auxinas son degradados (Tian et al., 2002; Li et al., 2011). Estas observaciones sugieren que los niveles de auxinas estarían aumentados en la parte aérea. Por otra parte, se ha visto que estos genes son regulados por luz y regulan la expresión de otros genes diferentes a los de respuesta primaria a auxinas (Tian et al., 2002; Nomoto et al., 2012). En ese sentido, se han encontrado genes como *PSK2*, *PAR1* y *COL7* con una expresión disminuida entre 5.5 y 8.5 veces. Así, se ha descrito que *PKS2* se expresa en hipocotilos y cotiledones de plántulas jóvenes y regula la forma plana y posición de las hojas controlando la homeostasis de auxinas, probablemente modulando su transporte en su redistribución lateral (de Carbonnel et al., 2010). Por otro lado, se ha visto que el gen *PAR1* es un represor de genes involucrados en la respuesta de huida de sombra, como la elongación de la plántula, y de genes de respuesta a auxinas pertenecientes a la familia *SAUR* (*small auxin upregulated*) (Roig-Villanova et al., 2007). Finalmente, el gen *COL7* se ha postulado como un factor crítico en la unión entre percepción de la luz y respuesta a huida de sombra con cambios en los niveles de auxinas (Zhang et al., 2014b).

Por otra parte, el silenciamiento de *maMYB* en la raíz se traduce en una disminución de la expresión en torno a 2.5 veces de tres genes del clúster de cuatro genes implicados en la síntesis de tialanol (*THAS1*, *THAH1* y *THAD1*), y entre 5.5 y 7.5 veces de dos genes del clúster de tres genes implicados en la síntesis de marneral (*MRN1* y *CYP705A12*) (Tabla 3). En los dos clúster de genes implicados en la síntesis

de estos triterpenos, los genes *THAS1* y *MRN1* codifican las oxidoescualeno ciclasas (OSCs, *oxidosqualene cyclases*) que producen el esqueleto cíclico a partir del precursor 2,3-oxidoescualeno, mientras que el resto de los genes pertenecen a la familia CYP450s y son necesarios para las posteriores modificaciones de ambos esqueletos triterpénicos (Field and Osbourn, 2008; Field et al., 2011). Por tanto, los datos de expresión de estos genes sugieren una disminución de los niveles de ambos triterpenos en los mutantes de silenciamiento de maMYB. Se ha descrito que los mutantes de sobreexpresión de *THAS1* o *THAH1* producen una acumulación de talianol o talian-diol en la parte aérea, donde muestran un fenotipo de enanismo, aunque las plantas sobreexpresoras de *THAS1* muestran un aumento en la longitud de la raíz primaria, lo que indica que el talianol produce efectos en el crecimiento específicos según el órgano de la planta (Field and Osbourn, 2008). Respecto al marneral, los mutantes de sobreexpresión de *MRN1* producen un fenotipo de enanismo similar al avanzado en la acumulación de talianol (Field et al., 2011), mientras que los mutantes silenciados muestran alteraciones en los niveles de esteroides y triterpenoides, alteraciones en la integridad y permeabilidad de la membrana, e inhibición de la expansión y elongación celular (Go et al., 2012). Además, se ha descrito que la alteración de la expresión del gen *THAD1* provoca en la raíz un retraso de la respuesta a la gravedad, un incremento de los niveles de flavonoides y una disminución del transporte basípeto de auxinas (Withers et al., 2013). Todas estas observaciones parecen indicar que tanto el aumento como la disminución de los niveles de talianol, marneral y/o sus derivados afectan al desarrollo y crecimiento de la planta. Por otra parte, también se ha postulado que el marneral y sus derivados podrían actuar de forma parecida a las hormonas (*hormone-like*), como ocurre con otros triterpenos como la estrigolactona, que está involucrado en el crecimiento de la parte aérea (Go et al., 2012). Todas estas observaciones son coherentes con las alteraciones en el desarrollo de la raíz descritas en los mutantes amiRNAs.

Estudios transcriptómicos masivos de mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en los pelos radiculares, han permitido identificar grupos de genes desregulados que definirían el transcriptoma implicado en la morfogénesis de los pelos radiculares (Jones et al., 2006; Won et al., 2009). Este transcriptoma está altamente enriquecido en genes ya conocidos por estar involucrados en la morfogénesis de pelos radiculares, y además en otras familias de genes que codifican proteínas relacionadas con la pared celular, glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (extensinas), proteínas arabinogalactano, peroxidasas, quinasas de tipo receptor (*receptor-like kinases*), y proteínas con una predicción de anclaje por GPI en las balsas lipídicas de la

membrana plasmática (Jones et al., 2006; Won et al., 2009). Comparando las listas de genes generadas en estos estudios con en el análisis transcriptómico de la raíz del mutante *amiRNA 2*, se han encontrado desregulados 27 genes implicados en la morfogénesis de los pelos radiculares. Entre ellos, destacan los implicados en pared celular *PERK4*, *EXT4*, *At5g44400* (*FAD-binding Berberine family protein*) y *At5g38020* (*S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily*), los implicados en la síntesis de talianol y marneral *THAS1*, *THAH1* (*CYP708A2*), *THAD1* (*CYP705A5*) y *CYP705A12*, que junto con los genes *CYP735A2*, *CYP94B3* y *CYP71A19* (Tabla 3), convierte a la familia CYP450s como la más representada en el grupo de los 27 genes. La desregulación de estos genes sugiere que los mecanismos responsables de la formación y elongación de los pelos radiculares estarían afectados en los mutantes de silenciamiento de *maMYB*, lo que es totalmente coherente con la observación del fenotipo.

Por último, se ha descrito que los clúster de genes implicados en la síntesis de talianol y marneral son genes diana del proceso de regulación epigenético a través de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) (Field and Osbourn, 2008; Field et al., 2011). Durante el desarrollo en plantas y animales, los genes tienen que ser activados o reprimidos según un estricto programa temporal y espacial. La histona trimetilada (H3K27me3) mantiene la represión de determinados genes en el tejido o estadio apropiado regulando el desarrollo en animales y plantas (Zhang et al., 2007b). Sin embargo, no se sabe si este proceso ocurre mediante los mismos mecanismos en planta y animales. En cualquier caso, se ha sugerido que H3K27me3 participa en un mecanismo principal de silenciamiento en plantas, y se han identificado más de 4400 genes diana de este proceso en el genoma de plántulas de *Arabidopsis* de 10 de edad, lo que correspondería en torno al 16% del genoma de *Arabidopsis* (Zhang et al., 2007b). Comparando la lista de genes diana de H3K27me3 con las listas de genes desregulados en el mutante *amiRNA 2*, se ha visto que el 53% de los genes desregulados en la raíz, el 45% de los de la parte aérea, y el 52% de los comunes son genes diana de H3K27me3, lo que supone un alto enriquecimiento de estos genes diana en el análisis transcriptómico del mutante de silenciamiento de *maMYB*. Estas observaciones indicarían que *maMYB* podría estar relacionado con este proceso de regulación epigenética necesario para el correcto desarrollo de la planta.

En resumen, el silenciamiento de *maMYB* provoca la desregulación de grupos de genes involucrados en el desarrollo y el crecimiento de la planta, que son bastante coherentes con el fenotipo observado. Por un lado, tanto en la raíz como en la parte aérea se han identificado genes desregulados que están involucrados en la elongación

celular y relacionados con la pared celular, entre los que se encuentran LTPs y HyPRPs y genes implicados en la síntesis de lignina o que codifican proteínas constituyentes de la pared celular (Figura 59). Además, en la raíz se han encontrado genes desregulados que están relacionados con la biosíntesis de flavonoides y chalconas, el transporte de auxinas y la morfogénesis de pelos radiculares, como la síntesis de talianol y marneral, otros CYP540s y relacionados con la pared celular (Figura 59). Por otro lado, en la parte aérea se han identificado genes desregulados que están implicados en la biosíntesis de fenilpropanoides y auxinas, y en la respuesta a auxinas (Figura 59). Además, en la parte aérea también se han encontrado desregulados un gran número de genes relacionados con el transporte transmembrana de aminoácidos, iones y especialmente nitratos (Tabla 4) que podrían estar afectando al crecimiento de la planta. De forma global, el silenciamiento de la expresión de *maMYB* provoca unas alteraciones en el desarrollo de las plántulas que sugieren que éste sea un MTTF que se libere en respuesta a estímulos de desarrollo, y como respuesta secundaria, parece provocar la desregulación de un grupo de genes comunes a la raíz y a la parte aérea que en su mayoría están involucrados en una respuesta generalizada a estímulos hormonales y abióticos, especialmente a ácido abscísico, frío, sequía y estrés osmótico (Tabla 5) (Figura 59). Por otra parte, tampoco se puede descartar que *maMYB* estuviese implicado en la integración de respuestas a estímulos de desarrollo con respuestas a estrés abiótico.

Este trabajo representa la primera aproximación transcriptómica sobre la función del gen *maMYB*, y aporta datos relevantes acerca de su efecto sobre la expresión génica global y por lo tanto, sobre su interacción en otros procesos esenciales para la planta. El siguiente paso necesario sería validar los resultados obtenidos a partir del análisis transcriptómico mediante técnicas basadas en la RT-PCR. De momento, el análisis del cambio en el perfil de expresión génica no permite asignar a *maMYB* una función determinada. Sin embargo, se podría investigar cómo se producen estos cambios a distintos tiempos después de inducir el silenciamiento, para intentar discernir cuales corresponden a una respuesta primaria, posiblemente dianas directas de *maMYB*, y cuales a respuesta secundaria.

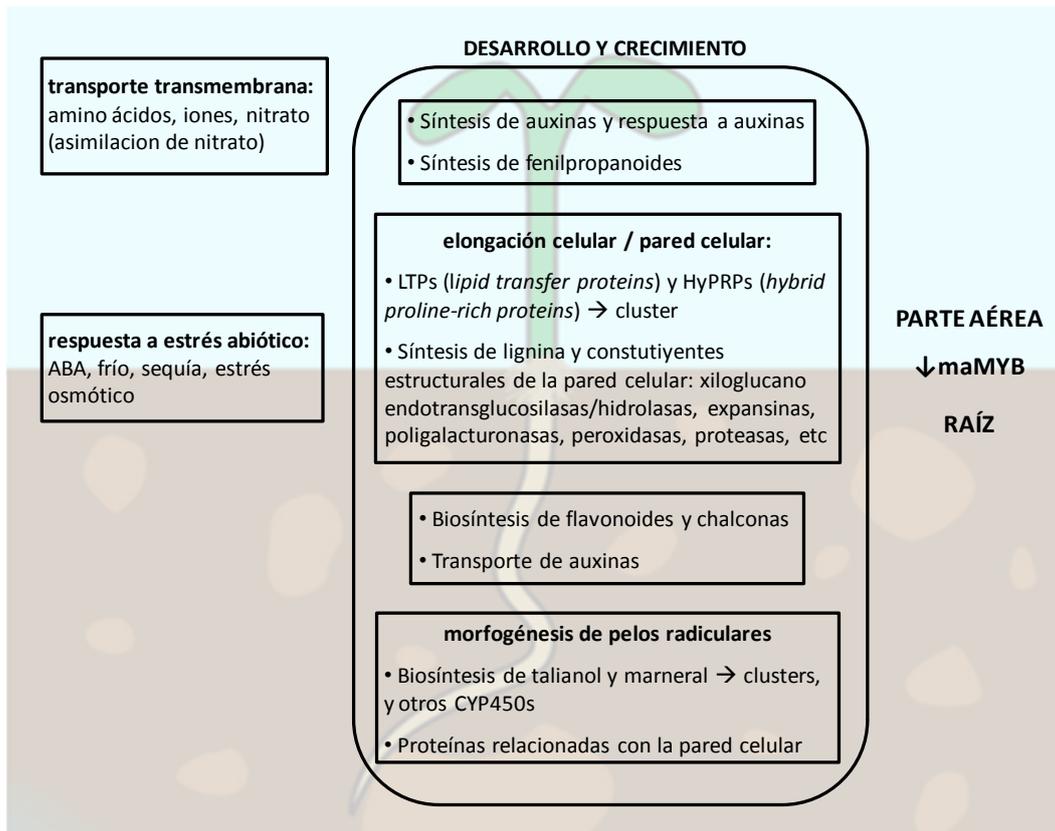


Figura 59. Modelo propuesto sobre las implicaciones biológicas asociadas al silenciamiento de maMYB. En los recuadros se muestran los procesos biológicos en los que están implicados los genes desregulados como consecuencia del silenciamiento de maMYB en la parte aérea (arriba), en la raíz (abajo) y los que son comunes en ambos tejidos (centro).

CONCLUSIONES

1. Las proteínas ScArv1 y AtArv1 son capaces de homodimerizar y se insertan en la membrana del RE con sus extremos N- y C-terminal orientados hacia el citosol.

2. A pesar de que las proteínas de levadura ScArv1 y Erg11 (lanosterol 14 α -demetilasa) interaccionan, los ortólogos de Arabidopsis AtArv1 y CYP51 (obtusifoliol 14 α -demetilasa) no lo hacen, aunque la conservación estructural y funcional de AtArv1 y ScArv1 permite su heterodimerización y la interacción de AtArv1 con Erg11.

3. Mediante el cribado de un banco de cDNA de plántulas de Arabidopsis empleando AtArv1 como cebo y la técnica MbyYTH se han identificado 12 proteínas que interaccionan con AtArv1, entre las cuales se ha seleccionado la proteína maMYB como la candidata más interesante por tener características de factor de transcripción anclado a la membrana del RE. La proteína maMYB es capaz de interaccionar con AtArv1 y AtArv2.

4. La proteína maMYB tiene características de un MTTF de la familia MYB puesto que contiene dos DTMs en la región N-terminal que la anclan a las membranas del RE y un dominio citosólico del tipo R2R3-MYB en la región C-terminal. Ambos extremos de maMYB se proyectan hacia el citosol y la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, que contiene el dominio citosólico R2R3-MYB, se localiza en el núcleo y preferentemente en el nucléolo.

5. La región N-terminal de maMYB que incluye los dos DTMs está implicada en la interacción con AtArv1, mientras que ni el dominio citosólico C-terminal de maMYB ni el dominio AHD N-terminal de AtArv1 participan en dicha interacción.

6. Los niveles de la proteína maMYB son muy distintos en los tejidos de *A. thaliana*, siendo en la raíz y en la parte aérea de las plántulas donde son más altos. También se expresa abundantemente en células de cultivo de la línea T87 en fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, en ninguno de los tejidos se ha detectado la hipotética forma procesada y soluble de maMYB.

7. El genoma de Arabidopsis contiene un único gen *maMYB*, cuyo silenciamiento produce una reducción pronunciada en los niveles de mRNA y proteína que, a su vez, provoca una alteración severa del desarrollo de las plántulas de Arabidopsis que se caracteriza por una reducción del tamaño general de la plántula, una disminución de la longitud de la raíz primaria, una inhibición de la formación de raíces laterales y pelos

radiculares, una alteración en la forma, el tamaño y el número de las células de las diferentes capas de la raíz, una desestructuración de las células epiteliales de los cotiledones y una alteración en los niveles de los productos finales de la ruta de esteroides y de sus precursores inmediatos.

8. La sobreexpresión constitutiva de maMYB y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ no altera el fenotipo de las plantas, probablemente por la existencia de mecanismos reguladores que seleccionan negativamente las líneas sobreexpresoras con niveles elevados de maMYB a favor de las que tienen niveles moderados o bajos de sobreexpresión. En cambio, la sobreexpresión inducible resulta en niveles muy elevados de dichas proteínas que producen alteraciones en el fenotipo de las plántulas similares a las observadas cuando se silencia maMYB.

9. La sobreexpresión de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ revierte (en mayor o menor medida) el fenotipo causado por el silenciamiento de maMYB, lo cual avala la funcionalidad *in vivo* del dominio citosólico cuyo direccionamiento específico hacia el núcleo ha quedado demostrado y, por lo tanto, el papel de maMYB como MTF, cuyo dominio R2R3-MYB citosólico necesitaría liberarse por acción de una proteasa de intramembrana y trasladarse al núcleo donde ejercería su función. Sin embargo, no ha sido posible identificar las especies proteicas detectadas como candidatas a ser formas procesadas de maMYB.

10. El silenciamiento de maMYB provoca la desregulación de grupos de genes involucrados en el desarrollo y el crecimiento de la planta, que son coherentes con el fenotipo observado. Tanto en la raíz como en la parte aérea se han identificado genes desregulados involucrados en la elongación celular, como las LTPs y otros relacionados con la pared celular. En la raíz se han identificado genes desregulados relacionados con la síntesis de los flavonoides chalconas, con el transporte de auxinas y con la morfogénesis de pelos radiculares, como la síntesis de talianol y marneral. En la parte aérea se han identificado genes desregulados implicados en la síntesis de fenilpropanoides y auxinas, en la respuesta a auxinas y en el transporte transmembrana. Todo ello parece provocar como respuesta secundaria la desregulación de genes involucrados en respuesta a estímulos hormonales y abióticos que son comunes a la raíz y a la parte aérea.

11. Las alteraciones observadas en el desarrollo de las plántulas de los mutantes de silenciamiento de maMYB sugieren que éste sea un MTF que se libere en respuesta a estímulos de desarrollo.

12. Los genes desregulados como consecuencia del silenciamiento de maMYB presentan un alto enriquecimiento de genes regulados epigenéticamente a través de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), siendo del 53% en la raíz y del 45% en la parte aérea, mientras que en el genoma de Arabidopsis solo representan el 16%, lo que sugiere que maMYB podría estar relacionado con este proceso necesario para el correcto desarrollo de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

1.1 Especies vegetales empleadas

Para la mayoría de los experimentos se empleó la especie *Arabidopsis thaliana* variedad Columbia 0 (Col 0), mientras que para la expresión transitoria de proteínas en la localización subcelular, BiFC y coimmunoprecipitación fue la especie *Nicotiana benthamina*.

1.2 Mutantes pedidos de *A. thaliana*

En el estudio de la localización de la expresión del gen *maMYB* mediante el análisis histoquímico de la actividad GUS (resultados parte II, apartado 5), se empleó como control positivo la línea **35S::GUS:GFP** de fondo genético *wild type* Col 0 y resistencia a kanamicina, cedido por el Dr. Manuel Rodríguez Concepción (Rodríguez-Villalón et al., 2009).

Para investigar la función biológica de la proteína maMYB (resultados parte II, apartado 6), se buscaron mutantes con pérdida de función del gen en la base de datos T-DNA *express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Se identificaron dos candidatos pertenecientes a la colección SAIL (*Syngenta Arabidopsis Insertion Library*) (Sessions et al., 2002; McElver et al., 2001) y un candidato perteneciente a la colección GABI-Kat (Kleinboelting et al., 2012):

- ***mamyb1-1*** (SAIL_423_B04) de fondo genético *wild type* Col 3. La inserción de T-DNA, que posee el carácter de resistencia al herbicida BASTA (glufosinato de amonio), se encuentra en la posición -475 (región promotora) respecto a la primera base del codón ATG de inicio de traducción, según las anotaciones de genes de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

- ***mamyb1-2*** (SAIL_503_C01): de fondo genético *wild type* Col 0. La inserción de T-DNA, que posee el carácter de resistencia al herbicida BASTA, se encuentra en la posición +1271 (único intrón) respecto a la primera base del codón ATG de inicio de traducción, según las anotaciones de genes de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

- ***mamyb1-3*** (GABI_311C08): de fondo genético *wild type* Col 0. La inserción de T-DNA, que posee el carácter de resistencia al antibiótico sulfonamida, se encuentra en la posición +2391 (exón 3'-UTR) respecto a la primera base del codón ATG de inicio de

traducción, según las anotaciones de genes de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

Por otra parte, también se pidió la línea transgénica *knock down* de *maMYB RNAi-2* y el control **empty vector** descritos por Slabaugh et al. (2011), que poseen el carácter de resistencia al herbicida BASTA y de fondo genético *wild type* Col 0 (resultados parte II, apartados 9 y 10).

Para investigar la escisión de *maMYB in vivo* (resultados parte II, apartado 11) se desarrolló una colaboración con la Dra. Federica Brandizzi y la Dra. Erin Slabaugh de la Universidad Estatal de Michigan (MSU, Michigan State University, USA), quienes nos cedieron la línea transgénica ***maMYB-YFP***, de fondo genético Col 0 y resistencia a higromicina, que fue empleada en los experimentos de inmunoprecipitación.

1.3 Esterilización de semillas de *A. thaliana*

Las semillas repartidas en microtubos *Eppendorf* en una cantidad equivalente a 100 μL como máximo, se esterilizaron superficialmente en dos lavados consecutivos de 1 mL con una solución etanólica al 70% (v/v), mezclando con agitador vortex durante 3 min en cada lavado. Seguidamente, para eliminar las moléculas de agua, en una cabina de flujo laminar se realizó un lavado con 1 mL de etanol absoluto mezclando con agitador vortex durante 3 min. Posteriormente, se golpeó suavemente la base del *Eppendorf* para que las semillas se esparcieran por las paredes, y en una cabina de flujo laminar se dejaron secar las semillas con el *Eppendorf* abierto el tiempo necesario (aproximadamente 30 minutos).

1.4 Cultivo *in vitro* de *A. thaliana*

En una cabina de flujo laminar se distribuyeron las semillas homogéneamente, ya sea por dispersión desde el *Eppendorf* o bien sembradas una a una mediante el uso de micropipeta de 1000 μL y agua milliQ esterilizada, en placas Petri con medio Murashige y Skoog (MS). Las placas se sellaron con esparadrapo transpirable (Leukopor®) y se dejaron a 4°C en oscuridad envueltas en papel de aluminio durante 3 días, para sincronizar la germinación de las semillas sembradas. Una vez transcurrido el periodo de estratificación, las placas se trasladaron a una cámara de cultivo en condiciones ambientales controladas (22°C y 100 $\mu\text{Einsteins m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica) en fotoperiodo de día largo (16h luz /

8h oscuridad), donde las semillas germinaron y crecieron hasta un máximo de 15 días aproximadamente.

El medio **Murashige & Skoog pH 5,7 (MS)** contiene, 4.4 g/L de sales MS (Sigma), 0.5 g/L de MES, 10 g/L de sacarosa (se ajustó el pH con KOH) y, en caso de medio sólido, 0.8 g/L de agar para plantas. En algunos casos se usó ½ MS, disminuyendo a la mitad solamente la concentración de sales MS y MES. El medio MS se preparó en agua milliQ y se autoclavó 20 min a 120°C y 1 atm. Los antibióticos, herbicidas o reactivos necesarios para cada ocasión se añadieron después de autoclavar y atemperar el medio (50°C), a partir de las soluciones *stock* (Tabla 6).

Tabla 6 Reactivos empleados para suplementar el medio MS

Reactivo	Solvente	Stock (mg/mL)	Concentración final (µg/mL)
Ampicilina	Agua	100	50 - 25
BASTA	Agua	5	10
Cefotaxima	Agua	100	25
Higromicina	Agua	50	50 - 40
Kanamicina	Agua	100	50 - 25
Metoxifenocida (Runner®)	Agua		Dil 1:20.000
Sulfonamida	HCl 2M	7.5	7.5

1.5 Cultivo en tierra de *A. thaliana*

En los casos en que se necesitaron plantas adultas, cuando las plántulas crecidas en placa presentaban el primer par de hojas (10-15 días de edad), se trasladaron a tuestos de 55 mm de diámetro con una mezcla humedecida de turba/vermiculita/perlita (2:1:1) dispuestos en bandejas, se regaron por inmersión con abundante agua de grifo, y se cubrieron con film plástico. Las bandejas se trasladaron al invernadero en condiciones ambientales controladas (T^a día 22-24°C, T^a noche 20°C y 100 µEinsteins m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica de luz natural, suplementada con luz artificial cuando era necesario, y 30-40% de humedad relativa). El film plástico mantiene una alta humedad mientras las plantas se habitúan al medio de tierra. Después de una semana se agujereaba el film para reducir la humedad y unos días después se retiraba completamente. A partir de este momento, las plantas se regaban tres veces por semana por inmersión con solución nutritiva (8.4 mM KNO₃, 1.2 mM NH₄NO₃, 1.2 mM K₂HPO₄, 3.6 mM KH₂PO₄, 0.7 mM

MgSO₄·7H₂O, 2.5 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.6 mM FeSO₄·7H₂O, 50 μM de EDTA Férrico, 70 μM de H₃BO₃, 14 μM de MnCl₂, 0.5 μM de CuSO₄, 1 μM de ZnSO₄, 0.2 μM de NaMoO₄, 10 μM de NaCl, y 10 nM de CoCl₂), llevado a cabo por los servicios de invernadero del CRAG.

1.6 Obtención de semillas de *A. thaliana*

Cuando se necesitaba obtener semillas, las plantas se dejaban crecer hasta que las silicuas empezaban a ponerse marrones (aproximadamente 6-8 semanas después de trasplantar a tierra). En este momento se cubría la parte aérea con sobres y se dejaban las plantas una semana con riego y otra semana sin riego. Seguidamente, se cortaban los tallos y los sobres se dejaban unos tres días en secadores cerrados herméticamente con gel de sílice desecante. Posteriormente, el material vegetal seco de cada sobre se hacía pasar varias veces a través de un cedazo hasta obtener semillas libres del resto de material vegetal seco. Las semillas se almacenaban en *Eppendorfs* dispuestos en cajas de cartón con gradilla a temperatura ambiente.

1.7 Cultivo en tierra de *N. benthamiana*

Las semillas de *Nicotiana* se sembraron directamente en una maceta pequeña con turba y se trasladaron al invernadero en condiciones controladas (T^a día 23-26°C, T^a noche 21-22°C y 80 μEinsteins m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica de luz natural, suplementada con luz artificial cuando era necesario, y 35-45% de humedad relativa), donde se regaron periódicamente con solución nutritiva. Pasados unos 10 días cada plántula se trasplantó a una maceta más grande, donde crecieron hasta alcanzar la fase adulta deseada (4-6 semanas). El cultivo de *Nicotiana* fue llevado a cabo por los servicios de invernadero del CRAG.

2. Material microbiológico

2.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- ***Escherichia coli* DH5 α** TM: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*. Empleada de forma general para el clonaje de los diferentes genes estudiados.
- ***Escherichia coli* DB3.1**TM: F⁻ *gyrA462 endA1* Δ (*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20* (rB⁻, mB⁻) *supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20* (SmR) *xyt-5 λ - leu mtl1*. Empleada de forma específica para la replicación de plásmidos del sistema Gateway®.
- ***Escherichia coli* One Shot® OmniMAX**TM (Invitrogen): F' {*proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15 *Tn10*(Tet^R) Δ (*ccdAB*)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80(*lacZ*) Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD*. Células competentes comerciales para la transformación mediante choque térmico y usadas en la transformación del producto de la reacción de recombinación de la LR Clonase® entre plásmidos del sistema Gateway.
- ***Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (pTiC58)**: Contiene secuencias derivadas del plásmido Ti desarmado pTiC58 integradas en su cromosoma y un gen de resistencia a rifampicina. Además posee el plásmido *helper* pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA) con los genes *vir* y resistencia a gentamicina (Hellens et al., 2000). Empleada en la transformación estable de plantas de *A. thaliana*.
- ***Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (pTiBo542)**: Integrado en su cromosoma contiene secuencias derivadas del plásmido Ti desarmado pTiBo542 y un gen de resistencia a rifampicina. Empleada en la expresión transitoria de proteínas en plantas de *N. benthamiana*.

2.2 Medios de cultivo

De forma rutinaria, las diferentes cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37°C durante 18h (*overnight*) y a 250 rpm en caso de medio líquido, mientras que las diferentes cepas de *A. tumefaciens* se cultivaron en medio YEB a 28-30°C durante 2 días en caso de medio sólido, y durante 18h (*overnight*) y a 180 rpm en caso de medio líquido.

El medio **Luria-Bertini pH 7,4 (LB)** contiene, 5 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona; y el medio **YEB pH 7.0**, 1 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de extracto de carne, 5 g/L de peptona, 5 g/L de sacarosa y 0.5 g/L de MgSO₄·7H₂O. En ambos casos el pH se ajustó con NaOH. Los medios de cultivo se prepararon en agua destilada y se autoclavaron 20 min a 120 °C y 1 atm. En el caso de la preparación de medios de cultivo sólidos, se añadieron 15 g/L de agar bacteriológico antes de autoclavarlo. Los antibióticos o reactivos necesarios para cada ocasión se añadieron

después de autoclavar y atemperar el medio (50°C), a partir de las soluciones *stock* (Tabla 7).

Tabla 7 Reactivos empleados para suplementar los medios bacteriológicos

Reactivo	Solvente	Stock (mg/mL)	Concentración final (µg/mL)		
			E. coli	GV3101	EHA105
Amikacina	Agua	25	25		
Ampicilina	Agua	100	100	50	25
Gentamicina	Agua	100		100	
IPTG	Agua	240	120		
Kanamicina	Agua	25	50	100	25
Rifampicina	Metanol	50		150	100
X-Gal	DMF	20	40		

2.3 Cepas de levadura y medios de cultivo

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* NMY51 empleada en este trabajo para los experimentos de doble híbrido estaba incluida en el kit comercial DUAL membrane kit 3 (dualsystems biotech, MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3, 112 ade2 LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3 ura3::(*lexAop*)₈-lacZ ade2::(*lexAop*)₈-ADE2 GAL4), y presenta las auxotrofías para adenina e histidina.

La cepa NMY51 wild type se cultivó en medio nutritivo YPAD a 30°C durante 1 día en caso de medio sólido, y durante 18h (*overnight*) y a 250 rpm en caso de medio líquido. El medio **YPAD pH 6.5** contiene, 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 2% de glucosa y 10 mL/L de sulfato de adenina *stock* (4mg/mL). Se prepara disolviendo todos los componentes excepto la glucosa y la adenina, y ajustando el pH con HCl. Se autoclava durante 20 min a 120°C y a 1 atm. Una vez autoclavado y atemperado a 50°C, se añadieron la glucosa preparada al 20% y autoclavada por separado, ya que si se autoclavara con el medio se caramelizaría y la solución se tornaría de color marrón, y la adenina filtrada previamente (0.22 µm), ya que el proceso de autoclave podría destruirla. En el caso de la preparación de medios de cultivo sólidos, se añadieron 20 g/L de agar bacteriológico antes de autoclavarlo.

3. Plásmidos empleados y construcciones generadas

Durante el desarrollo de la tesis, para el clonaje de las construcciones deseadas en los plásmidos necesarios, se emplearon las técnicas básicas y comunes de manipulación de DNA y bacterias, que se describen de forma general en el apartado 4.

3.1 Plásmidos intermediarios de clonaje

Como punto de partida para la obtención de las construcciones empleadas, se utilizaron los plásmidos pGEM-T Easy® (Promega) y pENTR™3C (Invitrogen) (Figura 60). El plásmido pENTR™3C contiene el gen *ccdB* que codifica para una proteína que actúa sobre la subunidad GyrA de la DNA girasa, lo que resulta tóxico para la bacteria, siendo necesario emplear la cepa DB3.1 para la replicación de este plásmido.

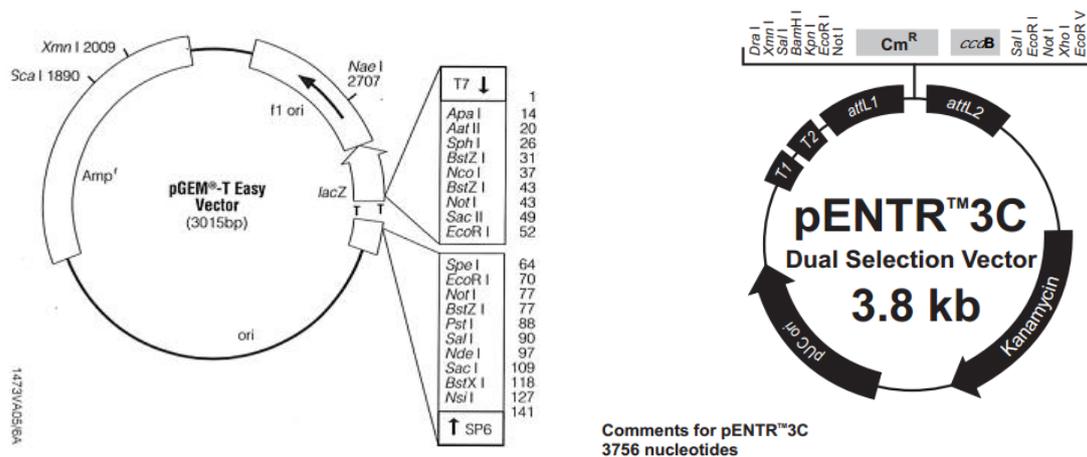


Figura 60. Esquema de los plásmidos intermediarios pGEM-T Easy® (Promega) y pENTR™3C (Invitrogen).

El plásmido pGEM-T Easy se suministra linealizado y con una timina protuberante a cada extremo 3', que permite el subclonaje de fragmentos de DNA poliadenilados. Como la inserción de la construcción rompe la pauta de lectura del gen *lacZ*, las bacterias no serán capaces de expresar la enzima beta-galactosidasa. Esta enzima es capaz de transformar X-Gal en un compuesto de color azul. Además, el plásmido pGEM-T Easy contiene el gen de resistencia a ampicilina. Por tanto, las colonias de bacterias DH5α que crezcan en presencia de ampicilina y sean blancas serán las que hayan incorporado el plásmido con la construcción. Para transferir la construcción al plásmido final, se emplean las dianas de

restricción dispuestas en el plásmido pGEM-T Easy a cada lado de la construcción, o las dianas introducidas por los *primers* en la amplificación por PCR del fragmento de DNA a subclonar.

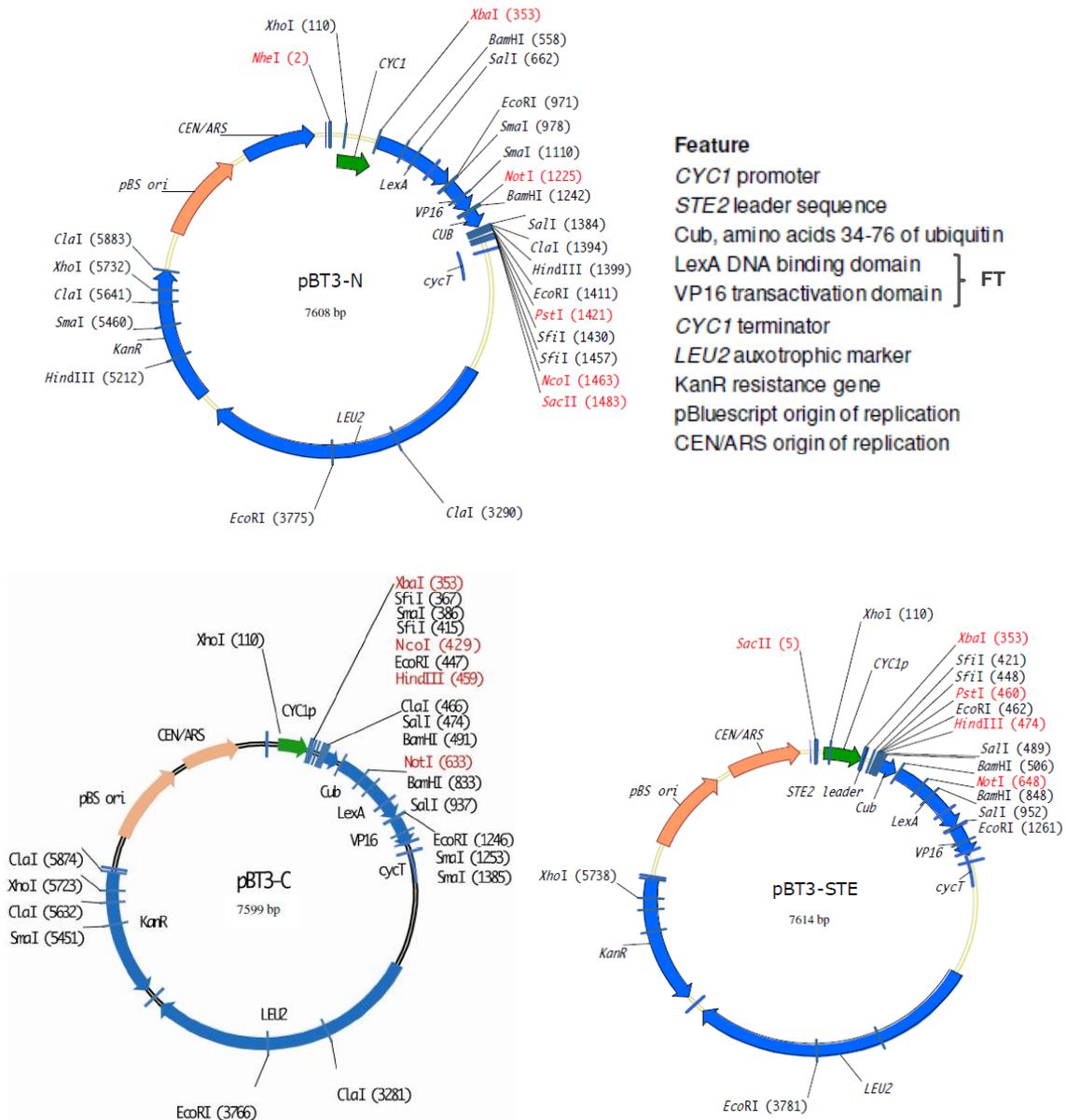
En el caso del clonaje en el plásmido pENTR3C, se emplea el sitio de clonaje múltiple que se encuentra entre los sitios de recombinación attL1 y attL2, lo que conlleva la pérdida del gen *ccdB*, que resultaba tóxico para la cepa bacteriana DH5 α . Además, el plásmido pENTR3C contiene el gen de resistencia a kanamicina. Por tanto, en medio LB suplementado con kanamicina, solo podrán crecer las colonias de DH5 α que hayan incorporado el plásmido con el gen *ccdB* sustituido por el gen de interés. Para transferir el DNA desde pENTR3C al plásmido de destino, se emplea el sistema de recombinación homóloga de la tecnología *Gateway*.

3.2 Construcciones para la expresión de proteínas en levadura

En los ensayos de doble híbrido en levaduras, basados en la técnica *split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid* (MbyTH), se utilizaron los plásmidos necesarios incluidos en el kit comercial DUAL membrane kit 3 (dualsystems biotech) (Figuras 61 y 62). La replicación de estos plásmidos se llevó a cabo por transformación en la cepa DH5 α .

Para la expresión de proteínas fusionadas al dominio Cub-FT (región C-terminal de la ubiquitina fusionada al factor de transcripción híbrido LexA-VP16) en el extremo N- y C-terminal, se emplearon los plásmidos cebo pBT3N y pBT3C, respectivamente. También se empleó el plásmido pBT3STE, similar al pBT3C pero con una secuencia líder *STE2* después del promotor *CYC1p* que potencia la expresión de la proteína en levadura. Los plásmidos cebo contienen, además, un gen que codifica una enzima que interviene en la síntesis del aminoácido leucina (*LEU2*), lo que confiere a la cepa de levadura NMY51 la capacidad de crecer en un medio carente de leucina (Figura 61).

Figura 61. Esquema de los plásmidos cebo pBT3N, pBT3C y pBT3STE para la expresión en levadura de proteínas fusionadas al dominio Cub-FT en los ensayos de doble híbrido. *LEU2* es el gen para la selección de los transformantes de levadura y codifica una enzima involucrada en la síntesis del aminoácido leucina. *KanR* es el gen que otorga resistencia a kanamicina en bacteria.



Para la expresión de proteínas fusionadas al dominio NubG (región N-terminal de la ubiquitina portadora de la mutación puntual Ile3→Gly3) en el extremo N- y C- terminal, se emplearon los plásmidos presa pPR3N y pPR3C, respectivamente. El plásmido pPR3N también se empleó como control negativo en los ensayos de doble híbrido, y el plásmido pAI-Alg5 como control positivo, que expresa la proteína del RE Alg5 fusionada al dominio Nubl (región N-terminal de la ubiquitina *wild type*), de forma que Nubl queda orientado hacia el citosol. Este plásmido también se empleó en los ensayos para determinar la orientación de los extremos N- y C-terminal de las proteínas de membrana AtArv1, ScArv1, CYP51, Erg11, maMYB y AtArv2. Los plásmidos presa contienen, además, un gen que codifica una enzima que interviene en la síntesis del aminoácido triptófano (*TRP1*), lo que

confiere a la cepa de levadura NMY51 la capacidad de crecer en un medio carente de triptófano (Figura 62).

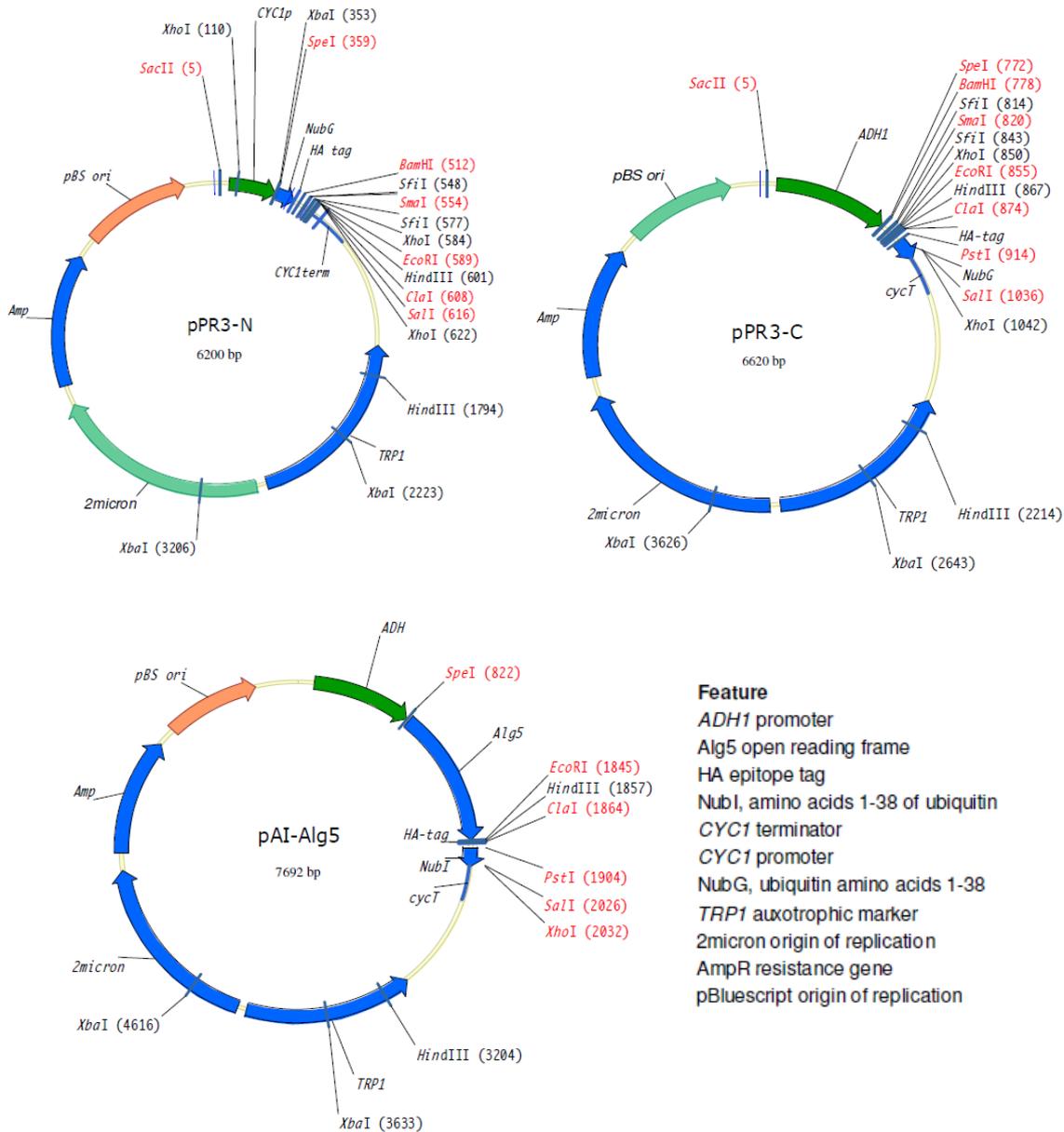


Figura 62. Esquema de los plásmidos presa pPR3N y pPR3C para la expresión en levadura de proteínas fusionadas al dominio Nub en los ensayos de doble híbrido. Los plásmidos pPR3N y pPR3C codifican la versión NubG, portadora de la mutación puntual Ile3→Gly3 que no presenta afinidad por el dominio Cub. El plásmido pAI-Alg5 expresa la proteína de RE Alg5 fusionada en el extremo N-terminal al dominio NubI (región N-terminal de la ubiquitina *wild type*). *TRP1* es el gen para la selección de los transformantes en levadura y codifica para una enzima involucrada en la síntesis del aminoácido triptófano. *AmpR* es el gen que otorga resistencia a ampicilina en bacteria.

El cDNA que codifica cada una de las proteínas de estudio (ScArv1, Erg11, AtArv1, CYP51, maMYB, AtArv2, maMYB¹⁻⁹⁰, maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, AtArv1Δ35 y AtArv1Δ68) estaba ya disponible en nuestro laboratorio, excepto para el caso de maMYB que se obtuvo del cribado del banco de cDNA de Arabidopsis (apartado 5.5-5.8). Los fragmentos de cDNA indicados se amplificaron por PCR empleando los *primers* indicados en la Tabla 8. En primer lugar, los cDNAs amplificados se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy y se secuenciaron. Posteriormente, se clonaron a través de las dianas de restricción *Sfi*I en los correspondientes plásmidos cebo (pBT3STE-AtArv1 / AtArv1Δ35 / AtArv1Δ68 / AtArv2, pBT3C-ScErg11 / CYP51 / Erg11, pBT3N-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11) y presa (pPR3C-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11 / maMYB, pPR3N-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11 / maMYB / maMYB¹⁻⁹⁰ / maMYB⁹¹⁻³⁰⁹). La secuencia de reconocimiento de la enzima *Sfi*I (GGCCNNNN↓NGGCC, la flecha indica el sitio de corte) tiene una región interna de cinco nucleótidos variable. Cada plásmido cebo y presa contiene dos sitios de restricción de *Sfi*I distintos (GGCCATTA↓CGGCC y GGCCGCCT↓CGGCC) a cada lado del sitio de clonaje múltiple, lo que permite el clonaje direccional de los cDNAs. Por otra parte, como el sitio de restricción de *Sfi*I es muy raro en todos los genomas de eucariotas, hace que no se encuentre en las construcciones empleadas.

Nombre	Secuencia	T (°C)	Hibridación	Orientación
ARV1SfiI-S	5'-CGGGCCATTACGGCCATGGC GGCGAGTGAACAC-3'	50	AtArv1	Directo
Arv1Δ35Fmet_SfiI	5'-GGCCATTACGGCCATGAAGG AAGTAGCAGATGAG-3'	48	AtArv1 (Arv1Δ35)	Directo
Arv1Δ68Fmet_SfiI	5'-GGCCATTACGGCCATGGCAA TTAATCCAGCAACTGTC-3'	48	AtArv1 (Arv1Δ68)	Directo
ARV1SfiI-AS	5'-CGGGCCGAGGCGGCCTCATA CGATTCTGAAAAATAAGAC-3'	50	AtArv1	Reverso
ARV1SfiI No STOP-AS	5'-CGGGCCGAGGCGGCCCTAC GATTCTGAAAAATAAGAC-3'	50	AtArv1	Reverso
ARV1y-SfiI 5'	5'-GGCCATTACGGCCATGATT GCATAACGTGC-3'	50	ScArv1	Directo
ARV1y-SfiI 3'	5'-GGCCGAGGCGGCCCTAAC AATAAATAAGTTCC-3'	50	ScArv1	Reverso
ARV1y-SfiI 3' stop	5'-GGCCGAGGCGGCCTTAAC AATAAATAAGTTCTGAC-3'	50	ScArv1	Reverso
Cyp51 5'-SfiI	5'-GGCCATTACGGCCATGGAAT TGGATTCCGAGAAC-3'	52	CYP51	Directo
Cyp51 3' STOP-SfiI	5'-GGCCGAGGCGGCCTTAAGAA AGCTGGCGCCTC-3'	52	CYP51	Reverso

Cyp51 3' NOstop-Sfil	5'-GGCCGAGGCGGCC CC AGAA AGCTGGCGCCTCTTG-3'	52	CYP51	Reverso
ERG11 5'-Sfil	5'-GGCCATTACGGCC ATG TCTG CTACCAAGTCAATC-3'	52	Erg11	Directo
ERG11 3' NOstop-Sfil	5'-GGCCGAGGCGGCC CC GATCT TTTGTCTGGATTCTC-3'	52	Erg11	Reverso
ERG11 3' STOP-Sfil	5'-GGCCGAGGCGGCC TTA GATC TTTTGTCTGGATTTC-3'	52	Erg11	Reverso
Arv2Sfil_Fow	5'-GGCCATTACGGCC ATG GCGA GAGAGAAGAAGAC-3'	55	AtArv2	Directo
Arv2noSfil_Rev	5'-GGCCGAGGCGGCC CC CATG ACAGATCCTAAGTGCCAG-3'	55	AtArv2	Reverso
MybSfil_Fow	5'-GGCCATTACGGCC ATG GATT TTTTCGACGAAG-3'	55	maMYB	Directo
MybstopSfil_Rev	5'-GGCCGAGGCGGCC TTA ATTA GCTGGAGTTTTTCGAG-3'	55	maMYB	Reverso
MybnoSfil_Rev	5'-GGCCGAGGCGGCC CC ATTAG CTGGAGTTTTTCGAGC-3'	55	maMYB	Reverso
MybTMDf_Sfil	5'-GGCCATTACGGCC ATG GATT TTTTCGACGAAGAC-3'	52	maMYB (maMYB ¹⁻⁹⁰)	Directo
MybTMDRstop_Sfil	5'-GGCCGAGGCGGCC TTA ATAA CCGACGCGAATCTTAC-3'	52	maMYB (maMYB ¹⁻⁹⁰)	Reverso
MybΔ90F_Sfil	5'-GGCCATTACGGCCGGTCAGA TCTTGAGCCAG-3'	52	maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹)	Directo
MybΔ90Rstop_Sfil	5'-GGCCGAGGCGGCC TTA ATTA GCTGGAGTTTTTCGAG-3'	52	maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹)	Reverso

Tabla 8. Primers empleados para generar las construcciones para la expresión de las distintas proteínas cebo y presa en levadura. En las secuencias de los *primers* se indica la secuencia de la diana de restricción empleada (subrayada), la secuencia añadida para mantener el marco de lectura (negrita y cursiva) y los codones de inicio (verde) y de parada (rojo) de la traducción. Las dianas de restricción empleadas se indican en el nombre del *primer*. Se indica la temperatura empleada en la reacción de PCR y contra que gen hibrida. En los casos de construcciones de genes quimera, se detalla entre paréntesis el propósito concreto del *primer*.

3.3 Construcciones para la expresión de proteínas en planta

A lo largo de la tesis se emplearon diferentes plásmidos tanto para la expresión estable de proteínas en *Arabidopsis* como para la expresión transitoria en *Nicotiana*.

3.3.1 Construcciones para la expresión de proteínas fusionadas a GFP

Los plásmidos del sistema *Gateway* de la familia pMDC (Curtis and Grossniklaus, 2003), en concreto pMDC43 y pMDC83 (Figura 63), se emplearon para expresar proteínas fusionadas a GFP en N- y C-terminal, respectivamente, en los ensayos de localización subcelular en *Nicotiana* y coinmunoprecipitación tanto en *Nicotiana* como en *Arabidopsis*. La replicación de estos plásmidos, que contienen el gen *ccdB*, se llevó a cabo por transformación en la cepa DB3.1.

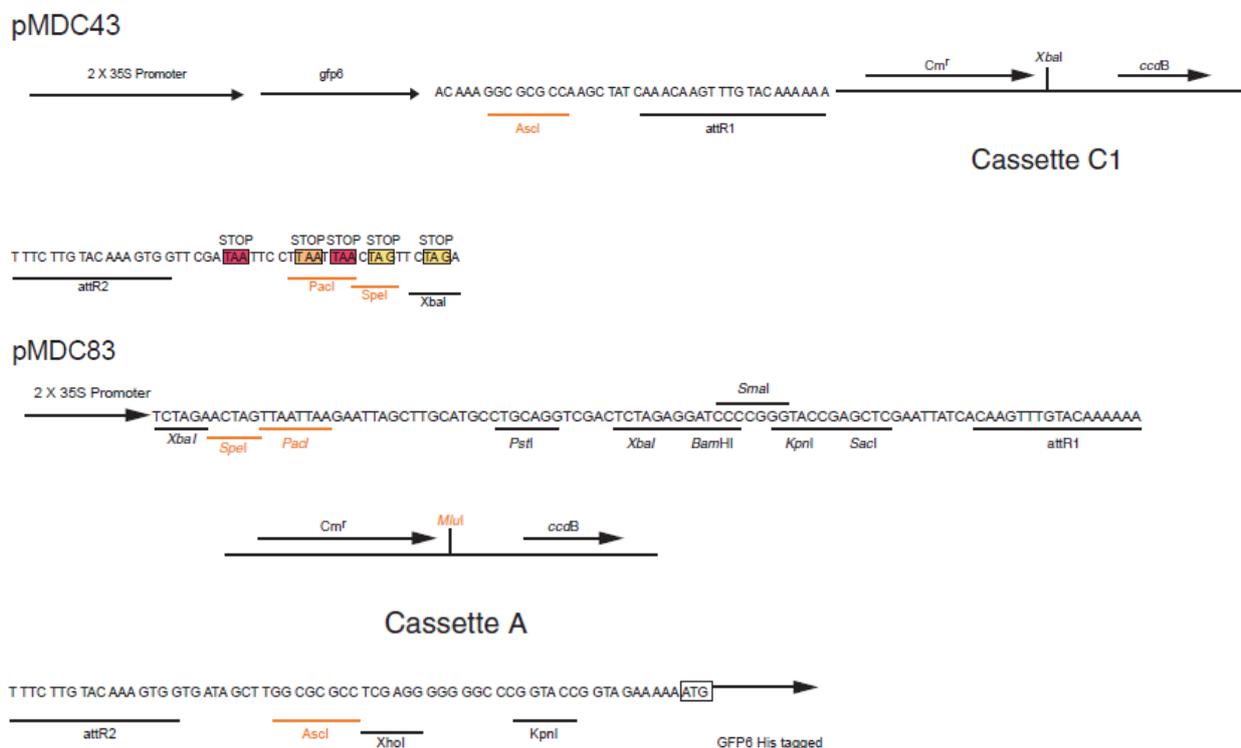


Figura 63. Esquema parcial de los plásmidos pMDC43 y pMDC83 para la expresión de proteínas fusionadas a GFP en el extremo N- y C-terminal, respectivamente. La expresión de la proteína fusionada a GFP (mGFP6, *monomeric green fluorescence protein 6*) queda bajo el control del promotor constitutivo 2x35S (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor). *attR1* y *attR2* son los sitios de recombinación empleados por el sistema *Gateway*[®]. El gen *ccdB* expresa una proteína tóxica para la mayoría de cepas bacterianas. Los plásmidos confieren resistencia a amikacina en bacteria y a higromicina en *Arabidopsis*. Abreviaciones: RB, *right border*; LB, *left border*; Nos *terminator*, terminador del gen de la nopalina sintasa.

El cDNA que codifica las proteínas de estudio AtArv1 y CYP51 estaba ya disponible en nuestro laboratorio, mientras que el de maMYB y AtAGP18 se obtuvieron del cribado del banco de cDNA de *Arabidopsis* (apartado 5.5-5.8). Los fragmentos de cDNA se amplificaron por PCR empleando los *primers* indicados en la Tabla 9. En primer lugar, los

cDNAs amplificados se clonaron en el plásmido pENTR3C a través de las dianas de restricción *Sall* y *NotI*. Posteriormente, los cDNAs se transfirieron desde el pENTR3C mediante recombinación homóloga del sistema *Gateway* a los plásmidos pMDC43 y pMDC83 (pMDC43-AtArv1 / CYP51 / maMYB / AtAGP18, pMDC83-AtArv1 / CYP51 / maMYB / AtAGP18). En el caso de la versión truncada de maMYB (maMYB⁹¹⁻³⁰⁹), el fragmento de cDNA amplificado empleando los *primers* indicados en la Tabla 9, se clonó en primer lugar en el plásmido pGEM-T Easy, y posteriormente en el plásmido pENTR3C a través de las dianas de restricción *KpnI* y *XbaI*, y finalmente, por recombinación homóloga, en el plásmido pMDC45 (pMDC45-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹), que es equivalente al pMDC43 pero diseñado para incorporar el cDNA desplazado 2 nucleótidos para la correcta fusión de su marco de lectura respecto al de la *GFP*.

Nombre	Secuencia	T (°C)	Hibridación	Orientación
Arv1F_ <i>Sall</i>	5'–ACGCGT CGACT ATGGCGGCGA GTGAACAC–3'	52	AtArv1	Directo
Arv1Rstop_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CTCA TACGATTCTGAAAAATAAG–3'	52	AtArv1	Reverso
Arv1Rno_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CGA TACGATTCTGAAAAATAAGAC–3'	52	AtArv1	Reverso
Cyp51F_ <i>Sall</i>	5'–ACGCGT CGACT ATGGAATTGG ATTCGGAGAAC–3'	52	CYP51	Directo
Cyp51Rstop_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CTTA AGAAAGCTGGCGCCTC–3'	52	CYP51	Reverso
Cyp51Rno_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CGA AGAAAGCTGGCGCCTCTTG–3'	52	CYP51	Reverso
MybF_ <i>Sall</i>	5'–ACGCGT CGACT ATGGATTTTT CGACGAAGAC–3'	52	maMYB	Directo
MybRstop_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CTTA ATTAGCTGGAGTTTTCGAG–3'	52	maMYB	Reverso
MybRno_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CGA ATTAGCTGGAGTTTTCGAGC–3'	52	maMYB	Reverso
MybΔ90F_ <i>KpnI</i>	5'– GGTACCCG GGTCAGATCTTGG AGCCAG–3'	55	maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹)	Directo
MybRno_ <i>XbaI</i>	5'– TCTAGAG ATTAGCTGGAGTTTT CGAGC–3'	55	maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹)	Reverso
AGP18F_ <i>Sall</i>	5'–ACGCGT CGACT ATGGATCGCA ATTCCTCC–3'	52	AtAGP18	Directo
AGP18Rstop_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CTTA GAATGCCATAACGAGAAC–3'	52	AtAGP18	Reverso
AGP18Rno_ <i>NotI</i>	5'–AAGGAAAAAAGCGGCC CGA GAATGCCATAACGAGAACG–3'	52	AtAGP18	Reverso

Tabla 9. Primers empleados para generar las construcciones necesarias para la expresión de proteínas fusionadas a GFP. Las características de las secuencias de los *primers* se indican de la misma forma que en la Tabla 8.

3.3.2 Plásmidos para expresar proteínas marcadoras de orgánulos en los ensayos de localización subcelular

Para generar el marcador de RE empleado en los ensayos de localización subcelular en *Nicotiana*, se empleó la secuencia que codifica para la proteína marcadora de RE T3RE del plásmido pT3RE, cedido por el Dr. Narciso Campos. La proteína T3RE consiste en una versión mejorada de la proteína fluorescente roja de *Discosoma* DsRed.T3 (Bevis and Glick, 2002), a la que se había incorporado el péptido de tránsito de una quitinasa para dirigirla al RE, y la señal de retención en el RE KDEL (Forés et al., 2006). A través de las dianas de restricción *EcoRI*, se transfirió la secuencia que codifica la proteína T3RE junto con el terminador de la nopalina sintasa desde el plásmido pT3RE (*EcoRI*-T3RE-NosTer-*EcoRI*) al vector binario pMDC83, reemplazando el fragmento del plásmido que contenía la secuencia *mgfp6* (*EcoRI*-3'CMr-*ccdB*-attR2-*mgfp6*-NosTer-*EcoRI*) y generando el plásmido pMDC83-T3RE (Figura 64). Debido a que se empleó la misma diana de restricción a cada lado de la inserción, la selección del plásmido pMDC83-T3RE con la correcta disposición del DNA de T3RE se realizó mediante el análisis del patrón de fragmentos de DNA específicos tras digestión con determinadas enzimas de restricción. La región 5' del gen de resistencia a cloranfenicol (CMr), que quedó en el plásmido pMDC83-T3RE, no se encuentra en fase de lectura con T3RE, por lo que su presencia no afecta a la expresión de la proteína marcadora.

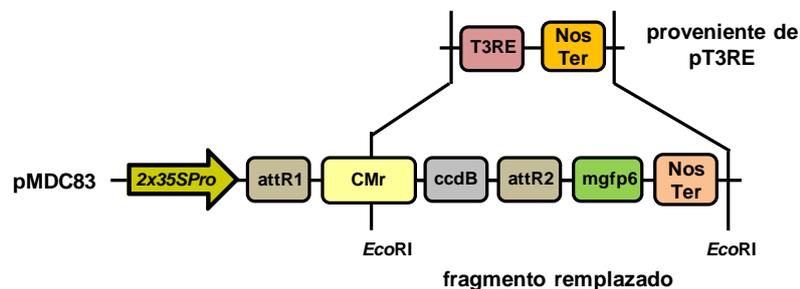


Figura 64. Esquema de la construcción para expresar la proteína marcadora de RE T3RE. A través de la digestión con *EcoRI* se reemplazó el fragmento indicado de pMDC83 por el fragmento proveniente del plásmido pT3RE (T3RE-Nos Ter). La región 5' de CMr (gen de resistencia a cloranfenicol) quedó en el plásmido final (pMDC83-T3RE), pero no se encuentra en fase de lectura con T3RE.

Para el estudio de la localización subcelular en *Nicotiana* de la proteína quimera maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, se emplearon los marcadores de cuerpos nucleares fusionados a mRFP (*monomeric RFP*) fibrillarín-mRFP, coilín-mRFP y SRp30-mRFP, que habían sido generados en el plásmido pROK2-mRFP y fueron cedidos por el Dr. Jiří Fajkus (Dvorácková, 2010).

3.3.3 Plásmidos y construcciones empleados en los ensayos BiFC

Para llevar a cabo los ensayos BiFC, se expresaron transitoriamente en *Nicotiana* las proteínas objeto de estudio fusionadas, a través de un pequeño *linker* flexible (AGGGGSGGGGSGGGGSL, diseñado por el Dr. Alejandro Ferrando, Facultad de Biología, Universidad de Valencia), a las mitades N- y C-terminal de la YFP (YFN e YFC, respectivamente). Para ello, se emplearon los plásmidos pMDC43 y pMDC83 a los que se substituyó la secuencia de la GFP por las secuencias de *linker* fusionado a YFN o YFC. El Dr. Alejandro Ferrando nos cedió las versiones pMDC43YFN y pMDC43YFC, para la expresión de las fusiones YFN-*linker*-Proteína y YFC-*linker*-Proteína, respectivamente. Durante esta tesis, como colaboración con el Dr. Alejandro Ferrando, se realizaron las versiones pMDC83YFN y pMDC83YFC, que sirven para la expresión de las fusiones Proteína-*linker*-YFN y Proteína-*linker*-YFC, respectivamente. A través de las dianas de restricción *Ascl* y *Sacl* se incorporaron al plásmido pMDC83 los DNAs correspondientes al *linker*-YFN y *linker*-YFC, clonados previamente en el plásmido pGEM-T Easy tras amplificarse mediante PCR empleando los *primers* indicados en la Tabla 10 y las construcciones pMDC43YFN y pMDC43YFC como molde.

Nombre	Secuencia	T (°C)	Hibridación	Orientación
F-YFN_linker_AscI	5'-GGGGCGCGCC GCCGGTGGAGGTGGATCT GGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATC TCTT ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT-	54	YFP (YFN)	Directo
R-YFNstop_SacI	5'-GGCGAGCTCT CA CATGATATAGACGTTGTG GCTGTTGTAGTT-3'	54	YFP (YFN)	Reverso
F-YFC_linker_AscI	5'-GGGGCGCGCC GCCGGTGGAGGTGGATCT GGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATC TCTT ATGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT-	56	YFP (YFC)	Directo
R-YFCstop_SacI	5'-GGCGAGCTCT CA CTTGATACAGCTCGTCCAT GCCGAGAGTGAT-3'	56	YFP (YFC)	Reverso

Tabla 10. Primers empleados para generar los plásmidos pMDC83YFN y pMDC83YFC. La secuencia del *linker* se muestra en negrita y cursiva, y el resto de las características de las secuencias de los *primers* se indican de la misma forma que en la Tabla 8.

Los cDNAs que codifican las proteínas de estudio (AtArv1, CYP51, maMYB y AtAGP18) se clonaron mediante recombinación homóloga en los cuatro plásmidos empleados para el análisis por BiFC. Para ello, se emplearon las construcciones generadas previamente en el plásmido pENTR3C (apartado 3.3.1) y se generaron los plásmidos finales pMDC43YFN-AtArv1 / CYP51 / maMYB / AtAGP18, pMDC43YFC-AtArv1 / CYP51 / maMYB / AtAGP18, pMDC83YFN-AtArv1 / CYP51 / maMYB / AtAGP18, pMDC83YFC-AtArv1 / CYP51 / maMYB / AtAGP18.

3.3.4 Construcción para el análisis del patrón de expresión del gen *maMYB* de *Arabidopsis* mediante el gen reportero GUS

Con el fin de analizar el patrón de expresión del gen *maMYB*, se empleó el plásmido pCAMBIA1304 (Figura 65) para generar una construcción en la que el promotor del gen *maMYB* controle la expresión del gen reportero GUS. La replicación de este plásmido se llevó a cabo en la cepa DH5 α .

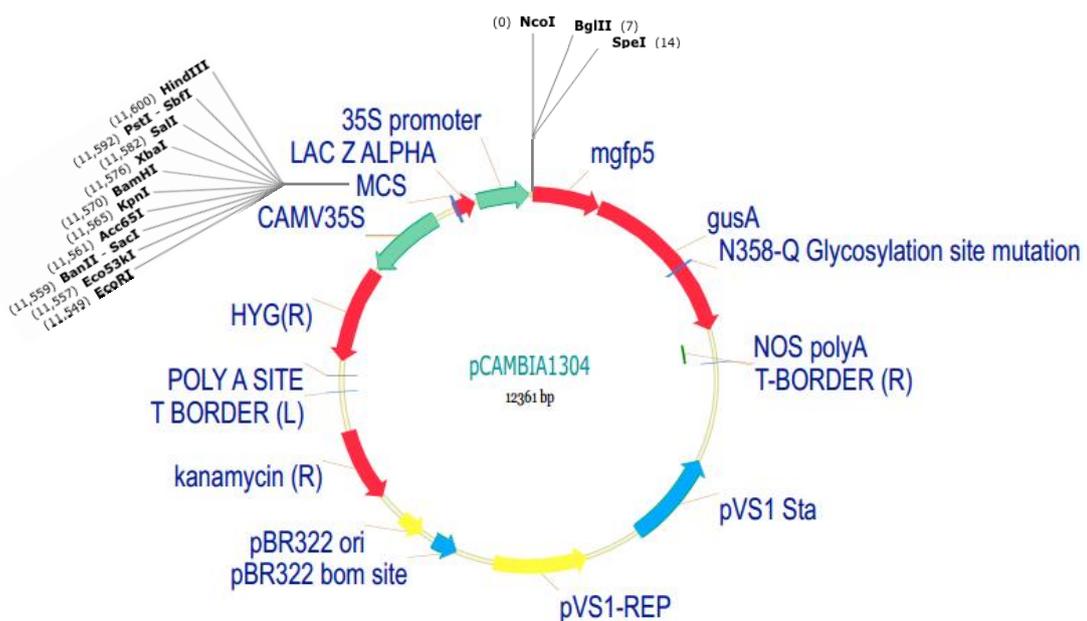


Figura 65. Esquema del plásmido pCAMBIA1304. La expresión de la proteína GUS (beta-glucuronidasa) queda bajo el control del promotor 35S (promotor 35S del virus del mosaico de la

coliflor), que se puede sustituir a través de dianas de restricción únicas que se encuentran a cada lado de dicho promotor. El plásmido confiere resistencia a kanamicina en bacteria y a higromicina en *Arabidopsis*.

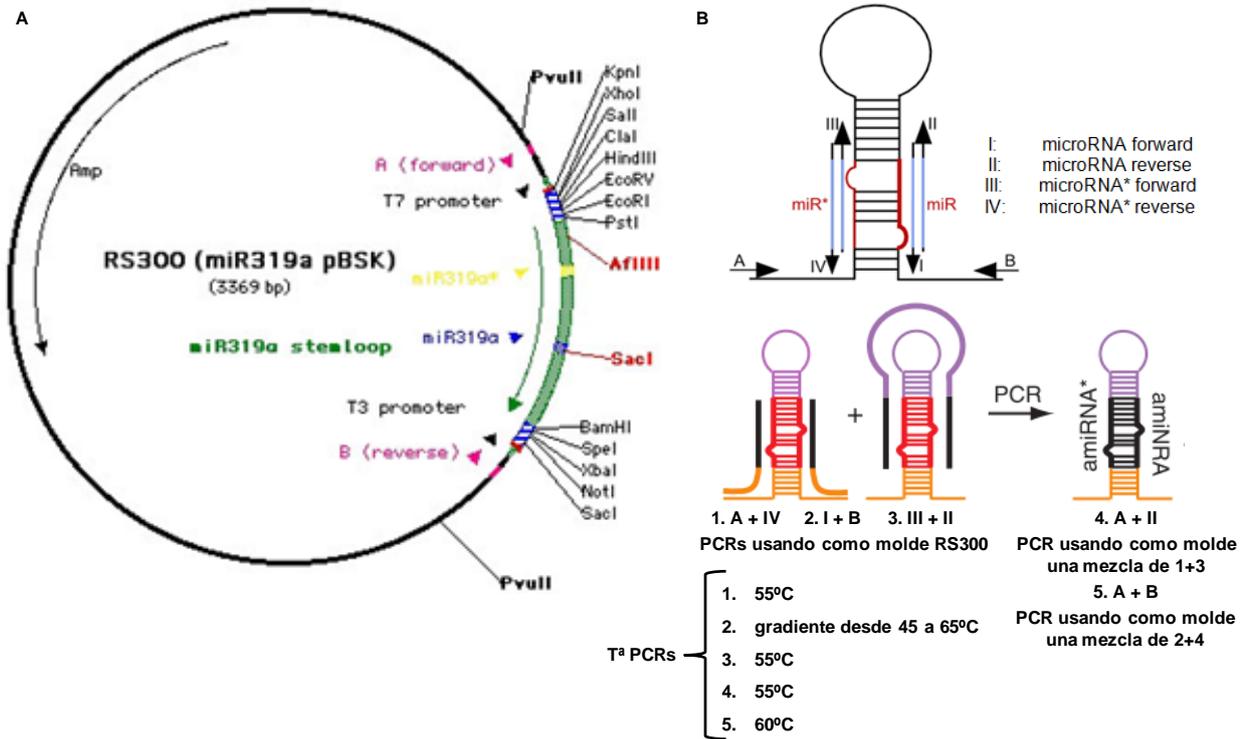
A partir de DNA genómico obtenido de plántulas de *Arabidopsis* (apartado 9.2), se amplificó por PCR el fragmento de 813 pb de la región 5'-flanqueante de *maMYB* empleando los primers indicados en la Tabla 11. La zona promotora se clonó en primer lugar en el plásmido pGEM-T Easy, y posteriormente, a través de las dianas *Sall* y *NcoI*, en el plásmido pCAMBIA1304 sustituyendo el promotor 35S (Figura 65) por el fragmento de DNA correspondiente al promotor de *maMYB*, dando lugar al plásmido pCAMBIA1304*maMYB::GFP::GUS*.

Nombre	Secuencia	T (°C)	Hibridación
3'promMyb_NcoI	5'- <u>CCATGGT</u> GTTGCTCTGTTGCACTG-3'	55	5'gDNA <i>maMYB</i>
5'promMyb_Sall	5'- <u>GTCGACC</u> GTATTTGTGTGGTTCTCG-3'	55	5'gDNA <i>maMYB</i>

Tabla 11. Primers empleados para generar el plásmido pCAMBIA2301 *maMYB::GUS::GFP*. Las características de las secuencias de los *primers* se indican de la misma forma que en la Tabla 8.

3.3.5 Construcción del amiRNA de *maMYB* integrado en un pre-miRNA

Siguiendo la estrategia de clonaje de amiRNA diseñada en el laboratorio del Dr Detlef Weigel (Ossowski et al., 2008), los amiRNAs de *maMYB* (amiRNA 1 y amiRNA 2) diseñados con la herramienta bioinformática WMD (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), se integraron en el esqueleto del pre-miRNA miR319 empleando como molde el plásmido RS300 en una serie de PCRs solapantes (Figura 66A-B). Para ello, la herramienta bioinformática WMD diseñó los *primers* I a IV de posición, orientación y secuencia necesarias para generar la estructura en forma de horquilla mediante la hibridación del amiRNA y su complementario amiRNA*, dejando algunas posiciones específicas sin hibridar (*mismatches*) (Figura 66B). En la Figura 66C se muestra la secuencia de los *primers* A y B del plásmido, y los *primers* I a IV empleados para integrar cada amiRNA de *maMYB*.



C

Nombre	Secuencia	Hibridación	Orientación
A_RS300	5'-CTGCAAGGCGATTAAGTT GGGTAAC-3'	RS300	Directo
B_RS300	5'-GCGGATAACAATTCACA CAGGAAACAG-3'	RS300	Reverso
I_miMybTMD-s	5'-gaTTAATAGTAGCGATTTG CCAGtctctctttgtattcc-3'	amiRNA1/RS300	Directo
II_miMybTMD-a	5'-gaCTGGCAAATCGCTACTA TTAAtcaaagagaatcaatga-3'	amiRNA1/RS301	Reverso
III_miMybTMD*s	5'-gaCTAGCAAATCGCTTCTA TTATtcacaggtcgtgatatg-3'	amiRNA1*/RS302	Directo
IV_miMybTMD*a	5'-gaATAATAGAAGCGATTTG CTAGtctacatatattcct-3'	amiRNA1*/RS303	Reverso
I_miMyblikeD-s	5'-gaTATTGAGCAATGCAACG TCTTtctctctttgtattcc-3'	amiRNA2/RS300	Directo
II_miMyblikeD-a	5'-gaAAGACGTTGCATTGCTC AATAtcaaagagaatcaatga-3'	amiRNA2/RS300	Reverso
III_miMyblikeD*s	5'-gaAAAACGTTGCATTCTC AATTtcacaggtcgtgatatg-3'	amiRNA2*/RS300	Directo
IV_miMyblikeD*a	5'-gaAATTGAGGAATGCAAC GTTTTtctacatatattcct-3'	amiRNA2*/RS300	Reverso

Figura 66. Estrategia de clonaje de los amiRNAs de *maMYB* en el pre-miRNA miR319 (Ossowski, 2008). **A)** Esquema del plásmido RS300 que contiene un sitio de clonaje múltiple (rayado azul y blanco) con dianas de restricción únicas en cada extremo del pre-miRNA miR319 (verde). Los *primers* A y B (rosa) hibridan en el plásmido RS300 a cada lado del pre-miRNA y fuera de los sitios de clonaje múltiple. **B)** Estrategia de la construcción del amiRNA integrado en el pre-miRNA empleando los *primers* I a IV, A y B. En las PCRs que emplean como molde el plásmido RS300, se obtienen los fragmentos 1 (A+IV), 3 (III+II) y 2 (I+B), que hibrida por cada extremo con los fragmentos 1 y 3 dejando algunas posiciones específicas sin hibridar (*mismatches*). Las PCRs solapantes 4 (A+II) y 5 (A+B) usan como molde una mezcla de los productos obtenidos en 1+3 y 2+4 respectivamente, obteniéndose la construcción final del pre-miRNA. Se indica la temperatura empleada en cada una de las reacciones de PCRs mencionadas. **C)** Secuencia de los *primers* A, B y I-IV específicos para generar cada pre-miRNA de *maMYB* (amiRNA 1 y amiRNA 2). En las secuencias de los *primers* I a IV se indica en mayúsculas la secuencia del amiRNA o su complementaria amiRNA* empleadas para cada amiRNA de *maMYB*, y en minúsculas lo que hibridaría con el plásmido RS300.

3.3.6 Construcciones de los amiRNAs para modificar de forma inducible la expresión de *maMYB* en Arabidopsis

Con el propósito de generar líneas transgénicas de Arabidopsis de silenciamiento condicional del gen *maMYB* mediante el amiRNA 1 y amiRNA 2 (apartado 3.3.5), se empleó el plásmido pB110Red-2844 (Figura 67), cedido por el Dr. Edgar B. Cahoon del Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Missouri, USA). La replicación de este plásmido, que posee el sistema *Gateway*, se llevó a cabo en la cepa DB3.1.

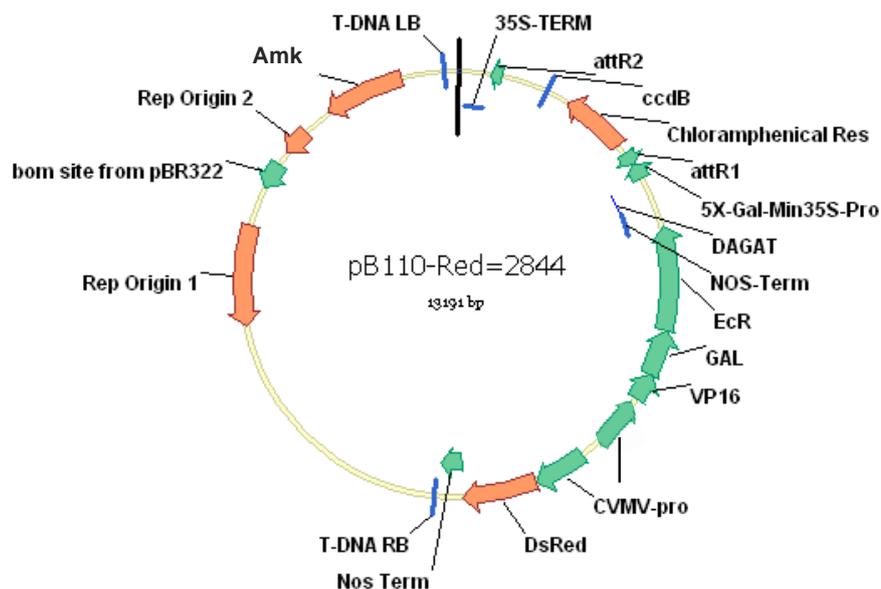


Figura 67. Esquema del plásmido pB110-Red-2844 con el promotor inducible basado en el receptor de ecdisona. Bajo el control del promotor constitutivo CVMV-pro (promotor del virus del

mosaico de la nervadura de Cassava), se expresa el factor de transcripción híbrido formado por un dominio de activación (VP16), un dominio de unión a DNA (GAL) y un dominio receptor de ecdisona (EcR). En presencia del inductor metoxifenocida, el factor de transcripción dimeriza y se une al promotor mínimo 5X-Gal-Min35S-Pro (que contiene 5 copias del elemento de respuesta a GAL4 fusionado al promotor mínimo CaMV35S). *attR1* y *attR2* son los sitios de recombinación *Gateway*. El plásmido confiere resistencia a amikacina en bacteria. La selección de plantas transgénicas se realiza mediante la proteína marcadora DsRed, que permite identificar las semillas transgénicas por la fluorescencia roja que emiten. Abreviaciones: RB, *right border*; LB, *left border*; Nos *terminator*, terminador del gen de la nopalina sintasa; 35S Ter, terminador del gen 35S.

El plásmido pB110Red-2844 posee un promotor inducible basado en el receptor de la hormona ecdisona de insectos, que es un miembro de la familia de receptores esteroideos (Wing, 1988). En insectos, este sistema hormona-receptor cumple una importante función en la regulación del crecimiento, el desarrollo y el proceso de muda (Wing, 1988). Dicho sistema fue adaptado inicialmente en el plásmido pBin-2800B para su uso en laboratorio (Padidam et al., 2003; Koo et al., 2004; Martínez-Andújar et al., 2011). Para activar el sistema, se utiliza un agonista no esteroideo de la ecdisona llamado metoxifenocida, comercializado por la empresa Bayer bajo el nombre comercial de Runner®. El plásmido pBin-2800B se modificó posteriormente cambiándole el gen marcador por un gen que expresa la proteína DsRed de fluorescencia roja, que permite la detección visual de las semillas transgénicas, dando lugar finalmente al plásmido pB110Red-2844. Este plásmido posee, bajo el control del promotor constitutivo CVMV-pro, un factor de transcripción híbrido formado por un dominio de activación (VP16), un dominio de unión a DNA (GAL) y un dominio receptor de ecdisona (EcR). En presencia del inductor metoxifenocida, el factor de transcripción híbrido dimeriza y se une al promotor mínimo 5X-Gal-Min35S-Pro, provocando que se transcriba la secuencia que haya después del promotor.

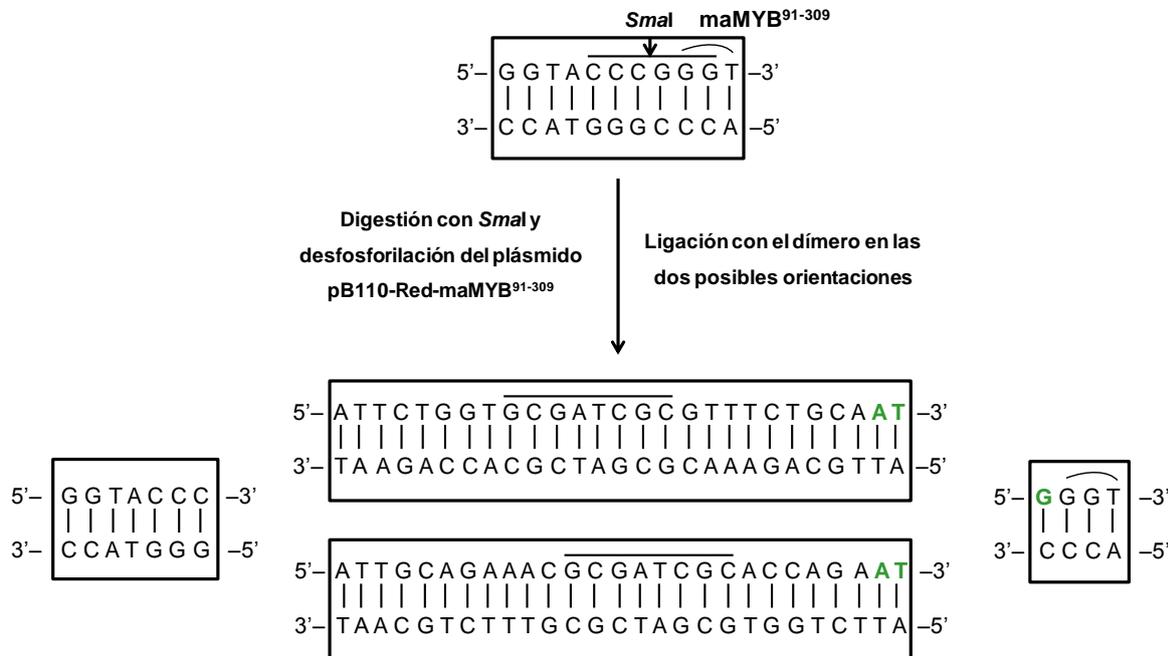
Los correspondientes DNAs de las construcciones de los pre-miRNA con los amiRNA 1 y amiRNA 2 obtenidas en el apartado anterior (Figura 66), se clonaron a través de las dianas de restricción *SaI* y *NotI*, en primer lugar, en el plásmido pGEM-T Easy, y posteriormente, en el plásmido pENTR3C. Finalmente, se traspasaron mediante recombinación homóloga al plásmido pB110Red-2844, dando lugar a los plásmidos pB110-Red-amiRNA1 y pB110-Red-amiRNA2.

3.3.7 Construcciones para la sobreexpresión inducible de maMYB en Arabidopsis

Por otra parte, con el objetivo de obtener líneas transgénicas de Arabidopsis de sobreexpresión condicional de la proteína maMYB entera y de la versión truncada maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, se clonó el cDNA que codifica cada una de las proteínas de estudio mediante recombinación homóloga del sistema *Gateway* en el plásmido pB110Red-2844 (Figura 67). Para ello, se emplearon las construcciones generadas en el plásmido pENTR3C que se habían empleado previamente para analizar la localización subcelular de dichas proteínas (apartado 3.3.1). En ambos casos se emplearon las construcciones que tenía el codón de parada y se obtuvieron los plásmidos pB110-Red-maMYB y pB110-Red-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹. Sin embargo, en el caso de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, no contenía el codón de inicio de la traducción, ya que al ser la versión truncada y como la construcción había sido diseñada para la fusión de GFP en N-terminal de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹, la propia secuencia de GFP era la que aportaba el codón de inicio. Por ello, el plásmido pB110-Red-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se digirió con la enzima de restricción *Sma*I y se desfosforilaron los extremos romos 5' del plásmido linealizado para evitar que se recircularizara. Posteriormente, los oligonucleótidos fosforilados ATGSfglMybA90_Fow y ATGSfglMybA90_Rev se hibridaron entre ellos y se ligaron al plásmido a través de los extremos romos generados por *Sma*I, de forma que, las dos posibles orientaciones del dímero en la ligación regeneraban el codón de inicio de la traducción, en marco de lectura con la secuencia codificante de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ (Figura 68). Además, las secuencias de los oligonucleótidos contenían la diana de restricción *Sfg*I para poder seleccionar por digestión el plásmido que los había incorporado, dando lugar al plásmido pB110-Red-ATGmaMYB⁹¹⁻³⁰⁹.

Figura 68. Introducción del codón de inicio de traducción en la construcción pB110-Red-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹. El *primer* Myb Δ 90F_KpnI, que se empleó para clonar maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ en el plásmido pENTR3C (Tabla 9), carece del codón de inicio de la traducción y posee también la diana de restricción *Sma*I (subrayada y con el sitio de corte indicado por una flecha). El dímero formado por los oligonucleótidos ATGSfglMybA90_Fow y ATGSfglMybA90_Rev, que contienen la diana de restricción *Sfg*I (subrayada), regeneran el codón de inicio de la traducción (verde) en sus dos posibles orientaciones en la ligación, en marco de lectura con el codón GGT (marcado por encima con un arco), que es el primer codón de la secuencia de maMYB⁹¹⁻³⁰⁹.

Nombre	Secuencia	Hibridación	Orientación
ATGSfglMybA90_Fow	5'-ATTCTGGT <u>GCGATCGCG</u> TTTCTGCAAT-3'		
ATGSfglMybA90_Rev	5'-ATTGCAGAAAC <u>GCGATCGC</u> ACCAGAAAT-3'		
MybΔ90F_KpnI	5'-GGTACCC↓ <u>GGGTCAGATCTTGGAGCCAG</u> -3'	maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹)	Directo



3.3.8 Modificación del plásmido pB110Red-2844 como control del promotor inducible basado en el receptor de ecdisona

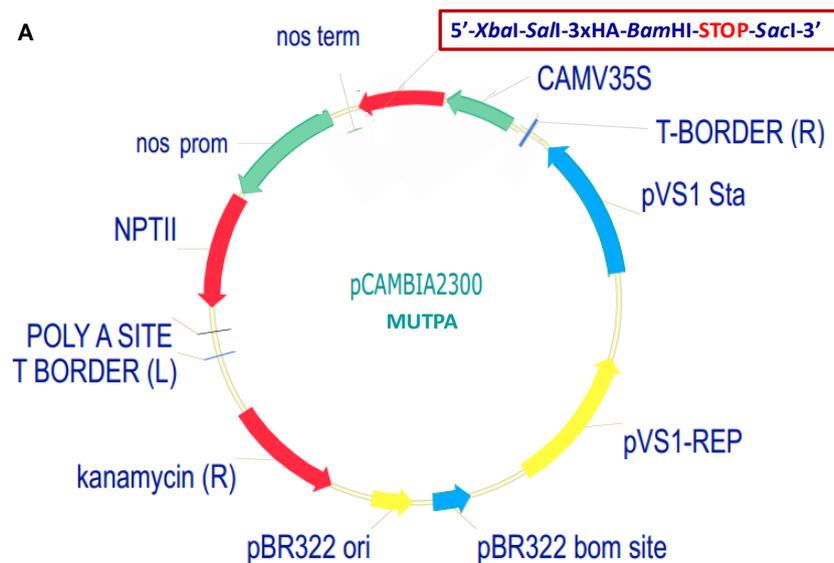
Para generar plantas transgénicas control de las plantas de silenciamiento y sobreexpresión inducible mediante metoxifenocida, se procedió a eliminar el marco de lectura abierto bajo el promotor mínimo 5X-Gal-Min35S-Pro del plásmido pB110Red-2844, que corresponde al fragmento de DNA entre los sitios de recombinación attR1 y attR2, y que contiene los genes *ccdB* y de resistencia a cloranfenicol (Figura 67). De esta forma, el factor de transcripción híbrido se sigue expresando de forma constitutiva y, en presencia del inductor metoxifenocida, dimeriza y se une al promotor mínimo, que no regularía la transcripción de ningún gen.

Como no se encontraron dianas de restricción únicas en la región de DNA comprendida entre los sitios attRs, se optó por aprovechar el propio sistema de recombinación homóloga para quitar dicha región de DNA. De acuerdo con esta estrategia, en primer lugar se eliminó el gen *ccdB* que hay entre los sitios de recombinación attL1 y attL2 del plásmido pENTR3C (Figura 60) por digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Posteriormente, tras ligar los extremos del nuevo plásmido pENTR3C obtenido, se sometió

a recombinación homóloga con el plásmido pB110Red-2844. Según este proceso, la región de DNA comprendida entre los sitios de recombinación attR1 y attR2 del plásmido pB110Red-2844 pasaron al plásmido pENTR3C, y la región de DNA comprendida entre los sitios de restricción attL1 y attL2 del plásmido pENTR3C pasaron al plásmido pB110Red-2844. De esta forma, se consiguió generar el vector vacío pB110-Red-Ø con el que se generaron plantas transgénicas de Arabidopsis, que se usaron como control en los análisis de las líneas transgénicas de silenciamiento y sobreexpresión inducibles del gen *maMYB* de Arabidopsis.

3.3.9 Construcciones para la expresión constitutiva de una proteína en planta

Con el fin de generar líneas transgénicas de Arabidopsis de sobreexpresión constitutiva de las proteínas *maMYB* y *maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹, se empleó el plásmido pCAMBIA2300-MUTPA (Figura 69A; Paola Andrade, tesis doctoral 2014). Dicho plásmido permite expresar, bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S, proteínas fusionadas en el extremo C-terminal al triple epítopo HA. Para ello, los fragmentos de cDNA que codifica cada proteína se amplificaron por PCR empleando los *primers* indicados en la Figura 69B y se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy. Posteriormente, se transfirieron al plásmido pCAMBIA2300-MUTPA a través de las dianas de restricción *Xba*I y *Sal*I, dando lugar a las construcciones pC2300-MUTPA-*maMYB* y pC2300-MUTPA-*maMYB*⁹¹⁻³⁰⁹.



B

Nombre	Secuencia	T (°C)	Hibridación	Orientación
MybF_XbaI	5'– <u>TCTAGA</u> ATGGATTTTTTCGACGAAGAC–3'	54	maMYB	Directo
MybΔ90Fmet_XbaI	5'– <u>TCTAGA</u> ATGGGTCAGATCTTGGAGCCAG–3'	54	maMYB (maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹)	Directo
MybnoR_SalI	5'– <u>GTCGAC</u> ATTAGCTGGAGTTTTTCGAGCTC–3'	54	maMYB / maMYB ⁹¹⁻³⁰⁹	Reverso

Figura 69. Clonaje de las construcciones maMYB y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ en el plásmido pCAMBIA2300-MUTPA. A) Esquema del plásmido pCAMBIA2300-MUTPA (Paola, tesis doctoral, 2014). Bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S se encuentra el triple epitopo HA integrado en el sitio de clonaje múltiple, que acaba con un codón de parada, lo que permite expresar de forma constitutiva proteínas fusionadas en el extremo C-terminal a dicho epitopo. El plásmido confiere resistencia a kanamicina en bacteria y Arabidopsis (gen *nptII*). **B)** *Primers* empleados para generar las construcciones de expresión constitutiva de maMYB y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹. Las características de las secuencias de los *primers* se indican de la misma forma que en la Tabla 8.

Por otra parte, las construcciones realizadas de maMYB y la de AtArv1 (pC2300-MUTPA-AtArv1), esta última construcción generada por (Keim, 2012), se emplearon en los experimentos de coimmunoprecipitación en Nicotiana.

4. Técnicas de clonaje: manipulación de DNA y bacterias

4.1 PCR de alta fidelidad

Para el clonaje de las distintas construcciones, el fragmento de DNA se amplificó mediante PCR de alta fidelidad a partir de diversos moldes, normalmente de otro plásmido portador de una determinada construcción o de cDNA del organismo necesario. En la PCR de alta fidelidad se emplearon polimerasas termoestables con una tasa de error muy baja, como son las DNA polimerasas *Platinum Pfx* (Invitrogen), *Pfu turbo* (Agilent Technologies) y *Expand High Fidelity* (Roche).

El diseño de los *primers* específicos para cada gen se realizó de forma manual teniendo en cuenta la longitud (mínima de 18 nucleótidos), contenido de GC superior al 40%, extremos 3' ricos en GC y temperatura de fusión (T_m) similar en cada pareja de *primers*. Los *primers* utilizados fueron sintetizados por Sigma, cuya página web permitía previamente analizar la T_m de los *primers* y si formaban dímeros o estructuras secundarias no deseadas. Cuando fue necesario que los fragmentos amplificados llevaran sitios de

restricción u otro tipo de secuencias, se añadían a los extremos 5' de los correspondientes *primers*.

A continuación se detallan la composición de la reacción y las etapas en el termociclador utilizadas para este tipo de amplificación con las diferentes polimerasas de alta fidelidad empleadas a lo largo de esta tesis, para las que siguieron las instrucciones de cada fabricante.

DNA	100 ng aprox.	94 - 95°C	2 min	} 25 - 30 ciclos
Tampón 10X (con Mg)	5 µL (1x)	94 - 95°C	15 - 30 s	
DNA polimerasa	1 µL (2.5 unidades)	A°C	30 s	
dNTPs (10 mM)	1 - 2 µL (0.2 - 0.4 mM)	68 - 72°C	B	
<i>primers</i> (10 µM)	1.5 µL (0.3 µM) de cada <i>primer</i>	68 - 72°C	5 - 10 min	
H ₂ O milliQ	hasta volumen final de 50 µL	4°C	infinito	

A = temperatura óptima de hibridación de los *primers*, calculada como 5°C por debajo de la menor T_m de la pareja de *primers*. La T_m era facilitada en el página web de Sigma o se calculaba según la fórmula $[4*(G+C)+2*(A+T)]$.

B = tiempo de extensión, depende de la longitud del fragmento a amplificar (aproximadamente 1 min por cada kb de DNA).

4.2 Sistema de poliadenilación y ligación en pGEM-T Easy.

En la estrategia de clonaje en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) debe añadirse una adenina a cada extremo 3' del producto amplificado por PCR con polimerasas de alta fidelidad. Para ello, el DNA purificado de un gel de agarosa se poliadeniló en un termociclador durante 25 min a 70°C [200 ng de DNA, 1 µL de tampón 10x, 0.75 µL de Taq polimerasa (Biotools), 0.4 µL de dATP *stock* (10 mM), hasta un volumen final de 10 µL con H₂O mQ).

En la ligación en el plásmido pGEM-T Easy, que se encuentra abierto en un punto concreto con una timina colgando en cada extremo 3', se usó la relación estequiométrica plásmido/inserto de 1:3.

$$\text{cantidad inserto (ng)} = \frac{\text{cantidad plásmido (50 ng)} * \text{tamaño inserto (kb)}}{\text{tamaño plásmido (3000 kb)}} * 3$$

Siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial, las reacciones de ligación se realizaron normalmente en un volumen final de 10 – 20 µL conteniendo 50 ng de plásmido pGEM-T Easy y la cantidad recomendada de inserto (1 µL pGEM-T Easy, X

ng del fragmento poliadenilado, 5-10 μL de tampón ligación 2x, 1 μL de ligasa, completar con H_2O mQ). Las reacciones se mantuvieron durante 16h (*overnight*) a 4°C . Los productos de las reacciones de ligación se emplearon directamente para la transformación bacteriana.

4.3 Sistema de restricción, desfosforilación y ligación

La estrategia de este sistema de clonaje consiste en introducir en un plásmido un gen amplificado por PCR al cual se le habían añadido a través de los *primers* unas dianas de restricción concretas en los extremos 5' y 3'. Para ello, se emplean las mismas dianas de restricción en el inserto como en el nuevo plásmido donde se va a clonar. Esta estrategia se utilizó para pasar las construcciones del plásmido pGEM-T Easy al plásmido final y para introducir las construcciones en el plásmido pENTR3C. En el primer caso, la construcción ya se encontraba en un plásmido, que le da soporte físico a la enzima para la digestión. En el caso del pENTR3C, la digestión se llevó a cabo directamente sobre el producto de amplificación. Por ello, los *primers* empleados poseen una cola en sus extremos que queda a cada lado del producto de amplificación y le da soporte a la enzima para la digestión. Las reacciones se llevaron a cabo con 3 unidades de enzima por μg de DNA en un volumen final de 50 μL empleando H_2O mQ y con el tampón adecuado a una concentración final 1x. En el caso de DNA plasmídico se emplearon 2.5 μg , mientras que del producto de PCR se empleó el máximo volumen posible.

En el caso de que se digiriera con una sola enzima de restricción o con dos enzimas de restricción que generasen extremos romos o extremos cohesivos compatibles entre sí, era necesario desfosforilar los extremos 5' del plásmido para evitar que se pudiera recircularizar. La desfosforilación se aplicó sobre el mismo volumen de la digestión del plásmido [a 2.5 μg del plásmido digerido en un volumen de 50 μL , se añadieron 7 μL de tampón 10x, y 5 μL de fosfatasa alcalina AP de Roche (2 U/ μg de DNA)], y se llevó hasta un volumen final de 70 μL con H_2O mQ. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1h. Posteriormente, la fosfatasa se inactivó añadiendo 3.5 μL de 200 mM EGTA (1/20 del volumen final de la desfosforilación) y calentando la solución a 65°C durante 10 min.

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa del inserto y plásmido digeridos. Sobre el DNA purificado de las bandas recortadas se realizó la ligación con T4 DNA ligasa (Roche) generando un plásmido cerrado con el inserto incorporado. La relación estequiométrica plásmido/inserto empleada en la ligación fue de 1:3.

$$\text{cantidad inserto (ng)} = \frac{\text{cantidad plásmido (100 ng)} * \text{tamaño inserto (kb)}}{(\text{tamaño plásmido (kb)} + \text{tamaño inserto (kb)})} * 3$$

Las reacciones de ligación [100 ng de plásmido, X ng de inserto, 2-3 µL tampón de ligación 10x, 2 µL T4 DNA ligasa (2U), en un volumen final de 20-30 µL con H₂O mQ] se mantuvieron durante 16h (*overnight*) a 4°C. Los productos de las reacciones de ligación se emplearon directamente para la transformación bacteriana.

4.4 Sistema de recombinación homóloga *Gateway*

El sistema de clonaje con la tecnología *Gateway* se basa en la recombinación homóloga entre el plásmido donador (pENTR3C) y el plásmido de destino a través de sus secuencias de recombinación attL y attR, respectivamente (Figura 70). Los plásmidos con la tecnología *Gateway* contienen originalmente entre los sitios de recombinación el gen *ccdB*, que resulta tóxico para la célula.

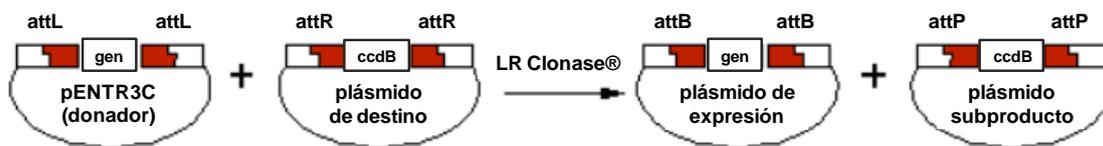


Figura 70. Esquema de la reacción de recombinación LR del sistema de clonaje *Gateway*. La reacción de recombinación llevada a cabo por la enzima LR Clonase II (Invitrogen) entre las secuencias de recombinación attL del plásmido donador y attR del plásmido de destino, da lugar a las secuencias attB en el plásmido de expresión y attP en el plásmido subproducto. Figura adaptada de www.invitrogen.com.

De esta forma, a través de la reacción de recombinación llevada a cabo por la enzima LR Clonase™ II (Invitrogen), el gen subclonado previamente en el plásmido pENTR3C se introduce en el plásmido de destino, y el gen *ccdB* se introduce en el plásmido pENTR3C. La reacción de recombinación (200 ng de la construcción en pENTR3C, 200 ng del plásmido de destino, 2 µL de LR Clonasa II, completado a 10 µL con tampón TE pH8) se incubó a temperatura ambiente durante 16h (*overnight*). Posteriormente, la clonasa se degradó mediante tratamiento con proteinasa K (1 µL) incubando a 37°C durante 30 min. El producto final de la reacción de recombinación se empleó directamente en la transformación de la cepa DH5α por electroporación o de la cepa One Shot® OmniMAX™ (Invitrogen) por choque térmico. Ambas cepas son sensibles

al gen *ccdB*, por lo que solo crecerán en medio selectivo aquellas bacterias que hayan incorporado en la transformación el plásmido de destino que haya sufrido la recombinación, y por tanto, no contenga el gen *ccdB*.

4.5 Hibridación de oligonucleótidos

Para hibridar los dos oligonucleótidos empleados en el apartado 3.3.7, se mezcló la misma cantidad de los oligos 5' y 3' y se calentó durante 10 min a 65°C en un bloque térmico. Tras apagar el bloque térmico, se dejó enfriar la mezcla de oligonucleótidos en el mismo bloque durante 10–20 min, y finalmente se dejó fuera del bloque a temperatura ambiente durante 30 min. La ligación del dímero con el plásmido pB110-Red-maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ se llevó a cabo como se indica en el apartado 4.3.

4.6 Obtención de células competentes de *E. coli*

4.6.1 Método de cloruro de calcio

Para obtener células de *E. coli* competentes para la transformación por choque térmico, se creció la cepa correspondiente *overnight* en una placa de medio LB para obtener colonias aisladas. Se inoculó una colonia en 3 mL de medio LB y se incubó *overnight* a 37°C y 250 rpm de agitación. A continuación, se inoculó con 1 mL del pre-cultivo anterior por cada 100 mL de medio LB y se incubó a 37°C y 250 rpm de agitación hasta obtener una DO₅₉₀ de 0.4 (2h aproximadamente). En este punto se alicuotó el cultivo en Falcons de 50 mL, se colocaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron 7 min a 3000 rpm a 4°C para recuperar las células. Se resuspendieron suavemente cada uno de los pellets en 10 mL de solución estéril de cloruro de calcio frío [10 mM Tris-HCl pH 7.0, 60 mM CaCl₂ y 15% glicerol (v/v)]. Seguidamente, se centrifugaron las células 5 min a 3000 rpm a 4°C, se resuspendieron suavemente cada uno de los pellets de nuevo en 10 mL de la misma solución de cloruro de calcio fría y se mantuvieron las células en hielo durante 30 min. Las células se centrifugaron de nuevo 5 min a 3000 rpm a 4°C, se resuspendieron suavemente cada uno de los pellets en 2 mL de solución de cloruro de calcio frío y se dejaron reposar las células en hielo durante 30 min. Finalmente, se centrifugaron de nuevo las células 5 min a 2500 rpm a 4°C, se resuspendieron suavemente

cada uno de los pellets en 2 mL de solución de cloruro de calcio frío, se alicuotaron en 100 μ L y se congelaron a -80°C para su crioconservación.

4.6.2 Método de desionización

En el caso de células de *E. coli* competentes para la transformación por electroporación, se creció la cepa bacteriana del mismo modo que en el apartado anterior hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5 (2-3 h aproximadamente). Se alicuotó el cultivo en Falcons de 50 mL, se colocaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron 20 min a 3500 rpm a 4°C para recuperar las células. Cada pellet de células se resuspendió suavemente en 50 mL de agua milliQ fría y estéril, y se centrifugó durante 20 min a 3500 rpm a 4°C . Se repitió el paso anterior de resuspensión y centrifugación. A continuación, se resuspendieron suavemente cada uno de los pellets en 10 mL de glicerol al 10% (v/v) frío y estéril, y se centrifugaron las células 10 min a 3500 rpm a 4°C . Finalmente, se resuspendieron suavemente cada uno de los pellets en 100 μ L de glicerol al 10% (v/v) frío y estéril, y se hicieron alícuotas de 20 μ L. Se colocó cada alícuota inmediatamente en nieve carbónica y se mantuvieron a -80°C para su crioconservación.

4.7 Transformación de *E. coli*

4.7.1 Choque térmico

En condiciones estériles se añadió alrededor de 100 ng de DNA (0.5 μ L de plásmidos cerrados recuperados por mini-prep y 5-10 μ L de una ligación) en una alícuota de células competentes obtenidas mediante el método del cloruro de calcio del apartado anterior y descongeladas de -80°C momentos antes. Se dejaron reposar en hielo durante 5-30 min. A continuación, se colocaron en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos. Se colocaron en hielo durante 2 min, se añadieron 500 μ L de medio LB estéril y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 1h. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron 1000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μ L de medio LB. De éstos, se sembraron 25 y 175 μ L en dos placas de LB, suplementado con el antibiótico o reactivos necesarios para seleccionar las células que incorporaron el plásmido con la construcción respecto de las que no lo habían hecho, y se incubaron las placas durante 1 día a 37°C .

4.7.2 Electroporación

En condiciones estériles se añadió alrededor de 100 ng de DNA (hasta un volumen máximo de 5 μ L) en una alícuota de células competentes obtenidas mediante el método de desionización y descongeladas en hielo. La mezcla de células y DNA se transfirió al fondo de una cubeta de electroporación de 0.1 cm, previamente enfriada a 4°C y estéril (limpiada con etanol y tratada con luz ultravioleta durante 16h), y se dejaron reposar en hielo durante 1 min. A continuación, se secó la cubeta y se le aplicó mediante un electroporador un breve pulso eléctrico (2.5 kV/cm, 200 Ohms y 25 μ F durante 1 μ s). Se añadió 1 mL de medio LB estéril a la cubeta, se homogeneizó la mezcla y se transfirió la suspensión a un Eppendorf de 1.5 mL. Se incubó 1h a 37°C y 250 rpm de agitación y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μ L de medio LB. Finalmente, se sembraron 25 y 175 μ L de la suspensión en dos placas de LB, suplementado con los antibióticos necesarios para seleccionar las células que incorporan el plásmido con el inserto correspondiente a la construcción, y se incubaron las placas durante 1 día a 37°C.

4.8 Secuenciación de DNA

Tras obtener el DNA plasmídico de la construcción deseada, se realizó un primer análisis a través de digestión con una o dos enzimas de restricción, se seleccionó el DNA plasmídico que presentó el patrón esperado de fragmentos tras digerirse con las enzimas de restricción seleccionadas, y se comprobó que la secuencia era correcta mediante la secuenciación del fragmento de DNA plasmídico clonado empleando *primers* que hibridasen en las regiones del plásmido flanqueantes y/o internas a la construcción (Tabla 12). La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica de los SCT (Servicios Científico Técnicos) de la UB o en el Servicio de secuenciación del CRAG.

DNA	200 ng	96°C	3 min	
Tampón 5x	1.5 μ L (0.75x)	96°C	30 s	} 25 ciclos
mix BigDye Terminator v3.1 2.5x (Applied Biosystems)	2 μ L (0.5x)	50°C	15 s	
		60°C	4 min	
<i>primer</i> (10 μ M)	0.5 μ L (0.5 μ M)	4°C	infinito	
DMSO:H ₂ O milliQ (1:3)	1 μ L	Añadir 10 μ L de H ₂ O milliQ		
H ₂ O milliQ	hasta volumen final de 10 μ L			

Tabla 12. Primers empleados a lo largo de la tesis para secuenciar las distintas construcciones generadas. Se indica contra que gen o plásmido hibrida el *primer*.

Nombre	Secuencia	Hibridación	Orientación
M13	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	pGEM-T Easy	Directo
pGEMT R	5'-CAGCTATGACCATGATTACGC-3'	pGEM-T Easy	Reverso
pENTR3C_Fow	5'-CTACAAACTCTTCTGTTAGTTAG-3'	pENTR3C	Directo
pENTR3C_Rev	5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'	pENTR3C	Reverso
pBT3Ns(Cub)	5'-GCCGGTAAGCAGCTAGAAG-3'	doble híbrido	Directo
pBT3C-F	5'-GGCATGCATGTGCTCTGTATG-3'	doble híbrido	Directo
pBT3Cas(Cub)	5'-CTGGAGGGATCCCCCGAC-3'	doble híbrido	Reverso
pPR3Ns(Nub)	5'-GTCGAAAATTCAAGACAAGG-3'	doble híbrido	Directo
pPR3C-F	5'-GTTTCTCGTCATTGTTCTCG-3'	doble híbrido	Directo
pPR3Cas(Nub)	5'-CGGTTTTACCGTCAAAGTC-3'	doble híbrido	Reverso
pDSL-Nx Rev	5'-AAGCGTGACATAACTAATTAC-3'	doble híbrido	Reverso
pC1303GUS_Rev	5'-GTAATGAGTGACCGCATC-3'	Pcambia1303/4	Reverso
pMDC85_Fow	5'-GTCAGGCTCCCTTATACACAG-3'	pMDC83/85/43/45	Directo
pMDC85Tnos_Rev	5'-GATAATCATCGCAAGACCG-3'	pMDC83/85/43/45	Reverso
pMDC83GFP_Rev	5'-CGTATGTTGCATCACCTTC-3'	pMDC83/85	Reverso
p45GFPend_Fow	5'-CAACCATTACCTGTCCACAC-3'	pMDC43/45	Directo
pArv1int_Rev	5'-GACCAACTCCACAACAGATG-3'	AtArv1	Reverso
pMybint_Rev	5'-CTTAGACTGCGGAATCACC-3'	maMYB	Reverso
pCyp51int_Rev	5'-CAACTTCACCACTCTCTCC-3'	CYP51	Reverso
pCyp51int_Rev2	5'-CGGTTGTCTGTCTACCATC-3'	CYP51	Reverso
AGP18int_Rev	5'-GTGGAGACGACTCGCTAAC-3'	AtAGP18	Reverso
pB110Red_Fow	5'-GCACCTACTCAAACACATTG-3'	pB110Red-2844	Directo
pB110Red_Rev	5'-GAGCGAAACCCTATAAGAAC-3'	pB110Red-2844	Reverso

5. Técnica del doble híbrido para identificar proteínas que interaccionen con una proteína de membrana y/o su topología

La variante de la técnica del doble híbrido en levadura *split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid* (MbYTH) (Stagljar et al., 1998; Fetchko and Stagljar, 2004) permite identificar proteínas solubles o de membrana que interaccionan con proteínas de membrana. Esta técnica se basa en la complementación entre dos dominios separables de la ubiquitina, el dominio C-terminal Cub (aminoácidos 34 a 76) y el dominio N-terminal Nubl (aminoácidos 1 a 38), que interaccionan entre sí y reconstituyen de forma espontánea el heterodímero de ubiquitina. El dominio Nub se trata en concreto de una versión modificada, de forma que al cambiar el aminoácido de la posición 3 del dominio Nubl (Ile 3 → Gly 3), la

versión mutada resultante NubG pierde su afinidad por el dominio Cub impidiendo que la ubiquitina se reconstituya de forma espontánea (Figura 71).

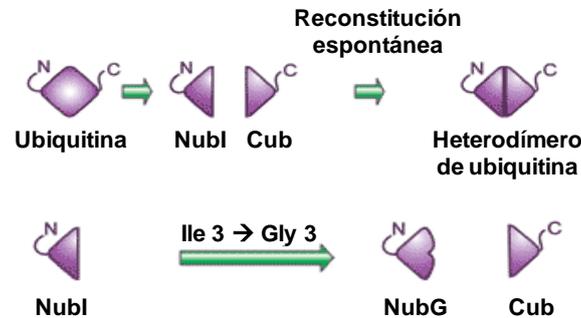
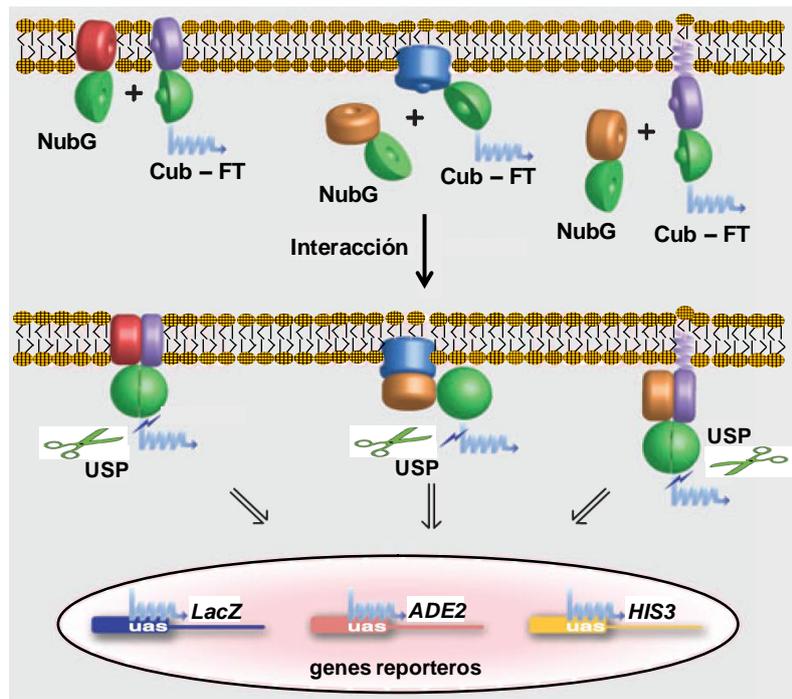


Figura 71. Complementación de los dos dominios Cub y Nub separables de la ubiquitina. Los dominios N- y C-terminal de la ubiquitina *wild type*, Nubl y Cub respectivamente, interaccionan y reconstituyen de forma espontánea el heterodímero de ubiquitina. La versión mutada del dominio N-terminal de la ubiquitina (Ile 3 → Gly 3) NubG, pierde afinidad por el dominio Cub impidiendo que la ubiquitina se reconstituya de forma espontánea. Figura adaptada de www.dualsystems.com.

Cuando dos proteínas objeto de estudio, una fusionada al dominio Cub (proteína cebo) y otra fusionada al dominio NubG (proteína presa), se expresan en una misma célula de la cepa de *S. cerevisiae* NMY51 (auxotrófica para histidina y adenina); si las dos proteínas interaccionan entre sí, entonces la proximidad de los dominios Cub y NubG permite que interaccionen y se reconstituya el heterodímero de ubiquitina. Las proteasas específicas de ubiquitina (USP, *ubiquitin specific proteases*) reconocen la ubiquitina reconstituida y liberan el factor de transcripción híbrido LexA-VP16 (FT), que está unido al dominio Cub. De este modo, FT se traslada al núcleo y activa la expresión de los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*, permitiendo que la levadura crezca en un medio de cultivo selectivo sin adenina e histidina y haciendo que las colonias adquieran una coloración azul tras realizar un ensayo de actividad β -galactosidasa (Figura 72).

Figura 72. Esquema representativo del empleo de la técnica *split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid* (MbYTH) para identificar proteínas que interaccionen con una proteína de membrana. Los dominios NubG y Cub corresponden a las mitades N- y C-terminal de la ubiquitina, respectivamente. FT representa el factor de transcripción híbrido LexA-VP16. *ADE2* e *HIS3* son genes reporteros que codifican proteínas involucradas en la síntesis de adenina e histidina, respectivamente. *lacZ* es un gen reportero que codifica la β -galactosidasa. Figura modificada de Lalonde et al., 2008.



5.1 Reactivos y medios necesarios para los experimentos de doble híbrido

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo y soluciones necesarios para los diferentes protocolos realizados en los ensayos de doble híbrido, que se guardaron a 4°C hasta su uso.

YPAD: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, ajustar a pH 6.5 con HCl y enrasar con agua mQ hasta 890 mL. Autoclavar 20 min a 120°C y 1 atm y guardar a 4°C. En el momento de usarlo, añadir 100 mL/L de glucosa al 20% (p/v) previamente autoclavada y 10 mL/L de sulfato de adenina (4 mg/mL) previamente filtrada (0.22 µm).

2x YPAD: 20 g/L de extracto de levadura, 40 g/L de peptona, ajustar a pH 6.5 con HCl y enrasar con agua mQ hasta 790 mL. Autoclavar 20 min a 120°C y 1 atm y guardar a 4°C. En el momento de usarlo, añadir 200 mL/L de glucosa al 20% (p/v) previamente autoclavada y 10 mL/L de sulfato de adenina (4 mg/mL) previamente filtrada (0.22 µm).

Medio mínimo SD: 1.72 g/L de YNB (*yeast nitrogen base*), 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ajustar el pH a 5.8 con NaOH y enrasar a 800 mL con agua mQ. Autoclavar 20 min a 120°C y 1 atm y guardar a 4°C. En el momento de usarlo, añadir 100 mL/L de glucosa al 20% (p/v) previamente autoclavada, y según el experimento, 100 mL/L de la mezcla *drop out* 10x (Tabla 13).

Tabla 13. Mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas para cada tipo de *drop out*.

Auxotrofías	Conc. en el <i>drop out</i> 10x (µg/mL)	Composición del <i>drop out</i> 10x para cada tipo de medio				Conc. final en el medio (µg/mL)
		SD/-Leu	SD/-Leu-Trp	SD/-Leu-Trp -His	SD/-Leu-Trp -His-Ade	
Uracilo	500	+	+	+	+	50
Adenina	400	+	+	+		40
Histidina	200	+	+			20
Triptófano	400	+				40

Los medios líquidos se prepararon previamente sin los reactivos nutritivos (glucosa, adenina y *drop out*) para que la glucosa no caramelice al autoclavarse en presencia del medio y para evitar contaminaciones durante el almacenamiento de los medios. Para preparar medios sólidos, tras ajustar el pH se añadieron 20 g de agar bacteriológico por litro de medio, y después de autoclararlo y atemperarse a 50°C, se añadieron los reactivos nutritivos y la cantidad necesaria de 3-AT 1M previamente filtrados (0.22 µm), según el experimento. Además, de esta forma se evita que las altas temperaturas degraden dichos compuestos. Las placas con medios sólidos son estables durante al menos un mes, momento a partir del cual puede empezar a degradarse el compuesto 3-AT.

Solución de PEG 50% (p/v): Para preparar la solución stock 50% PEG, que resulta problemática, se añadieron 50 g de PEG en 80 mL de H₂O milliQ, se agitó calentando suavemente durante varias horas y se autoclavó.

A-PEG/LiOAc master mix (una transformación): 240 µL de 50% PEG, 35 µL de 1M LiOAc previamente autoclavado y 25 µL de DNA de esperma de salmón (Roche).

B-PEG/LiOAc master mix (una transformación): 250 µL de 1M LiOAc y 250 µL de TE pH 7.5 10x previamente autoclavados y 2 mL de 50% PEG.

LiOAc/TE master mix (1mL): 110 µL de 1M LiOAc, 110 µL de TE pH 7.5 10x y 780 µL de agua mQ previamente autoclavados.

NaCl 0.9% (p/v): 0.9 g de NaCl en 100 mL de agua mQ y autoclavar.

Solución de lisis (dualsystems biotech): 995 µL de *One-Step Lysis and Assay Reagent* y 5 µL *Dye stock solution* (para 10 reacciones).

Las soluciones A-PEG/LiOAc, B-PEG/LiOAc y LiOAc/TE se prepararon extemporáneamente, es decir, en el momento en que se van a transformar las levaduras. Según cada protocolo de transformación, previo a la preparación de la solución

PEG/LiOAc, se descongeló una alícuota de DNA de esperma de salmón (10 mg/mL, Roche) o de DNA de cadena sencilla (2 mg/mL, dualsystems biotech), se calentó durante 5 min a 95°C, se mantuvo en hielo durante 2 min y se repitió el proceso de calentamiento/enfriamiento una vez más.

5.2 Transformación del plásmido cebo en la levadura NMY51

A continuación se detalla el protocolo de transformación de la cepa de levadura NMY51 con el plásmido para expresar la proteína cebo de interés (pBT3STE-AtArv1 / AtArv1Δ35 / AtArv1Δ68 / AtArv2, pBT3C-ScErg11 / CYP51 / Erg11, pBT3N-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11).

En primer lugar, se estrió la cepa de levadura NMY51 en una placa con medio YPAD y se dejó crecer durante 1 día a 30°C. Posteriormente, se inocularon 3 mL de YPAD con una colonia aislada de NMY51 cogida de una placa fresca (menos de dos semanas de antigüedad) y se creció durante 8h a 30°C y 250 rpm de agitación. Finalmente, se inocularon 30 mL de YPAD con 300 µL del cultivo anterior y se dejó crecer *overnight* a 30°C y 250 rpm. Al día siguiente se determinó OD₅₄₆ del cultivo (debería estar entre 0.6-0.8). Si era superior a 1.0, se diluyó el cultivo hasta obtener una OD₅₄₆ de 0.2 y se volvió a incubar a 30°C hasta alcanzar de nuevo una OD de 0.6 (4-5 h aproximadamente). Se centrifugó el cultivo durante 5 min a 2500 g y se resuspendió el pellet en 2.5 mL de agua milliQ estéril. A 100 µL de las levaduras resuspendidas anteriormente en agua se añadieron 300 µL del A-PEG/LiOAc master mix y 1.5 µg del DNA plasmídico que se quiere transformar. Se mezcló en vortex durante 1 min y se incubó en un baño de agua a 42°C durante 45 min. Se centrifugó durante 5 min a 2500 g, se resuspendió el pellet en 100 µL de 0.9% NaCl estéril y se sembraron en placa con medio mínimo SD/-Leu. Se selló la placa con parafilm y se incubó a 30°C durante 2 días.

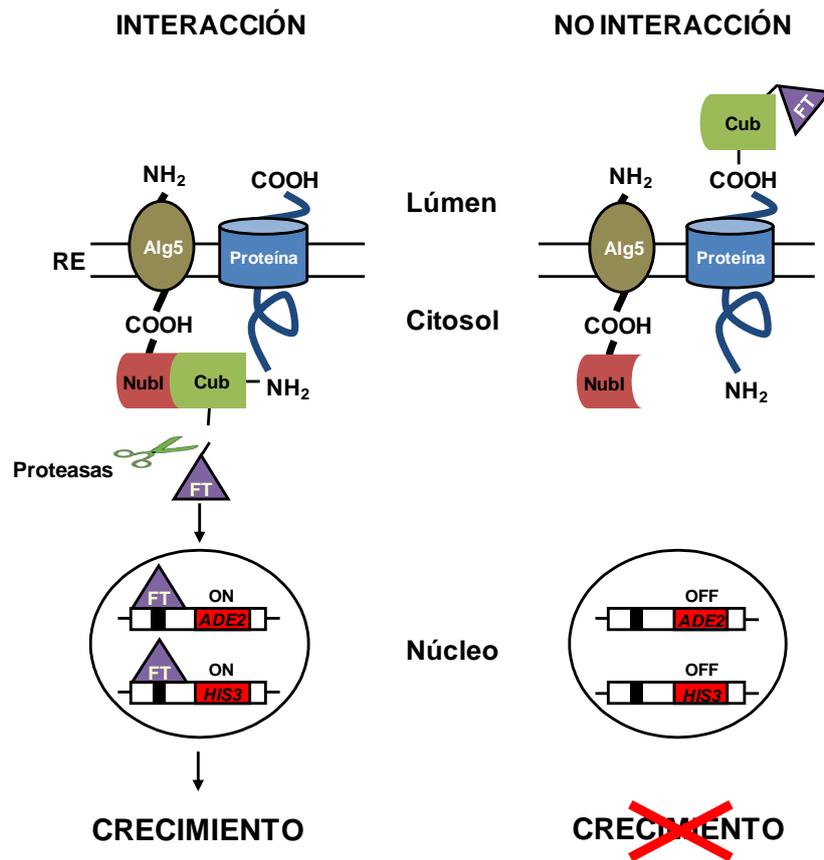
Una vez crecidas las colonias de levaduras transformadas, se inoculó 3 mL de medio mínimo SD/-Leu con una colonia aislada y se creció durante 1 día a 30°C y 250 rpm. Finalmente, 1 mL del cultivo crecido se mezcló con 300 µL de glicerol estéril en un microtubo, se homogeneizó bien y se guardó congelado a -80°C para su crioconservación.

5.3 Análisis de la topología de las proteínas de estudio y puesta a punto de las condiciones experimentales

Como condición necesaria para que esta técnica se pueda emplear, los dominios Cub-FT y NubG fusionados al extremo de la proteína cebo y presa respectivamente, han de quedar orientados hacia el citosol. De esta forma, al interaccionar las dos proteínas objeto de estudio y reconstituirse la ubiquitina, FT se libera por acción de las USP en el citosol, donde puede migrar al núcleo para activar los genes reporteros. Por tanto, antes de realizar cualquier experimento de doble híbrido, es necesario comprobar la topología de las proteínas a estudiar con el fin de definir la orientación de sus extremos.

Para ello, la cepa de levadura NMY51 transformada con el plásmido que expresa la proteína cebo de estudio (pBT3STE-AtArv1, pBT3C-ScErg11 / CYP51 / Erg11, pBT3N-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11), se transformó de nuevo (protocolo apartado 5.4) con el plásmido presa pAl-Alg5-Nubl, que permite expresar la proteína de referencia Alg5 fusionada por su extremo C-terminal a Nubl. Está establecido que el dominio Nubl de la proteína Alg5-Nubl queda encarado hacia el citosol, donde puede interaccionar con el dominio Cub y reconstituir espontáneamente el heterodímero de ubiquitina (Figura 71). Cuando una misma célula de la cepa NMY51 expresa Alg5-Nubl y la proteína cuya topología se quiere estudiar fusionada al dominio Cub-FT, si el extremo al que se ha fusionado Cub-FT también es citosólico, las USP reconocen la ubiquitina reconstituida y liberan FT. De este modo, FT se traslada al núcleo y activa la expresión de los genes reporteros de crecimiento auxotrófico *ADE2* e *HIS3*, permitiendo que la levadura crezca en un medio de cultivo selectivo sin adenina e histidina. Por el contrario, si el extremo de la proteína estudiada se encuentra orientado hacia el lumen del RE, el dominio Cub no interacciona con el dominio Nubl citosólico de Alg5 y no se activan los genes reporteros, lo que impide que la levadura crezca en el medio selectivo (Figura 73).

Figura 73. Esquema representativo del empleo de la técnica *split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid (MbYTH)* para determinar la orientación de una proteína en la membrana del RE. Alg5 es una proteína anclada al RE a través de una única secuencia transmembrana. Los dominios Nubl y Cub corresponden a las mitades N- y C-terminal de la ubiquitina *wild type*, respectivamente. FT representa el factor de transcripción híbrido LexA-VP16. *ADE2* e *HIS3* son genes reporteros que codifican proteínas involucradas en la síntesis de adenina e histidina, respectivamente.



También es necesario tener en cuenta que, debido a la acción de otras proteasas o del proteosoma, existe la posibilidad de que FT se libere inespecíficamente del dominio Cub unido a la proteína cebo. Esto provocaría la activación de los genes reporteros sin haber interacción entre las proteínas cebo y presa, dando lugar, por tanto, a un falso positivo. El compuesto 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) es un inhibidor competitivo del producto del gen *HIS3* que puede emplearse para minimizar los falsos positivos si se añade a la concentración adecuada en el medio de crecimiento de la levadura. Para determinar la concentración óptima de 3-AT necesaria, la cepa de levadura transformada con el plásmido que expresa la proteína cebo de estudio, se transformó de nuevo (protocolo apartado 5.4) con el plásmido presa pPR3N-NubG (control negativo), que permite expresar el dominio NubG libre. Como NubG no interacciona con Cub, impide que la ubiquitina se reconstituya, que FT se libere del dominio Cub y que los genes reporteros se activen. El plásmido pPR3N-NubG se empleó para fijar la concentración mínima de 3-AT necesaria para reducir al máximo los posibles falsos positivos, sin enmascarar significativamente el resultado real obtenido con el plásmido pAI-Alg5-Nub1 (control positivo).

Las levaduras que contenían cada una de las parejas de plásmidos se sembraron en medio mínimo SD/-Leu-Trp como se indica en el apartado 5.4 y en una batería de

placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp-His suplementado con diferentes concentraciones de 3-AT (0, 1, 2, 4 y 8 mM), lo que permitía analizar la concentración óptima necesaria para cada proteína cebo.

5.4 Transformación del plásmido presa para analizar la interacción de las proteínas cebo y presa

Una vez se había obtenido la cepa de levadura transformada con el plásmido que expresa la proteína cebo y se había fijado la concentración óptima de 3-AT, se llevó a cabo la transformación de dicha cepa de levadura con el plásmido que expresa la proteína presa (pPR3C-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11 / maMYB, pPR3N-AtArv1 / ScArv1 / CYP51 / Erg11 / maMYB / maMYB¹⁻⁹⁰ / maMYB⁹¹⁻³⁰⁹) o con los plásmidos control para expresar Alg5-Nubl o NubG, con el fin de analizar la interacción entre las proteínas cebo y presa.

En primer lugar, se estirió la cepa de levadura NMY51 transformada previamente con el plásmido cebo en una placa con medio SD/-Leu y se creció durante 2 días a 30°C. Posteriormente, se inocularon 3 mL de medio mínimo SD/-Leu con una colonia aislada de la cepa anterior cogida de una placa fresca (menos de dos semanas de antigüedad) y se creció durante 8h a 30°C y 250 rpm de agitación. A continuación, se inocularon 30 mL de medio mínimo SD/-Leu con 300 µL del cultivo anterior y se crecieron *overnight* a 30°C y 250 rpm. Al día siguiente se determinó la OD₅₄₆ del cultivo, se calculó el volumen de células necesario para obtener una OD de 0.15 en un volumen de 50 mL [OD medida * Volumen del cultivo a coger = OD final (0.15) * Volumen final (50 mL)], que se centrifugó durante 5 min a 2500 g y el pellet se resuspendió en 50 mL de 2xYPAD. A continuación, las células se incubaron a 30°C y 250 rpm hasta OD₅₄₆ de 0.6-0.7 (5h aproximadamente). Una vez alcanzada la densidad de células adecuada, se centrifugó el cultivo durante 5 min a 2500 g y se resuspendió el pellet con un agitador vortex en 30 mL de agua milliQ estéril. Se centrifugó durante 5 min a 2500 g y se resuspendió el pellet en 1 mL de LiOAc/TE master mix. Se centrifugó de nuevo durante 5 min a 2500 g y se resuspendió el pellet en 600 µL de LiOAc/TE master mix. Se añadió a la resuspensión de células 7 µg de DNA plasmídico que se quiere transformar (proveniente de una midiprep), 20 µL de DNA de esperma de salmón (Roche) preparado previamente mediante el proceso de calentamiento/enfriamiento explicado en el apartado 5.1, y 2.5 mL de B-PEG/LiOAc master mix. Se mezcló con un agitador vortex durante 1 min. A continuación, la mezcla se incubó en un baño de agua a 30°C durante 45 min mezclando con agitador vortex cada 15 min. Transcurrido el tiempo, se añadieron 160 µL de DMSO, se mezcló con agitador vortex y se

incubó en un baño de agua a 42°C durante 20 min. Seguidamente, se centrifugó durante 5 min a 2500 g, se resuspendió el pellet en 3 mL de 2xYPAD y se incubó durante 90 min a 30°C y 250 rpm. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 2500 g y se resuspendió el pellet en 1.2 mL de 0.9% NaCl estéril. Finalmente, se sembraron 100 µL de una dilución 1:1000 de la suspensión de levaduras transformadas en dos placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp y 180 µL de la suspensión de levaduras en dos placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp-His y otras dos con SD/-Leu-Trp-His-Ade, suplementadas ambas con la concentración necesaria de 3-AT, según el experimento. Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 30°C durante 2 días (SD/-Leu-Trp), 4 días (SD/-Leu-Trp-His) y 5 días (SD/-Leu-Trp-His-Ade).

Debido al gen reportero *ADE2*, la cepa de levadura NMY51 puede presentar diferentes tonos de color, que van desde el rojo oscuro al blanco. Cuando no se produce interacción entre la proteína cebo y presa, el gen reportero *ADE2* no se transcribe, la ruta de síntesis de adenina queda bloqueada y se acumula un intermediario metabólico de color rojo. Si se produce interacción entre la proteína cebo y presa, el gen reportero *ADE2* se activa, la ruta de síntesis de la adenina se desbloquea y las colonias crecen de color blanco. De esta forma, cuando se analiza la interacción entre las proteínas cebo y presa a la concentración óptima de 3-AT obtenida en las placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp-His, se puede comprobar si las colonias que crecen en medio mínimo SD/-Leu-Trp-His-Ade son blancas y, por lo tanto, se confirma que son verdaderos positivos.

La eficacia de la transformación (cfu / µg DNA) se calculó a partir de las placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp, donde la levadura se sembró a una dilución 1:1000, mediante la fórmula

$$\frac{\text{cfu}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{N}^{\circ}\text{colonias} * \text{Volumen final suspensión células (1200 } \mu\text{L)} * \text{Dilución (1000)}}{\text{Volumen siembra en placa (100 } \mu\text{L)} * \mu\text{g DNA plasmídico (7 } \mu\text{g)}}$$

Para obtener resultados significativos era necesario que la eficacia de la transformación fuera superior al umbral requerido de 2×10^4 .

5.5 Transformación del banco de cDNA NubG-X de Arabidopsis y selección de interactores de AtArv1

Una vez se había obtenido la cepa de levadura transformada con el plásmido que expresa la proteína cebo AtArv1-Cub-FT (pBT3STE-AtArv1) y se había fijado la concentración óptima de 3-AT en 4 mM, se llevó a cabo la transformación de dicha cepa de

levadura con el banco de cDNA de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* NubG-x cDNA library, dualsystems biotech), con el objetivo de encontrar proteínas que interaccionen con AtArv1. A continuación se detalla el protocolo de transformación llevado a cabo en este caso.

En primer lugar, se estirió la cepa de levadura NMY51 transformada previamente con el plásmido pBT3STE-AtArv1 en una placa con medio SD/-Leu y se creció durante 2 días a 30°C. Posteriormente, se inocularon 10 mL de medio mínimo SD/-Leu con una colonia de la cepa anterior cogida de una placa fresca (menos de dos semanas de antigüedad) y se creció durante 8h a 30°C y 250 rpm de agitación. Finalmente, se inocularon 100 mL de medio mínimo SD/-Leu con 1 mL del cultivo anterior y se creció *overnight* a 30°C y 250 rpm. Al día siguiente, se midió la OD₅₄₆ del cultivo y se calculó el volumen de células necesario para obtener una OD de 0.15 en un volumen de 200 mL [OD medida * Volumen del cultivo a coger = OD final (0.15) * Volumen final (200 mL)], que se centrifugó durante 5 min a 2500 g y el pellet se resuspendió en 200 mL de 2xYPAD. A continuación, las células se incubaron a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD₅₄₆ de 0.6-0.7 (5h aproximadamente). En este punto se dividió el cultivo en cuatro tubos Falcon de 50 mL, se centrifugó durante 5 min a 2500 g y se resuspendió cada pellet con un agitador vortex en 30 mL de agua milliQ estéril. Se centrifugó durante 5 min a 2500 g y se resuspendió cada pellet en 1 mL de LiOAc/TE master mix. Se centrifugó de nuevo durante 5 min a 2500 g y se resuspendió cada pellet en 600 µL de LiOAc/TE master mix. Se añadió a cada resuspensión de células 7 µg de DNA del banco de cDNA, 100 µL de DNA de cadena sencilla (dualsystems biotech) preparado previamente mediante el proceso de calentamiento/enfriamiento explicado en el apartado 5.1, y 2.5 mL de B-PEG/LiOAc master mix, y se mezcló en un vortex durante 1 min. A continuación, se incubó en un baño de agua a 30°C durante 45 min mezclando con agitador vortex cada 15 min. Transcurrido el tiempo, se añadieron 160 µL de DMSO a cada tubo y se mezcló con agitador vortex. Se incubaron en un baño de agua a 42°C durante 20 min, se centrifugaron durante 5 min a 2500 g y se resuspendió cada pellet en 3 mL de 2xYPAD. Se incubaron durante 90 min a 30°C y 250 rpm, se centrifugaron durante 5 min a 2500 g y se resuspendió cada pellet en 1.2 mL de 0.9% NaCl estéril. Se unieron los contenidos de los cuatro tubos (volumen final 4.8 mL). Se sembraron 100 µL de una dilución 1:1000 de la suspensión de levaduras en dos placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp y el resto de la suspensión de levaduras en alícuotas de 185 µL en cada placa con medio mínimo SD/-Leu-Trp-His-Ade suplementadas con la concentración necesaria de 3-AT (4 mM). Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 30°C durante 2 días (SD/-Leu-Trp) y 5 días (SD/-Leu-Trp-His-Ade).

La eficacia de la transformación (cfu / μg DNA) se calculó a partir de las placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp, donde la levadura se sembró a una dilución 1:1000, mediante la fórmula

$$\frac{\text{cfu}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{N}^{\circ}\text{colonias} * \text{Volumen final suspensión células (4800 } \mu\text{L)} * \text{Dilución (1000)}}{\text{Volumen siembra en placa (100 } \mu\text{L)} * \mu\text{g DNA plasmídico (28 } \mu\text{g)}}$$

Para obtener resultados significativos era necesario que la eficacia de la transformación fuera superior al umbral requerido de 2×10^5 . En este caso fue de 2.4×10^5 .

A continuación, todas las colonias blancas crecidas en las placas con medio mínimo SD/-Leu-Trp-His-Ade se estriaron de nuevo en el mismo medio y las que crecieron se replicaron de nuevo en ese mismo medio. Finalmente, se seleccionaron aquellas que crecieron después del segundo pase.

5.6 Ensayos para la detección de actividad β -galactosidasa

Además de los genes reporteros *HIS3* y *ADE2*, la cepa NMY51 también contiene el gen reportero *lacZ*. El gen *lacZ* codifica para la enzima β -galactosidasa, que convierte el sustrato X-gal en un compuesto de color azul. Las células de levadura que expresen la β -galactosidasa adquirirán una coloración azul cuando se incuben con X-gal. El gen reportero *lacZ* sirve para evaluar la intensidad de la interacción de las proteínas en cada transformante seleccionado en el cribado con el banco de cDNA. A continuación se detalla el protocolo llevado a cabo en el ensayo de actividad β -galactosidasa.

En primer lugar, las colonias de cada transformante que mostró crecimiento tras el segundo pase en el apartado anterior, se inocularon en 5 mL de medio mínimo SD/-Leu-Trp y se crecieron *overnight* a 30°C y 250 rpm. Se determinó la OD₅₄₆ del cultivo y se calculó el volumen de células necesario para obtener una OD de 0.6 a 1 en un volumen de 1 mL [ODmedida * Volumen del cultivo a coger = ODfinal (0.6–1) * Volumen final (1 mL)], que se centrifugó durante 10 min a 2500 g. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con el poco volumen de sobrenadante que quedaba y se transfirió cada suspensión de células a un pocillo de una placa de 96 pocillos MicroWell™. Se añadieron 100 μL de la solución de lisis (dualsystems biotech, apartado 5.1) a cada pocillo empleando una micropipeta multicanal e inmediatamente se monitorizó la absorbancia a 620 nm (A_{620}) correspondiente al desarrollo del color azul en un espectrofotómetro de placas Multiskan® EX (Thermo Scientific) (Unidad de Laboratorios Docentes, Facultad de Farmacia, UB)

durante 90 minutos a intervalos de 3 min. Finalmente, se calculó la actividad β -galactosidasa a cada punto de medición según la fórmula:

$$\text{actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{Abs a 620 nm}}{\text{tiempo incubación (min)} * \text{Volumen células (1 mL)} * \text{OD a 546 nm (0.6- 1 OD)}}$$

Mediante la representación del inverso de la actividad β -galactosidasa frente al tiempo, se seleccionaron los candidatos que mostraban mayor intensidad en la interacción con la proteína AtArv1. Como puntos de referencia, se analizaron también las actividades β -galactosidasa de las colonias transformadas con los plásmidos para expresar los controles positivo (Alg5-Nubl) y negativo (NubG).

5.7 Recuperación del plásmido presa de la levadura, retransformación en *E. coli* y análisis de la identidad del clon

Para recuperar el DNA plasmídico de las colonias de levadura seleccionadas que presentaban mayor actividad β -galactosidasa, se empleó el kit comercial *Zymoprep II™ Yeast Plasmid Miniprep* (Zymo Research). Para ello, cada colonia seleccionada se inoculó en 2 mL de medio mínimo SD/-Leu-Trp y se crecieron *overnight* a 30°C y 250 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 2500 g durante 5 min y se prosiguió con el protocolo de la obtención de DNA plasmídico indicado por la casa comercial para cultivos líquidos de levadura (<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/14/d2004i.pdf>), que emplea la enzima Zymolyase™ para romper la pared celular.

Como el rendimiento de la recuperación del DNA plasmídico de levaduras resulta en general muy bajo, para amplificar el DNA plasmídico se transformó por electroporación (apartado 4.9.2) en la cepa DH5 α y las bacterias se crecieron en placas con medio LB suplementado con ampicilina. Teniendo en cuenta que los plásmidos del banco de cDNA NubG-X de Arabidopsis contienen el gen de resistencia a ampicilina, mientras que el plásmido que expresa la proteína cebo (pBT3STE-AtArv1) contiene el gen de resistencia a kanamicina, solo las bacterias transformadas con un plásmido del banco de cDNA fueron capaces de crecer en el medio selectivo en presencia de ampicilina.

Como una célula de levadura podría haber incorporado varios plásmidos después de la transformación con el banco de cDNA, se seleccionaron al azar dos colonias de bacterias de cada evento de transformación. El DNA plasmídico extraído de dichas bacterias por miniprep, se analizó por digestión con la enzima de restricción *SfiI* (Fermentas), de forma que se liberaba el inserto de cDNA del plásmido. Si ambas

digestiones del DNA plasmídico proveniente de un mismo evento de transformación mostraban un inserto del mismo tamaño, quería decir que originalmente se había incorporado un único plásmido del banco de cDNA en la levadura, y por lo tanto, ambas colonias contenían el mismo plásmido. Si los dos insertos obtenidos diferían en tamaño, indicaba que la levadura original contenía más de un plásmido del banco de cDNA, y por tanto, las colonias poseían plásmidos diferentes. En el primer caso, se escogió uno de los dos plásmidos para determinar la secuencia del fragmento de cDNA clonado, mientras que en el segundo, se secuenciaron los insertos de ambos plásmidos. La secuenciación se llevó a cabo según se explica en el apartado 4.11.

5.8 Confirmación de las proteínas interactoras de AtArv1 positivas

Como en cualquier proceso de cribado, podrían haberse aislado un cierto número de falsos positivos. Estos clones mostrarían un fenotipo *HIS⁺/ADE⁺/lacZ⁺* independientemente de la interacción entre las proteínas cebo y presa. Para eliminar los falsos positivos, la cepa de levadura que expresa la proteína cebo AtArv1-Cub-FT se transformó con los plásmidos presa positivos aislados y solo las levaduras resultantes que mostraron un fenotipo *HIS⁺/ADE⁺/lacZ⁺* se consideraron como verdaderos positivos.

Para ello, se adaptó el protocolo del apartado 5.4 de forma que, la suspensión de células de levadura que expresa la proteína cebo AtArv1-Cub-FT resuspendidas en 600 μ L de LiOAc/TE, se empleó para seis transformaciones, adecuando los volúmenes de reactivos necesarios en los pasos posteriores. Respecto a la cantidad de DNA, por cada 100 μ L de suspensión celular se añadieron 1.5 μ g de DNA plasmídico, 20 μ L de DNA de esperma de salmón (Roche) y 415 μ L de B-PEG/LiOAc master mix. Por cada transformación se añadieron 25 μ L de DMSO, 500 μ L de 2xYPAD y 200 μ L de 0.9% NaCl en los pasos correspondientes del protocolo del apartado 5.4. Finalmente, se sembraron 100 μ L de una dilución 1:1000 de la suspensión final de levaduras en una placa con medio mínimo SD/-Leu-Trp y 180 μ L de la suspensión final de levaduras en una placa con medio mínimo SD/-Leu-Trp-His-Ade suplementada con la concentración necesaria de 3-AT.

Las levaduras transformadas con una eficacia aceptable y que en el medio selectivo dieron lugar a un número de colonias significativamente superior al obtenido con el control negativo (NubG), se emplearon para llevar a cabo el ensayo de actividad β -galactosidasa (apartado 5.6).

La selección de candidatos positivos se realizó en base a la intensidad de la interacción con la proteína cebo siguiendo los criterios de número de colonias obtenidas en el medio mínimo SD/-Leu-Trp-His-Ade y nivel de actividad β -galactosidasa obtenidos.

6. Expresión transitoria de proteínas en *N. benthamiana*

La expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* mediada por agroinfiltración con *A. tumefaciens* EHA105, se empleó para llevar a cabo tres tipos de análisis diferentes: ensayos BiFC, localización subcelular y coimmunoprecipitación.

6.1 Obtención de células competentes de *A. tumefaciens* EHA105

A continuación se detalla el protocolo para obtener células competentes para la transformación por choque térmico de la cepa de *A. tumefaciens* EHA105.

Se estiró la cepa EHA procedente de -80°C en una placa con YEB suplementada con rifampicina y se incubó a 28°C durante 2 días. Después se inoculó una colonia en 3 mL de YEB suplementado con rifampicina y se incubó a 28°C y 180 rpm durante 16h (*overnight*). Al día siguiente, se inocularon 2 mL del cultivo anterior en 200 mL de YEB suplementado con rifampicina y se incubaron a 28°C y 180 rpm hasta obtener una OD_{595} de 0.6. En este momento, se enfrió el cultivo a 4°C durante 15 min y se centrifugó a 3000 g durante 10 min a 4°C . Finalmente, se resuspendió suavemente el pellet en 4 mL de una solución 20 mM CaCl_2 enfriada a 4°C , se realizaron alícuotas de 200 μL y se congelaron a -80°C para su crioconservación.

6.2 Transformación de la cepa de *A. tumefaciens* EHA105

A continuación se detalla el protocolo de transformación de la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 por el método de choque térmico.

Se añadieron 1-2 μL de DNA plasmídico en 50 μL de células competentes descongeladas previamente y se incubaron en hielo durante 20 min. A continuación, se incubaron durante 5 min en nitrógeno líquido (choque térmico) y posteriormente se atemperaron en un baño de agua a 37°C durante 5 min. Seguidamente, se añadió 1 mL de YEB y se incubó a 28°C durante 2-4h a 180 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 2600 rpm durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μL de YEB. Se

sembraron 25 y 175 μL de la suspensión de *Agrobacterium* transformado en dos placas con YEB suplementado con rifampicina y el antibiótico necesario para seleccionar las células que incorporan el plásmido con la construcción, y las placas se incubaron a 28°C durante 2 días.

Finalmente, se creció una colonia aislada en 3 mL de YEB con los antibióticos de selección adecuados durante 16h (*overnight*). A continuación, se añadieron 600 μL del cultivo crecido en un microtubo con 600 μL de glicerol autoclavado previamente, se homogeneizó bien la mezcla y se congeló -80°C para su crioconservación.

6.3 Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Para los ensayos de expresión transitoria de proteínas en *N. benthamiana*, se emplearon plantas de 3-8 semanas de edad, preferiblemente antes de que presentaran inflorescencias, ya que cuando presentan flores desciende notablemente la expresión de las proteínas. Además de las cepas EHA105 transformadas con el plásmido de interés, también se empleó la cepa EHA105 transformada con el plásmido pTRANS5'TEV (aporta resistencia a kanamicina), que codifica para la proteína supresora HC-Pro (*helper component proteinase*) del *potyvirus Tobacco etch virus* (cepa cedida por el Dr. Juanjo López Moya; Ruiz-ferrer et al., 2005). La expresión de esta proteína en tabaco permite mitigar el silenciamiento post-transcripcional inducido por la introducción de transgenes o genes víricos. A continuación se indica el protocolo para llevar a cabo la agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, para lo cual se preparaban cultivos independientes de los *Agrobacterium* transformados con las construcciones de proteínas que se querían expresar y el *Agrobacterium* que contenía la construcción de la proteína supresora HC-Pro.

Se estriaron las cepas EHA105 transformadas en placas con YEB suplementada con rifampicina y el antibiótico de selección del plásmido correspondiente, y se incubaron a 28°C durante 2 días. Posteriormente, se inoculó una colonia en 3 mL de YEB suplementado con rifampicina y el antibiótico de selección y se incubaron a 28°C y 180 rpm durante 16h (*overnight*). Al día siguiente, se inocularon 30 μL del cultivo anterior en 30 mL de YEB suplementado con rifampicina y el antibiótico de selección, y se incubaron a 28°C y 180 rpm hasta OD_{595} de 0.5-1. Alcanzada la OD, se centrifugó a 3500 g durante 10min y según la fórmula $[\text{OD medida} (0.5-1) * \text{Volumen inicial} (30 \text{ mL}) = \text{OD final} (1) * \text{Volumen final} (\text{mL})]$, se resuspendió el pellet con el volumen adecuado de solución de agroinfiltración (10 mM MgCl_2 , 10 mM MES pH 6.3 y 200 μM acetosiringona) para conseguir una OD final de 1. A continuación, se agitó suavemente para homogeneizar las células y se incubó a

temperatura ambiente durante 4-6h, quedando así los cultivos preparados. Para llevar a cabo la agroinfiltración de *Nicotiana*, se mezclaron las mismas cantidades de las suspensiones de *Agrobacterium* transformadas con los plásmidos para expresar HCPPro y cada una de las proteínas de interés que se querían expresar en una misma hoja de *Nicotiana*. Posteriormente en el invernadero, la mezcla obtenida se agroinfiltró suavemente empleando una jeringa de 1 mL (sin aguja) en distintas regiones de la superficie abaxial de varias hojas de una misma planta. Aproximadamente tres días después de la agroinfiltración, se recortaron las regiones agroinfiltradas de la hoja para su posterior análisis por microscopía laser confocal o coinmunoprecipitación.

7. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*

Para generar plantas transgénicas de *A. thaliana*, se empleó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* como vehículo para transferir e integrar al genoma de la planta los genes quiméricos de interés de forma estable.

7.1 Obtención de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101

A continuación se detalla el protocolo para obtener células competentes para la transformación por choque térmico de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101.

Se estrió la cepa GV3101 en una placa con YEB suplementada con rifampicina y gentamicina y se incubó a 28°C durante 2 días. Posteriormente, se inoculó una colonia en 3 mL de YEB suplementado con rifampicina y gentamicina y se incubó a 28°C y 180 rpm durante 20h. A continuación, se añadieron 50 µL del cultivo anterior en 50 mL de YEB suplementado con rifampicina y gentamicina, y se incubaron a 28°C y 180 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5-0.8 (aproximadamente 8-12h). En este momento, se enfrió el cultivo a 4°C durante 15 min y se centrifugó a 3000 g durante 5 min a 4°C. El pellet se resuspendió suavemente en 10 mL de una solución fría 0.15 M NaCl y se centrifugó a 3000 g durante 5 min. Finalmente, el pellet se resuspendió suavemente en 1 mL de una solución fría 200 mM CaCl₂, se realizaron alícuotas de 100 µL y se congelaron a -80°C para su crioconservación.

7.2 Transformación de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101

A continuación se detalla el protocolo de transformación de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 por el método de choque térmico.

Se añadió 1 µg de DNA plasmídico en 100 µL de células competentes descongeladas previamente y se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación, se sumergieron en nitrógeno líquido durante 1 min y posteriormente se atemperaron en un baño de agua a 37°C durante 5 min. Seguidamente, se añadió 1 mL de medio de cultivo YEB líquido y se incubó a 28°C y 180 rpm durante 4 h. En este momento, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y el pellet se resuspendió en 200 µL de YEB. Finalmente, se sembraron 25 y 175 µL de la suspensión en dos placas con YEB suplementado con rifampicina, gentamicina y el antibiótico necesario para seleccionar las células que incorporan el plásmido con la construcción. Las placas se incubaron a 28°C durante 2 días.

7.3 Genotipado del *A. tumefaciens* transformado

Debido a la cantidad de tiempo que conlleva generar plantas transgénicas, previamente se comprobó que las células transformadas hubieran incorporado el plásmido de interés, llevando a cabo una PCR directamente sobre las colonias de *Agrobacterium* transformadas. Para ello, se cogió parte de una colonia, se resuspendió en 150 µL de H₂O milliQ estéril y la suspensión celular se incubó a 100°C durante 5 min, lo que permite romper las células y liberar el DNA plasmídico. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min, y se llevó a cabo una PCR convencional con 1-2 µL del sobrenadante y los *primers* empleados para generar la construcción transformada en la bacteria. La amplificación se llevó a cabo con la Taq DNA polimerasa (Biotools) en un volumen final de 30-50 µL y después de 30 ciclos en condiciones estándar en el termociclador, se analizó el producto en un gel de agarosa.

Una vez comprobado que la colonia contenía el plásmido de la construcción correspondiente, se cogió el resto de la colonia y se inoculó en 3 mL de YEB con los antibióticos de selección adecuados durante 16h (*overnight*). A continuación, se añadieron 600 µL del cultivo crecido en un microtubo con 600 µL de glicerol autoclavado previamente, se homogeneizó la mezcla y se congeló -80°C para su crioconservación.

7.4 Transformación de *A. thaliana* vía infección con *A. tumefaciens* por el método de inmersión floral

Para llevar a cabo la transformación de *A. thaliana* se empleó un protocolo basado en el método de inmersión floral (*floral dip*) (Clough and Bent, 1998), que infecta las células germinales de la planta sumergiendo las flores en una solución con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 transformada con el plásmido deseado. Posteriormente, la planta transformada produce semillas portadoras del transgén de interés.

En todos los casos se empleó la variedad de plantas de *A. thaliana wild type* Col 0 crecidas primero a día corto (8h luz / 16h oscuridad) durante 4 semanas (2 semanas en placa y 2 semanas en tierra), y posteriormente a día largo (16h luz / 8h oscuridad) hasta que las plantas sacaron el tallo principal (aproximadamente 4 semanas). En este estadio aún joven de la planta, se cortó el tallo rompiéndose la dominancia apical y favoreciendo el desarrollo de tallos laterales, lo que permitía obtener posteriormente un mayor número de inflorescencias. Cuando la planta había producido varios tallos laterales y la mayoría de las flores se encontraban todavía cerradas (aproximadamente 10 días después de cortar el tallo), se llevó a cabo el protocolo de transformación por inmersión floral que se indica a continuación.

Se estirió la cepa GV3101 transformada en una placa con YEB suplementada con rifampicina, gentamicina y el antibiótico de selección y se incubó a 28°C durante 2 días. Posteriormente, se inoculó una colonia en 3 mL de YEB suplementado con rifampicina, gentamicina y el antibiótico de selección y se incubó a 28°C y 180 rpm durante 18h (*overnight*). Al día siguiente, se añadieron 250 µL del cultivo anterior en 250 mL de LB con rifampicina, gentamicina y el antibiótico de selección y se incubaron a 28°C y 180 rpm hasta obtener OD₆₀₀ de 0.6-1 (aproximadamente 12-16h). A continuación, se centrifugó a 5000 rpm y 15°C durante 15 min y se resuspendió el pellet en 150 mL de solución de sacarosa al 5% (p/v). Finalmente, se añadieron 45 µL de Silwet-77 y se homogenizó bien para obtener finalmente la solución de transformación. Se sumergieron las inflorescencias de la planta en la solución de transformación durante 1 min. Las plantas sumergidas en la solución de transformación, se mantuvieron en posición horizontal, sobre papel de filtro en una bandeja cubierta con film plástico, hasta que las inflorescencias empezaron a curvarse hacia arriba debido al fototropismo (aproximadamente 12-20h). Posteriormente, las plantas se pusieron en posición vertical en una bandeja y se trasladaron al invernadero para crecer en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad), lo que favorecía la producción de semillas.

7.5 Selección de plantas transgénicas hasta obtener líneas homocigotas

Según el gen marcador del T-DNA integrado en el genoma de las plantas, se seleccionaron las semillas transformantes obtenidas en la generación T₁ (4-6 semanas después) y se propagaron según los criterios de selección anteriores hasta obtener líneas transgénicas T₃ homocigotas. El estudio de la segregación del carácter del gen marcador permitió seleccionar las líneas homocigotas con una única integración del T-DNA en el genoma, que eran las que habían seguido las proporciones mendelianas de transformantes en las generaciones anteriores (75% en la T₂ y 100% en la T₃).

En la mayoría de los casos, el método de selección de las semillas transformantes se basó en el crecimiento en placas con medio MS, suplementado con el herbicida o el antibiótico al que daba resistencia el gen marcador de la región del T-DNA del plásmido empleado en la transformación. Solo para el caso en que se empleó el plásmido pB110Red-2844, las semillas transformantes se seleccionaron por su fluorescencia roja empleando una luz verde de linterna LED de alta intensidad y un filtro rojo, colocado entre la luz verde y las semillas.

7.6 Líneas transgénicas de *Arabidopsis* generadas en la tesis

Para los experimentos desarrollados en la tesis se generaron las siguientes líneas transgénicas homocigotas:

- ***GFP:AtArv1* y *AtArv1:GFP***: expresan la proteína AtArv1 fusionada a GFP en el extremo N- y C-terminal respectivamente, y se emplearon en los ensayos de coimmunoprecipitación para intentar validar la interacción entre AtArv1 y maMYB en planta. Poseen resistencia a higromicina.
- ***maMYB::GFP:GUS***: expresa la proteína de fusión GFP-GUS bajo el control del promotor del gen *maMYB* (813 pb de la región 5'-flanqueante de *maMYB*) y se empleó en los ensayos de actividad GUS para analizar el patrón de expresión del gen *maMYB* en plántulas. Posee resistencia a higromicina.
- ***amiRNA 1* y *amiRNA 2***: expresan bajo el control de un promotor inducible el amiRNA 1 y amiRNA 2 respectivamente, provocando el silenciamiento del gen *maMYB*. Las semillas presentan fluorescencia roja.
- ***Vector vacío***: control del sistema del promotor inducible, bajo el cual no se transcribe ningún gen. Las semillas presentan fluorescencia roja.

- ***EcR::maMYB*** y ***EcR::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹***: sobreexpresan bajo el control de un promotor inducible la proteína maMYB y la versión quimérica maMYB⁹¹⁻³⁰⁹. Las semillas presentan fluorescencia roja.
- ***35S::maMYB*** y ***35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹***: sobreexpresan de forma constitutiva la proteína maMYB y la versión quimérica maMYB⁹¹⁻³⁰⁹ fusionadas en el extremo C-terminal al triple epítopo HA. Poseen resistencia a kanamicina.

8. Generación por polinización cruzada de plantas doble mutantes *amiRNA1x35S::maMYB* y *amiRNA1x35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹*

La polinización cruzada entre líneas transgénicas de *A. thaliana* permite obtener nuevas líneas que heredan la mitad de la dotación cromosómica de las plantas progenitoras (doble mutantes). Para seleccionar las semillas doble mutantes, las líneas transgénicas progenitoras deben aportar marcadores de selección diferentes.

Como línea receptora en los cruzamientos se empleó la línea transgénica T₃ homocigota *amiRNA 1*, que expresa bajo el control de un promotor inducible el amiRNA 1 provocando el silenciamiento del gen *maMYB*. Esta línea posee el gen marcador que expresa para la proteína DsRed de fluorescencia roja, que permite la detección visual de las semillas transgénicas. Como líneas donadoras de polen en los cruzamientos se emplearon las líneas transgénicas T₂ hemicigotas *35S::maMYB* y *35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹*, que expresan bajo el control de un promotor constitutivo las proteínas quiméricas maMYB-3xHA y maMYB⁹¹⁻³⁰⁹-3xHA, respectivamente. Estas líneas poseen el gen marcador de resistencia a kanamicina, que permite el crecimiento en presencia del antibiótico. Tanto la línea receptora como las líneas donadoras son de fondo genético Col 0.

La línea receptora *amiRNA 1* se sembró 7 días después que las líneas donadoras *35S::maMYB* y *35S::maMYB⁹¹⁻³⁰⁹*, lo que permitió que, al llegar a la fase reproductiva, las plantas donadoras desarrollaran abundancia de flores abiertas con granos de polen maduros, mientras que las plantas receptoras tuvieran las yemas florales cerradas o con apertura incipiente, y por tanto, sin haber sido autofecundadas. Una vez alcanzadas las condiciones de desarrollo necesarias, con pinzas de puntas ultrafinas de disección se extrajeron cuidadosamente los pétalos y los estambres de varias flores de las plantas receptoras *amiRNA 1*, dejando solamente el pistilo íntegro, proceso de emasculación. Para evitar posibles futuras confusiones, también se eliminaron el resto de flores que no se emplearon en la polinización y las silicuas ya formadas en las plantas receptoras. Seguidamente, se cogieron varias flores de las plantas donadoras y el polen de los

estambres se esparció sobre los pistilos receptores. Para evitar que los pistilos polinizados se secaran, se cubrieron cuidadosamente con film plástico, dejando espacio para que también se airearan ligeramente. En los días posteriores, este proceso de polinización se repitió varias veces tanto en los pistilos ya polinizados como en flores nuevas que habían surgido en la planta receptora. Las plantas polinizadas se dejaron crecer en una cámara de cultivo en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y las silicuas maduras provenientes de cada polinización se recogieron individualmente en microtubos *Eppendorf*. Para acabar de secar las semillas, los microtubos se dejaron con la tapa abierta durante varios días en un secador cerrado herméticamente con gel de sílice desecante. Finalmente, aquellas semillas que mostraron fluorescencia roja se sembraron en placas con MS suplementadas con kanamicina. Las plantas que crecieron se propagaron hasta conseguir líneas doble mutantes homocigotas para ambos caracteres.

9. Técnicas con DNA en Arabidopsis

Según el caso, como material vegetal de partida para estos experimentos se emplearon 1-2 hojas jóvenes de la roseta o unos 50 mg de plántulas de Arabidopsis. El material vegetal se recogió en un microtubo *Eppendorf* y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente, el material vegetal o bien se trituró en un mortero con nitrógeno líquido, o tras añadir un par de bolas de circonio al microtubo, se homogeneizó con ayuda del TissueLyser II o Bullet Blender®, manteniendo en todo momento el material congelado.

9.1 Extracción rápida de DNA genómico de *A. thaliana*

Este método de extracción tiene la ventaja de ser rápido, pero en el DNA genómico (gDNA) obtenido quedan restos celulares no solubles que se depositan en el fondo. El gDNA obtenido se empleó como molde en las PCRs de los experimentos de genotipado, ya que la pureza del DNA no era una condición excluyente. A continuación se detalla el protocolo de extracción rápida de gDNA.

Se añadió al material vegetal previamente triturado en presencia de nitrógeno líquido y congelado a -80°C, 400 µL del tampón TENS (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS p/v), se mezcló suavemente y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante en 400 µL de isopropanol. Se incubó en presencia de isopropanol durante 1h a temperatura ambiente, se centrifugó a máxima velocidad

durante 5 min y se lavó el pellet con 800 μL de 70% etanol (v/v). Se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el gDNA durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el pellet de DNA en 150 μL de H_2O milliQ estéril. En las posteriores PCRs realizadas en el genotipado se emplearon 2.5 μL (aproximadamente 200 ng) del gDNA obtenido.

9.2 Extracción de DNA genómico de alta calidad en *A. thaliana*

Este método de extracción, aunque resulta más laborioso, permite obtener un buen rendimiento de DNA y de buena calidad, inclusive partiendo de bajas cantidades de muestra. En este caso se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. A partir del gDNA de alta calidad obtenido por este método, se amplificó la zona del promotor de *maMYB* y se generó la construcción necesaria para analizar el patrón de expresión del gen *maMYB*, en la que la expresión de la proteína GUS se encontraba bajo el control del promotor del gen *maMYB* (813 pb de la región 5' flanqueante de *maMYB*).

9.3 Genotipado de los mutantes de inserción de T-DNA de *A. thaliana*

Los individuos de las líneas mutantes de inserción de T-DNA se genotiparon mediante PCR con los *primers* propios del elemento insertado y de la región genómica flanqueante al sitio de inserción. La amplificación se llevó a cabo con la Taq DNA polimerasa (Biotools) en un volumen final de 30 μL y después de 30 ciclos en condiciones estándar en el termociclador, se analizó el producto en un gel de agarosa. Para conocer la posición exacta de la inserción de T-DNA, los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa, se secuenciaron empleando los *primers* flanqueantes a la inserción. En la Tabla 14 se indican los *primers* empleados en los experimentos anteriores.

Tabla 14. *Primers* empleados para genotipar los distintos mutantes de inserción de T-DNA. Se indica contra que gen o T-DNA insertado en la línea mutante híbrida el *primer*. La temperatura indicada fue la empleada en la reacción de PCR. Abreviaciones: RB, *right border*; LB, *left border*.

Nombre	Secuencia	T (°C)	Hibridación	Orientación
MybSAIL503_Fow	5'-GTAATAAACATGCCACAAGAGC-3'	54	maMYB	Directo
MybSAIL503_Rev	5'-GACCTCTCAGCAACTAGCAAC-3'	54	maMYB	Reverso
pDAP101_RB1	5'-ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG-3'	54	<i>mamyb1-2</i>	RB T-DNA
pLB3	5'-GAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3'	54-53	<i>mamyb1-2/1-1</i>	LB T-DNA
MybSAIL423_Fow	5'-CGAGATCGCAGATAGAGATAG-3'	53	maMYB	Directo
MybSAIL423_Rev	5'-GGTAGTGTCTGTTGGTGCTAAG-3'	53	maMYB	Reverso
pCSA110_QRB2	5'-GGTGCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTGA-3'	53	<i>mamyb1-1</i>	RB T-DNA
MybGABI311_Fow	5'-CTGTCATGTTAGATTCGATCTTAGG-3'	54	maMYB	Directo
MybGABI311_Rev	5'-GGTGTGGATAATAATGGATCG-3'	54	maMYB	Reverso
pAC161_RB	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3'	54	<i>mamyb1-3</i>	RB T-DNA
pAC161_LB	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'	54	<i>mamyb1-3</i>	LB T-DNA

10. Análisis de la expresión del RNA mensajero en Arabidopsis

10.1 Extracción de RNA total de *A. thaliana*

El material vegetal de partida recogido, normalmente 50-100 mg de plántulas de Arabidopsis, se congeló y se trituró en mortero con nitrógeno líquido. Para la extracción rutinaria de RNA total, se empleó el kit comercial PureLink® Mini Kit (Ambion), siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. La integridad del RNA se comprobó visualmente en geles de agarosa, y la cantidad y pureza del RNA se determinó mediante análisis espectrofotométrico en NanoDrop 2000™.

Para eliminar las pequeñas trazas de gDNA que hubieran podido quedar, se trataron 3 µg del RNA obtenido, con el kit Turbo DNA-free™ DNase Treatment and Removal (Ambion). La reacción para la hidrólisis del gDNA contenía 6 µg de RNA total, 5 µl de tampón 10x, 1 µl de DNase DNA-free y agua nuclease free hasta un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadieron 5 µL de resina de inactivación de la DNasa y se incubó 5 min a temperatura ambiente agitando frecuentemente. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad durante 1.5 min y se traspasó el sobrenadante a un nuevo microtubo. La concentración final de RNA quedó en torno a 120 ng/µL.

10.2 Transcripción reversa o síntesis de cDNA para la RT-PCR

Para sintetizar cDNA por transcripción reversa a partir de RNA total, se utilizó la enzima SuperScript™ III *Reverse Transcriptase* (Invitrogen). A continuación se detalla el protocolo empleado.

Mix 1 (Vol. final 13 µL)		Mix 2 (Vol. final 7 µL)	
Oligo dT (50 µM)	1 µL	Tampón 5x	4 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL	DTT (0.1 M)	1 µL
RNA tratado (120 ng/µL)	11 µL (1300 ng)	RiboLock RNase inhibitor (40 U/µL) (Fermentas)	1 µL
		SuperScript III (200 U/µL)	1 µL

En primer lugar, se prepararon las mezclas 1 y 2 y se conservaron en hielo. A continuación, se incubó la mezcla 1 a 65°C durante 5 min (desnaturalización de estructuras secundarias del RNA), se colocó la mezcla 1 en hielo durante 1 min y se añadió la mezcla 2. Después, se incubó a 50°C durante 60 min (síntesis de la cadena de cDNA a partir del mRNA). Por último, se inactivó la transcriptasa calentando 15 min a 70°C. Una vez terminado el proceso de síntesis de cDNA, una alícuota de la muestra se guardó a -20°C para uso en el laboratorio y el resto a -80°C para guardarlo a largo plazo.

10.3 Reacción de PCR semicuantitativa del gen *maMYB* (RT-PCR)

Para determinar de forma semicuantitativa la cantidad de mRNA del gen *maMYB* que se expresaba en los mutantes de inserción de T-DNA, se realizaron PCRs en condiciones estándar sobre el cDNA obtenido en el apartado anterior. La amplificación se llevó a cabo con la Taq DNA polimerasa (Biotools) en un volumen final de 50 µL y empleando 5 µL de una dilución 1:10 del cDNA. Como gen de referencia endógeno, se empleó el gen que codifica para proteína PP2AA3 (fosfatasa 2A subunidad A3, At1g13320). En la Tabla 15 se indica los *primers* y condiciones del termociclador empleados en las PCRs semicuantitativas.

Tabla 15. *Primers* empleados en el RT-PCR semicuantitativo. Se indica contra que gen hibrida el *primer*, y la temperatura y los ciclos que fueron empleados en la reacción de PCR.

Nombre	Secuencia	T (°C)	Ciclos	Hibridación	Orientación
Mybexon1_F	5'–GATTGGTTGATGAAAACG–3'	50	30-35	maMYB	Directo
Mybexon1_R	5'–CCTCTAGTTAATTAGCTGGAG–3'	50	30-35	maMYB	Reverso
Mybexon2B_R	5'–CTAGTAATAAAAATAGGTGCTCTTTG–3'	50	30-35	maMYB	Reverso
AtPP2A.FOR	5'–TAACGTGGCCAAAATGATGC–3'	55	25-30	PP2AA3	Directo
AtPP2A.REV	5'–GAAGCCAACATTAACATTAGTAGC–3'	55	25-30	PP2AA3	Reverso

10.4 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los experimentos de expresión génica de maMYB, AtArv1, AtArv2 y PP2AA3 (At1g13320) realizados mediante esta técnica se llevaron a cabo en un equipo LightCycler480 (Roche), utilizando el reactivo LightCycler 480 SYBRGreen I Master (Roche). El diseño de *primers*, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. En primer lugar, se hicieron pruebas preliminares a distintas concentraciones de cDNA (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) para validar la concentración de los *primers* a la cual la amplificación se produce de forma lineal y calcular la eficiencia de los mismos, que debía estar dentro del rango 1.8-2.2 para considerarse óptimos. Para ello, se representan los valores de C_t frente a $-\text{Log}(1/\text{dilución})$, lo que al unir los puntos tiene que dar una línea recta, indicativo de que la amplificación es lineal. La eficiencia de los *primers* se calculó según la fórmula: $\text{Eficiencia} = 10^{(1/\text{pendiente de la recta})}$. Las curvas de disociación de los *primers* obtenidas en estos experimentos preliminares mostraron un único pico de amplificación, lo que demostraba la especificidad de los *primers* por un único producto.

La reacción de amplificación contenía 2 μL de una dilución 1:20 de cDNA, 0.6 μL (0.3 μM) de cada primer *stock* a 10 μM , 10 μL SYBR Green y 6.8 μL de agua *nuclease free*. Para todas las muestras biológicas se hicieron tres réplicas técnicas de PCR. Para cuantificar la cantidad de transcritos de los genes estudiados, se emplearon *primers* que hibridaban en la zona 3' de la región codificante y se normalizaron en relación a los niveles de expresión de la proteína PP2AA3. En la Tabla 16 se muestran los primers empleados para RT-qPCR.

Tabla 16. *Primers* empleados en la RT-qPCR. Se indica contra que gen hibrida, el tamaño del fragmento amplificado y la eficiencia de cada pareja de *primers*. Los *primers* de PP2AA3 se obtuvieron de Hong et al., 2010, y el *primer* Arv1_3_Real_AS se obtuvo de Keim, 2012.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Eficiencia	Hibridación	Orientación
D1F-rtmaMYB-likeD	5'-TCTGGAGCTGGTGGAGATGC-3'	152 pb	2.0026	maMYB	Directo
D1R-rtmaMYB-likeD	5'-GCTGCTTTCGACTTCCCAGGT-3'				Reverso
D2-Arv13'F	5'-CAACAATGACCAGATGCATAGC-3'	157 pb	2.0094	AtArv1	Directo
Arv1_3Real_AS	5'-GGAAGCTGATGGGATCATAACGATT-3'				Reverso
D1-Arv2QF	5'-ACTGAATCAGCAACGAGCAG-3'	96 pb	1.9564	AtArv2	Directo
D2-Arv2-3'R	5'-GACAGATCCTAAGTGTCAGAG-3'				Reverso
PP2AA3_qRTF	5'-GCG/GTTGTGGAGAACATGATACG-3'	162 pb	1.9743	PP2AA3	Directo
PP2AA3_qRTR	5'-GAACCAAACACAATTCGTTGCTG-3'				Reverso

Tras normalizar la cantidad de transcrito en relación al control interno, para calcular las diferencias de expresión de un determinado gen entre los pares de condiciones consideradas, se llevó a cabo el análisis cuantitativo de los niveles de mRNA de acuerdo al método comparativo de C_t o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001; Wong and Medrano, 2005). Este método asume la eficiencia de amplificación de los *primers* como 2, siempre que se esté trabajando en un rango de concentración de *primer* donde la amplificación se produce de una forma lineal.

$$2^{-[(Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ PP2AA3})_{\text{muestra problema}} - (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ PP2AA3})_{\text{muestra control}}]}$$

Los niveles normalizados de mRNA representados en los resultados se expresaron en relación a la cantidad de mRNA de la muestra control, a la que se le atribuyó el valor 1.

11. Técnicas con proteínas en Arabidopsis

11.1 Producción de un anticuerpo anti-péptido de maMYB

Para generar el anticuerpo policlonal contra maMYB, mediante la ayuda del programa bioinformático *OptimumAntigen™ Design Tool* de la empresa GenScript, se escogió un péptido específico de maMYB, NKRSKGSTKSDNPP (aminoácidos de las posiciones 117 a 130), ya que tenía en global las mejores predicciones en cuanto a las propiedades de antigenicidad, exposición en la superficie de la proteína e hidrofobicidad. El péptido fue sintetizado comercialmente con la adición de una cisteína en el extremo C-terminal para la conjugación a la proteína hemocianina de lapa (KLH), y acetilado en el

extremo N-terminal para imitar la conformación nativa del antígeno. Los anticuerpos fueron producidos usando un protocolo estándar de inmunización en conejo, y posteriormente purificados por afinidad usando la proteína A (GenScript). El anticuerpo liofilizado generado por la empresa GenScript se disolvió en PBS pH 7.4 y 0.02% NaN₃ (p/v) quedando a la concentración de 1.881 mg/mL.

11.2 Extracción de proteína total de diferentes tejidos de *A. thaliana* Col 0

Para el análisis de la expresión de la proteína maMYB en diferentes tejidos de *Arabidopsis wild type* Col 0, el tejido vegetal (40 mg de semillas y alrededor de 200 mg de los otros tejidos) se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para la posterior obtención de extractos proteicos, según el siguiente protocolo.

El **tampón de extracción** contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1x *protease inhibitor cocktail*, 0.2% (v/v) tritón X-100. Se preparó a partir de las soluciones siguientes, 2M Tris-HCl pH 7.5, 1M NaCl, 0.2 M EDTA pH 8, 1M DTT, 0.1 M PMSF, 10x *protease inhibitor cocktail* (Sigma), 10% tritón X-100.

Se trituró el material vegetal en un mortero con nitrógeno líquido y seguidamente se colocó en un microtubo *Eppendorf*, conservándolo en nitrógeno líquido o a -80°C hasta su posterior procesamiento, momento en el que se colocó en hielo e inmediatamente se añadió el tampón de extracción frío (20 µL por mg de semillas, 1 µL por mg de tejido de raíz y de células en cultivo de la línea T87, y 2 µL por mg del resto de tejidos). A continuación, se incubó en un agitador de noria durante 1h a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 600 g durante 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un nuevo microtubo. Para acabar, se repitió el último paso de centrifugación para eliminar posibles restos celulares que pudieran haberse arrastrado. Los extractos se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

11.3 Extracción de proteína total de plántulas de *A. thaliana*

El material vegetal recogido (100-150 mg) se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para la posterior extracción de proteína total, según el siguiente protocolo.

El **tampón de extracción** contenía 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% (v/v) de β-mercaptoetanol, 4 mM PMSF, 40% sacarosa (p/v), 10 µg/mL de aprotinina, 55 µM de leupeptina, 1 µM de pepstanina A, 6 µM de E64, 0.2% (v/v) tritón

X-100 (preparar en un volumen de H₂O mQ en torno al 55% del volumen total). Se preparó a partir de las soluciones siguientes, 1 M Tris-HCl pH 7.5, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8, 100 mM PMSF, 10 mg/mL aprotinina, 21 mM leupeptina, 1.46 mM pepstatina, 1 mM E64, 10% tritón X-100.

Se trituró el material vegetal en un mortero con nitrógeno del mismo modo que en el apartado anterior, pero en el homogenado la proporción de tampón de extracción fue de 1 µL por mg de tejido. A continuación, se incubó en un agitador de noria a 4°C durante 30 min, se centrifugó a la máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C, y a partir de este punto se procedió como en el apartado anterior.

11.4 Método de Bradford para la cuantificación de proteínas

La concentración de proteína en los extractos proteicos se determinó mediante el método espectrofotométrico de Bradford (Bradford, 1976), adaptado para el uso con el reactivo comercial *BioRad Protein Assay* (BioRad). Como recta de calibrado se empleó la proteína patrón albúmina sérica bovina (BSA) a distintas concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 µg/mL). Para poder interpolar los resultados de las muestras problema dentro del rango de la recta de calibrado, se empleó la dilución adecuada, normalmente entre 1:10 y 1:40. Las muestras patrón y problema se preparan por duplicado según la mezcla de reacción (790 µL de agua destilada, 10 µL del extracto proteico previamente diluido, y 200 µL del reactivo *BioRad protein Assay*). Tras mezclar en agitador vortex, la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 20 min y se midió la absorbancia a 595 nm.

11.5 Western blot

Tras la cuantificación por el método de Bradford, 15 µg de los extractos de proteína total combinados con la cantidad necesaria de tampón de muestra 6x [20 mM Tris-HCl pH 8.8, 5 mM EDTA, 1M sacarosa, 60 mM DTT, 10% (p/v) SDS, 0.1% (p/v) azul de bromofenol], se hirvieron durante 5 min y se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (0.75 mm de grosor) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se emplearon concentraciones de poliacrilamida del 12.5% en el gel separador y del 4% en el gel apilador.

Gel apilador	5 mL (2 geles)	Gel separador	10 mL (2 geles)
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 mL	1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL
30% Acrilamida (BioRad)	670 μ L (4%)	30% Acrilamida (BioRad)	4.167 mL (12.5%)
10% SDS	50 μ L (0.1%)	10% SDS	100 μ L (0.1%)
10% PSA	37.5 μ L	10% PSA	75 μ L
TEMED	3.75 μ L	TEMED	7.5 μ L
H ₂ O milliQ	2.989 mL	H ₂ O milliQ	3.15 mL

Como marcador de pesos moleculares se emplearon 6 μ L de *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas), que se trató de la misma forma que los extractos proteicos. Tanto la preparación de los geles como la electroforesis se llevaron a cabo mediante el equipo Mini-Protean 3 (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta con 1x tampón de electroforesis [tampón electroforesis 10x: 250 mM Tris base, 192 mM glicina, ajustar pH a 8.3, 1% (p/v) SDS] aplicando una intensidad de corriente constante de 15 mA por gel hasta que el azul de bromofenol del tampón de muestra saliera del gel (aproximadamente 2h). A continuación, las proteínas contenidas en el gel separador se electrotransfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) Hybond-P (Amersham). En primer lugar, la membrana se activó sumergiéndola unos segundos en metanol frío y seguidamente, se lavó con H₂O milliQ fría y se equilibró en tampón de transferencia frío con metanol (10% v/v) (tampón de transferencia 10x: 250 mM de Tris base, 192 mM de glicina, ajustar pH a 8.3). La electrotransferencia se llevó a cabo mediante el sistema húmedo del equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad). El montaje en el cassette de transferencia constaba, desde la cara de color negro a la transparente, de esponja, tres papeles Whatman 3MM, gel separador, membrana PVDF, tres papeles Whatman 3MM y esponja. La electrotransferencia se llevó a cabo en una cubeta con tampón de transferencia con metanol frío aplicando una intensidad de corriente constante de 150 mA durante 3h a 4°C. Una vez realizada la transferencia, se recuperó la membrana PVDF y se procedió a detectar la proteína de interés con un anticuerpo específico. Para ello, inmediatamente después de desmontar el cassette de transferencia, se lavó la membrana con PBS 1x (PBS 10x pH 7.4: 1.37 M de NaCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, 27 mM KCl) en un agitador orbital durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se bloqueó incubándola en PBS-T-Leche [0.1% (v/v) Tween 20 y 5% (p/v) de blotto Santa Cruz en PBS 1x] en un agitador orbital durante 16h (*overnight*) a 4°C. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se realizaron cuatro lavados con PBS-T [0.1% (v/v) Tween 20 en PBS 1x] en un agitador orbital durante 5 min cada uno y a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario anti-peptido

maMYB a una dilución 1:4000 en PBS-T-Leche en un agitador orbital durante 2h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron los cuatro lavados con PBS-T igual que en el paso anterior y se realizó una segunda incubación, esta vez con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (RPH) (Amersham) a una dilución 1:8000 en PBS-T-Leche, en un agitador orbital durante 1h a temperatura ambiente. Se realizaron los cuatro lavados en PBS-T igual que en pasos anteriores, y dos lavados más con 1x PBS durante 5 min cada uno a temperatura ambiente. Para la visualización del complejo maMYB-anticuerpo anti-maMYB, la superficie de la membrana se incubó, según las instrucciones de la casa comercial, con 1 mL del reactivo ECL Advanced® Western Blotting Detection Kit (Amersham) durante 1 min. Tras eliminar por goteo el exceso de reactivo, la membrana se colocó en una funda de plástico transparente y se eliminaron las burbujas de aire con ayuda de papel secante. La quimioluminiscencia emitida se capturó digitalmente en el equipo ImageQuant™ LAS 4000 *mini biomolecular imager* (GE Healthcare) durante el tiempo necesario para obtener la imagen adecuada.

La tinción irreversible de la membrana de PVDF con azul de Coomassie después de realizar el *Western blot*, resulta de gran ayuda para confirmar la integridad de las proteínas presentes en la misma, así como para evaluar la normalización de la cantidad de proteína presente en los diferentes carriles. Para teñir la membrana, se colocó en la solución de tinción [40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético glacial, 0.025% (p/v) azul brillante de Coomassie] en un agitador orbital durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente, se hicieron varios lavados con la solución de destinción [40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético glacial] hasta eliminar el exceso de tinte en la membrana.

11.6 Inmunoprecipitación de maMYB y coimmunoprecipitación de maMYB y AtArv1

Para realizar los ensayos de inmunoprecipitación y coimmunoprecipitación, el material vegetal de partida se creció en medio de cultivo líquido. Un volumen aproximado de 20 μ L de semillas de *Arabidopsis* esterilizadas (apartado 1.3) se estratificaron (apartado 1.4) en *Erlenmeyers* de 250 mL con 35 mL de medio $\frac{1}{2}$ MS estéril (sin agar). Por cada línea de estudio se prepararon tres *Erlenmeyers* independientes con semillas. Posteriormente, los *Erlenmeyers* se trasladaron a una cámara de cultivo en condiciones ambientales controladas (22°C y 100 μ Einsteins $m^{-2} s^{-1}$ de intensidad lumínica), en fotoperiodo de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y en agitación constante de 80 rpm. Después de 7 días en la cámara de cultivo se procedió con el protocolo que se indica a continuación.

a. Preparación del tejido vegetal

Se lavó el tejido vegetal de cada *Erlenmeyer* tres veces con H₂O milliQ usando una pipeta Pasteur unida a un matraz Kitasato acoplado a vacío para aspirar el agua en cada lavado. Se juntaron los tejidos de los tres *Erlenmeyers* correspondientes a la misma muestra, se eliminó el exceso de agua cuidadosamente con papel de filtro y se pesó el tejido. Se colocó el tejido en un mortero enfriado sobre hielo, se añadió 1.25 µL de tampón de lisis frío 1.75x por cada mg de tejido y se trituró hasta obtener un lisado homogéneo. El lisado obtenido de las muestras trituradas se filtró a través de un embudo de filtración con papel Miracloth, recogiendo el filtrado en un tubo Falcon enfriado previamente y manteniendo los extractos en hielo hasta continuar con la inmunoprecipitación (apartado c).

Tampón de lisis 1.75x: 1.75x HEPES-KOH pH 7.0, 1.75 mM PMSF, 3.5 µg/mL aprotinina, 3.5 µg/mL leupeptina, 1.75 µg/mL pepstatina A, 6.125 µg/mL E64, 3.5 µg/mL antipaína, 3,5 mM 1,10-fenantrolina, 70% (p/v) de sacarosa (preparar en un volumen de H₂O mQ en torno al 30% del volumen total).

HEPES-KOH pH 7.0 10x: 0.5 M de HEPES y 1.5 M NaCl.

Soluciones stock de los inhibidores de proteasas: 100mM PMSF, 10 mg/mL aprotinina, 21 mM leupeptina, 1.46 mM pepstatina A, 1mM E64, 6 mg/mL antipaína y 200 mM 1,10-fenantrolina.

b. Equilibrado de la resina GFP-TrapA

Se debe empezar el equilibrado de la resina mientras se están triturando los tejidos (apartado a). En cada reacción de inmunoprecipitación, se añadieron 10 µL de la resina GFP-Trap-A (Chromotek) en 1 mL de tampón frío 1x HEPES-KOH pH 7.0 con 1% (p/v) BSA y se incubó en un agitador de noria durante 1h a 4°C. A continuación, se centrifugó a 2700 g durante 2 min a 4°C para recuperar la resina. Se lavó la resina con 1 mL de 1x tampón de lisis frío [1x HEPES-KOH pH 7.0, 1 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinina, 2 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL pepstatina A, 3.5 µg/mL E64, 2 µg/mL antipaína, 2 mM 1,10-fenantrolina, 40% (p/v) de sacarosa (preparar en un volumen de H₂O mQ en torno al 55% del volumen total)], mezclando con agitador vortex unos segundos, y se centrifugó a 2700 g durante 2 min a 4°C. Se lavó de nuevo la resina con 1x tampón de lisis fría, pero en este paso no se debe centrifugar en seguida, sino que se mantiene la resina en el tampón de lisis hasta el momento en que los lisados se encuentren listos para incubarse con la resina, como se indica en el apartado c.

c. Inmunoprecipitación

Se añadió a cada lisado (obtenido en el apartado a) la cantidad necesaria de 10% Tritón X-100 para conseguir la concentración de 0.2% y se incubaron los tubos en un agitador de noria durante 30 min a 4°C. A continuación, los lisados se colocaron en tubos Corex fríos, se centrifugaron a 19000 g durante 17 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes en tubos Falcon enfriados previamente. Se separaron 100 µL de cada lisado en un *Eppendorf* y se guardaron como muestra *input*. Se añadió a cada tubo del lisado la resina equilibrada recuperada por centrifugación del último lavado (apartado b). A continuación, la resina en presencia del extracto lisado, se incubó en un agitador de noria durante 2h a 4°C y se centrifugó a 2000 g durante 2 min a 4°C. En este paso, se separaron otros 100 µL del sobrenadante en un tubo *Eppendorf* y se guardó como muestra *unbound*. Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente sin tocar la resina del fondo del tubo. Seguidamente, se lavó la resina dos veces con 500 µL de tampón de lavado frío [1x HEPES-KOH pH 7.0, 0.25 mM PMSF, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 0.5 µg/mL pepstatina A, 1.75 µg/mL E64, 1 µg/mL antipaína, 1 mM 1,10-fenantrolina, 0.2% (v/v) Tween 20], en tubos *Eppendorf* mezclando suavemente unos segundos con agitador vortex y se centrifugó a 2000 g durante 2 min a 4°C. Se resuspendió la resina en 35 µL de tampón 2x de carga de electroforesis (preparado a partir del tampón de muestra 6x del apartado 11.5) y se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min. A continuación, se colocaron las muestras inmediatamente en hielo durante 2 min, se centrifugaron a 2700 g durante 2 min a 4°C, y el sobrenadante se colocó en un tubo *Eppendorf* que se guardó como muestra *bound*. Las muestras *input*, *unbound* y *bound* se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

En los experimentos de coinmunoprecipitación de maMYB y AtArv1, se sustituyó el tritón X-100 por IGEPAL a la concentración final de 0.1% (v/v) y se eliminó el Tween 20 del tampón de lavado.

Para analizar las muestras *input*, *unbound* y *bound* por *Western blot* se siguieron los mismos pasos indicados en el apartado 11.5 con algunas variaciones. Las muestras se prepararon por duplicado conteniendo 4 µL de tampón de muestra 6x, 2 µL de muestra en el caso de *input* y *unbound* y 20 µL en el caso de *bound*, y completando el volumen a 24 µL con H₂O milliQ. Tras calentar las muestras, éstas se fraccionaron por electroforesis en dos geles de poliacrilamida del 10%. Para la visualización de las proteínas de interés se emplearon el anticuerpo anti-péptido maMYB a la dilución 1:4000, el anticuerpo anti-GFP (Chromotek) a la dilución 1:3000 y el anticuerpo anti-HA (Santa Cruz) a la dilución 1:2000 como anticuerpos primarios, y se incubaron durante 3h. Como anticuerpos secundarios se

emplearon el anticuerpo IgG de conejo (Amersham) a la dilución 1:8000 y 1:4000 en el caso del anti-péptido maMYB y anti-HA, respectivamente, y el anticuerpo anti IgG de rata (Amersham) a la dilución 1:6000 en el caso del anti-GFP, y se incubaron durante 1.5h.

12. Métodos de histología y microscopía

12.1 Análisis de la actividad GUS

Para el análisis de la actividad GUS se emplearon plántulas de *Arabidopsis* de 8 días de edad siguiendo el protocolo que se indica a continuación, basado en Jefferson et al., 1987.

Se recogió cada plántula en un tupo *Eppendorf* y se cubrió con la cantidad suficiente de tampón de ensayo (500-600 μ L), preparado en el momento de su uso. Se colocaron los tubos con la tapa abierta en el interior de un desecador conectado a una bomba de vacío y se sometieron a vacío suave durante 5-10 min. A continuación, se incubaron las muestras a 37°C durante 24h. Transcurrido el tiempo, se eliminó el tampón de ensayo y se eliminaron los pigmentos verdes por medio de sucesivos lavados de las muestras con 70% de etanol (v/v) a temperatura ambiente. Se repitieron estos lavados, dejando alrededor de un día entre uno y otro, tantas veces como fue necesario hasta conseguir una decoloración total del tejido de las plántulas. Finalmente, se colocaron las plántulas con la ayuda de un poco de agua en un portaobjetos y un cubreobjetos, se observaron en campo claro en un estereomicroscopio Olympus SZX16 y se fotografiaron con una cámara Olympus DP71 acoplada al estereomicroscopio.

Tampón de ensayo GUS: 50 mM NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 pH 7.0, 0.5 mg/mL de X-Gluc, 1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (ferrocianuro de potasio), 1 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (ferricianuro de potasio) y 0.05% de Tritón X-100)

Soluciones stock: 0.1 M NaH_2PO_4 / 0.1 M Na_2HPO_4 pH 7.0 (NaOH), 10 mg/mL X-Gluc disuelto en metanol, 0.1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0.1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 10% (v/v) Tritón X-100.

12.2 Obtención de cortes transversales de raíz y análisis por microscopía óptica

Las raíces de Arabidopsis se incrustaron en 1% agarosa de bajo punto de fusión (p/v), y tras dejar secar durante 30 min se recortaron. Cada trozo de agarosa recortado se introdujo en un vial y tras cubrirlos con 1% glutaraldehído en 0.1 M de cacodilato sódico a pH 7.4 (Electron Microscopy Science), se fijaron a 4°C durante 16h (*overnight*). La solución de fijación se desechó y se lavaron las muestras dos veces con H₂O milliQ durante 10 min cada vez. Posteriormente, las muestras se fueron deshidratando mediante una serie de soluciones de etanol de concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 90% y 100%; v/v) durante 30 min cada una. A continuación, se lavaron con una solución 50% Histoiresina-I (1g Hardener-I / 100 mL Histoiresin, Technkovit) en etanol (v/v) durante 15 min a 4°C y seguidamente, con 100% Histoiresina-I durante 1h a 4°C. Finalmente, se lavaron con 100% Histoiresina-I durante 16h (*overnight*) a 4°C. Las muestras se colocaron en moldes de plástico que se rellenaron con 100% Histoiresina-II (200 µL Hardener-II / 3 mL Histoiresina-I, Technkovit). Cada molde se cubrió con parafilm y se guardó a 4°C durante 16h (*overnight*) para que solidificaran y formaran bloques duros.

Las secciones transversales (5 µm) se obtuvieron mediante un micrótomo RM2265 (Leica). Las secciones se tiñeron durante 30 segundos con 0.005% de azul de toluidina en 0.1 M NaPO₄ pH 7.0 (p/v), se lavaron con agua y se colocaron con la ayuda de un poco de agua en un portaobjetos. Tras evaporar a sequedad en una placa caliente, las muestras quedaron adheridas al portaobjetos y se visualizaron mediante el microscopio Zeiss Axiophot (40x).

12.3 Fotografía e imagen

Se utilizó la cámara Nikon D7000 acoplada a los objetivos AF-S NIKKOR 18-70 mm 1:3.5-4.5G y AF-S MICRO NIKKOR 105 mm 1:2.8G para fotografiar las colonias de levadura y los fenotipos de las líneas de Arabidopsis estudiadas en esta tesis. En el caso de las imágenes obtenidas de las raíces, para medir la longitud de éstas, se analizaron mediante el programa informático ImageJ.

El equipo LAS 4000 Fujifilm se utilizó en la captura de imágenes de Western Blot revelado con el kit ECL Plus (Amersham). Las imágenes obtenidas se editaron mediante el programa informático Photoshop CS (Adobe Systems).

12.4 Fotografía mediante microscopía de bajo aumento

Para fotografiar tejidos (raíz, pelos radiculares, plántulas de *Arabidopsis* y hojas de *Nicotiana*) a bajo aumento (5-20X), se utilizó un estereomicroscopio Olympus SZX16 provisto de una unidad de iluminación externa de luz blanca, o de fluorescencia en el caso de las hojas de *Nicotiana*, acoplado a una cámara Olympus DP71 conectada a un ordenador para el análisis de la imagen (Servicio de Microscopía, CRAG). Las imágenes obtenidas se editaron mediante el programa informático Photoshop CS (Adobe Systems).

12.5 Microscopía óptica

El microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara Olympus DP70 (Servicio de Microscopía, CRAG) se empleó con iluminación en campo claro y con los objetivos 40x (NEOFLUAR 40X/0,75 Ph2) y 20x (NEOFLUAR 20x/0,50 Ph2) para fotografiar los cortes transversales de raíz y las células epiteliales de los cotiledones de *Arabidopsis*, respectivamente. Las imágenes obtenidas se editaron mediante el programa informático Photoshop CS (Adobe Systems).

12.6 Microscopía láser confocal

En los análisis de localización subcelular y BiFC en *N. benthamiana* se utilizó el microscopio láser de escáner confocal Leica SP11 ubicado en la Unidad de Microscopía confocal de la Facultad de Biología (Serveis Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona). Transcurridos 2-3 días después de la agroinfiltración, las hojas de tabaco se observaron en primer lugar con una lupa Leica MZFLIII para seleccionar las zonas donde se observaba un mayor número de células fluorescentes, y posteriormente, el trozo seleccionado se recortó y se colocó con la ayuda de un poco de agua en un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos. Se observaron en el microscopio láser confocal con el objetivo de inmersión en agua 40x ó 63x y según las condiciones de excitación (láser) y emisión (filtro) que se indican en la Tabla 17 para la identificación de las diferentes proteínas fluorescentes. Los programas informáticos ImageJ y Photoshop CS (Adobe Systems) se utilizaron para obtener las imágenes finales por solapamiento de los planos del eje Z seleccionados, la combinación de dos imágenes finales (*merge*) y su posterior edición.

Tabla 17. Condiciones excitación / emisión

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
mGFP6	488	498 – 563
YFP	514	520 – 563
DsRed / mRFP	568	569 – 617

13. Análisis de esteroides

El proceso de análisis de esteroides en muestras provenientes de plántulas de *Arabidopsis* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Fraser et al., 2000 con algunas modificaciones.

En primer lugar, el material vegetal se trituró en presencia de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino homogéneo. Posteriormente, las muestras se liofilizaron durante 16h (*overnight*) y se conservaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta el momento de la extracción de esteroides, que se llevó a cabo siguiendo el siguiente procedimiento.

Se pesaron en tubos de vidrio pyrex (10x15 mm) entre 15-30 mg de tejido liofilizado y se agregaron 10 µL del patrón interno 5 α -colestano (1.2 mg/mL disuelto en hexano). A continuación, se añadieron 3 mL de diclorometano:metanol (2:1, v/v grado GC) y se sonicaron en un baño de agua durante 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó durante 3 min a 5000 rpm y se trasladaron los sobrenadantes a un tubo nuevo. Se repitió el proceso de extracción una vez más, se reunieron los dos extractos orgánicos obtenidos y se llevaron hasta sequedad con la ayuda de un Speed-Vac. Sobre los extractos secos se añadieron 1.5 mL de KOH al 7.5% en 95% de metanol, se mezcló bien con vortex y sonicación en un baño de agua durante 1 min. Se incubaron durante 16h (*overnight*) a temperatura ambiente para saponificar la fracción correspondiente a los ésteres de esteroles. A continuación, se añadieron 1.5 mL de H₂O milliQ para detener la saponificación y se extrajeron los esteroides libres añadiendo 3 mL de hexano mezclando en agitador vortex. Se centrifugaron durante 3 min a 5000 rpm a temperatura ambiente y se recuperaron las fases orgánicas. Se repitió el proceso de extracción una vez más, se reunieron las dos fases hexánicas y se evaporaron a sequedad con ayuda de un Speed-Vac. Los extractos secos correspondientes a los esteroides libres se guardaron a -20°C hasta proceder con la silanización. La derivatización de los esteroides libres extraídos de las muestras por silanización de los grupos –hidroxilo, se realizó añadiendo 50 µL de trimetilsilil e incubando

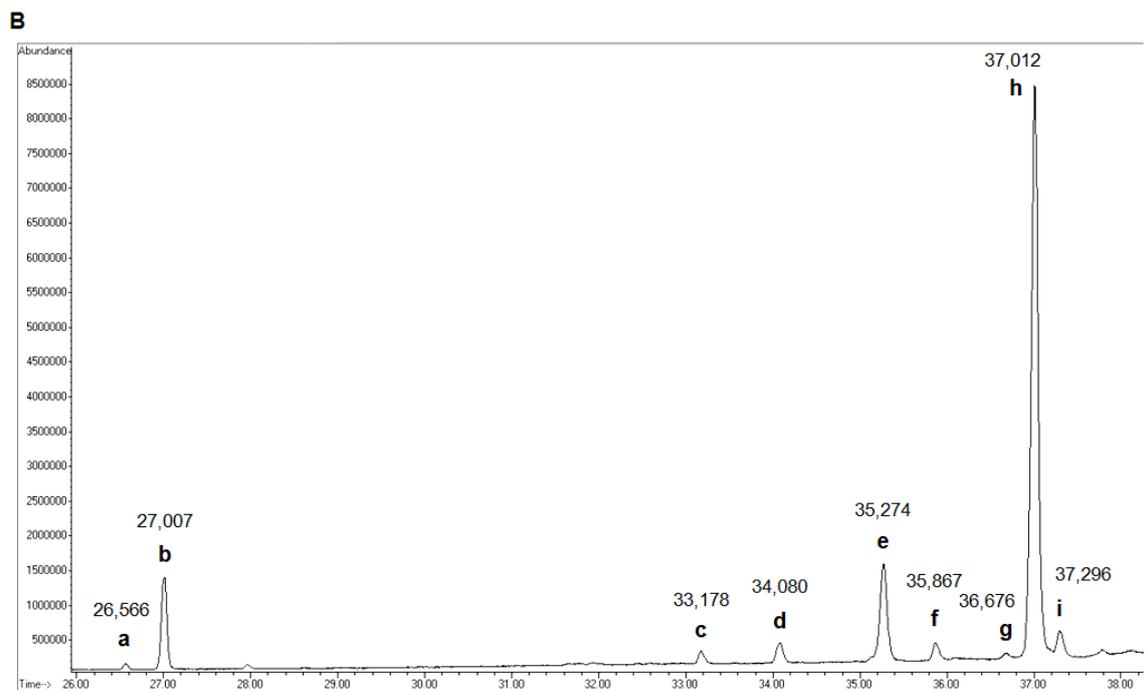
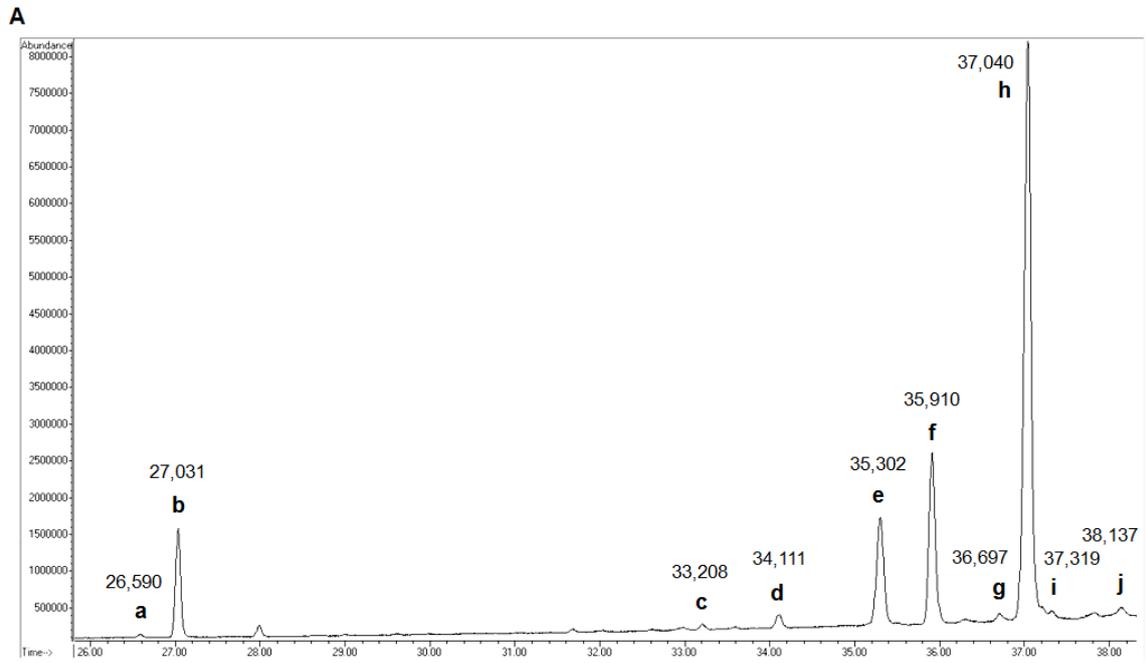
1h a 70°C. A continuación, se evaporó el reactivo silanizante de las muestras mediante el Speedvac y se resuspendieron en 100-150 µL de isoactano. Se analizó 1 µL del extracto silanizado mediante GC-MS en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas 7890A/5975C GC/MSD (Agilent technology). El sistema estaba equipado con una columna capilar DB-5MS (95% metilpolisiloxano y 5% de fenilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 µm de diámetro interno y 0.25 µm de tamaño de partícula (AWSCientific), y con un detector de ionización de llama (FID, *flame ionization detector*). Como gas portador se empleó helio a una velocidad de 2 mL/min. El sistema de inyección era manual con *splits* de 12.5:1. Las condiciones de la cromatografía se indican a continuación.

	Temperatura
Inyector	280°C
Detector	300°C
Horno	245°C 30 seg, 2°C/min hasta 265°C y 3.5°C/min hasta 290°C

La identificación de los perfiles obtenidos en el GC-MS (Figura 74) se realizó en base a los tiempos de retención relativos y por comparación con cromatografías y espectros de masas de estándares o de una base de datos incorporada en el software del equipo. En los cromatogramas, la integración de las áreas de los picos se realizó mediante el programa *MSD Productivity ChemStation* (Agilent) y la cuantificación se calculó a partir de las áreas de los picos por normalización interna, basado en el área relativa del pico del esteroles en cuestión respecto al área del 5α-colestano. Los resultados del contenido de esteroides se expresaron en µg por mg de peso seco (tejido liofilizado).

$$\frac{\text{Área esteroles}}{\text{Área 5}\alpha\text{-colestano}} = \frac{\text{Concentración esteroles}}{\text{Concentración 5}\alpha\text{-colestano}}$$

Figura 74. Cromatograma representativo correspondiente a los esteroides identificados de la raíz (A) y de la parte aérea (B) del mutante amiRNA 2 crecido en presencia del inductor metoxifenocida. Los compuestos identificados mediante espectrometría de masas son: **a**, escualeno; **b**, 5α-colestano (patrón interno); **c**, colesterol; **d**, brasicasterol; **e**, campesterol; **f**, estigmasterol; **g**, β-sitostanol; **h**, β-sitosterol; **i**, isofucosterol; **j**, cicloartenol (solo se pudo identificar en algunos cromatogramas de la raíz). Los tiempos de retención situados encima de su correspondiente pico se expresan en minutos.



El proceso de extracción y cuantificación de esteroides fue llevado a cabo por la Dra. Cristina Bortolotti, técnica superior encargada del servicio de metabolómica en el CRAG. El análisis se llevó a cabo con triplicados biológicos independientes.

14. Análisis transcriptómico por secuenciación masiva (*RNA-Seq*)

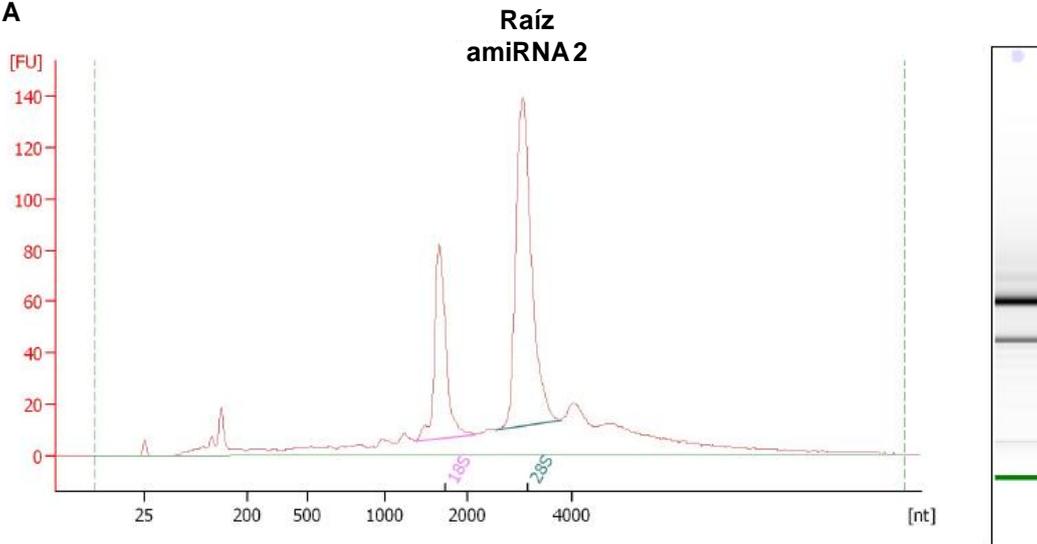
Existen diferentes métodos para evaluar el perfil de expresión génica. La tecnología de *RNA-Seq* (*RNA sequencing*), basada en la secuenciación del cDNA, ofrece varias ventajas respecto al *microarray*. En primer lugar, el *RNA-Seq* ofrece una mayor especificidad, y por lo tanto, es potencialmente mejor para la detección de expresión génica específica de alelo y eventos de *splicing* alternativo (Malone and Oliver, 2011). Al contrario que el *microarray*, el *RNA-Seq* no tiene límite superior para la cuantificación, lo que conlleva un mayor rango de niveles de expresión sobre los que se pueden detectar los transcritos (Wang et al., 2009). Además, el *RNA-Seq* requiere menor cantidad de RNA y los resultados muestran altos niveles de reproducibilidad, tanto para las réplicas técnicas como biológicas (Marioni et al., 2008). Por último, el *RNA-Seq* posee una tasa de falsos positivos más baja, convirtiéndose en el método más adecuado para la detección cualitativa y cuantitativa de expresión génica, y por lo tanto, para analizar los cambios transcriptómicos a una escala genómica (Ding et al., 2014).

Se analizó el transcriptoma del tejido de raíz y de parte aérea por separado de plántulas del mutante *amiRNA 2*, empleando la técnica de secuenciación masiva de la plataforma *HiSeq 2000 Illumina*. Para ello, las plántulas se crecieron en posición vertical en placas con medio ½ MS durante 8 días en condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad) en presencia y ausencia del inductor metoxifenocida.

14.1 Extracción, cuantificación y comprobación de la calidad del RNA

Aunque el *RNA-Seq* tiene menor variabilidad técnica que otras técnicas de análisis de expresión génica (Trapnell et al., 2012), la variabilidad biológica persevera. Ante la necesidad de reducir al máximo posible la variabilidad biológica, el RNA de cada muestra analizada procedía de la mezcla de cantidades equimoleculares de RNA total que provenía de las extracciones realizadas de tres réplicas independientes. Debido a que el RNA debe ser de alta pureza, a diferencia de las extracciones rutinarias de RNA, para este experimento de secuenciación masiva, el RNA se extrajo con el kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel), que incluye un tratamiento con DNAsa. Previo a la mezcla de los tres RNA, se determinó la integridad y concentración de RNA de cada réplica mediante el sistema de *Agilent 2100 Bioanalyzer*, que considera un valor de RIN (*RNA Integrity Number*) superior a 8 como la calidad suficiente para el análisis de expresión génica en una muestra (Schroeder et al., 2006). En nuestro caso todas las muestras se encontraban con un valor de RIN entre 8 y 10 (Figura 75).

A



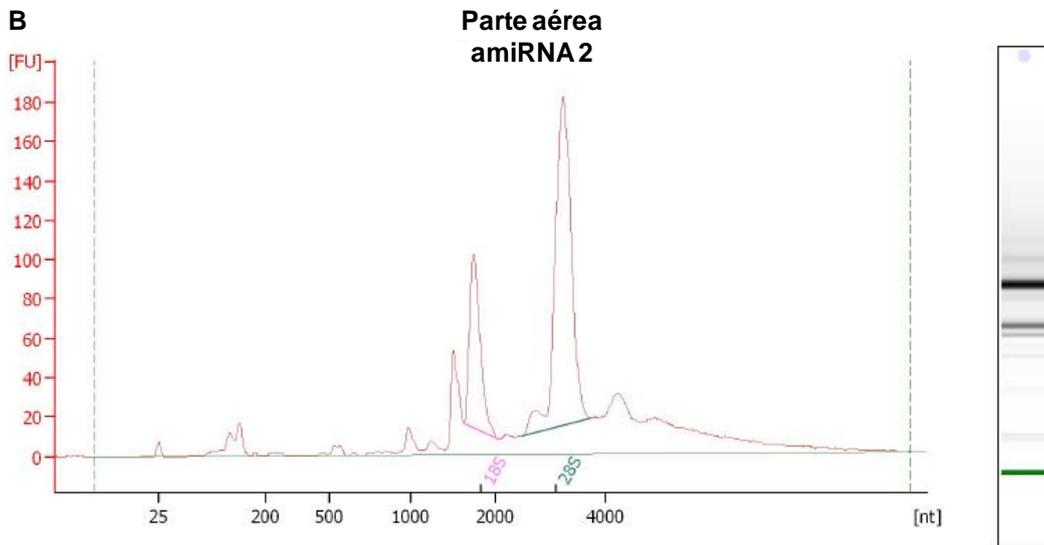
Overall Results for sample 10 :

RNA Area:	1,003.7	RNA Integrity Number (RIN):	9.3 (B.02.07)
RNA Concentration:	636 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.2	Result Flagging Label:	RIN: 9.30

Fragment table for sample 10 :

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,367	2,163	146.8	14.6
28S	2,552	3,781	316.7	31.6

B



Overall Results for sample 3 :

RNA Area:	1,248.6	RNA Integrity Number (RIN):	9 (B.02.07)
RNA Concentration:	791 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.5	Result Flagging Label:	RIN:9

Fragment table for sample 3 :

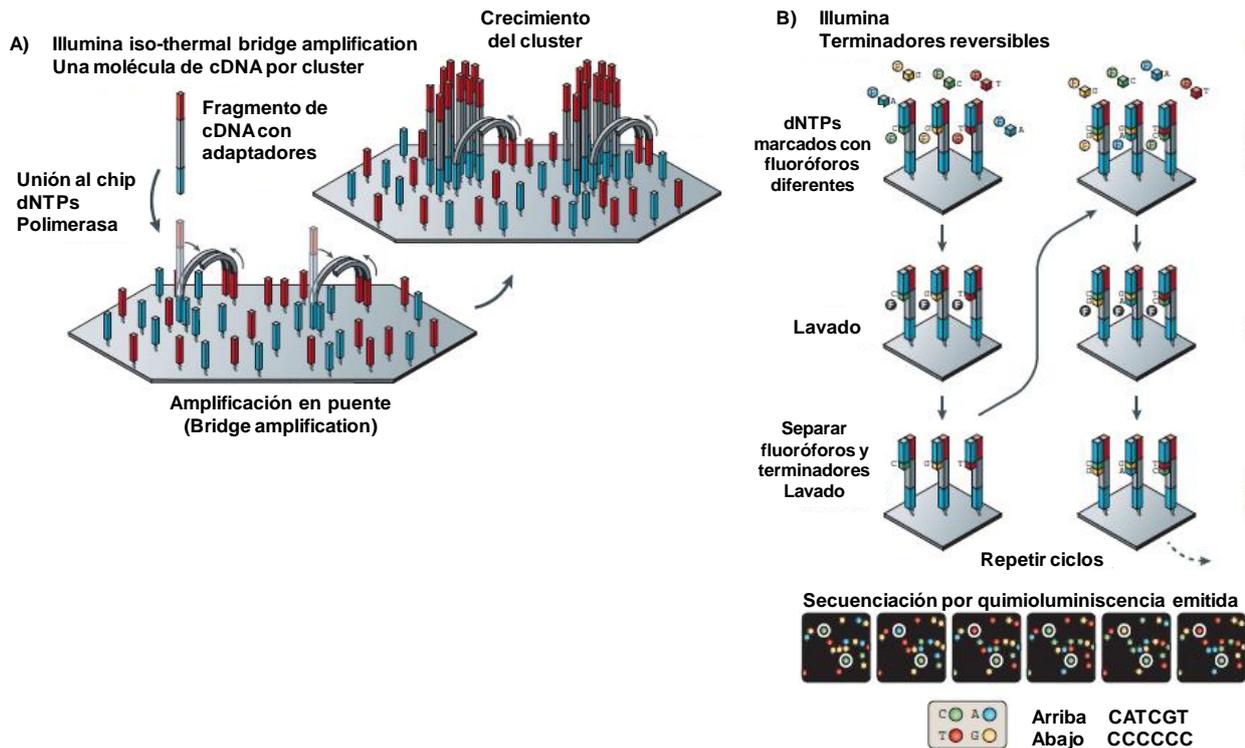
Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,631	2,039	160.1	12.8
28S	2,473	3,748	398.9	31.9

Figura 75. Electroferograma representativo correspondiente al RNA total extraído de una réplica de la raíz (A) y de la parte aérea (B) del mutante amiRNA 2 crecido en presencia del inductor metoxifenocida. En el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer las muestras de RNA total se separan electroforéticamente, y se analiza su integridad de acuerdo a la relación entre el rRNA 28S y 18S. Según unos algoritmos establecidos (Schroeder et al., 2006), la integridad del RNA se calcula como valor RIN (*RNA Integrity Number*), que va de 1 a 10, considerándose como aceptables valores superiores a 8. Al mismo tiempo también se calcula la concentración de RNA total.

14.2 Secuenciación masiva mediante la tecnología *Illumina RNA-Seq*

Previo al inicio de secuenciación de la plataforma *HiSeq 2000 Illumina* (Figura 76), a partir de la muestra de RNA total se obtuvo la población de RNA poli(A), que se transformó, mediante fragmentación usando cationes divalentes bajo elevada temperatura y posterior retrotranscripción, en una librería de fragmentos de cDNA, a los que se les unieron adaptadores en ambos extremos. Seguidamente, se seleccionaron los fragmentos de un determinado tamaño (80-250 bases), que se hibridaron a una superficie sólida (*flow cell*). Tras varios ciclos de PCR, cada molécula de cDNA molde se amplificó en puente (*iso-thermal bridge amplification*) generando clústers densos, que contienen más de 1000 moléculas, manteniendo la proporción inicial entre los transcritos. Posteriormente, empleando de forma cíclica nucleótidos terminadores reversibles marcados con fluoróforos, se sintetizó la cadena complementaria al fragmento de cDNA. A lo largo de cada ciclo de síntesis, los fragmentos se fueron secuenciando de forma masiva por cada extremo (*pair-end sequencing*) mediante la detección de la quimioluminiscencia emitida por los nucleótidos marcados, obteniéndose lecturas cortas de unas 76 bases (Wang et al., 2009; Metzker, 2010). Este proceso se llevó a cabo en el servicio de secuenciación masiva del CNAG (Centro Nacional de Análisis Genómico).

Figura 76. Proceso de secuenciación masiva de la plataforma *HiSeq 2000 Illumina*. **A)** Inmovilización en una superficie sólida (*flow cell*) del fragmento de cDNA unido a los adaptadores y amplificación en puente para generar clústers a partir de cada molécula de cDNA. **B)** Síntesis por ciclos con dNTPs terminadores reversibles marcados con fluoróforos distintos y secuenciación por la quimioluminiscencia emitida. Figura modificada a partir de Metzker, 2010.



14.3 Análisis bioinformático

Después de la secuenciación, se llevó a cabo un control de calidad y limpieza de las lecturas, que eliminó las secuencias de baja calidad (PHRED = 30, error \leq 0.001) y los adaptadores. Posteriormente, se seleccionaron las lecturas de tamaño mayor o igual a 36 nucleótidos y se descartaron aquellas lecturas que, aun habiendo superado todos los filtros, su pareja no había cumplido con los requisitos anteriores. Una vez superados los pasos anteriores, las lecturas se alinearon frente al genoma de referencia de *Arabidopsis* (TAIR10, www.arabidopsis.org) empleando los programas *Bowtie* y *TopHat* (Langmead et al., 2009; Trapnell et al., 2012). Por último, las lecturas se ensamblaron para producir un mapa de transcripción a nivel genómico, que consiste en el nivel de expresión de cada gen (Wang et al., 2009). Para el ensamblaje y la cuantificación de los transcritos se empleó el programa *Cufflinks* (Trapnell et al., 2012). Para comparar el transcriptoma del mutante amiRNA 2 con y sin inducción del silenciamiento de *maMYB*, se utilizó el programa *Cuffdiff*, una parte del paquete de *Cufflinks*, que toma las lecturas alineadas de las dos condiciones y realiza un informe sobre los genes expresados diferencialmente usando un análisis estadístico riguroso (Trapnell et al., 2012). Este proceso se llevó a cabo en la unidad de bioinformática del CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica).

La evaluación de la expresión diferencial se centró en la expresión general de genes, más que en la expresión específica de isoformas. Para poder llevar a cabo la comparación entre dos muestras, se utilizó el número de fragmentos mapeados del gen a comparar, normalizados según la longitud en kilobases del exón de dicho gen y los millones de fragmentos totales mapeados en la muestra (FPKM, *Fragment Per Kilobase of exon per Million fragments mapped*). De esta forma, la expresión diferencial se muestra como la división entre el FPKM asignado a un gen en cada muestra, es decir, número de veces que cambia (*fold change*). En ocasiones este valor se muestra en escala logarítmica en base 2 ($\log_2[\textit{fold change}]$). Basándose en el test estadístico Benjamini–Hochberg (Hochberg and Benjamini, 1990), Cuffdiff clasifica los genes según el valor p corregido para análisis múltiples (*q-value*), de forma que la diferencia de expresión asociada a un *q-value*<0.05 resulta estadísticamente significativo. Además, los genes escogidos debían presentar una expresión diferencial con *fold change* mayor que 2 o menor que –2.

Después de obtener los resultados de expresión diferencial, el siguiente paso lógico es interpretar las listas de genes en un contexto biológico, que pueda ayudar al entendimiento de los mecanismos biológicos subyacentes. En los últimos años se han desarrollado varios métodos y herramientas, que integran diferentes bases de datos y fuentes de información de diversa naturaleza (funcional, regulatoria o estructural), con el objetivo de encontrar grupos de genes con significado biológico similar y evaluar su relevancia estadística. Este proceso, conocido como análisis de enriquecimiento, emplea descriptores y anotaciones funcionales típicamente de fuentes como *Gene Ontology* (GO) (Ashburner et al., 2000) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa et al., 2008). Las herramientas para el análisis de enriquecimiento empleadas en este trabajo fueron GeneCodis3 (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) (Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012) y agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) (Du et al., 2010), en las que se empleó el test estadístico de distribución hipergeométrica con la corrección de Bonferroni para análisis múltiples, considerando como límite del nivel de significancia el valor de 0.05.

15. Herramientas bioinformáticas

En el presente trabajo se emplearon las siguientes herramientas bioinformáticas:

AgriGo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>)

Agris (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>)

Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>)

Athena (<http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>)

AtTFDB (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/>)

BAR (<http://142.150.214.117/welcome.htm>)

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/)

DATF (<http://datf.cbi.pku.edu.cn/>)

GeneCodis (<http://genecodis.cnb.csic.es/>)

Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/>)

GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>)

IDT (<http://eu.idtdna.com/site>)

Mapman (<http://mapman.gabipd.org/web/guest>)

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

PlnTFDB (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>)

ProP 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>)

Prosite Scan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/ps_scan/)

ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)

SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

Tair (<http://www.arabidopsis.org/>)

TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)

T-DNA express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>)

TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>)

Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>)

WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>)

BIBLIOGRAFÍA

- Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T., and Laux, T.** (2012). Plant stem cell niches. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 615–36.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y., Amasino, R., Scheres, B., Univ-me, U.M.R.C.C.E.A., and Paul, F.- Saint** (2004). of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**: 109–120.
- Albornos, L., Martín, I., Pérez, P., Marcos, R., Dopico, B., and Labrador, E.** (2012). Promoter activities of genes encoding β -galactosidases from Arabidopsis a1 subfamily. *Plant Physiol. Biochem.* **60**: 223–232.
- Alden, K.P., Dhondt-Cordelier, S., McDonald, K.L., Reape, T.J., Ng, C.K.-Y., McCabe, P.F., and Leaver, C.J.** (2011). Sphingolipid long chain base phosphates can regulate apoptotic-like programmed cell death in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**: 574–580.
- Amari, K. et al.** (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* **6**: e1001119.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., and Yadav, R.C.** (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. plants* **19**: 307–321.
- Aronel, V., Vergnolle, C., Cantrel, C., and Kader, J.** (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Sci.* **157**: 1–12.
- Ashburner, M. et al.** (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**: 25–29.
- Awai, K., Xu, C., Lu, B., and Benning, C.** (2006). Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the chloroplast. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 395–398.
- Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., and Simons, K.** (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 3254–3259.
- Bai, L., Zhang, G., Zhou, Y., Zhang, Z., Wang, W., Du, Y., Wu, Z., and Song, C.-P.** (2009a). Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca signalling, is required for abscisic acid responses in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **60**: 314–327.
- Bai, L., Zhou, Y., and Song, C.** (2009b). Arabidopsis proline-rich extensin-like receptor kinase 4 modulates the early event toward abscisic acid response in root tip growth. *Plant Signal. Behav.* **4**: 1075–1077.
- Bateman, A., Finn, R.D., Sims, P.J., Wiedmer, T., Biegert, A., and Söding, J.** (2009). Phospholipid scramblases and Tubby-like proteins belong to a new superfamily of membrane tethered transcription factors. *Bioinformatics* **25**: 159–162.
- Beck, J.G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S., and Dufourc, E.J.** (2007). Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* **21**: 1714–23.
- Beh, C.T. and Rine, J.** (2004). A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J. Cell Sci.* **117**: 2983–2996.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., and Feldmann, K.A.** (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* (80-.). **273**: 948–950.
- Benning, C.** (2008). A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog. Lipid Res.* **47**: 381–389.
- Benning, C., Xu, C., and Awai, K.** (2006). Non-vesicular and vesicular lipid trafficking involving plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 241–247.
- Benveniste, P.** (2002). Sterol metabolism. *Arabidopsis Book*.
- Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., and Scheres, B.** (1997). letters to nature Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**: 287–289.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2007). Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell* **19**: 148–162.
- Bevis, B.J. and Glick, B.S.** (2002). Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* **20**: 83–7.
- Bhat, R.A. and Panstruga, R.** (2005). Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5–19.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., and Ohad, N.** (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**: 419–427.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Braun, E.L. and Grotewold, E.** (1999). Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiol.* **121**: 21–24.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Schaller, H., Khafif, M., Schott, G., Bendahmane, A., and Voinnet, O.** (2012). Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 1778–1783.
- Bromley, P.E., Li, Y.O., Murphy, S.M., Sumner, C.M., and Lynch, D. V** (2003). Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **417**: 219–226.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L.** (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 11041–11048.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L.** (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391–398.
- Buer, C.S. and Djordjevic, M. a** (2009). Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* **60**: 751–763.
- Burce A. Stermer, Graciela M. Bianchini, and K.L.K.** (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J. Lipid Res.* **35**: 1133–1140.
- Busquets, A., Keim, V., Closa, M., del Arco, A., Boronat, A., Arró, M., and Ferrer, A.** (2008). Arabidopsis thaliana contains a single gene encoding squalene synthase. *Plant Mol. Biol.* **67**: 25–36.
- Cacas, J.-L., Furt, F., Le Guédard, M., Schmitter, J.-M., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J.-J., Simon-Plas, F., and Mongrand, S.** (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Prog. Lipid Res.* **51**: 272–299.
- Cai, K., Lucki, N.C., and Sewer, M.B.** (2014). Silencing diacylglycerol kinase-theta expression reduces steroid hormone biosynthesis and cholesterol metabolism in human adrenocortical cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**: 552–562.
- De Carbonnel, M., Davis, P., Roelfsema, M.R.G., Inoue, S.-I., Schepens, I., Lariguet, P., Geisler, M., Shimazaki, K.-I., Hangarter, R., and Fankhauser, C.** (2010). The Arabidopsis PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol.* **152**: 1391–1405.
- Carland, F., Fujioka, S., and Nelson, T.** (2010). The sterol methyltransferases SMT1, SMT2, and SMT3 influence Arabidopsis development through nonbrassinosteroid products. *Plant Physiol.* **153**: 741–756.
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A.** (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* **8**.
- Carvalho, A.D.O. and Gomes, V.M.** (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—a concise review. *Peptides* **28**: 1144–1153.
- Chandran, D., Tai, Y.C., Hather, G., Dewdney, J., Denoux, C., Burgess, D.G., Ausubel, F.M., Speed, T.P., and Wildermuth, M.C.** (2009). Temporal Global Expression Data Reveal Known and Novel Salicylate-Impacted Processes and Regulators Mediating Powdery Mildew Growth and Reproduction. *Plant Physiol.* **149**: 1435–1451.
- Chang, T.-Y. and Doolittle, G.M.** (1983). *Lipid Enzymology* (Elsevier).
- Chappell, J.** (1995a). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 521–547.
- Che, P., Bussell, J.D., Zhou, W., Estavillo, G.M., Pogson, B.J., and Smith, S.M.** (2010). Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis. *Sci. Signal.* **3**.
- Chelsky, D., Ralph, R., and Jonak, G.** (1989). Sequence Requirements for Synthetic Peptide-Mediated Translocation to the Nucleus. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2487–2492.
- Chen, G. and Zhang, X.** (2010). New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation. *Protein Sci.* **19**: 2015–2030.
- Chen, Y.-N., Slabaugh, E., and Brandizzi, F.** (2008). Membrane-tethered transcription factors in Arabidopsis thaliana: novel regulators in stress response and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 695–701.
- Clough, S.J. and Bent, a F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Clouse, S.D.** (2002). Arabidopsis Mutants Reveal Multiple Roles for Sterols in Plant Development. *Plant Cell* **14**: 1995–2000.

- Copic, A., Dorrington, M., Pagant, S., Barry, J., Lee, M.C.S., Singh, I., Hartman, J.L., and Miller, E. a** (2009). Genomewide analysis reveals novel pathways affecting endoplasmic reticulum homeostasis, protein modification and quality control. *Genetics* **182**: 757–769.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G.** (2000). Natural products (Secondary Metabolites). *Biochem. Mol. Biol. Plants*: 1250–1318.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta [w]. *Plant Physiol.* **133**: 462–469.
- Czech, C., Tremp, G., and Pradier, L.** (2000). Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog. Neurobiol.* **60**: 363–384.
- Davis, W.** (2014). The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates esterification of plasma membrane cholesterol by modulation of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**: 168–179.
- Demel, R.A. and De Kruffyff, B.** (1976). The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **457**: 109–32.
- Devaiah, B.N., Madhuvanhi, R., Karthikeyan, A.S., and Ragothama, K.G.** (2009). Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in Arabidopsis. *Mol. Plant* **2**: 43–58.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., and Le, D.P.** (1998). NEW INSECTICIDES WITH ECDYSTEROIDAL AND JUVENILE HORMONE ACTIVITY. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 545–569.
- Diaz-Rohrer, B.B., Levental, K.R., Simons, K., and Levental, I.** (2014). Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 8500–8505.
- Diener, a C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D., and Fink, G.R.** (2000). Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell* **12**: 853–870.
- Dietrich, C.R., Han, G., Chen, M., Berg, R.H., Dunn, T.M., and Cahoon, E.B.** (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* **54**: 284–298.
- Ding, M., Jiang, Y., Cao, Y., Lin, L., He, S., Zhou, W., and Rong, J.** (2014). Gene expression profile analysis of Ligon lintless-1 (Li1) mutant reveals important genes and pathways in cotton leaf and fiber development. *Gene* **535**: 273–285.
- Ding, Z., Li, S., An, X., Liu, X., Qin, H., and Wang, D.** (2009). Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in Arabidopsis thaliana. *J. Genet. genomics* **36**: 17–29.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**: 71–84.
- Du, H., Wang, Y.-B., Xie, Y., Liang, Z., Jiang, S.-J., Zhang, S.-S., Huang, Y.-B., and Tang, Y.-X.** (2013). Genome-wide identification and evolutionary and expression analyses of MYB-related genes in land plants. *DNA Res.* **20**: 437–448.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z.** (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res.* **38**: W64–W70.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **15**: 573–581.
- Duncan, E. a., Dave, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (1998). Second-site Cleavage in Sterol Regulatory Element-binding Protein Occurs at Transmembrane Junction as Determined by Cysteine Panning. *J. Biol. Chem.* **273**: 17801–17809.
- Dunkley, T.P.J. et al.** (2006). Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 6518–6523.
- Dunn, T.M., Lynch, D. V, Michaelson, L. V, and Napier, J. a** (2004). A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in Arabidopsis thaliana. *Ann. Bot.* **93**: 483–497.
- Dvoráková, M.** (2010). AtTRB1 , a telomeric DNA-binding protein from Arabidopsis , is concentrated in the nucleolus and shows highly dynamic association with chromatin. *Plant J.* **61**: 637–649.
- Dvoráková, L., Srba, M., Opatrny, Z., and Fischer, L.** (2012). Hybrid proline-rich proteins: novel players in plant cell elongation? *Ann. Bot.* **109**: 453–462.
- Edwards, P. a, Tabor, D., Kast, H.R., and Venkateswaran, A.** (2000). Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**: 103–113.

- Eisenkolb, M., Zenzmaier, C., Leitner, E., and Schneider, R.** (2002). A Specific Structural Requirement for Ergosterol in Long-chain Fatty Acid Synthesis Mutants Important for Maintaining Raft Domains in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **13**: 4414–4428.
- Escamilla-Treviño, L.L., Chen, W., Card, M.L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., and Poulton, J.E.** (2006). *Arabidopsis thaliana* beta-Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monoglignol glucosides. *Phytochemistry* **67**: 1651–1660.
- Eschenmoser, A. and Arigoni, D.** (2005). Revisited after 50 Years: The “Stereochemical Interpretation of the Biogenetic Isoprene Rule for the Triterpenes.” *Helv. Chim. Acta* **88**: 3011–3050.
- Evert, R.** (2006). *Esau’s Plant Anatomy Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development.* (John Wiley & Sons, Hoboken:).
- Fei, W., Alfaro, G., Muthusamy, B.-P., Klaassen, Z., Graham, T.R., Yang, H., and Beh, C.T.** (2008). Genome-wide analysis of sterol-lipid storage and trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **7**: 401–414.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L., and Grotewold, E.** (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* **66**: 94–116.
- Fetchko, M. and Stagljar, I.** (2004). Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions. *Methods* **32**: 349–362.
- Field, B., Fiston-Lavier, A.-S., Kemen, A., Geisler, K., Quesneville, H., and Osbourn, A.E.** (2011). Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 16116–16121.
- Field, B. and Osbourn, A.E.** (2008). Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science (80-)*. **320**: 543–547.
- Forés del Ruste, O.** (2007). *Metabolisme lipídic en plantes: Caracterització de la dehidrodoliquildifosfat sintasa 1 i de les proteïnes Arv d’ “a. thaliana”.*
- Forés, O., Arró, M., Pahissa, A., Ferrero, S., Germann, M., Stuke, J., McDonough, V., Nickels, J.T., Campos, N., and Ferrer, A.** (2006). *Arabidopsis thaliana* expresses two functional isoforms of Arvp, a protein involved in the regulation of cellular lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 725–735.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E.S., Holloway, D.E., and Bramley, P.M.** (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**: 551–558.
- 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., and 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**: 1617–1634.
- Fujita, M., Mizukado, S., Fujita, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Matsui, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**: 250–257.
- Gallo-Ebert, C., McCourt, P.C., Donigan, M., Villasmil, M.L., Chen, W., Pandya, D., Franco, J., Romano, D., Chadwick, S.G., Gyax, S.E., and Nickels, J.T.** (2012). Arv1 lipid transporter function is conserved between pathogenic and nonpathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 101–113.
- Gao, H., Brandizzi, F., Benning, C., and Larkin, R.M.** (2008). A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 16398–16403.
- Garay, E., Campos, S.E., González de la Cruz, J., Gaspar, A.P., Jinich, A., and Deluna, A.** (2014). High-resolution profiling of stationary-phase survival reveals yeast longevity factors and their genetic interactions. *PLoS Genet.* **10**.
- Garay-Arroyo, A. et al.** (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J.* **32**: 2884–2895.
- Geertsma, E.R., Nik Mahmood, N. a B., Schuurman-Wolters, G.K., and Poolman, B.** (2008). Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nat. Protoc.* **3**: 256–266.
- Georgiev, A.G., Johansen, J., Ramanathan, V.D., Sere, Y.Y., Beh, C.T., and Menon, A.K.** (2013). Arv1 regulates PM and ER membrane structure and homeostasis but is dispensable for intracellular sterol transport. *Traffic* **14**: 912–921.
- Gibbs, D.J. et al.** (2014). AtMYB93 is a novel negative regulator of lateral root development in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **203**: 1194–1207.
- Go, Y.S., Lee, S.B., Kim, H.J., Kim, J., Park, H.-Y., Kim, J.-K., Shibata, K., Yokota, T., Ohyama, K., Muranaka, T., Arseniyadis, S., and Suh, M.C.** (2012). Identification of marneral synthase, which is critical for growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **72**: 791–804.

- Gonda, T.J.** (1998). The c-Myb oncoprotein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**: 547–551.
- Goujon, T., Minic, Z., El Amrani, A., Lerouxel, O., Aletti, E., Lapierre, C., Joseleau, J.-P., and Jouanin, L.** (2003). AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *Plant J.* **33**: 677–690.
- Grandmougin-Ferjani, A., Schuler-Muller, I., and Hartmann, M.A.** (1997). Sterol Modulation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity from Corn Roots Reconstituted into Soybean Lipids. *Plant Physiol.* **113**: 163–174.
- Guan, X.L. et al.** (2009). Functional Interactions between Sphingolipids and Sterols in Biological Membranes Regulating Cell Physiology. *Mol. Biol. Cell* **20**: 2083–2095.
- Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voss, U., Jürgens, G., and Ito, M.** (2007). R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**: 1101–1110.
- Hartmann, M.** (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* **3**: 170–175.
- Hartmann, M.-A., Perret, A.-M., Carde, J.-P., Cassagne, C., and Moreau, P.** (2002). Inhibition of the sterol pathway in leek seedlings impairs phosphatidylserine and glucosylceramide synthesis but triggers an accumulation of triacylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1583**: 285–296.
- He, J., Fujioka, S., Li, T., Kang, S.G., Seto, H., Takatsuto, S., Yoshida, S., and Jang, J.** (2003). Sterols Regulate Development and Gene Expression in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiol.* **131**: 1258–1269.
- Hellens, R., Mullineaux, P., and Klee, H.** (2000). Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* **5**: 446–51.
- Helm, M., Schmid, M., Hierl, G., Terneus, K., Tan, L., Lottspeich, F., Kieliszewski, M.J., and Gietl, C.** (2008). KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds. *Am. J. Bot.* **95**: 1049–1062.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J.** (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol.* **6**.
- Hillig, I., Leipelt, M., Ott, C., Zähringer, U., Warnecke, D., and Heinz, E.** (2003). Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **553**: 365–369.
- Hochberg, Y. and Benjamini, Y.** (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat. Med.* **9**: 811–818.
- Holmberg, N., Harker, M., Gibbard, C.L., Wallace, A.D., Clayton, J.C., Rawlins, S., Hellyer, A., and Safford, R.** (2002). Sterol C-24 Methyltransferase Type 1 Controls the Flux of Carbon into Sterol Biosynthesis in Tobacco Seed. *Plant Physiol.* **130**: 303–311.
- Hong, S.M., Bahn, S.C., Lyu, A., Jung, H.S., and Ahn, J.H.** (2010). Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1694–1706.
- Hoppe, T., Rape, M., and Jentsch, S.** (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 344–348.
- Irshad, M., Canut, H., Borderies, G., Pont-Lezica, R., and Jamet, E.** (2008). A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* **8**.
- Ito, M.** (2005). Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J. Plant Res.* **118**: 61–69.
- Iwata, Y., Fedoroff, N. V., and Koizumi, N.** (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell* **20**: 3107–3121.
- Iwata, Y. and Koizumi, N.** (2005). An *Arabidopsis* transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 5280–5285.
- Iwata, Y. and Koizumi, N.** (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.* **17**: 720–727.
- Jakoby, M.J., Falkenhan, D., Mader, M.T., Brininstool, G., Wischnitzki, E., Larkin, J., Schnittger, A., Platz, N., Hudson, A., and Hu, M.** (2008). Transcriptional Profiling of Mature *Arabidopsis* Trichomes Reveals That NOECK Encodes the MIXTA-Like Transcriptional Regulator MYB106. *Plant Physiol.* **148**: 1583–1602.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: β -glucuronidase. *EMBO J.* **6**: 3901–3907.
- Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X., and Peterson, T.** (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene* **326**: 13–22.

- Jones, M. a, Raymond, M.J., and Smirnov, N.** (2006). Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **45**: 83–100.
- José-Estanyol, M., Gomis-Rüth, F.X., and Puigdomènech, P.** (2004). The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 355–365.
- Kader, J.-C.** (1997). Lipid-transfer proteins : a puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci.* **2**: 66–70.
- Kaffman, A. and O’Shea, E.K.** (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 291–339.
- Kajiwara, K., Watanabe, R., Pichler, H., Ihara, K., Murakami, S., Riezman, H., and Funato, K.** (2008). Yeast ARV1 Is Required for Efficient Delivery of an Early GPI Intermediate to the First Mannosyltransferase during GPI Assembly and Controls Lipid Flow from the Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol.* **19**: 2069–2082.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., Kawashima, S., Okuda, S., Tokimatsu, T., and Yamanishi, Y.** (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* **36**: D480–D484.
- Kang, Y.H., Kirik, V., Hulskamp, M., Nam, K.H., Hagely, K., Lee, M.M., and Schiefelbein, J.** (2009). The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis. *Plant Cell* **21**: 1080–1094.
- Karlsson, K.A. and Larson, G.** (1982). Aspects of the future for the analysis of glycosphingolipid mixtures. *Adv. Exp. Med. Biol.* **152**: 15–21.
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S.K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., and Bansal, K.C.** (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* **13**.
- Keim, A.V.B.** (2012). Metabolismo lipídico en “*Arabidopsis thaliana*”: Caracterización de mutantes “arv” y de las isoenzimas farnesildifosfato sintasa citosólicas.
- Kenrick, P. and Crane, P.R.** (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**: 33–39.
- Ketelaar, T.** (2013). The actin cytoskeleton in root hairs: all is fine at the tip. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 749–756.
- Kim, H.B., Schaller, H., Goh, C., Kwon, M., Choe, S., An, C.S., Durst, F., and Feldmann, K.A.** (2005). *Arabidopsis cyp51* Mutant Shows Postembryonic Seedling Lethality Associated with Lack of Membrane Integrity 1. *Plant Physiol.* **138**: 2033–2047.
- Kim, S.-G., Kim, S.-Y., and Park, C.-M.** (2007a). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Planta* **226**: 647–54.
- Kim, S.-G., Lee, S., Seo, P.J., Kim, S.-K., Kim, J.-K., and Park, C.-M.** (2010). Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Genomics* **95**: 56–65.
- Kim, S.-Y., Kim, S.-G., Kim, Y.-S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.-K., and Park, C.-M.** (2007b). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* **35**: 203–213.
- Kim, Y.-S., Kim, S.-G., Park, J.-E., Park, H.-Y., Lim, M.-H., Chua, N.-H., and Park, C.-M.** (2006). A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3132–3144.
- Kinch, L.N., Ginalski, K., and Grishin, N. V** (2006). Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci.* **15**: 84–93.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B.** (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res.* **40**: D1211–D1215.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M., and Friml, J.** (2006). Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **18**: 3171–3181.
- Koo, J.C., Asurmendi, S., Bick, J., Woodford-Thomas, T., and Beachy, R.N.** (2004). Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**: 439–448.
- Kuhn, B.M., Geisler, M., Bigler, L., and Ringli, C.** (2011). Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 585–595.
- Kushiro, M., Nakano, T., Sato, K., Yamagishi, K., Asami, T., Nakano, a, Takatsuto, S., Fujioka, S., Ebizuka, Y., and Yoshida, S.** (2001). Obtusifoliol 14 α -demethylase (CYP51) antisense *Arabidopsis* shows slow growth and long life. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 98–104.
- Kwak, S.-H. and Schiefelbein, J.** (2007). The role of the SCRAMBLED receptor-like kinase in patterning the *Arabidopsis* root epidermis. *Dev. Biol.* **302**: 118–131.

- Lalonde, S., Ehrhardt, D.W., Loqué, D., Chen, J., Rhee, S.Y., and Frommer, W.B.** (2008). Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J.* **53**: 610–635.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L.** (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W., and Lange, M.** (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 6866–6871.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P.** (2011). Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res.* **18**: 263–276.
- Lee, M.M. and Schiefelbein, J.** (2002). Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**: 611–8.
- Lee, M.M. and Schiefelbein, J.** (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**: 473–483.
- Li, H., Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (2011). Identical amino acid substitutions in the repression domain of auxin/indole-3-acetic acid proteins have contrasting effects on auxin signaling. *Plant Physiol.* **155**: 1252–1263.
- Li, J., Zhang, J., Wang, X., and Chen, J.** (2010). A membrane-tethered transcription factor ANAC089 negatively regulates floral initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. China. Life Sci.* **53**: 1299–1306.
- Li, L., Zhang, C., Xu, D., Schläppi, M., and Xu, Z.-Q.** (2012). Expression of recombinant EARL11, a hybrid proline-rich protein of *Arabidopsis*, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the growth of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **506**: 50–61.
- Libault, M., Brechenmacher, L., Cheng, J., Xu, D., and Stacey, G.** (2010). Root hair systems biology. *Trends Plant Sci.* **15**: 641–650.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., and Schwender, J.** (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* **101**: 643–652.
- Lindsey, K., Pullen, M.L., and Topping, J.F.** (2003). Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends Plant Sci.* **8**: 521–525.
- Liu, J., Elmore, J.M., Fuglsang, A.T., Palmgren, M.G., Staskawicz, B.J., and Coaker, G.** (2009). RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol.* **7**.
- Liu, J.-X. and Howell, S.H.** (2010). Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* **22**: 2930–2942.
- Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H.** (2007a). An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell* **19**: 4111–4119.
- Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H.** (2007b). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J.* **51**: 897–909.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lynch, D. V and Dunn, T.M.** (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol.* **161**: 677–702.
- Malone, J.H. and Oliver, B.** (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Mol. Biol.* **9**.
- Mansfield, T. a, Schultes, N.P., and Mourad, G.S.** (2009). AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **583**: 481–486.
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M., and Gilad, Y.** (2008). RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome* **18**: 1509–1517.
- Markham, J.E. and Jaworski, J.G.** (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 1304–1314.

- Martin Souter, Jennifer Topping, Margaret Pullen, Jiri Friml, Klaus Palme, Rachel Hackett, Don Grierson, and K.L.** (2002). *hydra* Mutants of *Arabidopsis* Are Defective in Sterol Profiles and Auxin and Ethylene Signaling. *Plant Cell* **14**: 1017–1031.
- Martínez-Andújar, C., Ordiz, M.I., Huang, Z., Nonogaki, M., Beachy, R.N., and Nonogaki, H.** (2011). Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 17225–17229.
- Maxfield, F.R. and van Meer, G.** (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 422–429.
- Maxfield, F.R. and Menon, A.K.** (2006). Intracellular sterol transport and distribution. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 379–385.
- McElver, J. et al.** (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 1751–1763.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1015–1026.
- Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.-D., Hartmann, M.-A., Moritz, T., and Grebe, M.** (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* **10**: 237–44.
- Metzker, M.L.** (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 31–46.
- Miller, J.P., Lo, R.S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Noble, W.S., and Fields, S.** (2005). Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 12123–12128.
- Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y., and Uemura, M.** (2009). Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* **50**: 341–359.
- Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M.** (2009). Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1232–1248.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.-Y., and Helariutta, Y.** (2013). Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J.* **32**: 178–93.
- Mu, R.-L. et al.** (2009). An R2R3-type transcription factor gene *AtMYB59* regulates root growth and cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Cell Res.* **19**: 1291–1304.
- Muday, G.K., Rahman, A., and Binder, B.M.** (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends Plant Sci.* **17**: 181–195.
- Müller, M. and Schmidt, W.** (2004). Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**: 409–419.
- Nagashima, Y., Mishiba, K.-I., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., and Koizumi, N.** (2011). *Arabidopsis* IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Sci. Rep.* **1**: 1–29.
- Neumann, M. and Naumann, M.** (2007). Beyond I κ Bs: alternative regulation of NF- κ B activity. *FASEB J.* **21**: 2642–2654.
- Ng, C.K., Carr, K., McAinsh, M.R., Powell, B., and Hetherington, A.M.** (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**: 596–599.
- Ng, S. et al.** (2013). A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 3450–3471.
- Nieto, B., Forés, O., Arró, M., and Ferrer, A.** (2009). *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry* **70**: 53–59.
- Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B.A.H., Fasolino, A., Hilbers, C.W., Derksen, J., and Mariani, C.** (2005). Lipid Transfer Proteins Enhance Cell Wall Extension in Tobacco. *Plant Cell* **17**: 2009–2019.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A.** (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* **37**: W317–W322.
- Nomoto, Y., Nomoto, Y., Kubozono, S., Yamashino, T., Nakamichi, N., and Mizuno, T.** (2012). Circadian clock- and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1950–1964.
- O'Brien, M., Chantha, S., Rahier, A., and Matton, D.P.** (2005). Lipid Signaling in Plants . Cloning and Expression Analysis of the *Obtusifolius 14 a* -Demethylase from *Solanum chacoense* Bitt ., a Pollination- and

- Fertilization-Induced Gene with Both Obtusifoliol and Lanosterol Demethylase Activity 1. *Plant Physiol.* **139**: 734–749.
- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S., and Sarai, A.** (1996). The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 178–187.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D.** (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* **53**: 674–690.
- Ovecka, M., Berson, T., Beck, M., Derksen, J., Samaj, J., Baluska, F., and Lichtscheidl, I.K.** (2010). Structural sterols are involved in both the initiation and tip growth of root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 2999–3019.
- Padidam, M., Gore, M., Lu, D.L., and Smirnova, O.** (2003). Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. *Transgenic Res.* **12**: 101–109.
- Page, J.E., Hause, G., Raschke, M., Gao, W., Zenk, M.H., and Kutchan, T.M.** (2004). Functional Analysis of the Final Steps of the 1-Deoxy- D -xylulose 5-phosphate (DXP) Pathway to Isoprenoids in Plants Using Virus-Induced. *Plant Physiol.* **134**: 1401–1413.
- Parsons, A.B., Brost, R.L., Ding, H., Li, Z., Zhang, C., Sheikh, B., Brown, G.W., Kane, P.M., Hughes, T.R., and Boone, C.** (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* **22**: 62–69.
- Pata, M.O., Hannun, Y. a, and Ng, C.K.-Y.** (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* **185**: 611–630.
- Pauluzzi, G., Divol, F., Puig, J., Guiderdoni, E., Dievart, a, and Périn, C.** (2012). Surfing along the root ground tissue gene network. *Dev. Biol.* **365**: 14–22.
- Paz-ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Petersont, A., and Saedler, H.** (1987). products and with structural similarities. *EMBO J.* **6**: 3553–3558.
- Pei, W., Du, F., Zhang, Y., He, T., and Ren, H.** (2012). Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Sci.* **187**: 10–18.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., and Delmer, D.** (2002). Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* **295**: 147–150.
- Petrásek, J. and Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675–2688.
- Petroni, K., Falasca, G., Calvenzani, V., Allegra, D., Stolfi, C., Fabrizi, L., Altamura, M.M., and Tonelli, C.** (2008). The AtMYB11 gene from *Arabidopsis* is expressed in meristematic cells and modulates growth in planta and organogenesis in vitro. *J. Exp. Bot.* **59**: 1201–1213.
- Pike, L.J.** (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**: 655–667.
- Pittet, M. and Conzelmann, A.** (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**: 405–420.
- Pollmann, S., Müller, A., Piotrowski, M., and Weiler, E.W.** (2002). Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 155–161.
- Pontes, O. and Pikaard, C.S.** (2008). siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**: 197–203.
- Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Taconnat, L., Ferrer, A., Dolan, L., Valpuesta, V., and Botella, M. a** (2009). Identification of the *Arabidopsis* *dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J.* **59**: 63–76.
- Prouse, M.B. and Campbell, M.M.** (2012). The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**: 67–77.
- Pullen, M., Clark, N., Zarinkamar, F., Topping, J., and Lindsey, K.** (2010). Analysis of vascular development in the hydra sterol biosynthetic mutants of *Arabidopsis*. *PLoS One* **5**.
- Qian, P., Han, B., Forestier, E., Hu, Z., Gao, N., Lu, W., Schaller, H., Li, J., and Hou, S.** (2013). Sterols are required for cell-fate commitment and maintenance of the stomatal lineage in *Arabidopsis*. *Plant J.* **74**: 1029–1044.
- Raffaele, S. et al.** (2009a). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**: 1541–1555.
- Raffaele, S., Leger, A., and Roby, D.** (2009b). Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signal. Behav.* **4**: 94–99.

- Rape, M. and Jentsch, S.** (2004). Productive RUPture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**: 209–213.
- Raven, J. a and Edwards, D.** (2001). Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Exp. Bot.* **52**: 381–401.
- Raychaudhuri, S. and Prinz, W.A.** (2010). The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**: 157–177.
- Riechmann, J.L.** (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview. *Arab. B.* **1**.
- Rodríguez-Concepción, M.** (2006). Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochem. Rev.* **5**: 1–15.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., and Rodríguez-Concepción, M.** (2009). Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **60**: 424–435.
- Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portolés, S., Rodríguez-Concepción, M., and Martínez-García, J.F.** (2007). Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO J.* **26**: 4756–4767.
- Romano, J.M., Dubos, C., Prouse, M.B., Wilkins, O., Hong, H., Poole, M., Kang, K.-Y., Li, E., Douglas, C.J., Western, T.L., Mansfield, S.D., and Campbell, M.M.** (2012). AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor, functions as a pleiotropic regulator via a small gene network. *New Phytol.* **195**: 774–786.
- Ron, D. and Walter, P.** (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 519–529.
- Rösti, J., Barton, C.J., Albrecht, S., Dupree, P., Pauly, M., Findlay, K., Roberts, K., and Seifert, G.J.** (2007). UDP-glucose 4-epimerase isoforms UGE2 and UGE4 cooperate in providing UDP-galactose for cell wall biosynthesis and growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1565–1579.
- Ruggles, K. V et al.** (2014). A functional, genome-wide evaluation of liposensitive yeast identifies the “ARE2 required for viability” (ARV1) gene product as a major component of eukaryotic fatty acid resistance. *J. Biol. Chem.* **289**: 4417–4431.
- Ruiz-ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-abella, D., López-moya, J.J., Lo, D., and Jose, J.** (2005). Structural Analysis of Tobacco Etch Potyvirus HC-Pro Oligomers Involved in Aphid Transmission Structural Analysis of Tobacco Etch Potyvirus HC-Pro Oligomers Involved in Aphid Transmission †. *J. Virol.* **79**: 3758–3765.
- Sannerud, R. and Annaert, W.** (2009). Trafficking, a key player in regulated intramembrane proteolysis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 183–190.
- Santi, S. and Schmidt, W.** (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* **183**: 1072–1084.
- Schaller, H.** (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 465–476.
- Schaller, H.** (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* **42**: 163–175.
- Schattat, M., Barton, K., Baudisch, B., Klösgen, R.B., and Mathur, J.** (2011). Plastid stromule branching coincides with contiguous endoplasmic reticulum dynamics. *Plant Physiol.* **155**: 1667–1677.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek, P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475–2487.
- Schiefelbein, J. and Lee, M.M.** (2006). A novel regulatory circuit specifies cell fate in the *Arabidopsis* root epidermis. *Physiol. Plant.* **126**: 503–510.
- Schrack, K., Debolt, S., and Bulone, V.** (2012). Deciphering the molecular functions of sterols in cellulose biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **3**.
- Schrack, K., Fujioka, S., Takatsuto, S., Stierhof, Y.-D., Stransky, H., Yoshida, S., and Jürgens, G.** (2004). A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J.* **38**: 227–243.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T.** (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D.** (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cell* **8**: 517–527.
- Selkoe, D. and Kopan, R.** (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**: 565–597.

- Seo, P.J.** (2014). Recent advances in plant membrane-bound transcription factor research: emphasis on intracellular movement. *J. Integr. Plant Biol.* **56**: 334–342.
- Seo, P.J., Hong, S.-Y., Kim, S.-G., and Park, C.-M.** (2011). Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends Plant Sci.* **16**: 541–549.
- Seo, P.J., Kim, M.J., Song, J.-S., Kim, Y.-S., Kim, H.-J., and Park, C.-M.** (2010). Proteolytic processing of an Arabidopsis membrane-bound NAC transcription factor is triggered by cold-induced changes in membrane fluidity. *Biochem. J.* **427**: 359–367.
- Seo, P.J., Kim, S.-G., and Park, C.-M.** (2008). Membrane-bound transcription factors in plants. *Trends Plant Sci.* **13**: 550–556.
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.-Y., Lee, Y.N., Kim, S.-G., Lee, Y.-H., Park, W.J., and Park, C.-M.** (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **151**: 275–289.
- Sessions, A. et al.** (2002). GENOMICS ARTICLE A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell* **14**: 2985–2994.
- Shaw, P. and Brown, J.** (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol.* **158**: 44–51.
- Shechtman, C.F., Henneberry, A.L., Seimon, T. a, Tinkelenberg, A.H., Wilcox, L.J., Lee, E., Fazlollahi, M., Munkacsi, A.B., Bussemaker, H.J., Tabas, I., and Sturley, S.L.** (2011). Loss of subcellular lipid transport due to ARV1 deficiency disrupts organelle homeostasis and activates the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **286**: 11951–11959.
- Shi, Y., Zhang, X., Xu, Z.-Y., Li, L., Zhang, C., Schläppi, M., and Xu, Z.-Q.** (2011). Influence of EARL1-like genes on flowering time and lignin synthesis of Arabidopsis thaliana. *Plant Biol.* **13**: 731–739.
- Shin, G., Veen, M., Stahl, U., and Lang, C.** (2012). Overexpression of genes of the fatty acid biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **29**: 371–383.
- Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K. a, Tiwari, S.B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J., and Schachtman, D.P.** (2007). The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *Plant Cell* **19**: 2440–2453.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M.** (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 410–417.
- Shiu, S., Shih, M., and Li, W.** (2005). Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals 1. *Plant Physiol.* **139**: 18–26.
- Sieberer, B.J., Ketelaar, T., Esseling, J.J., and Emons, A.M.C.** (2005). Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytol.* **167**: 711–719.
- Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P., and Mongrand, S.** (2011). An update on plant membrane rafts. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 642–649.
- Slabaugh, E., Held, M., and Brandizzi, F.** (2011). Control of root hair development in Arabidopsis thaliana by an endoplasmic reticulum anchored member of the R2R3-MYB transcription factor family. *Plant J.* **67**: 395–405.
- Smalle, J. and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 555–590.
- Souter, M., Topping, J., Pullen, M., Friml, J., Palme, K., Hackett, R., Grierson, D., and Lindsey, K.** (2002). hydra Mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell* **14**: 1017–1031.
- Sperling, P. and Heinz, E.** (2003). Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1632**: 1–15.
- Srivastava, R., Chen, Y., Deng, Y., Brandizzi, F., and Howell, S.H.** (2012). Elements proximal to and within the transmembrane domain mediate the organelle-to-organelle movement of bZIP28 under ER stress conditions. *Plant J.* **70**: 1033–1042.
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A.G., and Howell, S.H.** (2013). BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1416–1429.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S.** (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5187–5192.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447–456.

- Swain, E., Baudry, K., Stuke, J., McDonough, V., Germann, M., and Nickels, J.T.** (2002a). Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 26177–26184.
- Swain, E., Stuke, J., McDonough, V., Germann, M., Liu, Y., Sturley, S.L., and Nickels, J.T.** (2002b). Yeast cells lacking the ARV1 gene harbor defects in sphingolipid metabolism. Complementation by human ARV1. *J. Biol. Chem.* **277**: 36152–36160.
- Swarup, R. and Péret, B.** (2012). AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. *Front. Plant Sci.* **3**: 225.
- Szczesna-Skorupa, E. and Kemper, B.** (2006). BAP31 is involved in the retention of cytochrome P450 2C2 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **281**: 4142–4148.
- Tabas, I., Weiland, D.A., and Tall, A.R.** (1986). Inhibition of Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyl Transferase in J774 Macrophages Enhances Down-regulation of the Low Density Lipoprotein Receptor and 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase and Prevents Low Density Lipoprotein-induced Cholesterol Ac. *J. Biol. Chem.* **261**: 3147–3155.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A.** (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* **40**: W478–W483.
- Tajima, H., Iwata, Y., Iwano, M., Takayama, S., and Koizumi, N.** (2008). Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**: 242–247.
- Takahashi, K., Shimada, T., Kondo, M., Tamai, A., Mori, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2010). Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 123–131.
- Tamura, T., Kuroda, M., Oikawa, T., Kyozuka, J., Terauchi, K., Ishimaru, Y., Abe, K., and Asakura, T.** (2009). Signal peptide peptidases are expressed in the shoot apex of rice, localized to the endoplasmic reticulum. *Plant Cell Rep.* **28**: 1615–1621.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., and Friml, J.** (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell. Mol. life Sci.* **63**: 2738–2754.
- Thevissen, K., Ayscough, K.R., Aerts, A.M., Du, W., De Brucker, K., Meert, E.M.K., Ausma, J., Borgers, M., Cammue, B.P. a, and François, I.E.J. a** (2007). Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *J. Biol. Chem.* **282**: 21592–21597.
- Thomas, C.L., Bayer, E.M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., and Maule, A.J.** (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol.* **6**.
- Tian, Q., Uhlir, N.J., and Reed, J.W.** (2002). Arabidopsis SHY2 / IAA3 Inhibits Auxin-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* **14**: 301–319.
- Tinkelenberg, a H., Liu, Y., Alcantara, F., Khan, S., Guo, Z., Bard, M., and Sturley, S.L.** (2000). Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1. *J. Biol. Chem.* **275**: 40667–40670.
- Titapiwatanakun, B. et al.** (2009). ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J.* **57**: 27–44.
- Tong, F., Billheimer, J., Shechtman, C.F., Liu, Y., Crooke, R., Graham, M., Cohen, D.E., Sturley, S.L., and Rader, D.J.** (2010). Decreased expression of ARV1 results in cholesterol retention in the endoplasmic reticulum and abnormal bile acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **285**: 33632–33641.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L.** (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**: 562–578.
- Tzfira, T. and Citovsky, V.** (2007). Nuclear Import and Export in Plants and Animals (Springer).
- Urban, S.** (2006). Rhomboid proteases: conserved membrane proteases with divergent biological functions. *Genes Dev.* **20**: 3054–3068.
- Valitova, J.N., Minibayeva, F. V, Kotlova, E.R., Novikov, A. V, Shavarda, A.L., Murtazina, L.I., and Ryzhkina, I.S.** (2011). Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: the changes in membrane permeability, sterols and glycosceramides. *Phytochemistry* **72**: 1751–1759.
- Vazquez, F.** (2006). Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends Plant Sci.* **11**: 460–468.
- Vernoux, T., Besnard, F., and Traas, J.** (2010). Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**.

- Villasmil, M.L., Ansbach, A., and Nickels, J.T.** (2011). The putative lipid transporter, Arv1, is required for activating pheromone-induced MAP kinase signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet. Soc. Am.* **187**: 455–465.
- Villasmil, M.L. and Nickels, J.T.** (2011). Determination of the membrane topology of Arv1 and the requirement of the ER luminal region for Arv1 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **11**: 524–527.
- Vissenberg, K., Oyama, M., Osato, Y., Yokoyama, R., Verbelen, J.-P., and Nishitani, K.** (2005). Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in *Arabidopsis* roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant Cell Physiol.* **46**: 192–200.
- Vriet, C., Russinova, E., and Reuzeau, C.** (2012). Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* **24**: 842–857.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L., and Mysore, K.S.** (2012). Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol.* **158**: 1789–1802.
- Wang, W. et al.** (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 3163–3179.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57–63.
- Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., Toorn, A. Van Den, Palme, K., and Scheres, B.** (2003). Cell Polarity and PIN Protein Positioning in *Arabidopsis* Require STEROL METHYLTRANSFERASE1 Function. *Plant Cell* **15**: 612–625.
- Wing, K.D.** (1988). RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Science* **241**: 467–9.
- Withers, J.C., Shipp, M.J., Rupasinghe, S.G., Sukumar, P., Schuler, M. a, Muday, G.K., and Wyatt, S.E.** (2013). Gravity Persistent Signal 1 (GPS1) reveals novel cytochrome P450s involved in gravitropism. *Am. J. Bot.* **100**: 183–193.
- Won, S.-K., Lee, Y.-J., Lee, H.-Y., Heo, Y.-K., Cho, M., and Cho, H.-T.** (2009). Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **150**: 1459–1473.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F.** (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**: 75–85.
- Worgall, T.S., Johnson, R. a, Seo, T., Gierens, H., and Deckelbaum, R.J.** (2002). Unsaturated fatty acid-mediated decreases in sterol regulatory element-mediated gene transcription are linked to cellular sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **277**: 3878–3885.
- Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F., and Deckelbaum, R.J.** (1998). Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Expression of Promoters with Sterol Regulatory Elements by Decreasing Levels of Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 25537–25540.
- Worrall, D., Liang, Y.-K., Alvarez, S., Holroyd, G.H., Spiegel, S., Panagopoulos, M., Gray, J.E., and Hetherington, A.M.** (2008). Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J.* **56**: 64–72.
- Xu, D., Huang, X., Xu, Z.-Q., and Schläppi, M.** (2011). The HyPRP gene EARL1 has an auxiliary role for germinability and early seedling development under low temperature and salt stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **234**: 565–577.
- Xu, L., Yang, L., and Huang, H.** (2007). Transcriptional, post-transcriptional and post-translational regulations of gene expression during leaf polarity formation. *Cell Res.* **17**: 512–519.
- Xu, X.X. and Tabas, I.** (1991). Lipoproteins activate acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in macrophages only after cellular cholesterol pools are expanded to a critical threshold level. *J. Biol. Chem.* **266**: 17040–17048.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 781–803.
- Yan, D. and Olkkonen, V.M.** (2008). Characteristics of oxysterol binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* **265**: 253–285.
- Yang, J. and Showalter, A.M.** (2007). Expression and localization of AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan-protein in *Arabidopsis*. *Planta* **226**: 169–179.
- Yao, H., Wang, G., Guo, L., and Wang, X.** (2013). Phosphatidic acid interacts with a MYB transcription factor and regulates its nuclear localization and function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 5030–5042.

- Ye, J., Davé, U.P., Grishin, N. V, Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (2000a). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 5123–5128.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L.** (2000b). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**: 1355–1364.
- Yeats, T.H. and Rose, J.K.C.** (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* **17**: 191–198.
- Zhang, S., Wu, J., Yuan, D., Zhang, D., Huang, Z., Xiao, L., and Yang, C.** (2014a). Perturbation of auxin homeostasis caused by mitochondrial FtSH4 gene-mediated peroxidase accumulation regulates arabidopsis architecture. *Mol. Plant* **7**: 856–873.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V, Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S.E.** (2007b). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **5**.
- Zhang, Y. and Schläppi, M.** (2007a). Cold responsive EARL11 type HyPRPs improve freezing survival of yeast cells and form higher order complexes in plants. *Planta* **227**: 233–243.
- Zhang, Y., Yang, J., and Showalter, A.M.** (2011a). AtAGP18 is localized at the plasma membrane and functions in plant growth and development. *Planta* **233**: 675–683.
- Zhang, Y., Yang, J., and Showalter, A.M.** (2011b). AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan protein in Arabidopsis thaliana, functions in plant growth and development as a putative co-receptor for signal transduction. *Plant Signal. Behav.* **6**: 855–857.
- Zhang, Z., Ji, R., Li, H., Zhao, T., Liu, J., Lin, C., and Liu, B.** (2014b). CONSTANS-LIKE 7 (COL7) is involved in phytochrome B (phyB)-mediated light-quality regulation of auxin homeostasis. *Mol. Plant* **7**: 1429–1440.
- Zhu, C., Gan, L., Shen, Z., and Xia, K.** (2006). Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **57**: 1299–1308.

PUBLICACIONES

Characterization of Arabidopsis FPS Isozymes and *FPS* Gene Expression Analysis Provide Insight into the Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in Seeds

Verónica Keim^{1,2}, David Manzano^{1,2}, Francisco J. Fernández³, Marta Closa², Paola Andrade^{1,2}, Daniel Caudepón^{1,2}, Cristina Bortolotti^{1,2}, M. Cristina Vega³, Montserrat Arró^{1,2,9}, Albert Ferrer^{1,2,9}

1 Department of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain, **2** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Department of Structural and Quantitative Biology, Centre for Biological Research (CIB-CSIC), Madrid, Spain

Abstract

Arabidopsis thaliana contains two genes encoding farnesyl diphosphate (FPP) synthase (FPS), the prenyl diphosphate synthase that catalyzes the synthesis of FPP from isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In this study, we provide evidence that the two Arabidopsis short FPS isozymes FPS1S and FPS2 localize to the cytosol. Both enzymes were expressed in *E. coli*, purified and biochemically characterized. Despite FPS1S and FPS2 share more than 90% amino acid sequence identity, FPS2 was found to be more efficient as a catalyst, more sensitive to the inhibitory effect of NaCl, and more resistant to thermal inactivation than FPS1S. Homology modelling for FPS1S and FPS2 and analysis of the amino acid differences between the two enzymes revealed an increase in surface polarity and a greater capacity to form surface salt bridges of FPS2 compared to FPS1S. These factors most likely account for the enhanced thermostability of FPS2. Expression analysis of *FPS::GUS* genes in seeds showed that *FPS1* and *FPS2* display complementary patterns of expression particularly at late stages of seed development, which suggests that Arabidopsis seeds have two spatially segregated sources of FPP. Functional complementation studies of the Arabidopsis *fps2* knockout mutant seed phenotypes demonstrated that under normal conditions FPS1S and FPS2 are functionally interchangeable. A putative role for FPS2 in maintaining seed germination capacity under adverse environmental conditions is discussed.

Citation: Keim V, Manzano D, Fernández FJ, Closa M, Andrade P, et al. (2012) Characterization of Arabidopsis FPS Isozymes and *FPS* Gene Expression Analysis Provide Insight into the Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in Seeds. PLoS ONE 7(11): e49109. doi:10.1371/journal.pone.0049109

Editor: Joshua L. Heazlewood, Lawrence Berkeley National Laboratory, United States of America

Received: June 5, 2012; **Accepted:** October 7, 2012; **Published:** November 7, 2012

Copyright: © 2012 Keim et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (cofinanced by the European Regional Development Fund) (BIO2009-06984 and CSD2007-00036 to A.F., and PET2008_0101 and BFU2010-22260-C02-02 to M.C.V.), the Generalitat de Catalunya (SGR-00914 to A.F.), and the European Commission Framework Programme 7 (FP7 Project ComplexINC No. 279039 to M.C.V.) The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

* E-mail: albertferrer@ub.edu

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

All isoprenoids are derived from the C₅ building blocks isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, IPP and DMAPP are synthesized via two independent pathways: the mevalonic acid (MVA) pathway in the cytosol [1] and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway in the plastids [2]. IPP and DMAPP are subsequently used as substrates by distinct short-chain prenyl diphosphate synthases that catalyze the head-to-tail condensation of one molecule of DMAPP with one, two or three IPP units to produce geranyl diphosphate (GPP; C₁₀), farnesyl diphosphate (FPP; C₁₅) and geranylgeranyl diphosphate (GGPP; C₂₀), respectively [3], [4]. Pathway specialized branches starting from these prenyl diphosphates lead ultimately to the production of the astonishing number of isoprenoid end products synthesized by plants. GPP serves as a precursor for monoterpenoids, GGPP is a precursor of diterpenoids, gibberellins, carotenoids and abscisic acid, side chains of chlorophyll, phylloquinone, plastoquinone and tocopherols, and geranylgeranylated proteins, and FPP serves as a

precursor for sesquiterpenoids, sterols, brassinosteroids, triterpenoids, polyprenols, side chains of ubiquinone, and farnesylated proteins [5]. It is generally accepted that the intracellular levels of these prenyl diphosphates and their precursors IPP and DMAPP must be strictly controlled to avoid deleterious effects on the metabolic flux through the pathway branches competing for these intermediates [6]. Indeed, overexpression of FPP synthase (FPS) in Arabidopsis [7], [8], [9] and phytoene synthase in tomato [10] results in altered levels of specialized isoprenoid end products that negatively affect plant performance.

Plants contain small FPS (EC 2.5.1.1/EC 2.5.1.10) isozyme families [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18]. This, together with the key position of FPP at a node of the isoprenoid pathway to which many branches leading to mitochondrial and cytosolic isoprenoids are connected [19], [20], has fuelled interest in deciphering the role of individual FPS isozymes in the isoprenoid pathway. Arabidopsis contains two genes, *FPS1* (At5g47770) and *FPS2* (At4g17190), encoding three FPS isozymes: FPS1L, FPS1S and FPS2. The *FPS1* gene encodes FPS1S and FPS1L, which

differ only by an N-terminal extension of 41 amino acid residues that targets FPS1L into mitochondria [10], [13] whereas the *FPS2* gene encodes FPS2 that shares 90.6% amino acid identity with FPS1 isozymes [12]. Although the intracellular localization of Arabidopsis FPS1S and FPS2 remains to be experimentally established, both isozymes are predicted to localize in the cytosol since they do not bear any obvious subcellular targeting signal [12]. However, the possibility that one or both Arabidopsis short FPS isozymes might reside in a different compartment cannot be excluded. In fact, a *Catharanthus roseus* short FPS lacking a canonical peroxisomal targeting sequence partially localizes to the peroxisomes of *C. roseus* cells [21]. This observation would support the hypothesis for a partial localization of the early steps of the plant isoprenoid pathway in peroxisomes [22], [23] as reported to occur in mammals [24].

Studies in transgenic Arabidopsis expressing chimeric *FPS::GUS* genes [25] and analysis of microarray expression data [26] have shown that *FPS* genes are expressed in all organs throughout plant development, albeit at greatly different levels. *FPS1* is widely expressed in all tissues throughout plant development whereas expression of *FPS2* is mainly concentrated in floral organs, seeds and the early stages of seedling development. Characterization of Arabidopsis *fps1* and *fps2* single knockout mutants demonstrated that a single functional *FPS* gene is enough to sustain normal plant growth and development, thereby indicating that *FPS1* and *FPS2* can almost fully complement each other. However, simultaneous knockout of both *FPS* genes is embryo-lethal and severely impairs male genetic transmission [26]. Thus, the small Arabidopsis *FPS* gene family seemingly constitutes a redundant two-locus genetic network in which as long as one gene functions, no noticeable loss of plant fitness occurs. Nevertheless, *FPS1* and *FPS2* functions are not completely redundant. FPS activity measurements and analysis of sterol and ubiquinone levels, the major cytosolic and mitochondrial FPP-derived isoprenoids, have shown that FPS1S has a major role during most of the plant life cycle, whereas FPS2 has a predominant role in seeds and during the early stages of seedling development. In fact, FPS2 is by far the major contributor to total FPS activity in mature seeds, though shortly after germination FPS1 replaces FPS2 as the major provider of FPS activity. Hence, lack of FPS2, but not of FPS1, leads to a marked reduction of sitosterol content in mature seeds concomitant to a positive feedback regulatory response of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), the enzyme that catalyzes the main regulatory step in the MVA pathway and downstream isoprenoid pathways [27]. The elevated levels of HMGR activity become essential to sustaining a flux through the isoprenoid pathway that is high enough to produce sufficient sterols and likely other isoprenoids needed for normal seed viability, as revealed by the hypersensitivity of *fps2* mutant seeds to the HMGR inhibitor mevastatin [26]. Correct quantitative and qualitative sterol composition is essential for proper seed development and viability, not only because sterols have well established roles in maintaining membrane structure and function [28] and as precursors of brassinosteroids [29], but also because they are involved in signalling pathways that are essential for normal embryogenesis [30], [31].

Biochemical characterization of individual FPS isozymes can also greatly contribute to the understanding of their physiological functions. So far, studies on the biochemical properties of plant FPSs have been conducted in a very limited number of species using purified native [32], [33] and recombinant [18], [34] enzyme preparations and, to the best of our knowledge, a comparative biochemical analysis between individual members of FPS isozyme families has only been reported in *Artemisia tridentata*. This plant contains two FPS isozymes that share 83% of amino

acid identity. In spite of this, FDS-1 and FDS-2 exhibit different functional properties, which led the authors to propose specific cellular functions for each of the two isozymes [18]. In the present study, we report the results of a detailed functional and structural characterization of the two Arabidopsis short FPS isozymes FPS1S and FPS2. We also expand our previous *FPS* gene expression analysis [25] by establishing the spatial and temporal pattern of expression of the *FPS* genes during seed development, and present the results of functional complementation studies of the *fps2* single knockout mutant phenotypes [26] with chimeric *FPS* gene constructs. Altogether, findings reported herein provide new clues to understand the biological role of FPS isozymes in Arabidopsis.

Materials and Methods

Chemicals

Unlabelled IPP, DMAPP, GPP and FPP were purchased from Echelon Biosciences and [4-¹⁴C]IPP (60 mCi/mmol) was from GE Healthcare Life Sciences. Mevastatin (Calbiochem, www.merck-chemicals.com) was dissolved in EtOH to prepare a 5 mM stock solution.

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana wild-type (ecotype Col-3 *qrt1/qrt1*) and *fps2* mutant plants were grown *in vitro* on Murashige and Skoog (MS) medium (Duchefa, <http://www.duchefa.com>) solidified using 0.8% w/v agar, or *in vivo* on soil in a climate-controlled growth chamber, under long-day conditions (16 h light/8 h dark) at 22°C. When required, MS medium was supplemented with 1 μM mevastatin.

Heterologous Expression of GST-FPS1S and GST-FPS2 in *E. coli* and Recombinant Protein Purification

Arabidopsis FPS proteins were expressed as N-terminal GST fusion proteins using a modified version of pGEX-3X plasmid (Pharmacia Biotech). The polylinker of pGEX-3X was modified by introducing a *NotI* restriction site upstream from the *BamHI* site that allows to obtain native proteins having an N-terminal end without extra residues after cleavage with Factor Xa protease [35]. The cDNAs coding for FPS1S and FPS2 were amplified by PCR using, respectively, the forward primers 5'-**ATGGAGACC-GATCTCAAGTCAACC**-3' and 5'-**ATGGCGGATCT-GAAATCAACC**-3', the common reverse primer 5'-**CGCGGATCCCTACTTCTGCCTCTTGTAG**-3' (translation start and stop codons are shown in bold, and *BamHI* restriction site is underlined) and plasmids pcNC3 [13] and pcNC2 [12] as templates, respectively. The resulting PCR products were digested with *BamHI*, phosphorylated with T4 Polynucleotide kinase (Promega) and cloned into the *NotI* (blunt ended by nuclease S1 treatment) and *BamHI* restriction sites of the modified pGEX-3X, yielding plasmids pGEX-3X-NotI-FPS1 and pGEX-3X-NotI-FPS2. These expression plasmids were transformed into the *E. coli* strain BL21 (DE3), harbouring pUBS520 encoding *E. coli* tRNA^{Arg} AGA/AGG [36], and transformed cells were grown overnight on LB plates supplemented with ampicillin (100 μg/mL). Plasmids were isolated from overnight cultures and their sequences were verified. To express the recombinant proteins, 30 mL of LB medium supplemented with ampicillin (100 μg/mL) and kanamycin (50 μg/mL) was inoculated with 0.5 mL of an overnight culture of BL21 (DE3) cells harbouring either pGEX-3X-NotI-FPS1 or pGEX-3X-NotI-FPS2 and grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.5–0.6. After induction with 0.4 mM isopropyl thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) the cultures were shifted to 20°C and incubated for 16 additional hours at 200 rpm. *E. coli* cells were

collected by centrifugation at 7,000 *g* for 5 min at 4°C, resuspended in 3 mL of PBS (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5) and disrupted by sonication (0.5 min/mL suspension) while being chilled in a -10°C bath. Cell debris was removed by centrifugation at 15,000 *g* for 30 min at 4°C, and the resulting supernatant was loaded onto a 1 mL Glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography column (GE Healthcare) pre-equilibrated with PBS. All procedures for enzyme purification were performed at 4°C unless otherwise indicated. The column was washed with a minimum volume of 10 mL of PBS and re-equilibrated with Factor Xa cleavage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂). GST-FPS fusion proteins were digested by adding to the column 40U of Factor Xa (Amersham Biosciences) in cleavage buffer to the column. After overnight incubation at 20–22°C the resulting native FPS proteins were eluted with cleavage buffer. Fractions of 250 µL were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE [37] after a quick estimation of protein concentration with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fractions enriched in FPS protein were pooled and the remaining Factor Xa protease was removed by treatment with Factor Xa removal resin (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Glycerol was then added to a final concentration of 15% (v/v) and samples were stored frozen at -80°C. The purity of each FPS preparation was checked by SDS-PAGE. Protein concentration was determined by the method of Lowry [38] using BSA as a standard.

FPS Enzyme Activity Assay and Kinetic Studies

FPS activity of purified recombinant FPS isoforms was measured in a total volume of 100 µL containing 30 mM PIPES (pH 7.0), 6 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 150 mM sucrose, 10 µg/mL aprotinin, 2 µg/mL E64, 1 µg/mL pepstatin, 0.35 mM PMSF, 0.30 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 100 µM [¹⁴C]IPP (6.97 µCi/µmol), 100 µM GPP and the appropriate amount of enzyme (between 10 and 40 ng). The reaction was initiated by the addition of the substrates after preincubation of the enzyme for 5 min at 37°C. The reaction was carried out at 37°C for 15 min and terminated by the addition of 585 µL of 2 M HCl pre-chilled at 0°C. Solid NaCl was added to saturation and the reaction products were acid hydrolysed by incubation for 30 min at 37°C. The mixture was extracted with 1 mL of *n*-hexane and the radioactivity in 500 µL of the hexanic phase was quantified by liquid scintillation counting. To measure FPS activity in extracts from plant tissues, shoots (between 200 and 250 mg) or seeds (between 25 and 40 mg) were mixed with extraction buffer (2 µL per mg of seedlings and 20 µL per mg of seeds) containing 50 mM PIPES, pH 7.0, 250 mM sucrose, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 15 µg/mL aprotinin, 3 µg/mL E64, 1.5 µg/mL pepstatin, and 0.5 mM PMSF pre-chilled at 4°C and ground to a fine powder with mortar and pestle. The slurry was centrifuged at 200 *g* for 10 min at 4°C to remove cell debris and the resulting supernatant was collected and centrifuged again at 16,000 *g* for 20 min at 4°C. The supernatant was recovered and FPS activity (between 100 and 200 µg of protein) was assayed for 30 min at 37°C as described above. One unit of FPS is defined as the amount of enzyme that incorporates one nanomol of IPP into acid-labile products per minute and mg of protein at 37°C.

For pH dependence analysis, enzyme activity assays were carried out using MES (5.5, 6.0), PIPES (6.5, 7.0) and Tris-HCl (7.5, 8.0, 8.5, 9.0). The apparent K_m values for the substrates IPP, DMAPP and GPP were calculated from Lineweaver-Burk plots of FPS activity. The K_m values for DMAPP and GPP were determined with substrate concentrations in the range of 6.25 to 200 µM with a fixed IPP concentration of 100 µM. The K_m value

for IPP was determined with concentrations in the range between 1 to 100 µM and a fixed DMAPP concentration of 200 µM. A nonlinear regression analysis in Sigma Plot 7.0 was used to calculate the kinetic parameters.

Determination of HMGR Enzyme Activity and Sitosterol Content in Seeds

For HMGR activity measurements, seeds (50 mg) were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder with mortar and pestle, and mixed with 0.4 mL of pre-chilled extraction buffer (40 mM sodium phosphate, pH 7.5, 100 mM sucrose, 30 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL E64, 0.5 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 0.5 mM PMSF and 0.25% (w/v) Triton X-100). The slurry was centrifuged at 200 *g* for 10 min at 4°C to remove cell debris and HMGR activity was immediately measured in the supernatant as previously described [39]. One unit of HMGR activity is defined as the amount of enzyme that converts one picomol of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A into MVA per min and mg of protein at 37°C. Sitosterol levels in seeds were analyzed by GC-MS as previously described [26].

Western Blot Analysis

Aliquots (40–50 µg of protein) of the same seed extracts used for FPS activity measurements (16,000 *g* supernatant) were fractionated by 10% SDS-PAGE and electrotransferred onto Hybond-P polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK) at a constant intensity of 125 mA for 3 h at 4°C. The membrane was blocked in PBS pH 7.5, 0.5% (v/v) Tween 20 and 5% (v/v) Blotto non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology inc.) for 16 h at 4°C, and incubated with rabbit polyclonal anti-FPS1S antibody [8] (1:8000 dilution in blocking solution) for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase (Amersham) (1:60000 dilution in blocking solution) for 1 h at room temperature. The FPS1S-antibody complex was visualized using the ECL Advance Western blotting system (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Protein loading was assessed by Coomassie blue staining of the membranes.

Differential Scanning Fluorimetry

The difference in thermal stability between FPS1S and FPS2 was analyzed by differential scanning fluorimetry (DSF) [40]. In brief, 20 µL reactions were set up on a 96-well thin-wall plate (Bio-Rad) containing 3–14 µM each protein in assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 15% (v/v) glycerol and 5× Sypro Orange (Invitrogen)). Assay buffer was added instead of protein in the control samples. The plates were sealed with optical-quality sealing tape (Bio-Rad) and heated on a iQ5 Real Time (RT)-PCR instrument (Bio-Rad) from 20–80°C in increments of 0.2°C. Fluorescence was monitored with a charge-coupled device (CCD) camera using 490 and 575 nm as emission and excitation wavelengths, respectively. The mid-point temperature of the unfolding transition or melting temperature (T_m) was calculated by fitting a Boltzmann model to the fluorescence imaging data after eliminating data beyond the fluorescence intensity maximum.

Homology Modelling

To construct homology models of Arabidopsis FPS1S and FPS2 that could be directly comparable with respect to their sequence differences, we chose as template the crystal structure of unliganded human FPS (PDB 2F7M) [41]. The sequence identity

of human FPS and FPS1S was 45% over 99% of its length (339 out of 343 amino acids) and between human FPS and FPS2 was 46% over 99% of its length (338 out of 342 amino acids). The phosphate ion and the four water molecules found in the active site of FPS in this structure were kept to maintain a stable conformation of the active site loops during modelling. First, we threaded the correct FPS1S and FPS2 sequences onto the template structure using Modeller 9.10 [42] and then selected the 10 best models out of 1000 independent models on the basis of the Z-DOPE normalized scores, which ranged from -1.916 to -1.337 for FPS1S and from -1.949 to -1.529 for FPS2 (a Z-DOPE of less than -1 indicates a plausible model with 80% of the C α atoms lying within 3.5 Å of their correct positions). Next, the top ten models for each protein were refined and minimized using the Rosetta force field and Monte Carlo sampling methods [43], [44] and the improved models were clustered and analyzed to obtain a final model. The final models for FPS1S and FPS2 showed correct stereochemistry as assessed by MolProbity [45].

In Silico Evaluation of Free Energy and Structure Changes Upon Mutation

Free energy (*DDG*) and structure changes upon mutation were calculated using two established methods, the Rosetta *DDG* application [46] and the publicly available CC/PBSA web server (<http://ccpbsa.biologie.uni-erlangen.de/ccpbsa/>) [47]. The changes in stability predicted by the two independent calculations were analyzed in the context of the predicted structural changes. The Rosetta *DDG* protocol corresponds to row 16 of a recent benchmarking study [46]. Row 16 protocol first repacks all residues according to Rosetta standard sidechain sampling procedures while keeping the backbone fixed, and then minimizes all backbone and sidechain degrees of freedom. Energies are calculated for 50 wild-type and mutant sequence contexts and the predicted *DDG* is the difference in the free energy between the mutant and wild-type protein. The CC/PBSA method is accessed via a web interface where the coordinates are submitted along with a string describing the desired mutation. In a nutshell, the CC/PBSA method generates two random conformational ensembles each one of them consisting of 300 wild-type and mutant minimized structures for which energies are evaluated using a custom energy function. Those energy contributions are scaled to reproduce experimentally measured free energies using five-fold cross validation.

Gene Constructs for Mutant Complementation

To construct plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S, a 1388-bp fragment including 1329 bp of the *FPS2* gene promoter, the 5' untranslated region and the ATG translation start codon, was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GCGTCGACAGCTTGGAGCATAAGAAG-3' and reverse primer 5'-TCCGCCATGGATAGGATCAAGG-3'. A *SaI* restriction site was added at the 5' end of forward primer and an *NcoI* site encompassing the ATG start codon of FPS2 was created in the reverse primer by introducing a G (shown in bold) instead of a C. A 2353-bp fragment including the region encoding FPS1S and 339 bp of the 3'-non coding region was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-AGCTCTTCCATGGAGACCGATC-3' and reverse primer 5'-TTGGAGCTCTTTTGGGAATGGAATGTAGG-3'. An *NcoI* restriction site encompassing the ATG start codon of FPS1S was created by introducing a C (shown in bold) instead of a G in the forward primer and a *SacI* restriction site was added at the 5' end of reverse primer. Both genomic fragments were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), excised by digestion with either

SaI and *NcoI* or *NcoI* and *SacI*, and cloned into the *SaI* and *SacI* sites of pBluescript KS⁺ in a three-piece ligation yielding pBFPS2p::FPS1S. The entire FPS2p::FPS1S fragment was then excised by digestion with *SaI* and *SacI* and cloned into pCAMBIA2300 yielding plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S.

To create plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S-mutdis, a 1375-bp fragment including 1329 bp of the *FPS2* gene promoter was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GCGTCGACAGCTTGGAGCATAAGAAG-3' and reverse primer 5'-CCCAAGCTTGATAGGATCAAGGAAGGTGT-3'. Restriction sites for *SaI* and *HindIII* (underlined) were added at the 5' end of forward and reverse primers, respectively. The amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy vector yielding pGEM-FPS2p. A 2472-bp fragment including the entire coding region of the *FPS1* gene and 339 bp of the 3'-non coding region was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GGGATATCAGTGTGAGTTGTTGTTGT-3' and reverse primer 5'-TTGGAGCTCTTTTGGGAATGGAATGTAGG-3'. Restriction sites for *EcoRV* and *SacI* (underlined) were added at the 5' end of forward and reverse primers, respectively. In the forward primer the third base of the ATG codon corresponding to the translation start codon of FPS1L isoform was changed to C (shown in bold). The amplified fragment was cloned into the *EcoRV* and *SacI* sites of pBluescript SK⁺ yielding pBFPS1S-mutdis. The *FPS1* gene fragment was then excised from pBFPS1S-mutdis with *EcoRV* and *SacI* and cloned into plasmid pGEM-FPS2p, which had been previously digested with *HindIII*, treated with nuclease S1 to produce blunt ends and digested again with *SacI* (in the pGEM-T polylinker) yielding pGEM-FPS2p::FPS1S-mutdis. The entire FPS2p::FPS1S-mutdis fragment was then excised by digestion with *SaI* and *SacI* and cloned into pCAMBIA2300 yielding plasmid pCAM-FPS2p::FPS1S-mutdis.

To construct plasmid pCAM-FPS1p::FPS2, a 1526-bp fragment including 1338 bp of the *FPS1* gene promoter and 185 bp of the 5' leader region up to the ATG translation start codon of FPS1S was amplified by PCR using DNA from genomic clone pgNC241 as a template [12], forward primer 5'-GCGTCGACATAGTAGTTAATGTTGGGG-3' and reverse primer 5'-TCTCCATGGAAGAGCTTTGGATAACG-3'. A *SaI* site was added at the 5' end of forward primer and an *NcoI* site encompassing the ATG start codon of FPS1S was created by introducing a G (shown in bold) instead of a T in the reverse primer. A 2553-bp fragment including the entire coding region of the *FPS2* gene and 438 bp of the 3'-non coding region was amplified by PCR using genomic DNA as a template, forward primer 5'-GATCCTATCCATGGCGGATCTG-3' and reverse primer 5'-AGCGAGCTCATTCCACTAATCTTCTCG-3'. An *NcoI* restriction site encompassing the ATG start codon of FPS2 was created by introducing a C (shown in bold) instead of an A in the forward primer. A *SacI* restriction site was added at the 5' end of reverse primer. Both genomic fragments were cloned into pGEM-T Easy vector, excised by digestion with either *SaI* and *NcoI* or *NcoI* and *SacI*, and cloned into the *SaI* and *SacI* sites of pBluescript KS⁺ in a three-piece ligation yielding pBFPS1p::FPS2. The entire FPS1p::FPS2 fragment was then excised by digestion with *SaI* and *SacI* and cloned into pCAMBIA1300-T-Nos yielding plasmid pCAM-FPS1p::FPS2. Plasmid pCAMBIA1300-T-Nos was generated by introducing the T-Nos sequence from pBI221 into the *SacI* and *EcoRI* sites of pCAMBIA1300.

To create plasmid pCAM-FPS1mutdisp::FPS2, a 1526-bp fragment of the *FPS1* flanking region was amplified by PCR using as a template a chimeric translational *FPS1S::GUS* gene fusion in which the ATG start codon of FPS1L had been converted to an

ATC codon by site directed mutagenesis [25] and the same forward and reverse primers used to construct pCAM-FPS1p::FPS2. The amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy yielding pGEM-FPS1mutdisp. The *FPS1* gene fragment was then excised with *SaI* and *NcoI* and cloned into pBFPS1p::FPS2 to replace the corresponding non-mutated region of *FPS1* promoter, yielding plasmid pBFPS1mutdisp::FPS2. The entire pBFPS1mutdisp::FPS2 fragment was then excised with *SaI* and *SacI* and cloned into pCambia1300-T-Nos yielding plasmid pCAM-FPS1mutdisp::FPS2.

All PCR fragments used to construct plasmids described above were sequenced to exclude amplification artifacts. The correct fusion of the genomic fragments was also confirmed by sequencing.

Plant Transformation and Transgene Expression Analysis

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 harbouring plasmids described above was used to transform Arabidopsis *fps2-1* mutant plants by the floral dip method [48]. Seeds from infiltrated plants were surface sterilized and sown in Petri dishes containing solid MS medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin. Antibiotic-resistant seedlings (T₁) were transplanted into soil and grown to maturity. Lines homozygous for the transgenes containing a single insertion were selected by segregation analysis of the kanamycin resistance trait.

To analyze the expression of the transgenes introduced into the *fps2-1* mutant, total RNA was isolated from 12-days-old seedlings from *fps2-1* lines harbouring *FPS2p::FPS1S*, *FPS2p::FPS1-mutdis*, *FPS1p::FPS2*, or *FPS1mutdisp::FPS2*. Total RNA (1.5 µg) was treated with DNase (Ambion) and single-stranded cDNA pools were synthesized using oligo-dT primer and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to standard protocols. PCR reactions were carried out by 35 cycles of amplification (45 s at 94°C, 60 s at 50°C and 90 s at 72°C with a 5 min final extension at 72°C) using as template 7.5 µL of a 1:10 dilution of the corresponding single-stranded cDNA pools and 1 unit of Taq polymerase (Biotools). Primers 5'-GGCTTTGCA-CACCTTCCTTG-3' and 5'-CCTGTGGATGTGATTGC-GAAG-3' were used for expression analysis of *FPS2p::FPS1S* and *FPS2p::FPS1-mutdis* genes, and primers 5'-GGTGGGAGTCTC-TATCGTCGTCGTATCCAA-3' and 5'-CGGAGAGGCCG-GAGTATG-3' were used for expression analysis of *FPS1p::FPS2* and *FPS1mutdisp::FPS2* genes. The expression of the *ACT2* (At3g18780) gene was analyzed using primers 5'-GATCTGG-CATCACACTTTCTAC-3' and 5'-GCCTTGGAGATCCA-CATCTGCTG-3'. The expression of the *PP2AA3* (At1g13320) gene encoding the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A) was analyzed using primers 5'-TAACGTGGC-CAAATGATGC-3' and 5'-GAAGCCAACATTAACATTAG-TAGC-3'.

GUS Assay in Arabidopsis Seeds

Siliques were harvested, opened longitudinally, placed in GUS assay buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 0.2% (v/v) Triton X-100, 20 mM X-Gluc and 2 mM potassium ferricyanide) and subjected to vacuum for 10 min. After incubation for 24 hours at 37°C, siliques were placed in ethanol:acetic acid (1:1) and incubated for either 4 hours (young seeds with embryos at the globular and heart stages) or 8 hours (mature seeds with embryos at torpedo and cotyledon stages). GUS-stained seeds were cleared in Hoyer's medium for 3–4 days in darkness [49]. Dissected seeds were placed on a slide covered with a coverslip, stored in darkness for 24 hours and observed under a Zeiss Axiophot microscope equipped with Nomarski optics. Photographs were taken using the same microscope equipped with an Olympus DP70 photo camera.

Expression of GFP-FPS1S, GFP-FPS2, FPS1S-GFP and FPS2-GFP in Agroinfiltrated Leaves of *N. benthamiana* Plants

The FPS1S coding sequence (1029 bp) was amplified by PCR using forward primer 5'-ACGCGTGCACAATGGAGACC-GATCTCAAGTCAACC-3', reverse primer 5'-CTGTGCA-TATCCCTTCTGCCTCTTGTAGATCTTAGC-3' and plasmid pcNC3 [13] as a template. The sequence coding for FPS2 (1039 bp) was amplified using forward primer 5'-ACGCGTGCACAATGGCGGATCTGAAATCAACCTTC-3', reverse primer 5'-GAGTATGATATCCCTTCTGCCTCTTGTAGATCT-TAGC-3' and plasmid pcNC2 [12] as a template. Translational start codons are shown in bold. *SaI* and *EcoRV* restriction sites (underlined) were added at the 5' end of the forward and reverse primers, respectively. The amplified fragments were cloned into the corresponding sites of plasmid pENTR3C (Gateway®, Invitrogen) yielding plasmids pENTR-FPS1S and pENTR-FPS2. Both cDNA fragments were subsequently transferred from pENTR-FPS1S and pENTR-FPS2 to pMDC43 and pMDC83 (Gateway®, Invitrogen) yielding plasmids pMDC43FPS1S, pMDC43FPS2, pMDC83FPS1S and pMDC83FPS2, in which the FPS coding sequences were fused in-frame to the 5'- or 3'-ends of the green fluorescent protein (GFP) coding sequence. In all cases the coding sequences were under the transcriptional control of the CaMV35S gene promoter. All constructs were sequenced to confirm the in-frame fusions. Plasmids coding for the different protein fusions were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. The recombinant *A. tumefaciens* strains were grown overnight at 28°C in YEB liquid medium supplemented with 100 µg/mL rifampicine and 25 µg/mL kanamycin. Cells were harvested by centrifugation and resuspended to an OD₆₀₀ of 0.150 in a solution containing 10 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 5.6, and 200 µM acetosyringone (3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone). Prior infiltration, bacterial suspensions were incubated at room temperature for 3 h. For co-expression experiments, suspensions of *A. tumefaciens* harbouring the FPS-GFP expression constructs were mixed with *A. tumefaciens* cultures harbouring constructs for expression of the cyan fluorescent protein (CFP)-peroxisome marker (CFP-SKL) [50] and the tobacco etch polytivirus helper component protein (HC-Pro) silencing suppressor [51] in a 1:1:1 ratio. Leaves of 2–4 week old *N. benthamiana* plants were infiltrated by gently appressing a 2-ml syringe without a needle to the abaxial surface of fully expanded leaves. Following a 2–3 day incubation of infiltrated plants under long-day conditions at 25°C and 60% humidity, abaxial epidermis of leaf tissue was examined by confocal laser-scanning microscopy using a Leica SP5 microscope (Leica Microsystems). GFP and CFP were excited by using 488 and 458 laser lines, respectively. Images were acquired sequentially to avoid crosstalk between channels. LAS-AF Lite 2.6.0 software was used for image capture and for merging false-coloured images of transiently co-transformed cells.

Results

Biochemical Characterization of Recombinant FPS1S and FPS2 Isozymes

Arabidopsis FPS1S and FPS2 isozymes were expressed in *E. coli* as soluble N-terminal GST fusions (Figure 1A). The resulting recombinant proteins were purified through Glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography, digested with Factor Xa protease to release native FPS1S and FPS2 enzymes, and further purified to remove both the excised GST moiety and Factor Xa protease. SDS-PAGE analysis showed that this purification procedure

yielded highly purified preparations of both enzymes (Figure 1B) that were used for biochemical characterization.

Prenyltransferases are known to require a divalent metal ion for catalytic activity. Thus, we first analyzed the effect of different Mg^{2+} concentrations on FPS1S and FPS2 activity. Similar values of activity were obtained when the enzyme activity was measured in the presence of $MgCl_2$ concentrations ranging between 1 and 5 mM (data not shown). The optimal pH range for FPS1S and FPS2 was also determined. Both enzymes showed a similar pH-rate profile with only minor differences (Figure 2A). Maximal activity for both enzymes was observed at a pH value of 7.0, albeit the pH-rate profile of FPS1S was slightly shifted toward more acidic pH values compared to FPS2. We next investigated the effect of NaCl on the activity of FPS1S and FPS2 using concentrations in the range from 0 to 2 M. As shown in Figure 2B, the activity of both enzymes progressively declined as the concentration of NaCl increased, though in the case of FPS1S this effect was observed only at NaCl concentrations higher than 0.5 M. At all NaCl concentrations tested, FPS2 was markedly more sensitive to the inhibitory effect of NaCl than FPS1S. Purified FPS1S and FPS2 were also subjected to kinetic analyses and the resulting steady-state kinetic constants are shown in Table 1. Both enzymes displayed typical Michaelis-Menten behaviour, as observed for other FPSs, and exhibited similar K_m values in the μ molar range (from 8.3 to 31.5 μ M) for both IPP and the allylic substrates DMAPP and GPP. The affinity (K_m) of FPS1S and FPS2 for the reaction intermediate GPP was approximately 2.7-fold higher than for DMAPP, thus indicating a preference of both enzymes for the allylic intermediate. Similarly, comparison of the specificity constants (k_{cat}/K_m) indicated a 2-fold higher catalytic efficiency for GPP compared to DMAPP. The inhibitory effect of the reaction product FPP on FPS1S and FPS2 activity was analyzed using concentrations in the range from 0 to 1 mM. The activity inhibition profile was nearly identical for both enzymes, with a maximal 30% reduction of activity at the highest FPP concentration assayed.

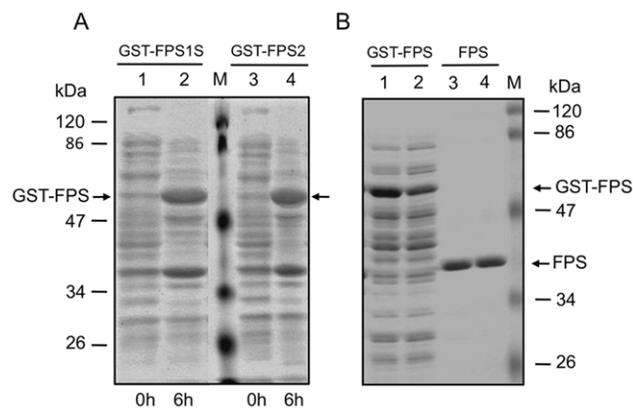


Figure 1. Expression in *E. coli* and purification of recombinant FPS1S and FPS2 proteins. (A) Total protein extracts from *E. coli* cells harbouring either pGEX-3X-NotI-FPS1 or pGEX-3X-NotI-FPS2 before (lanes 1 and 3) and after induction (lanes 2 and 4) of GST-FPS1S and GST-FPS2 expression with 0.4 mM IPTG for 6 hours at 22°C. (B) Soluble protein extracts of IPTG-induced *E. coli* cells harbouring either pGEX-3X-NotI-FPS1 (lane 1) or pGEX-3X-NotI-FPS2 (lane 2), and purified native FPS1S (lane 3) and FPS2 (lane 4) protein preparations after Glutathione-Sepharose 4B affinity column chromatography, proteolytic digestion with Factor Xa and protease removal. Arrows indicate the position of GST-FPS protein fusions and purified native FPS proteins. Molecular masses of standards (M) are indicated in kDa. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g001

Interestingly, FPS2 preparations consistently showed higher specific activity than the FPS1S ones. In fact, FPS2 showed catalytic rate constant (k_{cat}) values for IPP, DMAPP, and GPP that were 3.2-, 2.7- and 2.7-fold higher, respectively, than FPS1S, thus indicating that FPS2 is a more efficient catalyst than FPS1S. These differences cannot be attributed to differential stability of the enzymes either under storage conditions or during the purification procedure since both retained more than 90% of their initial activity after 2 months of storage at $-80^{\circ}C$ and their activity remained virtually unaffected after incubation for 1 hour at $37^{\circ}C$ (Figure 3A). In contrast to this later observation, we observed a markedly different response of FPS1S and FPS2 to treatment at $45^{\circ}C$ for different time-periods. As shown in Figure 3A, FPS2 activity remained unaltered after incubation for 1 hour at $45^{\circ}C$

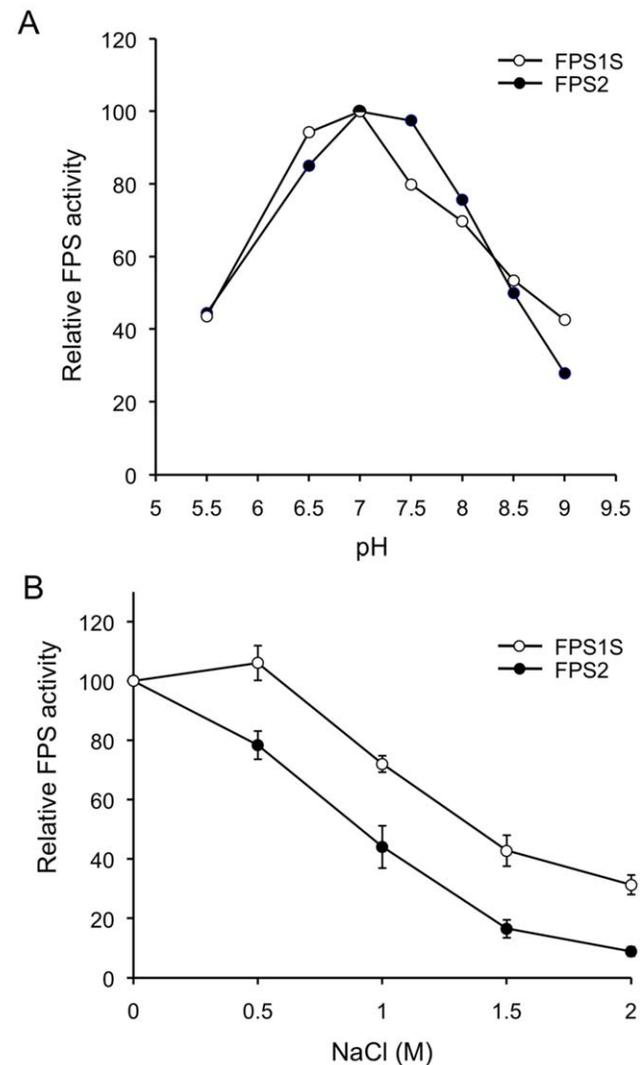


Figure 2. Effect of pH and NaCl on FPS1S and FPS2 enzyme activity. (A) FPS activity of purified FPS1S and FPS2 was determined at pH values ranging from 5.5 to 9.0 as described under Materials and Methods. Enzyme activities are expressed relative to the maximal activity values for FPS1S and FPS2. (B) Effect of NaCl on FPS1S and FPS2 enzyme activity. FPS activity of purified FPS1S and FPS2 was determined at the indicated NaCl concentrations. Enzyme activities are expressed relative to the activity values for FPS1S and FPS2 measured without NaCl. The mean values and SE were calculated from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g002

Table 1. Steady-state kinetic constants for FPS1S and FPS2.

Variable substrate	Kinetic parameter	FPS1S	FPS2
IPP	K_m (μM)	23.1 ± 0.4	31.3 ± 0.5
	k_{cat} (min^{-1})	62.5	269.0
	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	2.7	8.6
DMAPP	K_m (μM)	22.7 ± 2.1	31.5 ± 0.5
	k_{cat} (min^{-1})	52.2	197.3
	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	2.3	6.2
GPP	K_m (μM)	8.3 ± 1.2	11.3 ± 1.0
	k_{cat} (min^{-1})	36.4	132.8
	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	4.4	11.7

The K_m mean values and SE were calculated from three independent experiments.

k_{cat} values were calculated for the dimeric form of the enzyme.

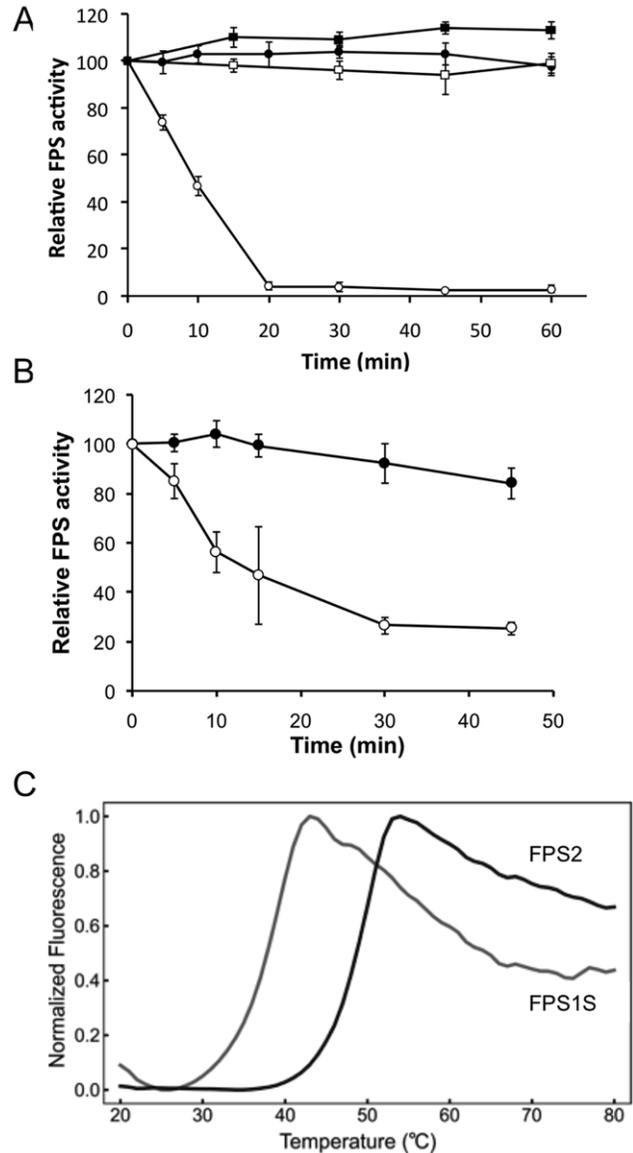
doi:10.1371/journal.pone.0049109.t001

whereas FPS1S activity was completely abolished after 20 minutes at the same temperature. A similar result was obtained when protein extracts from the Arabidopsis *fps1-1* and *fps2-1* single knockout mutants bearing only one functional FPS gene (*FPS2* and *FPS1* respectively) were incubated at 45°C for different time-periods and assayed for FPS activity. Again, incubation at 45°C had almost no effect on FPS2-derived activity in extracts from *fps1-1* plants, whereas FPS1-derived activity in extracts from *fps2-1* plants was severely diminished upon incubation at the same temperature (Figure 3B). These differences in thermal stability were corroborated by differential scanning fluorimetry (DSF) [40]. The melting temperature (T_m) derived from the DSF data is a useful diagnostic tool because greater thermal stability is associated with a positive shift in T_m with respect to a reference T_0 ($T_m - T_0 = \Delta T_m > 0$) and vice versa. DSF experiments with 3–14 μM FPS1S or FPS2 in FPS activity assay buffer yielded T_m values of 37°C and 48.3°C, respectively, a difference in T_m of 11.3°C (Figure 3C). Based on these results, it can be concluded that FPS2 is more resistant to thermal inactivation than FPS1S because FPS2 protein is thermodynamically more stable than FPS1S.

Structural Basis of the Enhanced Thermal Stability of FPS2

To further our understanding of the differential thermal stability between FPS1S and FPS2, homology models for both proteins were built using as a template the crystal structure of unliganded human FPS (PDB 2F7M) [41] (Figure 4A) and carefully assessed with respect to their stereochemistry. Best models for both enzymes showed correct stereochemical parameters and native dimer interfaces using various stringent criteria [45], [52]. The root-mean-square (r.m.s.) deviation between each model and the template structure was 0.26 Å and between the two models was 0.29 Å. Mapping of the sequence substitutions between FPS1S and FPS2 onto their respective ribbon structures and molecular surfaces (Figure 4B) showed that the immense majority of these substitutions occur at the outer surface of the enzyme.

Detailed analysis of the thirty-two substitutions that separate FPS2 from FPS1S revealed that the increase in surface polarity and the greater capacity to form surface salt bridges of FPS2 compared with FPS1S appear to be determining factors of the enhanced thermostability of FPS2. Indeed, there are several discernable trends in amino acid substitution between FPS2 and

**Figure 3.** Thermal stability of FPS1S and FPS2 enzyme activity.

(A) Activity of purified FPS1S (open symbols) and FPS2 (closed symbols) was measured after incubation at either 37°C (squares) or 45°C (circles) for the indicated time periods. (B) FPS activity in 16,000 g protein extracts from *fps1-1* (FPS2 activity, closed circles) and *fps2-1* (FPS1 activity, open circles) mutants was determined after incubation at 45°C for the indicated times. In both cases enzyme activities are expressed relative to the FPS activity values at time 0 min and the mean values and SE were calculated from three independent experiments. (C) Differential scanning fluorimetry (DSF) results plotted as change in fluorescence emission intensity (normalized to unity at its maximum) with increasing temperature (20–80°C). The FPS1S and FPS2 curves correspond to 6 μM enzyme. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g003

FPS1S that lends support to this hypothesis. First, FPS2 has four charged residues more than FPS1S of which three are basic and one is acidic. Secondly, polar and charged sidechains in FPS2 tend to be longer on average than in FPS1S (e.g., substitutions follow Asp => Glu, Asn => Gln), which could afford greater rotameric freedom and thereby facilitate formation of polar interactions on the protein's surface. In summary, inspecting the FPS1S and FPS2 homology models around each mutated residue suggested that as

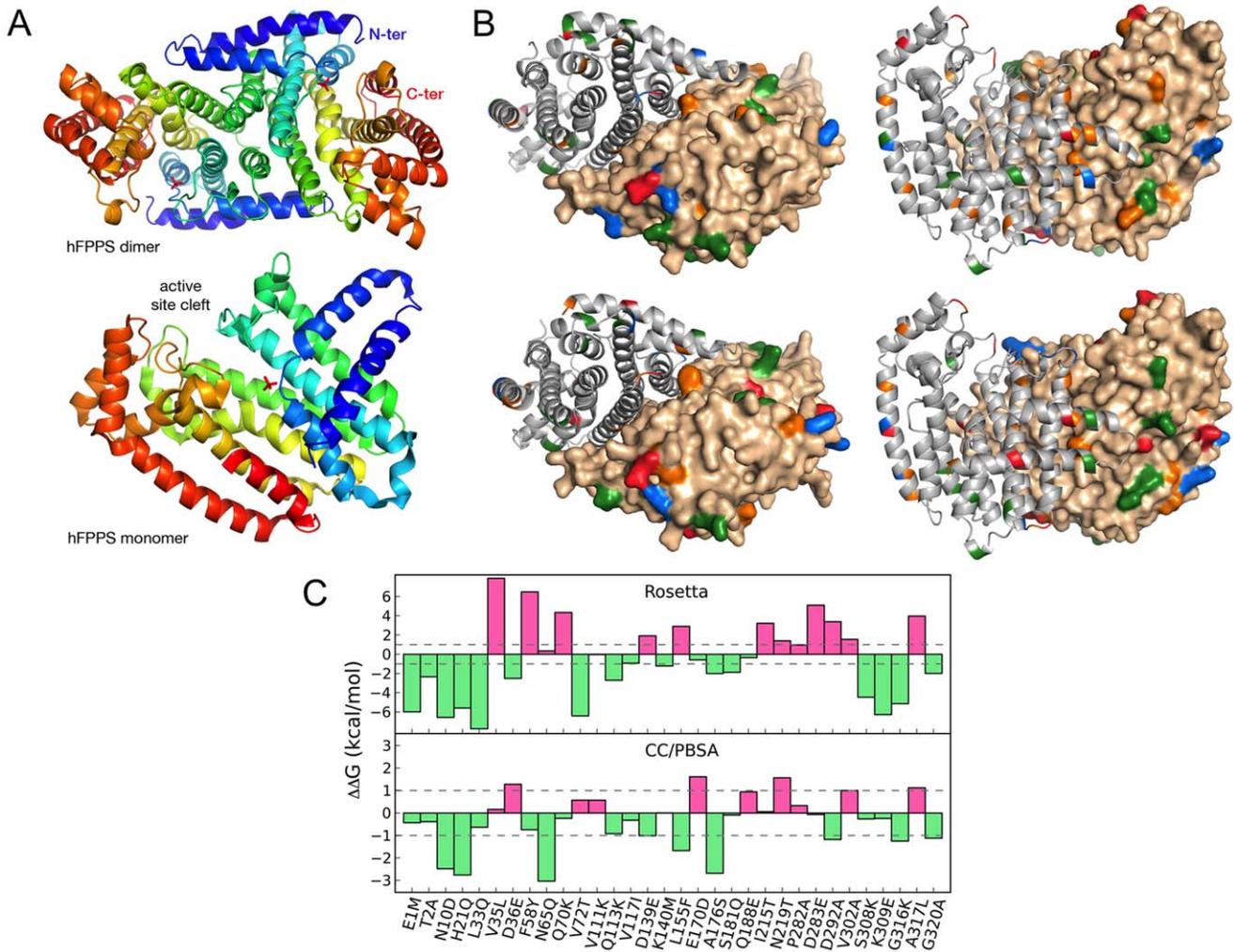


Figure 4. Homology modelling of FPS15 and FPS2 proteins and in silico *DDG* calculations. (A) Ribbon representation of the dimeric and monomeric structures of human FPS (PDB 2F7M), which was used to template the threading of Arabidopsis FPS15 and FPS2. The active site cleft is labelled and a bound phosphate ion is shown in sticks. (B) Sequence substitutions between FPS15 (top) and FPS2 (bottom) were mapped onto the ribbon structure (left monomer) or the molecular surface (right monomer) of the homology modeled dimers. Chemical character is colour coded as follows: red, acidic (Asp, Glu); blue, basic (Arg, Lys, His); green, polar (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr); orange, apolar (Met, Phe, Pro, Trp, Val, Leu, Ile, Ala). (C) Histogram of *DDG* (kcal/mol) upon single-site substitution calculated using Rosetta *DDG* application (top) or CC/PBSA (bottom). Mutations predicted to occur with a decrease in *DDG* are coloured green and those expected to increase *DDG* are coloured pink. Horizontal dashed lines at -1 to $+1$ kcal/mol bound the neutral area where *DDG* is supposed to contribute little to the overall stabilization or destabilization of the mutated protein. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g004

many as three additional salt bridges (and several strong hydrogen bonds) could be established in FPS2 compared to FPS1S. Other metrics of structure stability, such as sidechain hydrogen bonds (31 in all/4 strong versus 30 in all/2 strong) and salt bridges across the dimer interface (7 versus 5) interface did also favour FPS2 with respect to FPS1S. Interestingly, a number of aromatic-aromatic, aromatic-sulfur and pi-cation interactions seem to be more prevalent in FPS2 than in FPS1S, and could also make a sizable contribution to the overall thermal stability of the two enzymes.

To accurately calculate the changes in free energy and structure induced by single residue substitutions we applied the Rosetta *DDG* [46] and CC/PBSA [47] methods to predict the free energy and structure changes underwent by FPS1S as single FPS2-mimicking substitutions are introduced. Results indicated that the cumulative free energy change summed over all mutated residues was energetically very favourable regardless of the method used, in qualitative agreement with the results from DSF experiments.

Moreover, the Rosetta *DDG* and CC/PBSA protocols flag 58% (15 versus 11) and 69% (9 versus 4) of the non-neutral substitutions as stabilizing ($DDG < -1$ kcal/mol). Of the non-stabilizing mutations, Rosetta *DDG* brands more mutations than CC/PBSA as destabilizing ($DDG > +1$ kcal/mol) than neutral (DDG between -1 and $+1$ kcal/mol). Figure 4C shows this pattern for both the Rosetta *DDG* and the CC/PBSA protocols. Of the 21 out of 32 substitutions that change any residue in FPS1S to a polar/charged residue in FPS2, 85% (18) are predicted as non-destabilizing (the three exceptions are Q70K, E170D and D283E) thereby providing corroborative evidence for the important role of surface electrostatic interactions for FPS2 thermal stability. Perhaps one of the larger discrepancies between the two prediction methods involves substitutions F58Y, N65Q, Q70K and V72T, for which *DDG* estimates are reversed. These four substitutions, which are located in three consecutive helices, cluster tightly together around a 6-Å sphere and therefore it is plausible that the true structure of

FPS2 had undergone compensatory changes that cannot be accurately captured by our single-site mutation calculations. Future structural studies of FPS1S and FPS2 should provide more accurate rationales for the observed stability differences.

Subcellular Localization of FPS1S and FPS2

Arabidopsis FPS1S and FPS2 isoforms have long been considered to localize in the cytosol, mainly because no obvious organellar targeting signals have been detected in their primary structure. To provide experimental data supporting this assumption, the subcellular localization of Arabidopsis FPS1S and FPS2 was investigated by transiently expressing N- and C-terminal fusions of both FPS isoforms to the GFP in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaf cells (Figure 5). Confocal laser microscopy analysis of the transfected cells revealed that all four tested proteins (GFP-FPS1S, FPS1S-GFP, GFP-FPS2, and FPS2-GFP) showed a diffuse pattern of fluorescence throughout the cytosol that was completely different from the punctuate fluorescence pattern characteristic for peroxisomal proteins, as revealed by comparison with the fluorescence signal of the peroxisomal marker CFP-SKL. These results strongly suggested that both FPS1S and FPS2 localize in the cytosol and not in the peroxisomes.

Expression Pattern of Arabidopsis FPS1 and FPS2 Genes during Seed Development

Characterization of Arabidopsis *fps* single knockout mutants revealed a differential contribution of FPS isoforms to total FPS activity in mature seeds [26]. In order to investigate whether this effect could be due to differential expression of FPS1 and FPS2 in seed tissues, we analyzed the spatial and temporal pattern of expression of GUS activity in seeds at different developmental stages harvested from Arabidopsis lines harbouring FPS1S::GUS and FPS2::GUS transgenes (Figure 6). These chimeric gene fusions included approximately 1350 bp of the corresponding FPS promoter region [25]. In FPS1S::GUS plants, the primary site of GUS activity detection at all stages of development was the maternal chalazal seed coat (Figure 6A–E). At the globular, heart and early-torpedo stages of embryo development some variable and weaker GUS staining could also be detected in surrounding tissues (Figure 6A–C) although it is difficult to establish whether this expression reflected diffusion of the substrate or true expression of the transgene. At latter stages of embryo development GUS activity was restricted to the chalazal seed coat (Figure 6D and E). Interestingly, no expression of GUS activity in the embryo could be detected at any developmental stage. The pattern of GUS expression driven by the FPS2 promoter was completely different (Figure 6F–J). At the globular stage of embryo development GUS staining was detected only in the chalazal endosperm (Figure 6F), but from the heart stage onward GUS activity could also be detected in the embryo (Figure 6G–J). At the heart and early torpedo stage GUS expression in the embryo was primarily localized to the root apical meristem region (Figure 6G and H, arrowhead) and the pro-vascular tissue of embryo (Figure 6, inset). Up to this developmental stage, a very faint staining could also be detected in the endosperm of some seeds when they were subjected to intensive staining. At later developmental stages GUS activity was clearly detected in the whole embryo as well as in the surrounding endosperm (Figure 6I). In mature seeds, strong GUS activity was also present in the cotyledonary embryo (Figure 6J), which is in sharp contrast to the absence of GUS activity in the embryo of mature seeds expressing FPS1S::GUS (Figure 6E). In conclusion, analysis of FPS1S::GUS and FPS2::GUS expression analysis demonstrated that FPS genes are differentially regulated during Arabidopsis seed development, showing highly comple-

mentary expression patterns particularly at late stages of seed formation.

Functional Complementation of *fps2* Mutant Seed Phenotypes by FPS1S

Mature seeds lacking FPS2 activity display several phenotypes including reduced levels of sitosterol, the main sterol found in plant tissues, increased HMGR activity and hypersensitivity to mevastatin compared to both *fps1* and wild-type seeds [26]. To determine whether FPS1S could complement these phenotypes, transgenic *fps2-1* plants expressing FPS1S under the control of the FPS2 gene promoter were obtained. To this end we created two different gene constructs that were able to produce only isoform FPS1S (Figure 7A and B). The FPS2p::FPS1S-*mutdis* gene consisted of 1375 bp of the FPS2 5'-flanking region, including 1329 bp of the promoter and the entire 5'-untranslated region, fused to the genomic coding region of FPS1 in which the distal ATG start codon was converted into an ATC codon to ensure that only FPS1S isoform could be produced. The FPS2p::FPS1S gene differed from FPS2p::FPS1S-*mutdis* gene in that the region comprised between the two ATG codons was removed.

Several independent lines of these two kinds of transgenic plants were obtained and characterized. Among them, lines 6.2, 7.2 and 10.2 for FPS2p::FPS1S-*mutdis* and lines 2.2, 7.1 and 8.1 for FPS2p::FPS1S were selected for further characterization. The expression of FPS2p::FPS1S-*mutdis* and FPS2p::FPS1S was analyzed in young seedlings using semiquantitative RT-PCR and a primer set consisting of a forward primer specific for the FPS2 5'-untranslated sequence and a reverse primer located in the FPS1 coding region. The three selected FPS2p::FPS1S-*mutdis* lines showed very similar levels of expression of the FPS1 mRNA that were even higher than those detected in wild-type plants (Figure 8A). Accordingly, protein extracts from seeds of FPS2p::FPS1S-*mutdis* lines also contained both higher levels of FPS1S protein, as demonstrated by Western blot analysis (Figure 8B), and higher values of FPS activity (Figure 9C) compared to wild-type seeds. On the contrary, FPS protein and enzyme activity levels in extracts from seeds of the three FPS2p::FPS1S transgenic lines were comparable to those found in extracts of *fps2-1* mutant seeds, which indeed were much lower than those detected in wild-type seed extracts (Figure 8B and C). The inability of FPS2p::FPS1S to restore wild-type levels of FPS protein and enzyme activity was not due to a lack of expression of the transgene, since its mRNA was detected in the seedlings of the three selected lines. In two of them (lines 7.1 and 8.1), expression of the transgene was less intense than in wild-type plants whereas in the third one (line 2.2) expression was slightly stronger than in control plants (Figure 8A). These observations suggested that translation of the chimeric FPS2::FPS1S mRNA expressed by FPS2p::FPS1S was severely impaired, which is most likely due to the different structural environment around the AUG start codon of the FPS2::FPS1S mRNA compared to that of the FPS2 and FPS2::FPS1S-*mutdis* mRNAs (Figure S1). Among the different structural features known to be involved in translational control of specific mRNAs [53], base-pairing involving nucleotides within the AUG codon has been recognized as an important structural determinant that may influence translation initiation [54], [55].

To complete the characterization of the transgenic lines we next assessed whether expression of FPS1S driven by the FPS2 promoter could complement the characteristic phenotypes of *fps2-1* seeds. Sitosterol and HMGR activity levels were quantified in seeds of FPS2p::FPS1S-*mutdis* and FPS2p::FPS1S lines. None of the *fps2-1* seed phenotypes could be rescued by FPS2p::FPS1S expression (Figures 9A–C), a result that was fully consistent with

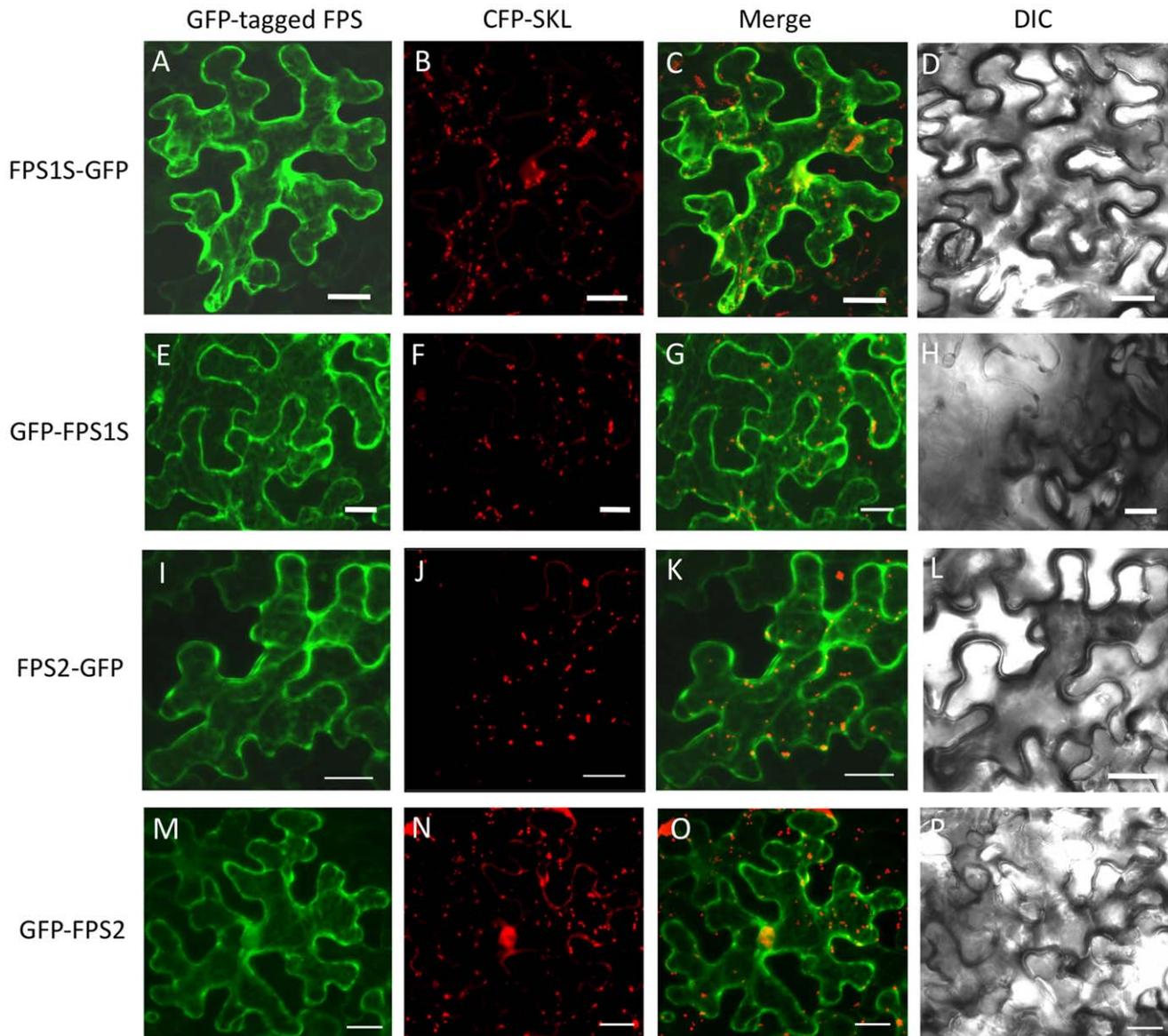


Figure 5. Subcellular localization of GFP-tagged FPS1S and FPS2 proteins. Confocal laser scanning micrographs showing the distribution of fluorescence in agroinfiltrated *N. benthamiana* epidermal cells transiently co-expressing FPS1S-GFP (A), GFP-FPS1S (E), FPS2-GFP (I) or GFP-FPS2 (M) with the peroxisome protein marker CFP-SKL (B, F, J and N). Co-localization evaluation of GFP-tagged FPS proteins with the peroxisome protein marker (C, G, K and O). Differential interference contrast (DIC) images showing the morphology of transformed cells (D, H, L and P). Scale bars = 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0049109.g005

the lack of FPS1S protein production and enzyme activity recovery (Figure 8B and C). On the contrary, sitosterol and HMGR activity levels were both restored to those of wild-type seeds in lines expressing *FPS2p::FPS1S-mutdis* (Figures 9A and B). Recovery of wild-type levels of HMGR activity in seeds also restored normal mevastatin sensitivity to these lines (Figure 9C). Altogether, these results demonstrated that FPS1S is able to functionally replace FPS2.

Rescue of *fps2* Mutant Seed Phenotypes by Increasing Total FPS Activity in Seeds

Once we had demonstrated that expression of FPS1S driven by the *FPS2* promoter was able to rescue the phenotypes caused by loss of function of FPS2, we set out to determine whether

expression of FPS2 driven by the *FPS1* promoter could also rescue the *fps2-1* phenotypes. To this end *fps2-1* plants harbouring genes *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* (Figure 7C and D) were created and characterized. *FPS1mutdisp::FPS2* consisted of 1526 bp of the *FPS1* 5'-flanking region, including 1338 bp of the *FPS1* gene promoter and the entire 5'-untranslated region in which the distal ATG start codon was converted into an ATC codon, fused to the genomic coding region of *FPS2* so that only FPS2 isoform could be produced from this transgene. In the *FPS1p::FPS2* gene, the distal ATG codon was not disrupted and therefore this transgene could potentially express both FPS2 and a long version of FPS2 equivalent to FPS1L. Among the transgenic lines obtained, lines 6.2, 5.4 and 5.2 harbouring *FPS1mutdisp::FPS2*, and lines 3.1, 2.4 and 2.1 harbouring *FPS1p::FPS2* were selected for further

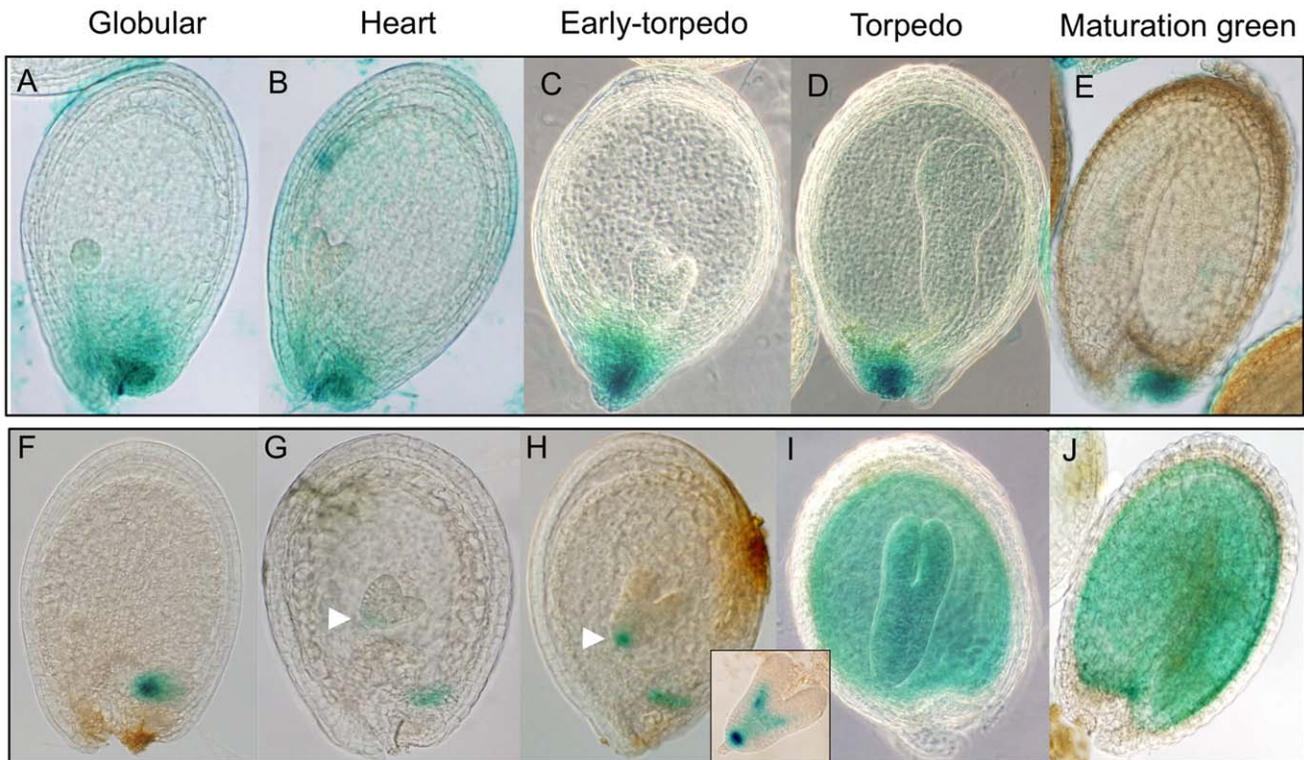


Figure 6. Histochemical analysis of GUS activity during seed development in Arabidopsis lines harbouring transgenes *FPS15::GUS* (panels A to E) and *FPS2::GUS* (panels F to J). Seeds containing embryos at the globular (A and F), heart (B and G), early-torpedo (C and H), torpedo (D and I) and maturation green (E and J) developmental stages were analyzed for GUS expression as described under Material and Methods. GUS expression in the root meristematic region of the embryo at heart (G) and early-torpedo (H) stages in *FPS2::GUS* seeds is indicated by arrowheads. The inset between panels (H) and (I) shows expression of *FPS2::GUS* in the root meristematic region and the pro-vascular tissue of an embryo at the early-torpedo stage.

doi:10.1371/journal.pone.0049109.g006

characterization. The expression of the transgenes was analyzed in young seedlings of these lines using semiquantitative RT-PCR and a primer set consisting of a forward primer specific for the *FPS1* 5'-untranslated sequence and a reverse primer specific for the *FPS2* coding region. All selected lines showed comparable expression levels of the chimeric *FPS2* mRNAs that, as expected, were not detected either in wild-type plants or in *fps2-1* plants (Figure 10A). However, striking differences in FPS protein and activity levels were observed between the two groups of transgenic plants. FPS protein content in seeds of the three *FPS1mutdisp::FPS2* lines was comparable and only slightly above that found in *fps2-1* seed extracts. By contrast, total FPS protein levels in *FPS1p::FPS2* seeds varied greatly. The amount of FPS protein in line 2.4 was pretty similar to that found in *FPS1mutdisp::FPS2* plants whereas line 3.1 had strikingly elevated levels of FPS protein. Line 2.1 showed intermediate levels of FPS that were, nevertheless, higher than in wild-type plants (Figure 10B). These differences could be due to the production of different relative amounts of short and long versions of *FPS2* in *FPS1p::FPS2* seeds. Unfortunately, it is not possible to determine the relative contributions of the individual short and long *FPS2* forms to the total amount of *FPS2* protein since they both have the same size after processing of the long version of *FPS2* [9]. In any case, a close correlation between FPS protein content and enzyme activity levels was observed in the seed extracts of all lines (Figure 10C). Analysis of the characteristic *fps2-1* phenotypes in seeds of the transgenic lines revealed that the phenotypes associated to loss of function of *FPS2* were fully rescued in all transgenic lines regardless of the degree of FPS

activity enhancement in the mature mutant seeds (Figure 11A–C). In fact, a small increase of FPS activity of only 1.2-fold (line 6.2) was sufficient to restore wild-type sitosterol and HMGR activity values as well as normal Mst sensitivity to the same extent than a drastic enhancement of FPS activity (approximately 9-fold in line 3.1). These results suggested that impaired synthesis of FPP in the mature embryo due to the lack of *FPS2* activity could be fully compensated just by increasing slightly the synthesis of FPP in the seed maternal tissues.

Discussion

Isozymes usually display specific biochemical properties that allow fine-tuning of metabolic pathways to meet the specific needs of tissues and organs at different developmental stages and/or under different environmental conditions. The occurrence in plants of small FPS isozyme families has raised the still-unanswered question about the role of individual FPS isozymes in the cytosol/ER isoprenoid biosynthetic pathway. Most of the information currently available on the biological function of FPS isozyme family members has been obtained from the pattern of expression of the corresponding genes [11], [14], [15], [16], [17], [25] and the characterization of mutants that either overexpress [8], [10] or lack individual FPS isozymes [26]. By contrast, much less attention has been paid to investigate and compare the biochemical properties of individual FPS isozyme family members, despite this knowledge may also greatly contribute to the understanding of their role in the isoprenoid pathway [18].

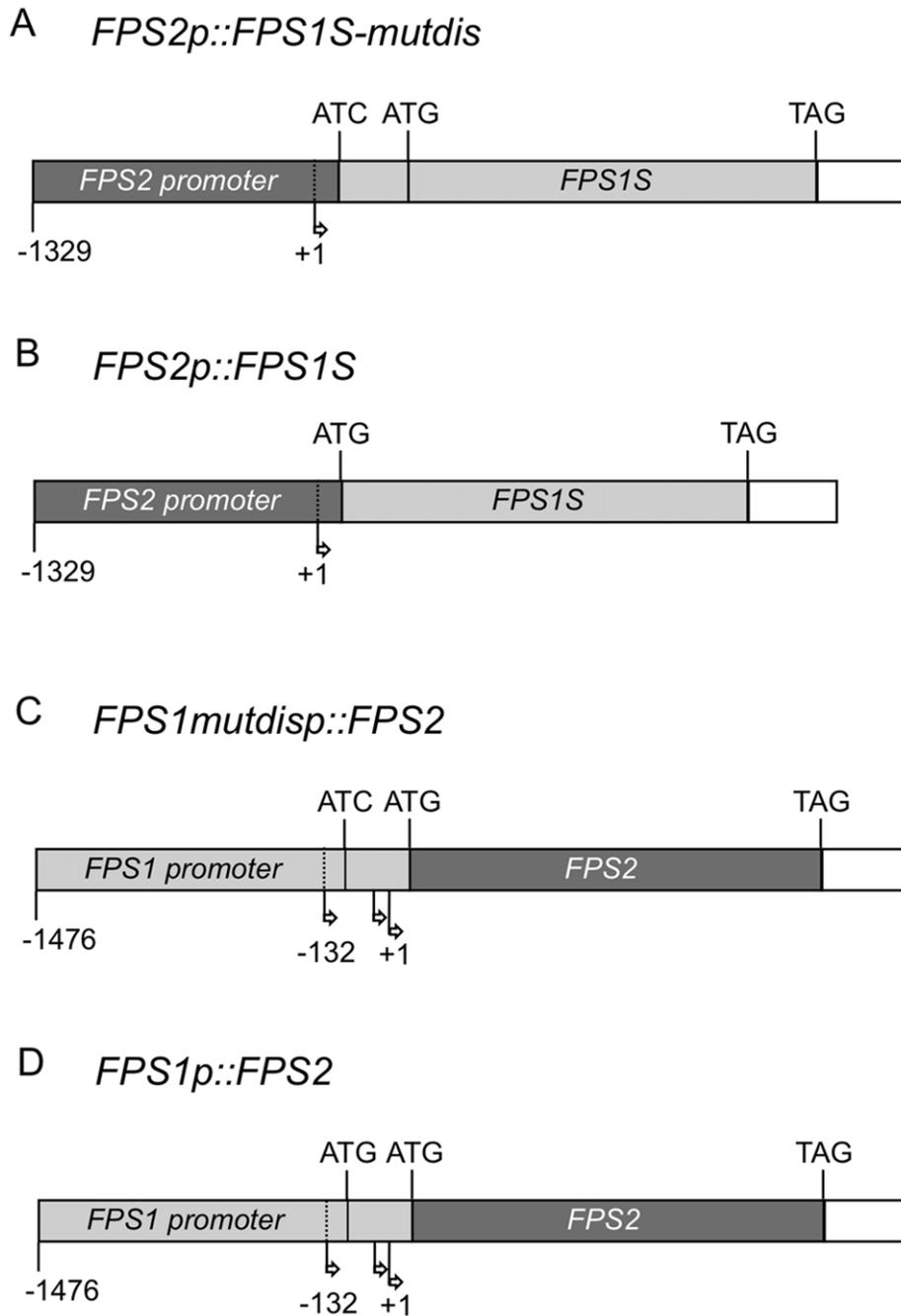


Figure 7. Schematic representation of chimeric genes *FPS2p::FPS1-mutdis* (A), *FPS2p::FPS1S* (B), *FPS1mutdisp::FPS2* (C) and *FPS1p::FPS2* (D). Dark gray boxes represent *FPS2* genomic sequences whereas sequences corresponding to *FPS1* gene are represented by light gray boxes. In all constructs the 3'-untranslated regions of both *FPS* genes is represented by an empty box. The position of the translational start codons is indicated as ATG and that of stop codons is indicated as TAG. In the *FPS2p::FPS1S-mutdis* (A) and *FPS1mutdisp::FPS2* (C) constructs, the 5'-most ATG codon in exon 1 of the *FPS1* gene was mutated to an ATC codon (encoding Ile). Arrows indicate the transcription start sites. In the *FPS1* gene, position +1 was assigned to the most internal transcription start site.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g007

In this study we report a detailed functional and structural characterization of the Arabidopsis FPS1S and FPS2 isozymes. Both enzymes were efficiently expressed in *E. coli* as GST-FPS fusion proteins, though the GST tag was removed by proteolytic cleavage during the purification process (Figure 1) to avoid any interference it could have on FPS activity [56]. Biochemical characterization of the purified native FPS1S and FPS2 revealed

that both enzymes displayed very similar pH-rate profiles with an optimum at pH 7.0 (Figure 2). This pH preference was consistent with the predicted cytosolic localization of both FPS isozymes because the pH of the cytoplasm of plant cells is kept slightly alkaline at 7.2-7.5 under non-eliciting conditions [57]. The cytosolic localization of both FPS isozymes was demonstrated by transiently expressing N- and C-terminal fusions of FPS1S and

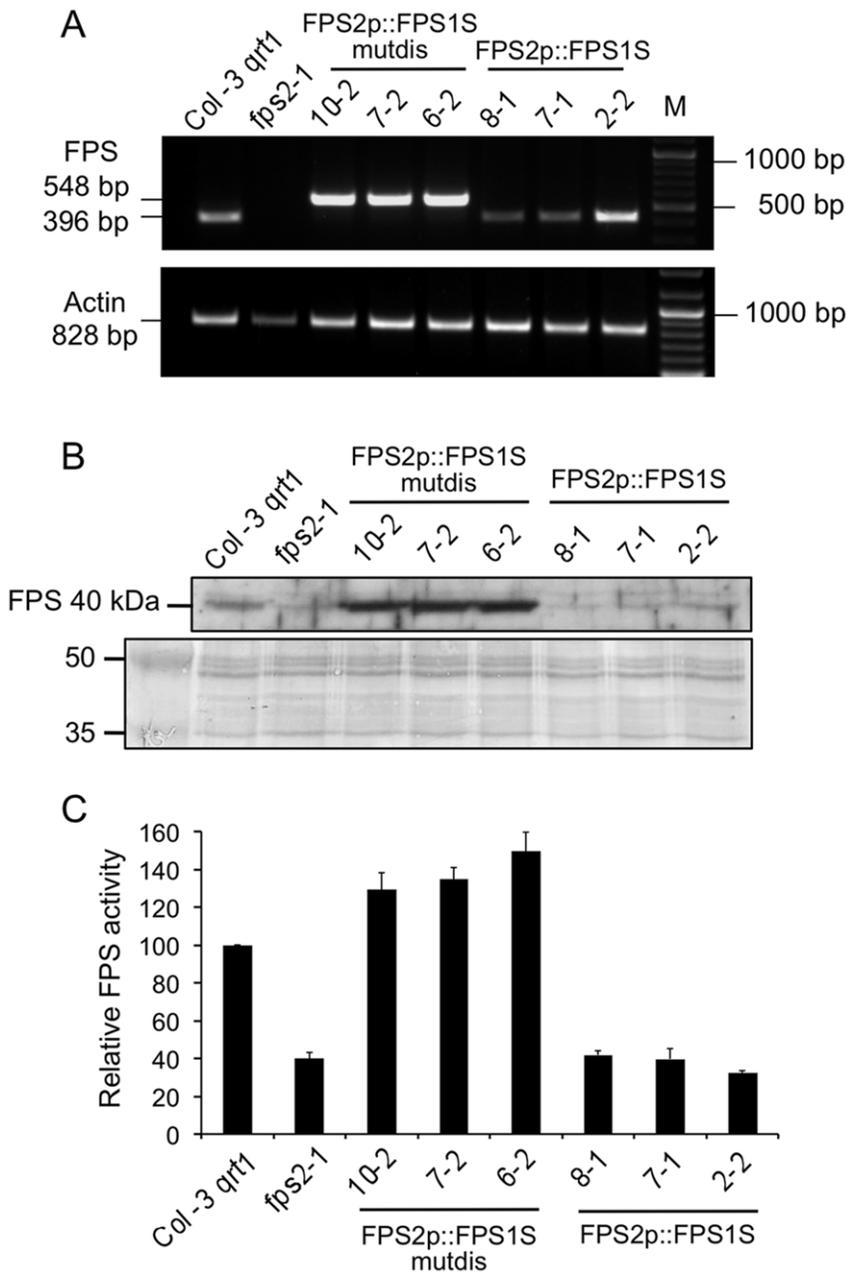


Figure 8. Characterization of *fps2-1* mutant lines harbouring *FPS2p::FPS1S* and *FPS2p::FPS1S-mutdis* genes. (A) The expression of *FPS2p::FPS1S* and *FPS2p::FPS1S-mutdis* was investigated using total RNA from 12-day-old seedlings of Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS2p::FPS1S-mutdis* and *FPS2p::FPS1S* chimeric genes (upper panel). PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel. The size in bp of the amplified cDNA fragments corresponding to *FPS2p::FPS1S-mutdis*, *FPS2p::FPS1S* and *ACT2* (actin) genes is indicated on the left. The size of the fragment amplified from *FPS2p::FPS1S-mutdis* lines (548 bp) was larger than that amplified from both *FPS2p::FPS1S* lines and wild-type plants (396 bp) because the *FPS2p::FPS1S-mutdis* mRNA contains the region between the two ATG translation start codons of the *FPS1* gene, which is not present in the *FPS2p::FPS1S* mRNA. Numbers on the right indicate the sizes in bp of DNA markers shown in lane M. (B) Western blot analysis of total FPS protein in 16,000 g extracts from seeds of plant lines indicated above (upper panel). The lower panel shows the Coomassie blue-stained electrophoretic protein patterns in the 35 to 50 kDa range of extracts used for FPS protein level determinations. Images show the results of one representative experiment. (C) FPS activity in the 16,000 g protein extracts used for Western blot analysis. FPS activity in *fps2-1* mutants is expressed relative to that in the wild-type, which was assigned a value of 100. The mean values and SE were calculated from three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g008

FPS2 with GFP in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaf cells. Under our experimental conditions all the four fusion proteins localized exclusively in the cytosol (Figure 5). This result was fully consistent with the absence of canonical subcellular targeting signals in the FPS1S and FPS2 proteins, and argued against the possibility that

FPS1S and FPS2 could harbour a cryptic signal for peroxisomal targeting as recently reported to occur in a *C. roseus* short FPS enzyme. In contrast to our results, an N-terminal fusion of CrFPS with YFP was found to localize both in the peroxisomes and the cytosol of *C. roseus* cells despite the protein does not contain any

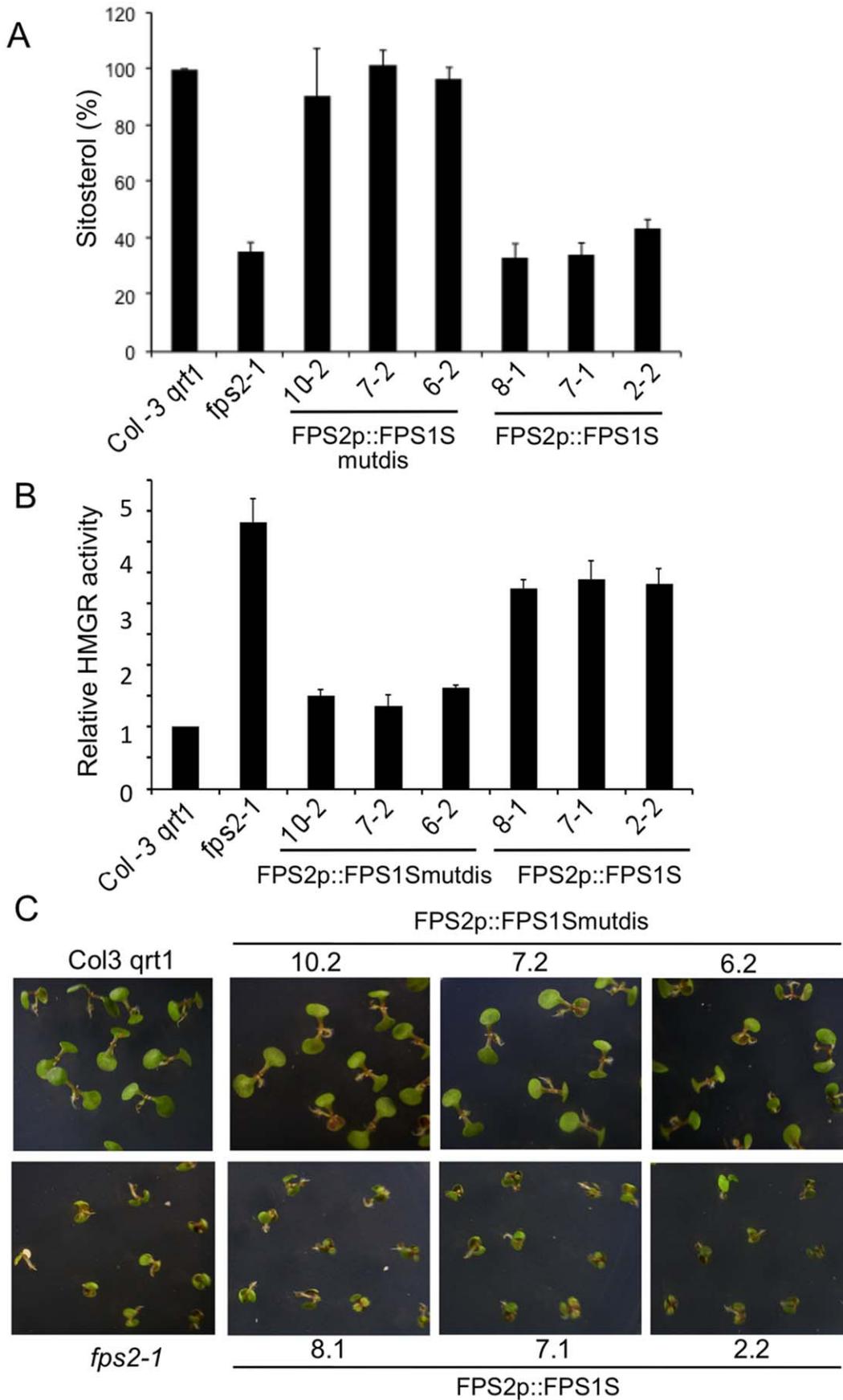


Figure 9. Reversion of *fps2-1* phenotypes by expressing FPS1S under control of the *FPS2* promoter. Sitosterol (A) and HMGR activity (B) levels in seeds from Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS2p::FPS1S-mutdis* and *FPS2p::FPS1S* chimeric genes. Values are expressed relative to the wild-type values. Data represent the mean values and SE of three independent experiments. (C) Reversion of mevastatin hypersensitivity. Representative seedlings of the same lines were grown for 12 days under long-day conditions (16 h light/ 8 h dark) on MS plates supplemented with 1 μ M mevastatin.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g009

classical peroxisomal targeting sequence [21]. It is also worth noting that our finding that none of the Arabidopsis short FPS isoforms reside in the peroxisomes was fully consistent with the results of extensive proteomic studies that have detected both FPS1S and FPS2 in the cytosolic proteome of Arabidopsis [58] and could not detect any FPS protein in purified Arabidopsis

peroxisomes [59], [60]. The distinct subcellular localization of Arabidopsis and *C. roseus* short FPS isozymes could be related to the different profile of isoprenoid compounds produced by these two plant species [3], [61], though the central position of FPS in the isoprenoid pathway and the fundamental role of isoprenoid biosynthesis in plant biochemistry and physiology would argue

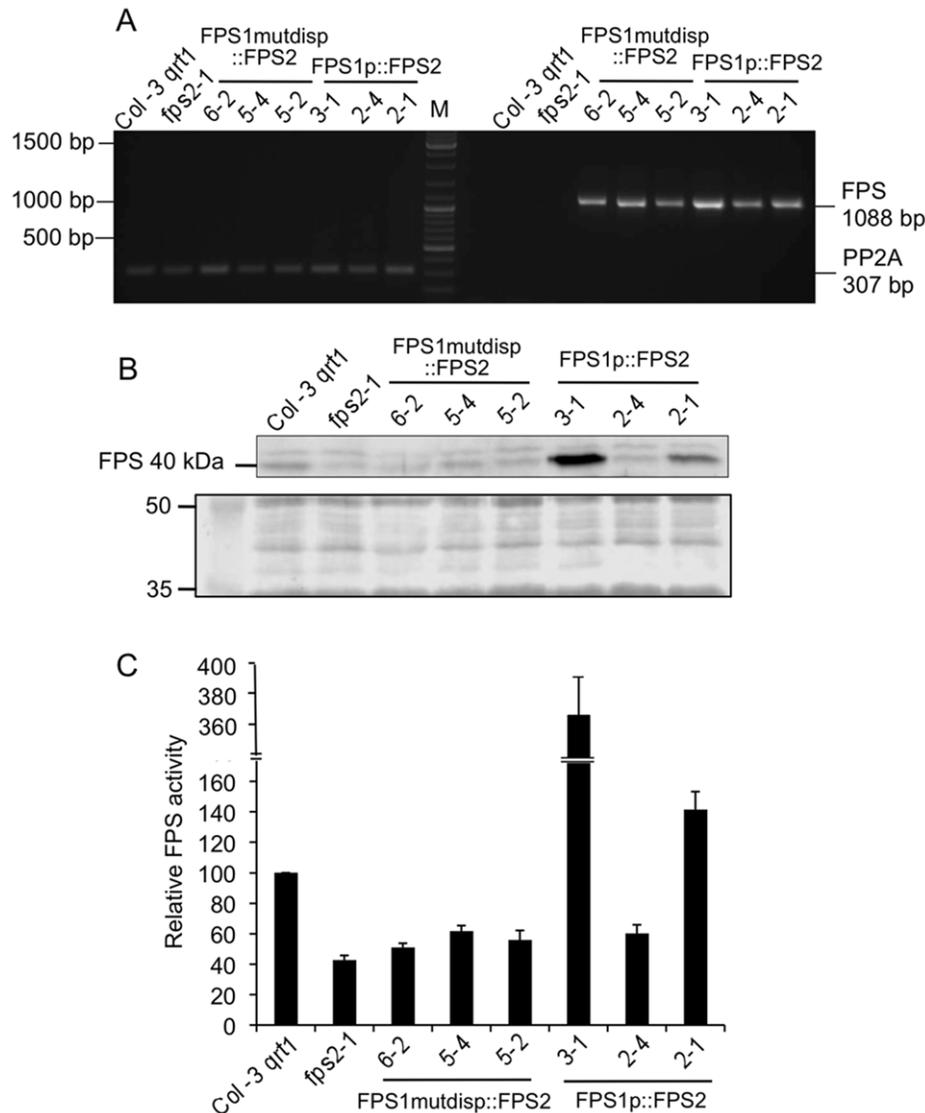


Figure 10. Characterization of *fps2-1* mutant lines harbouring *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* genes. (A) The expression of *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* was investigated using total RNA from 12-day-old seedlings of Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* chimeric genes. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel. The size in bp of the amplified cDNA fragments corresponding to *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* (1088 bp) and *PP2A* genes (307 bp) is indicated on the right. Numbers on the left indicate the sizes in bp of DNA markers shown in lane M. (B) Western blot analysis of total FPS protein in 16,000 g extracts from seeds of plant lines indicated above (upper panel). The lower panel shows the Coomassie blue-stained electrophoretic protein patterns in the 35 to 50 kDa range of extracts used for FPS protein level determinations. Images show the results of one representative experiment. (C) FPS activity in the 16,000 g protein extracts used for Western blot analysis. FPS activity in mutants is expressed relative to that in the wild-type, which was assigned a value of 100. The mean values and SE were calculated from three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0049109.g010

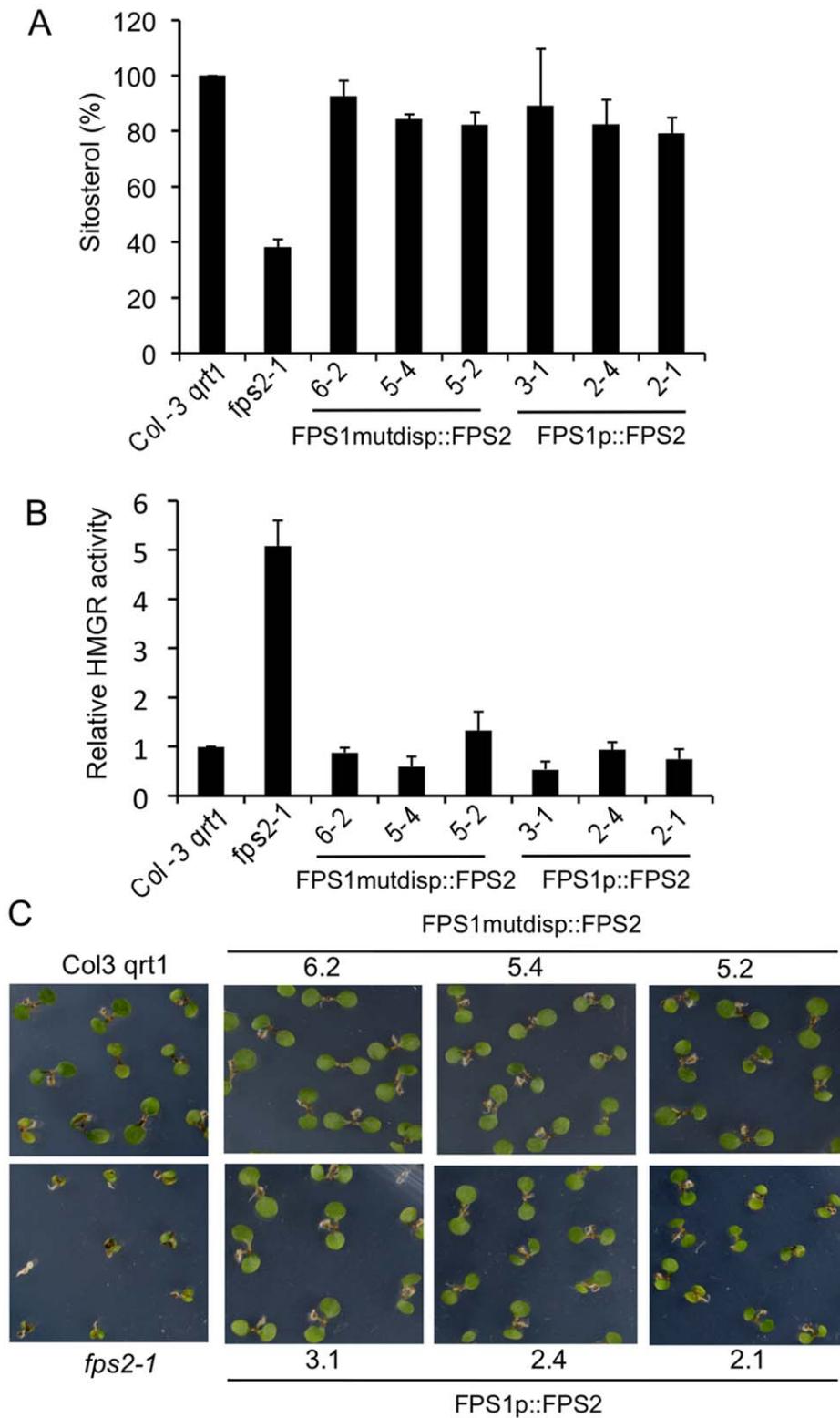


Figure 11. Reversion of *fps2-1* phenotypes by expressing FPS2 under the control of the FPS1 promoter. Sitosterol (A) and HMGR activity (B) levels in seeds from Arabidopsis wild-type, *fps2-1* and the indicated lines of the *fps2-1* mutant harbouring *FPS1mutdisp::FPS2* and *FPS1p::FPS2* chimeric genes. Values are expressed relative to the wild-type values. Data represent the mean values and SE of three independent experiments. (C) Reversion of mevastatin hypersensitivity. Representative seedlings of the same lines were grown for 12 days under long-day conditions (16 h light/ 8 h dark) on MS plates supplemented with 1 μM mevastatin. doi:10.1371/journal.pone.0049109.g011

against this hypothesis. Thus, given the ongoing controversy regarding the subcellular localization of FPS and other MVA pathway enzymes and the potential interference of fluorescent protein tags with proper subcellular targeting of proteins, further studies based on alternative experimental approaches are required in order to establish whether or not short FPS isozymes localize in different subcellular compartments in a plant-species dependent manner.

Comparison of the steady-state kinetic constants of purified FPS1S and FPS2 (Table 1) revealed that both enzymes have similar K_m values for their substrates and a clear preference for GPP over DMAPP as the allylic substrate for FPP formation. A similar kinetic behaviour has also been reported for FPS enzymes from both eukaryotic and prokaryotic organisms [33], [18], [56], [62], [63]. The kinetic similarities between FPS1S and FPS2 are consistent with the high degree of sequence conservation (90.6% identity) shared by these isozymes. However, FPS1S and FPS2 also displayed some remarkable differential properties that must be a consequence of the small differences in their primary structure. FPS2 is a more efficient catalyst than FPS1S by a factor of 2.5- to 3-fold (Table 1). All known FPS proteins contain seven highly conserved amino acid motifs [64] that are involved in enzyme catalysis and product chain length determination [5], [65]. Arabidopsis FPS1S and FPS2 differ by only 32 amino acid residues out of a total of 343 and 342 amino acids, respectively. These amino acid changes are scattered throughout the sequence but, interestingly, none of them is located within the conserved motifs involved in catalysis [12]. Thus, it is difficult to attribute the differences in catalytic efficiency between FPS1S and FPS2 to a particular amino acid substitution. Rather it appears that this functional difference is the consequence of subtle changes in the three-dimensional structure of the enzymes due to multiple individual amino acid changes acting together. In fact, FPS is a homodimeric enzyme in which subunits interact with each other to form a shared active site rather than bearing an independent active site in each subunit [66]. The suggested structural differences between FPS1S and FPS2 must also account for the greater thermal stability (Figure 3) and higher sensitivity to the inhibitory effect of NaCl (Figure 2) exhibited by FPS2 compared to FPS1S. In fact, a single amino acid substitution is sufficient to alter temperature and salt sensitivity in the case of malate dehydrogenase [67], [68], [69]. Indeed, inspection of atomic-level homology models of FPS1S and FPS2 and theoretical calculations of the free energy and structural changes that accompany the single-site substitution of FPS2 unique amino acids into the FPS1S structural template indicate that surface salt bridge formation and reduced conformational entropy might largely account for the increased thermostability observed for FPS2. These stabilizing electrostatic effects are reflected in specific amino acid composition biases that have been extensively studied in thermophilic proteins [70], [71].

Our recent characterization of Arabidopsis *fps* single knockout mutants showing that FPS1S and FPS2 can almost fully compensate each other's loss throughout most of the plant life cycle demonstrated that FPS1S and FPS2 have largely overlapping physiological functionalities. The only signs of functional specialization were observed in mature seeds and early developing seedlings. At these developmental stages FPS2 becomes the major contributor to total FPS activity, to the point that residual FPS1-derived activity in mature seeds is unable to supply enough FPP for normal sterol production, which triggers a compensatory enhancement of HMGR activity that is crucial for proper seed germination and seedling establishment [26]. Interestingly, our GUS expression analysis during seed development revealed a marked spatial and temporal divergence in the *FPS1* and *FPS2*

expression pattern, which from the torpedo stage onward showed a strong degree of qualitative complementarity (Figure 6), also known as reciprocal expression pattern. This is when only one gene copy is expressed in some organs or tissue types and the other copy is expressed in others [72]. In the mature stages of seed development *FPS2* expression clearly dominates over the expression of *FPS1*. The *FPS2* gene is expressed throughout the endosperm and the embryo at the torpedo stage, and throughout the cotyledonary embryo in mature seeds, whereas the expression of *FPS1* remains restricted to the maternal chalazal seed coat. The exclusive expression of *FPS2* in the whole cotyledonary embryo, which at this stage occupies most of the seed, along with the higher catalytic efficiency of FPS2, explain why this isozyme is the major contributor to total FPS activity in mature seeds [26]. Interestingly, our results from genetic cross-complementation studies of the *fps2-1* mutant seed phenotypes showed that expression of FPS1S driven by the *FPS2* gene promoter (Figure 8) restored wild-type sitosterol and HMGR activity levels as well as normal sensitivity to mevastatin (Figure 9). This finding demonstrated that under normal conditions FPS1S and FPS2 are completely functionally interchangeable, which is fully consistent with the kinetic similarities exhibited by FPS1S and FPS2, and raises the question as to why FPS2 is the predominant FPS isozyme expressed in mature seeds and during the early stages of seed germination and seedling emergence. Seed viability is essential for survival of higher plants and therefore seeds are well equipped to withstand extended periods of exposure to harsh environmental conditions, as for instance extreme temperatures that may cause protein denaturation and inactivation among other effects. Arabidopsis seeds can complete germination even after treatment for more than 3.5 hours at 45°C [73], a temperature that is lethal for seedlings [74]. It is thus tempting to speculate that FPS2 has been evolutionarily selected as the predominant FPS isozyme in mature seeds of Arabidopsis because of its striking thermotolerance that could contribute to maintain seed germination capability of seeds exposed to high temperatures. It will be interesting to determine whether other isoprenoid biosynthetic enzymes expressed in seeds also display this biochemical feature. Moreover, the higher catalytic efficiency of FPS2 compared to FPS1S would enable early developing seedlings to sustain an active synthesis of isoprenoid precursors until the newly made FPS1S replaces FPS2 in this task.

FPP synthesis has been found to be indispensable for Arabidopsis embryos to progress beyond the pre-globular/globular stage and continue further development [26]. Our GUS expression analysis in seeds suggests that early developing embryos do not synthesize their own FPP since no embryo-specific expression of any of the *FPS* genes could be detected until the heart stage of embryo development (Figure 6). Rather it seems that early developing embryos import FPP or downstream FPP-derived isoprenoid precursors from other seed tissues like the maternal chalazal seed coat and/or the chalazal endosperm, where FPP can be synthesized as inferred from the expression of *FPS1* and *FPS2* in these tissues. This is a plausible hypothesis since the maternal chalazal seed coat and the chalazal endosperm are both considered to be specialized seed tissues involved in the uptake, reprocessing and release of metabolites into the endosperm to support embryogenesis [75], [76]. The proposal that an active synthesis of isoprenoid precursors occurs in the chalazal endosperm at the early stages of embryo development is further supported by the results of a previous study showing a strong expression of isopentenyl transferase (IPT) genes *AtIPT4* and *AtIPT8* in the chalazal zone of Arabidopsis seeds, that disappeared when the embryo progressed to the heart stage [77]. IPTs catalyze

the first committed step of the cytokinin biosynthetic pathway, the isopentenylolation of AMP, ADP and ATP from DMAPP [78]. Interestingly, the finding that *FPS2* gene started to be expressed in embryos at the heart stage of development suggests that the embryo acquires the ability to synthesize its own FPP at this stage, though this biosynthetic capability does not seem to be essential for normal embryo and seed development since embryos in *fps2* mutant seeds lacking FPS2 activity are fully viable (Figure S2). These observations support the hypothesis that the maternal chalazal seed coat is able to supply sufficient FPP or FPP-derived precursors to the embryo and the endosperm to sustain normal seed development, though the amount of isoprenoid precursors supplied by this tissue would not be sufficient to sustain normal sterol production in the *fps2* seeds (Figure 9). The finding that expression of FPS2 under control of the *FPS1* promoter (Figure 10), whose activity is restricted to the chalazal seed coat based on the GUS expression analysis (Figure 6), was also able to restore normal sterols levels to *fps2* seeds (Figure 11) lends further support to the hypothesis that the maternal chalazal seed coat can function as a source of FPP for the developing embryo and reinforces the view that maternal seed tissues contribute sterol precursors to developing Arabidopsis embryos [79]. Nevertheless, to the best of our knowledge direct experimental evidence of FPP exchange between cells has yet to be provided. These cross-complementation experiments also indicated that the level of FPS1-derived activity in the chalazal seed coat of *fps2* seeds is only slightly below the minimum threshold of total FPS activity needed to sustain a normal flux through the sterol pathway in seeds, since a 1.2-fold increase of FPS activity in this tissue with respect to the activity in *fps2* seeds (Figure 10) is enough to prevent all *fps2* seed and seedling phenotypes including normal sterols levels (Figure 11). In conclusion, the existence of two potential sources of FPP in seeds would explain why under normal conditions embryos and seeds of

fps single knockout mutants develop like their wild-type counterparts.

Supporting Information

Figure S1 Predicted secondary structure of the region containing the AUG translation initiation codon of the FPS2::FPS1S, FPS2, and FPS2::FPS1S-mutdis mRNAs.

Secondary structure models were generated by using the RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). The AUG start codons are marked with an oval.

(TIF)

Figure S2 Normal embryo development in *fps2-1* mutant seeds. Seeds with embryos at the indicated developmental stages were fixed and cleared for visualization as previously described [26].

(TIF)

Acknowledgments

The excellent technical support from Patricia Lordén and members of the Greenhouse and Microscopy facilities at CRAG and the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona is greatly appreciated. The authors also thank the Galicia Supercomputing Center (CESGA) for the provision of computational support. V.K. and D.C. were recipients of PhD fellowships from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VK DM FJF MCV MA AF. Performed the experiments: VK DM FJF MC PA DC CB MA AF. Analyzed the data: VK DM FJF CB MCV MA AF. Wrote the paper: MCV AF.

References

- Croteau RB, Kutchan T, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville MD: American Society of Plant Biologists. 1250–1268.
- Rodríguez-Concepción M (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* 5: 1–15.
- Wang KC, Ohnuma S (2000) Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta* 1529: 33–48.
- Vandermoten S, Haubrugge E, Cusson M (2009) New insights into short-chain prenyltransferases: structural features, evolutionary history and potential for selective inhibition. *Cel Mol Life Sci* 66: 3685–3695.
- Tholl D, Sungbeon L (2011) Terpene specialized metabolism in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Book* 9: e0143. doi:10.1043/tab.0143.
- Crowell DN, Salaz MS (1992) Inhibition of growth of cultured tobacco cells at low concentrations of lovastatin is reversed by cytokinin. *Plant Physiol* 100: 2090–2095.
- Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernandez-Busquets X, et al. (2002) Overexpression of Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic Arabidopsis induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J* 30: 123–132.
- Manzano D, Fernández-Busquets X, Schaller H, González V, Boronat A, et al. (2004) The metabolic imbalance underlying lesion formation in Arabidopsis thaliana overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* 219: 982–992.
- Manzano D, Busquets A, Closa M, Hoyerová K, Schaller H, et al. (2006) Overexpression of farnesyl diphosphate synthase in Arabidopsis mitochondria triggers light-dependent lesion formation and alters cytokinin homeostasis. *Plant Mol Biol* 61: 195–213.
- Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, et al. (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* 8: 693–701.
- Attucci S, Aitken SM, Gulick PJ, Ibrahim RK (1995) Farnesylpyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys* 321: 493–500.
- Cunillera N, Arró M, Delourme D, Karst F, Boronat A, et al. (1996) Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem* 271: 7774–7780.
- Cunillera N, Boronat A, Ferrer A (1997) The Arabidopsis thaliana FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* 272: 15381–15388.
- Li C-P, Larkins BA (1996) Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. *Gene* 171: 193–196.
- Pan Z, Herickhoff L, Backhaus RA (1996) Cloning, characterization, and heterologous expression of cDNAs for farnesyl diphosphate synthase from the guayule rubber plant reveals that this prenyltransferase occurs in rubber particles. *Arch Biochem Biophys* 332: 196–204.
- Sanmiya K, Ueno O, Matsuoka M, Yamamoto N (1999) Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 40: 348–354.
- Gaffe J, Bru JP, Causse M, Vidal A, Stamitti-Bert L, et al. (2000) LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development. *Plant Physiol* 123: 1351–1362.
- Hemmerlin A, Rivera SB, Erickson HK, Poulter CD (2003) Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J Biol Chem* 278: 32132–32140.
- Suzuki M, Muranaka T (2007) Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids* 42: 47–54.
- Vranová E, Coman D, Gruissem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* 5: 318–333.
- Thabet I, Guirimand G, Courdavault V, Papon N, Godet S, et al. (2011) The subcellular localization of periwinkle farnesyl diphosphate synthase provides insight into the role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis. *J Plant Physiol* 168: 2110–2116.
- Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, et al. (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol* 148: 1219–1228.
- Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, et al. (2011) Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta* 234: 903–914.

24. Kovacs WJ, Tape KN, Shackelford JE, Duan X, Kasumov T, et al. (2007) Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochem Cell Biol* 127: 273–290.
25. Cunillera N, Boronat A, Ferrer A (2000) Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the Arabidopsis thaliana farnesyl diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2. *Plant Mol Biol* 44: 745–758.
26. Closa M, Vranová E, Bortolotti C, Bigler L, Arró M, et al. (2010) The Arabidopsis thaliana FPP synthase isozymes have overlapping and specific functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FPP synthase activity causes early developmental arrest. *Plant J* 63: 512–525.
27. Bach TJ, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Vollack KU (1999) Mevalonate biosynthesis in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34: 107–122.
28. Hodzic A, Rappolt M, Amenitsch H, Laggner P, Pabst G (2008) Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol. *Biophys J* 94: 3935–3944.
29. Fujioka S, Yokota T (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* 54: 137–164.
30. Schrick K, Mayer U, Horrichs A, Kuhnt C, Bellini C, et al. (2000) FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* 14: 1471–1484.
31. Schrick K, Mayer U, Martin G, Bellini C, Kuhnt C, et al. (2002) Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of Arabidopsis. *Plant J* 31: 61–73.
32. Huguency P, Camara B (1990) Purification and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*. *FEBS Lett* 273: 235–238.
33. Tholl D, Croteau R, Gershenzon J (2001) Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch Biochem Biophys* 386: 233–242.
34. Schmidt A, Gershenzon J (2007) Cloning and characterization of isoprenyl diphosphate synthases with farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate synthase activity from Norway spruce (*Picea abies*) and their relation to induced oleoresin formation. *Phytochemistry* 68: 2649–2659.
35. Montella C, Bellsollé L, Pérez-Luque R, Badia J, Baldomà L, et al. (2005) Crystal structure of an iron-dependent group III dehydrogenase that interconverts l-lactaldehyde and l-1,2-propanediol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 4957–4966.
36. Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85: 109–114.
37. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–75.
39. Dale S, Arró M, Becerra B, Morrice NG, Boronat A, et al. (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* 233: 506–513.
40. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2: 2212–2221.
41. Rondeau J-M, Bitsch F, Bourgier E, Geiser M, Hemmig R, et al. (2006) Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *Chem Med Chem* 1: 267–273.
42. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A (2008) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 426: 145–159.
43. Kim DE, Chivian D, Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res*. 32 (Web Server issue), W526–531.
44. Kaufmann KW, Lemmon GH, Deluca SL, Sheehan JH, Meiler J (2010) Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry* 49: 2987–2998.
45. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, et al. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35 (Web Server issue), W375–383.
46. Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D (2011) Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins* 79: 830–838.
47. Benedix A, Becker CM, de Groot BL, Caffisch A, Böckmann RA (2009) Predicting free energy changes using structural ensembles. *Nat Methods* 6: 3–4.
48. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16: 735–743.
49. Stangeland B, Salehian Z (2002) An improved clearing method for GUS staining in Arabidopsis endosperm. *Plant Mol Biol Rep* 20: 107–114.
50. Nelson BK, Cai X, Nebenführ A (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* 51: 1126–1136.
51. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, et al. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13079–13084.
52. Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372: 774–797.
53. Adeli K (2011) Translational control mechanisms in metabolic regulation: critical role of RNA binding proteins, microRNAs, and cytoplasmic RNA granules. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E1051–E1064.
54. Reineke LC, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC (2008) A small stem-loop element directs internal initiation of the URE2 internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283: 19011–19025.
55. Blaszczyk L, Ciesiolka J (2011) Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry* 50: 7080–7092.
56. Mekkiengkrai D, Sando T, Hirooka K, Sakdapiphanich J, Tanaka Y, et al. (2004). Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the rubber-producing mushroom *Lactarius chrysorheus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2360–2368.
57. Felle HH (2001) pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol* 3: 577–591.
58. Ito J, Bath TS, Petzold CJ, Redding-Johansson AM, Mukhopadhyay A, et al. (2011) Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J Proteome Res* 10, 1571–1582.
59. Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, et al. (2007) Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* 19, 3170–3193.
60. Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, et al. (2009) In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiol* 150: 125–143.
61. Guirimand G, Courdavault V, St-Pierre B, Burlat V (2010) Biosynthesis and regulation of alkaloids. In Pua EC, Davey M, editors. *Plant Developmental Biology. Biotechnological Perspectives*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. vol. 2, 139–160.
62. Sen SE, Trobaugh C, Béliveau C, Richard T, Cusson M (2007) Cloning, expression and characterization of a dipteran farnesyl diphosphate synthase. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1198–1206.
63. Ranzer LK, Brück TB, Brück WM, López JV, Kerr RG (2009) A new prokaryotic farnesyl diphosphate synthase from the octocoral *Eunicia fusca*: differential display, inverse PCR, cloning, and characterization. *Mar Biotechnol* 11: 62–73.
64. Koyama T, Obata S, Osabe M, Takeshita A, Yokoyama K, et al. (1993) Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J Biochem (Tokyo)* 113: 355–363.
65. Szkopinska A, Plochocka D (2005) Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Polon* 52: 45–55.
66. Koyama T, Gotoh Y, Nishino T (2000) Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: Reconstruction of active enzymes by hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants. *Biochemistry* 39: 463–469.
67. Madern D, Ebel C, Zaccai G (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91–98.
68. Madern D, Pfister C, Zaccai G (1995) Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* 230: 1088–1095.
69. Dong Y, Somero GN (2009) Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of limpets (genus *Lottia*): differences in stability and function due to minor changes in sequence correlate with biogeographic and vertical distributions. *J Exp Biol* 212: 169–177.
70. Kumar S, Tsai C (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* 13: 179–191.
71. Zeldovich BZ, Berezovsky IN, Shakhnovich EI (2007) Protein and DNS sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput Biol* 3: e5.
72. Liu S-L, Baute GJ, Adams K (2011) Organ and cell type-specific complementary expression patterns and regulatory neofunctionalization between duplicated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol Evol* 3: 1419–1436.
73. Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E (2005) Heat stress phenotypes of Arabidopsis thaliana mutants implicate multiple signalling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138: 882–897.
74. Burke JJ, O'Mahony PJ, Oliver MJ (2000) Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance. *Plant Physiol* 123: 575–587.
75. Nguyen H, Brown RC, Lemmon B (2000) The specialized chalazal endosperm in *Arabidopsis thaliana* and *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Protoplasma* 212: 99–110.
76. Ingram GC (2010) Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development. *Protoplasma* 247: 195–214.
77. Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37: 128–138.
78. Sakakibara H (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 431–449.
79. Rasbery JM, Shan H, LeClair RJ, Norman M, Matsuda SPT, et al. (2007) Arabidopsis thaliana squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J Biol Chem* 282: 17002–17013.

ANEXOS

Anexo 1. RNA-Seq. Listado de los 153 genes expresados diferencialmente en raíz ordenados por su *fold change*

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT4G34250	KCS16	Chr4:16394707-16396495	5,57	0,40	-5,17	-13,92	-3,80	4,44	8,85E-06	2,91E-03	3-ketoacyl-CoA synthase 16, biosynthesis of VLCFA (very long chain fatty acids)
AT3G48510		Chr3:17967353-17968538	4,88	0,41	-4,47	-11,89	-3,57	3,80	1,42E-04	2,37E-02	unknown protein
AT4G13420	HAK5	Chr4:7796849-7802251	3,67	0,36	-3,31	-10,16	-3,34	4,15	3,31E-05	7,70E-03	high affinity K ⁺ transporter 5
AT1G69230	SP1L2	Chr1:26026311-26027708	53,06	5,25	-47,81	-10,11	-3,34	5,43	5,68E-08	5,35E-05	SPIRAL1-like2
AT1G62540	FMO GS-OX2	Chr1:23151793-23155717	7,15	0,72	-6,44	-9,97	-3,32	4,52	6,07E-06	2,19E-03	flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 2 (glucosinolate biosynthesis)
AT5G24770	VSP2	Chr5:8500475-8502224	19,84	2,46	-17,39	-8,08	-3,01	4,92	8,79E-07	4,36E-04	vegetative storage protein 2
AT1G66950	PDR11	Chr1:24978204-24984619	1,87	0,24	-1,63	-7,92	-2,99	3,90	9,69E-05	1,76E-02	pleiotropic drug resistance 11, ABC transporter G family member 39
AT5G42600	MRN1	Chr5:17053516-17058245	15,58	2,07	-13,50	-7,51	-2,91	6,18	6,55E-10	8,86E-07	marneral synthase
AT4G11880	AGL14	Chr4:7143114-7147391	20,10	2,70	-17,41	-7,46	-2,90	4,84	1,27E-06	5,61E-04	AGAMOUS-like 14
AT5G38000		Chr5:15141787-15143492	20,06	2,70	-17,36	-7,43	-2,89	5,07	3,91E-07	2,49E-04	Zinc-binding dehydrogenase family protein
AT2G33850		Chr2:14321061-14322049	48,99	7,07	-41,91	-6,92	-2,79	6,37	1,93E-10	3,48E-07	unknown protein
AT4G13310	CYP71A20	Chr4:7750304-7753133	5,81	0,86	-4,95	-6,72	-2,75	3,87	1,07E-04	1,90E-02	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 20
AT5G15960	KIN1	Chr5:5209897-5210727	308,49	51,41	-257,08	-6,00	-2,59	7,70	1,35E-14	2,67E-10	stress-responsive/-induced protein (cold and ABA inducible protein)
AT1G26770	EXPA10	Chr1:9259604-9261313	8,23	1,42	-6,81	-5,80	-2,54	3,63	2,79E-04	3,98E-02	expansin A10
AT5G42580	CYP705A12	Chr5:17023645-17025229	10,64	1,93	-8,71	-5,51	-2,46	4,10	4,07E-05	8,74E-03	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 12
AT4G00910		Chr4:389369-391287	15,12	2,78	-12,33	-5,43	-2,44	4,63	3,66E-06	1,39E-03	Aluminium activated malate transporter family protein
AT3G62740	BGLU7	Chr3:23211415-23213888	50,04	9,39	-40,65	-5,33	-2,41	6,48	8,92E-11	1,93E-07	beta glucosidase 7

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT2G20340	AAS	Chr2:8779734-8782772	12,26	2,34	-9,92	-5,25	-2,39	4,41	1,03E-05	3,20E-03	Aromatic aldehyde synthase, Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily, Tyrosine decarboxylase 1
AT5G23840		Chr5:8035766-8036982	46,21	8,89	-37,32	-5,20	-2,38	4,90	9,36E-07	4,50E-04	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
AT4G37800	XTH7	Chr4:17775473-17777397	15,25	2,96	-12,28	-5,15	-2,36	3,99	6,75E-05	1,34E-02	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7
AT5G51750	SBT1.3	Chr5:21020206-21022781	6,80	1,35	-5,45	-5,04	-2,33	4,20	2,66E-05	6,47E-03	subtilase 1.3
AT2G18470	PERK4	Chr2:8005284-8008052	6,24	1,24	-5,00	-5,02	-2,33	3,63	2,80E-04	3,98E-02	proline-rich extensin-like receptor kinase 4
AT3G20470	GRP5	Chr3:7140439-7141228	254,15	50,77	-203,38	-5,01	-2,32	7,26	3,74E-13	2,03E-09	glycine-rich protein 5
AT3G48350	CEP3	Chr3:17905724-17907561	11,84	2,40	-9,44	-4,93	-2,30	4,07	4,70E-05	9,71E-03	Cysteine proteinases superfamily protein
AT3G16370		Chr3:5556709-5558589	31,97	6,51	-25,46	-4,91	-2,30	5,23	1,68E-07	1,20E-04	GDSL-like Esterase/Lipase, Acylhydrolase superfamily protein
AT4G04890	PDF2	Chr4:2476488-2482345	4,82	1,00	-3,82	-4,84	-2,27	3,81	1,40E-04	2,35E-02	protodermal factor 2, homeobox-leucine zipper protein
AT5G44400		Chr5:17886193-17888480	24,32	5,04	-19,28	-4,82	-2,27	5,54	2,99E-08	2,95E-05	FAD-binding Berberine family protein
AT3G45680		Chr3:16770932-16773030	15,96	3,32	-12,65	-4,81	-2,27	4,55	5,47E-06	2,01E-03	Major facilitator superfamily protein, putative nitrate excretion transporter 3
AT1G62280	SLAH1	Chr1:23007146-23008585	31,06	6,47	-24,59	-4,80	-2,26	4,96	7,15E-07	3,78E-04	SLAC1 homologue 1, S-type anion channel
AT2G16005		Chr2:6959149-6960197	311,15	68,53	-242,62	-4,54	-2,18	6,72	1,83E-11	4,97E-08	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
AT3G47340	ASN1/DIN6	Chr3:17437883-17441243	10,58	2,45	-8,12	-4,31	-2,11	3,59	3,36E-04	4,67E-02	glutamine-dependent asparagine synthase 1
AT4G07820	CAP	Chr4:4636763-4637450	44,80	10,57	-34,23	-4,24	-2,08	4,17	3,01E-05	7,25E-03	Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, Pathogenesis-related 1 protein
AT5G01870		Chr5:337176-337820	247,06	58,33	-188,73	-4,24	-2,08	6,27	3,52E-10	5,45E-07	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/pathogenesis-related
AT4G13290	CYP71A19	Chr4:7740282-7742857	26,11	6,24	-19,86	-4,18	-2,06	5,34	9,41E-08	7,55E-05	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 19

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT3G23450		Chr3:8410432-8412193	12,61	3,05	-9,57	-4,14	-2,05	4,92	8,85E-07	4,36E-04	unknown protein
AT5G24780	VSP1	Chr5:8507589-8508957	123,62	29,97	-93,65	-4,12	-2,04	6,20	5,64E-10	8,15E-07	vegetative storage protein 1, acid phosphatase
AT4G29020		Chr4:14304920-14305721	40,80	10,30	-30,49	-3,96	-1,99	4,28	1,84E-05	4,86E-03	glycine-rich protein
AT5G15970	COR6.6 /KIN2	Chr5:5211910-5212665	570,81	150,94	-419,86	-3,78	-1,92	6,09	1,14E-09	1,46E-06	stress-responsive/-induced protein, cold-responsive/regulated protein
AT4G14060		Chr4:8107336-8108307	106,92	28,48	-78,44	-3,75	-1,91	5,37	7,87E-08	7,11E-05	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily, major latex protein-like
AT1G60470	GolS4	Chr1:22275483-22280586	31,76	8,52	-23,25	-3,73	-1,90	4,57	4,98E-06	1,86E-03	galactinol synthase 4
AT5G38020		Chr5:15165651-15167729	127,14	34,15	-92,99	-3,72	-1,90	5,98	2,23E-09	2,69E-06	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily
AT4G12550	AIR1	Chr4:7439114-7439805	722,46	198,62	-523,84	-3,64	-1,86	5,84	5,21E-09	5,94E-06	Auxin-Induced in Root cultures 1
AT5G59320	LTP3	Chr5:23928970-23929745	124,04	34,16	-89,88	-3,63	-1,86	5,27	1,33E-07	1,03E-04	lipid transfer protein 3
AT1G66800		Chr1:24924812-24926365	33,75	9,63	-24,12	-3,50	-1,81	4,24	2,23E-05	5,63E-03	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily, alcohol dehydrogenase-like protein
AT5G44417		Chr5:17901831-17903346	14,11	4,06	-10,04	-3,47	-1,80	3,59	3,27E-04	4,60E-02	pseudogene
AT4G30140	CDEF1	Chr4:14738386-14740676	42,38	12,51	-29,88	-3,39	-1,76	4,78	1,79E-06	7,30E-04	GDSL-like Esterase/Lipase, Acylhydrolase superfamily, cuticle destructing factor 1
AT1G18870	ICS2	Chr1:6515428-6519282	21,63	6,53	-15,10	-3,31	-1,73	4,13	3,67E-05	8,28E-03	isochorismate synthase 2
AT2G42840	PDF1	Chr2:17826115-17827536	82,19	25,39	-56,81	-3,24	-1,69	4,94	7,67E-07	3,96E-04	protodermal factor 1, putative extracellular proline-rich protein
AT5G01600	FER1	Chr5:227023-230051	236,91	73,72	-163,19	-3,21	-1,68	5,23	1,72E-07	1,20E-04	ferretin 1
AT1G73330	DR4	Chr1:27568717-27569717	1857,55	591,37	-1266,18	-3,14	-1,65	3,65	2,62E-04	3,82E-02	drought-repressed 4
AT4G36250	ALDH3F1	Chr4:17150868-17153578	16,00	5,17	-10,83	-3,09	-1,63	3,90	9,82E-05	1,76E-02	aldehyde dehydrogenase 3F1
AT4G11190		Chr4:6826676-6827383	140,65	46,24	-94,41	-3,04	-1,60	4,81	1,54E-06	6,53E-04	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT5G47990	CYP705A5/ THAD1	Chr5:19434826-19436689	146,46	50,48	-95,97	-2,90	-1,54	4,87	1,14E-06	5,26E-04	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 5; thalian-diol desaturase
AT3G26460		Chr3:9683872-9684657	148,11	51,75	-96,36	-2,86	-1,52	4,75	2,05E-06	8,22E-04	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT1G55740	SIP1/RS1	Chr1:20835365-20838778	16,87	6,09	-10,79	-2,77	-1,47	3,97	7,22E-05	1,42E-02	seed imbibition 1, raffinose synthase 1
AT2G01520	MLP328	Chr2:235924-237147	1558,10	566,66	-991,44	-2,75	-1,46	3,57	3,56E-04	4,85E-02	MLP-like protein 328
AT4G12545		Chr4:7434198-7434858	399,34	151,60	-247,73	-2,63	-1,40	4,49	7,01E-06	2,49E-03	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT1G02640	BXL2	Chr1:564204-567769	36,10	13,76	-22,34	-2,62	-1,39	4,34	1,40E-05	3,85E-03	beta-xylosidase 2
AT2G43590		Chr2:18081330-18082767	248,78	95,10	-153,68	-2,62	-1,39	4,41	1,02E-05	3,20E-03	Chitinase family protein
AT1G12780	UGE1	Chr1:4353905-4358328	82,68	31,71	-50,96	-2,61	-1,38	4,32	1,54E-05	4,11E-03	UDP-D-glucose/UDP-D-galactose/UDP-D-xylose 4-epimerase 1
AT5G02230		Chr5:448104-450654	64,02	24,96	-39,07	-2,57	-1,36	3,84	1,25E-04	2,14E-02	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT4G29270		Chr4:14423661-14424882	184,46	72,01	-112,44	-2,56	-1,36	4,37	1,23E-05	3,54E-03	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase
AT5G48000	CYP708A2/ THAH1	Chr5:19444137-19447850	120,86	47,64	-73,22	-2,54	-1,34	4,16	3,25E-05	7,66E-03	cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 2; thalianol hydroxylase 1
AT2G38750	ANNAT4	Chr2:16196264-16198491	67,88	26,87	-41,01	-2,53	-1,34	4,14	3,52E-05	8,11E-03	annexin D4
AT5G48010	THAS1	Chr5:19456959-19461689	100,66	39,98	-60,68	-2,52	-1,33	4,16	3,21E-05	7,64E-03	thalianol synthase 1, oxidosqualene cyclase
AT5G11110	SPS2F	Chr5:3536225-3541133	12,43	5,03	-7,40	-2,47	-1,31	3,68	2,31E-04	3,48E-02	sucrose phosphate synthase 2F
AT5G56870	BGAL4	Chr5:23004195-23008649	92,46	37,77	-54,69	-2,45	-1,29	4,12	3,75E-05	8,28E-03	beta-galactosidase 4
AT1G62570	FMO GS-OX4	Chr1:23169135-23172105	95,29	39,42	-55,88	-2,42	-1,27	4,12	3,79E-05	8,28E-03	flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 4 (glucosinolate biosynthesis)
AT1G54660		Chr1:20408412-20411449	16,22	6,80	-9,43	-2,39	-1,25	3,59	3,33E-04	4,65E-02	pseudogene
AT5G24030	SLAH3	Chr5:8118316-8122784	72,55	30,52	-42,03	-2,38	-1,25	4,02	5,72E-05	1,15E-02	SLAC1 homologue 3

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT5G37990		Chr5:15133736-15135500	299,51	126,83	-172,68	-2,36	-1,24	3,77	1,62E-04	2,59E-02	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily
AT3G29250	SDR4	Chr3:11193658-11194993	135,18	57,39	-77,79	-2,36	-1,24	3,65	2,63E-04	3,82E-02	NAD(P)-binding Rossmann-fold family, short-chain dehydrogenase reductase 4
AT5G66170	STR18	Chr5:26447641-26448776	92,18	40,17	-52,01	-2,29	-1,20	3,56	3,68E-04	4,98E-02	sulfurtransferase 18
AT3G09220	LAC7	Chr3:2827238-2830542	113,24	50,34	-62,90	-2,25	-1,17	3,78	1,57E-04	2,54E-02	laccase 7
AT5G48070	XTH20	Chr5:19482105-19483452	37,37	84,68	47,31	2,27	1,18	-3,68	2,35E-04	3,52E-02	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 20
AT3G44260	CAF1A	Chr3:15952044-15953084	55,20	125,34	70,14	2,27	1,18	-3,78	1,57E-04	2,54E-02	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
AT1G27730	STZ/ZAT10	Chr1:9648140-9649073	70,05	160,84	90,80	2,30	1,20	-3,84	1,21E-04	2,11E-02	salt tolerance zinc finger
AT5G10210		Chr5:3206139-3208825	27,80	66,16	38,36	2,38	1,25	-3,71	2,09E-04	3,16E-02	unknown protein, C2 calcium-dependent membrane targeting
AT5G13930	TT4	Chr5:4488687-4495585	158,24	387,28	229,04	2,45	1,29	-3,71	2,09E-04	3,16E-02	Chalcone and stilbene synthase family protein, Transparent testa 4
AT2G41010	CAMB25	Chr2:17113865-17114804	35,00	86,84	51,84	2,48	1,31	-3,72	1,98E-04	3,05E-02	calmodulin (CAM)-binding protein of 25 kDa
AT1G44800	SIAR1	Chr1:16914008-16916997	137,47	342,62	205,16	2,49	1,32	-3,84	1,26E-04	2,14E-02	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT2G22510		Chr2:9569025-9569758	155,23	387,03	231,81	2,49	1,32	-4,26	2,05E-05	5,30E-03	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT1G27020		Chr1:9378558-9380692	17,93	45,20	27,27	2,52	1,33	-3,85	1,20E-04	2,11E-02	unknown protein
AT5G05270	CHIL	Chr5:1563319-1565007	36,65	92,56	55,91	2,53	1,34	-3,84	1,22E-04	2,11E-02	Chalcone-flavanone isomerase family protein
AT1G12200	FMO	Chr1:4137532-4140028	19,23	48,59	29,36	2,53	1,34	-4,09	4,31E-05	9,05E-03	Flavin-binding monooxygenase family protein
AT1G71400	RLP12	Chr1:26909834-26912597	13,49	34,98	21,49	2,59	1,37	-4,24	2,23E-05	5,63E-03	receptor like protein 12
AT4G01430	UMAMIT29	Chr4:585597-588029	22,22	59,20	36,97	2,66	1,41	-4,09	4,34E-05	9,05E-03	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family, usually multiple acids move in and out
AT1G61820	BGLU46	Chr1:22835077-22838615	39,11	105,08	65,97	2,69	1,43	-4,45	8,56E-06	2,85E-03	beta glucosidase 46

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT2G27550	ATC	Chr2:11773250-11774681	24,03	65,14	41,11	2,71	1,44	-3,95	7,85E-05	1,52E-02	centroradialis
AT3G55120	TT5	Chr3:20430113-20431470	37,92	103,44	65,51	2,73	1,45	-4,38	1,17E-05	3,42E-03	Chalcone-flavanone isomerase family protein, Transparent testa 5
AT3G01950		Chr3:323976-324365	59,86	164,47	104,61	2,75	1,46	-3,77	1,60E-04	2,57E-02	Protein of unknown function (DUF 3339)
AT5G10625		Chr5:3358786-3359781	30,78	85,14	54,36	2,77	1,47	-4,35	1,39E-05	3,85E-03	unknown protein
AT1G21130	IGMT4	Chr1:7399061-7400605	22,43	64,83	42,39	2,89	1,53	-4,48	7,30E-06	2,55E-03	O-methyltransferase family protein, Indole glucosinolate O-methyltransferase 4
AT5G26340	STP13/ MSS1	Chr5:9243510-9247066	15,62	46,83	31,21	3,00	1,58	-4,74	2,11E-06	8,32E-04	Major facilitator superfamily protein, sugar transport protein 13
AT2G31110	TBL40	Chr2:13258328-13262099	10,33	31,25	20,92	3,03	1,60	-3,89	9,83E-05	1,76E-02	Plant protein of unknown function (DUF231)
AT5G08640	FLS1	Chr5:2803956-2805606	30,20	91,39	61,19	3,03	1,60	-5,00	5,76E-07	3,29E-04	flavonol synthase 1
AT1G18570	MYB51	Chr1:6389410-6391267	8,87	27,15	18,28	3,06	1,61	-4,21	2,57E-05	6,32E-03	myb domain protein 51, high indolic glucosinolate 1
AT4G08300	UMAMIT17	Chr4:5244890-5248342	19,82	61,98	42,17	3,13	1,65	-4,96	7,11E-07	3,78E-04	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family
AT4G31800	WRKY18	Chr4:15383200-15385029	9,29	29,22	19,93	3,15	1,65	-4,22	2,40E-05	5,98E-03	WRKY DNA-binding protein 18
AT1G28600		Chr1:10051000-10053117	6,59	20,91	14,31	3,17	1,66	-3,67	2,43E-04	3,61E-02	GDSL-like Esterase/Lipase, Acylhydrolase superfamily protein
AT4G18010	5PTASE2/ IP5PII	Chr4:9991011-9994420	14,63	46,49	31,86	3,18	1,67	-5,02	5,07E-07	3,05E-04	myo-inositol polyphosphate 5-phosphatase 2
AT1G49230		Chr1:18209260-18210128	12,15	39,05	26,90	3,21	1,68	-3,83	1,28E-04	2,16E-02	RING/U-box superfamily protein
AT2G18690		Chr2:8097419-8098827	28,04	91,52	63,48	3,26	1,71	-5,00	5,68E-07	3,29E-04	unknown protein
AT3G22550		Chr3:7991645-7993454	9,44	30,98	21,54	3,28	1,71	-4,36	1,28E-05	3,64E-03	Protein of unknown function (DUF581)
AT1G67110	CYP735A2	Chr1:25061730-25065446	15,67	51,94	36,27	3,31	1,73	-5,16	2,50E-07	1,64E-04	cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 2; cytokinin hydroxylase
AT1G76930	EXT4	Chr1:28895300-28896883	488,19	1652,77	1164,58	3,39	1,76	-4,38	1,17E-05	3,42E-03	extensin 4

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT4G39675		Chr4:18413774-18414240	55,70	189,24	133,55	3,40	1,76	-4,85	1,26E-06	5,61E-04	unknown protein
AT2G07671		Chr2:3251664-3252113	26,68	90,71	64,03	3,40	1,77	-3,75	1,78E-04	2,78E-02	ATP synthase subunit C family protein
AT5G22250	CAF1b	Chr5:7365531-7366778	10,33	35,35	25,03	3,42	1,78	-4,33	1,46E-05	3,96E-03	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
AT1G11080	scpl31	Chr1:3694671-3698013	39,79	145,48	105,69	3,66	1,87	-5,63	1,81E-08	1,96E-05	serine carboxypeptidase-like 31
AT5G59080		Chr5:23847404-23848557	9,52	36,19	26,68	3,80	1,93	-3,94	8,18E-05	1,55E-02	unknown protein
AT2G23910		Chr2:10177833-10180064	6,10	23,97	17,87	3,93	1,97	-4,48	7,51E-06	2,58E-03	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily
AT1G77380	AAP3	Chr1:29074887-29077390	4,97	23,13	18,16	4,65	2,22	-5,23	1,68E-07	1,20E-04	amino acid permease 3
AT4G23713	JAW/ MIR319A	Chr4:12352955-12353131	117,75	574,07	456,33	4,88	2,29	-3,73	1,94E-04	3,01E-02	jagged and wavy, microRNA 319
AT3G48520	CYP94B3	Chr3:17974976-17976670	10,45	52,13	41,68	4,99	2,32	-6,47	1,01E-10	1,99E-07	cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3
AT2G31980	CYS2	Chr2:13609092-13609902	3,79	20,16	16,37	5,32	2,41	-3,80	1,47E-04	2,40E-02	PHYTOCYSTATIN 2, cysteine proteinase inhibitor 2
AT2G43510	TI1	Chr2:18067171-18067802	8,51	46,20	37,69	5,43	2,44	-4,10	4,18E-05	8,89E-03	trypsin inhibitor protein 1
AT1G06830		Chr1:2097150-2097655	5,89	33,26	27,37	5,65	2,50	-3,62	2,90E-04	4,10E-02	Glutaredoxin family protein, monothiol glutaredoxin-S11
AT3G21720	ICL	Chr3:7652486-7656011	0,80	4,62	3,81	5,76	2,53	-3,66	2,56E-04	3,78E-02	isocitrate lyase
AT2G48090		Chr2:19669109-19669764	5,45	31,76	26,32	5,83	2,54	-4,41	1,05E-05	3,22E-03	unknown protein
AT1G56430	NAS4	Chr1:21136943-21138087	5,91	34,62	28,72	5,86	2,55	-4,98	6,32E-07	3,51E-04	nicotianamine synthase 4
AT1G47395		Chr1:17383033-17383408	13,96	82,04	68,07	5,87	2,55	-4,11	3,95E-05	8,55E-03	unknown protein
AT3G28580		Chr3:10715622-10717329	2,83	17,54	14,71	6,20	2,63	-5,54	2,97E-08	2,95E-05	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase, AAA-type ATPase family
AT2G22860	PSK2	Chr2:9737606-9738298	4,63	29,51	24,88	6,37	2,67	-3,89	9,85E-05	1,76E-02	phytosulfokine 2 precursor

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT1G74810	BOR5	Chr1:28108473-28111534	0,81	5,42	4,61	6,68	2,74	-3,90	9,47E-05	1,76E-02	HCO3- transporter family, boron transporter 5
AT5G01740		Chr5:280721-281445	4,38	30,24	25,86	6,90	2,79	-4,81	1,47E-06	6,39E-04	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein
AT1G03580		Chr1:892846-894052	1,45	10,72	9,27	7,37	2,88	-3,90	9,47E-05	1,76E-02	pseudogene
AT4G12480	EARL1	Chr4:7406104-7406937	249,20	1870,88	1621,68	7,51	2,91	-7,62	2,46E-14	2,67E-10	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT4G31330		Chr4:15202295-15203431	2,41	18,09	15,68	7,52	2,91	-4,39	1,12E-05	3,38E-03	Protein of unknown function, DUF599
AT2G22590		Chr2:9592995-9594535	1,56	12,51	10,96	8,02	3,00	-4,64	3,48E-06	1,35E-03	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT3G02480		Chr3:512311-513027	6,89	65,27	58,38	9,47	3,24	-5,35	8,66E-08	7,22E-05	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
AT3G17520		Chr3:5999288-6000370	0,54	5,13	4,59	9,57	3,26	-3,80	1,45E-04	2,40E-02	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
AT2G27535		Chr2:11765322-11766144	1,30	13,53	12,23	10,40	3,38	-3,57	3,51E-04	4,82E-02	ribosomal protein L10A family protein
AT1G47400		Chr1:17385716-17386186	2,11	25,20	23,08	11,92	3,57	-3,90	9,81E-05	1,76E-02	unknown protein
AT2G35300	LEA18	Chr2:14862900-14863387	1,60	22,89	21,29	14,31	3,84	-4,41	1,03E-05	3,20E-03	Late embryogenesis abundant protein 4-2
AT4G12500		Chr4:7414149-7414927	4,95	74,03	69,07	14,95	3,90	-6,31	2,88E-10	4,80E-07	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT3G28540		Chr3:10694443-10696123	0,20	3,46	3,26	17,49	4,13	-3,76	1,67E-04	2,62E-02	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase, AAA-type ATPase family
AT1G73805	SARD1	Chr1:27745426-27749178	1,29	26,05	24,76	20,19	4,34	-7,05	1,74E-12	7,53E-09	Calmodulin binding protein-like
AT5G40420	OLE2/ OLEO2	Chr5:16173392-16174783	0,53	11,07	10,54	20,80	4,38	-4,47	7,82E-06	2,65E-03	oleosin 2
AT4G15680		Chr4:8931651-8932295	0,62	14,32	13,70	22,99	4,52	-4,26	2,01E-05	5,26E-03	Thioredoxin superfamily protein, monothiol glutaredoxin-S4
AT4G12490		Chr4:7409620-7410406	3,74	87,75	84,01	23,45	4,55	-6,93	4,10E-12	1,48E-08	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT1G48130	PER1	Chr1:17780501-17781727	0,47	12,56	12,09	26,78	4,74	-4,89	1,03E-06	4,85E-04	1-cysteine peroxiredoxin 1

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT1G47980		Chr1:17691833-17693867	0,15	4,97	4,81	32,19	5,01	-4,12	3,77E-05	8,28E-03	unknown protein
AT3G54940		Chr3:20354350-20356318	0,09	3,04	2,94	32,40	5,02	-3,95	7,81E-05	1,52E-02	Papain family cysteine protease
AT2G41260	M17	Chr2:17206509-17207698	0,11	5,70	5,59	52,14	5,70	-4,13	3,57E-05	8,14E-03	glycine-rich protein / late embryogenesis abundant protein (M17)
AT1G23730	BCA3	Chr1:8395556-8399749	0,38	20,80	20,42	54,39	5,77	-3,77	1,64E-04	2,59E-02	beta carbonic anhydrase 3
AT2G28490		Chr2:12178596-12181012	0,07	4,27	4,20	60,83	5,93	-4,78	1,76E-06	7,30E-04	RmlC-like cupins superfamily protein
AT5G55410		Chr5:22460549-22461309	0,20	12,89	12,69	64,53	6,01	-3,94	8,00E-05	1,53E-02	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT3G21080		Chr3:7388366-7389974	0,06	3,71	3,65	64,63	6,01	-3,64	2,76E-04	3,98E-02	ABC transporter-related
AT5G44120	CRA1/CRU1	Chr5:17756263-17758288	0,29	43,60	43,30	148,03	7,21	-7,45	9,64E-14	6,96E-10	RmlC-like cupins superfamily protein
AT1G73190	TIP3;1	Chr1:27521943-27523332	0,00	10,22	10,22	Infinite	Infinite	NaN	1,03E-05	3,20E-03	Aquaporin-like superfamily protein, alpha-tonoplast intrinsic protein
AT4G28520	CRC/CRU3	Chr4:14087555-14089796	0,00	8,68	8,68	Infinite	Infinite	NaN	8,31E-08	7,20E-05	cruciferin 3
AT5G35660		Chr5:13852389-13853717	0,00	6,40	6,40	Infinite	Infinite	NaN	4,36E-07	2,70E-04	Glycine-rich protein family

NaN: no determinado

Anexo 2. RNA-Seq. Listado de los 133 genes expresados diferencialmente en la parte aérea ordenados por su *fold change*

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT4G21650		Chr4:11501197-11504678	7,44	0,11	-7,32	-65,37	-6,03	5,08	3,83E-07	8,06E-04	Subtilase family protein
AT3G55240		Chr3:20473540-20474763	50,52	1,91	-48,61	-26,49	-4,73	5,00	5,83E-07	1,12E-03	Plant protein 1589 of unknown function
AT4G13575		Chr4:7892319-7893705	26,83	1,42	-25,41	-18,87	-4,24	4,32	1,59E-05	7,10E-03	unknown protein
AT1G67265	DVL3/ RTFL21	Chr1:25175557-25176202	28,08	1,71	-26,37	-16,42	-4,04	4,01	6,06E-05	1,64E-02	ROTUNDIFOLIA like 21
AT2G32870		Chr2:13944610-13946790	38,31	2,33	-35,97	-16,41	-4,04	5,29	1,24E-07	4,35E-04	TRAF-like family protein
AT5G62280		Chr5:25017072-25018246	34,15	2,09	-32,05	-16,30	-4,03	4,78	1,75E-06	2,05E-03	Protein of unknown function (DUF1442)
AT1G29395	COR413IM1	Chr1:10288196-10289621	134,29	9,52	-124,76	-14,10	-3,82	5,71	1,11E-08	5,84E-05	cold regulated 314 inner membrane 1
AT5G35777		Chr5:13949227-13953802	2,99	0,22	-2,77	-13,59	-3,76	3,81	1,36E-04	2,84E-02	pseudogene, copia-like retrotransposon family
AT4G32280	IAA29	Chr4:15583386-15584769	14,25	1,12	-13,13	-12,75	-3,67	3,74	1,86E-04	3,45E-02	indole-3-acetic acid inducible 29
AT1G67865		Chr1:25446288-25446737	89,59	8,04	-81,55	-11,14	-3,48	4,24	2,19E-05	8,37E-03	unknown protein
AT5G23660	SWEET12/ MTN3	Chr5:7971650-7973925	36,52	3,32	-33,20	-10,99	-3,46	4,33	1,48E-05	6,97E-03	homolog of Medicago truncatula MTN3, bidirectional sugar transporter
AT5G02540		Chr5:568523-570920	23,58	2,28	-21,31	-10,36	-3,37	4,09	4,28E-05	1,29E-02	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily
AT3G28220		Chr3:10524403-10526728	30,85	3,33	-27,52	-9,27	-3,21	4,31	1,64E-05	7,19E-03	TRAF-like family protein
AT1G73330	DR4	Chr1:27568717-27569717	23,56	2,58	-20,99	-9,14	-3,19	3,69	2,22E-04	3,83E-02	drought-repressed 4
AT1G49130	BBX17	Chr1:18174739-18176022	31,16	3,69	-27,46	-8,44	-3,08	3,71	2,03E-04	3,60E-02	B-box type zinc finger protein with CCT domain
AT1G73870	BBX16/ COL7	Chr1:27779165-27780676	14,44	1,71	-12,73	-8,43	-3,08	3,81	1,41E-04	2,91E-02	B-box type zinc finger protein with CCT domain
AT4G14130	XTH15/ XTR7	Chr4:8137050-8138281	25,56	3,14	-22,42	-8,15	-3,03	3,77	1,66E-04	3,24E-02	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT1G66100		Chr1:24605670-24606537	189,49	26,64	-162,85	-7,11	-2,83	4,82	1,45E-06	1,79E-03	Plant thionin
AT5G36910	THI2.2	Chr5:14561816-14562750	83,72	11,82	-71,90	-7,08	-2,82	4,20	2,65E-05	9,30E-03	thionin 2.2
AT1G52000		Chr1:19333158-19336115	12,56	1,83	-10,73	-6,88	-2,78	3,96	7,54E-05	1,94E-02	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT1G06080	ADS1	Chr1:1843567-1846302	28,99	4,25	-24,74	-6,83	-2,77	3,73	1,94E-04	3,45E-02	delta 9 desaturase 1
AT2G42870	PAR1	Chr2:17836415-17837250	66,10	10,10	-56,00	-6,54	-2,71	4,01	6,07E-05	1,64E-02	phy rapidly regulated 1
AT4G35770	SEN1/DIN1	Chr4:16944940-16946192	673,80	104,36	-569,45	-6,46	-2,69	3,83	1,29E-04	2,79E-02	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
AT5G44680		Chr5:18024214-18025991	92,25	15,18	-77,07	-6,08	-2,60	4,60	4,33E-06	3,72E-03	DNA glycosylase superfamily protein, putative 3-methyladenine glycosylase I
AT5G22580		Chr5:7502673-7503449	91,58	15,35	-76,23	-5,97	-2,58	3,78	1,54E-04	3,12E-02	Stress responsive A/B Barrel Domain
AT4G17340	TIP2;2	Chr4:9699252-9700410	73,63	12,73	-60,90	-5,78	-2,53	3,95	7,81E-05	1,96E-02	tonoplast intrinsic protein 2;2
AT5G10180	AST68/ SULTR2;1	Chr5:3193143-3197120	71,13	12,46	-58,67	-5,71	-2,51	4,52	6,31E-06	4,43E-03	sulfate transporter 2;1
AT5G65730	XTH6	Chr5:26299031-26300478	70,82	12,49	-58,33	-5,67	-2,50	4,19	2,79E-05	9,46E-03	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6
AT1G13650		Chr1:4680431-4682196	39,69	7,07	-32,62	-5,62	-2,49	3,82	1,35E-04	2,84E-02	unknown protein
AT3G11930		Chr3:3776236-3777694	80,34	14,57	-65,78	-5,52	-2,46	3,87	1,08E-04	2,44E-02	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
AT1G14280	PKS2	Chr1:4877626-4879149	33,87	6,20	-27,66	-5,46	-2,45	3,94	8,11E-05	2,00E-02	phytochrome kinase substrate 2
AT2G33850		Chr2:14321061-14322049	40,28	7,45	-32,83	-5,41	-2,43	3,76	1,70E-04	3,28E-02	unknown protein
AT1G52190	NRT1.11	Chr1:19434508-19438971	30,43	5,76	-24,67	-5,28	-2,40	3,99	6,49E-05	1,73E-02	Major facilitator superfamily protein, nitrate transporter 1.11
AT5G15970	COR6.6/ KIN2	Chr5:5211910-5212665	287,52	55,25	-232,27	-5,20	-2,38	4,27	2,00E-05	7,79E-03	stress-responsive/-induced protein, cold-responsive/-regulated protein
AT5G50950	FUM2	Chr5:20729611-20733926	61,33	12,87	-48,46	-4,77	-2,25	3,73	1,94E-04	3,45E-02	FUMARASE 2

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT5G19190		Chr5:6457259-6458031	261,01	55,33	-205,68	-4,72	-2,24	4,06	4,87E-05	1,43E-02	unknown protein
AT5G48490		Chr5:19647834-19648281	193,51	42,25	-151,26	-4,58	-2,20	3,68	2,31E-04	3,92E-02	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT5G49730	FRO6	Chr5:20201100-20204513	55,36	12,66	-42,70	-4,37	-2,13	3,87	1,11E-04	2,44E-02	ferric reduction oxidase 6
AT2G15960		Chr2:6947308-6947688	1472,60	340,19	-1132,41	-4,33	-2,11	3,68	2,35E-04	3,96E-02	unknown protein
AT1G04240	IAA3/SHY2	Chr1:1128187-1129551	65,94	15,93	-50,01	-4,14	-2,05	3,62	2,98E-04	4,68E-02	AUX/IAA transcriptional regulator, indole-3-acetic acid inducible 3, short hypocotyl 2
AT1G78370	GSTU20	Chr1:29484268-29485290	248,63	62,04	-186,59	-4,01	-2,00	3,65	2,57E-04	4,23E-02	glutathione S-transferase TAU 20
AT3G62550		Chr3:23135983-23137173	373,61	93,91	-279,70	-3,98	-1,99	3,60	3,12E-04	4,84E-02	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like family, drought responsive protein
AT1G64060	RBOH F	Chr1:23769773-23776931	6,03	24,58	18,55	4,08	2,03	-3,66	2,49E-04	4,12E-02	respiratory burst oxidase protein F
AT3G48520	CYP94B3	Chr3:17974976-17976670	15,74	65,75	50,02	4,18	2,06	-3,73	1,92E-04	3,45E-02	cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3
AT2G40080	ELF4	Chr2:16734293-16734912	27,63	126,97	99,34	4,60	2,20	-3,73	1,92E-04	3,45E-02	Protein of unknown function (DUF1313), EARLY FLOWERING 4
AT5G04950	NAS1	Chr5:1457644-1458890	20,84	97,92	77,08	4,70	2,23	-3,97	7,12E-05	1,87E-02	nicotianamine synthase 1
AT1G07350	SR45a	Chr1:2257424-2260101	32,69	154,25	121,56	4,72	2,24	-3,70	2,18E-04	3,79E-02	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family, serine/arginine rich-like protein
AT3G50740	UGT72E1	Chr3:18855160-18856884	21,27	104,36	83,10	4,91	2,29	-4,16	3,14E-05	1,02E-02	UDP-glucosyl transferase 72E1
AT3G20100	CYP705A19	Chr3:7018994-7020901	7,27	36,22	28,96	4,98	2,32	-3,92	8,76E-05	2,12E-02	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 19
AT4G36988	CPuORF49	Chr4:17440176-17442151	11,19	55,91	44,71	5,00	2,32	-4,13	3,62E-05	1,14E-02	conserved peptide upstream open reading frame 49, uncharacterized protein
AT5G52750		Chr5:21384042-21384924	26,61	133,08	106,47	5,00	2,32	-3,87	1,10E-04	2,44E-02	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT1G74810	BOR5	Chr1:28108473-28111534	4,24	21,28	17,04	5,02	2,33	-3,63	2,88E-04	4,60E-02	HCO ₃ ⁻ transporter family, boron transporter 5
AT5G26340	STP13/MSS1	Chr5:9243510-9247066	23,51	118,31	94,80	5,03	2,33	-4,22	2,43E-05	8,99E-03	Major facilitator superfamily protein, sugar transport protein 13

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT3G10500	NAC053/ NTL4	Chr3:3271489-3274030	10,66	54,83	44,17	5,14	2,36	-4,23	2,30E-05	8,65E-03	NAC domain containing protein 53
AT2G28190	CSD2	Chr2:12014497-12016569	48,95	256,51	207,56	5,24	2,39	-4,32	1,53E-05	7,01E-03	copper/zinc superoxide dismutase 2
AT5G44572		Chr5:17968151-17969563	43,10	227,14	184,04	5,27	2,40	-4,17	3,01E-05	9,98E-03	unknown protein
AT5G41750		Chr5:16693908-16698943	5,12	26,97	21,86	5,27	2,40	-3,95	7,82E-05	1,96E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
AT3G16660		Chr3:5676828-5677921	73,17	386,97	313,80	5,29	2,40	-4,36	1,31E-05	6,71E-03	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family
AT3G18280		Chr3:6267048-6267643	38,84	205,46	166,62	5,29	2,40	-4,13	3,58E-05	1,14E-02	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT3G25610		Chr3:9308941-9313353	3,96	21,23	17,28	5,37	2,42	-4,17	3,03E-05	9,98E-03	ATPase E1-E2 type/haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT3G49120	PRXCB	Chr3:18207650-18210132	32,34	175,15	142,81	5,42	2,44	-4,41	1,02E-05	5,66E-03	peroxidase CB
AT1G76930	EXT4	Chr1:28895300-28896883	63,52	355,00	291,48	5,59	2,48	-4,46	8,30E-06	4,99E-03	extensin 4
AT5G64120	PRX71	Chr5:25659305-25661002	9,55	54,06	44,50	5,66	2,50	-4,05	5,14E-05	1,46E-02	Peroxidase superfamily protein
AT5G49520	WRKY48	Chr5:20090775-20093346	4,41	25,28	20,87	5,73	2,52	-3,74	1,87E-04	3,45E-02	WRKY DNA-binding protein 48
AT1G27020		Chr1:9378558-9380692	33,09	190,04	156,95	5,74	2,52	-4,52	6,23E-06	4,43E-03	unknown protein
AT1G62300	WRKY6	Chr1:23016682-23019279	4,09	23,54	19,45	5,75	2,52	-3,89	1,02E-04	2,33E-02	WRKY family transcription factor
AT5G37540		Chr5:14912834-14914431	7,97	48,37	40,41	6,07	2,60	-4,21	2,51E-05	9,12E-03	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT3G02480		Chr3:512311-513027	13,42	82,63	69,21	6,16	2,62	-3,62	2,90E-04	4,60E-02	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
AT1G64170	CHX16	Chr1:23815238-23818293	2,35	15,06	12,71	6,42	2,68	-3,71	2,10E-04	3,69E-02	cation/H+ exchanger 16
AT2G31980	CYS2	Chr2:13609092-13609902	25,69	166,31	140,61	6,47	2,69	-4,67	2,96E-06	2,96E-03	PHYTOCYSTATIN 2, cysteine proteinase inhibitor 2
AT5G37600	GLN1;1/ GSR1	Chr5:14933335-14935841	47,10	306,60	259,50	6,51	2,70	-4,55	5,31E-06	4,24E-03	glutamine synthase clone R1

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT4G24110		Chr4:12519931-12520813	4,77	31,21	26,44	6,54	2,71	-3,82	1,36E-04	2,84E-02	unknown protein
AT4G12290		Chr4:7304404-7307138	5,63	37,31	31,69	6,63	2,73	-4,59	4,41E-06	3,72E-03	Copper amine oxidase family protein
AT1G17745	PGDH2	Chr1:6100960-6105265	4,40	29,28	24,88	6,65	2,73	-4,46	8,17E-06	4,99E-03	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
AT2G18690		Chr2:8097419-8098827	12,93	87,09	74,15	6,73	2,75	-4,55	5,44E-06	4,24E-03	unknown protein
AT5G64100	PRX69	Chr5:25650640-25652123	4,38	30,07	25,69	6,87	2,78	-3,78	1,56E-04	3,12E-02	Peroxidase superfamily protein, peroxidase 69
AT4G32650	KC1/KAT3	Chr4:15751321-15754854	2,33	16,16	13,82	6,92	2,79	-3,62	2,89E-04	4,60E-02	potassium channel in Arabidopsis thaliana 3
AT3G44990	XTR8	Chr3:16446974-16448764	9,00	62,68	53,67	6,96	2,80	-4,53	5,79E-06	4,35E-03	xyloglucan endo-transglycosylase-related 8
AT1G22900		Chr1:8103658-8104505	6,15	42,99	36,84	6,99	2,81	-3,80	1,44E-04	2,94E-02	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
AT3G26320	CYP71B36	Chr3:9644382-9646064	2,95	21,89	18,94	7,41	2,89	-3,97	7,26E-05	1,89E-02	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 36
AT3G14610	CYP72A7	Chr3:4912465-4914652	2,43	18,23	15,80	7,49	2,91	-4,01	5,99E-05	1,64E-02	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 7
AT3G61990	OMTF3	Chr3:22957053-22958995	15,70	123,40	107,70	7,86	2,97	-5,12	3,12E-07	7,47E-04	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT2G37130		Chr2:15597920-15600077	19,77	156,77	137,00	7,93	2,99	-4,85	1,20E-06	1,69E-03	Peroxidase superfamily protein
AT5G50200	NRT3.1/ WR3	Chr5:20436179-20437726	5,35	43,50	38,15	8,13	3,02	-3,75	1,79E-04	3,43E-02	nitrate transmembrane transporters
AT1G80130		Chr1:30140960-30142646	2,37	21,56	19,19	9,08	3,18	-4,08	4,46E-05	1,32E-02	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT4G14365	XBAT34	Chr4:8271463-8273765	4,12	38,39	34,27	9,32	3,22	-4,63	3,62E-06	3,31E-03	XB3 ortholog 4 in Arabidopsis thaliana, putative E3 ubiquitin-protein ligase
AT2G04050		Chr2:1337385-1339270	1,25	13,19	11,93	10,52	3,40	-3,62	2,89E-04	4,60E-02	MATE efflux family protein
AT5G09800		Chr5:3043011-3044413	1,76	18,98	17,22	10,78	3,43	-3,94	8,16E-05	2,00E-02	ARM repeat superfamily protein
AT4G27970	SLAH2	Chr4:13918289-13920132	1,59	17,92	16,32	11,25	3,49	-4,05	5,07E-05	1,46E-02	SLAC1 homologue 2

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT1G30700		Chr1:10892569-10894572	0,75	8,50	7,76	11,40	3,51	-3,73	1,89E-04	3,45E-02	FAD-binding Berberine family protein
AT3G63380	ACA12	Chr3:23406610-23410360	1,65	19,10	17,45	11,58	3,53	-5,29	1,20E-07	4,35E-04	ATPase E1-E2 type/haloacid dehalogenase-like hydrolase, calcium-transporting
AT3G44300	NIT2	Chr3:15983310-15985535	1,54	18,68	17,13	12,10	3,60	-4,19	2,75E-05	9,46E-03	nitrilase 2
AT4G26260	MIOX4	Chr4:13297697-13300387	2,74	33,69	30,95	12,29	3,62	-4,03	5,51E-05	1,55E-02	myo-inositol oxygenase 4
AT4G12480	EARLI1	Chr4:7406104-7406937	109,91	1373,80	1263,89	12,50	3,64	-5,73	9,88E-09	5,84E-05	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT1G54000	GLL22	Chr1:20154168-20156419	1,78	22,53	20,76	12,69	3,67	-4,29	1,77E-05	7,47E-03	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily
AT3G53040		Chr3:19664673-19666487	0,28	3,73	3,45	13,41	3,75	-3,61	3,04E-04	4,75E-02	late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein
AT1G12940	NRT2.5	Chr1:4416404-4418590	0,61	8,29	7,69	13,65	3,77	-3,77	1,62E-04	3,19E-02	nitrate transporter2.5
AT3G21320		Chr3:7497289-7501841	1,61	22,43	20,81	13,90	3,80	-4,64	3,43E-06	3,28E-03	unknown protein
AT3G28540		Chr3:10694443-10696123	1,84	25,76	23,92	14,02	3,81	-4,91	9,03E-07	1,36E-03	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases, AAA-type ATPase family
AT3G21380		Chr3:7528183-7530677	0,38	5,47	5,09	14,45	3,85	-3,63	2,84E-04	4,60E-02	Mannose-binding lectin superfamily, jacalin-like lectin domain-containing protein
AT5G38340		Chr5:15320506-15324061	0,30	4,37	4,07	14,48	3,86	-3,90	9,49E-05	2,27E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
AT4G18250		Chr4:10087342-10091963	1,60	23,16	21,57	14,51	3,86	-5,20	2,04E-07	6,13E-04	receptor serine/threonine kinase, putative
AT3G21720	ICL	Chr3:7652486-7656011	0,96	15,48	14,52	16,15	4,01	-4,70	2,55E-06	2,79E-03	isocitrate lyase
AT1G47980		Chr1:17691833-17693867	0,64	10,38	9,74	16,18	4,02	-3,87	1,10E-04	2,44E-02	unknown protein
AT4G15390		Chr4:8792811-8794293	0,53	8,98	8,46	17,05	4,09	-3,89	1,01E-04	2,33E-02	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT5G40420	OLE2/ OLEO2	Chr5:16173392-16174783	1,20	20,55	19,34	17,08	4,09	-4,10	4,10E-05	1,25E-02	oleosin 2
AT1G36060		Chr1:13454495-13456331	1,67	28,97	27,30	17,40	4,12	-4,96	7,06E-07	1,19E-03	Integrase-type DNA-binding family, ethylene-responsive transcription factor

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT3G17520		Chr3:5999288-6000370	0,53	10,85	10,32	20,29	4,34	-4,27	1,98E-05	7,79E-03	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
AT1G73190	TIP3;1	Chr1:27521943-27523332	0,87	17,86	16,99	20,47	4,36	-4,33	1,49E-05	6,97E-03	Aquaporin-like superfamily protein, alpha-tonoplast intrinsic protein
AT2G28490		Chr2:12178596-12181012	0,34	7,36	7,02	21,59	4,43	-4,34	1,45E-05	6,97E-03	RmlC-like cupins superfamily protein
AT2G02010	GAD4	Chr2:474164-476594	1,10	23,69	22,60	21,63	4,43	-5,11	3,19E-07	7,47E-04	glutamate decarboxylase 4
AT2G01008		Chr2:1024-2810	0,79	17,24	16,45	21,86	4,45	-4,47	7,83E-06	4,99E-03	unknown protein
AT5G13330	Rap2.6L	Chr5:4272059-4274660	0,99	22,56	21,57	22,69	4,50	-4,70	2,65E-06	2,79E-03	related to AP2 6l, ethylene-responsive transcription factor
AT1G17960		Chr1:6180895-6183806	0,39	9,14	8,75	23,44	4,55	-4,35	1,34E-05	6,71E-03	Threonyl-tRNA synthetase
AT4G12490		Chr4:7409620-7410406	1,39	33,32	31,93	23,98	4,58	-4,38	1,16E-05	6,12E-03	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT2G35300	LEA18	Chr2:14862900-14863387	1,60	39,74	38,14	24,81	4,63	-4,39	1,13E-05	6,09E-03	Late embryogenesis abundant protein 4-2
AT4G21020		Chr4:11228186-11229577	0,21	5,23	5,02	25,32	4,66	-3,89	1,00E-04	2,33E-02	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
AT5G35660		Chr5:13852389-13853717	0,28	7,30	7,01	25,81	4,69	-4,48	7,36E-06	4,85E-03	Glycine-rich protein family
AT1G08090	ACH1/ NRT2:1	Chr1:2524075-2526164	0,26	7,60	7,34	29,29	4,87	-4,43	9,59E-06	5,46E-03	nitrate transporter 2:1
AT3G21080		Chr3:7388366-7389974	0,23	7,76	7,53	33,56	5,07	-3,90	9,64E-05	2,28E-02	ABC transporter-related
AT2G43570	CHI	Chr2:18076223-18077463	0,27	9,17	8,89	33,64	5,07	-4,12	3,72E-05	1,15E-02	chitinase putative
AT1G48130	PER1	Chr1:17780501-17781727	0,68	23,04	22,36	33,73	5,08	-4,83	1,37E-06	1,79E-03	1-cysteine peroxiredoxin 1
AT5G55410		Chr5:22460549-22461309	0,52	21,48	20,97	41,41	5,37	-4,29	1,77E-05	7,47E-03	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily
AT2G34020		Chr2:14371184-14373855	0,20	9,24	9,04	46,24	5,53	-4,95	7,34E-07	1,19E-03	Calcium-binding EF-hand family protein
AT5G23160		Chr5:7795255-7796346	0,18	8,87	8,69	48,76	5,61	-4,27	1,95E-05	7,79E-03	unknown protein

AGI code	gene	locus	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	test stat	p value	q value	description
AT3G54940		Chr3:20354350-20356318	0,11	5,47	5,36	48,94	5,61	-4,27	1,91E-05	7,79E-03	Papain family cysteine protease
AT3G28580		Chr3:10715622-10717329	0,05	3,28	3,23	61,79	5,95	-4,21	2,56E-05	9,14E-03	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases, AAA-type ATPase family
AT5G44120	CRA1/CRU1	Chr5:17756263-17758288	0,97	95,48	94,51	98,24	6,62	-5,81	6,40E-09	5,84E-05	RmlC-like cupins superfamily protein
AT5G24200		Chr5:8203002-8205793	0,02	2,52	2,49	111,01	6,79	-3,67	2,47E-04	4,12E-02	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G54870		Chr1:20459005-20460647	0,02	2,97	2,94	125,76	6,97	-3,78	1,57E-04	3,12E-02	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily
AT1G04560		Chr1:1244946-1246059	0,04	5,06	5,02	129,84	7,02	-3,82	1,34E-04	2,84E-02	AWPM-19-like family protein
AT4G28520	CRC/CRU3	Chr4:14087555-14089796	0,11	21,51	21,40	197,00	7,62	-4,50	6,85E-06	4,66E-03	cruciferin 3
AT2G27380	EPR1	Chr2:11713410-11715696	0,02	4,63	4,61	250,85	7,97	-4,43	9,23E-06	5,40E-03	extensin proline-rich 1

Anexo 3. RNA-Seq. Listado de los 29 genes comunes expresados diferencialmente en raíz y parte aérea ordenados alfabéticamente por su código

AGI code	gene	ROOT						SHOOT						description
		FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	q_value	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	q_value	
AT1G27020		17,93	45,20	27,27	2,52	1,33	2,11E-02	33,09	190,04	156,95	5,74	2,52	4,43E-03	unknown protein
AT1G47980		0,15	4,97	4,81	32,19	5,01	8,28E-03	0,64	10,38	9,74	16,18	4,02	2,44E-02	unknown protein
AT1G48130	PER1	0,47	12,56	12,09	26,78	4,74	4,85E-04	0,68	23,04	22,36	33,73	5,08	1,79E-03	1-cysteine peroxiredoxin 1
AT1G73190	TIP3;1	0,00	10,22	10,22	Infinite	Infinite	3,20E-03	0,87	17,86	16,99	20,47	4,36	6,97E-03	Aquaporin-like superfamily
AT1G73330	DR4	1857,55	591,37	-1266,18	-3,14	-1,65	3,82E-02	23,56	2,58	-20,99	-9,14	-3,19	3,83E-02	drought-repressed 4
AT1G74810	BOR5	0,81	5,42	4,61	6,68	2,74	1,76E-02	4,24	21,28	17,04	5,02	2,33	4,60E-02	HCO ₃ ⁻ /boron transporter
AT1G76930	EXT4	488,19	1652,77	1164,58	3,39	1,76	3,42E-03	63,52	355,00	291,48	5,59	2,48	4,99E-03	extensin 4
AT2G18690		28,04	91,52	63,48	3,26	1,71	3,29E-04	12,93	87,09	74,15	6,73	2,75	4,24E-03	unknown protein
AT2G28490		0,07	4,27	4,20	60,83	5,93	7,30E-04	0,34	7,36	7,02	21,59	4,43	6,97E-03	RmIC-like cupins superfamily
AT2G31980	CYS2	3,79	20,16	16,37	5,32	2,41	2,40E-02	25,69	166,31	140,61	6,47	2,69	2,96E-03	cysteine proteinase inhibitor
AT2G33850		48,99	7,07	-41,91	-6,92	-2,79	3,48E-07	40,28	7,45	-32,83	-5,41	-2,43	3,28E-02	unknown protein
AT2G35300	LEA18	1,60	22,89	21,29	14,31	3,84	3,20E-03	1,60	39,74	38,14	24,81	4,63	6,09E-03	Late embryogenesis abundant
AT3G02480		6,89	65,27	58,38	9,47	3,24	7,22E-05	13,42	82,63	69,21	6,16	2,62	4,60E-02	Late embryogenesis abundant
AT3G17520		0,54	5,13	4,59	9,57	3,26	2,40E-02	0,53	10,85	10,32	20,29	4,34	7,79E-03	Late embryogenesis abundant
AT3G21080		0,06	3,71	3,65	64,63	6,01	3,98E-02	0,23	7,76	7,53	33,56	5,07	2,28E-02	ABC transporter-related
AT3G21720	ICL	0,80	4,62	3,81	5,76	2,53	3,78E-02	0,96	15,48	14,52	16,15	4,01	2,79E-03	isocitrate lyase
AT3G28540		0,20	3,46	3,26	17,49	4,13	2,62E-02	1,84	25,76	23,92	14,02	3,81	1,36E-03	AAA-type ATPase family
AT3G28580		2,83	17,54	14,71	6,20	2,63	2,95E-05	0,05	3,28	3,23	61,79	5,95	9,14E-03	AAA-type ATPase family
AT3G48520	CYP94B3	10,45	52,13	41,68	4,99	2,32	1,99E-07	15,74	65,75	50,02	4,18	2,06	3,45E-02	cytochrome P450
AT3G54940		0,09	3,04	2,94	32,40	5,02	1,52E-02	0,11	5,47	5,36	48,94	5,61	7,79E-03	Papain cysteine protease

AGI code	gene	ROOT						SHOOT						description
		FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	q_value	FPKM (MS)	FPKM (MS+Met)	ΔFPKM	fold change	log2 (fold change)	q_value	
AT4G12480	EARLI1	249,20	1870,88	1621,68	7,51	2,91	2,67E-10	109,91	1373,80	1263,89	12,50	3,64	5,84E-05	lipid-transfer protein
AT4G12490		3,74	87,75	84,01	23,45	4,55	1,48E-08	1,39	33,32	31,93	23,98	4,58	6,12E-03	lipid-transfer protein
AT4G28520	CRC/ CRU3	0,00	8,68	8,68	Infinite	Infinite	7,20E-05	0,11	21,51	21,40	197,00	7,62	4,66E-03	cruciferin 3
AT5G15970	COR6.6/ KIN2	570,81	150,94	-419,86	-3,78	-1,92	1,46E-06	287,52	55,25	-232,27	-5,20	-2,38	7,79E-03	stress/cold responsive
AT5G26340	STP13/ MSS1	15,62	46,83	31,21	3,00	1,58	8,32E-04	23,51	118,31	94,80	5,03	2,33	8,99E-03	sugar transport protein 13
AT5G35660		0,00	6,40	6,40	Infinite	Infinite	2,70E-04	0,28	7,30	7,01	25,81	4,69	4,85E-03	Glycine-rich protein family
AT5G40420	OLE2/ OLEO2	0,53	11,07	10,54	20,80	4,38	2,65E-03	1,20	20,55	19,34	17,08	4,09	1,25E-02	oleosin 2
AT5G44120	CRA1/ CRU1	0,29	43,60	43,30	148,03	7,21	6,96E-10	0,97	95,48	94,51	98,24	6,62	5,84E-05	RmlC-like cupins superfamily
AT5G55410		0,20	12,89	12,69	64,53	6,01	1,53E-02	0,52	21,48	20,97	41,41	5,37	7,47E-03	lipid-transfer protein

Agradecimientos

Acababa de llegar a Zaragoza después de una estancia Erasmus de unos cinco meses en Gelsenkirchen, una de las regiones más tristes de Alemania. En pocos días tendría mi último examen de la carrera, que afortunadamente aprobé, y me planté hacia finales de Septiembre sin saber qué hacer con mi futuro. Menos mal que mis padres Ángel y Diamantina me animaron y me apoyaron para que buscara lo que más me gustase. Y así fue como en menos de un mes acabé en Barcelona en casa de mis tíos Julio y Ana, que siempre los he tenido para lo que he necesitado, y me matriculé en el máster de Biotecnología de la UB. Las prácticas del máster las hice en la Facultad de Biología en el grupo RST (Marçal y Javier), donde me dieron la oportunidad de tener mi primer contacto serio con un laboratorio. Aunque han pasado muchos años desde entonces, tengo que agradecer a Lorena y Miriam por su apoyo y dedicación durante mi estancia en RST.

Tras varios intentos fallidos para conseguir una beca con RST, me decidí a buscar también con otros grupos. Cuando salieron las becas FPI, escribí a los 5 grupos que más me habían interesado, entre ellos al de Albert y Montse, que finalmente me dieron la oportunidad de desarrollar lo que ahora es esta tesis. Yo nunca había trabajado con plantas, es más, en la carrera no había cogido las optativas relacionadas con planta, pero en realidad a mí el continente no me importaba sino el contenido, las células. Gracias a Albert y Montse por la dedicación y dirección durante mi desarrollo como científico. Y así es como empecé los primeros años de la tesis en el Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Farmacia. Me gustaría agradecer a toda la gente de Bioquímica por todo el tiempo que hemos compartido, en especial a Analú, Lilia, Sebas, Mariona, Mary, Marina, Anna y más que me olvido.

Mención aparte merecen los que han ido siendo mis compañeros de laboratorio, que formábamos el equipo A y a los que tengo un cariño especial por los buenos momentos compartidos. Vero, que fue la que me introdujo en la experimental y con la que he compartido un montón de experiencias, viajes, fiestas y alguna que otra pelea, pero hacíamos una buena pareja. Paola la supermamá, con la que hemos compartido experiencias que nos han unido mucho y de la que estamos muy orgullosos por su evolución en la ciencia. David, por fin un chico en el grupo que de serenidad...y buena música, además de ser una de las personas con las que más me gusta discutir de ciencia. Gracias por tus consejos y por tu humor que es igual que el mío. Patricia, nuestra técnico de grupo que tantas semillas le hemos hecho recoger, pero también te he hecho reír mucho en el lab. Echaré de menos las veces que salíamos todos juntos de bares. Quiero también agradecer a Laura y Salomé, mis dos mejores estudiantes de prácticas y con las que llevé a cabo los experimentos que dieron lugar al apartado 6 (Laura) y 7 (Salomé) de la parte I de resultados. Se nos queda en el grupo el chihuahuense Alejandro, que siempre da el toque mexicano, suerte con la tesis.

Los últimos años de mi tesis los pasé en el CRAG, donde conocí a un montón de gente nueva y todos plantólogos. Allí pude sumergirme en el mundo de las raíces de la mano de MaryPaz y sobre todo Norma, que me ayudó con los experimentos que dieron lugar al apartado 7.2.2 de la parte II de resultados. Norma es como un motor, siempre tiene energía, propuestas, positividad, sin duda una de las mejores personas que me llevo del CRAG. Sin duda los siguientes son los manolos, con los que hemos compartido un montón de risas y momentos muy cercanos, llevo toda la escritura de tesis echándoos de menos. Gracias a los mejores vecinos de lab: Águila, Catalina, Miriam, Rosa, Briardo, Lucio, Jordi, Pablo; y a los demás del CRAG: Laura, Tom, María, Silvia, Asier, Joan, Karel, Carmen, Inés, Guio, Pablo, Juan y más que me olvido. También quiero agradecer al personal encargado de los Servicios Científicos del CRAG por su colaboración y apoyo.

No me puedo olvidar de mis compañeros de máster, Analú, Karel, Jordi, Sergi y Joan, que conozco desde mi primer año en Barcelona y que han sido un pilar muy importante durante todos estos años. Otro pilar muy importante han sido mis compañeros de piso en gran via, los granviers Vero, Mile, Emi, Elisa, María, Marc, e Isa, somos como una familia. Con todos ellos he pasado los mejores momentos en Barcelona y hemos hecho terapia entre todos siempre que lo hemos necesitado. Y en este último año y medio, Ibán se ha convertido en una persona muy importante para mí, animándome para acabar los últimos experimentos y la escritura de la tesis, han sido momentos complicados pero hemos construido un vínculo especial.

Finalmente, quiero dar mi más grande agradecimiento a mi familia. A mis abuelos a los que va dedicada mi tesis y que les recuerdo con gran cariño. A mis padres y mi hermana que son el núcleo duro y que se ha ampliado con Joan, Jaume y Mel.

Gracias a todos los que forman una parte de mi mundo.