

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Búsqueda de interactores de QQS, proteína de un gen huérfano de *Arabidopsis* que está relacionada con el pH intracelular y el metabolismo de almidón, mediante dos técnicas de Doble Híbrido

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Javier Sáez Sáez

Tutor académico: Ramón Serrano Salom

Co-tutor: Gaetano Bissoli

Curso 2015-16

Valencia, julio de 2016





Datos personales

Nombre y apellidos: Javier Sáez Sáez

Datos del Trabajo Final de Grado

Título: Búsqueda de interactores de QQS, proteína de un gen huérfano de *Arabidopsis* que está relacionada con el pH intracelular y el metabolismo de almidón, mediante dos técnicas de Doble Híbrido

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor académico: Ramón Serrano Salom

Co-tutor: Gaetano Bissoli

Localidad y fecha de lectura: Valencia, julio de 2016

Resumen

Datos previos de *microarrays* de los mutantes simples de pérdida de función de las dos principales isoformas de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, *aha1-6* y *aha2-4*, resaltan el gen *QQS*, el único que baja considerablemente su expresión en ambos mutantes. Asimismo, datos de expresión de nuestro laboratorio, indican que *QQS* es antagónico con respecto a las H⁺-ATPasas de membrana.

Para apoyar estos resultados, en la línea transgénica *pQQS::QQS-GFP* de *Arabidopsis* se evaluó mediante fluorescencia la expresión de *QQS* a distintos pH, y se demostró que aumenta notablemente en ambientes alcalinos, mientras que desaparece en ambientes ácidos.

Por otro lado, en Western blots con anticuerpos contra la H⁺-ATPasa de membrana en la línea de *QQS RNAi*, se observó que *QQS* puede ser un factor directo o indirecto de la inhibición de la expresión de la bomba de protones.

Este gen, que codifica para una pequeña proteína citosólica de 59 aminoácidos, no presenta dominios conocidos y tampoco está presente en especies cercanas como *Arabidopsis lyrata* o *Brassica napus*.

Para seguir investigando cuáles son sus dianas se realizó un rastreo mediante la técnica de doble híbrido contra una genoteca de cDNA de *Arabidopsis*. Para ello, se clonó el gen *QQS* en un plásmido para usarlo de cebo o *bait* y se transformó en levadura, para luego realizar el rastreo de proteínas que interactúan con *QQS* a partir de la biblioteca de cDNA. El mejor candidato ha sido At1g70470, una proteína de membrana de la que no existe ninguna descripción bibliográfica.

Como tampoco era posible descartar que *QQS* pudiese interactuar directamente con la H⁺-ATPasa de membrana, se realizó un ensayo de doble híbrido específico para proteínas de membrana. Se obtuvieron evidencias, usando AHA1 como *bait* y *QQS* como *prey*, de que ambas proteínas interactúan directamente. Estos resultados pueden dar la clave para descubrir un nuevo mecanismo de control de la H⁺-ATPasa de membrana y del pH intracelular.

Palabras clave

pH intracelular, almidón, doble híbrido, H⁺-ATPasa



Abstract

Previous data from microarrays of the simple knock-out mutants of the main isoforms of PM H⁺-ATPase, *aha1-6* and *aha2-4*, evidence that *QQS* is the only gene which is downregulated in both cases. Additionally, expression data from our laboratory suggests that *QQS* is antagonistic with respect to PM H⁺-ATPases.

In order to support these results, the expression of *QQS* was assessed with fluorescence microscopy at different pH values in the *Arabidopsis* transgenic line *pQQS::QQS-GFP*. The results showed an increase of the expression at basic pH values, whereas the fluorescence disappeared at acidic values.

Furthermore, the *QQS* RNAi line was Western blotted using different antibodies against the PM H⁺-ATPase, showing that *QQS* may act as a direct or indirect inhibitor of the expression of PM H⁺-ATPases.

QQS encodes for a small cytosolic protein of only 59 amino acids, does not show any known domains and is not present in closely related species such as *Arabidopsis lyrata* or *Brassica napus*. To investigate its targets, a yeast-two hybrid screening was carried out against an *Arabidopsis* cDNA library. *QQS* was cloned in a bait plasmid and was co-transformed with the cDNA library in yeast to perform the screening. The most promising interacting protein is At1g70470, a membrane protein of unknown function and without any bibliographic information.

As a direct interaction between *QQS* and PM H⁺-ATPase could not be excluded, a specific yeast-two hybrid assay for membrane proteins was conducted. In this case, the PM H⁺-ATPase AHA1 was used as bait, while *QQS* was the prey protein. The results proved that both proteins interact directly, providing a new control mechanism of the PM H⁺-ATPases and intracellular pH.

Key words

Intracellular pH, starch, two-hybrid, H⁺-ATPase

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ramón y Mariche por permitirme realizar el Trabajo Final de Grado en su laboratorio y por el trato tan familiar y cercano que he recibido por su parte en todo momento.

No quiero olvidarme de mi tutor en el laboratorio, Gaetano, en especial por la ayuda que me ha ofrecido a lo largo de estos meses, así como sus consejos, dedicación y disponibilidad.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y amigos por el apoyo recibido durante este tiempo, a pesar de que muchas veces no entendiesen a qué me dedicaba.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El problema del cambio climático antropogénico	1
1.2 La sequía en zonas de clima mediterráneo y sus consecuencias en la agricultura	2
1.3 Homeostasis de cationes	3
1.3.1 Homeostasis de pH (H ⁺)	3
1.3.1.1 Importancia del mantenimiento del pH	3
1.3.1.2 Mecanismos de regulación del pH	4
1.4 El gen huérfano <i>QQS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	10
1.5.1 El sistema de doble híbrido	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Material biológico	14
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
3.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	14
3.1.4 Vectores de clonación y de doble híbrido	14
3.2 Medios de cultivo	16
3.2.1 Medios de cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.2.2 Medios de cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	16
3.2.3 Medios de cultivo de <i>E. coli</i>	16
3.3 Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
3.4 Manipulación y crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.4.1 Preparación de células competentes	17
3.4.2 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.4.3 Minipreparación de DNA plasmídico en levadura	18
3.5 Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	18
3.5.1 Preparación de células competentes	18
3.5.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	18
3.5.3 Minipreparación de DNA plasmídico en <i>E. coli</i>	19
3.6 Realización de las construcciones plasmídicas de doble híbrido	19
3.6.1 Construcciones para el rastreo de doble híbrido	19
3.6.2 Construcciones de doble híbrido para proteínas de membrana	20

3.7	Rastreo de doble híbrido.....	21
3.7.1	Eficiencia de transformación y cálculo del número de clones a rastrear	21
3.7.2	Realización del rastreo	21
3.7.3	Análisis bioinformático.....	21
3.8	Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana.....	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1	Resultados previos	23
4.1.1	Efecto de la ausencia de las H ⁺ -ATPasas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
4.1.2	QQS regula la expresión de las H ⁺ -ATPasas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
4.2	Resultados	25
4.2.1	Expresión de las H ⁺ -ATPasas 1-2-3 en ausencia del gen QQS en <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
4.2.2	Expresión de QQS en función del pH en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
4.2.3	Rastreo de doble híbrido.....	27
4.2.3.1	Construcciones de doble híbrido	27
4.2.3.2	Número de clones rastreados	28
4.2.3.3	Controles del rastreo de doble híbrido	28
4.2.3.4	Genes positivos del rastreo de doble híbrido	29
4.2.3.5	Ensayo de crecimiento de los genes positivos	31
4.2.4	Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana.....	32
4.2.4.1	Construcciones de doble híbrido para proteínas de membrana	32
4.2.4.2	Controles del ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana	33
4.2.4.3	Ensayo de doble híbrido con QQS y AHA1	33
5.	CONCLUSIONES.....	35
6.	BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Controles positivos y negativos del rastreo de doble híbrido	29
Tabla 2. Genes positivos obtenidos en el rastreo de doble híbrido.....	29
Tabla 3. Ensayos de crecimiento de los genes positivos a diferentes pH y en presencia o ausencia de AHA1.....	32
Tabla 4. Control negativo del sistema de doble híbrido para proteínas de membrana.	33
Tabla 5. Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana entre QQS y AHA1	33

FIGURAS

Figura 1. Alteraciones en el sistema climático durante el último siglo.....	1
Figura 2. Forzamiento radiativo desglosado por fuentes en 2011, en relación a 1750.....	2
Figura 3. Biochemical pH stat propuesto por Davies (1986).....	5
Figura 4. Representación en 2D y 3D de la H ⁺ -ATPasa AHA2	7
Figura 5. Efecto sobre los niveles de almidón del gen QQS	9
Figura 6. Esquema del <i>screening</i> de doble híbrido (método clásico)	11
Figura 7. Sistema de doble híbrido para proteínas de membrana	12
Figura 8. Mapa del plásmido pCR TM 8/GW/TOPO [®] (Invitrogen).....	14
Figura 9. Plásmidos del <i>screening</i> de doble híbrido.....	15
Figura 10. Plásmidos del ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana.....	16
Figura 11. Genes sobre e infraexpresados en líneas <i>knock-out</i> de H ⁺ -ATPasas de membrana plasmática frente a la variedad silvestre.....	23
Figura 12. Datos transcriptómicos de expresión bajo tratamiento con un ácido orgánico débil en una línea silvestre de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
Figura 13. Resultados de PCR cuantitativa de diferentes líneas de T-DNA próximas al gen QQS	24
Figura 14. Western blot contra AHA3 en extractos de <i>Arabidopsis thaliana</i> con RNAi de QQS y el mutante <i>pgm1</i>	25
Figura 15. Esquema resumen de la función de QQS a nivel bioquímico y fisiológico.....	26
Figura 16. Efecto del pH en la expresión de QQS en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Figura 17. PCR de <i>NF-YC4</i> y QQS	27
Figura 18. Western blot de AHA1 expresado en pBridge en levadura	28
Figura 19. Predicción bioinformática de la topología de la proteína At1g70470	30
Figura 20. Comparación de los niveles de expresión de At1g70470, At3g51550 (<i>FERONIA</i>) y At1g72300 (<i>PSY1R</i>) bajo diferentes tratamientos químicos.....	30
Figura 21. Modelo de actuación propuesto para At1g70470	31
Figura 22. PCR de <i>14-3-3 Epsilon</i> , At1g70470 y QQS	32

ABREVIATURAS

ARS: secuencias de replicación autónomas

BSA: albúmina de suero bovino

CaMV35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

cDNA: DNA complementario

CEN: secuencias centroméricas

C-terminal: carboxi-terminal

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GFP: proteína verde fluorescente

IPCC: Panel Intergubernamental del Cambio Climático

kb: kilobases

LB: medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani

LiTE: tampón con acetato de litio-Tris-EDTA

MCS: sitio de clonación múltiple

Met25: promotor metionina 25 de levadura

mRNA: RNA mensajero

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EEUU

N-terminal: amino-terminal

OAA: oxalacetato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PEP: fosfoenol piruvato

PIPES: 1,4-Piperazina-N,N'-bis

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

rpm: revoluciones por minuto

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SD: dextrosa sintética.

SOB: medio de cultivo súper óptimo para bacterias

SOC: medio de cultivo súper óptimo con represión catabólica para bacterias

ssDNA: DNA de cadena simple

TBE: Tris-borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

UTR: región no traducida de un gen

YPD: extracto de levadura-peptona-dextrosa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El problema del cambio climático antropogénico

La variabilidad y los cambios en el clima son factores importantes para el desarrollo de las sociedades. En este sentido, alteraciones en las condiciones climáticas pueden afectar a la producción de alimentos, la disponibilidad de agua y la salud humana (Wheeler y von Braun, 2013).

Desde la década de 1950, los datos del sistema climático evidencian de forma inequívoca cambios sin precedentes en la temperatura de la atmósfera y la hidrosfera, en los niveles de los océanos y en las cantidades de hielo y nieve, tal y como señala el Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) de las Naciones Unidas (IPCC, 2014).

En concreto, según detalla dicho informe (IPCC, 2014), la temperatura de la superficie de tierras y océanos ha aumentado de media $0.85\text{ }^{\circ}\text{C}$ desde 1901 hasta 2012 (Figura 1a); en el mismo período, el nivel de los océanos ha aumentado 1.7 mm/año (Figura 1b), debido al pronunciado deshielo de zonas glaciales de Groenlandia, la Antártida y el océano Ártico, especialmente desde 1979 (Figura 1c); por último, las precipitaciones desde 1951 hasta 2010 se han incrementado en regiones orientales del continente americano, Europa y Asia septentrional y central, mientras que son más escasas en el Sahel, África y Asia meridional y el Mediterráneo, donde el clima es cada vez más seco (Figura 1d).

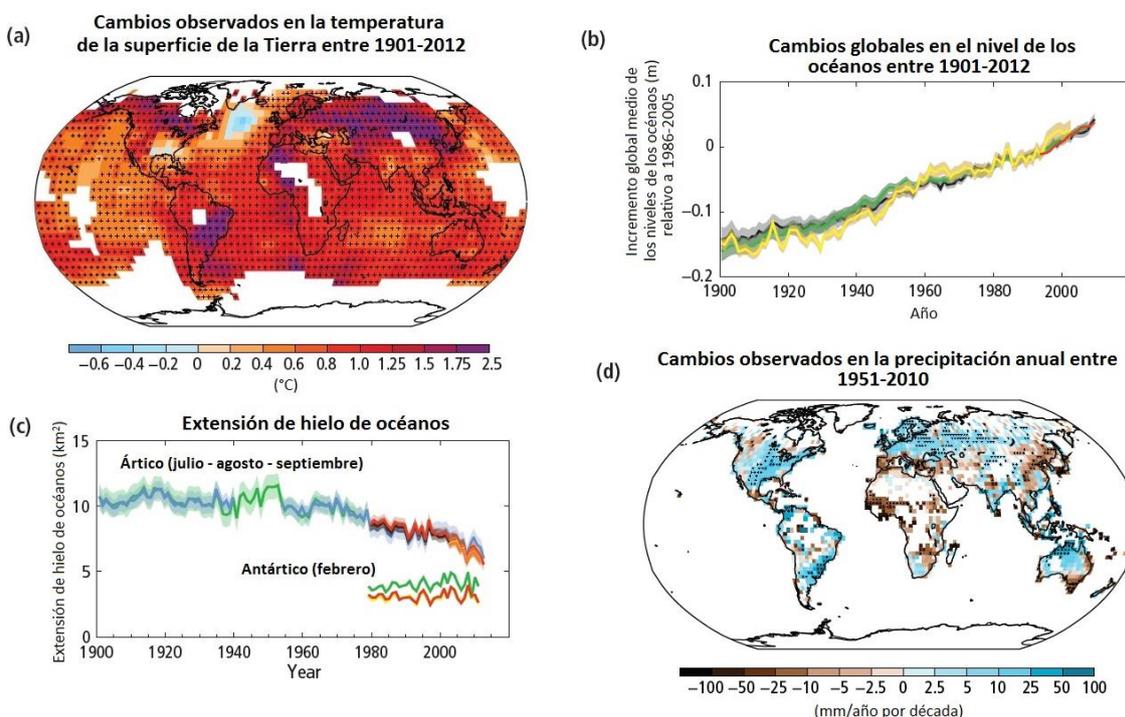


Figura 1. Alteraciones en el sistema climático durante el último siglo. a) Cambios de temperatura en la superficie terrestre (1901-2012). b) Alteraciones en el nivel de los océanos (1901-2012). c) Deshielo en zonas polares desde el pasado siglo. d) Cambios en los niveles de precipitación en los últimos 65 años. Extraída de IPCC, 2014.

Esta serie de cambios en el sistema climático tienen un claro origen antropogénico. A causa del crecimiento económico y poblacional iniciado en 1750 durante la revolución industrial, los gases de efecto invernadero se han ido incrementando hasta niveles jamás alcanzados en los últimos 800000 años. Fenómenos naturales que también afectan al forzamiento radiativo como las erupciones volcánicas que liberan gases de efecto invernadero o las variaciones en los niveles de radiación solar, apenas han tenido un impacto del 2% en 2011, si se compara con 1750 (IPCC, 2014), tal y como recoge la Figura 2.

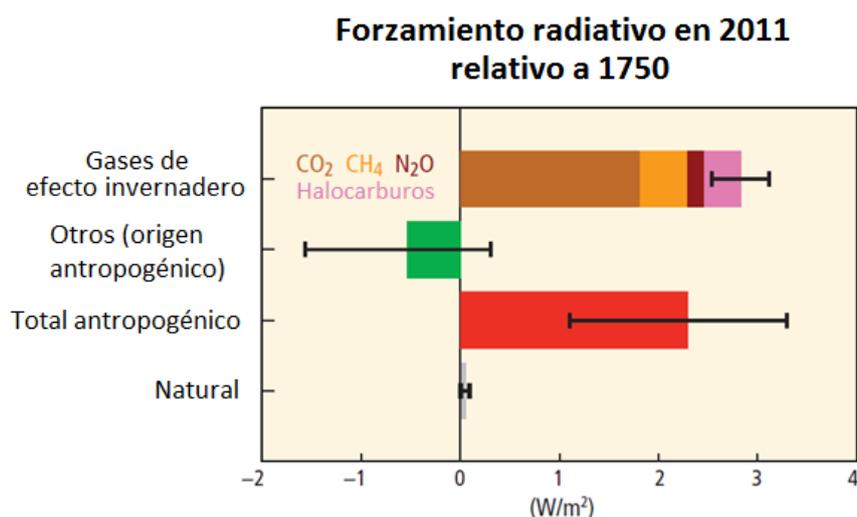


Figura 2. Forzamiento radiativo desglosado por fuentes en 2011, en relación a 1750. Las barras indican el forzamiento radiativo para gases de efecto invernadero, otros forzamientos de origen antropogénico (aerosoles, ozono y reflexión de la luz solar en la superficie terrestre asociada a cambios en el uso de las tierras), el total antropogénico y forzamientos de origen natural (volcanes y radiación solar). Extraída de IPCC, 2014.

Uno de los principales problemas sociales que acarreará el cambio climático será la dificultad para producir suficientes alimentos para toda la población mundial (IPCC, 2014). Únicamente considerando un incremento medio de las temperaturas de 2 °C en el presente siglo, las pérdidas de rendimiento de los cultivos de maíz, trigo y arroz serán de un 25% en regiones templadas, donde se estima que los niveles de precipitaciones se mantengan o incrementen (IPCC, 2014). En zonas con clima mediterráneo, que estarán cada vez más acechadas por la sequía y la desertización, las pérdidas de rendimiento serán aún mayores (Hoerling *et al.*, 2012). A todo ello hay que sumar las proyecciones de crecimiento de población mundial: en 2100 se estima que habrá 11200 millones de habitantes en la Tierra (Naciones Unidas, 2015).

1.2 La sequía en zonas de clima mediterráneo y sus consecuencias en la agricultura

En las regiones de clima mediterráneo, como las zonas bañadas por el mar Mediterráneo, California, Chile, Sudáfrica, Asia central y el suroeste de Australia, en el período comprendido de 1951 a 2010 se ha producido un claro retroceso en los niveles de precipitación anuales (IPCC, 2014). En el caso de la región mediterránea, en los últimos 25 años se han registrado 10 de los 12 años más secos desde 1902 (Hoerling *et al.*, 2012). En California, el período comprendido entre 2012-2014 fue el más seco en los últimos 1200 años (Griffin y Anchukaitis, 2014).

Los pronósticos de cara a los próximos 100 años auguran todavía más descensos en las precipitaciones, sequías persistentes y otros fenómenos extremos (IPCC, 2014).

La sequía y el estrés salino son los principales factores ambientales que afectan negativamente la productividad de los cultivos agrícolas, ya que son capaces de disminuir los rendimientos hasta un 65% (Boyer, 1982). Ambos fenómenos se encuentran interconectados: en zonas de sequía en las que se practica la agricultura de riego, iones tóxicos como el Na^+ y el Cl^- son los más abundantes en las soluciones del suelo (Ashraf y Wu 1994); por otro lado, tanto la sequía como la salinidad provocan estrés osmótico, ya que disminuyen la actividad química del agua (Yancey *et al.*, 1982).

A nivel fisiológico, los iones tóxicos alteran la estructura de enzimas y proteínas al modificar el balance entre cargas hidrofóbicas y electrostáticas, de forma que inhiben su actividad (Wyn Jones y Pollard, 1983). Asimismo, el ion Na^+ interfiere con sitios de unión de cationes como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , mientras que el anión Cl^- hace lo mismo con moléculas cargadas negativamente, como el RNA o el bicarbonato (Serrano, 1996). Por otra parte, el estrés salino provoca la inhibición del crecimiento de las células como consecuencia de la pérdida de turgencia, debida a la disminución de la actividad química del agua.

1.3 Homeostasis de cationes

Las plantas, como organismos inmóviles, han desarrollado diferentes mecanismos que les permitan sobrevivir en situaciones de estrés abiótico, como la sequía y la salinidad ya mencionadas, o la acidez, el calor, el frío y ambientes oxidativos. El transporte de cationes como H^+ y K^+ a través de las membranas celulares y su regulación forma parte de los mecanismos de tolerancia a este tipo de estreses (Sun *et al.*, 2009).

1.3.1 Homeostasis de pH (H^+)

Las células vegetales deben mantener el pH de sus distintos compartimentos celulares dentro de un margen que les permita llevar a cabo los diferentes procesos fisiológicos. En el citoplasma su valor varía entre 7 y 7.5, en la vacuola entre 5 y 5.5 y en el apoplasto el pH es de 5 (Felle, 2001).

A continuación se detallan los efectos que tienen las variaciones en los valores del pH a nivel celular, así como los mecanismos desarrollados para regularlo.

1.3.1.1 Importancia del mantenimiento del pH

Efecto del pH en los enzimas celulares

Los enzimas celulares presentan en su estructura aminoácidos con grupos funcionales cuyo estado de ionización varía con el pH, de manera que su función puede verse alterada dependiendo del pH del compartimento en el que se ubiquen. Por otra parte, cada enzima tiene un valor óptimo de pH para el cual su actividad es máxima, mientras que esta disminuye al alejarse de ese valor. Enzimas clave del metabolismo celular o de la síntesis de DNA se ven claramente afectadas por cambios en el pH (Monroe *et al.*, 2014).

pH como mensajero celular

Las concentraciones citosólicas de H^+ son del orden de 100 nM, un valor propio de cationes que actúan como señales o segundos mensajeros al variar de forma rápida y detectable su concentración (Felle, 2001). En concreto, se ha demostrado que el pH varía en respuesta a la intensidad lumínica (Felle y Bertl, 1986) o elicitores de patógenos (Mathieu *et al.*, 1996); por otra parte, variaciones en el pH alteran la conductividad de canales de K^+ (Latz *et al.*, 2007), el gravitropismo (Scott, 1999) o el crecimiento celular debido a la acción de las expansinas (Cosgrove, 2000).

Papel del pH en el transporte de solutos

El transporte de solutos a través de las membranas celulares puede ser pasivo o activo, en función de si se realiza a favor o en contra del gradiente de concentración, respectivamente.

Cuando en el transporte activo la energía necesaria para el transporte de solutos proviene de una reacción exergónica, como puede ser la hidrólisis de ATP, se trata de transporte activo primario (Serrano, 1985). De hecho, muchas de las bombas de protones presentes en las membranas celulares de las células vegetales funcionan bombeando H^+ en contra de su gradiente hidrolizando ATP.

La energía resultante es almacenada en forma de potencial electroquímico de protones (potencial eléctrico y gradiente de pH), que se emplea para transportar solutos esenciales como los cationes potasio y amonio (uniportadores a favor del potencial eléctrico negativo dentro) y aniones como fosfato, nitrato y sulfato mediante cotransporte con protones (con carga neta positiva) a favor tanto del potencial eléctrico como del gradiente de pH. Los cotransportadores con protones se inhiben por acidificación intracelular además de por depolarización.

Por tanto, resulta esencial una correcta regulación del pH en los diferentes compartimentos celulares que permita el transporte de iones o solutos necesarios para el desarrollo vegetal.

Importancia del pH en el tráfico vesicular

El pH juega un papel importante en el tráfico vesicular del sistema de endomembranas (Schumacher, 2014), ya que en función de la acidez o basicidad del lumen del endosoma, este se dirige hacia un orgánulo u otro. En concreto, valores de pH ácidos dirigen el endosoma hacia la vacuola, mientras que valores básicos lo dirigen hacia el aparato de Golgi (van Weert *et al.*, 1997).

1.3.1.2 Mecanismos de regulación del pH

A pesar de que las células vegetales tratan de mantener el pH de los distintos compartimentos celulares dentro de un rango que les permita llevar a cabo los procesos fisiológicos, diferentes factores asociados con el metabolismo (Smith y Raven, 1979) o el ambiente (Felle, 2001) pueden alterar este equilibrio. Para evitarlo, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos que mantienen el pH dentro de los valores adecuados.

Tampones citoplasmáticos

Todas las especies vegetales, como el resto de seres vivos, tienen sistemas de regulación del pH basados en mezclas de soluciones hidrolíticamente activas (Smith y Raven, 1979). En el citosol existen diferentes soluciones tampón útiles en el rango de pH 6-8. Las principales soluciones son el tampón bicarbonato ($pK_{a1} = 6.4$), el tampón fosfato ($pK_{a2} = 6.9$) y las proteínas con sus grupos ionizables (principalmente el imidazol de la histidina, $pK_a = 6.5$). Sin embargo, este sistema no permite compensar las alteraciones del pH a largo plazo, por lo que existen otros sistemas más robustos.

Biochemical pH stat

Este sistema de regulación, más efectivo que el anterior, fue propuesto por Davies (1986) y se basa en la síntesis y degradación de malato coordinado por la acción de la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa y la enzima málica (Figura 3).

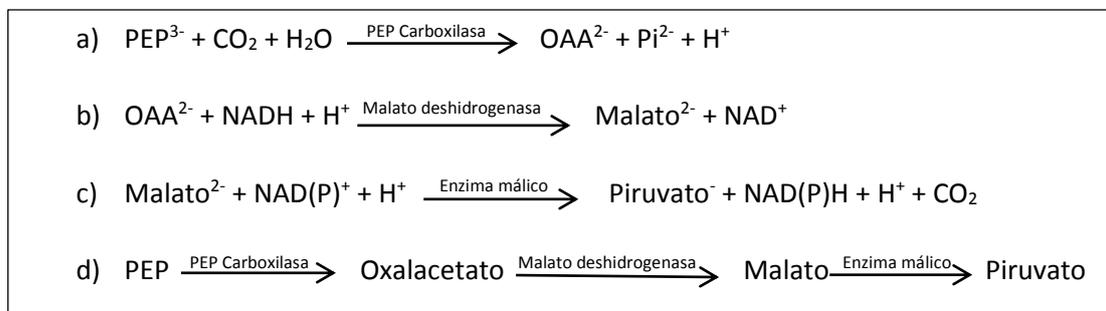


Figura 3. Biochemical pH stat propuesto por Davies (1986). a) Carboxilación del fosfoenolpiruvato para producir oxalacetato (OAA), reacción catalizada por la PEP carboxilasa. b) Transformación del OAA en malato por la malato deshidrogenasa, que emplea NADH como cofactor. c) Descarboxilación oxidativa del malato para producir piruvato, con consumo de un protón. d) Reacción global.

Puesto que el pH óptimo de la PEP carboxilasa es básico, cuando el pH del citosol se incrementa, la enzima cataliza la formación de oxalacetato (OAA) a partir de PEP (Figura 3a), generando protones y disminuyendo el pH. A continuación el OAA se transforma a ácido málico por la malato deshidrogenasa (Figura 3b). Por el contrario, cuando se produce una acidificación del citosol, la enzima málica descarboxila malato, produciendo piruvato con consumo de un protón (Figura 3c).

Este sistema explica el importante papel que juega el metabolismo del malato en la regulación del pH. A pesar de que la mayoría del malato se almacena en la vacuola, existen diferentes transportadores que permiten que fluya desde el lumen de la vacuola al citosol y viceversa (Martinoia *et al.*, 2006).

Biophysical pH stat

La regulación de forma prolongada del pH de los distintos compartimentos celulares se realiza mediante transportadores de protones ubicados en las membranas celulares. Las principales proteínas de este tipo son H^+ -ATPasas, que en plantas se ubican tanto en la membrana plasmática como en la membrana vacuolar, y necesitan de la cooperación de los canales de potasio. Una mayor entrada de potasio hace que la H^+ -ATPasa pueda bombear

protones con menor resistencia por parte del potencial eléctrico de membrana (Bissoli *et al.*, 2012; Niñoles *et al.*, 2013).

A nivel celular, el potasio es el ion más abundante en el citosol, pudiendo llegar a alcanzar entre el 2 y el 10% del peso seco total de la planta. A nivel fisiológico cumple importantes funciones como el mantenimiento de la turgencia, que posibilita el crecimiento, la polarización de la membrana o la neutralización de cargas negativas (Lebaudy *et al.*, 2007).

La toma y el transporte de K^+ en la célula está mediado por dos tipos de proteínas: canales y transportadores. Los canales se caracterizan por formar poros acuosos que permiten la unión del K^+ al sitio activo de la proteína desde ambos lados de la proteína, de forma simultánea y sin cambio conformacional durante el flujo, que se realiza a favor de gradiente electroquímico. Estas proteínas están reguladas por la apertura/cierre de una *puerta*, pero este cambio conformacional no ocurre en cada ciclo catalítico. Sus números de recambio son elevados, del orden de $10^7 s^{-1}$. Por el contrario, los transportadores representan una forma de transporte activo que requiere de la unión del sustrato (K^+) a un lado de la membrana para después liberarlo al otro lado, produciéndose un cambio conformacional por ciclo catalítico. Los números de recambio de estas proteínas son menores que el de los canales, del orden de $10-10^3 s^{-1}$, pero presentan una afinidad mucho mayor: K_M del orden μM frente a mM en el caso de los canales (Chiu *et al.*, 2002).

H⁺-ATPasas de la membrana plasmática

Las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática son enzimas electrogénicas que bombean protones hacia el exterior celular mediante la energía obtenida de la hidrólisis de ATP. De esta manera, generan un gradiente de transmembrana químico (ácido en el exterior) y eléctrico (negativo en el interior). El gradiente electroquímico generado, de entre -100 y -200 mV, permite la entrada al interior celular de otros solutos mediante cotransporte con protones. (Bublith *et al.*, 2010). El pH óptimo de este enzima es de 6.5, un valor muy inferior al pH habitual del citosol (7-7.5), de tal manera que ante una bajada del pH citosólico, la H⁺-ATPasa bombea el exceso de protones hacia el apoplasto.

Este tipo de bombas de la membrana plasmática forman parte del grupo de las ATPasas de tipo P, exclusivas de hongos y vegetales. En mamíferos no se han descrito H⁺-ATPasas, siendo la Na⁺/K⁺-ATPasa la proteína más relevante del mencionado grupo; la H⁺/K⁺-ATPasa del estómago es una derivación de la Na⁺/K⁺-ATPasa de todos los demás tejidos (Pedersen *et al.* 2007).

En *Arabidopsis thaliana* son 11 los genes que codifican para las diferentes H⁺-ATPasas (AHA1-11) y cada tipo celular expresa unas determinadas isoformas (Gaxiola *et al.*, 2007). Las dos principales y más abundantes son AHA1 y AHA2, que tienen una gran importancia puesto que el doble *knock-out* es letal embrionario (Haruta *et al.*, 2010).

Como se recoge en la Figura 4a, AHA2 a nivel de estructura se compone de una única cadena polipeptídica de 948 aminoácidos y un peso aproximado de 100 kDa (Falhof *et al.*, 2016). Esta cadena polipeptídica presenta 10 segmentos hidrofóbicos en α -hélice que se integran en la membrana, mientras que la actividad catalítica corre a cargo de los dominos A, N, P y R (Moerth *et al.*, 2011; Figura 4b).

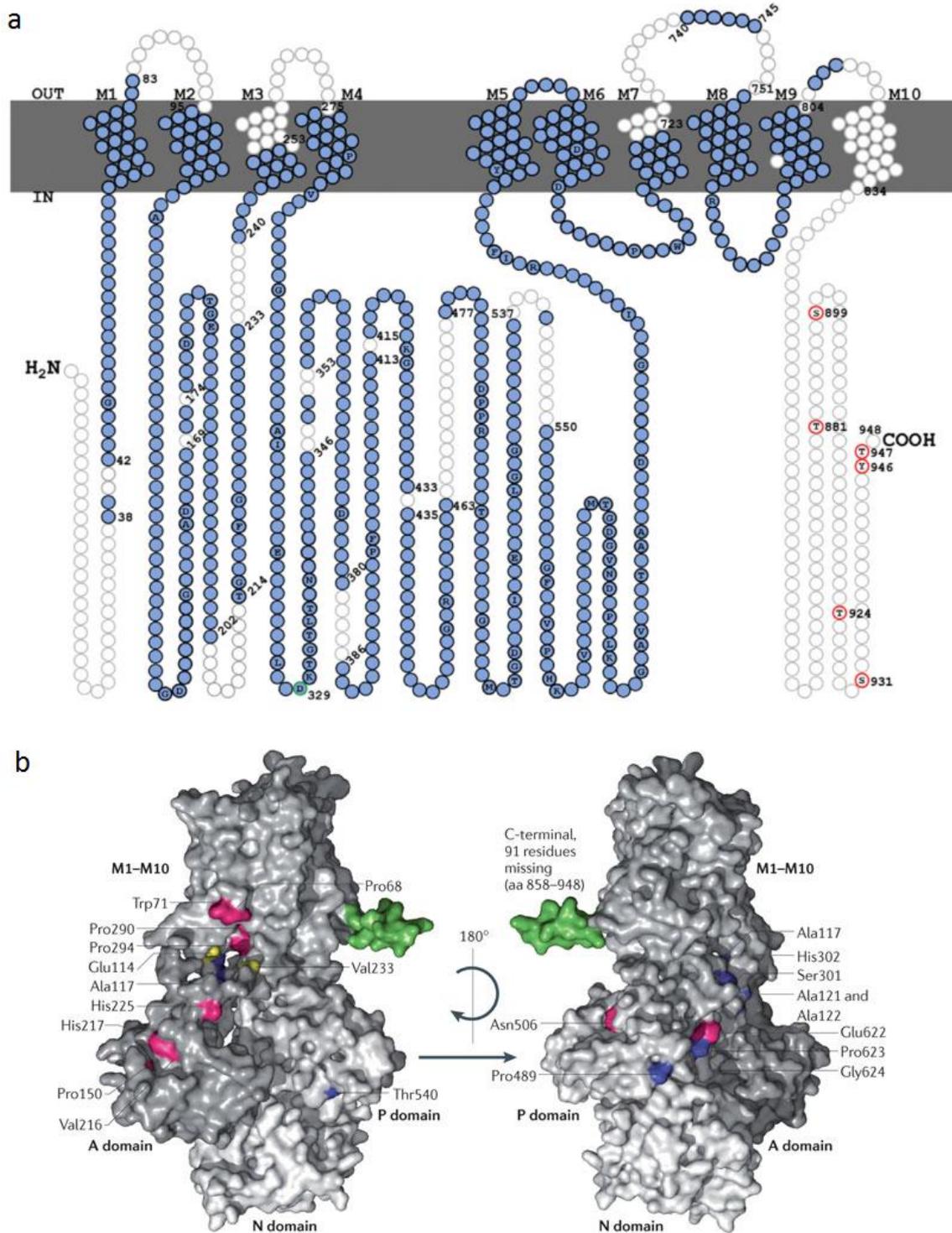


Figura 4. Representación en 2D y 3D de la H⁺-ATPasa AHA2. a) Modelo en 2D de AHA2 con sus 10 segmentos transmembrana (M1-10). Con círculos en azul se indican regiones en las que no se observan inserciones o deleciones al alinear con H⁺-ATPasas de 135 especies, mientras que los círculos en blanco representan regiones no conservadas. Los círculos con una letra en su interior indican aminoácidos conservados. En rojo se marcan residuos fosforilados *in vivo* y en verde el aminoácido Asp-329 del dominio P. Extraída de Falhof *et al.* (2016). b) Modelo en 3D de AHA2, con los diferentes dominios señalados. Resaltados en colores se remarcan las regiones de la proteína que se ha demostrado que interaccionan con el dominio regulador (R). En verde está la cola C-terminal de plantas. Extraída de Morth *et al.* (2011).

A nivel catalítico y de regulación son de gran importancia los dominios P y R, respectivamente. El dominio P se ubica en el gran bucle citosólico y es fosforilado en el residuo Asp-329 durante cada ciclo catalítico, mientras que el dominio R regula la acción del enzima en el extremo C-terminal autoinhibitorio, probablemente interaccionando e interfiriendo con los dominios catalíticos (Palmgren *et al.*, 1991). Por otra parte, el dominio A (actuador) se corresponde al extremo N-terminal y una pequeña asa, mientras que el dominio N es el encargado de unir el ATP (Pedersen *et al.*, 2007).

H⁺-ATPasa vacuolar

En las vacuolas y otros compartimentos del sistema de endomembranas es posible encontrar H⁺-ATPasas de tipo V. Su funcionamiento es similar al de la bomba de protones de la membrana plasmática: bombea H⁺ hacia las vesículas generando el ambiente ácido propio de estos compartimentos y posibilitando la entrada de otros iones por transporte activo secundario (Krebs *et al.*, 2010). Otras bombas de protones de la vacuola realizan funciones similares, pero empleando pirofosfato como sustrato (Zhen *et al.*, 1997).

Regulación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática

Dependiendo del estado de los extremos terminales, las H⁺-ATPasas de las membranas plasmáticas tanto de plantas como de levaduras pueden presentarse en dos estados distintos: un estado de autoinhibición en el que la hidrólisis de ATP es muy poco activa y no está asociada al bombeo de H⁺ y un estado de activación en el que el bombeo de protones e hidrólisis de ATP están asociados y son muy activos (Palmgren, 1995).

Esta regulación puede llevarse a cabo por diferentes fenómenos, como la activación por luz azul (Kinoshita y Hayashi, 2011) y por auxinas (Rayle y Cleland, 1992) y la inhibición por el ácido abscísico (Chen *et al.*, 2010) y los receptores de membrana de péptidos hormonales como los RALF (Caesar *et al.*, 2011).

La fosforilación del penúltimo residuo de la H⁺-ATPasa en el extremo C-terminal, que en plantas es una treonina (Thr-948 en AHA1 y Thr-947 en AHA2), permite la unión de la familia de proteínas 14-3-3 (Jahn, 1997). Estas proteínas estabilizan el extremo C-terminal manteniendo la bomba de protones en su estado activo (Fuglsang, 1997). La fosforilación activadora tiene lugar en condiciones óptimas de crecimiento, mientras que en condiciones de estrés se desfosforila. En cualquier caso, aún no se ha identificado el enzima encargado de la fosforilación del penúltimo residuo de la H⁺-ATPasa. También existe una fosforilación inhibidora en otros residuos del C-terminal.

1.4 El gen huérfano QQS de *Arabidopsis thaliana*

En datos de nuestro laboratorio de micromatrices de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico y en artículos que estudian la respuesta a mutaciones de las H⁺-ATPasas (Haruta *et al.*, 2012), destaca un gen que varía mucho su expresión, QQS. Se trata de un gen que no ha tenido especial atención por parte de la comunidad científica, ya que se considera un gen huérfano.

Los genes huérfanos son aquellos que no comparten ninguna similitud con genes o dominios de proteínas de otros linajes evolutivos (Tautz y Domazet-Lošo, 2011). Esta definición es compleja, ya que la identificación de genes huérfanos depende del método de detección empleado y del conjunto de genomas considerados en el proceso de identificación. El método de detección empleado es crucial para distinguir entre posibles homólogos y falsos emparejamientos. Por otra parte, el conjunto de genomas considerados es importante, ya que los resultados obtenidos son muy distintos en función de la relación evolutiva de las especies comparadas.

Los primeros genes huérfanos fueron detectados en el proyecto de secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Dujon, 1996) y posteriores trabajos de genómica comparada han demostrado que se encuentran presentes en todo tipo de genomas (Khalturin *et al.*, 2009), incluso en virus (Yin y Fischer, 2008).

Su origen es incierto, los principales modelos que explican la emergencia de genes huérfanos se basan en una pronunciada divergencia después de una duplicación génica (Conant y Wolfe, 2008) y en una generación *de novo* a partir de regiones no codificantes (Cai *et al.*, 2008). A pesar de ello, y debido al importante porcentaje de genes que representan en los genomas (0.5->8%), se cree que los genes huérfanos desempeñan importantes funciones en la adaptación a estreses ambientales (Long *et al.*, 2003).

En especies vegetales QQS (*Qua-quine starch*, At3g30720) de *Arabidopsis thaliana* ha sido el primer gen huérfano del que se ha podido caracterizar una función bioquímica. La proteína codificada por dicho gen consta de tan sólo 59 aminoácidos, no presenta ningún dominio conocido y tampoco existen homólogos en especies muy cercanas genéticamente como *Brassica napus* o *Arabidopsis lyrata* (Li *et al.*, 2009). Los estudios llevados a cabo con este gen han demostrado que participa en el metabolismo del almidón y la distribución de carbono y nitrógeno en la planta (Li *et al.*, 2009; Li y Wurtele, 2014; Li *et al.*, 2015).

En líneas de RNA de interferencia (RNAi) de QQS, los niveles de almidón son más abundantes con respecto a líneas silvestres, lo cual hace indicar que QQS actúa como inhibidor de la acumulación de almidón. Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que QQS incrementa su expresión como mecanismo de homeostasis ante el exceso de almidón en líneas mutantes que acumulan grandes cantidades de este polímero, como mutantes en *starch synthase 3*, *ss3* (Figura 5; Li *et al.*, 2009).

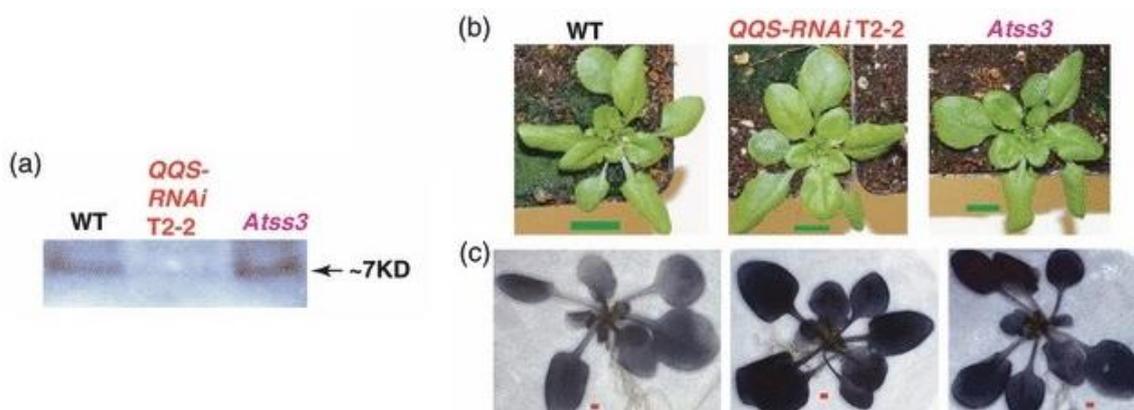


Figura 5. Efecto sobre los niveles de almidón del gen QQS. a) Western Blot de QQS en extractos de hojas de las líneas WT, QQS-RNAi y el mutante *Atss3* de *Arabidopsis thaliana* con exceso de acumulación de almidón. b) Fenotipo de las diferentes líneas antes de la cosecha. c) Prueba del yodo para las diferentes líneas. Extraída de Li *et al.* (2009).

Por otra parte, se ha demostrado que QQS requiere de NF-YC4 (Nuclear Factor Y Subunit C4, At5g63470) para formar un complejo que viaja al núcleo y expresa los genes involucrados en el incremento de los niveles de proteína, disminuyendo el contenido en almidón (Li *et al.*, 2015).

QQS se ha sobreexpresado también en líneas transgénicas de cultivos de interés agronómico como soja, arroz y maíz, pero no son organismos modelo y por ello se ha requerido un mayor esfuerzo en cuanto a tiempo y recursos para conseguir dichas líneas. En estas especies vegetales también se ha demostrado que QQS incrementa los niveles de proteína y disminuye los de almidón (Li y Wurtele, 2014; Li *et al.*, 2015). Resulta interesante que una proteína ausente en estas plantas pueda actuar igual que en *Arabidopsis*, lo cual es indicativo de que algún mecanismo muy conservado está relacionado con esta proteína tan peculiar.

1.5 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

Una de las principales ventajas de trabajar con levadura con respecto a *Arabidopsis* es que en un rastreo de genes es posible obtener buenos candidatos en apenas unos pocos meses, mientras que en *Arabidopsis* tomaría años de trabajo (Sáez *et al.*, 2008).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue introducida como organismo en la experimentación a mita de la década de 1930 por Herschel Roman (Roman, 1981) y desde entonces ha recibido una atención creciente. Muchos investigadores descubrieron que la levadura es un organismo ideal para estudiar la arquitectura y mecanismos celulares debido a las numerosas ventajas que presenta frente a otros organismos eucariotas.

Esta levadura es un organismo unicelular que puede presentarse en forma haploide o diploide, contiene 16 cromosomas completamente caracterizados que suman un total de 14000 kb y su genoma está perfectamente secuenciado y anotado (Goffeau *et al.*, 1996).

S. cerevisiae puede crecer en medios complejos y definidos, permitiendo el control de las condiciones de cultivo. Su tiempo de duplicación es muy corto (90 minutos en medio rico complejo y 140 minutos en medio sintético pobre), la temperatura de crecimiento es de 28-30 °C y no requiere de condiciones de seguridad especiales durante su manipulación puesto que no es patogénica.

A nivel de biología molecular e ingeniería genética, existen numerosas técnicas y protocolos establecidos para este organismo, además de colecciones de cepas con una amplia gama de modificaciones. El desarrollo de vectores y técnicas de transformación de alta eficiencia (Ito *et al.*, 1984) para la expresión de DNA foráneo en levadura supusieron un importante paso en el desarrollo de la biología molecular en este microorganismo. Posteriormente, al observarse la facilidad que presenta para disrumpir, eliminar o sustituir genes mediante recombinación homóloga (Thaler, 1988), comenzaron los proyectos para generar colecciones de cepas con mutaciones específicas. En la actualidad existen colecciones de mutantes de pérdida de función (mutantes nulos) y ganancia de función por aumento de dosis génica de todos los genes de *S. cerevisiae* (Winzeler, 1999; Sopko *et al.*, 2006).

El genoma de *S. cerevisiae* ha servido como modelo de referencia en proyectos de secuenciación de genomas de plantas, eucariotas superiores y otros organismos celulares. Estudios de genómica comparada han revelado el alto grado de conservación en las funciones

celulares desde levadura hasta mamíferos, lo cual reconfirma la idoneidad de este microorganismo como modelo de experimentación (Rubin, 2000).

1.5.1 El sistema de doble híbrido

En concreto, uno de los mejores ejemplos de la utilidad de la levadura en la biología molecular es el sistema de doble híbrido. Mediante esta herramienta es posible expresar y estudiar genes de cualquier eucariota en un organismo fácil de manejar como es *S. cerevisiae*.

Esta técnica, ideada por Fields y Song (1989), se basa en la premisa de que la mayoría de factores de transcripción eucariotas constan de dos dominios que deben estar próximos pero no unidos para ser activos (Verschure *et al.*, 2006). Uno de los dominios es el encargado de unirse al DNA (BD, *binding domain*), mientras que el otro es el responsable de reclutar otras proteínas e iniciar la transcripción (AD, *activation domain*). Cada uno de estos dominios puede fusionarse con proteínas de interés consiguiendo así dos proteínas quiméricas BD-X y AD-Y. Si las proteínas X e Y interactúan, los dominios del factor de transcripción quiméricos estarán lo suficientemente próximos como para que se reconstituya el factor de transcripción y sea activo. Este factor de transcripción permitirá la transcripción específica de unos genes reporteros que permitan evaluar la interacción en una cepa adecuada de levadura (Figura 5).

La aplicación más habitual del sistema de doble híbrido consiste en realizar un rastreo o *screening* de genotecas de cDNA, para identificar qué proteínas de todo un genoma pueden interactuar con una proteína de interés.

Para ello, se emplea una cepa mutante de levadura cuya ruta de biosíntesis de algún aminoácido esencial únicamente se expresa cuando se reconstituye el factor de transcripción del doble híbrido, generalmente GAL4. Esta cepa es cotransformada con las construcciones necesarias para el ensayo: vectores plasmídicos conocidos como *bait* (cebo) y *prey* (presa). El plásmido *bait* codifica para la proteína de interés fusionada al BD del factor de transcripción, mientras que los vectores *prey* consisten en una genoteca de plásmidos que codifican para todas las proteínas del genoma de interés fusionadas al AD del factor de transcripción. Esta técnica asume por tanto que cada célula de levadura únicamente incorporará un plásmido *prey* de la genoteca y, en última instancia, sólo se expresará una proteína de la colección. Finalmente, las células cotransformadas se siembran en una placa de medio definido, sin los aminoácidos cuya biosíntesis depende únicamente de la reconstitución del factor de transcripción. Por tanto, en la placa sobrevivirán exclusivamente aquellas colonias en las que haya interacción entre proteínas. Para identificar los genes que codifican para dichas proteínas simplemente se realiza una extracción de DNA plasmídico y se secuencian (Figura 6).

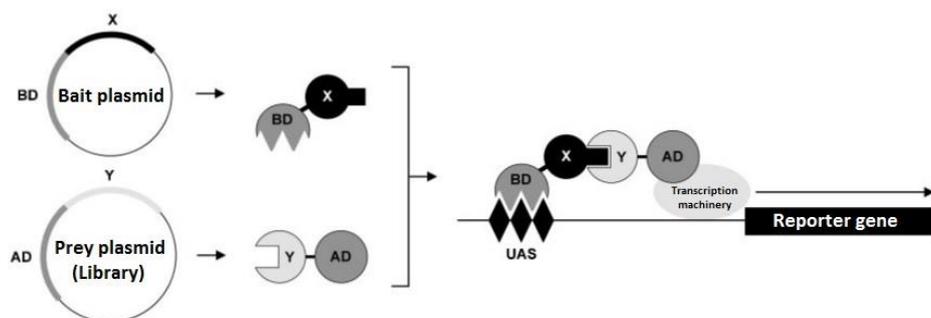


Figura 6. Esquema del *screening* de doble híbrido (método clásico). Para realizar el *screening* se requiere de un plásmido *bait* y una genoteca de plásmidos *prey*. Extraída de Causier (2004).

Esta potente herramienta permite identificar posibles interactores de una proteína determinada de un organismo, pero presenta la principal desventaja de que únicamente es aplicable a proteínas solubles que puedan encontrarse en el núcleo, ya que es donde debe actuar el factor de transcripción reconstituido. Por ello, se han realizado modificaciones al sistema para que permita evaluar la interacción de otras proteínas, como las transmembranales (Snider *et al.*, 2010).

En este caso, cada una de las dos proteínas de membrana a estudiar se fusiona a una fracción de ubiquitina (C-terminal y N-terminal). La fracción C-terminal contiene además fusionado un factor de transcripción que puede ser escindido mediante el corte con proteasas específicas de ubiquitina. De esta manera, cuando se produce la interacción entre las proteínas de membrana, la ubiquitina se reconstituye, las proteasas liberan el factor de transcripción y se produce la transcripción de los genes reporteros (Figura 7).

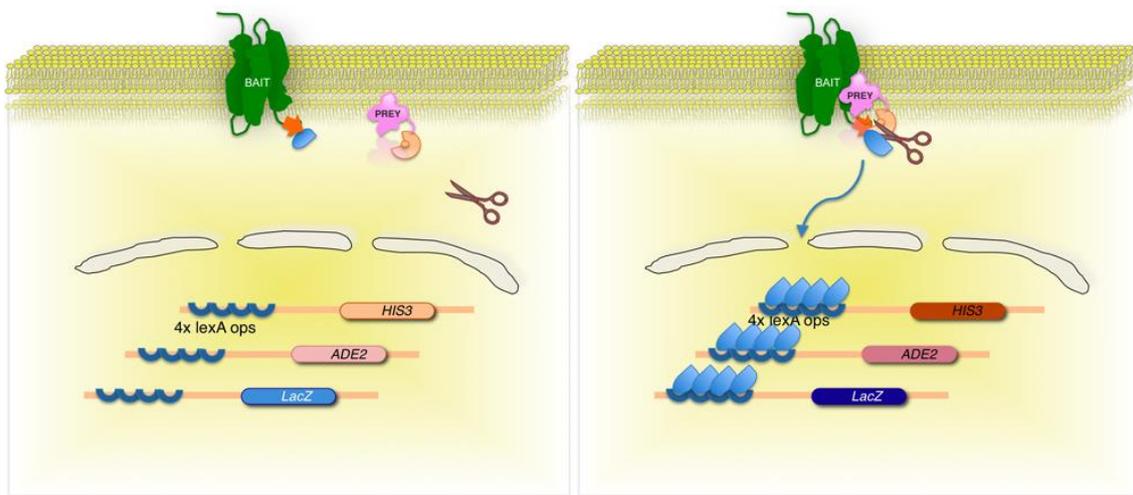


Figura 7. Sistema de doble híbrido para proteínas de membrana. La interacción entre las proteínas de interés permite la reconstitución de la ubiquitina y la escisión del factor de transcripción asociado por parte de una proteasa. Posteriormente el factor de transcripción viaja al núcleo para transcribir los genes reporteros.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo Final de Grado es identificar interactores de la proteína QQS de *Arabidopsis thaliana*, empleando para ello la técnica del doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae*. Para la consecución de este objetivo, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- i. Analizar los datos previos del laboratorio que relacionan QQS y AHAs y confirmar mediante Western blot una posible inhibición de la expresión de las H⁺-ATPasas de membrana por parte del gen huérfano.
- ii. Rastreo de doble híbrido:
 - Realizar las construcciones necesarias para el rastreo y establecer las condiciones óptimas para el ensayo.
 - Llevar a cabo el rastreo de doble híbrido e identificar los genes positivos.
 - Analizar los genes más prometedores y proponer un mecanismo de acción.
- iii. Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana:
 - Clonar los genes QQS y AHA1 en los plásmidos adecuados y determinar la posible interacción directa entre ambas proteínas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

La línea de *Arabidopsis thaliana* pQQS::QQS-GFP (Li *et al.*, 2009) fue empleada para evaluar el efecto del pH en la expresión del gen QQS. Dicha construcción contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) fusionado a QQS y controlado por el promotor nativo de QQS. Como control de dicho ensayo se utilizó la línea CaMV35S::GFP, en la que el gen GFP se encuentra regulado por el promotor constitutivo CaMV35S (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor).

Por otro lado, la línea de pérdida de función de *phosphoglucomutase 1* (*pgm1*) que presenta unos niveles de almidón casi nulos se empleó para determinar por Western blot (Planes *et al.*, 2014) la relación entre la expresión de AHAs y niveles de almidón.

3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa W303 de *S. cerevisiae* con genotipo *MATa/MATα* {*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*} [ϕ +] fue empleada para clonar mediante recombinación homóloga los genes *AHA1* en pBridge y pBT3-C, *QQS* en pPR3-C, *14-3-3 Epsilon* en pPR3-C y *At1g70470* en pPR3-C (van Leeuwen *et al.*, 2015).

La cepa THY.AP4 se empleó para realizar tanto el rastreo de doble híbrido clásico como el ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana. Su genotipo es el que sigue: *MATa, ura3, leu2, lexA::lacZ::trp1, lexA::HIS3, lexA::ADE2* (Obrdlik *et al.*, 2004).

3.1.3 *Escherichia coli*

La cepa DH5 α , con genotipo *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*, fue empleada para la propagación de las construcciones plasmídicas necesarias para los experimentos de doble híbrido.

3.1.4 Vectores de clonación y de doble híbrido

pCR™8/GW/TOPO®:

El vector de clonación pCR™8/GW/TOPO® de Invitrogen (Figura 8) es un plásmido abierto que contiene una topoisomerasa covalentemente unida a los extremos del plásmido, la cual permite la inserción de productos de PCR adenilados en 3'. Es un plásmido especialmente útil para subclonar genes de forma rápida y transferirlos a otros plásmidos destino mediante la tecnología de recombinación Gateway o por digestión y ligación, ya que presenta sitios de restricción *EcoRI* que flanquean el sitio de clonación.

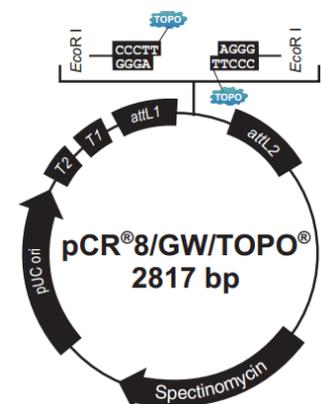


Figura 8. Mapa del plásmido pCR™8/GW/TOPO® (Invitrogen).

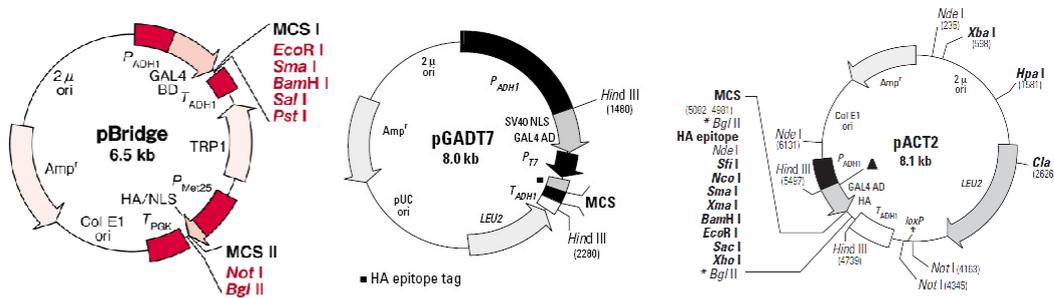
pBridge y pGADT7/pACT2:

Figura 9. Plásmidos del *screening* de doble híbrido.

Los plásmidos pBridge, pGADT7 y pACT2 (Clontech) fueron empleados para realizar las construcciones necesarias para el rastreo o *screening* de doble híbrido (Figura 9).

El plásmido pBridge es el *bait* del sistema, ya que contiene el gen que codifica para el BD del factor de transcripción GAL4, al cual se fusiona el gen que codifica para la proteína de interés gracias al MCS adyacente. La expresión de la proteína híbrida es constitutiva ya que está controlada por el promotor ADH1. Además, contiene un segundo MCS que permite clonar otros genes que se cree que puedan ayudar en la interacción entre proteínas. El promotor inducible Met25 regula la expresión de dichos genes (Solow *et al.*, 2008). Para su replicación y selección en levadura contiene el origen de replicación 2 μ y el marcador auxotrófico *TRP1*, mientras que para la propagación en *E. coli* tiene origen de replicación Col E1 y resistencia a ampicilina como marcador.

Por otro lado, pGADT7 y pACT2 son plásmidos *prey*, puesto que contienen el dominio AD de GAL4. pGADT7 es el plásmido empleado para realizar los controles positivos y negativos del sistema, mientras que pACT2 es el plásmido de la genoteca de cDNA (Németh *et al.*, 1998). Ambos plásmidos son muy similares, contienen el marcador auxotrófico *LEU2* para levadura y la resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli*.

pBT3-C y pPR3-C:

Estos plásmidos son el *bait* y el *prey*, respectivamente, del sistema de doble híbrido para proteínas de membrana (Figura 10).

En este caso pBT3-C es el plásmido *bait*, ya que contiene el dominio C-terminal de la ubiquitina y el factor de transcripción LexA. Este plásmido es centromérico, puesto que contiene un origen de replicación CEN/ARS. El marcador de selección para bacterias es la resistencia a kanamicina y en levadura el marcador auxotrófico es *LEU2*.

Por otro lado, pPR3-C es el vector *prey*, al contener el dominio N-terminal de la ubiquitina. Este plásmido no es centromérico, pero contiene el mismo promotor que pBT3-C, *CYC1*. El marcador auxotrófico de levadura es *TRP1* y para propagar en *E. coli* dispone del marcador de selección Amp^R.

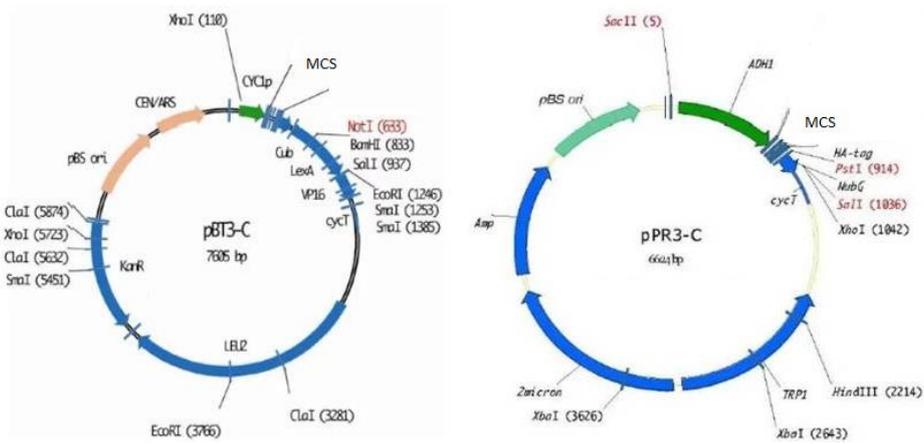


Figura 10. Plásmidos del ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana.

3.2 Medios de cultivo

3.2.1 Medios de cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en los medios que se detallan en Alejandro *et al.* (2011) y Naranjo *et al.* (2003).

3.2.2 Medios de cultivo de *S. cerevisiae*

Medio YPD (*Yeast Peptone Digest*)

Este medio complejo contiene todos los nutrientes requeridos para el crecimiento de las levaduras. Se compone de un 1% de extracto de levadura, 2% de peptona bacteriológica y 2% de glucosa. Para solidificar el medio se adiciona un 2% de agar.

Medio SD (*Synthetic Dextrose Minimal*)

El medio SD se compone de un 2% de glucosa, 0.7% de YNB (*Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos añadidos y con sulfato amónico) y se tampona con 50 mM de succínico ajustado a pH 5.5 o con 60 mM de TAPS ajustado a pH 8 con KOH. Además, se suplementa con los requerimientos nutricionales (auxotrofías) específicos de cada cepa (metionina y triptófano 20 mg/l; adenina, histidina y uracilo 30 mg/l; leucina 100 mg/l). Si se desea solidificar el medio se añade un 0.8% de agar.

3.2.3 Medios de cultivo de *E. coli*

Medio LB (*Luria-Bertani*)

Este medio estándar complejo para bacterias contiene un 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 0.5% de NaCl, ajustado a un pH 7 con NaOH. Para solidificar el medio se añade un 2% de agar. En el caso de cultivar bacterias transformadas con un plásmido que contiene un marcador de resistencia a antibióticos, se adiciona el antibiótico necesario. Para los

plásmidos empleados se añadió ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) o espectinomomicina (50 µg/ml).

Medios SOB (*Super Optimal Broth*) y SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite Repression*)

El medio SOB se utiliza para la preparación de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación. Se compone de un 2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM.

El medio SOC se emplea en la transformación de *E. coli* mediante choque térmico. Contiene los mismos componentes que el medio SOB pero con glucosa 20 mM.

3.3 Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas y crecidas según se detalla en Alejandro *et al.*, (2011) y Naranjo *et al.* (2003).

3.4 Manipulación y crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Para el crecimiento de *S. cerevisiae* se emplean matraces o tubos de 15 ml estériles, que se colocan en agitación orbital a 200 rpm y 28-30 °C. En caso de cultivos sólidos, las placas se colocan invertidas en una estufa a la misma temperatura.

3.4.1 Preparación de células competentes

Las células de levadura se dejan crecer durante toda la noche en un tubo de 50 ml con YPD (o SD selectivo si la cepa ya contiene algún plásmido) hasta alcanzar una absorbancia a 660 nm de 1-2, momento en el cual las células se encuentran en fase exponencial. Posteriormente se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm, se retira el medio de cultivo y se realiza un lavado con agua destilada. Tras centrifugar en las mismas condiciones, se resuspende el sedimento en 50 ml de LiTE (0.1 M de acetato de litio, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). Nuevamente se centrifuga, el sedimento se resuspende en 0.5 mL de LiTE y se incuba el tubo a 30 °C durante 15 minutos. Finalmente se añade 1/10 del volumen de ssDNA 1% (DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado). Si no se va a transformar en el momento, se añade ¼ del volumen de glicerol 80% y se realizan alícuotas de 100 µl para congelar a -80 °C.

3.4.2 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se realizan alícuotas o descongelan tantos tubos de células competentes como transformaciones se vayan a realizar. Por cada tubo con 100 µl de células competentes se añaden 0.1-1 µg de plásmido y 600 µl de PEG-LiTE (polietilenglicol 4000 al 40% p/v en LiTE).

Los tubos se incuban a 30 °C durante 30 minutos y después a 42 °C durante 20 minutos. Las células se centrifugan 10 segundos a 3000 rpm, se resuspenden en 100 µl de sorbitol y se

extienden en una placa de SD selectiva. Las placas se incuban a 28 °C hasta observar el crecimiento de colonias (2-3 días).

3.4.3 Minipreparación de DNA plasmídico en levadura

Las células crecidas durante toda la noche en medio SD selectivo se centrifugan en tubos de 1.5 ml y al pellet se le añaden 200 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, SDS 1% y Triton X100 2%), 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y microesferas de vidrio (425-600 µm de diámetro). La mezcla se agita en vórtex durante 10 minutos, se centrifuga a 10000 rpm 10 minutos y la fase acuosa con el DNA plasmídico se transfiere a un nuevo tubo. Seguidamente se añaden dos volúmenes de etanol absoluto, se centrifuga a la misma velocidad, se retira el sobrenadante y se realiza un lavado con 200 µl de etanol 70% v/v. Finalmente se vuelve a centrifugar, se eliminan los restos de etanol y una vez el pellet está seco se resuspende en 40 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM ajustado a pH 8 con HCl).

3.5 Manipulación y crecimiento de *Escherichia coli*

E. coli se cultiva en matraces o tubos de 15 ml estériles en agitación orbital a 200 rpm a 37 °C en el caso de cultivos líquidos. Los cultivos sólidos se colocan en placas invertidas en una estufa a la misma temperatura.

3.5.1 Preparación de células competentes

Para obtener células competentes de *E. coli* DH5α se parte de 400 µl de cultivo saturado que es inoculado en 200 ml de medio SOB. El cultivo se incuba a 18-25 °C hasta alcanzar una absorbancia de 0,5-0,7 a 660 nm, momento en el cual el matraz es enfriado en hielo.

Pasados 10 minutos, se centrifugan las células a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se elimina y se resuspende el sedimento agitando primeramente con el sobrenadante restante y posteriormente con 10 ml de tampón de transformación frío (PIPES 20 mM ajustado a pH 6.7 con KOH, CaCl₂ 20 mM, KCl 210 mM y MnCl₂ 50 mM). La mezcla se deja en hielo 10 minutos y se centrifuga en las mismas condiciones. A continuación, se repite la operación y se lleva a un volumen final de 5 ml con tampón de transformación frío. Por último, se añaden 375 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) lentamente y con agitación continua leve. Se deja reposar 10 minutos en hielo y se distribuye en alícuotas de 100 µl en diferentes tubos, que son almacenados a -80 °C.

3.5.2 Transformación de *Escherichia coli*

Los tubos con 100 µl células competentes de *E. coli* se descongelan manteniéndose en hielo. Seguidamente se añaden 5 µl de la reacción de ligación del plásmido con el inserto y se mantienen en hielo durante 30 minutos. A continuación, los tubos se someten a un choque térmico a 42 °C durante 50 segundos. Después se adicionan 250 µl de medio SOC y se incuba el tubo a 37 °C durante una hora. Por último, se extiende el contenido en placas de LB suplementadas con el antibiótico al que el plásmido confiera resistencia.

3.5.3 Minipreparación de DNA plasmídico en *E. coli*

Para realizar minipreparación de DNA plasmídico se empleó el kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), basado en la lisis alcalina y purificación en columnas de sílice.

3.6 Realización de las construcciones plasmídicas de doble híbrido

3.6.1 Construcciones para el rastreo de doble híbrido

pBridge

En el plásmido *bait* pBridge se clonó *QQS* y *AHA1*. *QQS* fue fusionado al dominio BD de GAL4 mediante su inserción en el MCS I, mientras que *AHA1* se clonó en el MCS II regulado por el promotor inducible Met25 (Solow *et al.*, 2008).

QQS y *AHA1* fueron amplificados siguiendo el protocolo de PCR de la DNA polimerasa Phusion® (New England Biolabs) y empleando cDNA de *Arabidopsis* como molde. Los oligonucleótidos empleados en la amplificación fueron los siguientes:

QQS_pBridge_dir: 5' CCGGAATTCATGAAGACCAATAGAGAGCAG 3'

QQS_pBridge_rev: 5' GCATCTAGAGTAGTTGTAGAACTGAAGCC 3'

AHA1_pBridge_dir: 5' CCTTCTAGTCCTAAGAAGAAGAGAAAGGTGATGTCAGGTCTCGAAG 3'

AHA1_pBridge_rev: 5' CAGTAGAGACATGGGAGATCAGCCCGAAGACTACACAGTGTAGTG 3'

Primeramente, *QQS* fue subclonado en pCR™8/GW/TOPO®, plásmido que fue digerido con *EcoRI* para escindir el gen. La reacción de digestión contenía 20 µl de plásmido, 10 µl de tampón del enzima, 10 µl de BSA 1 mg/ml, 2 µl de enzima (10 U/µl) y agua destilada hasta un volumen de 100 µl. Siguiendo los mismos pasos se digirió pBridge, para dejar el plásmido abierto y clonar mediante una reacción de ligación *QQS*. Para ello, en un volumen total de 15 µl se añadieron 200 ng de inserto (*QQS*), 100 ng de plásmido pBridge abierto, 1.5 µl de tampón de ligación y 1.5 µl de ligasa T4 (1 U/µl). La inserción de *QQS* en pBridge fue validada mediante digestión, PCR y secuenciación. La clonación en pCR™8/GW/TOPO® también fue utilizada en otras construcciones con plásmidos Gateway.

Para comprobar los resultados de PCRs y digestiones se realizaron electroforesis de DNA, utilizando para ello geles de agarosa al 0.8% (p/v) fundida en tampón de electroforesis TBE 0.5X (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA). Las electroforesis se realizaron a 100 voltios. El tampón de electroforesis contenía 0.05% (p/v) de bromuro de etidio para la visualización del DNA, que se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta UV de 254 nm de longitud de onda. Con las muestras se empleó el tampón de carga 6X [40% (p/v) de sacarosa, 0.1 M de EDTA y 0.25% (p/v) de azul de bromofenol], mientras que los marcadores de peso molecular utilizados fueron GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder y λ/*HindIII* (ThermoFisher).

Por otro lado, la clonación de *AHA1* en el MCS II del plásmido fue realizada mediante recombinación homóloga en la cepa W303 de *S. cerevisiae*. Para ello se realizó una transformación siguiendo el protocolo detallado con anterioridad, pero añadiendo *AHA1* amplificado por PCR y el plásmido pBridge con *QQS* ya clonado y abierto por digestión con *NotI* y *BglII*. El plásmido con ambos genes clonados se extrajo de las colonias de levadura siguiendo el protocolo ya mencionado de extracción de DNA plasmídico. Para verificar la presencia del gen *AHA1* en pBridge se realizó un Western blot de las células transformadas (Planes *et al.*, 2014).

pGADT7

En pGADT7, plásmido *prey*, fue clonado el gen *NF-YC4*, control positivo (Li *et al.*, 2015) del sistema de doble híbrido.

La estrategia seguida fue similar a la del plásmido *bait*, el gen fue amplificado por PCR a partir de cDNA de *Arabidopsis* con los siguientes oligonucleótidos:

NF-YC4_pGADT7_dir: 5' CAATTGATGGACAATAACAACAACAACAACAACCAGCA 3'

NF-YC4_pGADT7_rev: 5' CAATTGTCAACCTTGGCTATCGAGATTACCATGGCCGC 3'

El gen fue subclonado en pCR™8/GW/TOPO® y posteriormente fue escindido del vector mediante digestión con *MunI*. Por otro lado, pBridge fue digerido con *EcoRI* y se realizó una reacción de ligación con el gen *NF-YC4* y el plásmido pBridge abierto, ya que digestiones de *MunI* y *EcoRI* presentan extremos compatibles. La clonación fue validada por PCR, digestión y secuenciación.

pACT2

Para obtener la genoteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana* (Németh *et al.*, 1998), se realizó una maxipreparación de DNA plasmídico de cultivos de *E. coli* siguiendo el protocolo de PureLink® HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen).

3.6.2 Construcciones de doble híbrido para proteínas de membrana**pBT3-C**

En el plásmido *bait* pBT3-C, el gen *AHA1* fue clonado siguiendo la misma estrategia que en el plásmido pBridge. pBT3-C fue digerido con *NcoI* y *HindIII*. Por otra parte, *AHA1* fue amplificado por PCR con la DNA polimerasa Phusion® (New England Biolabs) a partir de cDNA de *Arabidopsis* y empleando como oligonucleótidos:

AHA1_pBT3C_dir: 5' ATCTAGACGGCCATTACGGCCAAACTCGCTATGTCAGGTCTCGAAG 3'

AHA1_pBT3C_rev: 5' CCCGACATGGTCGACGGTATCGATAAGCTCACAGTGTAGTGACT 3'

El producto de PCR fue clonado en el plásmido digerido pBT3-C mediante recombinación homóloga en la cepa de levadura W303.

pPR3-C

En pPR3-C, plásmido *prey*, la estrategia para clonar también fue la recombinación homóloga empleando la cepa W303 de levadura. En concreto, los genes clonados fueron *QQS*, *14-3-3 Epsilon* (control positivo) y *At1g70470*, un gen positivo del rastreo de doble híbrido que codificaría para una proteína de membrana. El plásmido se cortó con *SmaI* y los oligonucleótidos empleados en la amplificación de los distintos genes fueron los siguientes:

QQS_pPR3C_dir: 5' CACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGATGAAGACCAATAGA 3'

QQS_pPR3C_rev: 5' GTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGTAGTTGTAGAACT 3'

14-3-3Eps_pPR3C_dir: 5' CACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGATGGAGAATGAGAG 3'
 14-3-3Eps_pPR3C_rev: 5' GTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGTTCTCATCTTGAG 3'
 At1g70470_pPR3C_dir: 5' CACTAGTGGATCCAAGCAGTGGTATCAACGATGGGAGACCAACCAC 3'
 At1g70470_pPR3C_rev: 5' GTACATATCGATAAGCTTGATATCGAATTCATATATAACCGGA 3'

3.7 Rastreo de doble híbrido

3.7.1 Eficiencia de transformación y cálculo del número de clones a rastrear

La eficiencia de transformación fue evaluada realizando transformaciones de la cepa de levadura THY.AP4 con la maxipreparación de la genoteca de cDNA (Németh *et al.*, 1998) en medio sólido SD no selectivo a pH 5.5. Realizando diluciones de la maxipreparación de la genoteca, se evaluó el volumen de la misma necesario para conseguir cubrir al menos cinco veces el número de genes de *Arabidopsis thaliana*.

3.7.2 Realización del rastreo

Primeramente, se comprobó el funcionamiento del sistema mediante los controles positivos (pBridge_QQS+AHA1, pGADT7_NF-YC4) y la ausencia de autoactivación con los controles negativos (pBridge_QQS+AHA1, pGADT7_Ø). Dichas combinaciones de plásmidos fueron cotransformadas en la cepa THY.AP4 y las células fueron extendidas en placas de SD a pH 8 en condiciones restrictivas, únicamente suplementadas con histidina, uracilo y metionina.

Una vez validado el funcionamiento del sistema, el rastreo fue lanzado contrtransformando dicha cepa con el plásmido *bait* pBridge_QQS+AHA1 y la colección de plásmidos *prey* de la genoteca de cDNA (Németh *et al.*, 1998), siguiendo las cantidades obtenidas en la eficiencia de transformación. Las células fueron extendidas en medio sólido SD a pH 8 en condiciones restrictivas, para garantizar que la supervivencia únicamente fuese debida a la interacción entre proteínas. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 5-7 días hasta observar el crecimiento de colonias.

A las colonias positivas se les realizó una minipreparación de DNA plasmídico, que fue transformado en *E. coli*, extraído nuevamente y retransformado en *S. cerevisiae* en condiciones restrictivas para confirmar el crecimiento de colonias y validar la interacción, descartando posibles falsos positivos.

Asimismo, los plásmidos *prey*, tras la extracción en *E. coli* fueron secuenciados a fin de determinar los genes involucrados en la interacción.

3.7.3 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas de los plásmidos *prey* fueron sometidas a un BLAST frente a la base de datos del NCBI para averiguar los genes positivos. Otras bases de datos como TAIR fueron consultadas para buscar información adicional sobre los genes como bibliografía o datos de expresión. Asimismo, la web HMMTOP fue consultada para predecir la topología del gen positivo *At1g70470*.

3.8 Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana

El funcionamiento del sistema fue validado cotransformando la cepa THY.AP4 con pBT3-C_AHA1 y pPR3-C_14-3-3 (control positivo) o pPR3-C_∅ (control negativo) y sembrando en placa de SD selectiva.

Posteriormente se evaluó la interacción de QQS con AHA1 cotransformando pBT3-C_AHA1 y pPR3-C_QQS. Asimismo, se determinó la posible interacción de uno de los positivos del *screening* de doble híbrido, *At1g70470*, de forma que se cotransformó pBT3-C_AHA1 y pPR3-C_At1g70470.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados previos

4.1.1 Efecto de la ausencia de las H⁺-ATPasas en *Arabidopsis thaliana*

En un estudio llevado a cabo por Haruta y Sussman (2012) se evaluó el efecto transcriptómico de la eliminación de una de las dos H⁺-ATPasas mayoritarias de membrana en *Arabidopsis thaliana*. Para ello, mediante micromatrices de *Arabidopsis* se compararon los niveles de expresión de todos los genes en líneas *knock-out* para AHA1 o para AHA2 frente a líneas silvestres. En la Figura 11 se recogen los resultados de este estudio.

a)	Fold Change	P	Identifier	Annotation
Up-regulated genes				
	3.05	0.0498	At2g43140	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
	2.77	0.0428	At2g04050	MATE efflux family protein
	2.51	0.0373	At2g04040	ATDTX1_TX1_MATE efflux family protein
	2.26	0.0377	At5g57240	ORP4C_OSBP (oxysterol-binding protein)-related protein 4C
	2.20	0.0414	At3g23150	ETR2_signal transduction His kinase, hybrid type, ethylene sensor
	2.09	0.0455	At5g43450	2-Oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
	2.07	0.0020	At2g39980	HXXXD-type acyl-transferase family protein
	2.06	0.0238	At5g45820	CIPK20_PKS18_SnRK3.6_CBL-interacting protein kinase 20
	2.02	0.0174	At2g36690	2-Oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Down-regulated genes				
	6.14	0.0500	At3g30720	QQS_qua-quine starch
	2.84	0.0225	At2g18960	AHA1, OST2_PMA_H ⁺ -ATPase 1
	2.43	0.0036	At4g03060	AOP2, alkenyl hydroxyalkyl producing 2
	2.38	0.0495	At3g45140	ATLOX2_lipoxygenase 2

b)	Fold Change	P	Identifier	Annotation
Up-regulated genes				
	5.29	0.0183	At3g56980	BHLH039, basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding protein
	4.97	0.0043	At4g36700	RmlC-like cupins superfamily protein
	3.89	0.0365	At4g13420	ATHAK5, high-affinity K ⁺ transporter 5
	3.30	0.0359	At2g30750	CYP71A12, cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12
	2.96	0.0257	At5g48850	ATSDI1, tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
	2.86	0.0316	At1g26410	FAD-binding berberine family protein
	2.78	0.0208	At1g47400	Unknown protein
	2.74	0.0333	At2g39510	Nodulin MtN21, EamA-like transporter family protein
	2.72	0.0010	At1g02920/30	ATGST11, ATGSTF7, GST
	2.50	0.0082	At4g37290	Unknown protein
Down-regulated genes				
	17.64	0.0074	At4g30190	AHA2, HA2, PMA2, H ⁺ -ATPase 2
	9.01	0.0332	At3g30720	QQS, qua-quine starch
	2.39	0.0440	AtCg00180	RPOC1, DNA-directed RNA polymerase family protein
	2.12	0.0380	At3g49160	Pyruvate kinase family protein
	2.09	0.0016	At5g01600	ATFER1, FER1, ferretin 1

Figura 11. Genes sobre e infraexpresados en líneas *knock-out* de H⁺-ATPasas de membrana plasmática frente a la variedad silvestre. a) Mutante *aha1-6*. b) Mutante *aha2-4*. En ambos casos se indica el *fold-change*, *p-value*, identificador del gen y una pequeña descripción. Se observa cómo *QQS* aparece en los dos mutantes como gen significativamente infraexpresado. Extraída de Haruta y Sussman, 2012.

QQS aparece en el listado de genes que reducen significativamente su expresión en las dos líneas mutantes, lo cual pone de manifiesto su posible relación con la regulación de las H⁺-ATPasas de membrana y, por consiguiente, del pH intracelular.

En el laboratorio de Ramón Serrano hay datos transcriptómicos (Bissoli *et al.*, 2012) de tratamientos de una línea silvestre de *Arabidopsis* con un ácido orgánico débil (Figura 12).

At1g44446	-0.537	-0.595	-0.475	-0.397	
At3g30720	-0.915	-3.006	-1.202	-1.937	QQS
At3g30725	-0.801		-0.279	-0.18	

Figura 12. Datos transcriptómicos de expresión bajo tratamiento con un ácido orgánico débil en una línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*. En rojo se indican los datos de expresión del gen *QQS*. Se presentan cuatro repeticiones de la expresión de cada gen en los controles con respecto a las plantas tratadas con ácido acético. Los resultados corresponden al logaritmo en base 2 del cociente entre la expresión con tratamiento ácido y el control.

En las cuatro repeticiones de estos datos se confirma que *QQS* baja su expresión dependiendo del pH intracelular, de manera que cuanto más bajo es el pH menos se expresa el gen.

4.1.2 *QQS* regula la expresión de las H⁺-ATPasas de *Arabidopsis thaliana*

En vista a estos resultados, para determinar el papel que juega *QQS* en la expresión de las H⁺-ATPasas de membrana, en nuestro laboratorio se evaluó mediante PCR cuantitativa la expresión relativa de *QQS* y *AHAs 1-3* en diferentes líneas mutantes de *Arabidopsis*. En ese momento no había líneas *knock-out* para *QQS* disponibles, de forma que se realizó el ensayo con líneas de inserciones de T-DNA próximas a *QQS* y que podrían alterar la expresión del gen (Figura 13, como ocurre en Deprost *et al.*, 2007). En concreto, la expresión de los genes de resistencia a antibióticos con los que se seleccionan las líneas mutantes puede dar lugar a la sobreexpresión de genes próximos como el gen de interés. Por otro lado, el T-DNA puede interrumpir el promotor y disminuir la expresión de dicho gen.

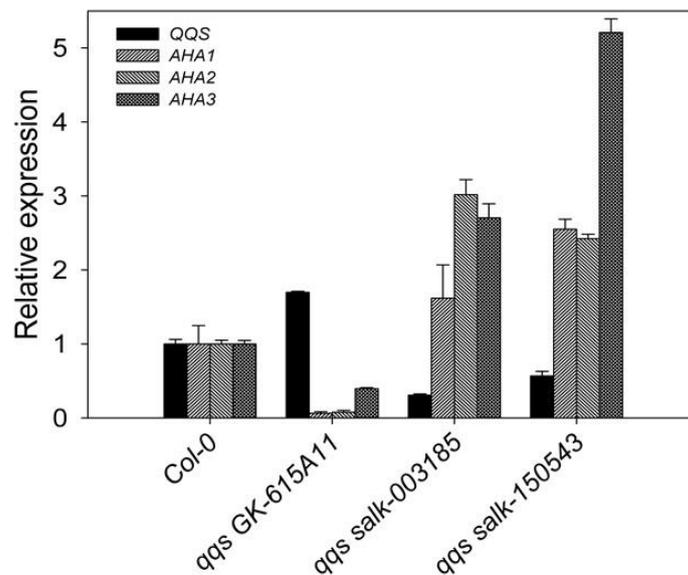


Figura 13. Resultados de PCR cuantitativa de diferentes líneas de T-DNA próximas al gen *QQS*.

Los resultados de la PCR cuantitativa evidencian que *QQS* podría actuar como un inhibidor de *AHAs*, ya que la sobreexpresión del gen huérfano impide que las bombas de protones se expresen. Por el contrario, cuando los niveles de expresión de *QQS* son reducidos, los niveles de mRNA de *AHAs* son más abundantes.

4.2 Resultados

4.2.1 Expresión de las H⁺-ATPasas 1-2-3 en ausencia del gen *QQS* en *Arabidopsis thaliana*

Los datos previos de la expresión de los niveles de mRNAs no son de líneas transgénicas de sobreexpresión canónicas, pero pueden ser indicativos de lo que puede ocurrir. Para tener la certeza de que los datos son correctos, se necesitan líneas transgénicas estables de ganancia y pérdida de función, que tardan un año en salir. En estos meses se ha podido utilizar la línea de pérdida de función de tipo RNAi que ya ha fue empleada por Li *et al.* (2009). Además, se determinó el nivel de expresión de las H⁺-ATPasas en la línea de RNAi de *QQS* (con más almidón) y en la línea de pérdida de función *pgm1* que presenta niveles de almidón casi nulos. De esta manera se comprobó si casi todos los mutantes de *Arabidopsis* con mayores niveles de almidón (como parece ser por varios datos de laboratorio no publicados) presentan una expresión más elevada de H⁺-ATPasas. Para ello utilizamos dos anticuerpos distintos: el "759", específico de la cola C-terminal de las AHAs, y el "758", específico del cuerpo central de la proteína (Figura 14).

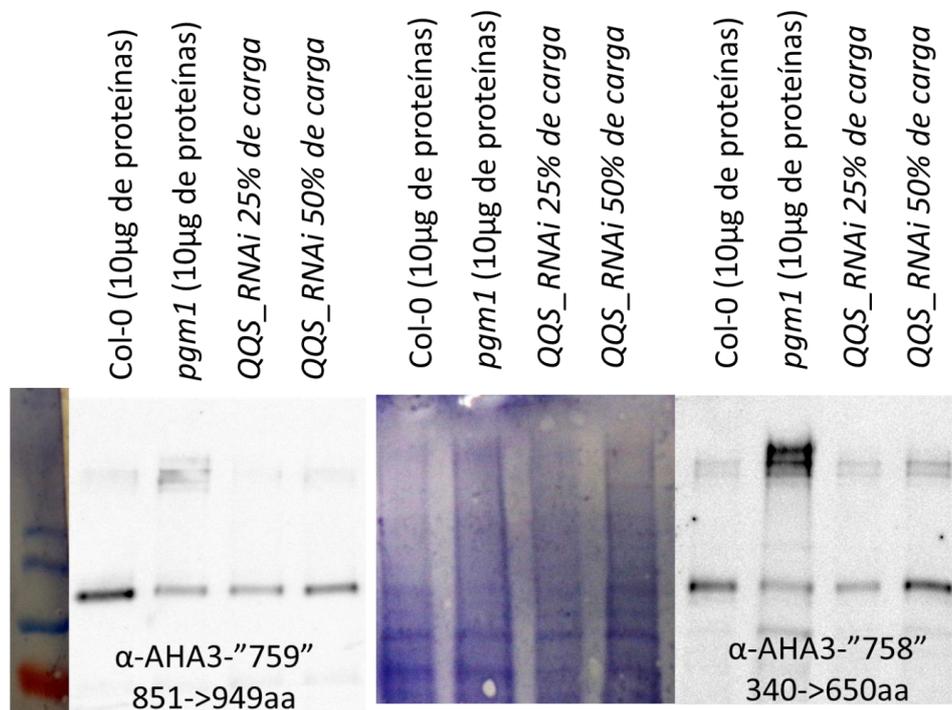


Figura 14. Western blot contra AHA3 en extractos de *Arabidopsis thaliana* con RNAi de *QQS* y el mutante *pgm1*. Se emplearon dos anticuerpos: 759 contra la cola C-terminal de AHAs y 758 para el cuerpo central de la bomba de protones.

Nuevamente se observa que la reducción de la expresión de *QQS* va acompañada a la sobreexpresión de *AHAs* con respecto a las líneas silvestres. De esta forma, es posible señalar que *QQS* actúa como un inhibidor de la expresión de las bombas de protones de la membrana plasmática en *Arabidopsis thaliana*. Finalmente, el almidón parece ser un factor positivo en la expresión de la bomba de protones.

En la Figura 15 se esquematiza el papel que juega *QQS* en *Arabidopsis* a nivel bioquímico y fisiológico, teniendo en cuenta todos los datos de los que se dispone de este gen hasta el momento.



Figura 15. Esquema resumen de la función de *QQS* a nivel bioquímico y fisiológico.

Para elucidar un posible mecanismo de inhibición y buscar proteínas involucradas en el proceso, se ha realizado el rastreo de doble híbrido del presente trabajo.

4.2.2 Expresión de *QQS* en función del pH en *Arabidopsis thaliana*

En la Figura 16 se recogen los niveles de expresión de *QQS* a pH ácido y básico en la línea de *Arabidopsis thaliana* con el gen reportero *GFP*. La línea contiene *GFP* fusionado a *QQS* y se encuentra bajo el control del promotor nativo de *QQS*.

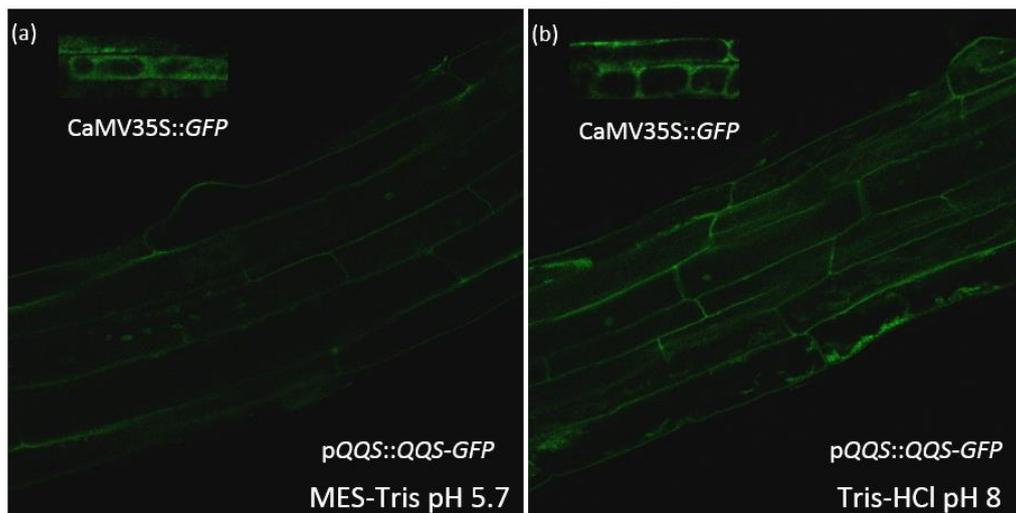


Figura 16. Efecto del pH en la expresión de *QQS* en *Arabidopsis thaliana*. Se empleó como construcción el gen de fusión *QQS-GFP* bajo el control del promotor nativo de *QQS*. Como control se empleó el gen *GFP* controlado por el promotor constitutivo *CaMV35S*. La expresión fue evaluada a pH 5.7 (MES-Tris) (a) y pH 8 (Tris-HCl) (b).

La imagen muestra un claro efecto del pH en la expresión del gen *QQS* en *Arabidopsis*, lo cual permite justificar el empleo de un tampón de pH básico para la realización de los rastreos de doble híbrido en levadura. Hipotetizamos por tanto que a pH 8 es más probable que *QQS* encuentre interactores de interés, ya que es cuando más se expresa en *Arabidopsis*.

4.2.3 Rastreo de doble híbrido

4.2.3.1 Construcciones de doble híbrido

En la Figura 17 se muestran las electroforesis de las PCR del gen empleado como control positivo *NF-YC4* (Li *et al.*, 2015) y de *QQS*, que permitieron verificar la clonación de los genes en pGADT7 y pBridge, respectivamente.

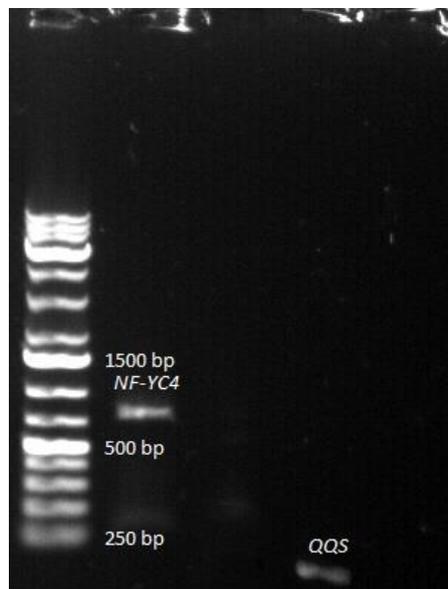


Figura 17. PCR de *NF-YC4* y *QQS*. En la amplificación se empleó un oligonucleótido del gen y otro del plásmido correspondiente para verificar si el vector y la orientación eran correctas.

En ambos casos se observa que las bandas de la amplificación de los genes presentan la longitud esperada. Además, la clonación fue validada por secuenciación de los plásmidos.

Por otro lado, para verificar la correcta clonación de *AHA1* en el MCS II de pBridge, se realizó un Western blot, que permitió además comprobar el funcionamiento del promotor Met25 a diferentes pH y a diferentes tiempos tras la inducción, ya que no disponíamos de datos de homeostasis de metionina en levadura (Figura 18).

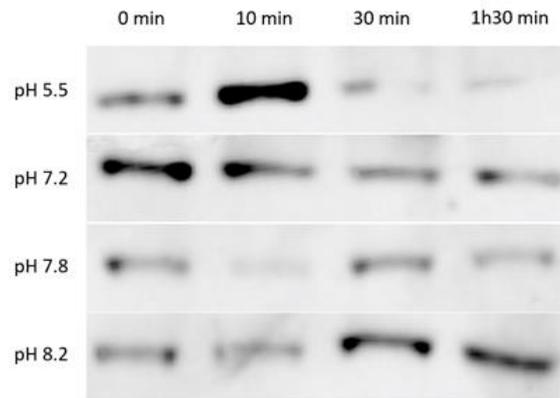


Figura 18. Western blot de AHA1 expresado en pBridge en levadura. Se evalúa el efecto del pH y el tiempo tras la inducción del promotor Met25 en la expresión de la proteína.

Los resultados muestran una mayor expresión de la proteína en tiempos cortos para pH 5.5 y 7.2, mientras que para valores de pH más básicos, la expresión es mayor en tiempos más largos tras la inducción. No obstante, el promotor Met25 (Solow *et al.*, 2008) suele presentar niveles basales de expresión en estado no inducido. En cualquier caso, fue posible determinar que *AHA1* estaba clonado correctamente en pBridge.

4.2.3.2 Número de clones rastreados

Las diluciones realizadas para determinar la eficiencia de transformación mostraron que por cada 1 μ L de genoteca de cDNA se lograban transformar aproximadamente 100 células. Teniendo en cuenta que *Arabidopsis thaliana* tiene 24500 genes y que es necesario transformar entre 5-10 veces este número de genes para obtener resultados significativos, con los volúmenes de genoteca empleados se ha rastreado el genoma de *Arabidopsis* hasta 6 veces.

4.2.3.3 Controles del rastreo de doble híbrido

Antes de realizar el rastreo de doble híbrido se comprobó la ausencia de autoactivación por parte de las construcciones, empleando para ello los controles negativos. Por otro lado, con los controles positivos se validó el funcionamiento del sistema (Tabla 1).

		Control (+A +H +M +U -W -L)	Crecimiento con Met (-A +H +M +U -W -L)	Crecimiento sin Met (-A +H -M +U -W -L)
pBridge_QQS pGADT7_NF-YC4	pH 5.5		-	-
	pH 8			
pBridge_QQS+AHA1 pGADT7_NF-YC4	pH 5.5		-	-
	pH 8	-		

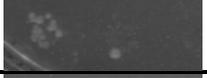
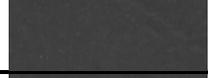
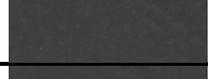
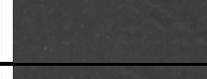
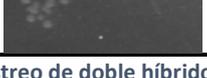
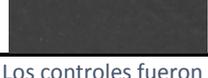
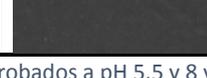
pBridge_QQS pGADT7_∅	pH 5.5			
	pH 8			
pBridge_QQS+AHA1 pGADT7_∅	pH 5.5			
	pH 8			

Tabla 1. Controles positivos y negativos del rastreo de doble híbrido. Los controles fueron probados a pH 5.5 y 8 y en ausencia o presencia de metionina, que controla la expresión de *AHA1*. En cada condición se indican los aminoácidos añadidos al medio SD.

El control positivo NF-YC4 (Li *et al.*, 2015) se demostró que crecía en condiciones restrictivas (sin adenina) sólo a pH 5.5, mientras que a pH 8 no lo hacía, lo cual pone de manifiesto el efecto del pH en las cargas de las proteínas y su implicación en la interacción. Las imágenes de NF-YC4 no están presentes puesto que al realizar el ensayo hubo problemas de contaminación. No obstante, en las pruebas previas a la realización del ensayo fue posible validar que actuaba como control positivo y el resto de controles mostraron los resultados esperados.

Por otro lado, en ninguno de los controles negativos se observó crecimiento en condiciones restrictivas, por tanto, no existía autoactivación por parte de las construcciones.

4.2.3.4 Genes positivos del rastreo de doble híbrido

Tras aislar los plásmidos pACT2 de las colonias positivas, secuenciarlos y realizar una búsqueda en BLAST, se obtuvieron las proteínas que interactúan con QQS, recogidas en la Tabla 2.

Identificador	Nombre del gen	Descripción
<i>At1g70470</i>	-	Unknown protein
<i>At3g13850</i>	<i>LBD22</i>	LOB domain-containing protein 22
<i>At5g15200</i>	-	Ribosomal protein S4
<i>At1g51805</i>	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein

Tabla 2. Genes positivos obtenidos en el rastreo de doble híbrido. Se indica el identificador del gen, el nombre del gen y una pequeña descripción ofrecida por la web TAIR.

El gen *At1g70470* es completamente desconocido, no existe bibliografía acerca de él pero sí que se encuentra conservado en otras especies vegetales. Predicciones bioinformáticas indican que el gen codificaría para una proteína transmembrana, la cual no presentaría ningún dominio conocido (Figura 19).

Al tratarse de una proteína de membrana, mediante el rastreo de doble híbrido clásico no debería haberse detectado la interacción, ya que únicamente aquellas proteínas capaces de viajar al núcleo permiten la transcripción de los genes reporteros. Sin embargo, el plásmido de la genoteca no contiene la secuencia completa del gen, únicamente la región que codifica para los aminoácidos 117-154 del dominio citosólico. Por consiguiente, es posible señalar que el dominio citosólico de la proteína *At1g70470* es el encargado de interactuar con QQS.

La ausencia de bibliografía y de cualquier tipo de información sobre este gen dificulta la determinación de una potencial función. No obstante, existen bases de datos públicas de niveles de expresión bajo diferentes condiciones en experimentos de *microarrays*. En este sentido, en *AtGenExpress* es posible comparar cómo varía la expresión de distintos genes cuando *Arabidopsis* es sometida a diferentes tratamientos químicos. Al comparar el comportamiento de *At1g70470* con el de *PSY1R* (*At1g72300*), un activador de AHAs (Falhof *et al.*, 2016), se observa que responden de forma similar frente a tratamientos con ácido abscísico (ABA) y aminoetoxivinilglicina (AVG) (Figura 20).

```

Protein: At1g70470
Length: 154
N-terminus: OUT
Number of transmembrane helices: 1
Transmembrane helices: 38-57

Total entropy of the model: 17.0042
Entropy of the best path: 17.0049

The best path:

seq  MGDQPQEFQQ PQVYPSTSSS TSSSFSPSSS GSSGSFGTAF IVLAAILVLA 50
pred OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOOOOOO OOOOOHHH HHHHHHHHHH

seq  ALACVFGRLC NRGGKQHKDK NNNKASKHEK PSSKKSREIR PVEREPRERG 100
pred HHHHHHHiii iiiiiiiiii iiiiiiiiii iiiiiiiiii iiiiiiiiii

seq  DVEFGFDMKR PGPMSKPTGR NGGDIEFGFD NKRGGGGGGG GGGKGGKRPP 150
pred IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII IIIIIIIIII

seq  PVIY 154
pred IIII
    
```

Figura 19. Predicción bioinformática de la topología de la proteína At1g70470. Con la letra O se representan los aminoácidos ubicados fuera la membrana, con la H los aminoácidos del dominio transmembrana y con la I los del dominio intracitoplasmático. En minúscula se indican los aminoácidos que forman una cola próxima al dominio transmembrana. Extraído de <http://www.enzim.hu/hmmtop/>

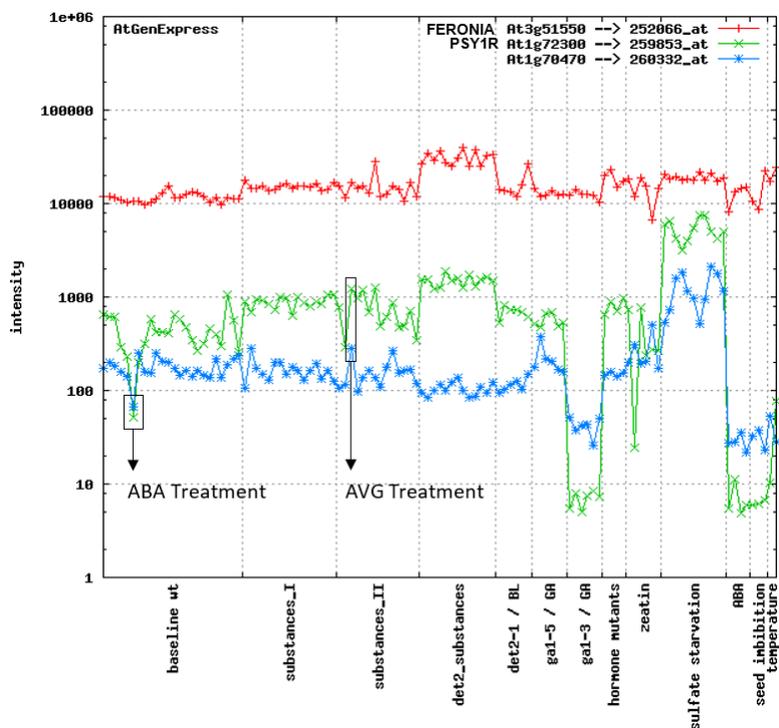


Figura 20. Comparación de los niveles de expresión de At1g70470, At3g51550 (FERONIA) y At1g72300 (PSY1R) bajo diferentes tratamientos químicos. FERONIA y PSY1R son un inhibidor y activador de AHAs, respectivamente. Se observa cómo At1g70470 actúa de forma similar a PSY1R en los tratamientos de ABA (inhibidor de AHAs) y AVG (inhibidor de la degradación de almidón).

Teniendo en cuenta la tendencia que presenta *At1g70470* cuando es sometido a estos tratamientos químicos, es posible plantear un modelo en el que *At1g70470* podría actuar como activador de AHA1 y de la síntesis de almidón. QQS funcionaría como inhibidor de *At1g70470* impidiendo que actuase (Figura 21).

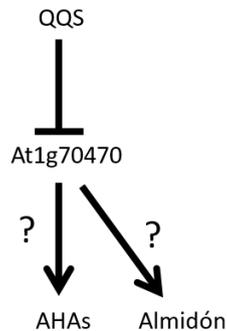


Figura 21. Modelo de actuación propuesto para *At1g70470*. Se trataría de un activador de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática y de la síntesis de almidón. A su vez, QQS inhibiría la acción de este gen.

El gen *LBD22* (*At3g13850*) codifica para una proteína de función también desconocida, aunque las proteínas de su familia se encargan de dar la forma correcta a las hojas de *Arabidopsis* (Matsumura *et al.*, 2009). Presenta una α -hélice anfipática en el extremo N-terminal propia de las proteínas que deben dirigirse al cloroplasto, aunque también se expresa en el núcleo. Sorprendentemente, la secuencia presente en el plásmido de la genoteca corresponde a una región UTR del gen, según lo consultado en diferentes bases de datos. Por tanto, podría haber algún tipo de *splicing* alternativo que no ha sido correctamente anotado todavía.

El gen *At5g15200* codifica para la proteína ribosomal S4, una proteína estructural del ribosoma que cambia su patrón de fosforilación durante el día y la noche (Turkina *et al.*, 2011).

Por último, el gen *At1g51805* sintetiza una kinasa rica en leucinas que fosforila residuos de serina y treonina, principalmente de proteínas secretadas mediante el sistema de endomembranas. No obstante, la secuencia del plásmido era muy sucia y se requiere una confirmación.

4.2.3.5 Ensayo de crecimiento de los genes positivos

Los genes positivos fueron sometidos a un ensayo de crecimiento en presencia o ausencia de metionina para evaluar el efecto de AHA1 en la interacción.

		Control (+A +H +M +U -W -L)	Crecimiento con Met (-A +H +M +U -W -L)	Crecimiento sin Met (-A +H -M +U -W -L)
pBridge_QQS+AHA1 pACT2_At1g70470	pH 5.5			
	pH 8			

pBridge_QQS+AHA1 pACT2_At5g15200	pH 5.5			
	pH 8			
pBridge_QQS+AHA1 pACT2_At3g13850	pH 5.5			
	pH 8			
pBridge_QQS+AHA1 pACT2_At1g51805	pH 5.5			
	pH 8			

Tabla 3. Ensayos de crecimiento de los genes positivos a diferentes pH y en presencia o ausencia de AHA1. En cada condición se indican los aminoácidos añadidos al medio SD.

En vista a los resultados parece que AHA1 tiene una influencia parcial en las interacciones entre las proteínas QQS - At1g70470 y QQS - At5g15200, que además sólo interaccionan a pH 8. Sería necesario comprobar la misma combinación de construcciones con un ensayo cuantitativo de la β -galactosidasa, que mide la intensidad de la interacción como resultado de la expresión del gen *lacZ*. No obstante, el único gen positivo del que se ha podido confirmar la interacción mediante retransformación (pasando por *E. coli* y después por levadura) es *At1g70470*.

4.2.4 Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana

4.2.4.1 Construcciones de doble híbrido para proteínas de membrana

En la Figura 22 se muestra el gel de electroforesis de las PCR de las distintas construcciones del sistema de doble híbrido para proteínas de membrana. Se realizaron empleando el plásmido pPR3-C con los genes ya clonados como molde.

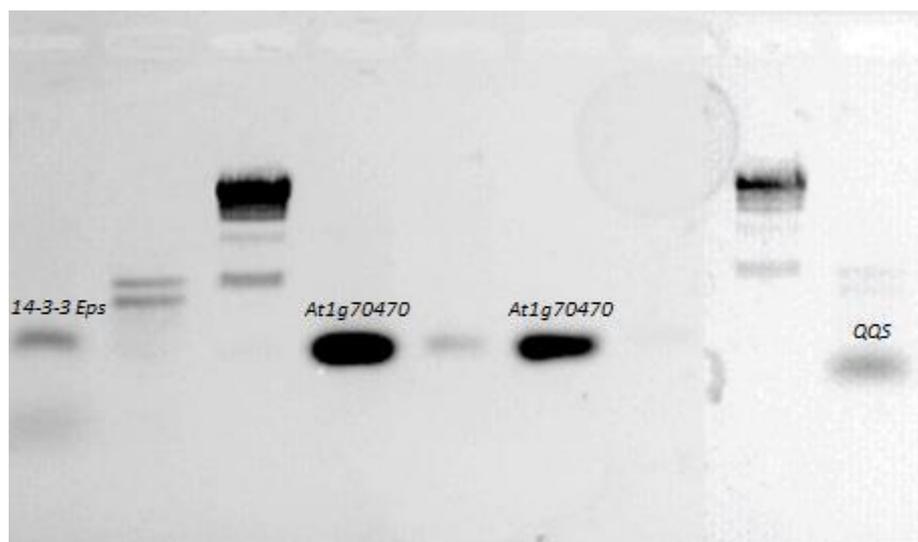


Figura 22. PCR de *14-3-3 Epsilon*, *At1g70470* y *QQS*. Se empleó un oligonucleótido de los genes y otro del plásmido pPR3-C para verificar que los genes estaban clonados en el plásmido correcto y con la orientación adecuada.

4.2.4.2 Controles del ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana

Para verificar el funcionamiento del sistema se probaron los controles negativos, con el plásmido pPR3-C vacío a fin de comprobar que no existía autoactivación (Tabla 4).

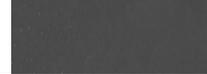
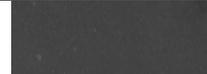
		Control (+A +H +U -W -L)	Condiciones restrictivas (-A +H +U -W -L)
pBT3-C_AHA1 pPR3-C_∅	pH 5.5		
	pH 7*		
	pH 8		

Tabla 4. Control negativo del sistema de doble híbrido para proteínas de membrana. Se comprobó el funcionamiento a pH 5.5, 7 y 8. En cada condición se indican los aminoácidos añadidos al medio SD. *Las placas también contenían X-Gal.

El control negativo con el plásmido pPR3-C vacío demostró que no existía autoactivación. Sin embargo, no fue posible llegar a cotransformar en levadura el plásmido pPR3-C_14-3-3Epsilon, junto con pBT3-C_AHA1, que actuaría como control positivo del sistema (Fuglsang, 1997).

4.2.4.3 Ensayo de doble híbrido con QQS y AHA1

En la Tabla 5 se muestra el ensayo de doble híbrido entre AHA1 y QQS.

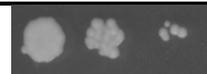
		Control (+A +H +U -W -L)	Condiciones restrictivas (-A +H +U -W -L)
pBT3-C_AHA1 pPR3-C_QQS	pH 5.5		
	pH 7*		
	pH 8		
pBT3-C_AHA1 pPR3-C_At1g70470	pH 5.5		
	pH 7*		

Tabla 5. Ensayo de doble híbrido para proteínas de membrana entre QQS y AHA1. Se comprobó el funcionamiento a pH 5.5, 7 y 8. En cada condición se indican los aminoácidos añadidos al medio SD. *Las placas también contenían X-Gal.

En el caso de la combinación pBT3-C_AHA1 y pPR3-C_QQS, en condiciones restrictivas y a pH 7 se observó crecimiento y desarrollo de color azul en presencia de X-Gal por la expresión del gen reportero *lacZ*, lo cual evidenciaría la interacción entre ambas proteínas.

También se probó la combinación pBT3-C_AHA1 y pPR3-C_At1g70470, sin embargo, a pesar de que se observa crecimiento en condiciones restrictivas, las células fueron crecidas en medio SD sin ninguna suplementación aminoacídica y se observó crecimiento, de manera que

las células no eran de la cepa de levadura THY.AP4. Por tanto, la interacción no pudo ser evaluada y es necesario repetir el ensayo para esta última combinación. Además, para esta combinación tampoco se observó el color rosado que desarrolla la levadura debido a la mutación de la síntesis de adenina. Por tanto, se requiere repetir el ensayo para esta combinación de construcciones.

Además, en todos los casos habría que realizar un ensayo enzimático cuantitativo de la β -galactosidasa para obtener datos más precisos de interacción y poder validar los resultados.

5. CONCLUSIONES

1. El gen huérfano *QQS* inhibe la expresión de las H⁺-ATPasas mayoritarias de membrana plasmática AHA1, AHA2 y AHA3. Este efecto podría estar relacionado con el efecto negativo de *QQS* sobre la acumulación de almidón.
2. El rastreo de doble híbrido en levadura ha identificado la proteína codificada por el gen *At1g70470* como interactora con la proteína codificada por el gen *QQS*. Se trata de una proteína de función desconocida, probablemente de membrana.
3. Utilizando un rastreo de doble híbrido para proteínas de membrana se ha obtenido evidencia preliminar de que *QQS* interactúa con AHA1.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ASHRAF, M. Y WU, L. (1994). Breeding for Salinity Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(1), pp.17-42.
- BISSOLI, G., NIÑOLES, R., FRESQUET, S., PALOMBIERI, S., BUESO, E., RUBIO, L., GARCÍA-SÁNCHEZ, M., FERNÁNDEZ, J., MULET, J. Y SERRANO, R. (2012). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 70(4), pp.704-716.
- BOYER, J. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), pp.443-448.
- BUBLITZ, M., POULSEN, H., MORTH, J. Y NISSEN, P. (2010). In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(4), pp.431-439.
- CAESAR, K., ELGASS, K., CHEN, Z., HUPPENBERGER, P., WITTHÖFT, J., SCHLEIFENBAUM, F., BLATT, M., OECKING, C. Y HARTER, K. (2011). A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 66(3), pp.528-540.
- CAI, J., ZHAO, R., JIANG, H. Y WANG, W. (2008). De Novo Origination of a New Protein-Coding Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 179(1), pp.487-496.
- CAUSIER, B. (2004). Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 23(5), pp.350-367.
- CHEN, Y., HOEHENWARTER, W. Y WECKWERTH, W. (2010). Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment. *The Plant Journal*, p.no-no.
- CHIU, J., BRENNER, E., DESALLE, R., NITABACH, M., HOLMES, T. Y CORUZZI, G. (2002). Phylogenetic and Expression Analysis of the Glutamate-Receptor-Like Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(7), pp.1066-1082.
- CONANT, G. Y WOLFE, K. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*, 9(12), pp.938-950.
- COSGROVE, D. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), pp.321-326.
- DAVIES, D. (1986). The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum*, 67(4), pp.702-706.
- DEPROST, D., YAO, L., SORMANI, R., MOREAU, M., LETERREUX, G., NICOLAÏ, M., BEDU, M., ROBAGLIA, C. Y MEYER, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, 8(9), pp.864-870.
- DUJON, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends in Genetics*, 12(7), pp.263-270.
- FALHOF, J., PEDERSEN, J., FUGLSANG, A. Y PALMGREN, M. (2016). Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*, 9(3), pp.323-337.
- FELLE, H. Y BERTL, A. (1986). Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 848(2), pp.176-182.

- FELLE, H. (2001). pH: Signal and Messenger in Plant Cells. *Plant Biology*, 3(6), pp.577-591.
- FIELDS, S. Y SONG, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), pp.245-246.
- FUGLSANG, A., VISCONTI, S., DRUMM, K., JAHN, T., STENSALLE, A., MATTEI, B., JENSEN, O., ADUCCI, P. Y PALMGREN, M. (1999). Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H⁺-ATPase AHA2 Involves the Three C-terminal Residues Tyr946-Thr-Val and Requires Phosphorylation of Thr947. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), pp.36774-36780.
- GAXIOLA, R., PALMGREN, M. Y SCHUMACHER, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581(12), pp.2204-2214.
- GOFFEAU, A., BARRELL, B., BUSSEY, H., DAVIS, R., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E., MEWES, H., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. Y OLIVER, S. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), pp.546-567.
- GRIFFIN, D. Y ANCHUKAITIS, K. (2014). How unusual is the 2012-2014 California drought? *Geophysical Research Letters*, 41(24), pp.9017-9023.
- HARUTA, M., BURCH, H., NELSON, R., BARRETT-WILT, G., KLINE, K., MOHSIN, S., YOUNG, J., OTEGUI, M. Y SUSSMAN, M. (2010). Molecular Characterization of Mutant *Arabidopsis* Plants with Reduced Plasma Membrane Proton Pump Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), pp.17918-17929.
- HARUTA, M. Y SUSSMAN, M. (2012). The Effect of a Genetically Reduced Plasma Membrane Protonmotive Force on Vegetative Growth of *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 158(3), pp.1158-1171.
- HOERLING, M., EISCHEID, J., PERLWITZ, J., QUAN, X., ZHANG, T. Y PEGION, P. (2012). On the Increased Frequency of Mediterranean Drought. *Journal of Climate*, 25(6), pp.2146-2161.
- IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate*. IPCC. Geneva. 151 pp.
- ITO, H., MURATA, K. Y KIMURA, A. (1984). Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations or Thiol Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(2), pp.341-347.
- JAHN, T. (1997). The 14-3-3 Protein Interacts Directly with the C-Terminal Region of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase. *THE PLANT CELL ONLINE*, 9(10), pp.1805-1814.
- KHALTURIN, K., HEMMRICH, G., FRAUNE, S., AUGUSTIN, R. Y BOSCH, T. (2009). More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? *Trends in Genetics*, 25(9), pp.404-413.
- KINOSHITA, T. Y HAYASHI, Y. (2011). New Insights into the Regulation of Stomatal Opening by Blue Light and Plasma Membrane H⁺-ATPase. *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp.89-115.
- KREBS, M., BEYHL, D., GORLICH, E., AL-RASHEID, K., MARTEN, I., STIERHOF, Y., HEDRICH, R. Y SCHUMACHER, K. (2010). *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient

- storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), pp.3251-3256.
- LATZ, A., IVASHIKINA, N., FISCHER, S., ACHE, P., SANO, T., BECKER, D., DEEKEN, R. Y HEDRICH, R. (2006). In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca²⁺-sensitive inward rectifying K⁺ channel. *Planta*, 225(5), pp.1179-1191.
- LEBAUDY, A., VÉRY, A. Y SENTENAC, H. (2007). K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters*, 581(12), pp.2357-2366.
- LI, L., FOSTER, C., GAN, Q., NETTLETON, D., JAMES, M., MYERS, A. Y WURTELE, E. (2009). Identification of the novel protein QQS as a component of the starch metabolic network in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, 58(3), pp.485-498.
- LI, L. Y WURTELE, E. (2014). The QQS orphan gene of *Arabidopsis* modulates carbon and nitrogen allocation in soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 13(2), pp.177-187.
- LI, L., ZHENG, W., ZHU, Y., YE, H., TANG, B., ARENDSEE, Z., JONES, D., LI, R., ORTIZ, D., ZHAO, X., DU, C., NETTLETON, D., SCOTT, M., SALAS-FERNANDEZ, M., YIN, Y. Y WURTELE, E. (2015). QQS orphan gene regulates carbon and nitrogen partitioning across species via NF-YC interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), pp.14734-14739.
- LONG, M., BETRÁN, E., THORNTON, K. Y WANG, W. (2003). The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nature Reviews Genetics*, 4(11), pp.865-875.
- MARTINOIA, E., MAESHIMA, M. Y NEUHAUS, H. (2006). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 58(1), pp.83-102.
- MATHIEU, Y., LAPOUS, D., THOMINE, S., LAURIÈRE, C. Y GUERN, J. (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta*, 199(3).
- MATSUMURA, Y., IWAKAWA, H., MACHIDA, Y. Y MACHIDA, C. (2009). Characterization of genes in the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *The Plant Journal*, 58(3), pp.525-537.
- MONROE, J., STORM, A., BADLEY, E., LEHMAN, M., PLATT, S., SAUNDERS, L., SCHMITZ, J. Y TORRES, C. (2014). -Amylase1 and -Amylase3 Are Plastidic Starch Hydrolases in *Arabidopsis* That Seem to Be Adapted for Different Thermal, pH, and Stress Conditions. *PLANT PHYSIOLOGY*, 166(4), pp.1748-1763.
- MORTH, J., PEDERSEN, B., BUCH-PEDERSEN, M., ANDERSEN, J., VILSEN, B., PALMGREN, M. Y NISSEN, P. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), pp.60-70.
- NACIONES UNIDAS. (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. United Nations. New York. 61 pp.
- NÉMETH, K., SALCHERT, K., PUTNOKY, P., BHALERAO, R., KONCZ-KALMAN, Z., STANKOVIC-STANGELAND, B., BAKO, L., MATHUR, J., OKRESZ, L., STABEL, S., GEIGENBERGER, P., STITT, M., REDEI, G., SCHELL, J. Y KONCZ, C. (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 12(19), pp.3059-3073.

- NIÑOLES, R., RUBIO, L., GARCÍA-SÁNCHEZ, M., FERNÁNDEZ, J., BUESO, E., ALEJANDRO, S. Y SERRANO, R. (2013). A dominant-negative form of *Arabidopsis* AP-3 β -adaptin improves intracellular pH homeostasis. *The Plant Journal*, 74(4), pp.557-568.
- OBRDLIK, P., EL-BAKKOURY, M., HAMACHER, T., CAPPELLARO, C., VILARINO, C., FLEISCHER, C., ELLERBROK, H., KAMUZINZI, R., LEDENT, V., BLAUDEZ, D., SANDERS, D., REVUELTA, J., BOLES, E., ANDRE, B. Y FROMMER, W. (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), pp.12242-12247.
- PALMGREN, M.G., SOMMARIN, M., SERRANO, R., Y LARSSON, C. (1991). Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 266:20470– 20475.
- PALMGREN, M. (1995). Metabolic Modulation of Transport Coupling Ratio in Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), pp.19659-19667.
- PEDERSEN, B., BUCH-PEDERSEN, M., PREBEN MORTH, J., PALMGREN, M. Y NISSEN, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450(7172), pp.1111-1114.
- PLANES, M., NIÑOLES, R., RUBIO, L., BISSOLI, G., BUESO, E., GARCIA-SANCHEZ, M., ALEJANDRO, S., GONZALEZ-GUZMAN, M., HEDRICH, R., RODRIGUEZ, P., FERNANDEZ, J. Y SERRANO, R. (2014). A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase and decreased cytosolic pH, K⁺, and anions. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), pp.813-825.
- RAYLE, D. Y CLELAND, R. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *PLANT PHYSIOLOGY*, 99(4), pp.1271-1274.
- ROMAN, H. (1981). The Molecular Biology of the Yeast. *Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor. New York. pp. 653-654
- RUBIN, G. (2000). Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science*, 287(5461), pp.2204-2215.
- SÁEZ, A., RODRIGUES, A., SANTIAGO, J., RUBIO, S. Y RODRIGUEZ, P. (2008). HAB1-SWI3B Interaction Reveals a Link between Abscisic Acid Signaling and Putative SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(11), pp.2972-2988.
- SCHUMACHER, K. (2014). pH in the plant endomembrane system—an import and export business. *Current Opinion in Plant Biology*, 22, pp.71-76.
- SCOTT, A. (1999). Changes in Cytosolic pH within *Arabidopsis* Root Columella Cells Play a Key Role in the Early Signaling Pathway for Root Gravitropism. *PLANT PHYSIOLOGY*, 121(4), pp.1291-1298.
- SERRANO, R. (1985). *Membrane potentials and active transport in Plants and Fungi. Plasma membrane ATPase of Plants and Fungi*. CRC Press, Inc. Florida. pp.31-78.
- SERRANO, R. (1996). Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and Defense Responses. *International Review of Cytology*, pp.1-52.
- SMITH, F. Y RAVEN, J. (1979). Intracellular pH and its Regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 30(1), pp.289-311.

- SNIDER, J., KITTANAKOM, S., CURAK, J. Y STAGLIAR, I. (2010). Split-Ubiquitin Based Membrane Yeast Two-Hybrid (MYTH) System: A Powerful Tool For Identifying Protein-Protein Interactions. *Journal of Visualized Experiments*, (36).
- SOLOW, S., SENGBUSCH, J. Y LAIRD, M. (2008). Heterologous Protein Production from the Inducible MET25 Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 21(2), pp.617-620.
- SOPKO, R., HUANG, D., PRESTON, N., CHUA, G., PAPP, B., KAFADAR, K., SNYDER, M., OLIVER, S., CYERT, M., HUGHES, T., BOONE, C. Y ANDREWS, B. (2006). Mapping Pathways and Phenotypes by Systematic Gene Overexpression. *Molecular Cell*, 21(3), pp.319-330.
- SUN, J., CHEN, S., DAI, S., WANG, R., LI, N., SHEN, X., ZHOU, X., LU, C., ZHENG, X., HU, Z., ZHANG, Z., SONG, J. Y XU, Y. (2009). Ion flux profiles and plant ion homeostasis control under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 4(4), pp.261-264.
- TAUTZ, D. Y DOMAZET-LOŠO, T. (2011). The evolutionary origin of orphan genes. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), pp.692-702.
- THALER, D. (1988). DNA Double-Chain Breaks In Recombination Of Phage Lambda And Of Yeast. *Annual Review of Genetics*, 22(1), pp.169-197.
- TURKINA, M., KLANG ÅRSTRAND, H. Y VENER, A. (2011). Differential Phosphorylation of Ribosomal Proteins in *Arabidopsis thaliana* Plants during Day and Night. *PLoS ONE*, 6(12), p.e29307.
- VAN LEEUWEN J, ANDREWS B, BOONE C, TAN G. (2015) Rapid and Efficient Plasmid Construction by Homologous Recombination in Yeast. Cold Spring Harbor Protocols. pdb.prot085100
- VAN WEERT, A.W., GEUZE, H.J. Y STOOORVOGEL, W. (1997). Heterogeneous behavior of cells with respect to induction of retrograde transport from the trans-Golgi network to the Golgi upon inhibition of the vacuolar proton pump. *European journal of cell biology*, 74: 417-423.
- VERSCHURE, P., VISSER, A. Y ROTS, M. (2006). Step out of the Groove: Epigenetic Gene Control Systems and Engineered Transcription Factors. *Advances in Genetics*, pp.163-204.
- WHEELER, T. Y VON BRAUN, J. (2013). Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science*, 341(6145), pp.508-513.
- WINZELER, E. (1999). Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*, 285(5429), pp.901-906.
- WYN JONES RG, POLLARD A. (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. In: Laüchli A, Pirson A, eds. *Encyclopedia of plant physiology*, New series, Vol. 15B. Berlin: Springer, pp.528–562.
- YANCEY, P., CLARK, M., HAND, S., BOWLUS, R. Y SOMERO, G. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), pp.1214-1222.
- YIN, Y. AND FISCHER, D. (2008). Identification and investigation of ORFans in the viral world. *BMC Genomics*, 9(1), p.24.
- ZHEN, R., KIM, E. Y REA, P. (1997). The Molecular and Biochemical Basis of Pyrophosphate-Energized Proton Translocation at the Vacuolar Membrane. *Advances in Botanical Research*, pp.297-337.