

# TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

Curso 2018-2019

## Caracterización de los factores de transcripción que regulan la expresión de *AHA2* en *Arabidopsis thaliana*



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Autora: Mireia Usó Agost  
Tutor: Eduardo Bueso Ródenas  
Cotutor: Gaetano Bissoli

Tipo Licencia: Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”



València, Julio 2019

## RESUMEN

QQS es un gen huérfano que tiene un papel relevante en el metabolismo del almidón incrementando el ratio nitrógeno/carbono, un rasgo agronómicamente muy interesante que se puede conseguir sobreexpresando QQS en arroz, soja y maíz (Li et al., 2009, Li et al., 2015). Además, QQS está relacionado con la protón ATPasa de la membrana plasmática (en *Arabidopsis*, AHA), responsable del crecimiento celular y la toma de nutrientes. Micromatrices de pérdida de función de las dos principales isoformas de AHA, *aha1-6* y *aha2-4*, muestran niveles bajos de mRNA de QQS (Haruta et al., 2012). Una posterior publicación asigna a QQS la tarea de facilitar la entrada al interior del núcleo el factor de transcripción NF-YC4. Este pertenece a la familia NF-YCs, los cuales se comportan como inhibidores transcripcionales de la bomba de protones. Posteriormente, analizando las secuencias de zonas promotoras de los AHAs se pone de manifiesto que AHA2 tiene 5 cajas CCAAT típicas de los NF-Ys, mientras que AHA1 tiene solo un par de ellas. El análisis de expresión mediante qRT-PCR de líneas de ganancia de función de QQS y NF-YC4 (NF-YC4 OE) muestran inhibición específica de la expresión del gen AHA2. En las mismas condiciones, la pérdida de función de QQS y el triple mutante *nf-yc3,4,9* tienen aumentadas su expresión. El factor de activación clave de ese gen se llama PTM, que procede de la pared del cloroplasto y reconoce una región de 63 pares de bases. El análisis de expresión del mutante *ptm2* (At5g22760), un gen de la familia del ya descrito PTM, muestra una expresión reducida de AHA2, mientras que en líneas constitutivas con una versión truncada muestran sobreexpresión de la misma. Todo esto, nos ha llevado a comprobar si PTM2 reconoce la caja del promotor AHA2 mediante un ensayo de One Hybrid en levadura.

**Palabras clave:** H<sup>+</sup>-ATPasa (AHA2), QQS, PTM2, NF-YC, Yeast One-Hybrid.

## ABSTRACT

QQS is a gene that has a relevant role in the starch metabolism by increasing the nitrogen / carbon ratio, an agronomically interesting feature that can be reached by overexpressing QQS in rice, soybeans and corn (Li et al., 2009, Li et al., 2015) . In addition, QQS is related to the proton ATPase of the plasma membrane (in *Arabidopsis*, AHA), responsible for cell growth and nutrient intake. Microarrays of loss of function of the two main isoforms of AHA, *aha1-6* and *aha2-4*, show low levels of QQS mRNA (Haruta et al., 2012). A subsequent publication assigns to QQS the task of facilitating the entry into the core of the transcription factor NF-YC4. This is a member of the NF-YCs family, which behave as transcriptional inhibitors of the proton pump. Subsequently, analyzing the sequences of the AHAs promoters, it is revealed that AHA2 has 5 CCAAT boxes typical of the NF-Ys, while AHA1 has only a couple of them. qRT-PCR expression analysis of QQS and NF-YC4 function gain lines (NF-YC4 OE) indicates specific inhibition of AHA2 gene expression. Under the same conditions, the loss of the QQS function and the triple mutant *nf-yc3,4,9* have increased expression. The activation factor of that gene is called PTM, which is derived from the reduction of chloroplast and a region of 63 base pairs is recognized. The analysis of the expression of the mutant *ptm2* (At5g22760), a gene of the family of the already described PTM, shows a reduced expression of AHA2, while in the constitutive lines with a truncated version show the overexpression of AHA2. Because of that, we are checking if PTM2 recognizes the AHA2 promoter box by means of a One Hybrid test in yeast.

**Keywords:** H<sup>+</sup>-ATPase (AHA2), QQS, PTM2, NF-YC, Yeast One-Hybrid.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Gaetano, por enseñarme tantísimas cosas en el laboratorio, por contagiarme la pasión por la biología molecular y por nunca dejar de creer en mí.

A Edu, por ayudarme hasta el último día tanto con este trabajo como con mis decisiones profesionales.

A Joan y a todos los demás con los que he compartido laboratorio por la ayuda, los ánimos y el buen ambiente de trabajo.

A mi familia y a todos mis amigos, en especial a Nerea y a Sergi, por su apoyo más incondicional y sincero.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. AHA2 (Autoinhibited H<sup>+</sup>-ATPase)</b> .....	1
1.1.1. Funciones fisiológicas.....	2
<b>1.2. Factores de regulación de AHA a nivel postraduccional</b> .....	3
<b>1.3. Factores de regulación de AHA a nivel transcripcional</b> .....	4
1.3.1. NF-YC.....	4
1.3.2. QQS.....	5
1.3.3. PTM2.....	6
<b>1.4. One Hybrid</b> .....	7
<b>1.5. Antecedentes</b> .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
<b>3.1. Material biológico</b> .....	10
3.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
3.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	10
3.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
<b>3.2. Vectores de clonación</b> .....	11
<b>3.3. Manipulación y crecimiento de <i>E. Coli</i></b> .....	14
3.3.1. Preparación de <i>E. coli</i> competentes y transformación.....	15
<b>3.4. Manipulación y crecimiento de <i>S. cerevisiae</i></b> .....	15
3.4.1. Preparación de <i>S. cerevisiae</i> competentes y transformación.....	15
<b>3.5. Medios de cultivo</b> .....	15
3.5.1. Murashige y Skoog (MS) y solución nutritiva.....	15
3.5.2. Luria-Bertani (LB).....	16
3.5.3. SOC (Super Optimal Broth).....	16
3.5.4. YPDA (Yeast extract-Peptone Dextrosa Adenina).....	16
3.5.5. Medio sintético SD.....	16
<b>3.6. Primers</b> .....	17
<b>3.7. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</b> .....	18
<b>3.8. Extracción RNA, conversión a cDNA y qRT-PCR</b> .....	18
<b>3.9. Electroforesis</b> .....	19
<b>3.10. Recombinación</b> .....	19
<b>3.11. Minipreparaciones de plásmidos</b> .....	19
<b>3.12. Digestiones</b> .....	19
<b>3.13. Ligaciones</b> .....	20
<b>3.14. Secuenciación</b> .....	20
<b>3.15. One Hybrid</b> .....	20

3.15.1. Construcción PTM2 y transformación en levadura THY.AP4.....	20
3.15.2. Construcción promotor AHA2 y transformación Y187.....	21
3.15.3. Ensayo Yeast One-Hybrid (Y1H).....	21
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Regulación de AHA2 por NF-YC y QQS.....</b>	<b>22</b>
4.1.1. Cuantificación de la expresión de AHA1, AHA2 y AHA3.....	22
4.1.2. Cuantificación de la expresión de AHA1, AHA2 en condiciones de ayuno y tras tratamiento con sacarosa.....	23
<b>4.2. Regulación de AHA2 por PTM2.....</b>	<b>24</b>
4.2.1. Expresión de AHA2 en mutantes de PHD.....	24
4.2.2. Clonaje de promotor de AHA2 en pHIPPIE y pHIS2.....	25
4.2.3. Clonaje de PTM2 en pGADT7-GW.....	26
4.2.4. Yeast One-Hybrid (Y1H).....	29
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1. Regulación negativa de AHA2.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2. Regulación positiva de AHA2.....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Esquema de la H <sup>+</sup> -ATPasa.....	1
<b>Figura 2</b> Formación del complejo de los NF-YA, B y C según Myers & Holt, 2018.....	5
<b>Figura 3</b> Modelo de inducción de QQS según Li et al., 2015.....	6
<b>Figura 4</b> Componentes del ensayo Y1H.....	7
<b>Figura 5</b> Esquema del plásmido pDONR/Zeo.....	11
<b>Figura 6</b> Esquema del plásmido pGEM®-T Easy.....	12
<b>Figura 7</b> Esquema del plásmido pHIS2.....	13
<b>Figura 8</b> Esquema del mecanismo de integración de pHIPPIE en el genoma de levadura.....	13
<b>Figura 9</b> Esquema del plásmido pGADT7-GW con los sitios de restricción.....	14
<b>Figura 10</b> qRT-PCR de AHA1,2 y 3.....	22
<b>Figura 11</b> qRT-PCR de AHA1 y 2 tras tratamiento con sacarosa.....	23
<b>Figura 12</b> qRT-PCR de AHA2 con líneas mutantes de PTM.....	24
<b>Figura 13</b> Gel de electroforesis tras digerir y tratar los vectores con fosfatasa alcalina.....	25
<b>Figura 14A.</b> Gel de electroforesis de la PCR para comprobar el sentido del inserto en pHIPPIE y PHIS2.....	26
<b>Figura 14B.</b> Gel de electroforesis de comprobación de la integración del vector pHIPPIE en el genoma de levadura.....	26
<b>Figura 15A.</b> Reacción BP.....	27
<b>Figura 15B.</b> Electroforesis en gel de agarosa de la digestión parcial del plásmido pDONR/Zeo con el gen PTM.....	27
<b>Figura 16A.</b> Reacción Gateway LR entre el vector pDONR/Zeo y el pGADT7-GW.....	28
<b>Figura 16B.</b> Gel de agarosa de la digestión con HindIII y EcoRV de pGADT7 de <i>E.Coli</i> transformadas.....	28
<b>Figura 17</b> Ensayo final del Y1H.....	30

## Índice de abreviaturas

H<sup>+</sup>-ATPasa, AHA2: protón ATPasa  
SOS1: Salt Overly Sensitive 1  
QQS : Qua Quine Starch  
NF: Nuclear Factor  
PHD: Plant Homeodomain  
FLC: FLOWERING LOCUS C  
CO: CONSTANS  
Y1H: Yeast One-Hybrid  
AD: Activation Domain  
BD: Binding Domain  
MCS: MultiCloning Site  
PCR: Polymerase Chain reaction  
qRT-PCR: Quantitative Real Time PCR



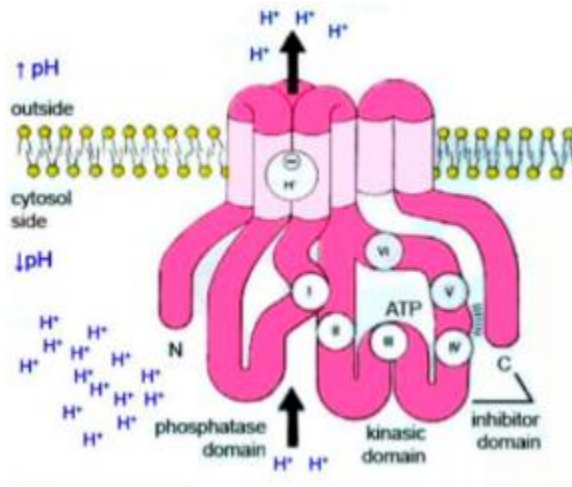
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1.AHA2 (Autoinhibited H<sup>+</sup>-ATPase)

La protón ATPasa (H<sup>+</sup>-ATPasa) es una proteína transmembrana que funciona como bomba de exportación de protones (Duby & Boutry, 2008). Esta ATPasa crea un gradiente electroquímico de protones que conduce a la toma de nutrientes y regula el crecimiento mediante la modulación del pH intracelular (neutro/básico) y extracelular (ácido). (**Figura 1**) (Morsomme & Boutry, 2000).

La H<sup>+</sup>-ATPasa pertenece a la extensa familia de las ATPasas P. En *Arabidopsis* hay 11 isoformas de H<sup>+</sup>-ATPasas, llamadas desde AHA1 a AHA11 (Yuan et al., 2017), las cuales suelen expresarse en tipos celulares específicos. Un ejemplo es AHA3, con gran importancia en el desarrollo del polen (Robertson et al., 2004). No obstante AHA1 y AHA2 son las H<sup>+</sup>-ATPasas más expresadas en toda la planta. Estas dos participan en la señalización celular modificando el pH citosólico cuando hay estrés abiótico y biótico.

Estas dos isoformas son las más importantes ya que el doble mutante de estas no es viable. Por otra parte, mutantes simples de cada una de las isoformas (*aha1-6* y *aha 2-4*) inducen la expresión del mismo gen, QQS (Qua Quine Starch) (Haruta & Sussman, 2012).



**Figura 1.** Estructura de la H<sup>+</sup>-ATPasa. La H<sup>+</sup>-ATPasa en un estado poco activo donde expulsa al apoplasto un limitado número de protones manteniendo un pH citosólico ligeramente alcalino (7,25).

Se conoce que esta proteína de membrana está codificada por aproximadamente 10 genes, aunque difiere según las especies (Morsomme & Boutry, 2000).

AHA2 está constituida por 948 residuos de aminoácidos, los cuales se pliegan de manera que conforman 10 segmentos en forma de alfa hélice hidrofóbicas (**Figura 1**). La actividad catalítica se encuentra en la parte citoplasmática (dominios A, N y P) donde además hay dos dominios terminales hidrofóbicos que participan en la regulación. El dominio C-terminal, de unos 100 residuos aproximadamente, inhibe la bomba de protones interfiriendo con estos dominios catalíticos. (Palmgren et al., 1991). Dependiendo de los dominios terminales, la H<sup>+</sup>-ATPasa estará en dos estados: autoinhibido, donde la hidrólisis de ATP y el transporte de H<sup>+</sup> están acoplados débilmente, e inducido, donde esta hidrólisis de ATP y transporte de H<sup>+</sup> están fuertemente acoplados (Falhof et al., 2016).

Además de en el transporte activo de protones y el consecuente transporte de otros compuestos, esta proteína participa en muchas otras funciones esenciales para las plantas.

### **1.1.1. Funciones fisiológicas** (Morsomme & Boutry, 2000)

#### **-Transporte secundario**

La H-ATPasa es la activadora principal del transporte secundario (transportadores y canales) ya que genera el gradiente electroquímico necesario para poder absorber los compuestos que la célula necesita a través de la membrana plasmática. La mayoría de estos sistemas son de simporte, como en el caso de la toma de potasio por canales tipo Shaker, aunque también encontramos antiportadores como el de H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> tipo SOS1 (Falhof et al., 2016).

#### **-Salinidad**

La sal es tóxica para las plantas, y por ello, estas han desarrollado varios mecanismos para evitar su acumulación utilizando los transportadores secundarios.

Las plantas no tienen bombas de Na<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa como tienen los animales, aunque las células vegetales sean más sensibles a la salinidad del medio que los animales. Sin embargo, las plantas sí son capaces de expulsar al medio el Na<sup>+</sup> mediante antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (SOS1 en *Arabidopsis*), que dependen directamente del gradiente que genera la H<sup>+</sup>ATPasa a través de la membrana plasmática.

La compartimentalización y la extrusión (expulsión) de los iones tóxicos como las sales, en la vacuola se produce como respuesta a la acumulación de estos mismos iones en el citosol.

### **-Apertura de estomas**

Los estomas son unos pequeños orificios que se encuentran en las hojas de las plantas y son los responsables del intercambio de gases ( $O_2$ ,  $CO_2$  y  $H_2O$ ). Están rodeados por dos células oclusivas, que controlan la apertura de los orificios mediante los cambios en su turgencia regulados a su vez por la hiperpolarización de la membrana plasmática y la acidificación del medio extracelular por parte de la  $H^+$ -ATPasa (Ilan, 1994). La función de la  $H^+$ -ATPasa es proporcionar el potencial electroquímico necesario para el movimiento de los iones a través de las membranas y controlar la apertura y cierre de los canales de iones (como el de  $Na^+$ ), lo cual explica porqué la  $H^+$ -ATPasa está altamente expresada en estas células que rodean los estomas.

### **-Regulación pH intracelular y elongación celular**

La teoría del crecimiento ácido dicta que los protones expulsados por la  $H^+$ -ATPasa bajan el pH del apoplasto. Esto provoca que se debiliten los puentes de hidrógeno de las microfibrillas de la pared celular vegetal y que se desplacen por la presión intracelular aumentando el volumen celular, por lo que la activación de la  $H^+$ -ATPasa promueve la elongación de las células y consecuentemente el crecimiento de la planta (Duby & Boutry, 2008). Además de esto, la acidificación del apoplasto induce también la toma de  $K^+$  por la hiperpolarización de la membrana, lo cual produce cambios osmóticos permitiendo que haya un flujo de agua a través de las acuaporinas, favoreciendo la elongación celular (Morsomme & Boutry, 2000).

## **1.2. FACTORES DE REGULACIÓN DE AHA A NIVEL POSTRADUCCIONAL**

Las modificaciones post-traduccionales como las fosforilaciones tienen un papel muy importante en muchos tipos de funciones celulares. Se conoce que alrededor de un tercio de todas las proteínas de eucariotas se fosforilan en algún momento para regular su actividad, estabilidad u organización espacial. Las fosforilaciones son un paso clave en la transducción de señales por cascada y son mediadas por kinasas (Rudashevskaya et al., 2011).

En general, hay varios sitios de activación e inhibición por fosforilación, que dependen principalmente del extremo C-terminal y de la posición donde se dan estas fosforilaciones (Falhof et al., 2016). No obstante, no todos los sitios de fosforilación están determinados.

Según la literatura (Haruta et al., 2018), hay varias fosforilaciones en la H<sup>+</sup>-ATPasa, no obstante, la más estudiada ha sido la del penúltimo residuo, en la Treonina 947 (Thr-947). Esta fosforilación estabiliza la H<sup>+</sup>-ATPasa creando un sitio de unión para proteínas 14-3-3, que se unen fuertemente a otras proteínas para estabilizar estructuras proteicas (Rosenquist et al., 2000).

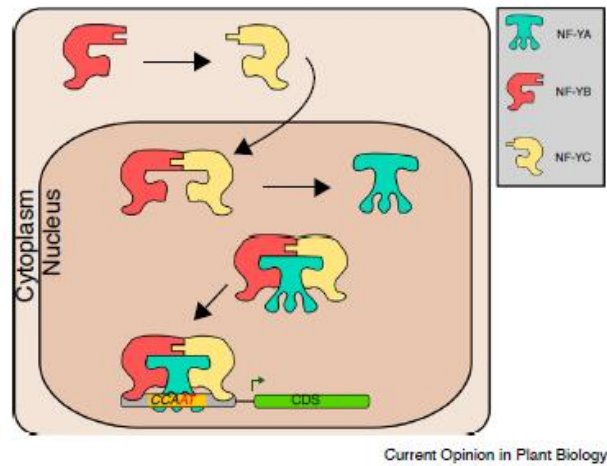
A pesar de que existen muchos estudios de regulación postraducciona de AHA2, a nivel de regulación transcripcional no existe apenas literatura.

### **1.3. FACTORES DE REGULACIÓN DE AHA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL**

#### **1.3.1. NF-YC**

Los “Nuclear Factor-Y” (NF-Y) están involucrados en muchos aspectos de la fisiología de las plantas como en el tiempo de floración o en la respuesta al estrés (Myers & Holt, 2018). Estos NF-Y son subunidades de 3 familias proteicas distintas altamente conservadas en eucariotas (Kumimoto et al., 2010): NF-YA, NF-YB y NF-YC. Se conoce que estos tres factores forman un complejo heterotrimérico que reconoce la secuencia consenso CCAAT de la zona promotora de los genes que regula y se une a ella. No obstante, hay más proteínas o complejos proteicos que se unen a estas cajas CCAAT, es decir, que hay otros factores que contribuyen a la unión de los NF-Y. El factor NF-YA es el que reconoce la secuencia y se une a ella y los NF-YB y NF-YC tienen unos dominios específicos de unión entre ellos y con la tercera subunidad de NF-YA (**Figura 2**).

Según Kumimoto et al., 2010, NF-YC3, NF-YC4 y NF-YC9 interactúan con CONSTANS, un factor de transcripción que regula el tiempo de floración. CONSTANS interactúa con estos NF-YC para activar al FLOWERING LOCUS T (FT), provocando la reducción del tiempo de floración. Estos tres NF-YC también están relacionados con la señalización de fitohormonas como el ácido abscísico y las giberelinas (Myers & Holt, 2018).



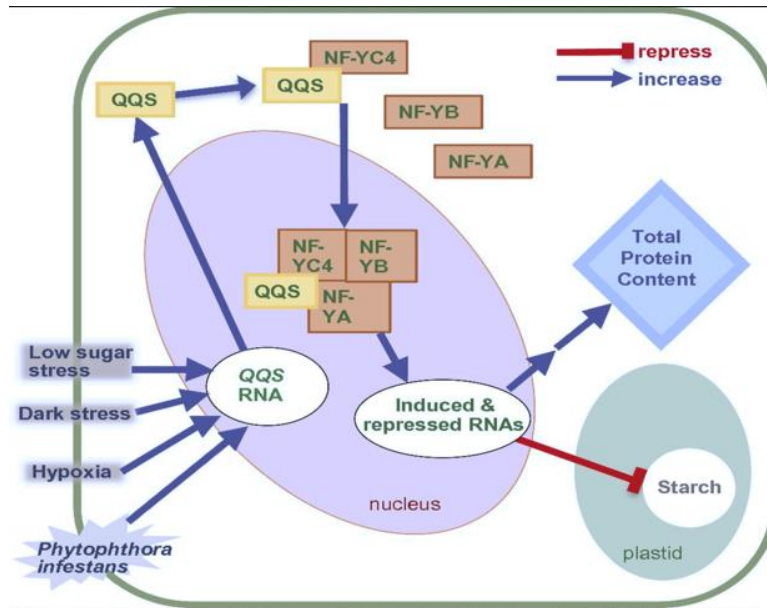
**Figura 2.** Formación del complejo de los NF-YA, B y C según Myers & Holt, 2018. La unión de los NF-YB y NF-YC ocurre en el citoplasma y seguidamente este complejo entra en el núcleo para unirse a su vez con NF-YCA. Así, estos tres factores reconocen las secuencias CCAAT de los genes a regular.

### 1.3.2. QQS

El gen Qua-Quine Starch (QQS) es un gen huérfano, es decir, que solo se encuentra en una especie, en este caso *Arabidopsis thaliana*, cuya función se relaciona con la inhibición de la síntesis de almidón. La sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis* aumenta el contenido total proteico de la célula y disminuye el de almidón.

QQS incrementa el ratio nitrógeno/carbono, un rasgo agronómicamente muy interesante que se puede conseguir sobreexpresándolo en arroz, soja y maíz (Li et al., 2009, Li et al., 2015).

En Li et al., 2015 se demostró, aunque no se conoce el mecanismo molecular todavía, que QQS, que se encuentra en el citosol, interacciona con el factor NF-YC4 formando un complejo que se desplaza al núcleo y modula la expresión de diferentes genes, dado que en ausencia de QQS, NF-YC4 no realiza su tarea específica (**Figura 3**).



**Figura 3.** Modelo de inducción de QQS según Li et al., 2015. El QQS citosólico forma un complejo con NF-YC4, se desplaza al núcleo y modula la expresión de diferentes genes.

### 1.3.3. PTM2

PTM es un factor de transcripción del tipo PHD (“plant homeodomain”) con dominios transmembrana del cloroplasto que reconoce una región de 63 pares de bases y se activa por la rotura proteolítica transmitiendo múltiples señales retrógradas hacia el núcleo. Los “PHD zinc fingers” son estructuras conservadas en proteínas que modifican la cromatina, así como también median interacciones moleculares en la transcripción de genes (Sanchez & Zhou, 2011).

Se sabe que PTM libera su fragmento N-terminal para asociarse con la cromatina y suprimir la transcripción del FLOWERING LOCUS C (FLC). Esto en definitiva hace que la planta florezca antes, ya que el FLC es un represor de la floración. Además el promotor de FLC tiene una caja muy parecida a la que tiene AHA2 (Feng et al., 2016).

El gen At5g22760 también es un gen de la familia de los PHD pero que no está descrito. En este trabajo se denomina PTM2 por la similitud con el gen PTM.

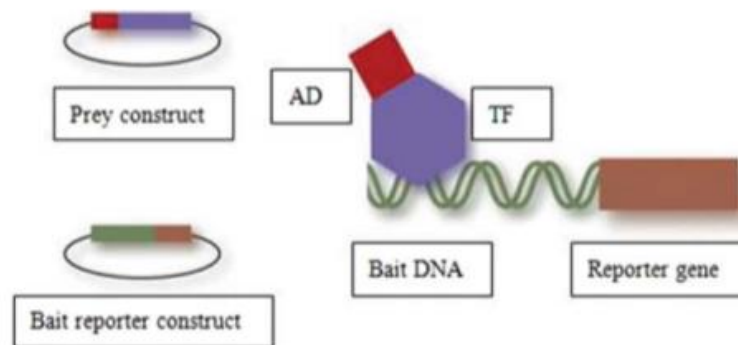
## 1.4. YEAST ONE-HYBRID (Y1H)

La “yeast one-hybrid” (Y1H) es una técnica derivada de la “yeast two-hybrid” que sirve para analizar interacciones DNA-proteína gracias a la expresión de genes reporteros. En este sistema, se detectan interacciones en sistemas eucariotas, lo que permite el estudio de factores de transcripción en animales y en plantas. Estos factores de transcripción se conforman normalmente de dos dominios: uno que se une al DNA (DNA-binding domain o BD) y otro que activa la transcripción (activation domain o AD) (Sun et al., 2011).

El sistema Y1H está formado por dos componentes (**Figura 4**, Sun et al., 2011): la “presa” (prey) y el “cebo” (bait). La llamada “presa” es la proteína híbrida que se forma con nuestra proteína de interés conjugada con el factor GAL4, y el “cebo” será el DNA al que se unirá la “presa”, que en caso de que esta interacción ocurra, expresará el gen reportero.

Ambos componentes están codificados en dos vectores diferentes que se introducirán en una misma levadura. Entonces si nuestro factor de transcripción codificado en un vector, se une al DNA codificado por el otro vector, el AD inducirá la expresión de la proteína reportera. Cabe señalar que esta técnica solo nos informará de si ocurre la interacción de la proteína con el DNA, no de si este factor es activador o inhibidor, ya que el AD de la levadura activa igualmente al gen reportero.

Las cepas utilizadas de levaduras para este ensayo pueden tener varias mutaciones en genes auxotróficos. Los más comunes son el triptófano (*trp1*), la leucina (*leu2*), la histidina (*his3*) y el uracilo (*ura3*), así como el gen *lacZ*, que también se usa para seleccionar las colonias con las construcciones deseadas mediante los fenotipos según los medios de selección.



**Figura 4.** Componentes del ensayo Y1H. Arriba se ve el plásmido presa que da como producto el factor de transcripción de interés (TF) unido al dominio de activación (AD). Abajo, el vector que da lugar al DNA de estudio y el gen reportero que se expresará en el caso de que esta interacción TF-DNA ocurra.

## **1.5. ANTECEDENTES**

Buscando indicios de la regulación de la H<sup>+</sup>ATPasa por factores de transcripción, se probaron los miembros de la familia PHD, entre los cuales solo el At5g22760 parecía regular la expresión. FLC es regulado por PTM, por lo que es posible que haya una interacción con la caja de este gen, y se sabe que el promotor de FLC tiene una caja muy parecida a la que tiene AHA2 (Feng et al., 2016).

A este gen se le denominó PTM2, por su similitud con el ya descrito PTM (Sun et al., 2011).



## 2. OBJETIVOS

**Objetivo general:** estudiar factores de transcripción que puedan regular la expresión de AHA2.

**Objetivos específicos:**

- Estudiar la expresión de AHA2 en mutantes de pérdida de función *ptm2* para conocer si es un activador o inhibidor de AHA2.
- Comprobar si existe interacción directa entre este factor PTM2 y el promotor AHA2.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1. *Arabidopsis Thaliana*

Para estos ensayos, se utilizó el ecotipo Columbia 0 (Col-0) de la planta *Arabidopsis thaliana*. El triple mutante de *Arabidopsis nf-yc3,4,9* ha sido concedido por el laboratorio de Ben F. Holt III (Kunimoto et al., 2010). La pérdida de función (de microRNA artificial) amiQQS viene del laboratorio de Wurtele (Li et al., 2009). La sobreexpresión de NF-YC4 viene de la colección de factores de transcripción TRANSPLANTA (Coego et al., 2014) y pedida con los códigos N2102545 y TPT\_5.63470.1A al NASC (Nottingham, UK). Siempre se pidieron del NASC la línea de pérdida de función *ptm* (At5g35210), en concreto pedimos la línea N666425 correspondiente a SALK\_073799C (homocigota). La línea de pérdida de función *ptm2* (At5g22760) identificada como N843295 y SAIL\_1170\_D01 (homocigota).

Para el cultivo in vitro de las semillas, se utilizaron placas del medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962), se sellaron con cinta micropore y crecieron a 23°C en condiciones de día largo.

Tanto el factor de transcripción PTM2 como el fragmento del promotor de *AHA2* clonados para el ensayo Y1H provienen del transcriptoma y del genoma de *Arabidopsis thaliana* respectivamente.

#### 3.1.2. *Escherichia Coli*

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia Coli* para manejar los genes clonados en distintos vectores plasmídicos.

#### 3.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Para el ensayo de Y1H se han utilizados dos cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* cada una con una construcción y luego gracias a los determinantes mating MAT $\alpha$  y MATa se ha conseguido juntarlas para obtener la copresencia de la construcción cebo y presa en levadura diploide Y187 y THY.AP4.

La Y187 es un MAT $\alpha$  que presenta el siguiente genotipo: *ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , met-, gal80 $\Delta$ , MEL1, URA3::GAL1UAS- GAL1TATA-lacZ*. Debido a estas mutaciones, la cepa incluye las siguientes auxotrofías: triptófano, leucina, histidina, adenina y metionina. Esta cepa es la que se utilizó para ser transformada con el plásmido

pHIS2 con el promotor de *AHA2* y *pHIS2* plásmido vacío como control. Se utilizó la misma cepa para transformar e integrar el plásmido pHIPPIE en el genoma de levadura tanto la construcción con el promotor de *AHA2* y la construcción sin promotor. Y la cepa *THY.AP4* lleva *determinante sexual MATa* y ha sido transformada con *pGALT7-PTM2* y lleva *ura3*, *leu2*, *lexA::lacZ::trp1*, *lexA::HIS3*, *lexA::ADE2* (Obrdlik et al., 2004).

### 3.2. VECTORES DE CLONACIÓN

Se utilizaron diversos vectores para clonación y subclonación del promotor de *AHA2* y del factor de transcripción *PTM2*.

**-pDONR/Zeo:** El vector pDONR/Zeo (ThermoFisherScientific™)(Figura 5) es un vector con la tecnología Gateway diseñado para generar clones con el gen de interés flanqueado con unos extremos attL, que se recombinarán con otro clon o producto de PCR flanqueado con extremos attB. Después de esta reacción BP, se podrá recombinar con otros vectores con tecnología Gateway con una reacción de recombinación LR. El vector contiene además unos terminadores T1 y T2 para proteger el gen clonado, unos primers M13 en sentido y en antisentido para la secuenciación del inserto, los sitios de recombinación anteriormente mencionados, el gen *ccdB* para la selección negativa, el origen de replicación pUC para *E.coli*, y resistencias a cloramfenicol y kanamicina o zeocina.

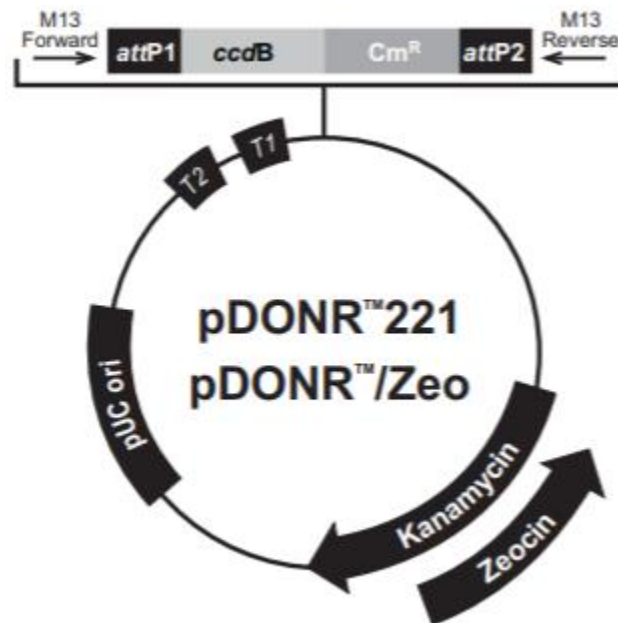
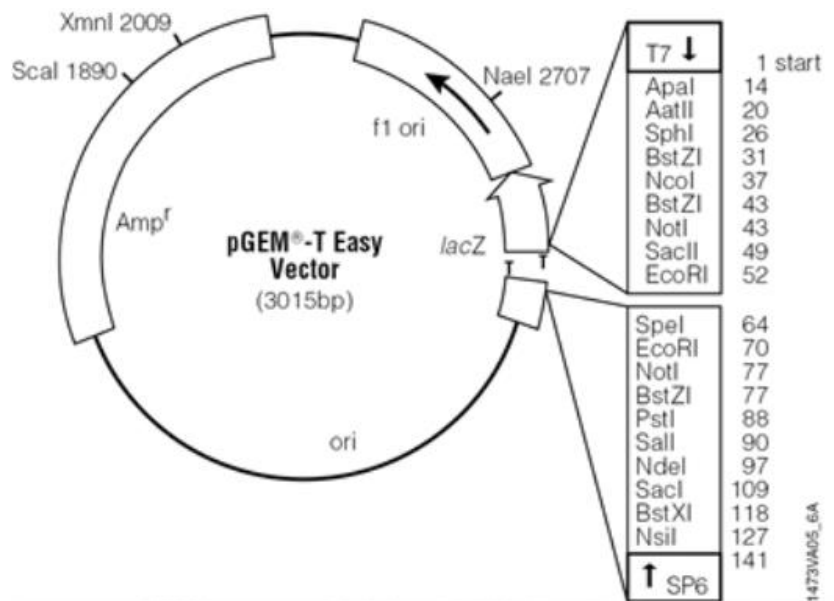


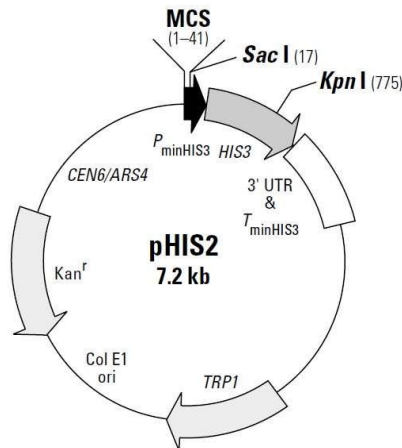
Figura 5. Esquema del plásmido pDONR/Zeo.

**-pGEM®-T Easy:** El vector pre-linealizado pGEM®-T Easy (Promega) se ha usado para subclonar el promotor de AHA2 entre -186 y -253 par de bases antes del codón de inicio ATG. Flanqueando el sitio de inserción se encuentran múltiples sitios de restricción (**Figura 6**) y además contiene extremos 3'-T para que sea compatible con los con los productos de PCR que añaden a los extremos una adenina como ocurre por ejemplo con la Taq polimerasa. Otra característica relevante de este plásmido es que las colonias que han incorporado un inserto en la reacción de ligación interrumpirán la región codificante para el péptido  $\alpha$  (LacZ) para la  $\beta$ -galactosidasa. Las colonias recombinantes serán blancas, mientras que las que no hayan captado el inserto serán azules, por la expresión de este péptido. Este vector también contiene un origen de replicación para *E.coli*, un gen de resistencia a ampicilina y un par de promotores para hacer posible la secuenciación del inserto (T7 y SP6).



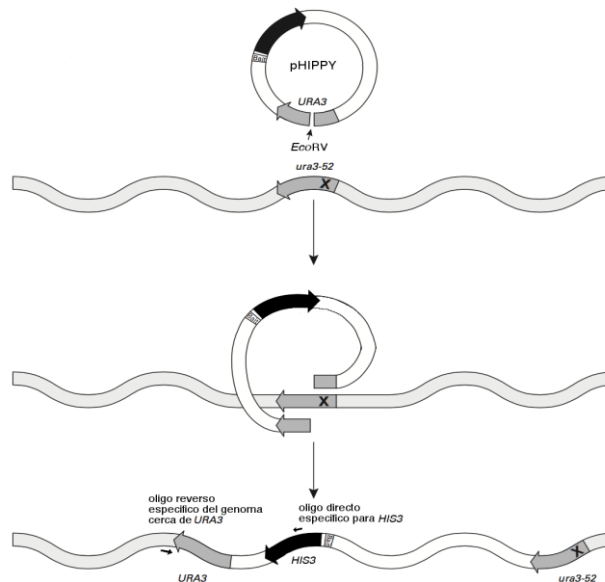
**Figura 6** . Esquema del Plásmido pGEM®-T Easy. Al lado derecho, el listado sitios de restricción que contiene el multiple cloning site (MCS).

**- pHIS2:** Se trata de un vector diseñado para ensayos de Y1H (**Figura 7**) que permite clonar fácilmente la zona promotora del gen del interés, en nuestro caso AHA2. Además, contiene un gen reportero HIS3 sin su promotor nativo, pero con un promotor mínimo y un sitio de múltiple conación para permitir el inserto de las secuencias de interés. Este plásmido lleva dos orígenes de replicación, uno para *E.coli* (Col E1) y uno para *S. cerevisiae* (ARS4/CEN6), además de un gen de resistencia a kanamicina y el gen de la auxotrofia para Triptófano (TRP1).



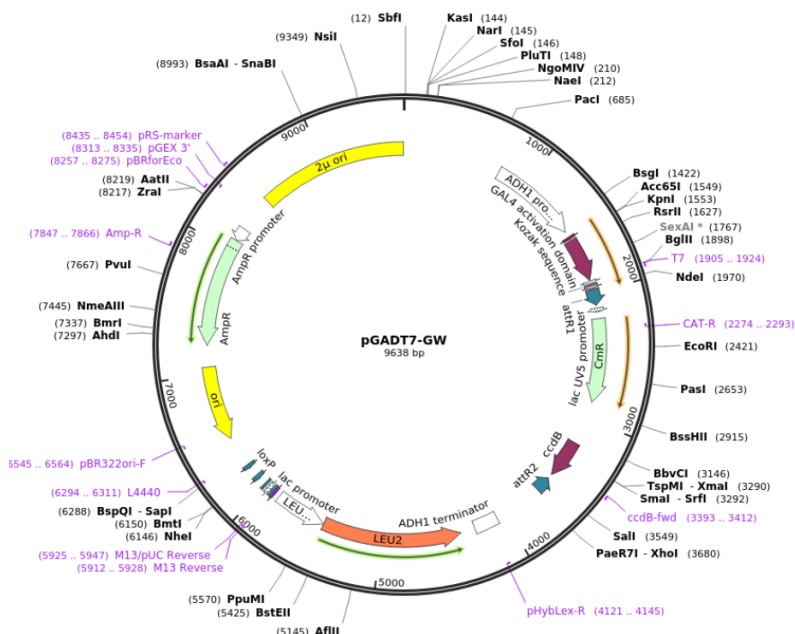
**Figura 7.** Esquema del vector pHIS2. Se muestran las partes detalladas y algunos sitios de cortes de restricción (Sac I, KpnI).

- **pHIPPIE:** Este plásmido es una variante del plásmido anterior pHIS2 (Clontech). Es plásmido tiene el gen de auxotrofía para uracilo (URA3) en lugar del de triptófano para poder integrarse mediante recombinación homóloga (de la mutación *ura3-52*) al genoma de la levadura transformada y sirve para hacer el ensayo Y1H (**Figura 8**). Para conseguir este cambio, cortamos el vector pHIS2 con *EcoRI* y *EcoRV* y el plásmido pCM259 con *EcoRI* y *PmeI* y los ligamos. En el fragmento de pHIS2, nos queda el reportero HIS3 y en el fragmento de pCM259 nos queda URA3 y la resistencia a ampicilina/carbenicilina.



**Figura 8.** Esquema del mecanismo de integración del plásmido pHIPPIE. Esto ocurre mediante las regiones de URA3 del plásmido y *ura3-52* del genoma de levadura.

- **pGADT7-GW**: Es un plásmido con la tecnología Gateway® (**Figura 9**) que sirve como vector “presa” en ensayos Yeast Two/One Hybrid. Esto es porque contiene el dominio GAL4 de activación que se pega a la proteína recombinante resultante. Tiene un promotor de levadura que genera un alto número de copias (2 $\mu$ ) y un gen de auxotrofia para la leucina (LEU2). Posee dos sitios de recombinación attR flanqueando el gen ccdB, que provoca la muerte de la célula, para la reacción LR que sustituirá el inserto de interés por este gen ccdB. También permite su uso en bacterias gracias al origen de replicación en *E.coli* y dos genes de resistencia a antibióticos, ampicilina y cloramfenicol.



**Figura 9.** Esquema del vector pGADT7-GW con los sitios de restricción.

### 3.3. Manipulación y crecimiento de *E.Coli*

Cultivamos bacterias *E.coli* a 37°C durante 24 horas. Para los medios sólidos utilizamos medio LB con agar y el antibiótico necesario para la posterior selección de colonias con los plásmidos de interés. El medio líquido (sin agar) lo utilizamos posteriormente para crecer las colonias seleccionadas en el medio sólido, incubándolo en agitación a 200 rpm a 37°C para conseguir una buena aireación.

### **3.3.1. Preparación de *E.coli* competentes y transformación**

Partimos de glicerizados de células competentes de *E.coli* (previamente preparada con método (Inoue et al., 1990) para transformarlas con nuestros plásmidos. Estos tubos glicerizados se descongelaron, ya que se encontraban a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se incubaron con los vectores de interés en hielo durante 30 minutos.

Para que nuestro DNA plasmídico entrara en las células se procedió a realizar un choque térmico, que consiste en incubar durante 50 segundos las bacterias a  $42^{\circ}\text{C}$ . Tras esto, añadimos  $300\ \mu\text{L}$  en medio LB y mantuvimos en agitación 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , con la finalidad de recuperar las bacterias del estrés térmico anterior.

Para acabar, sembramos las bacterias en medio sólido de LB sobre una placa con el antibiótico correspondiente para la posterior selección de las células transformadas.

### **3.4. Manipulación y crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae***

Las levaduras se mantienen 48 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  en medio rico YPDA líquido en agitación a 200 rpm para su correcto crecimiento hasta 1 OD. Después se hizo un lavado con agua y uno con AcLiTE ( $\text{Li}^+$  acetato  $0,1\text{M}$ ,  $10\text{mM}$  Tris-HCl pH7,6, EDTA  $1\text{mM}$ ) y añadimos el carrier (o ssDNA) para conseguir que estas células sean competentes.

#### **3.4.1. Preparación de *S. cerevisiae* y transformación de *Saccharomyces cerevisiae***

La transformación de levaduras también se llevó a cabo por choque térmico. En este caso, ha de ser un choque más agresivo ya que las levaduras tiene más resistencia a la lisis. Realizamos el choque en presencia de PEGLiTE (Polietilenglicol 4000 al 40% p/v,  $\text{Li}^+$  acetato  $0,1\text{M}$ , EDTA  $1\text{mM}$ ,  $10\text{mM}$  Tris-HCl pH7,6) durante 30 minutos a  $28^{\circ}\text{C}$  y luego 20 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$ . Luego se extienden en placas con medios selectivos SD con los aminoácidos que se necesite para seleccionar el/los plásmidos de interés.

### **3.5. Medios de cultivo**

#### **3.5.1. Murashige y Skoog (MS)**

Se preparó medio con sales Murashige y Skoog con la cantidad pertinente tanto para medios líquidos como sólidos. Para el medio sólido, sin sacarosa,  $10\text{mM}$  de ácido 2-[Nmorpholino]ethanesulfonic (MES) ajustado a pH 6 con Tris básico y con un 1% de agar. (Murashige y Skoog, 1962).

Para las muestras de qRT-PCR las plantas se crecieron en medio nutritivo (Naranjo et al., 2003) sólido y para experimentos de ayuno medio líquido.

Para compensar la presión osmótica que causa la sacarosa al 1%, a las plantas sin tratamiento (después del ayuno) se le ha añadido a la solución nutritiva el 3% de PEG6000.

### **3.5.2. Luria-Bertani (LB)**

El medio Luria-Bertani (LB) es el medio que utilizamos para el crecimiento de *E.coli*. La composición de este medio es: triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 1% ajustando el pH con NaOH a 7,2. En el caso de realizar el medio en placa, se le añade 20 g/L para que sea sólido, se autoclava y se añaden los antibióticos pertinentes para la selección bajo campana para mantener la esterilidad. Los antibióticos que usamos fueron la kanamicina a 50 µg/mL para las construcciones de pHIS2, la carbenicilina 100µg/mL.

### **3.5.3. SOC (Super optimal broth)**

Este medio lo utilizamos para el crecimiento de las bacterias tras el estrés del choque térmico. La composición es: triptona al 2%, extracto de levadura al 0,5%, 10 mM de NaCl y 2,5 mM de KCl. Ajustamos a pH 7 con NaOH, autoclavamos y cuando se enfrió un poco, añadimos 10mM de MgCl<sub>2</sub> y 20 mM de glucosa, ambas estériles.

### **3.5.4.YPDA (Yeast extract-Peptone Dextrosa Adenina)**

YPDA es el medio más completo para las levaduras y su composición es: 20 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura. A esto se le añade HCl para ajustar el pH a 5,8 y se enrasa con agua hasta 1 L para después esterilizar en el autoclave. Tras la esterilización y enfriamiento a unos 50°C, se le añade 50 ml glucosa al 20%.

### **3.5.5. Medio sintético SD**

Otro medio para levadura es el medio SD, este no es el mejor medio para las condiciones de crecimiento, pero es útil a la hora de seleccionar las levaduras que hayan incorporado el plásmido de interés. Su composición es: Yeast Nitrogen Buffer (YNB) al 0,7%, glucosa al 2%, 0,05M de ácido succínico a pH 5,5 y un 2% de agar, además de los aminoácidos que añadiremos para que la levadura crezca, pero en los que omitiremos los aminoácidos para la selección por auxotrofia, que dependerán en cada caso del plásmido con el que transformemos.



### 3.6. Primers

Para amplificar la secuencia de nuestro promotor de AHA2 a partir del DNA genómico de Arabidopsis, necesitamos diseñar unos primers, que fueron los siguientes:

AHA2 forward: GATTAAGAACTTAAAGAGGCAG

AHA2 reverse: GCATAGCTGAGACGTTGTCTT

Y para amplificar el cDNA (es cDNA porque en levadura , donde se hará Y1H, no podemos poner intrones, tiene que estar ya procesado para que de la proteína) de la secuencia de PTM2, necesitamos diseñar otros cebadores:

At5g22760\_0027s : ATGGAAGGAAAGGTGGCTAACCTAGA

At5g22760\_1540STOPas: TCATACCAGGACAACCTTTTGAATGT

Los cebadores para las qRT-PCR:

PP2AA3\_AT1G13320\_F (gen referencia) :5'-ACCTGCGGTAATAACTGCATCTA-3'

PP2AA3\_AT1G13320\_R (gen referencia) :5'-CCGAACATCAACATCTGGGTC-3'

AHA1Forward: 5'-GAACTAATGGGTGCTGTGTATCT-3'

AHA1Reverse: 5'-CCAGGACGTTTCGACAAATGA-3'

AHA2Forward: 5'-CCAGGCCATCATGACTGTTATT-3'

AHA2Reverse: 5'-GTAAGTACACCGCACCCATTAG-3'

AHA3Forward: 5'-CGTTACATACTAGCCGGAACAG-3'

Los cebadores para comprobar la integración del plásmido pHIPPIE:

231HIS3F (específico vector integración): 5'-ATCGTTGAGTGCATTGGTGAC-3'

closeURA3\_0660as (específico genoma levadura): 5'-TCTAATTTGTGAGTTTAGTATACAT-3'

### 3.7. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para las reacciones de PCR del promotor de AHA2 se utilizaron los siguientes reactivos: tampón de PCR 10x (BioTools), 0,2 mM dNTPs, 1  $\mu$ M primer directo, 1  $\mu$ M primer reverso, DNA (0,1-20 ng/ $\mu$ L), DNA polimerasa Taq (1 U/ $\mu$ L) (BioTools) y agua desionizada hasta un volumen de 20  $\mu$ L/reacción.

Las reacciones tuvieron lugar en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C de 5 min.
- 30 ciclos de amplificación: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación de primers utilizando una temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos entre 57 y 62 °C, dependiendo del par de primers utilizados en cada caso y extensión a 72 °C durante 1 min por cada kilobase de DNA que se fuera a amplificar.
- 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Sin embargo, para amplificar el cDNA de ptm1 utilizamos la DNA Polimerasa Phusion (New England BioLabs), en lugar de la Taq Polimerasa anterior. Esto es porque la Phusion tiene 50 veces más fidelidad de copia (tasa de error  $4,4 \cdot 10^{-7}$ ) que la DNA polimerasa Taq y posee la actividad 3'-5' exonucleasa, actividad correctora por la que se evita arrastrar errores durante la reacción.

Los reactivos fueron: tampón HF 5x (New England BioLabs), 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M primer directo, 0,5  $\mu$ M primer reverso, DNA genómico (~2 ng/ $\mu$ L), 3% DMSO, DNA polimerasa Phusion (1 U/ $\mu$ L), agua MiliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 50  $\mu$ L/reacción. Y las condiciones en termociclador:

- 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C de 3 min.
- 30 ciclos de amplificación: 10 segundos de desnaturalización a 98 °C, 15 segundos de hibridación de primers a 57° C y 15 segundos de extensión a 72 °C.
- 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 3 min.

### 3.8. Extracción RNA, conversión a cDNA y qRT-PCR

Para realizar las PCR cuantitativas a tiempo real (qRT-PCR) se tuvo que extraer RNA de las plantas según el protocolo de Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008. Tras esto, normalizamos la concentración del RNA en todas las muestras con la ayuda del NanoDrop. Después seguimos el protocolo ("Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR") de ThermoFisherScientific para sintetizar el cDNA a partir del RNA. La reacción de síntesis se mantuvo a 65°C durante 45 minutos para un volumen de 9,6 $\mu$ L y un 0.4 $\mu$ L de molde, que se realizó en la máquina "Applied Biosystems 7500 Fast", con el sistema Cmb (5X Pyro Taq EvaGreen qPCR).

### **3.9. Electroforesis**

Utilizamos la electroforesis como comprobación tanto después de amplificar DNA por reacciones de PCR tanto como después de reacciones de ligación y digestión. Los geles de agarosa al 0,7% contenían también 1,5%, tampón TBE (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA) y bromuro de etidio (500 µg/L). Para cargar las muestras en los pocillos del gel añadimos 1/5 volúmenes de tampón de carga LB x6 (40% sacarosa, 0,25% azul de bromofenol y 0,1 M EDTA). Utilizamos también como referencia para todas las electroforesis el marcador GeneRuler1kb para ver los tamaños aproximados de las bandas de interés.

Una vez cargado el gel, se deja correr a un máximo de 10V/cm con el mismo tampón TBE y se visualizan y fotografían en un transiluminador con luz UV.

En el caso de querer extraer la banda, como fue en el caso de la clonación de AHA2 en pHIPPIE y pHIS2, utilizamos el kit GENE CLEAN® Turbo (MP Biomedicals) para purificarla y poder manipularla.

### **3.10. Recombinación**

La reacción de Gateway® según el protocolo de la casa comercial Invitrogen se utilizaró para insertar el producto PCR de PTM2 en el plásmido pDONR/Zeo y la reacción LR para poner el inserto PTM2 en el plásmido final pGADT7-GW.

### **3.11. Minipreparaciones de plásmidos**

Purificamos los plásmidos incorporados y seleccionados en E.coli mediante el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Para el caso de la purificación de los plásmidos para levadura se utilizó el mismo protocolo, solo que se hizo un paso previo de lisis celular con bolas de cristal de 0,5 mm de diámetro y agitación con vórtex durante 10 minutos, ya que las levaduras son mucho más resistentes a la rotura que las bacterias.

### **3.12. Digestiones**

Hemos realizado varias digestiones con enzimas de restricción diferentes con el fin de comprobar que las minipreparaciones de los plásmidos eran correctas tras correr un gel y ver el tamaño de las bandas obtenidas, o con el fin de subclonar los fragmentos de DNA. En este caso, pudimos cortar el inserto de interés de un plásmido, correrlo en un gel para comprobarlo y extraerla para seguir trabajando con ella. Los reactivos son: tampón 10X (con BSA), el enzima de restricción pertinente (2U/µL) de la casa Thermo Fisher Scientific, el DNA plasmídico (1 µg/µL), y agua desionizada hasta un volumen final de 10? O 20 µL. Después se deja incubando durante una hora a 37°C.

### **3.13. Ligaciones**

Tanto en la clonación de AHA2 como en la clonación del factor de transcripción PTM2 se realizaron ligaciones. Estas con la finalidad de ligar un fragmento dentro de un plásmido. Para ello se utiliza el enzima T4 DNA Ligasa con el tampón pertinente y se dejó una hora a temperatura ambiente para que llevara a cabo la reacción.

### **3.14. Secuenciación**

La secuenciación fue un recurso vital al que recurrimos para comprobar si nuestros insertos estaban en los plásmidos deseados. Mandamos las muestras al propio servicio de secuenciación del IBMCP, a una concentración de 200 ng/μL en un volumen de 10 μL. También mandamos los primers correspondientes a 5 μM, o en el caso de utilizar alguno de los primers típicos (T7, M13) que tiene el servicio, lo indicamos en el informe.

Tras obtener los resultados de las secuencias, los analizamos con herramientas bioinformáticas para ver que todo era correcto (no mutaciones por PCR o por el clonaje) y en qué sentido se insertaba nuestro fragmento de interés. Una de estas herramientas fue el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y PLAZA ([https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\\_v4\\_dicots/](https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v4_dicots/)).

### **3.15. One Hybrid**

#### **3.15.1. Construcción PTM2 y transformación en levadura THY.AP4**

La primera transformación que realizamos fue la de nuestro factor de transcripción PTM2 en el vector p-GADT7-GW. Primero subclonamos el factor de transcripción en el vector pDONR/Zeo mediante tecnología Gateway con una reacción BP y después de comprobar que la inserción fue correcta, transferimos este factor PTM2 al vector final pGADT7-GW mediante una reacción LR también por la tecnología Gateway.

Tras esto, transformamos las levaduras por choque térmico con nuestra construcción pGADT7-GW. Para seleccionar las levaduras que habían sido transformadas con nuestro vector, plaqueamos sobre placas con medio SD sin leucina, que es el gen de auxotrofia específico del vector pGADT7-GW.

### **3.15.2. Construcción promotor AHA2 y transformación en levadura Y187**

En este caso, la construcción fue la de los vectores pHIPPIE y pHIS2 con el promotor de AHA2. Para ello, ligamos nuestro inserto AHA2 en el plásmido pGEMT-easy con el enzima ligasa. Después linealizamos los vectores pHIPPIE y pHIS2, los tratamos con fosfatasa alcalina según el protocolo de la casa Roche a 37°C durante 30 minutos para evitar la autoligación de los vectores. Comprobamos mediante la digestión del plásmido pGEMT-Easy que nuestro inserto era correcto y recuperamos la banda del gel para poder seguir trabajando con ella. Esta banda, perteneciente al promotor de AHA2 se ligó en ambos vectores con una ligasa. Para ver qué vectores habían aceptado el inserto y en qué sentido, realizamos una PCR con dos combinaciones de primers. Tras esto, pasamos a la transformación de las levaduras con nuestras construcciones. En el caso de pHIS2 este entra en la levadura, mientras que en el pHIPPIE, el plásmido se integra en el genoma mediante la recombinación homóloga con la región de URA3. El plásmido pHIPPIE posee el gen URA3, que en la levadura está mutado, lo cual no permite a la levadura crecer sin uracilo. Para que se integrara el vector, se cortó con EcoRV, que corta dentro de la auxotrofia para el uracilo. Así, linealizamos el vector, y si este se integra en el genoma, consigue reconstruir el gen de URA3, por lo que la levadura será capaz de crecer sin uracilo en el medio mínimo SD.

Nuestra cepa de levadura Y187 es auxótrofa para el triptófano, histidina, lisina, leucina, adenina y uracilo, por lo que al medio SD le añadimos todos estos aminoácidos a excepción del uracilo.

### **3.15.3. Ensayo Yeast One-Hybrid (Y1H)**

Las colonias diploides crecidas después de un par de días en medio mínimo selectivo líquido (-UL o -WL) habían llegado a saturación. Por mayor exactitud medimos la OD (densidad óptica) a 660 nm y llevamos todas las muestras con agua a una OD final de 0,07 con para que todas estuvieran con la misma concentración inicial de células. Para este ensayo gastamos una placa multipocillos para poner de forma ordenada nuestras muestras con 4 repeticiones independientes en distintos pocillos. En cada pocillo había 200uL de células e hicimos goteos gastando placas petri de SD (-UL o -WL) para comprobar si hay crecimiento regular (control) y placas petri (-ULH o -WLH) para medir la posible interacción de nuestro factor de transcripción con el promotor de interés o autoactivación si creciera con el vector vacío.

## 4. RESULTADOS

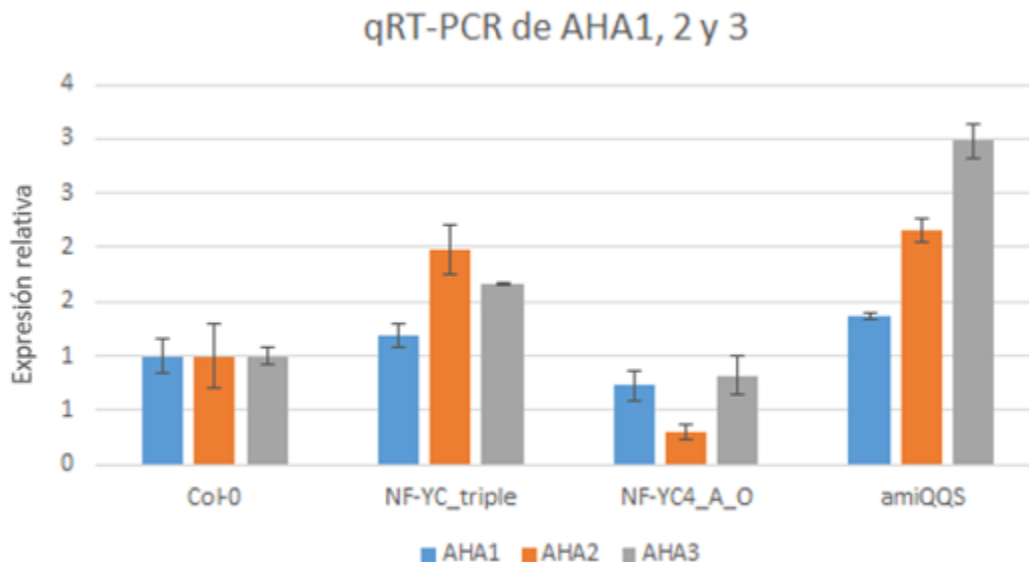
### 4.1. REGULACIÓN DE AHA2 POR NF-YC Y QQS

#### 4.1.1. Cuantificación de la expresión de AHA1, AHA2 y AHA3

Mediante una qRT-PCR se quiso comprobar si la expresión de las ATPasa está modificada en las líneas de *Arabidopsis* mutantes para los genes de QQS y NF-YC.

Se escogieron las 3 isoformas más relevantes de AHA y las siguientes líneas: Col-0, línea control, NF-YC\_triple, línea mutante de pérdida de función para los tres factores NF-YC, NF-YC4\_A\_O, línea mutante con sobreexpresión de NF-YC4, y por último, amiQQS. Esta última se trata de una línea mutante generada mediante la tecnología de los microRNAs (miRNA) artificiales, que silencian el gen diana utilizando pequeños fragmentos de RNA.

Se observa en la **Figura 10**, que en el mutante de los tres factores NY-FC se induce la expresión, especialmente de AHA2 y en cambio en la sobreexpresión de NF-YC4 disminuye su expresión. La línea mutante de QQS, en la que se inhibe la expresión de QQS, también aumenta la expresión de las tres isoformas de AHA. La línea Col-0 fue utilizada como referencia.

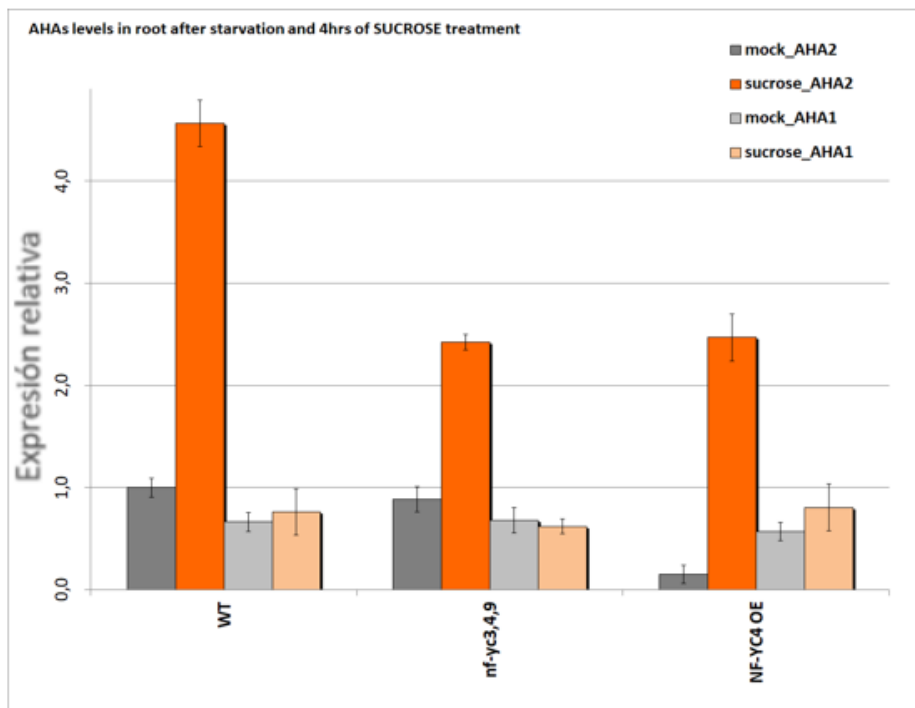


**Figura 10.** qRT-PCR de AHA1,2 y 3. Cuantificación de la expresión de las 3 isoformas más relevantes de AHA (AHA1, AHA2, AHA3) en diferentes líneas de *Arabidopsis* (Col-0, NF-YC\_triple, NF-YC4\_A\_O, amiQQS) mediante una qRT-PCR.

#### 4.1.2. Cuantificación de la expresión de AHA1, AHA2 en condiciones de ayuno y tras tratamiento con sacarosa

La sacarosa es detectada por proteínas de membrana que desencadenan cascadas de fosforilación. Como último paso se pueden fosforilar factores de transcripción, los cuales regularían la expresión de distintos genes, entre los cuales se podría encontrar las protón ATPasas (Niittyä et al., 2007).

Con el fin de comprobar esta hipótesis, realizamos una qRT-PCR de diferentes líneas de Arabidopsis para las isoformas AHA1 y AHA2. Utilizamos una planta wild-type (WT), una línea mutante para los tres factores de transcripción NF-YC (*nf-yc3,4,9*), y otra con la sobreexpresión de el factor NF-YC4 (NF-YC4\_OE). Todas las plantas fueron sometidas a un periodo de ayuno y después tratadas con sacarosa. Los resultados fueron los que se observan en la **Figura 11**. Los valores para AHA1 no varían tanto con tratamiento como sin tratamiento, pero los valores de AHA2 se disparan en la planta control Col-0 (WT).



**Figura 11.** qRT-PCR de AHA1 y 2 tras tratamiento con sacarosa. Resultados de la qRT-PCR donde se ve la expresión relativa de AHA1 y AHA2 tras el tratamiento con sacarosa en las diferentes líneas mutantes.

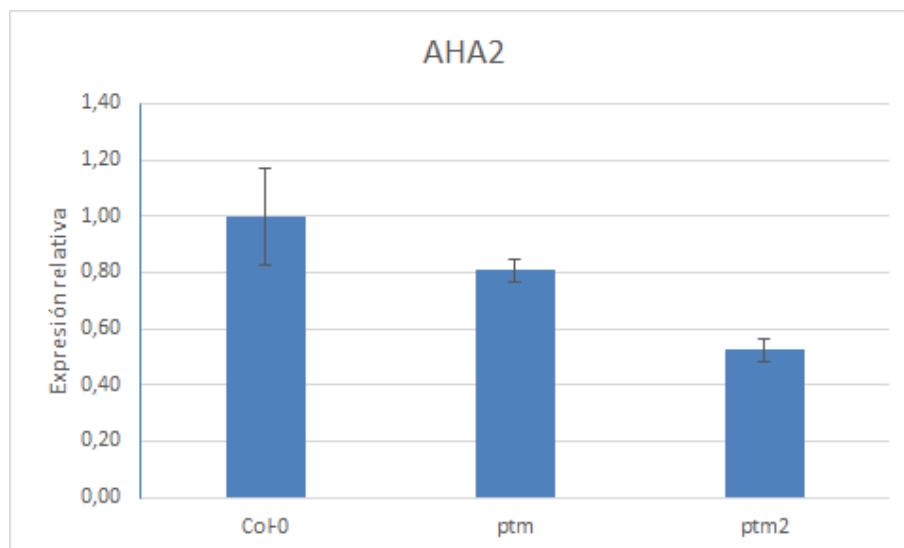
## 4.2. REGULACIÓN DE AHA2 POR PTM2

### 4.2.1. Expresión de AHA2 en mutantes de PHD

En primer lugar, realizamos una qRT-PCR de AHA2 en dos mutantes de los genes de tipo PHD: el ya descrito PTM y el At5g22760, que nosotros denominamos PTM2 por ser de la misma familia que el anterior.

Respecto a Col-0, que son las plantas de Arabidopsis que utilizamos como control, pudimos observar que la expresión de AHA2 en los mutantes *ptm*. La expresión relativa de AHA2 se tomó como referencia en las plantas control y le asignamos un valor de 1. La expresión, en el caso de las líneas mutantes *ptm*, tal como se observa en el gráfico (**Figura 12**), fue inferior a los valores del control. Esto nos indicó, que el gen PTM está involucrado en la expresión de AHA2, activándola, ya que en los mutantes donde *ptm* y *ptm2* no se expresan, la expresión de AHA2 también disminuye.

Este fue el ensayo clave por el que decidimos estudiar al gen At5g22760 o PTM2 mediante un ensayo Y1H para comprobar si este factor de transcripción, que no está caracterizado, interacciona con el promotor de AHA2.



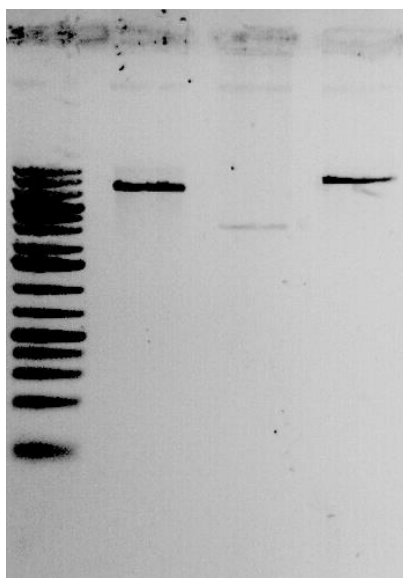
**Figura 12.** qRT-PCR de AHA2 con líneas mutantes de PTM. En la primera columna está el ecotipo Col-0 que sirve como referencia. *ptm* y *ptm2* son los mutantes en los que estos genes están inhibidos. Podemos observar la expresión relativa de AHA2 en Col-0 asignada con valor 1, mientras que en los mutantes disminuye la expresión, siendo menor en el mutante *ptm2*.



#### 4.2.2. Clonaje de promotor de AHA2 en pHIPPIE y pHIS2

Mediante una PCR con los cebadores se amplificó el fragmento del promotor de AHA2 y lo subclonamos en el vector pGEMT-Easy mediante una ligación. La inserción se comprobó mediante secuenciación.

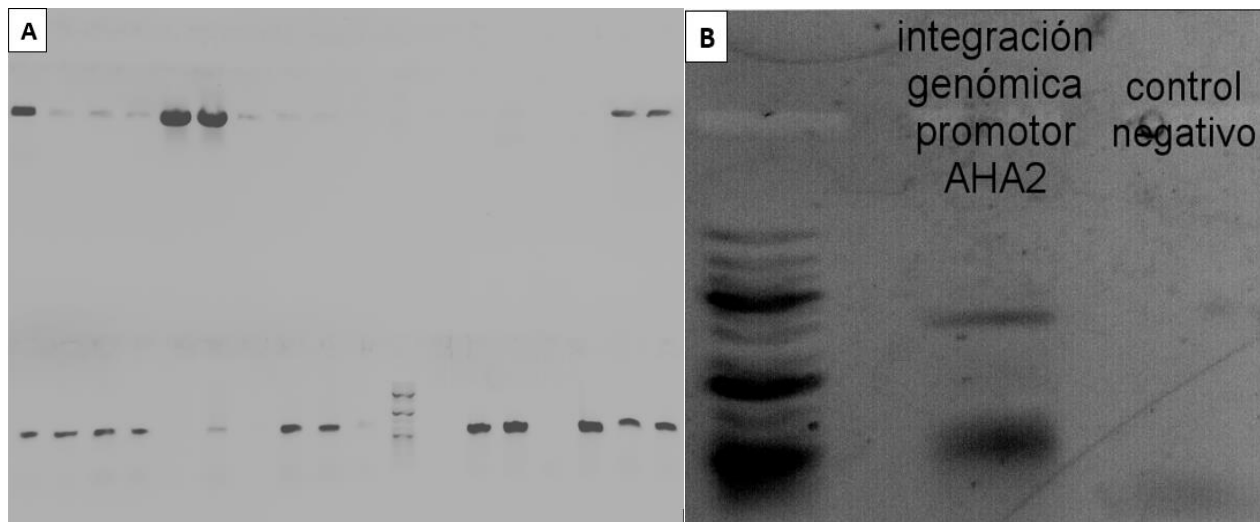
A continuación, procedimos a clonar este inserto en los vectores finales pHIS2 y pHIPPIE para el ensayo de Y1H. Para ello, cortamos los vectores con el enzima EcoRI, debido a que solo presentan un sitio de corte de este enzima. Para prevenir la autoligación del mismo vector, tratamos según el protocolo con fosfatasa alcalina y comprobamos en un gel de electroforesis (Figura 12). Una vez vimos que nuestros vectores estaban bien cortados, extrajimos la banda que correspondía a nuestro fragmento de interés (**Figura 13, columna 3**) y lo insertamos mediante una ligación con la ligasa.



**Figura 13.** Gel de electroforesis tras digerir y tratar los vectores con fosfatasa alcalina. La primera columna es la del marcador, la segunda es la digestión parcial de pHIS2, la tercera es la digestión de pGEMT-Easy y la cuarta la digestión de pHIPPIE.

Una vez hicimos la ligación, hicimos una PCR para comprobar que el inserto estaba insertado y en qué sentido se encontraba. Para ello utilizamos dos combinaciones de primers: ambas con el primer reverso del vector en HIS3. Una llevaba el primer *forward* del inserto y la otra combinación, el primer inverso del inserto. Corrimos un gel de electroforesis (figura 14A) con las muestras (10 de pHIPPIE y 6 de pHIS2). Asumimos que las muestras correctas fueron la pHIPPIE 5 en sentido forward, y el pHIS2 2 y 4 en sentido reverso según la imagen del gel.

Una vez conseguimos nuestros plásmidos finales con el inserto de interés, transformamos las levaduras de la cepa Y187 para el ensayo final de Y1H. En el caso de el plásmido pHIS2, este entra en la levadura y en el caso del pHIPPIE, el plásmido recombina mediante las regiones de URA y se integra en el genoma de la levadura. Para comprobar que pHIPPIE se había integrado en el genoma de la levadura correctamente, hicimos una PCR y corrimos un gel. (**Figura 14B**).



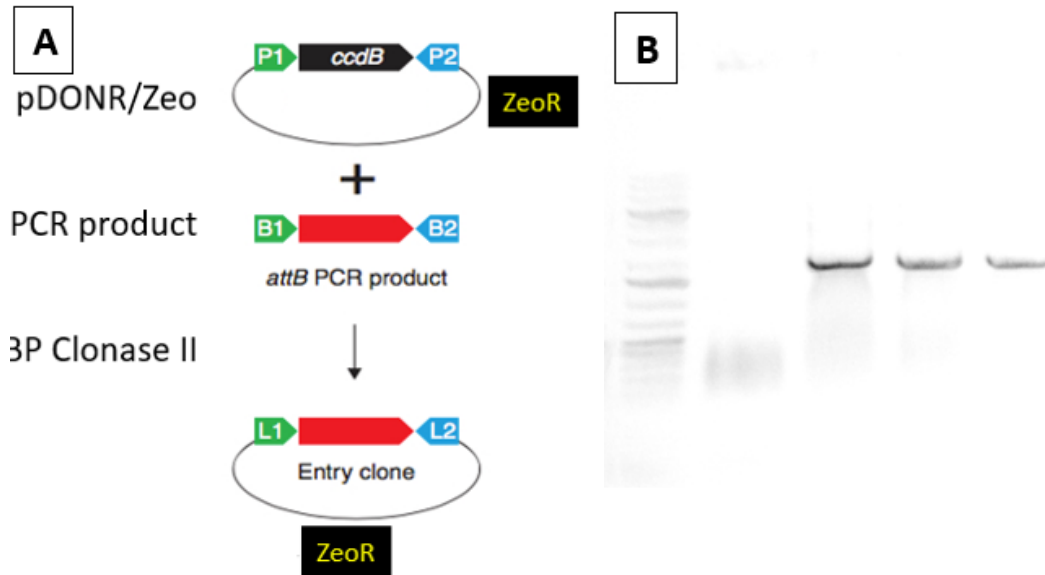
**Figura 14. A.** Gel de electroforesis de la PCR para comprobar el sentido del inserto en pHIPPIE y pHIS2. Hay dos líneas de pocillos, la de arriba con la combinación de cebadores de sentido *forward* para el inserto y la de abajo con la combinación para el sentido reverso. Las muestras válidas son las que presentan una banda en solo una de las dos líneas de combinaciones de cebadores. pHIPPIE5 solo muestra banda arriba, con lo cual se encuentra en sentido *forward* y pHIS2 2 y 4 solo se encuentran en la línea de abajo, por lo que el inserto lo tendrán en sentido reverso. **B.** Gel de electroforesis de comprobación de la integración del vector pHIPPIE en el genoma de levadura. La banda superior en la segunda columna es el fragmento correspondiente a AHA2 (aprox 3500 bp) y la inferior es un producto secundario, algo que puede suceder en PCR tan complejas.

#### 4.2.3. Clonaje de PTM2 en pGADT7-GW

El primer paso fue subclonar el gen de PTM2 en el vector pDONR/Zeo mediante una reacción BP (**Figura 15.A**).

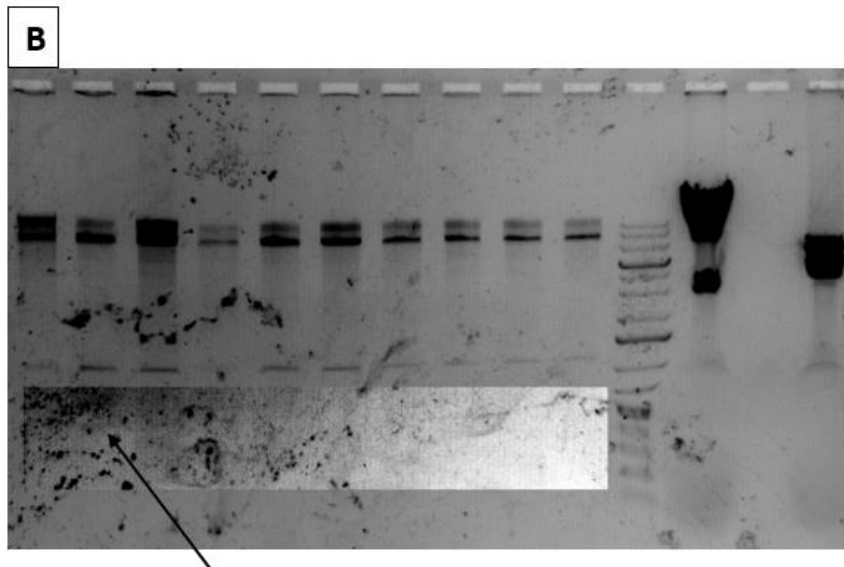
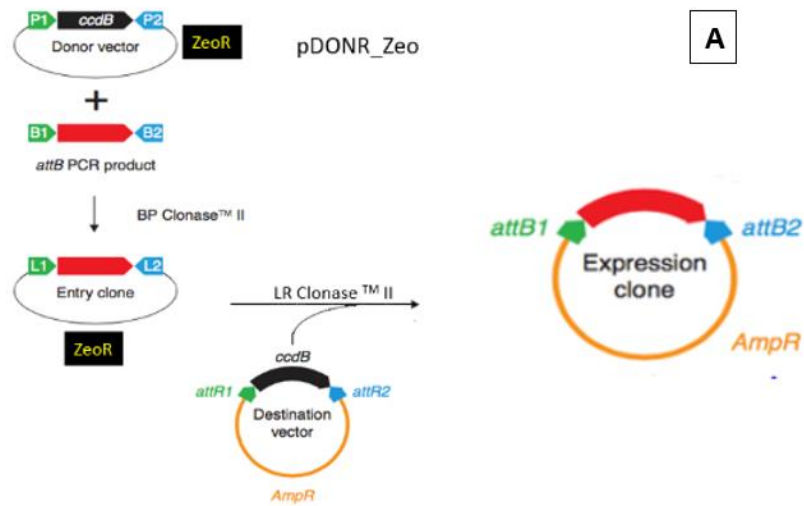
Para comprobar que nuestro gen de interés se insertó, se realizó una digestión parcial con el enzima MunI, que tiene un sitio de restricción dentro del inserto, por lo que si el plásmido ha integrado el inserto, se cortará.

Una vez hecha la digestión parcial, se hizo una electroforesis en gel de agarosa en la que se debería esperar para el plásmido con el inserto una banda de 3300 bp. Esto es porque restando al total del vector (4291 bp) las pares de bases que existen entre los sitios de recombinación attp1 y attp2 (2500) y sumando lo que ocupa nuestro gen PTM2 (1540), nos da 3300 bp. En nuestro gel pusimos 4 muestras, 3 de las cuales dieron el fragmento esperado (**Figura 15.B**).



**Figura 15. A.** Reacción BP. Con la enzima “BP clonase II” entre el vector pDONR/Zeo y nuestro gen de interés. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión parcial del plásmido pDONR/Zeo con el gen PTM. En la primera columna se encuentra el marcador molecular y en las 4 siguientes, las diferentes muestras de la digestión. Solo las 3 últimas dan la banda esperada a 3300 bp aproximadamente.

Tras tener asegurado que nuestro gen PTM2 se insertó en el vector de subclonación, pasamos este mismo gen al vector final pGADT7 mediante una reacción Gateway LR. (**Figura 16.A**) Para comprobar que pGADT7 tiene el inserto PTM2 transformamos *E.coli*, y realizamos una digestión parcial con EcoRV y HindIII. Los sitios de restricción de HindIII son dos fuera del inserto, y EcoRV solo tiene uno dentro de este. En el gel de agarosa se observa una banda de un tamaño alrededor de 400 bp (flecha de la **Figura 16.B**) que correspondería al fragmento que se encuentra entre los sitios de corte HindIII y EcoRV, indicando que el vector contiene el inserto. Luego comprobamos que efectivamente sí se encontraba en el vector secuenciando con el promotor T7 del pGADT7.



**Imagen.16 A.** Reacción Gateway LR entre el vector pDONR/Zeo y el pGADT7-GW. **B.** Gel de agarosa de la digestión con HindIII y EcoRV de pGADT7 de *E.Coli* transformadas. La flecha indica la banda que corresponde al inserto PTM2.

#### 4.2.4. Yeast One-Hybrid (Y1H)

El ensayo Y1H está formado por dos componentes: la “presa” (prey) y el “cebo” (bait). La llamada “presa” es la proteína híbrida que se forma con nuestra proteína de interés (en nuestro caso PTM2) conjugada con el factor GAL4, y el “cebo” será el DNA al que se unirá la “presa”, que en caso de que esta interacción ocurra, expresará el gen reportero (en nuestro caso HIS3).

En la **Figura 17** se observa nuestro resultado final del Y1H. Las combinaciones que realizamos fueron:

- pHIPPIE-AHA2 con pGADT7-PTM2
- pHIPPIE sin promotor (vacío) con pGADT7-PTM2
- pHIS2-AHA2 con pGADT7-PTM2
- pHIS2 sin promotor (vacío) con pGADT7-PTM2
- pGADT7-GW con CK2 $\alpha$ 1
- pGBTK con CK2 $\beta$ 1

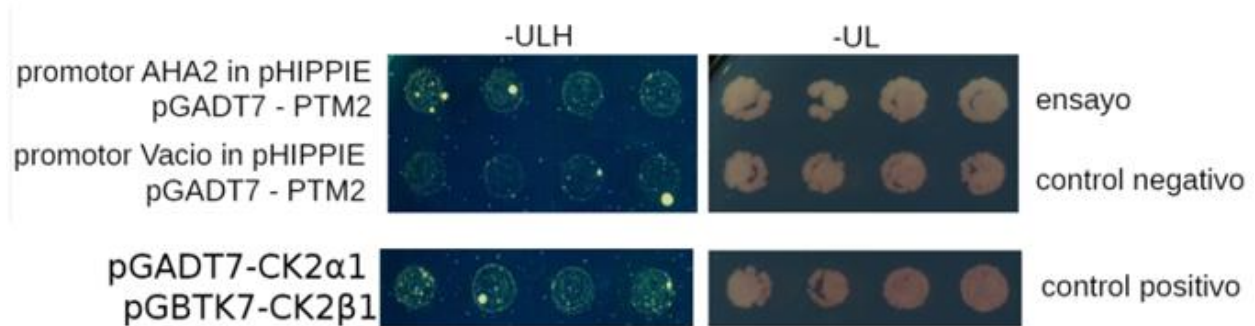
El vector “presa” pGADT7-GW está presente en todas las combinaciones por lo que ningún medio tendrá leucina. pGADT7-GW lleva el gen para la auxotrofia de la leucina, por lo que si el plásmido se transcribe correctamente la levadura será capaz de crecer sin la leucina. En el caso de estar presente el vector pHIPPIE (“cebo”), el medio no llevará ni uracilo ni histidina, ya que este plásmido contiene los genes para la auxotrofia para estos dos aminoácidos. En el caso de estar presente el plásmido pHIS2 (“cebo”), la histidina y triptófano no estarán presentes en el medio por la misma razón.

En el caso de la combinación de pHIPPIE con pGADT7-GW se replicaron en medio SD sin leucina ni uracilo, donde se deberían ver todas las colonias creciendo ya que ambos compuestos moleculares del ensayo están presentes. Y también en medio sin leucina, ni uracilo, ni histidina, donde deberían crecer solo las colonias en las que interaccione el factor de transcripción con el promotor, debido a que se transcribirá el gen reportero de la histidina, lo que permitirá crecer a la levadura. En el caso de la combinación de pHIS2 con pGADT7-GW las colonias crecieron en un medio sin triptófano y sin leucina, en el cual deberían crecer todas las colonias ya que los dos plásmidos que confieren la capacidad de sintetizar estos aminoácidos por ellos solos están presentes. Y en el medio en el que además se le quita también la histidina, deberían crecer colonias en el caso de que la interacción del promotor AHA2 y PTM2 exista.

La interacción entre el promotor AHA2 y el factor PTM2 con GAL4 permitiría la transcripción y traducción de histidina, lo cual permitiría que las levaduras crecieran en un medio en ausencia de este aminoácido. Pero puede darse el caso de algún resultado positivo porque se auto-active alguno de los componentes, que descartaremos por los controles negativos.

Por otra parte, contamos con dos controles positivos, CK2 $\alpha$ 1 y CK2 $\beta$ 1, dos kinasas que interactúan entre ellas según (Riera et al., 2011) comprobado por un ensayo de doble híbrido. Estos dos controles son muy importantes ya que en el caso de que todo nos hubiera salido negativo, es decir, que no hubiera crecido nada, no sabríamos si es porque la interacción que estamos testando no ocurre o si es por algún fallo en la metodología, como por ejemplo una mala selección de los aminoácidos para los medios selectivos.

En nuestro ensayo Y1H, se puede observar según la **Figura 17**, los diferentes medios con combinaciones anteriormente descritas. Si nuestro factor de transcripción interacciona con el promotor AHA2, las levaduras deberían crecer en los medios correspondientes sin histidina, no así, las mismas combinaciones pero con un plásmido vacío. Así pues, nosotros consideramos que el resultado es positivo cuando en el círculo donde hemos depositado las células se ve el crecimiento de una manera global y no de colonias aisladas. En cambio, cuando el vector pHIPPIE está vacío, parece que hay crecimiento también pero es mucho más débil que en el caso del pHIPPIE con el inserto. Es por esto, que consideramos que nuestra combinación de pHIPPIE con pGADT7-GW es positiva, por lo que aceptamos que hay una interacción de DNA-proteína.



**Figura 17.** Ensayo final del Y1H. El cuadro -UL (medio SD sin uracilo y sin leucina) es para ver qué levaduras han adquirido el plásmido, dado que salen colonias en los dos controles, todas las levaduras han adquirido los plásmidos correspondientes. El cuadro -ULH (sin uracilo, leucina e histidina) es para ver si hay interacción. Si crecen las levaduras es porque son capaces de crecer sin histidina, que significa que hay interacción, ya que es por ella por la que se transcribe el gen de la histidina y les permite crecer en un medio sin dicho aminoácido. Se han omitido las imágenes de pHIS2 ya que no salían resultados conclusivos. CK2 $\alpha$ 1 y CK2 $\beta$ 1, son el control positivo del experimento para saber que las condiciones son correctas y no ha habido ningún error metodológico. Hay interacción segura, por lo que podemos comparar esta interacción con la de nuestro promotor y nuestro factor de transcripción.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. REGULACIÓN NEGATIVA DE AHA2

La H<sup>+</sup>-ATPasa es una proteína muy interesante para el estudio debido a sus múltiples y muy importantes funciones a nivel fisiológico. Esto ha hecho que no falten estudios en cuanto a su regulación; no obstante, la mayoría de estos estudios se limitan a la regulación post-traducciona, dejando a la regulación transcripcional en un segundo plano. Es por ello nuestro interés en centrarnos en la regulación de esta proteína a nivel transcriptómico. En este trabajo se utilizaron distintas líneas mutantes en las cuales se determinó la expresión de las tres isoformas de la protón ATPasa AHA1, AHA2 y AHA3.

La sobreexpresión de los factores NF-YC, así como su inhibición y la de QQS, confirman que estos se tratan de reguladores negativos de la H<sup>+</sup>-ATPasa, lo cual pudimos comprobar con los estudios de la expresión relativa de esta proteína de membrana. Estos resultados concuerdan con la investigación de Haruta et. al 2012. Además, también pudimos observar como los azúcares también participan en esta regulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa. Con otro ensayo de medición de la expresión relativa de AHA2, pudimos comprobar que tras tratar las plantas en ayuno con un poco de sacarosa, esta disminuía su expresión. La sacarosa por tanto, es un componente importante de regulación. La activación de AHA2 tras el tratamiento con sacarosa nos indica que tras este estrés de ayuno con el posterior tratamiento con azúcar, la protón ATPasa es capaz de inducir su actividad. Este mecanismo sería especialmente relevante para el crecimiento de la planta.

### 5.2. REGULACIÓN POSITIVA DE AHA2

Según nuestros ensayos de qRT-PCR pudimos observar como los mutantes en PTM y PTM2 tienen una expresión relativa menor de AHA2. Especialmente relevante sería en el caso de *ptm2*. Este hecho fue el punto de partida que nos impulsó a querer comprobar si existía una interacción entre este factor de transcripción y el promotor de AHA2.

El estudio de la posible interacción entre el factor de transcripción PTM2 y el promotor de AHA2 se llevó a cabo mediante un ensayo de Yeast One-Hybrid, debido a que este sistema estaba ya puesto a punto en nuestro laboratorio y a las ventajas que ofrece (Sun et al., 2011) respecto a otros sistemas de detección de este tipo de interacciones. Este sistema también nos permite detectar interacciones DNA-proteína que no son activadoras, lo que permite detectar proteínas represoras, a diferencia que en los ensayos de luciferasa. Otra ventaja es que este ensayo Y1H es compatible con muchas bibliotecas ya existentes, ya que la mayoría de ensayos Y1H pueden usar “presas” híbridas y bibliotecas construídas para Y2H.

Además Y1H puede detectar interacciones específicas de diferentes isoformas mediante el diseño de plásmidos que codifique para las diferentes isoformas de interés.

Otro ensayo que podría haber sido útil es el ChIP-seq, ya que se basa en la unión de anticuerpos específicos a la proteína de interés, que por el uso de estos ya resulta muy caro para nuestro presupuesto. Otra opción habría sido realizar plantas transgénicas con GFP y detectar esta proteína GFP para ver cuándo se expresa, lo cual es un proyecto factible y que posiblemente se realice en el laboratorio.

Tras realizar el ensayo Y1H pudimos observar que la interacción de PTM2 con el promotor AHA2 parece producirse, aunque como hemos comentado previamente, las condiciones de crecimiento de las levaduras no fueron las mejores. Esta interacción, podría mejorarse repitiendo con otras condiciones de crecimiento.



## 6. CONCLUSIONES

1. Se ha observado mediante el estudio de la expresión relativa de AHA2 en diferentes líneas mutantes de los factores NF-YC estudiados, como del gen QQS, que estos participan en la regulación transcripcional inhibiendo a la isoforma 2 de la H<sup>+</sup>-ATPasa en *Arabidopsis thaliana*.
2. En cambio, PTM2, es un factor de transcripción de la familia de los PHD, que participa también en la regulación de AHA2 en *Arabidopsis thaliana*, pero activándola.
3. El promotor de AHA2 en *Arabidopsis thaliana* parece sí interactuar con el factor de transcripción PTM2, aunque sería necesario repetir el ensayo Y1H en mejores condiciones para las células e incluso complementarlo con otros estudios que pudieran confirmar con más certeza que esta interacción existe en la naturaleza.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Duby, G., & Boutry, M. (2008).** The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology*, 457(3), 645-655.

**Coego, A., Brizuela, E., Castillejo, P., Ruíz, S., Koncz, C., del Pozo, J.C., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., Paz-Ares, J., León, J., and The TRANSPLANTA Consortium (2014).** The TRANSPLANTA collection of Arabidopsis lines: a resource for functional analysis of transcription factors based on their conditional overexpression. *The Plant Journal* 77: 944–953.

**Falhof, J., Pedersen, J., Fuglsang, A., & Palmgren, M. (2016).** Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*, 9(3), 323-337.

**Feng, P., Guo, H., Chi, W., Chai, X., Sun, X., & Xu, X. et al. (2016).** Chloroplast retrograde signal regulates flowering. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 113(38), 10708-10713.

**Haruta, M., & Sussman, M. (2012).** The Effect of a Genetically Reduced Plasma Membrane Protonmotive Force on Vegetative Growth of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(3), 1158-1171.

**Haruta, M., Gaddameedi, V., Burch, H., Fernandez, D., & Sussman, M. R. (2018).** Comparison of the effects of a kinase-dead mutation of FERONIA on ovule fertilization and root growth of Arabidopsis. *FEBS Letters*, 592, 2395–2402.

**Ilan, N. (1994).** External pH effects on the depolarization-activated K channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *The Journal Of General Physiology*, 103(5), 807-831.

**Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23–28.

**Kumimoto, R., Zhang, Y., Siefers, N., & Holt, B. (2010).** NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 63(3), 379-391.

**Li, L., Foster, C.M., Gan, Q., Nettleton, D., James, M.G., Myers, A.M., and Wurtele, E.S. (2009).** Identification of the novel protein QQS as a component of the starch metabolic network in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* 58: 485–498

**Li, L., Zheng, W., Zhu, Y., Ye, H., Tang, B., & Arendsee, Z. et al. (2015).** QQSorphan gene regulates carbon and nitrogen partitioning across species via NF-YC interactions. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(47), 14734-14739.

**Morsomme, P., & Boutry, M. (2000).** The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2), 1-16.

**Murashige, T. and Skoog, F. (1962).** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

**Myers, Z., & Holt, B. (2018).** NUCLEAR FACTOR-Y: still complex after all these years?. *Current Opinion In Plant Biology*, 45, 96-102.

**Naranjo, M. A., Romero, C., Bellés, J. M., Montesinos, C., Vicente, O., & Serrano, R.(2003).** Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta*, 217(3), 417–424.

**Niittylä, T., Fuglsang, A., Palmgren, M., Frommer, W., & Schulze, W. (2007).** Temporal Analysis of Sucrose-induced Phosphorylation Changes in Plasma Membrane Proteins of *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(10), 1711-1726.

**Obdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., & Fleischer, C. et al. (2004).** K<sup>+</sup> channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 12242–12247.

**Oñate-Sánchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. (2008).** DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, 1(1), 93.

**Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R, Larsson C. (1991).** Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *J Biol Chem*. 266(30):20470-5.

**Riera, M., Irar, S., Vélez-Bermúdez, I., Carretero-Paulet, L., Lumbreras, V., & Pagès, M. (2011).** Role of Plant-Specific N-Terminal Domain of Maize CK2 $\beta$ 1 Subunit in CK2 $\beta$  Functions and Holoenzyme Regulation. *Plos ONE*, 6(7), e21909.

**Robertson, W., Clark, K., Young, J., & Sussman, M. (2004).** An *Arabidopsis thaliana* Plasma Membrane Proton Pump Is Essential for Pollen Development. *Genetics*, 168(3), 1677-1687.

**Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R., Sommarin, M., & Larsson, C. (2000).** Evolution of the 14-3-3 Protein Family: Does the Large Number of Isoforms in Multicellular Organisms Reflect Functional Specificity?. *Journal Of Molecular Evolution*, 51(5), 446-458.

**Rudashevskaya, E., Ye, J., Jensen, O., Fuglsang, A., & Palmgren, M. (2011).** Phosphosite Mapping of P-type Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Homologous and Heterologous Environments. *Journal Of Biological Chemistry*, 287(7), 4904-4913.

**Sanchez, R., & Zhou, M. (2011).** The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends In Biochemical Sciences*.

**Sun, X., Feng, P., Xu, X., Guo, H., Ma, J., & Chi, W. et al. (2011).** A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nature Communications*, 2(1).

**Yuan, W., Zhang, D., Song, T., Xu, F., Lin, S., & Xu, W. et al. (2017).** *Arabidopsis* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes AHA2 and AHA7 have distinct and overlapping roles in the modulation of root tip H<sup>+</sup> efflux in response to low-phosphorus stress. *Journal Of Experimental Botany*, 68(7), 1731-1741.