



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Universitat Politècnica de València

ETSIAMN

Generación y caracterización de líneas de
Arabidopsis que expresan 35S::*KAT1-YFP*

Grado en Biotecnología

Curso académico 2020/21

Autor: Alejandro Navarro Martínez

Tutor: Dra. Lynne Yenush

Valencia, julio de 2021



Generación y caracterización de líneas de *Arabidopsis* que expresan 35S::*KAT1-YFP*

Autor: Alejandro Navarro Martínez

Tutor: Prof. Lynne Yenush

Licencia: *Creative Commons*, Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)

Valencia, julio de 2021

Resumen

El canal de potasio (K⁺) rectificador de entrada KAT1 se encuentra altamente expresado en la membrana plasmática de las células oclusivas. Allí, junto con su homólogo KAT2, juega un papel esencial para el aumento de turgencia de estas células, lo que permite la apertura del estoma. En investigaciones previas, se han identificado proteínas que interaccionan con el canal y regulan su transporte hasta la membrana plasmática, como BAG4 o VAMP721. No obstante, todavía faltan muchas piezas del puzle por caracterizar.

En este trabajo, hemos confirmado nuestra observación preliminar que sugería que líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con 35S::*KAT1-YFP*, sólo expresan la proteína KAT1-YFP en la membrana plasmática de las células oclusivas. Esta observación sugiere la existencia de un mecanismo de regulación de *KAT1* que provoca que la proteína sólo se exprese en un tipo celular. Además, también observamos que KAT1-YFP no es detectable en hojas viejas.

Con el objetivo de poder estudiar la regulación de KAT1 mediante microscopía confocal con mayor facilidad, se generaron líneas homocigotas *kat1 KAT1-YFP*. Se comprobó que estas líneas complementaban la función de KAT1, con lo que pueden considerarse funcionalmente equivalentes a una línea *wild type*.

Asimismo, se realizó un estudio de la expresión génica de 35S::*KAT1-YFP* mediante RT-qPCR en 2 líneas, comparando un tejido en el que se observa expresión de KAT1-YFP (parte aérea) con otro en que su expresión no es detectable (raíz). Se encontraron niveles significativos del transcrito en ambos tejidos, con lo que es improbable que la regulación de KAT1 que restringe la acumulación de KAT1 exclusivamente en las células oclusivas, ocurra a nivel de mRNA. También se realizó una inmunodetección de KAT1-YFP en ambos tejidos, y se comprobó que era posible detectarlo en parte aérea, mientras que los resultados en raíz fueron inconcluyentes.

Palabras clave: KAT1; 35S; *Arabidopsis thaliana*; regulación; células oclusivas; complementación funcional; RT-qPCR; inmunodetección

Generation and characterization of *Arabidopsis* lines expressing 35S::*KAT1-YFP*

Abstract

The inward-rectifying potassium (K⁺) channel KAT1 is highly expressed in the plasma membrane of guard cells. There, together with its homolog KAT2, it plays a key role in the increase of turgor of these cells, which helps drive stomatal aperture. In previous investigations, proteins which interact with this channel and regulate its trafficking towards the plasma membrane, have been identified, like BAG4 or VAMP721. However, there are still many puzzle pieces left for characterization.

In the present work, we confirmed our preliminary observation suggesting that *Arabidopsis thaliana* lines transformed with 35S::*KAT1-YFP* only express the protein KAT1-YFP on the plasma membrane of guard cells. This observation suggests that a regulatory mechanism exists for *KAT1* that is responsible for the expression of the protein in a single cell type. In addition, we also observed that KAT1-YFP is not detectable in old leaves.

With the goal of being able to study the regulation of KAT1 by confocal microscopy more easily, homozygous *kat1 KAT1-YFP* lines were generated. Functional complementation of KAT1 was verified in these lines, so they can be considered functionally equivalent to a wild type line.

Moreover, a gene expression study of 35S::*KAT1-YFP* by RT-qPCR was performed in 2 lines, comparing a tissue where KAT1-YFP expression is observed (aerial part) with another one where its expression is not detectable (root). Significant levels of the transcript were found in both tissues, so it is unlikely that the regulation of KAT1 that restricts the accumulation of KAT1 exclusively in guard cells occurs at the level of mRNA. An immunodetection of KAT1-YFP in both tissues was carried out as well, and detection in the aerial part was confirmed, while the results for the root tissue were inconclusive.

Keywords: KAT1; 35S; *Arabidopsis thaliana*; regulation; guard cells; functional complementation; RT-qPCR; immunodetection

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a toda la gente del laboratorio. No ha dejado de sorprenderme ningún día la cantidad de entusiasmo que se puede respirar en un sitio al que “se va a trabajar”. Gracias a Pilar por ser la técnico de laboratorio más eficiente que conozco. A Laura y Sergio, por estar siempre dispuestos a resolver cualquier duda que pudiera tener. A Maria y Silvia, por crear el mejor ambiente de laboratorio posible (y por las fotos de YFP xd). Gracias a Nuria por su insuperable capacidad para explicar y por entrar al laboratorio todos los días con las pilas al 200%. Gracias a Rosa por apoyarme con toda la experiencia que a mí, desde luego, me falta, y por enseñarme tanto. Y sobre todo, gracias a Lynne por ilusionarse con cada paso del proyecto, por haberme guiado tan acertadamente, y por respaldarme con tanta dedicación. Puedo decir con seguridad que he estado trabajando con un equipo excepcional.

También le quiero dar las gracias a Adrià, por aguantar a este cráneo privilegiado desde primero de carrera; y a Sara, por romper el hielo (y un poco lo del cráneo también); y a Ester, por su cráneo. También le agradezco el haber cambiado mi vida por completo, y el haberme hecho olvidar que las personas pueden “sentirse aburridas” de vez en cuando. Tampoco voy a dejar sin mencionar a mis padres, que me han animado para que siga adelante con mis estudios desde el primer día; y a mi hermano, con el que comparto una vida entera.

Índice

1	Introducción	1
1.1	El potasio en las plantas	1
1.2	Proteínas transportadoras de potasio	1
1.3	Canales de K ⁺ regulados por voltaje de plantas.....	2
1.4	KAT1 y la apertura estomática.....	3
1.5	Regulación de KAT1	4
2	Objetivos.....	5
3	Materiales y métodos.....	5
3.1	Material vegetal y crecimiento	5
3.2	Microscopía confocal	6
3.3	Prueba de segregación.....	6
3.4	Ensayos de complementación funcional	6
3.4.1	Velocidad de crecimiento.....	6
3.4.2	Tolerancia a litio	6
3.4.3	Tolerancia a bajo potasio.....	7
3.5	Obtención de muestras para RT-qPCR	7
3.6	PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)	7
3.7	Fraccionamiento e inmunodetección de proteínas	8
4	Resultados.....	8
4.1	Caracterización del patrón de expresión de KAT1-YFP	8
4.2	Obtención de líneas <i>kat1 KAT1-YFP</i> homocigotas	12
4.3	Ensayos de complementación funcional	14
4.3.1	Velocidad de crecimiento.....	14
4.3.2	Tolerancia a litio	15
4.3.3	Tolerancia a bajo potasio.....	17
4.4	RT-qPCR.....	19
4.4.1	Caracterización de <i>primers</i>	19
4.4.2	Análisis de expresión de <i>KAT1-YFP</i> en parte aérea y raíz.....	21
4.5	Fraccionamiento e inmunodetección de KAT1-YFP	24
5	Discusión.....	26
6	Conclusiones	28
7	Bibliografía.....	30
8	Anexos	33
8.1	Datos RT-qPCR.....	33

Índice de figuras

Figura 1. Filogenia de los canales de K ⁺ de <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
Figura 2. Diagrama de una subunidad α de un canal de K ⁺ regulado por voltaje de plantas.....	3
Figura 3. Diagrama del proceso de apertura y cierre estomático.....	4
Figura 4. Patrón de expresión de 35S:: <i>KAT1-YFP</i> respecto a 35S:: <i>YFP</i> en epidermis de la hoja.....	9
Figura 5. Observación de KAT1-YFP en distintos tejidos.....	10
Figura 6. <i>Lambda scan</i> de la fluorescencia detectada en un estoma.....	11
Figura 7. Observación de KAT1-YFP en hojas con distinta longevidad.....	12
Figura 8. Ejemplo de prueba de segregación.....	13
Figura 9. Resultados del ensayo de complementación funcional de velocidad de crecimiento.....	14
Figura 10. Evaluación fenotípica del ensayo de complementación funcional de tolerancia al litio.....	15
Figura 11. Análisis del peso fresco de las plantas del ensayo de complementación funcional de tolerancia a litio.....	17
Figura 12. Análisis del ensayo de complementación funcional de tolerancia a bajo potasio.....	19
Figura 13. Curvas estándar para el cálculo de la eficiencia de los <i>primers</i> de <i>HPH</i> y <i>KAT1-YFP</i>	21
Figura 14. Comprobación de la integridad de las muestras extraídas de RNA.....	22
Figura 15. Expresión relativa de <i>KAT1-YFP</i> en parte aérea respecto a raíz, en los fondos genéticos WT y <i>kat1</i>	24
Figura 16. Inmunodetección de KAT1-YFP en parte aérea y raíz, en los fondos genéticos WT y <i>kat1</i>	25

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados de la prueba de segregación para las distintas líneas evaluadas.....	13
Tabla 2. Concentración y pureza de las muestras extraídas de RNA.....	22

Abreviaturas

- ABA Ácido abscísico
- AHA3 H⁺-ATPasa 3
- Ank *Ankyrin repeats*
- CNBD *Cyclic Nucleotide Binding Domain*
- Col-0 Columbia
- Cq Ciclo de cuantificación
- Eff% Eficiencia
- ER Expresión relativa
- GADPH *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit*
- HPH *Hygromycin-B-phosphotransferase protein*
- LSB *Laemmli Sample Buffer*
- m/v Porcentaje masa por volumen
- MAE MOPS-Acetate-EDTA
- MS *Murashige and Skoog medium*
- N Número de individuos
- P P-value
- PA Parte aérea
- PAGE *Polyacrylamide gel electrophoresis*
- PBS *Phosphate-Buffered Saline*
- PD *Pore Domain*
- Pnos *Nopaline Synthase promoter*
- R Raíz
- TTBS *Tween-Tris-Buffered Saline*
- v/v Porcentaje volumen por volumen
- VGK *Plant Voltage-Gated K⁺ channels*
- VSD *Voltage Sensor Domain*
- WT *Wild type*
- YFP *Yellow Fluorescent Protein*
- α Anti

1 Introducción

1.1 El potasio en las plantas

El potasio (K^+) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo vegetal. Es el catión más abundante en las células vegetales, suponiendo un 2-10% del peso seco de la planta (Leigh and Jones, 1984). La concentración citoplasmática del ion suele encontrarse alrededor de 100 mM, mientras que la de las vacuolas puede variar entre 10 mM y 200 mM en función de la cantidad de K^+ en el medio y del tipo de tejido (Leigh and Jones, 1984; Walker et al., 1996). Entre sus funciones se encuentran la activación enzimática, la neutralización de aniones, el mantenimiento del aparato fotosintético y la translocación de productos de asimilación (Nieves-Cordones et al., 2016; Zhao et al., 2001; Hartt, 1969). También es responsable de la generación de presión de turgencia para permitir la apertura estomática, los movimientos foliulares o la expansión celular (Nieves-Cordones et al., 2016; Schroeder, 2003; Elumalai et al., 2002).

Dadas todas las funciones que cumple este nutriente, las plantas han desarrollado mecanismos para poder abastecer a todas sus células, y también para regular su concentración en los procesos que lo requieran. Por ejemplo, deben ser capaces de captar K^+ del suelo encontrándose este a altas o bajas concentraciones, transportarlo a través del xilema al resto de tipos celulares, y poder almacenarlo en las vacuolas. También hay procesos que pueden requerir expulsar K^+ de las células, como la oclusión estomática o los movimientos foliulares (Nieves-Cordones et al., 2016). Todos estos procesos son posibles gracias a los distintos canales y transportadores de K^+ presentes en plantas.

1.2 Proteínas transportadoras de potasio

Se puede distinguir entre canales, poros selectivos a través de los cuales se transportan iones de forma pasiva; y transportadores, proteínas que sufren cambios de conformación para realizar el transporte, con lo que tienen una velocidad de acción inferior a la de los canales, y que pueden llevar a cabo transporte pasivo o activo.

En cuanto a los transportadores de K^+ , existen 3 familias principales: KT/HAK/KUP, HKT y CPA (Gierth and Mäser, 2007). Los transportadores de la familia KT/HAK/KUP son homólogos de los KUP (*K^+ uptake permeases*) de bacterias y de los HAK (*high-affinity K^+ transporters*) de hongos. KT es otra nomenclatura que se ha empleado para referirse a estas proteínas en plantas. Destaca HAK5 de *Arabidopsis*, que juega un papel importante en la absorción de K^+ en raíces (Gierth et al., 2005). Los HKTs (*high-affinity K^+ transporters*) son análogos de los transportadores Trk de hongos, y algunos como HKT1 son simportadores tipo Na^+/K^+ (Rubio et al., 1995). Por último, entre los CPA (*cation proton antiporters*) destacan los antiportadores tipo $Na^+,K^+/H^+$ NHX1 y NHX2, relevantes en hojas para la incorporación de K^+ en las vacuolas (Barragán et al., 2012).

Pasando a los canales de K^+ , se pueden apreciar otras 3 familias: TPK (*tandem-pore K^+*), Kir-like (*inward rectifier*) y VGK (*Plant Voltage-Gated K^+ channels*; canales de K^+ regulados por voltaje de plantas) (Lebaudy et al., 2007; Wang and Wu, 2013). Este último grupo es habitualmente conocido como “canales Shaker de plantas”, pero en el estudio de Jegla et al. (2018) se demuestra haciendo análisis filogenéticos y estructurales que los Shaker de animales y los de plantas presentan antepasados distintos, con lo que dicha nomenclatura es incorrecta. Funcionalmente, los TPK y los

Kir-like son muy poco sensibles a las diferencias de potencial. Se han identificado 5 TPKs y 1 Kir-like (Fig. 1). Estas 2 familias son bastante jóvenes y todavía no hay muchos estudios al respecto. No obstante, se ha visto que TPK1 se encuentra en el tonoplasto y cumple un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis del K⁺ entre citosol y vacuola (Gobert et al., 2007). Los canales regulados por voltaje son los mejor caracterizados.

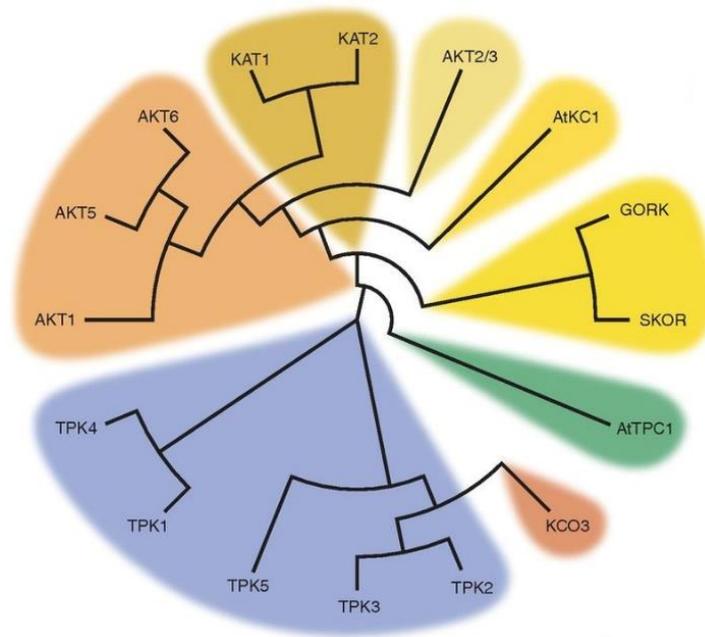


Figura 1. Filogenia de los canales de K⁺ de *Arabidopsis thaliana*.

En el genoma de *Arabidopsis* hay codificados 15 canales de K⁺ en total, más el canal no selectivo de cationes AtTPC1 (*two-pore channel*). En azul se encuentran los 5 canales TPK (*tandem-pore K⁺*), y en rojo el único Kir-like (*inward rectifier*; KCO3). Hay 9 canales VGK (*Plant Voltage-Gated K⁺ channels*), que se clasifican funcionalmente en 5 grupos: empezando por el clado de AKT1, AKT5 y AKT6 y siguiendo en sentido horario, se encuentran Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 y Grupo 5. Imagen modificada de Hedrich (2012).

1.3 Canales de K⁺ regulados por voltaje de plantas

Estructuralmente, estos canales están formados por 4 subunidades α , que pueden estar codificadas por el mismo gen (homotetrámeros) o por genes distintos (heterotetrámeros). Estas subunidades α consisten en una región transmembrana que contiene 2 dominios: VSD (*voltage sensor domain*) y PD (*pore domain*); y en otra región citoplasmática que presenta al menos 2 dominios: CNBD (*cyclic nucleotide binding domain*) y C-linker (Fig. 2) (Jegla et al., 2018). El dominio VSD a su vez contiene 4 dominios transmembrana S1-S4, presentando aminoácidos básicos en S4 que permiten detectar cambios en el voltaje. PD está compuesto por otros 2 dominios transmembrana, S5-S6, y está encargado de formar el poro y el filtro de selectividad iónica. El dominio CNBD tiene función reguladora, y está unido a PD por un dominio conservado C-linker, que a su vez forma un anillo en la cara citoplasmática de la membrana. Unido a CNBD, también puede haber un dominio Ank (*Ankyrin repeats*), de interacción proteína-proteína.

Hay identificados 9 canales de este tipo (Fig. 1), y todos se localizan en la membrana plasmática. Se puede hacer una clasificación funcional en 4 grupos distintos (Pilot et al., 2003; Nieves-Cordones et al., 2016). Los grupos 1 y 2 consisten en 5 canales rectificadores de entrada (*inward-rectifying*): AKT1, SPIK y AKT6 (grupo 1); KAT1 y

KAT2 (grupo 2). Estos se activan a potenciales de membrana hiperpolarizados y median la captación de K^+ . El grupo 5 está compuesto por 2 canales rectificadores de salida (*outward-rectifying*): SKOR y GORK, que se abren a potenciales de membrana despolarizados y median la expulsión de K^+ . En el grupo 3 se encuentra el canal rectificador débil AKT2/3, que puede encontrarse en 2 estados distintos: uno en el que actúa como rectificador de entrada, y otro en el que permanece abierto independientemente del potencial de membrana. Finalmente, el grupo 4 lo compone AtKC1, que es incapaz de formar canales funcionales por sí mismo, pero que puede formar heterómeros con los canales rectificadores de entrada y el rectificador débil, regulando su actividad.

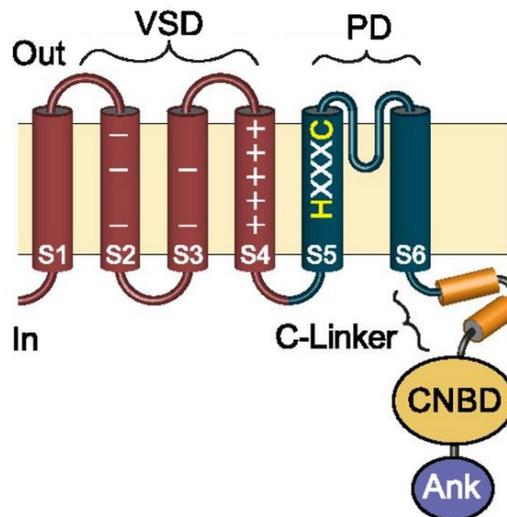


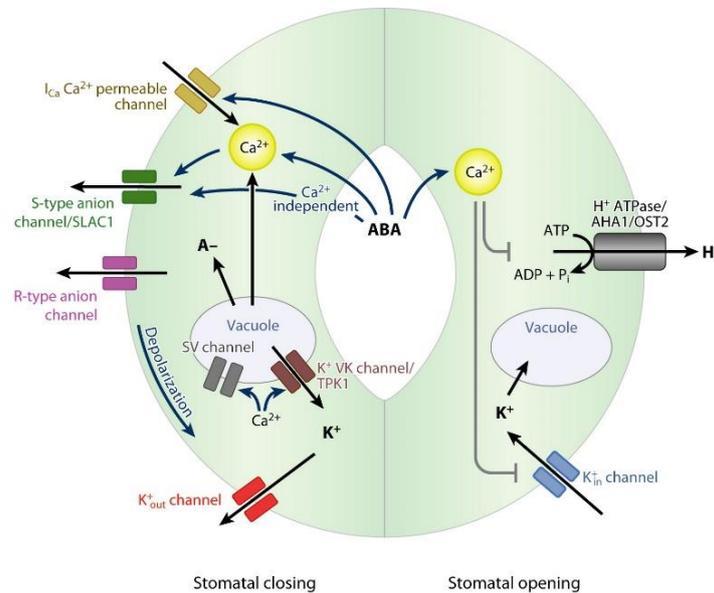
Figura 2. Diagrama de una subunidad α de un canal de K^+ regulado por voltaje de plantas. Se indican los dominios VSD (*voltage sensor domain*) y PD (*pore domain*) con sus respectivos dominios transmembranales. En VSD, se marca la carga de cada uno de estos dominios: (+) para detectar voltaje y (-) para estabilizar la estructura. En PD, también se indica un motivo conservado en estos canales, que no se encuentra en los parecidos canales Shaker. Finalmente, la estructura citoplasmática formada por C-linker, CNBD (*cyclic nucleotide binding domain*) y el posible dominio Ank (*Ankyrin repeats*). Imagen modificada de Jegla et al. (2018).

1.4 KAT1 y la apertura estomática

Los estomas son estructuras presentes en las hojas que consisten en un par de células oclusivas que protegen un poro, a través del cual el CO_2 puede difundir al interior de la planta, al mismo tiempo que se pierde agua por transpiración. KAT1 es un canal de K^+ rectificador de entrada regulado por voltaje, y se expresa sobre todo (junto con KAT2) en la membrana plasmática de las células oclusivas. Por tanto, es el principal responsable de la entrada de K^+ a estas células, lo que resulta imprescindible para la apertura estomática.

Brevemente, el fundamento de los movimientos estomáticos se puede explicar de la siguiente manera (Fig. 3) (Pandey et al., 2007). El movimiento de apertura estomática empieza cuando las bombas H^+ -ATPasa de la membrana plasmática expulsan H^+ del citosol, lo que hiperpolariza la membrana. Esto activa los canales de K^+ regulados por voltaje rectificadores de entrada, principalmente KAT1 y KAT2, con lo que iones K^+ entran a la célula. Además de por el K^+ , la osmolaridad interna también aumenta por la acumulación de malato²⁻ procedente de la digestión de almidón, y por la entrada de Cl^- y NO_3^- mediante transportadores. Esta alta concentración de solutos induce la entrada de agua, aumentando la presión de turgencia de las células oclusivas y así abriendo el

estoma. En el proceso de cierre, se inactivan las bombas H^+ -ATPasa y se activan canales de salida de Cl^- , NO_3^- y malato $^{2-}$, provocando una despolarización de la membrana. Esto conlleva la activación de los canales de K^+ regulados por voltaje rectificadores de salida, principalmente GORK, de manera que sale K^+ de la célula. Se expulsa también agua debido a la pérdida de osmolaridad y, por tanto, se pierde presión de turgencia y se cierra el estoma.



Kim T-H, et al. 2010.
Annu. Rev. Plant. Biol. 61:561–91

Figura 3. Diagrama del proceso de apertura y cierre estomático.

Se indican los flujos de solutos y el proceso de señalización. En el proceso de apertura (derecha), se activa H^+ -ATPasa, hiperpolarizando la membrana. Esto activa a los canales de K^+ rectificadores de entrada, con lo que entran cationes K^+ en las células oclusivas, aumentando su osmolaridad e induciendo la entrada de agua. El ácido abscísico (ABA) hace aumentar la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, lo que inhibe la apertura estomática y, por lo contrario, estimula el cierre (izquierda). En el cierre, se activan los canales de salida de aniones, lo que despolariza la membrana y activa los canales de K^+ rectificadores de salida. Esto baja la osmolaridad y se pierde agua. También se muestra el papel de la vacuola de almacenar solutos durante la apertura, y de expulsarlos en el cierre. Imagen modificada de Kim et al. (2010).

1.5 Regulación de KAT1

En distintas investigaciones, se han caracterizado varios mecanismos de regulación de KAT1 a nivel de proteína. Se conoce que el tratamiento con la fitohormona ácido abscísico (ABA) induce la internalización de KAT1 en vesículas endocíticas, tanto en células oclusivas como epiteliales (Sutter et al., 2007). Una menor presencia de canales de K^+ rectificadores de entrada en las células oclusivas reduce su capacidad para transportar K^+ a su interior, con lo que se dificulta la apertura estomática. Este hallazgo se llevó a cabo observando en el microscopio confocal hojas de tabaco que expresaban transitoriamente (no líneas estables) una proteína de fusión KAT1-GFP. Una vez que la concentración de ABA disminuye, las proteínas KAT1 presentes en las vesículas pueden ser devueltas a la membrana plasmática. Este proceso de transporte hacia la membrana está mediado por una proteína de la familia SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptors*) llamada SYP121 (Sutter et al., 2006).

Dentro de la familia SNARE, se encuentra la subfamilia de proteínas VAMP (Vesicle-Associated Membrane Proteins), que como su nombre indica, también juegan un papel importante en el tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática. En el trabajo de Zhang et al. (2015), se observó que VAMP721 interacciona con KAT1, y cuando lo hace, el flujo de cationes K^+ hacia el interior celular decrece. Por otro lado, nuestro grupo investigador demostró que la proteína BAG4 (*BCL2-associated athanogene 4*) interacciona con KAT1, y que participa en el transporte de éste hasta la membrana plasmática (Locascio et al., 2019). También se ha descrito que las proteínas 14-3-3 regulan la actividad de KAT1, bien promoviendo el transporte de los canales desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática (como SYP121 y BAG4), o bien cambiando sus propiedades cinéticas al aumentar la probabilidad de apertura (Sottocornola et al., 2008).

La realización de estos estudios de regulación de la actividad de KAT1, sería mucho más sencilla si se dispusiera de líneas que expresaran de manera estable KAT1 fusionado a una proteína fluorescente. De esta manera, se podría llevar el seguimiento de cambios en la localización subcelular o de la degradación de la proteína observando la planta directamente, sin tener que realizar un proceso de agroinfiltración previo, por ejemplo. Teniendo esto en mente, nuestro grupo de investigación generó líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con 35S::*KAT1-YFP*, esto es, el gen que codifica para la proteína de fusión KAT1-YFP (fusión a proteína fluorescente amarilla) regulado por el promotor fuerte constitutivo CaMV35S (Amack and Antunes, 2020). No obstante, al observar dichas líneas en el microscopio confocal, el patrón de expresión de KAT1-YFP no era el propio de un promotor constitutivo, sino que sólo se detectó la proteína en la membrana plasmática de las células oclusivas. En base a esto, se diseñó el proyecto presentado en este trabajo, con la finalidad de obtener más información sobre este fenómeno.

2 Objetivos

Los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Caracterizar las líneas transformadas con 35S::*KAT1-YFP* en lo que respecta a la expresión de la proteína KAT1-YFP. En qué estadios, tejidos, tipos celulares y orgánulos se expresa.
2. Obtener líneas mutantes *kat1* transformadas con *KAT1-YFP* en homocigosis, procedentes de eventos de transformación distintos. Comprobar si dichas líneas recuperan el fenotipo de la línea *wild type*, para confirmar si las observaciones de KAT1-YFP realizadas con estas líneas son extrapolables a KAT1 en la línea *wild type*.
3. Analizar la expresión del transcrito y de la proteína de KAT1-YFP en parte aérea y raíz, para empezar a discernir cuál es el mecanismo responsable de que sólo se observe la proteína KAT1-YFP en células oclusivas.

3 Materiales y métodos

3.1 Material vegetal y crecimiento

Se emplearon las siguientes líneas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*): el ecotipo Columbia (Col-0) como fondo genético *wild type* (WT), y el mutante *kat1* con número de

accesión SALK093506 en el *Arabidopsis Biological Resource Center*. También se emplearon líneas WT y *kat1* transformadas con un plásmido que contiene las construcciones 35S::*KAT1-YFP* y Pnos::*HPH* (gen de resistencia a la higromicina B). Se consiguieron líneas homocigotas para los transgenes.

Para cultivo *in vitro* se empleó medio *Murashige and Skoog* (MS) 0,5 o 1X (según el caso), suplementado con sacarosa 1% (m/v), MES 0,05% (m/v) y ajustado a pH 5,7. Para obtener MS sólido, se empleó fitoagar 0,8% como gelificante. Previo a la siembra, las semillas fueron incubadas en solución de desinfectado (lejía 50% (v/v), Tritón X-100 0,05% (v/v)) en agitación durante 15 minutos, lavadas y estratificadas en agua a 4°C durante 2 días. Las plantas fueron crecidas a 24°C en un fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad (día largo).

En el caso de querer conseguir plantas adultas de alguna línea, se trasplantaron plantas de 2 semanas al siguiente sustrato de *Arabidopsis*: turba DSM 50%, perlita 25% y vermiculita 25%. Las plantas fueron crecidas a 24 °C en día largo.

3.2 Microscopía confocal

Se prepararon muestras frescas, principalmente de hojas, de plantas transformadas con *KAT1-YFP* o con *YFP*, y se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia Zeiss. YFP fue excitado con un láser de argón (514 nm) y detectado a 516-548 nm. La autofluorescencia de los cloroplastos fue detectada entre 675 y 760 nm. Se realizaron *lambda scans* (obtener el espectro de emisión de cada píxel de la imagen) para comprobar si la señal correspondía a YFP (longitud de emisión máxima: 527 nm).

3.3 Prueba de segregación

Se recogieron aproximadamente 100 semillas de cada línea a evaluar, más un control negativo (línea sin gen *HPH*) y otro positivo (línea homocigota para gen *HPH*), y se sembraron en placas de MS 0,5X suplementado con higromicina (25 µg/mL). Se incubaron las placas a 24 °C en oscuridad durante 4 días. Para cada línea, se anotó el número de plantas capaces de elongar el hipocótilo en oscuridad respecto al total, y se calculó la proporción. Las semillas que no germinaron no se incluyeron en el recuento.

3.4 Ensayos de complementación funcional

3.4.1 Velocidad de crecimiento

Una línea *kat1* transformada con *KAT1-YFP*, y sus respectivas líneas control, fueron sembradas individualmente en 1 mL de MS 1X. De cada línea, se sembraron 2 tandas de 36 individuos. Las plantas fueron crecidas a 24 °C en día largo. A los 11 días, se cuantificó el número de individuos con un primer par de hojas verdaderas desarrollado.

3.4.2 Tolerancia a litio

Líneas *kat1* transformadas con *KAT1-YFP*, y sus respectivos controles, fueron sembradas en placas de MS 0,5X. Cuando las plantas presentaban el primer par de hojas verdaderas (8 días), fueron trasplantadas individualmente a 1 mL de MS 0,5X. Se trasplantaron 4 individuos de cada genotipo para el grupo control y el de tratamiento. Cuando las plantas presentaban el segundo par de hojas verdaderas (3 días más tarde), se marcaron los individuos estresados por el proceso de trasplante, y se sustituyó el medio del grupo de tratamiento por 1 mL de MS 0,5X suplementado con LiCl 12 mM. 4

días más tarde se fotografiaron las plantas, se separó la parte aérea y se midió el peso fresco de ésta. Los análisis estadísticos se realizaron en R (R Core Team, 2020).

3.4.3 Tolerancia a bajo potasio

Líneas *kat1* transformadas con *KAT1-YFP*, y sus respectivos controles, fueron sembradas en placas cuadradas de agarosa 1% con medio de sales mínimas (micronutrientes MS 1X, sacarosa 0,3%, NaNO₃ 2 mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 1 mM, MES 0,05% y pH 5,7), suplementado con NH₄Cl 2 mM y distintas concentraciones de KCl (1, 0,1 y 0,01 mM). Para cada concentración de KCl, se sembraron al menos 4 individuos de cada genotipo. Se incubaron las placas en vertical, a 24°C en día largo. A los 7 días, se midió la longitud radicular con el *software* ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Los análisis estadísticos se realizaron en R.

3.5 Obtención de muestras para RT-qPCR

Se sembraron individualmente en 1 mL de MS 1X plantas suficientes para conseguir 200 mg de raíces. A los 18 días, se cosecharon las plantas, se recogieron en tubos de 2 mL muestras de 100 mg de parte aérea y de 200 mg de raíces (en este estadio, 18 individuos equivalen a 200 mg de raíz) y se congelaron en N₂ líquido. Se trituraron las muestras introduciendo 4-5 cuentas de vidrio en cada tubo, y dando pulsos de 30 s a 30 Hz en un molino mezclador Retsch, congelando las muestras en N₂ líquido entre pulsos.

Se realizó la extracción de RNA empleando el kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel), que se basa en el empleo de una solución con una alta concentración de iones caotrópicos, que inactiva las RNasas y favorece la unión del RNA a una membrana de sílice, además de en el uso de DNasa para eliminar el DNA. Se evaluó la integridad de las muestras separándolas en un gel de agarosa 0,8% con tampón MAE (MOPS 20 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM y pH 7) y formaldehído 2,2 M, y se midió la concentración y pureza con un espectrofotómetro NanoDrop.

Se sintetizó cDNA a partir de 500 ng de RNA empleando el PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio), que utiliza tanto oligo dTs como hexámeros aleatorios como *primers*, y se realizó una dilución 1/5 del material.

3.6 PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)

Las reacciones de qPCR se prepararon con 5X PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX; CultiGen), que, entre otros, contiene una DNA polimerasa *hot start*, y emplea el tinte EvaGreen para cuantificar y el tinte Rox como referencia interna. Se añadieron *primer* directo y reverso a 200 nM, y se cargó 1 µL de cDNA en un volumen total de 20 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un QuantStudio 3 (ThermoFisher) siguiendo el siguiente programa: activación de la *hot start* DNAPol y desnaturalización (15 min a 95°C), 40 ciclos de amplificación (15 s a 95°C, 30 s a 57 °C y 30 s a 72 °C) y curva de *melting* (15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, calentamiento hasta 95 °C a 0,1 °C/s y 15 s a 95 °C).

La eficiencia de los *primers* se determinó realizando diluciones 1/5 de un molde de cDNA para construir curvas estándar con 5 puntos. Se realizaron 2 réplicas técnicas de cada dilución, más un control negativo de amplificación. Se construyó la curva estándar con el *software* *Design and Analysis* (ThermoFisher), se evaluó su calidad con el parámetro R² y se calculó la eficiencia a partir de la pendiente de la recta.

En el análisis de expresión se realizaron 3 réplicas técnicas de cada reacción. En cada muestra se amplificó el gen *GADPH* como control endógeno. También se amplificaron

los genes *HPH* y *KAT1-YFP*, y se añadieron controles negativos para cada gen amplificado. Se analizaron los resultados comparando los ΔCq en cada caso, y realizando cuantificación relativa con el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los *primers* empleados fueron: para *GADPH*, 5'-CAATGAAGGACTGGAGAGGTG-3' (directo) y 5'-TCCCTTGAGTTTGCCTTCG-3' (reverso); para *HPH*, 5'-GGCTCCAACAATGTCCTGAC-3' (directo) y 5'-CTCCATACAAGCCAACCACG-3' (reverso); y para *KAT1-YFP*, 5'-AATGCGGACAACGCTGAGAT-3' (directo) y 5'-TGAACAGCTCCTCGCCCTT-3' (reverso).

3.7 Fraccionamiento e inmunodetección de proteínas

Se cosecharon 400 mg de parte aérea y de raíz de cada genotipo analizado y se congelaron en N₂ líquido. Las muestras de parte aérea se recogieron en tubos de 1,5 mL y se homogeneizaron empleando una mano de mortero, mientras que para las de raíz se siguió el método descrito en el apartado 3.5. Los 400 mg de material se resuspendieron en 800 μ L de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 2 mM) con *Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche; 1 tableta/10 mL), en hielo. Se realizaron 2 centrifugaciones a 10000 g y 4 °C para eliminar restos sólidos. Se realizó una ultracentrifugación a 4 °C, 33000 rpm y 1 hora para separar la muestra en fracción soluble e insoluble. Se recuperó la fracción insoluble resuspendiendo el *pellet* en 50 μ L de LSB 2,5X (Tris-HCl 250 mM, SDS 10% (m/v), glicerol 25% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v), 2-mercaptoetanol 12,5% (v/v) y pH 6,8).

Debido a diferencias en el rendimiento de la extracción de proteínas, se ajustó la concentración de las muestras y se cargaron 40 μ L en un gel de SDS-PAGE 8%. Se separaron las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron con Direct Blue 71 (Sigma-Aldrich). Se destiñó la membrana y se incubó en solución de bloqueo, compuesta por TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (v/v) y pH 7,6) con leche desnatada 2% (m/v). La membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-KAT1 (1/1000, Agrisera) y con el secundario anti-conejo HRP (1/5000, ThermoFisher), intercalando lavados con TTBS. Los inmunocomplejos fueron detectados con el *Superbright ECL detection kit* (Agrisera).

Para tener un control de carga de proteína en cada carril, se realizó una deshíbrida de los anticuerpos en solución de *stripping* (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2% (m/v), 2-mercaptoetanol 100 mM y pH 6,7) a 50 °C durante 30 minutos. Se volvió a bloquear la membrana y se incubó con el anticuerpo primario anti-AHA3 cedido por el laboratorio del Profesor Ramón Serrano (1/10000) y con el secundario anti-rabbit HRP (1/10000, ThermoFisher). La detección se realizó con el kit *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (ThermoFisher).

4 Resultados

4.1 Caracterización del patrón de expresión de KAT1-YFP

En nuestro grupo de investigación, ya se habían obtenido líneas transformadas con 35S::*KAT1-YFP* que, por tanto, expresan KAT1-YFP de manera estable, y se habían observado en el microscopio confocal. En experimentos preliminares, se observó que sólo había señal detectable de YFP en la membrana plasmática de las células oclusivas de las hojas. En este trabajo, expandimos dicha observación evaluando distintos tejidos y estadios en más líneas y en distintos fondos genéticos.

En primer lugar, se confirmó que este patrón de expresión es aberrante para el promotor 35S, que es constitutivo. Para ello, se observó en el microscopio confocal una línea WT transformada con 35S::YFP, conseguida en un proyecto paralelo del grupo de investigación. En ella, se detectó YFP siguiendo un patrón de expresión esperable de un gen bajo control del promotor 35S (Fig. 1). Se identificó señal tanto en células epiteliales como en oclusivas; y dentro de ellas, en citosol y núcleo (YFP presenta un tamaño de 22 kDa, con lo que puede introducirse en el núcleo). En contraposición, se observaron varias líneas de fondos genéticos WT y *kat1* transformadas con 35S::KAT1-YFP, obtenidas de eventos de transformación distintos, y en todas ellas se confirmó la observación de YFP únicamente en la membrana plasmática de las células oclusivas. Concretamente, del fondo WT se observaron plantas de 2 eventos de transformación (2 y 7); y del fondo *kat1*, plantas de 6 eventos (2, 4, 5, 6 y 11).

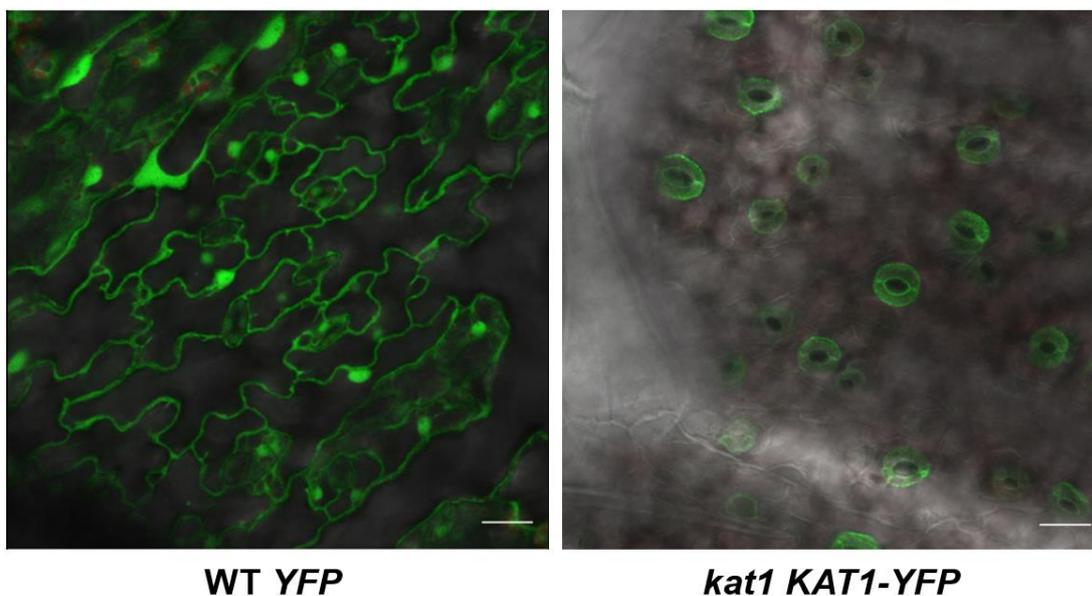


Figura 4. Patrón de expresión de 35S::KAT1-YFP respecto a 35S::YFP en epidermis de la hoja. La imagen de la izquierda corresponde a un fondo genético wild type (WT) transformado con 35S::YFP, de una planta de 30 días. La de la derecha es de un fondo genético *kat1* transformado con 35S::KAT1-YFP, de una planta de 39 días. Ambas imágenes son de la epidermis del envés de una hoja. Ambos especímenes se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia para detectar la presencia de YFP (máximo de emisión a 527 nm). Barras = 20 μ M.

A continuación, se realizó un estudio exhaustivo en una planta WT *KAT1-YFP* para buscar señal de KAT1-YFP en otros tejidos (Fig. 2). Se evaluaron raíz, parénquima del sépalo, pétalo, estigma y polen; todos con resultado negativo. Se confirmó la observación en estomas de las hojas, y adicionalmente se observó en estomas del sépalo. Para realizar estos análisis fue esencial realizar *lambda scans* de las imágenes, ya que en algunas se detectó fluorescencia en el rango de 515 a 548 nm, que no pertenecía a YFP. En la Figura 3 se ilustra uno de estos análisis, con resultado positivo, al comprobar que la fluorescencia presenta un máximo de emisión a 527 nm.

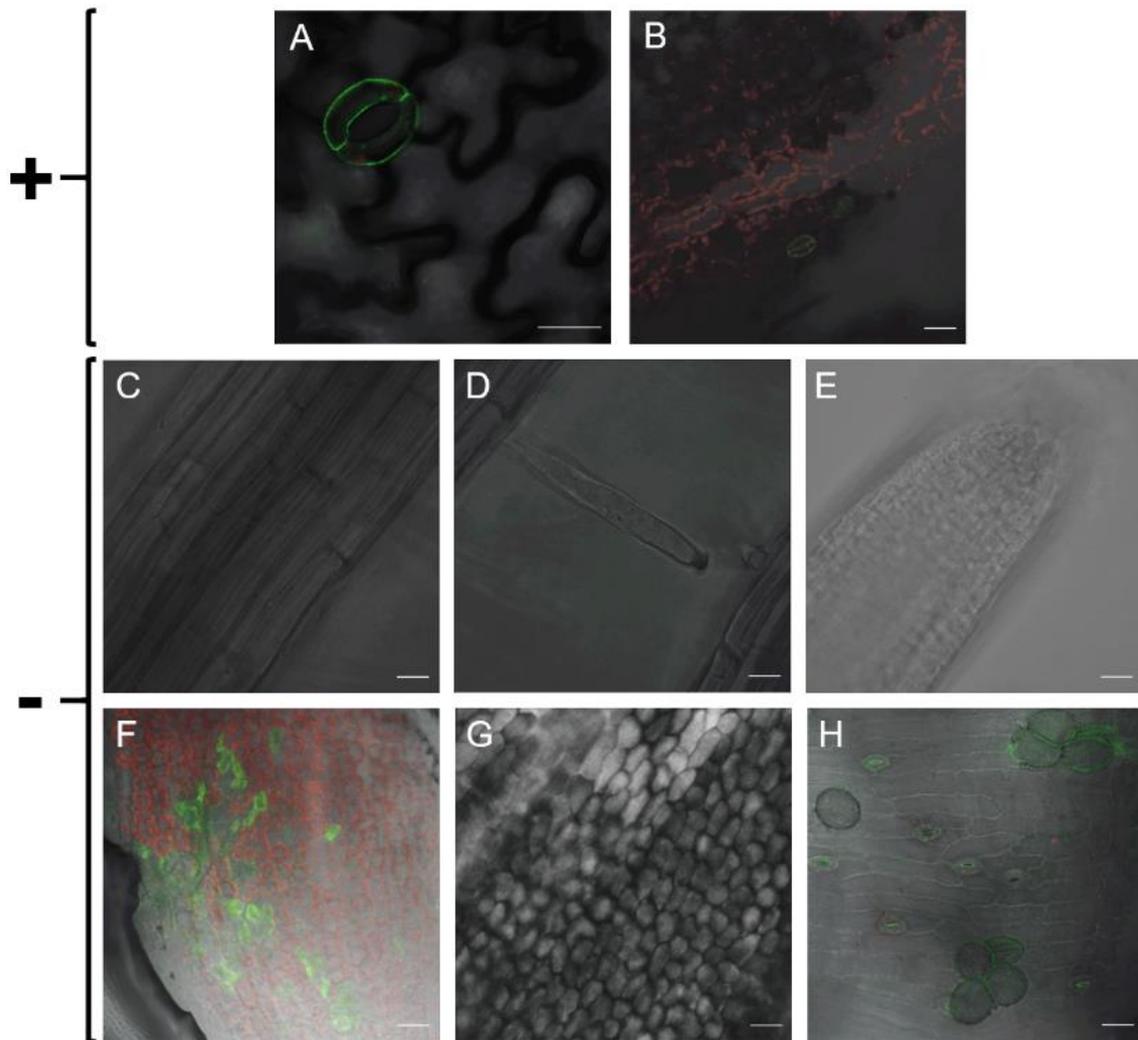


Figura 5. Observación de KAT1-YFP en distintos tejidos.

Se observó en el microscopio confocal de fluorescencia una planta de genotipo *wild type* transformada con *KAT1-YFP*, de 32 días. Se prepararon muestras de distintos tejidos y se analizaron. **(A)** Envés de la epidermis de una hoja. Se detectó YFP en células oclusivas, como se ha descrito anteriormente. **(B)** Sépalo. Se detectó señal únicamente en estomas. **(C)** Raíz. No se detectó señal en ningún tipo celular. Tampoco en pelo radicular **(D)** ni en la zona apical **(E)**. **(F)** Sépalo. Se detectó fluorescencia en el rango 515-548 nm en células parenquimáticas, pero no correspondía a YFP. **(G)** Pétalo. No se detectó fluorescencia en ningún tipo celular. **(H)** Estigma. Se detectó fluorescencia en el rango 515-548 nm en estomas y en granos de polen, pero en este último caso, no correspondía a YFP. Barras = 20 μ M.

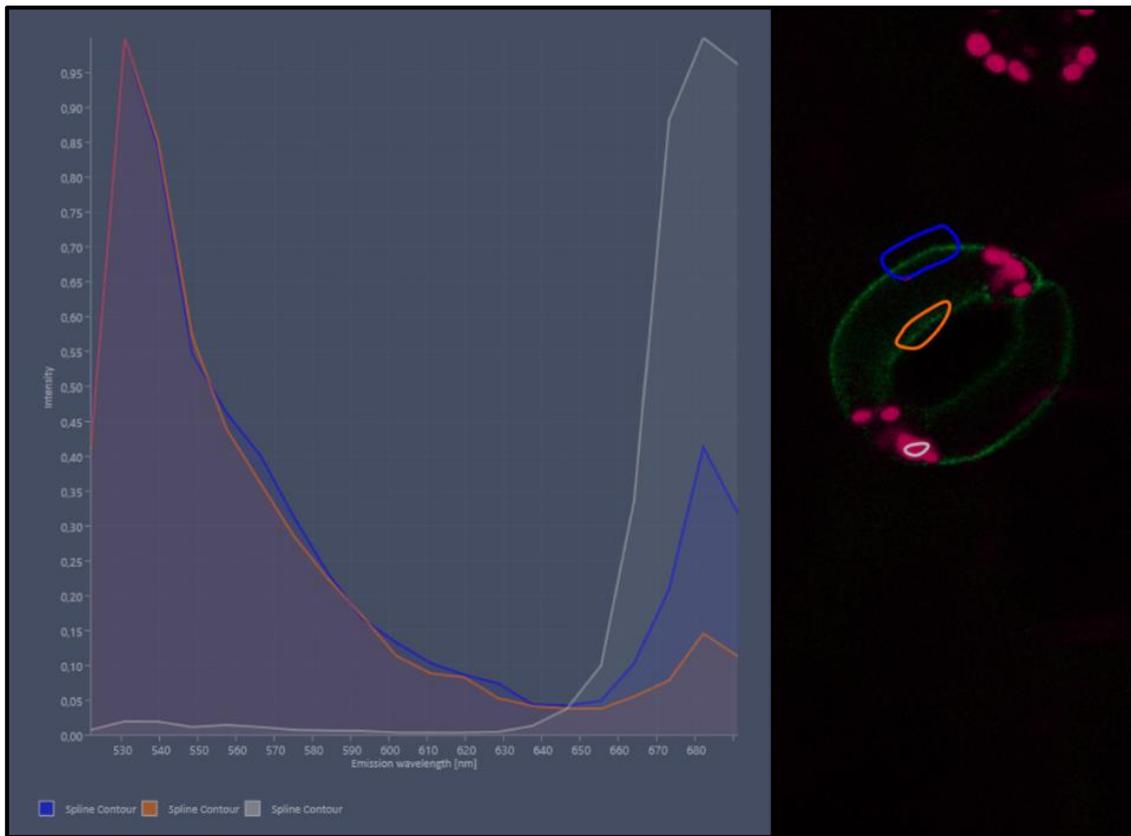


Figura 6. *Lambda scan* de la fluorescencia detectada en un estoma.

Se observó en el microscopio confocal de fluorescencia una planta de genotipo *wild type* transformada con *KAT1-YFP*, de 14 días. Se detectó fluorescencia en un estoma en el rango de longitudes de onda 515-548 nm, y autofluorescencia en cloroplastos (color rosa). Para comprobar si la señal correspondía a YFP, se obtuvo el espectro de emisión de cada píxel de la imagen (*lambda scan*), y se seleccionaron distintas áreas de la imagen para evaluar los espectros de los píxeles contenidos en ellas. Se seleccionaron la cara externa de la membrana plasmática de la célula oclusiva (selección azul), la cara interna (naranja) y un cloroplasto (gris). A la izquierda se observan los espectros de emisión. Las dos selecciones de la membrana plasmática presentan un máximo a ~530 nm, correspondiente a YFP; mientras que la selección del cloroplasto, no. Este análisis se llevó a cabo en todas las imágenes capturadas.

Finalmente, se comprobó si la edad de la hoja podía afectar a la expresión de *KAT1-YFP*. Para ello, se analizaron hojas con distinta longevidad, diferenciando las hojas de la roseta, más viejas; y las hojas del tallo, más jóvenes. Dentro de cada tipo de hoja, también se observaron hojas con distintas edades (Fig. 4). Únicamente se observó fluorescencia en las hojas más jóvenes de toda la planta: las del tallo más cercanas al ápice. Por tanto, se aprecia una relación inversa entre longevidad de la hoja y expresión de *KAT1-YFP*.

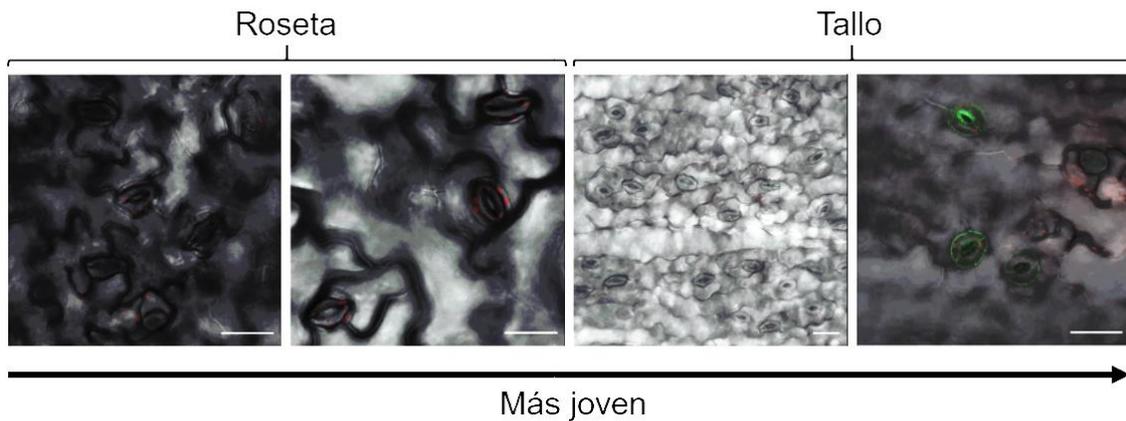


Figura 7. Observación de KAT1-YFP en hojas con distinta longevidad.

Se observó en el microscopio confocal de fluorescencia una planta de genotipo *wild type* transformada con *KAT1-YFP*, de 32 días. Se prepararon muestras de hojas. Por un lado, del tallo, diferenciando hojas jóvenes (más cercanas al ápice) de hojas viejas (más cercanas a la base); y por otro, de la roseta, diferenciando hojas jóvenes (mayor tamaño) de hojas viejas (menor tamaño). Todas las hojas del tallo son más jóvenes que las de la roseta. Barras = 20 μ M.

4.2 Obtención de líneas *kat1 KAT1-YFP* homocigotas

La observación inicial de expresión de KAT1-YFP únicamente en estomas que motivó la realización de este trabajo, se realizó en líneas procedentes de un número pequeño de eventos de transformación. En el caso de las líneas con fondo *kat1*, sólo se disponía de una línea homocigota del evento de transformación 1. Por tanto, era necesario generar más líneas homocigotas de eventos distintos, para poder analizarlas y contrastar si la observación inicial se debió al punto de inserción en el genoma del evento 1, o si se trata de un proceso generalizado.

Con este fin, se autofecundaron varias líneas de los eventos 2, 5 y 6; y se comprobó si eran homocigotas realizando una prueba de segregación de la descendencia. Esta prueba se basa en que si una planta es homocigota para cierto gen y se autofecunda, su descendencia presentará el gen en una proporción de 1 (100%); mientras que si es heterocigota, la descendencia lo presentará en una proporción 3:1 (75%). En la Figura 5 está descrita la realización de este tipo de prueba.

En la Tabla 1 se recogen las líneas que fueron puestas a prueba, con el % de individuos que no elongaron el hipocótilo en oscuridad en presencia de higromicina. Se marcaron como homocigotas las líneas con un porcentaje < 5% (0% esperado para homocigosis, 25% esperado para heterocigosis). Se consiguieron líneas homocigotas para los 3 eventos de transformación, y se seleccionaron las líneas 5.1.1 y 6.3.3.3 para realizar ensayos de complementación funcional (a partir de ahora, referidas como líneas 5 y 6, respectivamente).

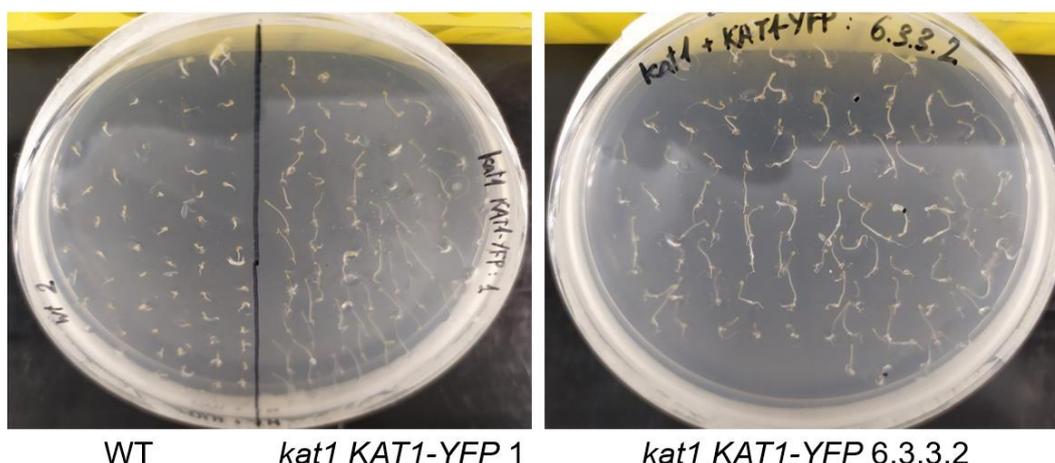


Figura 8. Ejemplo de prueba de segregación.

Se recogieron ~100 semillas procedentes de la autofecundación de líneas transformadas con el gen *HPH* de resistencia a la higromicina, se sembraron en placas de MS con higromicina y se incubaron en oscuridad durante 4 días. Se incluyó una línea sin el gen *HPH* como control negativo: WT (*wild type*), en la que ninguna planta fue capaz de elongar el hipocótilo en oscuridad. Se incluyó otra línea homocigota para el gen como control positivo (*kat1 KAT1-YFP 1*), en la que el 100% de individuos elongaron el hipocótilo. A la izquierda se muestran los controles, gracias a los cuales también es posible distinguir el fenotipo de “no elongación” respecto al de “elongación”. A la derecha se muestra una de las líneas evaluadas, que se marcó como homocigota ya que presentó un 0% de individuos que no elongasen el hipocótilo en oscuridad (frente al 25% esperado en la descendencia de una planta heterocigota).

Tabla 1. Resultados de la prueba de segregación para las distintas líneas evaluadas.

Las líneas vienen definidas por un código de números separados por puntos, dónde el primer número indica el evento de transformación, y los números siguientes indican el n.º de individuo en cada generación de autofecundación. Se calculó el porcentaje de individuos que no elongaron el hipocótilo en oscuridad respecto al total (“% No elongan”), esperándose un 0% para una línea homocigota (hom) y un 25% para una heterocigota (het). Se marcó a las líneas con un % No elongan < 5% como homocigotas.

Línea	Total	No elongan	% No elongan	Genotipo
6.3.3.2	90	0	0,00	hom
6.3.3.3	111	1	0,90	hom
6.3.3.6	91	1	1,10	hom
6.3.3.7	88	0	0,00	hom
6.9.2.1	89	24	26,97	het
6.9.2.2	80	4	5,00	hom
6.9.2.3	68	9	13,24	het
6.9.2.5	93	26	27,96	het
6.9.2.7	59	1	1,69	hom
5.1.1	99	1	1,01	hom
5.1.8	110	12	10,91	het
5.1.10	86	0	0,00	hom
5.1.11	92	0	0,00	hom
5.1.12	94	0	0,00	hom
2.2.1.1	90	0	0,00	hom
2.2.1.2	84	25	29,76	het
2.2.1.3	93	0	0,00	hom
2.2.1.7	104	27	25,96	het

4.3 Ensayos de complementación funcional

Una vez que se comprobó que la observación de KAT1-YFP únicamente en células oclusivas se daba en líneas procedentes de eventos de transformación distintos, la siguiente pieza del puzle era averiguar si las líneas obtenidas *kat1 KAT1-YFP* se comportaban como líneas *wild type*. Es decir, la única diferencia entre una línea *kat1 KAT1-YFP* y una WT es la sustitución de KAT1 por KAT1-YFP. Si las líneas generadas presentasen una funcionalidad de KAT1 igual a la del WT, entonces dichas líneas podrían utilizarse como representativas del WT, con la ventaja de poder visualizar KAT1.

Para averiguar si esta similitud funcional se daba entre WT y líneas mutantes complementadas, se realizaron 3 ensayos de complementación funcional. Estos ensayos se basan en crecer plantas de *Arabidopsis* en condiciones en que hay una diferencia fenotípica entre el genotipo WT y *kat1*.

4.3.1 Velocidad de crecimiento

Este ensayo de complementación se basa en una diferencia en la velocidad de crecimiento entre WT y *kat1*. A los 11 días de crecimiento en medio líquido, se hizo patente que un gran número de individuos del genotipo *kat1* presentaban un primer par de hojas verdaderas pequeño, mientras que en las plantas WT era significativamente más grande (Fig. 6A). Este ensayo sólo se llevó a cabo con la línea *kat1 KAT1-YFP* 1, debido a conveniencia con el resto de experimentos. Al cuantificar el % de individuos con el fenotipo del WT, se observó que en la línea complementada había un 83,1%, mientras que en el mutante *kat1* sólo había un 18,3% (Fig. 6B). Por tanto, este primer ensayo es una evidencia de una complementación funcional correcta en la línea 1.

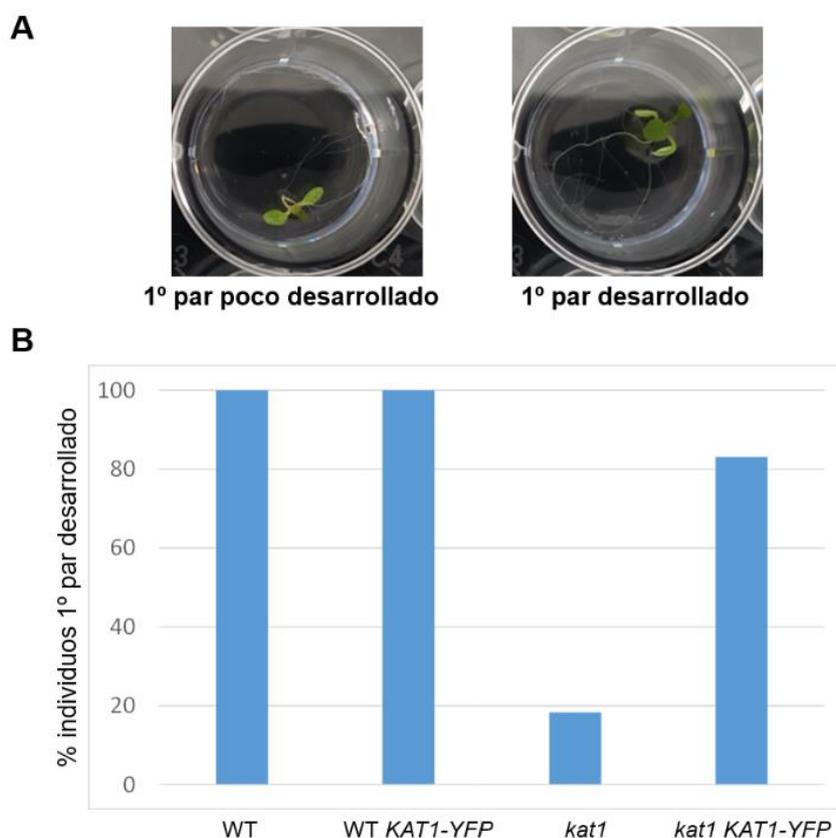


Figura 9. Resultados del ensayo de complementación funcional de velocidad de crecimiento.

Se sembraron en MS 1X líquido plantas de los genotipos WT (*wild type*) y *kat1*, y sus respectivos transformados con *KAT1-YFP*. Se crecieron durante 11 días y se realizó una evaluación fenotípica de cada individuo. **(A)** Fenotipo representativo de plantas con el primer par de hojas verdaderas poco desarrollado (izquierda), respecto a plantas con dicho primer par más desarrollado (derecha). **(B)** Porcentaje de individuos con el primer par de hojas verdaderas más desarrollado de cada genotipo. N = 72 (WT, WT *KAT1-YFP*), N = 71 (*kat1*, *kat1 KAT1-YFP*).

4.3.2 Tolerancia a litio

El fundamento de este ensayo está en que la inactivación de *KAT1* provoca un cambio en la homeostasis iónica que vuelve a las plantas sensibles al litio. El litio en altas concentraciones tiene efectos tóxicos, limitando el crecimiento de la planta debido a la interrupción de procesos metabólicos, y provocando otros síntomas como clorosis. Este ensayo de complementación se llevó a cabo empleando una concentración de LiCl 12 mM, que es tolerada durante cierto tiempo por el WT, pero que estresa rápidamente a *kat1*.

Se realizó el ensayo como se describe en la Figura 7, con las líneas mutantes complementadas 1, 5 y 6. A los 4 días de tratamiento, se observó un fenotipo fuerte de clorosis en las plantas *kat1*; mientras que en las líneas complementadas, el color de las hojas era más similar al del WT. Todas las plantas tratadas con litio presentaron un tamaño menor al de sus contrapartes control.

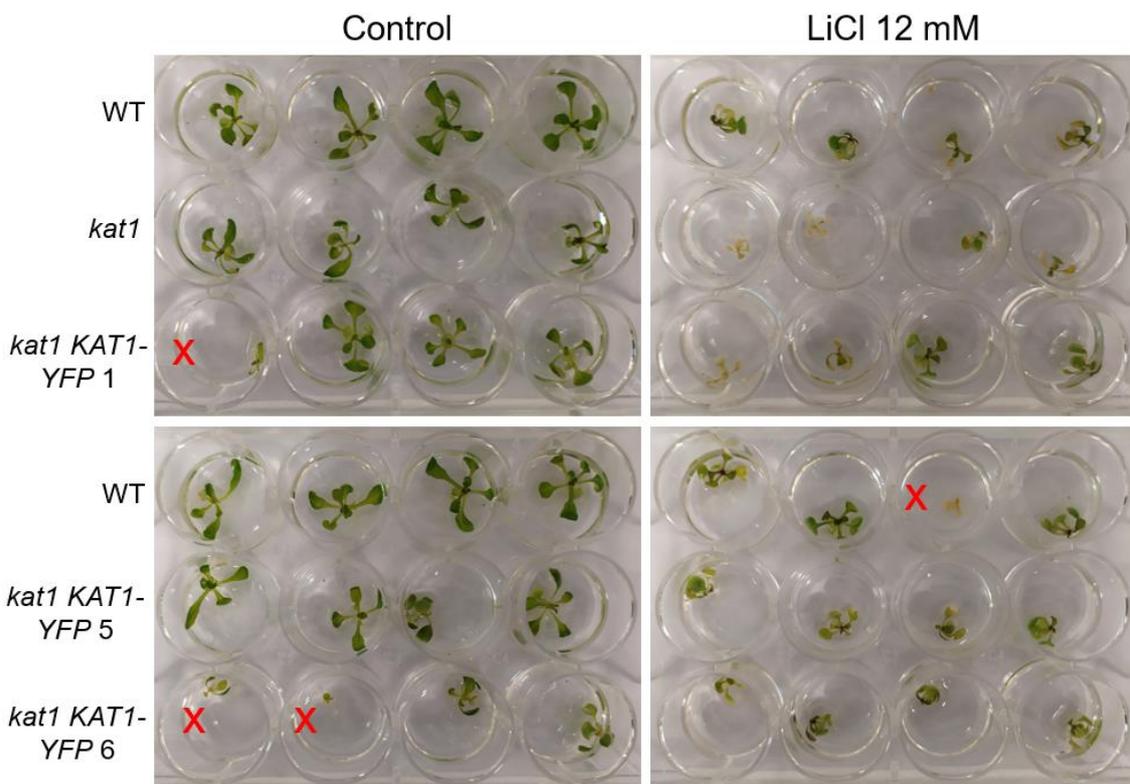


Figura 10. Evaluación fenotípica del ensayo de complementación funcional de tolerancia al litio. Líneas WT (*wild type*), *kat1* y 3 líneas distintas *kat1* transformadas con *KAT1-YFP* (1, 5 y 6); fueron sembradas en placas de MS y trasplantadas a MS líquido cuando presentaban un par de hojas verdaderas. Fueron crecidas hasta el estadio de dos pares de hojas verdaderas, y se retiraron del análisis los individuos estresados por el proceso de trasplante (pocillos marcados con cruces rojas). Se aplicó un tratamiento de MS con LiCl 12 mM a la mitad de las plantas, mientras que la otra mitad siguió creciendo en MS (Control). Las plantas fueron crecidas durante 4 días más, hasta observar síntomas de clorosis en el grupo de tratamiento con LiCl.

Para tener una medida del fenotipo adicional a la del síntoma de clorosis, que fuese cuantificable, se midió el peso fresco de las plantas y se analizó como se muestra en la Figura 8. Como se podía apreciar visualmente, todos los genotipos experimentaron una reducción de tamaño al ser tratados con litio (Fig. 8A). Por tanto, para poder realizar una comparación, se calculó la proporción en la que se había dado esta reducción en cada genotipo (*fold change*) (Figura 8B). Un valor más alto de esta proporción indica una reducción menor en el peso, ya que el peso del tratamiento se acerca más al del control (si fuesen iguales, *fold change* = 100%). Un *fold change* menor indica una mayor reducción.

El peso fresco del WT se redujo hasta un 54,0% del peso control, mientras que en el *kat1* se redujo hasta un 27,1% del peso control (una reducción mayor). Se determinó que con los datos obtenidos, esta diferencia era estadísticamente significativa, con lo que sí que hay una diferencia entre el *fold change* de WT y el de *kat1*. Por tanto, se puede estudiar este parámetro para evaluar la complementación funcional de *KAT1*.

Para estudiar si había algún grado de complementación funcional en las líneas *kat1 KAT1-YFP*, estas se compararon respecto al WT. Las líneas 1 y 6 no presentaron una diferencia significativa, con lo que los datos de estas poblaciones son similares a los de la población WT y, por tanto, hay complementación en estas líneas. La línea 5 sí que resultó ser significativamente distinta al WT, con lo que la complementación sería menor en esta línea.

Independientemente del test estadístico, las medias del *fold change* de las 3 líneas (37,6%, 41,6% y 48,1%; para líneas 1, 5 y 6, respectivamente) son mayores que la media de *kat1*, con lo que en todas las líneas hay cierto nivel de complementación. Los distintos valores medios para cada genotipo podrían apuntar a distintos niveles de complementación entre líneas. No obstante, antes de determinar algo así, sería necesario repetir el experimento con una N lo suficientemente grande para reducir la desviación estándar de los sets de datos.

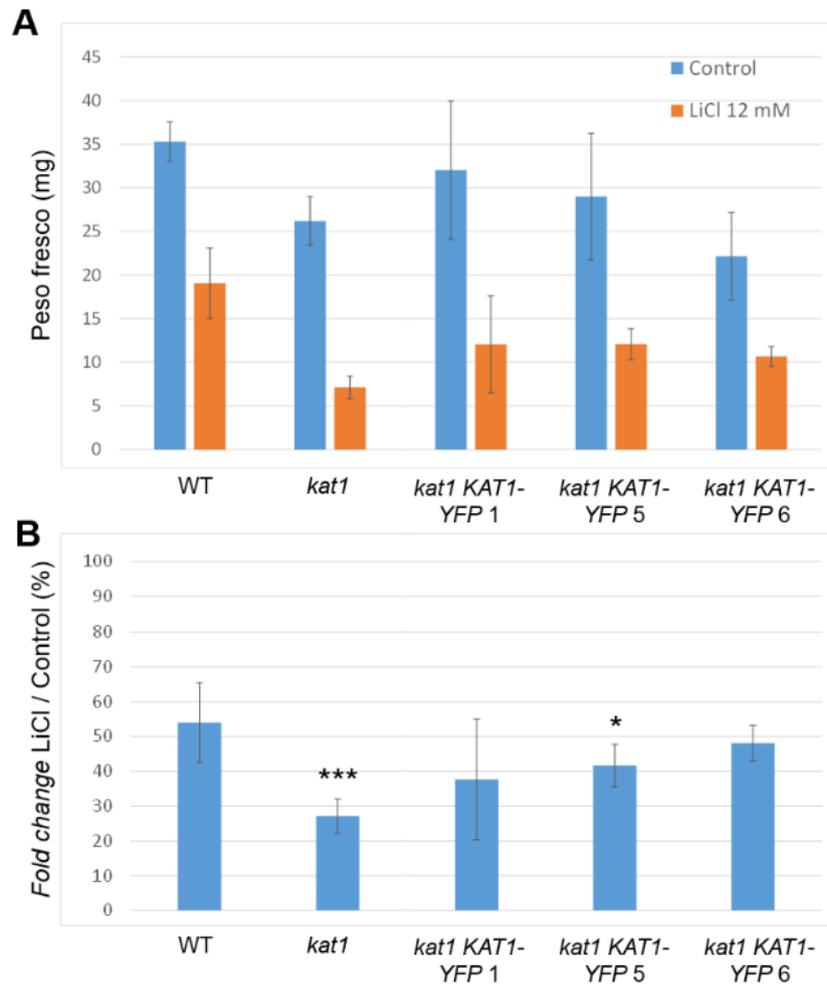


Figura 11. Análisis del peso fresco de las plantas del ensayo de complementación funcional de tolerancia a litio.

Se midió el peso fresco de las plantas de la Figura 7. **(A)** Cada barra representa el peso fresco medio \pm desviación estándar, para cada genotipo, del grupo control y el tratado con litio. N = 7-8 para WT, N = 2-4 para el resto. **(B)** Cada barra representa el *fold change* (factor multiplicador del cambio) en porcentaje, para cada genotipo, del peso fresco de las plantas tratadas con litio respecto a las control. Las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican la significación estadística en comparación con el genotipo WT (*wild type*) (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; test *t* de Student).

4.3.3 Tolerancia a bajo potasio

Este ensayo se planteó ante la hipótesis de que el desajuste iónico causado por la ausencia del gen *KAT1* estuviese implicado en la elongación de la raíz. En publicaciones anteriores, se había empleado este ensayo observando diferencias en mutantes en genes que regulan *KAT1* (Zhang et al., 2015). El potasio es el principal catión osmótico empleado en raíces para generar la presión de turgencia necesaria para la expansión celular, en el proceso de elongación. Cuando el potasio es limitante en el medio, el crecimiento de la raíz se ve afectado negativamente. Si *KAT1* jugase algún papel en la homeostasis de dicho catión, el mutante *kat1* presentaría una longitud radicular menor que la del WT.

Con esta premisa, se llevó a cabo el ensayo con las mismas líneas que en el ensayo de tolerancia al litio, tal como se describe en la Figura 9. Las plantas se crecieron en un medio de sales mínimas, que no contuviese fuentes de potasio adicionales al KCl añadido; y con una concentración de 2 mM NH_4Cl , que limita la entrada de K^+ por transporte de alta afinidad. El comportamiento esperado habría sido observar una

longitud radicular máxima en el WT, que no variara al reducir la concentración de K⁺ en el medio de 1 mM hasta 0,01 mM; mientras que en *kat1* se esperaría una longitud menor, dependiente de dicha concentración. Las líneas complementadas deberían presentar longitudes similares a las del WT, independientes de la concentración de KCl.

Los datos obtenidos aparecen representados en la Figura 9B. El WT se comporta dentro de lo esperado, y las longitudes medias de *kat1* para las 3 condiciones de KCl son menores que las del WT. No obstante, al realizar un test estadístico respecto al WT con KCl 1 mM, sólo *kat1* con KCl 0,1 mM es significativamente distinto a este; las otras dos concentraciones presentan desviaciones estándar demasiado elevadas para afirmar que hay diferencias respecto al WT. Tampoco se aprecia una tendencia clara de reducción de la elongación al reducir el K⁺ disponible en el medio. Esto podría deberse a la activación del transportador de K⁺ de alta afinidad HAK5 en condiciones de K⁺ limitante (Gierth et al., 2005).

Si a pesar de esto, seguimos adelante con el análisis centrándonos en la condición de KCl 0,1 mM; las líneas complementadas 1 y 5 sí que presentan longitudes similares a las del WT. Sin embargo, la línea 6 se comporta de manera inesperada, ya que presenta longitudes incluso inferiores a las de *kat1*, a cualquier concentración de KCl. Este fenotipo podría deberse a una mala complementación de la línea 6, o que esta línea presente sensibilidad a bajas concentraciones de K⁺ debido a su evento de transformación particular.

Por esta serie de inconsistencias, el ensayo de tolerancia a bajo K⁺ no parece un buen método para evaluar la complementación funcional de *KAT1*. Probablemente *KAT1* no juegue un gran papel en el proceso de elongación de raíces, lo que también se corresponde con su baja expresión en este tejido.

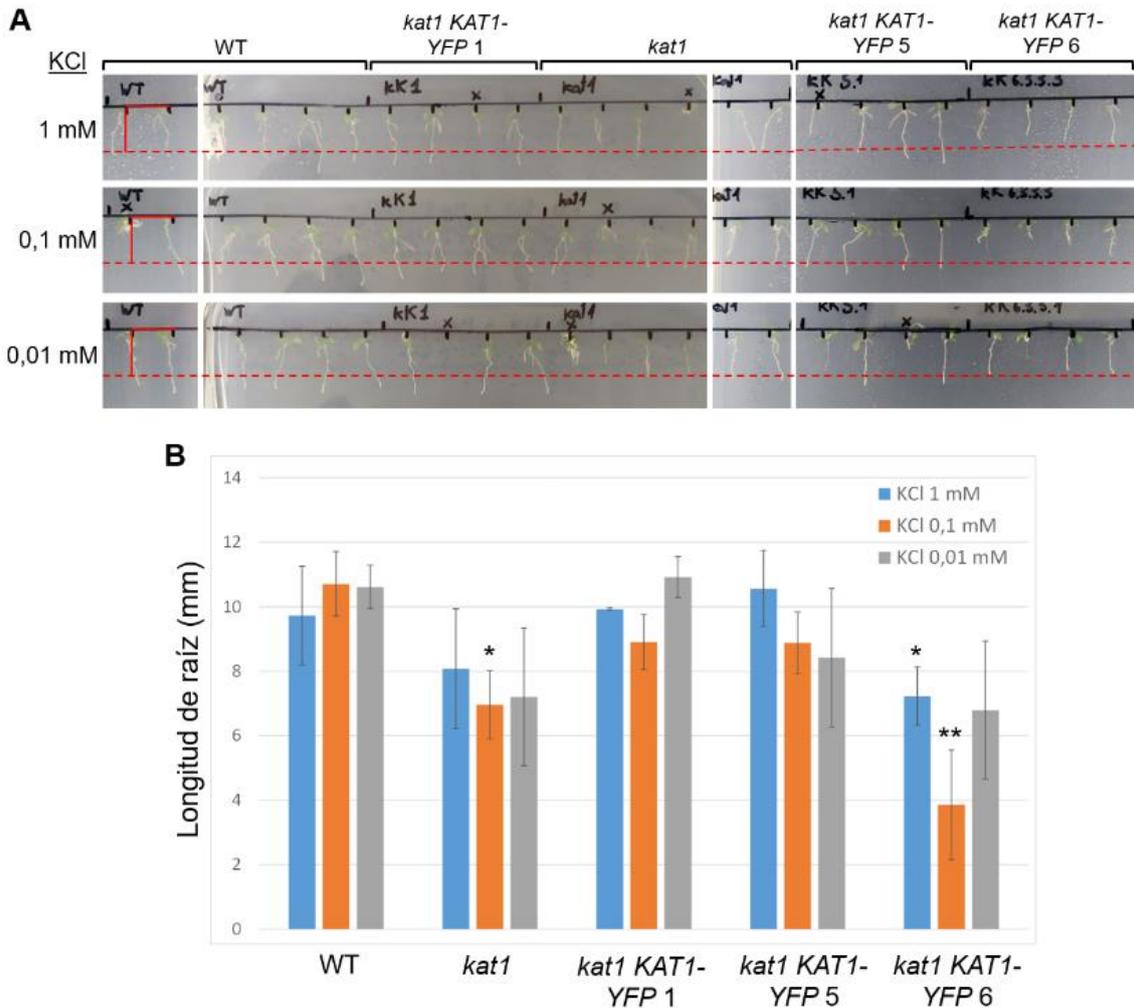


Figura 12. Análisis del ensayo de complementación funcional de tolerancia a bajo potasio. **(A)** Las mismas líneas que las descritas en la Figura 7 fueron sembradas en placas cuadradas de agarosa 1% con medio de sales mínimas suplementado con NH_4Cl 2 mM y distintas concentraciones de KCl: 1, 0,1 y 0,01 mM. Las plantas se crecieron en vertical durante 7 días, y se midió la longitud de la raíz más larga de cada individuo con ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Líneas rojas continuas = 9 mm. **(B)** Cada barra representa la longitud media \pm desviación estándar de cada genotipo a cada concentración de KCl. N = 3-6. Los asteriscos indican la significación estadística en comparación con el genotipo WT (*wild type*) 1 mM KCl (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; test *t* de Student).

4.4 RT-qPCR

4.4.1 Caracterización de *primers*

Una vez que se confirmó en varias líneas independientes el fenotipo de expresión de KAT1-YFP únicamente en células oclusivas, se diseñaron experimentos para empezar a caracterizar el mecanismo detrás de este fenómeno. Un primer paso es averiguar si el mecanismo se da a nivel transcripcional o postranscripcional, y para ello, se planteó un experimento de análisis de la expresión del gen *KAT1-YFP* mediante RT-qPCR, en parte aérea respecto a raíz.

Antes de realizar el ensayo, fue necesario obtener cierta información acerca de los *primers* para *HPH* y *KAT1-YFP*, ya que fueron diseñados para este experimento. Primero se comprobó la especificidad, amplificando un cDNA ya disponible de una planta transformada con $35S::KAT1-YFP$, y analizando la curva de *melting*. Se verificó

que dichas curvas presentaban un único pico, es decir, que sólo había un tipo de amplicón.

También se realizaron curvas estándar para el cálculo la eficiencia, como se describe en la Figura 10. En el caso de *HPH* (Fig. 10A), el ajuste de la recta presenta un R^2 cercano a 0,99. La eficiencia obtenida fue del 77,13%, bastante baja (lo deseable es 90-110%), inapropiada para realizar experimentos de cuantificación. Esta baja eficiencia puede deberse a la formación de estructuras secundarias (*hairpins*, dímeros) o a la realización de la qPCR en condiciones inadecuadas (temperatura de alineamiento, concentración de *primers*). Una eficiencia del 77% quiere decir que después de cada ciclo de amplificación, la cantidad de DNA no se está duplicando, sino que está aumentando en una proporción de $E = 1,77$. A pesar de esto, se decidió seguir adelante con estos *primers*, ya que su función era la de ser usados como control, en vez de cuantificar; y además, con el método de cuantificación relativa de Pfaffl se pueden normalizar los resultados respecto a la eficiencia de cada par de *primers*.

En el caso de *KAT1-YFP*, las diluciones de 1 y 1/5 no se amplificaron correctamente, así que esos puntos no se encuentran en la curva estándar. Con los 3 puntos restantes, el ajuste fue muy bueno. Se obtuvo una eficiencia del 107,55%, dentro del rango aceptable para realizar cuantificación. Las eficiencias >100% se dan cuando hay algo de inhibición de la enzima polimerasa, ya que en ese caso, aunque se aumente la cantidad de cDNA, puede que el C_q aparezca un poco más tarde de lo esperado. En una reacción de qPCR, la principal fuente de inhibidores es el cDNA, así que el problema se puede solucionar diluyendo la muestra. No obstante, en nuestro caso la eficiencia se encuentra en el rango aceptable, y como un valor >100% no tiene significado biológico

y sólo se da en muestras de cDNA concentradas; se ajustó la eficiencia de los *primers* de *KAT1-YFP* en el 100%.

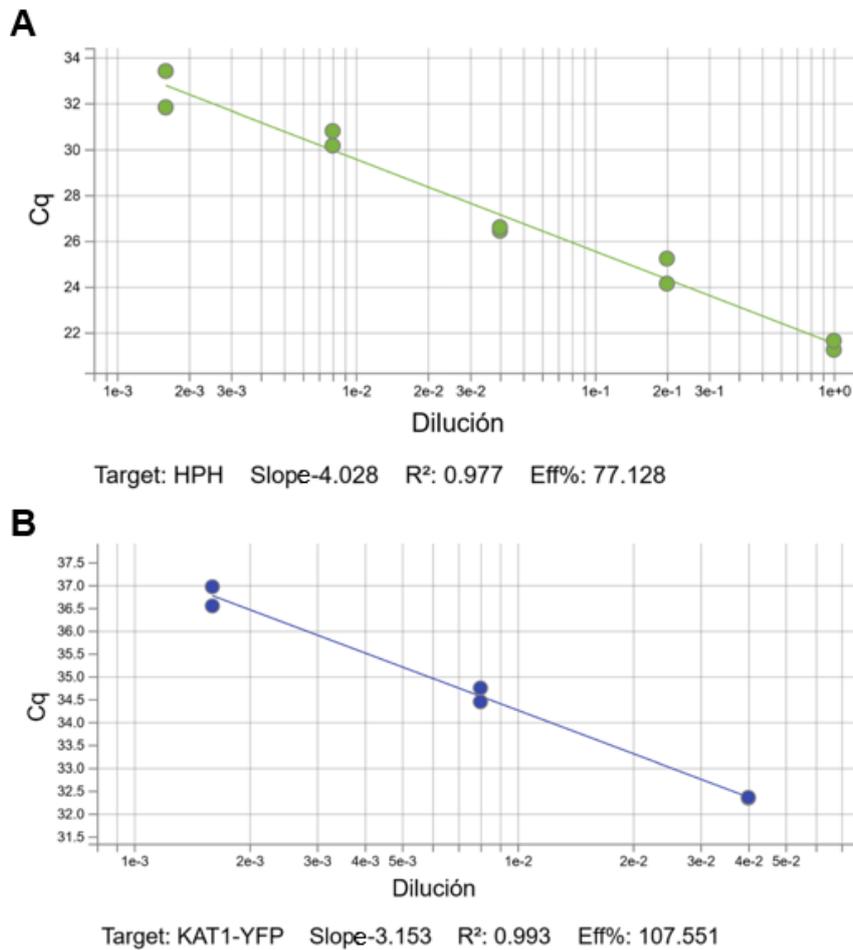


Figura 13. Curvas estándar para el cálculo de la eficiencia de los *primers* de *HPH* y *KAT1-YFP*. Se realizaron 4 diluciones 1/5 de un molde de cDNA que presentaba los cDNAs de *HPH* y *KAT1-YFP*, y se llevaron a cabo qPCRs para dichos genes (2 réplicas técnicas en cada caso). Se representó el Cq (ciclo de cuantificación) respecto a cada dilución, y se calculó la curva estándar con el *software Design and Analysis* (ThermoFisher). Se calculó el parámetro R² de calidad del ajuste de la curva, la pendiente (Slope) y la eficiencia (Eff%) de los *primers* de *HPH* (A) y *KAT1-YFP* (B) con la fórmula $Eff\% = [10^{(-1 / Slope)} - 1] * 100$. En el caso de *KAT1-YFP*, las primeras 2 diluciones no se amplificaron correctamente.

4.4.2 Análisis de expresión de *KAT1-YFP* en parte aérea y raíz

Una vez determinada la eficiencia de los *primers*, el siguiente paso fue obtener cDNA de los genotipos y tejidos que se quería analizar. Se generó biomasa de los genotipos WT, *kat1*, WT *KAT1-YFP* 2 y *kat1* *KAT1-YFP* 1; y se procesaron muestras de 100 mg de parte aérea, y de 200 mg de raíces. Se extrajo RNA de dichas muestras como se describe en materiales y métodos, y se evaluó la integridad (Fig. 11), la concentración y la pureza (Tabla 2). Las muestras no presentaron problemas de degradación. En cuanto a la concentración, se aprecia que en las muestras de parte aérea, el rendimiento de extracción fue mayor que en las muestras de raíz. Esto puede deberse a una trituración insuficiente de las muestras de raíz, con lo que es posible que sea necesario modificar el protocolo empleado para procesarlas (recoger 100 mg por tubo, o cambiar el método de homogeneización). Finalmente, se sintetizó cDNA a partir de 500 ng de RNA y se diluyó 5 veces.

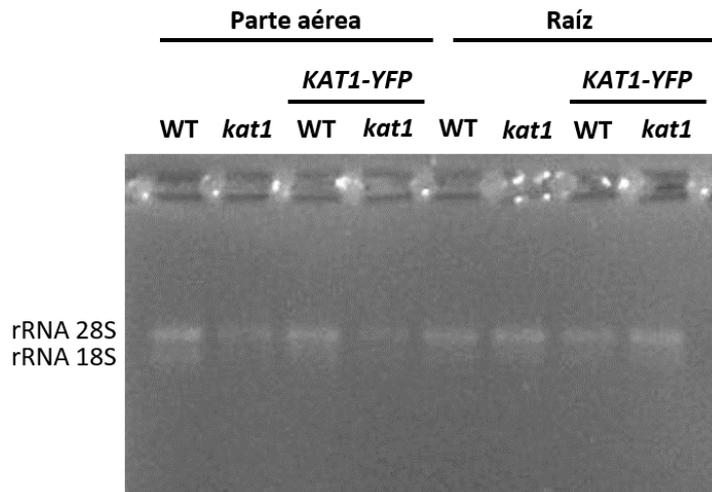


Figura 14. Comprobación de la integridad de las muestras extraídas de RNA.

Se extrajo RNA de plantas de los genotipos WT (*wild type*) y *kat1* y de sus respectivos transformados con KAT1-YFP, tanto de la parte aérea como de raíz. Las 8 muestras se separaron en un gel de agarosa 8% en condiciones desnaturizantes, hasta que se observaron las 2 bandas correspondientes al rRNA 28S y 18S. La visualización de dichas bandas, más el ratio de intensidad aproximado de 2:1 (28S respecto a 18S) indican una buena integridad de las muestras.

Tabla 2. Concentración y pureza de las muestras extraídas de RNA.

Las muestras descritas en la Figura 11 fueron evaluadas en un espectrofotómetro NanoDrop. Se presentan la concentración y el ratio de absorbancia a 260 nm respecto a la de 280 nm. Valores de este último ratio de 2-2,2 indican una buena pureza del RNA. PA = parte aérea, R = raíz.

Muestra	Concentración (ng/μL)	A260/280
WT PA	690,9	2,22
WT KAT1-YFP PA	701,6	2,19
<i>kat1</i> PA	316,1	2,18
<i>kat1</i> KAT1-YFP PA	552,0	2,19
WT R	126,6	2,16
WT KAT1-YFP R	218,9	2,18
<i>kat1</i> R	383,9	2,18
<i>kat1</i> KAT1-YFP R	246,8	2,18

Se realizaron qPCRs de las muestras de cDNA conseguidas tal como se explica en la Figura 12, y se analizaron los resultados. En primer lugar, en los controles negativos sin cDNA para cada par de *primers*, bien no hubo amplificación o bien se detectó algún artefacto a Cq > 37. El control endógeno *GADPH* se amplificó en todas las muestras, y se detectó en Cqs similares (18,8-20,0), lo que indica que se cargó prácticamente la misma cantidad de RNA en las 8 reacciones de síntesis de cDNA (asumimos que

GADPH debe estar igual de representado en todas las muestras). Por otro lado, los genes *HPH* y *KAT1-YFP*, bien no fueron amplificados en las muestras no transformadas con 35S::*KAT1-YFP*, o bien se detectó algún artefacto a $Cq > 35$, correspondiendo con lo esperado.

En lo que respecta al análisis de expresión de *KAT1-YFP*, se compararon las muestras transformadas, de 2 maneras distintas. En la primera comparación (Fig. 12A), se normalizaron los Cq de *KAT1-YFP* respecto a los de *GADPH* en cada muestra (cálculo del ΔCq). A continuación, se seleccionó la muestra con menor expresión (WT *KAT1-YFP* R) como muestra calibradora, y se calculó el $\Delta\Delta Cq$ (ΔCq muestra - ΔCq calibrador). Finalmente, se calculó la expresión relativa (ER) por el método de Pfaffl ($ER = E^{-\Delta\Delta Cq}$) ($E_{KAT1-YFP} = 2$). En la segunda comparación (Fig. 12B), se normalizó respecto a *HPH*, y se volvió a usar a WT *KAT1-YFP* R como muestra calibradora.

La primera apreciación que se puede hacer es que en las 4 muestras hay expresión de *KAT1-YFP*. En WT *KAT1-YFP* R, la que menor expresión presenta, el Cq es de 29,8, y no se trata de un artefacto. En la Figura 12A, también se puede observar que la línea WT *KAT1-YFP* presenta expresiones relativas (7,8 y 1) bastante más pequeñas que las de la línea *kat1 KAT1-YFP* (66,6 y 35,6). *KAT1-YFP* está controlado por el promotor 35S, que es constitutivo, con lo que cabría esperar que su expresión fuese la misma en las dos líneas. No obstante, las secuencias reguladoras de un promotor pueden ser distintas en función de la posición en el genoma en la que se ha insertado el transgén. Si este fuera el caso, por proximidad al gen *KAT1-YFP*, es probable que el gen *HPH* (con promotor *Pnos*) esté regulado por las mismas secuencias. Para poner a prueba esta hipótesis, se normalizaron los datos de expresión de *KAT1-YFP* respecto a los de expresión de *HPH*, en cada línea (Figura 12B). Si ambos promotores (y por tanto ambos genes) están regulados por las mismas secuencias, y este es el único factor que afecta a su expresión (no hay otros mecanismos como el silenciamiento de alguno de los genes), entonces la expresión de *KAT1-YFP* respecto a la de *HPH* se mantendrá relativamente constante en ambas líneas. En la Figura 12B se puede apreciar este comportamiento: fijando a la muestra WT *KAT1-YFP* R como calibrador, el resto de muestras presentan expresiones relativas de alrededor de 1. Ninguna muestra llega a tener un *fold change* del doble o la mitad siquiera. Por tanto, las diferencias de expresión relativa de *KAT1-YFP* observadas entre las 2 líneas estudiadas, se atribuyen al evento de transformación de cada línea, en vez de a un mecanismo regulador alternativo.

Por otro lado, en la Figura 12A también se puede observar una tendencia clara de que dentro de cada línea, hay una mayor expresión de *KAT1-YFP* en la parte aérea respecto a la raíz (7,8 veces más en la línea WT *KAT1-YFP*, y 1,87 veces más en *kat1 KAT1-YFP*). Podríamos plantear la hipótesis de que esta menor expresión en raíz es la responsable de que no se exprese la proteína *KAT1-YFP* en dicho tejido. No obstante, esta hipótesis se invalida al ver que en el tejido de parte aérea del genotipo WT *KAT1-YFP* se ha observado fluorescencia en estomas; mientras que en el tejido de raíz del genotipo *kat1 KAT1-YFP*, siendo la expresión 4,56 veces mayor ($35,6 / 7,8$), no se ha observado fluorescencia. Por tanto, es improbable que el mecanismo por el cual la proteína *KAT1-YFP* sólo se observa en estomas, se dé a nivel de transcrito, ya que no hay una correlación entre cantidad de transcrito y la visualización (o no) de la proteína.

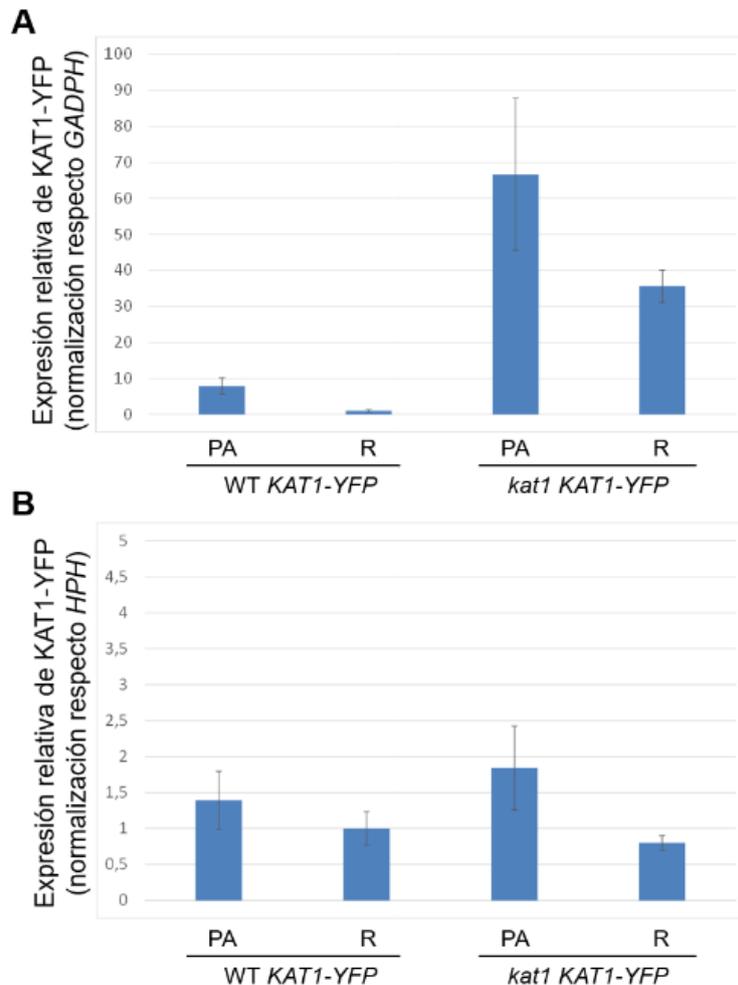


Figura 15. Expresión relativa de *KAT1-YFP* en parte aérea respecto a raíz, en los fondos genéticos WT y *kat1*.

Se realizó una RT-qPCR a partir de las muestras de RNA presentadas en la Tabla 2. Los genotipos *KAT1-YFP* estaban transformados con 35S::*KAT1-YFP* y Pnos::*HPH*. Se amplificaron los genes *KAT1-YFP*, *HPH* y *GADPH* como control endógeno, y se realizaron 3 réplicas técnicas en cada caso. En las muestras no transformadas con *KAT1-YFP*, bien no se detectaron los genes *HPH* y *KAT1-YFP*, o bien se detectó algún artefacto a $Cq > 35$ (ciclo de cuantificación). En las muestras transformadas sí que hubo amplificación específica de los genes, y sus resultados son los que se muestran en la figura. Los Cq obtenidos para *KAT1-YFP* fueron normalizados respecto al Cq del control endógeno *GADPH* (**A**) y respecto al de *HPH* (**B**) en cada muestra. Las barras representan la expresión relativa respecto a la muestra WT *KAT1-YFP* R, calculada según el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) (E de primers *KAT1-YFP* = 2). Las barras de error indican la desviación estándar. Los valores de expresión relativa en (**A**) son, de izquierda a derecha: 7,8; 1; 66,6; y 35,6. En (**B**), son: 1,4; 1; 1,8; y 0,8.

4.5 Fraccionamiento e inmunodetección de *KAT1-YFP*

Para complementar al ensayo de detección y cuantificación relativa del transcrito de *KAT1-YFP* en parte aérea respecto a raíz; se hizo un ensayo equivalente para la proteína *KAT1-YFP*, basado en una inmunodetección. El procedimiento seguido viene descrito en la sección 3.7 de materiales y métodos y la Figura 13. Como control del proceso de fraccionamiento celular, se detectó la proteína *AHA3* (H^+ -ATPasa 3), sólo presente en la membrana plasmática. También se empleó esta misma detección como control de carga, ya que se trata de una proteína constitutiva. Basándonos en ésta, y apoyándonos en la tinción inespecífica de proteínas Direct Blue; se aprecia cómo las 4 muestras de parte aérea presentan cantidades similares de proteína, las muestras WT

y *kat1* de raíz presentan cantidades inferiores, y WT *KAT1-YFP* y *kat1 KAT1-YFP* presentan cantidades superiores.

En lo que respecta a la detección de *KAT1-YFP*, se puede apreciar la banda específica de la proteína a ~100 kDa en las muestras de la parte aérea transformadas con *KAT1-YFP*. Teniendo en cuenta que la carga de proteína es similar en ambos carriles, se observa algo más de señal en *kat1 KAT1-YFP* que en WT *KAT1-YFP*, que corresponde con una mayor cantidad de proteína. Esta observación correlaciona con los resultados del experimento de RT-qPCR, en que había una cantidad mayor del transcrito de *KAT1-YFP* en la línea *kat1* respecto a la WT. Por otro lado, debido a la elevada carga en los carriles de las muestras transformadas con *KAT1-YFP* de raíz y a la baja especificidad del anticuerpo que reconoce *KAT1*, resulta difícil discernir si *KAT1-YFP* está presente o no. En la película con tiempo de exposición de 30 s es imposible de determinar, y en la de 5 s, estaría sujeto a discusión. Posiblemente se trate de bandas inespecíficas, ya que se observan varias de ellas con la misma intensidad. Si hubiese *KAT1-YFP* en dichas muestras, probablemente se vería una banda algo más intensa en 100 kDa. En el caso de que la observación de la ausencia de *KAT1-YFP* en muestras de raíz fuese confirmada, se tendría otra evidencia de que el mecanismo de regulación por el que *KAT1-YFP* no se observa en raíz, se da a nivel de proteína, ya que sí que se ha detectado el transcrito de *KAT1-YFP* en este tejido. Por falta de tiempo no fue posible repetir este experimento para confirmar los resultados, pero se hará en el laboratorio.

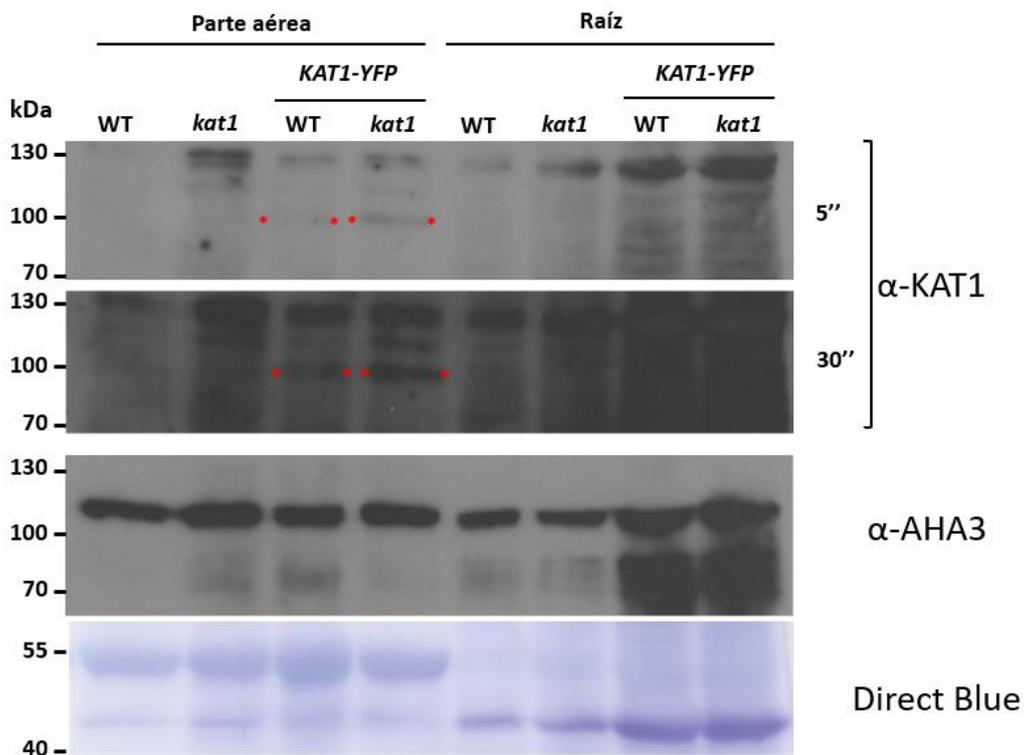


Figura 16. Inmunodetección de *KAT1-YFP* en parte aérea y raíz, en los fondos genéticos WT y *kat1*. Se extrajeron cantidades similares de proteínas a partir de plantas de los genotipos WT (*wild type*) y *kat1*, y de los genotipos correspondientes transformados con *KAT1-YFP*, tanto de la parte aérea como de raíz. Se llevó a cabo un fraccionamiento por ultracentrifugación, y se recuperó la fracción insoluble (membranas). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. *KAT1-YFP* fue detectado usando un anticuerpo primario anti-*KAT1* (banda esperada a 106 kDa) y un secundario anti-conejo HRP, mediante quimioluminiscencia, exponiendo películas durante 5 y 30 s. Como control de cantidad de proteína y del fraccionamiento, se detectó la proteína constitutiva AHA3 (H^+ -ATPasa 3) (banda

esperada a 104 kDa) con el anticuerpo primario anti-AHA3 y el secundario anti-conejo HRP. Como control de carga alternativo, se realizó una tinción con *Direct Blue*.

5 Discusión

KAT1 es el principal canal de K⁺ rectificador de entrada expresado en las células oclusivas, y por tanto, juega un papel esencial en el proceso de apertura estomática. Por esta razón, es esencial conocer cómo está regulada la actividad de este canal, porque ésta tiene un impacto directo sobre los movimientos estomáticos. Con el fin de estudiar la localización subcelular de KAT1, el grupo de investigación generó líneas transgénicas de *Arabidopsis* con la construcción 35S::*KAT1-YFP* (y *Pnos>::HPH*). No obstante, en ensayos preliminares se observó que estas líneas presentaban un patrón de expresión de KAT1-YFP impropio de un gen regulado por el promotor constitutivo 35S: sólo se expresaba la proteína en células oclusivas. En caso de corroborarse dicha observación, se tendría una evidencia de un mecanismo de regulación de KAT1, que limita su expresión a un tipo celular; además de disponer de unas líneas idóneas para estudiar dicho proceso.

En este trabajo se realizó esta corroboración, pues se observó el mismo fenotipo en varias líneas independientes. Además, se comparó este patrón de expresión con el de 35S::*YFP*, que sí que se observó en varios tipos celulares. De esta manera, se confirmó que el mecanismo de regulación es relativo a KAT1, y no a la fusión YFP.

También se expandió la información sobre este patrón de expresión, al comprobar si la longevidad de la hoja podía tener algún efecto en él. En plantas de 32 días, se observó que sólo había señal de KAT1-YFP en las hojas más jóvenes: las del final del tallo. Este hallazgo contrasta con los datos de expresión del promotor 35S en función de la longevidad de la hoja de *Arabidopsis* obtenidos por Kiselev et al. (2021). En este estudio, se analizaron por RT-qPCR un par de genes inocuos regulados por 35S, en 3 líneas distintas. Se clasificaron las hojas de *Arabidopsis* según su longevidad de la siguiente manera: L1 = cotiledones, 1^o y 2^o par de hojas; L2 = 3^o y 4^o par de hojas; L3 = 5^o hasta 8^o par de hojas (roseta); y L4 = hojas grandes del tallo. En todas las líneas se obtuvo una expresión máxima para L1, que fue decreciendo progresivamente hasta L4. Teniendo en cuenta que nuestro gen *KAT1-YFP* está regulado por 35S, es de esperar que se comporte de la misma manera. Entonces, estaríamos observando la proteína KAT1-YFP concretamente en el tejido en que menos transcrito se está generando. En futuros experimentos, se podría analizar por RT-qPCR la expresión de *KAT1-YFP* en hojas de distinta edad, para ver si se cumple la distribución descrita en Kiselev et al. (2021); además de analizar dichas hojas en el confocal para evaluar si hay señal de KAT1-YFP.

Por otro lado, en este proyecto también se han generado líneas *kat1 KAT1-YFP*, y se ha validado la complementación funcional de algunas de ellas. El que estas líneas complementen la función de *kat1* quiere decir que se comportan como un genotipo WT. Por tanto, pueden ser empleadas como líneas modelo para estudiar la regulación de KAT1, con la ventaja de poder visualizar la proteína. Gracias a esto, se podrían llevar a cabo experimentos como la visualización de la internalización de KAT1 en tiempo real al tratar las hojas con la fitohormona ácido abscísico (ABA); o experimentos comparativos con líneas mutantes para proteínas que interactúan con KAT1, transformadas con 35S::*KAT1-YFP* (como la línea *rpt2 KAT1-YFP*, ya disponible en el laboratorio).

En lo que respecta a las líneas en las que se ha comprobado la complementación funcional (1, 5 y 6), se podrían analizar por RT-qPCR las líneas 5 y 6, para ver si sus niveles de expresión de *KAT1-YFP* son similares o distintos a los de la línea 1. También se podrían realizar ensayos de complementación funcional más exhaustivos (con un n.º de individuos mucho mayor) con estas 3 líneas, con la intención de poder discernir distintos grados de complementación. Sería interesante evaluar si hay una relación entre el nivel de expresión de *KAT1-YFP* y el grado de complementación funcional.

De los ensayos de complementación funcional de *kat1* realizados, el más robusto es el de tolerancia al litio. No obstante, si se pretende realizarlo de manera cuantitativa (midiendo peso fresco), en vez de sólo cualitativa (observando los síntomas de clorosis); es necesario incrementar el n.º de individuos de cada genotipo. El ensayo de velocidad de crecimiento también dio buenos resultados, pero debería ser puesto a prueba con más líneas para comprobar cómo de robusto es. Por otra parte, el ensayo de tolerancia a bajo potasio no se comportó de la manera esperada de un ensayo de complementación, con lo que en un principio no es adecuado para evaluar la complementación funcional de *kat1*. No obstante, la dispersión de los sets de datos recogidos era bastante elevada, así que no se descarta que con un N lo suficientemente grande el ensayo sí que dé buenos resultados.

Otra manera de continuar el trabajo realizado sería repetir el ensayo de expresión de *KAT1-YFP* en parte aérea y raíz, para comprobar si los resultados expuestos aquí son consistentes en repeticiones sucesivas, y para conseguir un conjunto de datos más representativo de la realidad. También se debería repetir la inmunodetección de *KAT1-YFP*, con una menor cantidad de proteína para las muestras de raíz de WT y *kat1* transformadas con *KAT1-YFP*. Así se podría discernir con seguridad si hay expresión de la proteína en este tejido.

En el análisis de expresión de *KAT1-YFP* en parte aérea y raíz, se llegó a la conclusión de que la diferencia en expresión observada entre la línea WT *KAT1-YFP* y la línea *kat1 KAT1-YFP*, se debía al evento de transformación de cada línea respectiva, ya que al normalizar los datos respecto a la expresión de *HPH*, la cuantificación relativa era muy similar entre las dos líneas. No obstante, los datos también indicaban que la expresión era mayor en parte aérea que en raíz, en ambas líneas; y este fenómeno no tenía *a priori* una explicación discernible a partir del set de datos. Por tanto, se pueden proponer 2 posibles hipótesis para esta situación: el promotor 35S debería inducir el mismo nivel de expresión tanto en parte aérea como en raíz, con lo que esta observación indica que hay algún tipo de regulación del transcrito de *KAT1-YFP*. O bien, el promotor 35S induce niveles de expresión distintos en parte aérea y raíz, y por tanto, esta diferencia es normal. Para contrastarlas, se ha recurrido otra vez a los datos de Kiselev et al. (2021). Además de realizar RT-qPCR de genes regulados por 35S en muestras de hojas, también hicieron en raíz. En sus 3 líneas evaluadas, para los 2 genes testados, obtuvieron un rango de *fold change* de las muestras de raíz respecto a las L1 (cotiledones, 1º y 2º par de hojas) de 1,1-10,9. En nuestro caso, obtuvimos un *fold change* de raíz respecto a parte aérea de 7,8 en la línea WT *KAT1-YFP* 2, y de 1,85 en *kat1 KAT1-YFP* 1, que se encuentran dentro del rango obtenido en la publicación. No obstante, nuestras muestras no eran exactamente "L1", ya que las partes aéreas procesadas presentaban 3-4 pares de hojas. En cualquier caso, los datos del grupo de Kiselev et al. indican que es normal que haya niveles de expresión distintos de genes controlados por 35S, en muestras de hojas respecto a muestras de raíz. Por consiguiente, no hay razones para pensar que esta diferencia en la expresión se debe a una regulación específica de *KAT1-YFP*.

Según nuestros resultados de RT-qPCR, parece ser más probable que la expresión de *KAT1-YFP* esté siendo regulada a nivel de proteína. Para contrastar esta supuesta, se podría diseñar el siguiente experimento. Se generarían líneas de *Arabidopsis* transformadas con *KAT1-YFP*, regulado por un promotor inducible. Entonces, se induciría una expresión aguda de *KAT1-YFP*, acumulándose la proteína tanto en células oclusivas como epiteliales; y después de cierto tiempo, se dejaría de inducir el gen, empezando el proceso de degradación de la proteína. El experimento consistiría en seguir con el microscopio confocal y por inmunodetección este proceso de acumulación y de degradación de *KAT1-YFP*. Si el mecanismo de regulación por el que sólo se acumula la proteína en estomas, se da a nivel de proteína, entonces *KAT1-YFP* se acumulará más lentamente y/o se degradará más rápido en células epiteliales respecto a las oclusivas.

En el presente proyecto, se ha comprobado que *KAT1-YFP* está sujeto a algún mecanismo de regulación que provoca que su proteína sólo se exprese en células oclusivas. Se han generado líneas complementadas homocigotas *kat1 KAT1-YFP*, que facilitarán en gran medida el estudio de la regulación de *KAT1* en futuros proyectos. Con ellas, se podría analizar qué ocurre con la proteína *KAT1* al aplicar ciertos tratamientos, o al inducir o silenciar ciertos genes. También se han establecido las bases para realizar estudios futuros de análisis de expresión de *KAT1-YFP*, a nivel de transcrito y proteína, que arrojen luz sobre la regulación de *KAT1*. En este trabajo se han evaluado 2 líneas, comparando los tejidos de parte aérea y raíz. Así pues, se podrían expandir estos análisis a un número mayor de líneas, para ver si los resultados son consistentes; y también llevarlos a cabo en distintos tejidos, como por ejemplo, hojas de distintas edades. También sería muy interesante comparar la expresión en células epiteliales respecto a células oclusivas. Por tanto, en este trabajo, se ha confirmado la validez de un modelo experimental altamente útil para los estudios de la regulación de *KAT1* y se ha avanzado en la definición del mecanismo de restricción de expresión de este canal en células oclusivas, aportando evidencias de que sucede a nivel de proteína.

6 Conclusiones

- Plantas transformadas con la construcción *35S::KAT1-YFP* expresan proteína *KAT1-YFP* únicamente en las membranas plasmáticas de las células oclusivas.
- Plantas transformadas con *35S::KAT1-YFP* dejan de expresar proteína *KAT1-YFP* en hojas viejas. En contraposición, estudios en la literatura indican que el promotor *35S* induce una expresión génica mayor en hojas viejas.
- Líneas *kat1* transformadas con *35S::KAT1-YFP* son capaces de complementar la función de *kat1*. Por tanto, pueden emplearse de manera indistinta al WT.
- El mejor ensayo de complementación funcional para *kat1* es el de tolerancia al litio.
- *35S::KAT1-YFP* se expresa en niveles significativos tanto en parte aérea como en raíz.
- Los diferentes niveles de expresión de *KAT1-YFP* observados entre líneas transformadas con *35S::KAT1-YFP*, se deben a las características del evento de inserción y no a una regulación del transcrito *KAT1-YFP*.
- Las diferencias observadas en los niveles de expresión de *KAT1-YFP* entre parte aérea y raíz en una misma línea son comparables a las observadas en otros genes controlados por el promotor *35S*.

- Es improbable que el mecanismo de regulación por el cual plantas transformadas con 35S::*KAT1-YFP* expresan proteína KAT1-YFP únicamente en células oclusivas, se dé a nivel de transcrito.

7 Bibliografía

- AMACK, S.C.; ANTUNES, M.S. (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology* 24, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179>
- BARRAGÁN, V.; LEIDI, E.O.; ANDRÉS, Z.; RUBIO, L.; LUCA, A.D.; FERNÁNDEZ, J.A.; CUBERO, B.; PARDO, J.M. (2012). Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24, 1127–1142. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095273>
- ELUMALAI, R.P.; NAGPAL, P.; REED, J.W. (2002). A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *The Plant Cell* 14, 119–131. <https://doi.org/10.1105/tpc.010322>
- GIERTH, M.; MÄSER, P. (2007). Potassium transporters in plants – Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters, Plant Transporters and Channels* 581, 2348–2356. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.035>
- GIERTH, M.; MÄSER, P.; SCHROEDER, J.I. (2005). The Potassium Transporter AtHAK5 Functions in K⁺ Deprivation-Induced High-Affinity K⁺ Uptake and AKT1 K⁺ Channel Contribution to K⁺ Uptake Kinetics in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology* 137, 1105–1114. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057216>
- GOBERT, A.; ISAYENKOV, S.; VOELKER, C.; CZEMPINSKI, K.; MAATHUIS, F.J.M. (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *PNAS* 104, 10726–10731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702595104>
- HARTT, C.E. (1969). Effect of Potassium Deficiency Upon Translocation of ¹⁴C in Attached Blades and Entire Plants of Sugarcane. *Plant Physiology* 44, 1461–1469. <https://doi.org/10.1104/pp.44.10.1461>
- HEDRICH, R. (2012). Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews* 92, 1777–1811. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2011>
- JEGLA, T.; BUSEY, G.; ASSMANN, S.M. (2018). Evolution and Structural Characteristics of Plant Voltage-Gated K⁺ Channels. *The Plant Cell* 30, 2898–2909. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00523>
- KIM, T.-H.; BÖHMER, M.; HU, H.; NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J.I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 561–591. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>
- KISELEV, K.V.; ALEYNOVA, O.A.; OGNEVA, Z.V.; SUPRUN, A.R.; DUBROVINA, A.S. (2021). 35S promoter-driven transgenes are variably expressed in different organs of Arabidopsis thaliana and in response to abiotic stress. *Mol Biol Rep* 48, 2235–2241. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06235-x>
- LEBAUDY, A.; VÉRY, A.-A.; SENTENAC, H. (2007). K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters, Plant Transporters and Channels* 581, 2357–2366. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.058>

- LEIGH, R.A.; JONES, R.G.W. (1984). A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant Cell. *New Phytologist* 97, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb04103.x>
- LOCASCIO, A.; MARQUÉS, M.C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, G.; CORRATGÉ-FAILLIE, C.; ANDRÉS-COLÁS, N.; RUBIO, L.; FERNÁNDEZ, J.A.; VÉRY, A.-A.; MULET, J.M.; YENUSH, L. (2019). BCL2-ASSOCIATED ATHANOGENE4 Regulates the KAT1 Potassium Channel and Controls Stomatal Movement1[OPEN]. *Plant Physiol* 181, 1277–1294. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00224>
- NIEVES-CORDONES, M.; AL SHIBLAWI, F.R.; SENTENAC, H. (2016). Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants, in: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life, Metal Ions in Life Sciences*. Springer International Publishing, Cham, pp. 291–324. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_9
- PANDEY, S.; ZHANG, W.; ASSMANN, S.M. (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters*, *Plant Transporters and Channels* 581, 2325–2336. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.008>
- PFÄFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- PILOT, G.; PRATELLI, R.; GAYMARD, F.; MEYER, Y.; SENTENAC, H. (2003). Five-Group Distribution of the Shaker-like K⁺ Channel Family in Higher Plants. *J Mol Evol* 56, 418–434. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2413-2>
- R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- RUBIO, F.; GASSMANN, W.; SCHROEDER, J.I. (1995). Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science* 270, 1660–1663. <https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1660>
- SCHROEDER, J.I. (2003). Knockout of the guard cell K⁺-out channel and stomatal movements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4976–4977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1031801100>
- SOTTOCORNOLA, B.; GAZZARRINI, S.; OLIVARI, C.; ROMANI, G.; VALBUZZI, P.; THIEL, G.; MORONI, A. (2008). 14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes. *Plant Biology* 10, 231–236. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2007.00028.x>
- SUTTER, J.-U.; CAMPANONI, P.; TYRRELL, M.; BLATT, M.R. (2006). Selective Mobility and Sensitivity to SNAREs Is Exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ Channel at the Plasma Membrane. *The Plant Cell* 18, 935–954. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038950>
- SUTTER, J.-U.; SIEBEN, C.; HARTEL, A.; EISENACH, C.; THIEL, G.; BLATT, M.R. (2007). Abscisic Acid Triggers the Endocytosis of the Arabidopsis KAT1 K⁺ Channel and Its Recycling to the Plasma Membrane. *Current Biology* 17, 1396–1402. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.020>

- WALKER, D.J.; LEIGH, R.A.; MILLER, A.J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. PNAS 93, 10510–10514. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10510>
- WANG, Y.; WU, W.-H. (2013). Potassium Transport and Signaling in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 64, 451–476. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120153>
- ZHANG, B.; KARNIK, R.; WANG, Y.; WALLMEROOTH, N.; BLATT, M.R.; GREFEN, C. (2015). The Arabidopsis R-SNARE VAMP721 Interacts with KAT1 and KC1 K⁺ Channels to Moderate K⁺ Current at the Plasma Membrane[OPEN]. Plant Cell 27, 1697–1717. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00305>
- ZHAO, D.; OOSTERHUIS, D.M.; BEDNARZ, C.W. (2001). Influence of Potassium Deficiency on Photosynthesis, Chlorophyll Content, and Chloroplast Ultrastructure of Cotton Plants. Photosynthetica 39, 103–109. <https://doi.org/10.1023/A:1012404204910>

8 Anexos

8.1 Datos RT-qPCR

WT = *wild type*; KAT = *KAT1-YFP*; R = raíz; PA = parte aérea.

Sample	Target	Cq	Cq Conf	Amp Score	Amp Status	Baseline Start	Baseline End	Tm1	Tm2	Tm3	Tm4
WT R	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,89636555	No Amp	3	34	81,675	88,058		
WT R	KAT1-YFP	37,95194419	0,949026	1,12996127	Inconclusive	3	32	79,003			
WT R	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,44523388	No Amp	3	39	87,803	80,518		
WT R	HPH	36,28334787	0,973056	1,24452692	Amp	3	31	79,295	84,044		
WT R	HPH	Undetermined	0	0,71981761	No Amp	3	36	83,938			
WT R	HPH	Undetermined	0	0,53717377	No Amp	3	37	80,667			
WT R	GADPH	19,71566888	0,993907	1,53422486	Amp	3	14	85,993			
WT R	GADPH	19,26480252	0,992307	1,55094293	Amp	3	13	85,251			
WT R	GADPH	19,33155507	0,993125	1,55290466	Amp	3	13	85,083			
WT PA	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,62702779	No Amp	3	36	87,612			
WT PA	KAT1-YFP	Undetermined	0		No Amp	3	39	93,995	81,526		
WT PA	KAT1-YFP	36,20072964	0,985945	1,29984589	Amp	3	31	81,708			
WT PA	HPH	Undetermined	0		No Amp	3	39	94,284	85,083		
WT PA	HPH	Undetermined	0		No Amp	3	39	85,573	77,248		
WT PA	HPH	Undetermined	0		No Amp	3	39	94,345	87,209	82,005	76,653
WT PA	GADPH	20,68249886	0,993789	1,40070817	Amp	3	15	86,29			
WT PA	GADPH	19,40946744	0,994296	1,54732048	Amp	3	13	85,399			
WT PA	GADPH	19,51436438	0,994098	1,55006893	Amp	3	13	85,379			
WT KAT R	KAT1-YFP	29,68175807	0,995399	1,54422496	Amp	3	24	82,12			
WT KAT R	KAT1-YFP	29,45246367	0,994818	1,55221425	Amp	3	24	81,526			
WT KAT R	KAT1-YFP	30,13019379	0,988944	1,53094023	Amp	3	24	81,262			
WT KAT R	HPH	27,02743477	0,995254	1,49912093	Amp	3	22	87,457			
WT KAT R	HPH	28,39707658	0,995528	1,50462221	Amp	3	23	86,614			
WT KAT R	HPH	30,09245695	0,993721	1,51768509	Amp	3	25	86,317			
WT KAT R	GADPH	19,24045793	0,994076	1,54268857	Amp	3	13	85,993			
WT KAT R	GADPH	18,86630256	0,993175	1,568654	Amp	3	13	85,251			
WT KAT R	GADPH	18,93829319	0,988995	1,55947546	Amp	3	13	85,379			
WT KAT PA	KAT1-YFP	27,36252426	0,997153	1,58042856	Amp	3	22	82,268			
WT KAT PA	KAT1-YFP	28,10136368	0,994465	1,53769555	Amp	3	23	81,675			
WT KAT PA	KAT1-YFP	27,93044532	0,996665	1,541362	Amp	3	22	81,559			
WT KAT PA	HPH	24,95628454	0,997124	1,49465865	Amp	3	20	87,457			
WT KAT PA	HPH	29,05456421	0,965805	1,66478114	Amp	3	24	87,06			
WT KAT PA	HPH	27,07383982	0,994834	1,51907431	Amp	3	21	86,614			
WT KAT PA	GADPH	20,23025689	0,993864	1,51819359	Amp	3	14	86,142			
WT KAT PA	GADPH	19,98136104	0,98966	1,53714245	Amp	3	14	85,548			
WT KAT PA	GADPH	19,87963649	0,995482	1,53713368	Amp	3	14	85,676			
no cDNA	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,82828408	No Amp	3	35	87,357			
no cDNA	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,39392541	No Amp	3	37	80,93	91,765		
no cDNA	KAT1-YFP	Undetermined	0		No Amp	3	39	80,93	90,726	86,125	
no cDNA	HPH	Undetermined	0	0,76783218	No Amp	3	35	87,209			
no cDNA	HPH	Undetermined	0		No Amp	3	37	86,422			
no cDNA	HPH	Undetermined	0	0,72915279	No Amp	3	35	86,57			
no cDNA	GADPH	34,13701458	0,981371	1,35337194	Amp	3	28	76,801			
no cDNA	GADPH	39,32647823	0	1,03593977	Amp	3	32	76,329			
no cDNA	GADPH	37,77027152	0,93232	1,1227333	Amp	3	31	76,477			

kat1 R	KAT1-YFP	35,25299988	0,990004	1,41209513	Amp	3	30	79,448			
kat1 R	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,76687652	No Amp	3	34	86,722			
kat1 R	KAT1-YFP	Undetermined	0	0,90548125	No Amp	3	33	85,573			
kat1 R	HPH	37,95145548	0,966746	1,10392877	Inconclusive	3	33	87,309			
kat1 R	HPH	Undetermined	0	0,42129477	No Amp	3	36	86,614	83,938		
kat1 R	HPH	Undetermined	0	0,25876431	No Amp	3	39	82,6	78,288	94,048	
kat1 R	GADPH	19,57731171	0,994594	1,54036751	Amp	3	14	86,142			
kat1 R	GADPH	19,13233011	0,993474	1,55586614	Amp	3	13	85,399			
kat1 R	GADPH	19,20920007	0,99399	1,56061102	Amp	3	13	85,231			
kat1 PA	KAT1-YFP	36,40977421	0,986324	1,30925538	Amp	3	31	82,268			
kat1 PA	KAT1-YFP	35,36891594	0,990892	1,43476268	Amp	3	29	81,971			
kat1 PA	KAT1-YFP	36,37624171	0,986086	1,35089805	Inconclusive	3	31	81,559			
kat1 PA	HPH	34,76526527	0,991908	1,42863028	Amp	3	29	87,16			
kat1 PA	HPH	34,86165043	0,987639	1,38472017	Amp	3	29	86,911			
kat1 PA	HPH	36,04598111	0,981928	1,28126261	Amp	3	30	86,911			
kat1 PA	GADPH	19,82491683	0,994358	1,51655235	Amp	3	14	86,142			
kat1 PA	GADPH	19,3790011	0,992886	1,54165575	Amp	3	14	85,251			
kat1 PA	GADPH	19,40522636	0,993297	1,54574047	Amp	3	13	85,231			
kat1 KAT R	KAT1-YFP	24,21480221	0,995773	1,56275814	Amp	3	18	81,971			
kat1 KAT R	KAT1-YFP	24,52774241	0,995524	1,52831737	Amp	3	19	81,526			
kat1 KAT R	KAT1-YFP	24,51904539	0,996299	1,52884446	Amp	3	19	81,41			
kat1 KAT R	HPH	22,11477618	0,995175	1,47587507	Amp	3	17	87,309			
kat1 KAT R	HPH	22,95700837	0,995843	1,53305283	Amp	3	18	86,763			
kat1 KAT R	HPH	23,46694392	0,994223	1,52958518	Amp	3	17	86,614			
kat1 KAT R	GADPH	19,10097619	0,991183	1,49642924	Amp	3	13	85,696			
kat1 KAT R	GADPH	18,73629564	0,995364	1,55912169	Amp	3	13	85,696			
kat1 KAT R	GADPH	18,6665056	0,994618	1,55708946	Amp	3	13	85,379			
kat1 KAT PA	KAT1-YFP	24,91392591	0,997706	1,54868884	Amp	3	19	82,12			
kat1 KAT PA	KAT1-YFP	24,61444099	0,996499	1,56860048	Amp	3	19	81,675			
kat1 KAT PA	KAT1-YFP	24,06363144	0,996117	1,61401234	Amp	3	18	81,708			
kat1 KAT PA	HPH	24,33644352	0,842435	1,65435262	Amp	3	19	87,605			
kat1 KAT PA	HPH	23,81826875	0,996545	1,53283053	Amp	3	18	86,763			
kat1 KAT PA	HPH	24,33356282	0,995048	1,51900715	Amp	3	19	86,465			
kat1 KAT PA	GADPH	19,85941046	0,993969	1,54436201	Amp	3	14	85,433			
kat1 KAT PA	GADPH	19,75332557	0,994903	1,58067827	Amp	3	14	85,579			
kat1 KAT PA	GADPH	19,93458363	0,994293	1,55387982	Amp	3	14	85,714			