



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biotecnología

# **Caracterización del gen *CRIO4* y su implicación en tolerancia a estrés por frío**

Tesis Doctoral realizada por  
**Ana Cristina Izquierdo García**

Directores

**Dr. José Miguel Mulet Salort**

**Dr. Ramón Serrano Salom**

Valencia, febrero 2016



## RESUMEN

El frío es uno de los estreses abióticos más importantes, afecta severamente al crecimiento y desarrollo de las plantas, y limita su distribución geográfica. Puesto que el estrés por frío, por salinidad y por sequía solapan algunos de sus mecanismos moleculares de respuesta, se usó una biblioteca de ADNc de remolacha (*Beta vulgaris*) generada con hojas de plantas sometidas a estrés salino, para tratar de identificar genes de tolerancia a estrés por frío mediante su sobreexpresión en levadura. De este modo se identificó, entre otros, el gen *CRIO4* cuya caracterización ha sido el trabajo de esta tesis. *CRIO4* codifica una proteína tipo Sec14, y es ortólogo a la familia *PATL* de *Arabidopsis thaliana* y tiene un dominio conservado con *SEC14* y la familia *SFH* de levadura. La sobreexpresión de *CRIO4* confiere a las células de levadura la capacidad de crecer a temperaturas bajas y tolerancia a tunicamicina (inhibidor de la glicosilación de proteínas). El análisis *in silico* de la secuencia de *CRIO4* confirma diversos motivos y dominios conservados en la proteína que parecen dirigir su función hacia el tráfico vesicular, y revela múltiples potenciales sitios de fosforilación en *CRIO4* sugiriendo una posible función en señalización. El dominio Sec14 es un dominio de unión y transferencia de fosfolípidos, y los resultados obtenidos indican que *CRIO4* establece unión con fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. *CRIO4* no complementa la función de Sec14p de levadura, y esto podría ser debido a la falta de afinidad de *CRIO4* por fosfatidilcolina. En levadura, el transporte de triptófano es el mayor factor limitante para el crecimiento a temperaturas bajas. Los resultados del ensayo de coexpresión de *CRIO4* con *TAT2* (una permeasa de alta afinidad para triptófano) en levadura mostrados en esta tesis, parecen indicar una estimulación del transporte de Tat2p hacia la membrana plasmática por parte de *CRIO4*, que podría devenir en una absorción de triptófano mejorada, explicando así la mayor tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión de *CRIO4* en levadura.

El estudio de localización subcelular ha mostrado que *CRIO4* está asociada a la membrana plasmática y en membranas intracelulares, formando parte de vesículas, lo que parece confirmar el papel de *CRIO4* en el tráfico intracelular, función que compartiría con sus ortólogos. El patrón de expresión de *CRIO4* en remolacha ha mostrado que *CRIO4* se expresa en todos los tejidos analizados, concentrándose su mayor expresión en hoja y raíz. También se ha mostrado que la expresión de *CRIO4* aumenta tras tiempos cortos de exposición a estrés por frío y estrés por calor.

Se han realizado estudios fenotípicos de diferentes líneas mutantes en genes *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*, obteniéndose una gran variabilidad en los resultados que podría ser debida a la redundancia funcional entre los miembros de esta familia multigénica. También se han realizado estudios fenotípicos de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *CRIO4*. Estas líneas muestran una mejoría en su crecimiento y desarrollo a temperaturas bajas, aumentando por tanto su tolerancia al estrés por frío. Además, la expresión de *CRIO4*, en las líneas transgénicas de *A. thaliana*, aumenta considerablemente

tras el estrés por frío y tras un choque térmico, observándose en este último caso, acúmulos de CRI04 a lo largo de toda la célula.

El reciclaje intracelular de PIN2, indicador de la respuesta gravitrópica, se ve afectado por la disminución de la temperatura. Los resultados obtenidos en esta tesis parecen indicar que la sobreexpresión de *CRIO4* reactiva el transporte intracelular de PIN2 bajo estrés por frío, lo que implicaría que su fenotipo está relacionado con el tráfico de auxinas.

## RESUM

El fred és un dels estressos abiòtics més importants, afecta severament al creixement i desenvolupament de les plantes, i limita la seua distribució geogràfica. Ja que l'estrès per fred, per salinitat i per sequera solapen alguns dels seus mecanismes moleculars de resposta, es va usar una biblioteca d'ADNc de remolatxa (*Beta vulgaris*) generada amb fulles de plantes sotmeses a estrès salí, per tractar d'identificar gens de tolerància a estrès per fred mitjançant la seua sobreexpressió en llevat. D'aquesta manera es va identificar, entre d'altres, el gen *CRIO4* la caracterització del qual ha estat el treball d'aquesta tesi. *CRIO4* codifica una proteïna tipus Sec14, i és ortòleg a la família *PATL* d'*Arabidopsis thaliana* i té un domini conservat amb *SEC14* i la família *SFH* de llevat. La sobreexpressió de *CRIO4* confereix a les cèl·lules de llevat la capacitat de créixer a temperatures baixes i tolerància a tunicamicina (inhibidor de la glicosilació de proteïnes). L'anàlisi *in silico* de la seqüència de *CRIO4* confirma diversos motius i dominis conservats en la proteïna que semblen dirigir la seua funció cap al tràfic vesicular, i revelen múltiples potencials llocs de fosforilació en *CRIO4* suggerint una possible funció en senyalització. El domini Sec14 és un domini d'unió i transferència de fosfolípids i els resultats obtinguts indiquen que *CRIO4* estableix unió amb fosfatidilinositol i fosfatidiletanolamina. *CRIO4* no complementa la funció de Sec14p de llevat, i això podria ser a causa de la falta d'afinitat de *CRIO4* per fosfatidilcolina. En llevat, el transport de triptòfan és el major factor limitant per al creixement a temperatures baixes. Els resultats de l'assaig de coexpressió de *CRIO4* amb *TAT2* (una permeasa d'alta afinitat per triptòfan) en llevat mostrats en aquesta tesi, semblen indicar una estimulació del transport de Tat2p cap a la membrana plasmàtica per part de *CRIO4*, que podria esdevindre en una absorció de triptòfan millorada, explicant així la major tolerància a fred conferida per la sobreexpressió de *CRIO4* en llevat.

L'estudi de localització subcel·lular ha mostrat que *CRIO4* està associada a la membrana plasmàtica i en membranes intracel·lulars, formant part de vesícules, la qual cosa sembla confirmar el paper de *CRIO4* en el tràfic intracel·lular, funció que compartiria amb els seus homòlegs. El patró d'expressió de *CRIO4* en remolatxa ha mostrat que *CRIO4* s'expressa en tots els teixits analitzats, concentrant-se la seua major expressió en fulla i arrel. També s'ha mostrat que l'expressió de *CRIO4* augmenta després de temps curts d'exposició a estrès per fred i estrès per calor.

S'han realitzat estudis fenotípics de diferents línies mutants en gens *PATLs* d'*Arabidopsis thaliana*, obtenint-se una gran variabilitat en els resultats que podria ser deguda a la redundància funcional entre els membres d'aquesta família multigènica. També s'han realitzat estudis fenotípics de línies transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* que sobreexpressen el gen *CRIO4*. Aquestes línies mostren una millora en el seu creixement i desenvolupament a temperatures baixes, augmentant per tant la seua tolerància a l'estrès per fred. A més, l'expressió de *CRIO4*, en les línies transgèniques d'*A. thaliana*, augmenta considerablement després de l'estrès per fred i després d'un xoc tèrmic, observant-se en aquest últim cas, cúmuls de *CRIO4* al llarg de tota la cèl·lula.

El reciclatge intracel·lular de PIN2, indicador de la resposta gravitrópica, es veu afectat per la disminució de la temperatura. Els resultats obtinguts en aquesta tesi semblen indicar que la sobreexpressió de *CRIO4* reactiva el transport intracel·lular de PIN2 sota estrès per fred, la qual cosa implicaria que el seu fenotip està relacionat amb el tràfic d'auxines.

## ABSTRACT

Cold is one of the most important abiotic stresses, severely affects the growth and development of plants, and limits their geographical distribution. Given that cold, salinity and drought stresses overlap some of their molecular mechanisms of response, a cDNA library of sugar beet (*Beta vulgaris*), generated from leaves of plants subjected to saline stress, was used to try to identify genes for tolerance to cold stress by its overexpression in yeast. In this way it was identified, among others, the *CRIO4* gene whose characterization has been the work of this thesis. *CRIO4* encodes a SEC14-like protein, and it is ortholog to *PATL* family of *Arabidopsis thaliana* and it shares a conserved domain with *SEC14* and *SFH* family of yeast. *CRIO4* overexpression confers to the yeast cells the ability to grow at low temperatures and tolerance to tunicamycin (an inhibitor of protein glycosylation). The *in silico* analysis of the *CRIO4* sequence confirms several motifs and domains conserved in the protein that seem to direct its function toward the vesicular trafficking, and it reveals multiple potential phosphorylation sites in *CRIO4* suggesting a possible role in signaling. Sec14 domain is a phospholipid binding and transfer domain, and the obtained results indicate that *CRIO4* binds to phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine. *CRIO4* does not complement the function of Sec14p of yeast, and this could be due to the lack of phosphatidylcholine affinity by *CRIO4*. Tryptophan transport is the greatest limiting factor for growth at low temperatures in yeast. The results of the yeast coexpression assay of *CRIO4* and *TAT2* (a high-affinity tryptophan permease) displayed in this thesis, seem to indicate stimulation of Tat2p transport to the plasma membrane by *CRIO4*, which could develop into an enhanced tryptophan absorption, thereby explaining the greater cold tolerance conferred by overexpression of *CRIO4* in yeast.

The subcellular localization study has shown that *CRIO4* is associated with the plasma membrane and intracellular membranes, being part of vesicles, which seems to confirm the role of *CRIO4* in intracellular trafficking, function that it would share with its orthologous genes. The expression pattern of *CRIO4* in sugar beet has shown that *CRIO4* is expressed in all analyzed tissues, focusing its highest expression in leaf and root. It has also been shown that *CRIO4* expression increases after shorter exposure to cold stress and heat stress.

Phenotypic studies of several mutant lines of *PATLs* genes from *Arabidopsis thaliana* have been carried out and high variability in results was obtained, this could be due to functional redundancy among the members of this multigenic family. Phenotypic studies of transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* overexpressing the *CRIO4* gene have also been performed. These lines show an improvement in their growth and development at low temperatures, thereby increasing their tolerance to cold stress. Furthermore, expression of *CRIO4*, in *A. thaliana* transgenic lines, increases considerably after cold stress and heat shock. Moreover, accumulation points of *CRIO4* were observed along the whole cell, after heat shock.

Intracellular recycling of PIN2, a gravitropic response indicator, is affected by decreasing temperature. The results obtained in this thesis suggest that overexpression of *CRIO4*

reactivates intracellular transport of PIN2 under cold stress, which would imply that its phenotype is related to auxin traffic.



## ÍNDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| 1- INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| 1.1- Estrés por frío .....  | 1  |
| 1.1.1- Concepto de estrés en fisiología vegetal .....                 | 1  |
| 1.1.2- Tipos de estrés .....  | 2  |
| 1.1.3- Relevancia del estudio del estrés en plantas .....             | 2  |
| 1.1.4- Mecanismos generales de respuesta al estrés .....              | 3  |
| 1.1.5- Estrés por bajas temperaturas en plantas .....                 | 4  |
| 1.1.5.1- Percepción y transducción de la señal de frío .....          | 5  |
| 1.1.5.2- Regulación de la expresión génica .....                      | 8  |
| 1.1.5.2.1- Regulación transcripcional .....                           | 8  |
| 1.1.5.2.2- Regulación postranscripcional .....                        | 11 |
| 1.1.5.2.3- Regulación traduccional .....                              | 12 |
| 1.1.5.2.4- Regulación postraduccional .....                           | 13 |
| 1.1.5.2.5- Regulación independiente de la ruta CBF .....              | 15 |
| 1.1.5.3- Respuestas estructurales y bioquímicas .....                 | 17 |
| 1.2- Remolacha ( <i>Beta vulgaris</i> ). Importancia agronómica ..... | 21 |
| 1.3- Sistemas modelo .....  | 23 |
| 1.3.1- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                          | 23 |
| 1.3.1.1- SEC14 .....  | 24 |
| 1.3.1.1.1- Descripción dominio y familia .....                        | 24 |
| 1.3.1.1.2- Intercambio lipídico .....                                 | 26 |
| 1.3.1.1.3- Función biológica .....                                    | 28 |
| 1.3.1.1.4- Sec14p y balsas lipídicas .....                            | 31 |
| 1.3.1.2- TAT2 y transporte de triptófano .....                        | 32 |
| 1.3.2- <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                              | 35 |
| 1.3.2.1- Patelinas, familia multigénica .....                         | 36 |
| 1.3.2.1.1- Patelinas y balsas lipídicas .....                         | 40 |
| 1.3.2.2- PIN2 y auxinas .....   | 42 |
| 2- OBJETIVOS .....  | 49 |
| 3- MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 53 |
| 3.1- Material biológico .....   | 53 |
| 3.1.1- <i>Beta vulgaris</i> .....                                     | 53 |
| 3.1.2- <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                              | 53 |
| 3.1.3- <i>Escherichia coli</i> .....                                  | 54 |
| 3.1.4- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                          | 54 |
| 3.1.5- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                         | 54 |
| 3.1.6- <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                             | 54 |
| 3.1.7- Vectores de clonación y transformación .....                   | 54 |
| 3.2- Medios de cultivo .....  | 56 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.1- Medios para el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                   | 56 |
| 3.2.2- Medios para el crecimiento de bacterias.....                                      | 56 |
| 3.2.3- Medios para el crecimiento de levadura .....                                      | 57 |
| 3.2.4- Sustancias termolábiles de selección .....  | 57 |
| 3.3- Manipulación y crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> .....                            | 58 |
| 3.4- Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                     | 58 |
| 3.4.1- Esterilización de semillas .....  | 58 |
| 3.4.2- Condiciones de cultivo in vitro.....  | 58 |
| 3.4.3- Condiciones de cultivo en invernadero .....                                       | 58 |
| 3.4.4- Fertilización cruzada para obtención de dobles mutantes.....                      | 59 |
| 3.4.5- Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i> .....         | 59 |
| 3.4.5.1- Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos .....               | 59 |
| 3.4.6- Análisis fenotípicos.....   | 60 |
| 3.4.6.1- Ensayo de germinación.....  | 60 |
| 3.4.6.2- Medida de longitud de raíces.....   | 60 |
| 3.4.6.3- Medida de área de cotiledones .....   | 60 |
| 3.4.6.4- Medida de área de semillas .....  | 60 |
| 3.4.6.5- Medida de longitud de tallos .....  | 61 |
| 3.4.6.6- Ensayo de número de ramificaciones .....  | 61 |
| 3.4.6.7- Ensayo de número de hojas de roseta .....                                       | 61 |
| 3.4.6.8- Ensayo de número de silicuas .....  | 61 |
| 3.4.6.9- Ensayo de estadio de desarrollo.....  | 61 |
| 3.5- Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....                         | 62 |
| 3.5.1- Preparación de células competentes .....  | 62 |
| 3.5.2- Transformación de células competentes .....                                       | 62 |
| 3.6- Manipulación y crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                 | 62 |
| 3.6.1- Preparación de células competentes para choque térmico .....                      | 63 |
| 3.6.2- Transformación de células competentes por el método de alta eficiencia .....      | 63 |
| 3.6.3- Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos) .....                             | 63 |
| 3.7- Manipulación y crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                | 64 |
| 3.7.1- Preparación de células competentes .....  | 64 |
| 3.7.2- Transformación mediante electroporación.....                                      | 64 |
| 3.8- Manipulación y crecimiento de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                    | 64 |
| 3.8.1- Cultivo en invernadero .....  | 64 |
| 3.8.2- Transformación transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                  | 64 |
| 3.8.3- Obtención de protoplastos a partir de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> ..... | 65 |
| 3.8.4- Transfección de protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                | 65 |
| 3.9- Purificación, manipulación y análisis de ácidos nucleicos .....                     | 66 |
| 3.9.1- Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....                             | 66 |
| 3.9.2- Aislamiento de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .....                       | 66 |

|   |    |
|---|----|
| 3.9.3- Aislamiento de ADN genómico de <i>A. thaliana</i> .....  | 67 |
| 3.9.4- Aislamiento de ADN genómico de <i>B. vulgaris</i> .....  | 67 |
| 3.9.5- Tratamiento de ADN con endonucleasas de restricción.....   | 67 |
| 3.9.6- Reacciones de ligación de ADN.....   | 67 |
| 3.9.7- Electroforesis de ADN.....   | 68 |
| 3.9.8- Purificación de fragmentos de ADN.....   | 68 |
| 3.9.9- Aislamiento de ARN de <i>A. thaliana</i> .....   | 68 |
| 3.9.10- Aislamiento de ARN de <i>B. vulgaris</i> .....  | 69 |
| 3.9.11- Electroforesis de ARN.....  | 69 |
| 3.9.12- Marcaje radioactivo de sondas.....  | 69 |
| 3.9.13- Análisis <i>Northern blot</i> .....   | 70 |
| 3.9.14- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....  | 70 |
| 3.9.14.1- Oligonucleótidos cebadores.....   | 70 |
| 3.9.14.2- Condiciones de PCR.....   | 72 |
| 3.9.14.3- PCR diagnóstica.....  | 73 |
| 3.9.14.4- RT-PCR semicuantitativa.....  | 73 |
| 3.10- Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para experimentos de<br>transformación de plantas y levaduras..... | 74 |
| 3.11- Manipulación de proteínas.....  | 75 |
| 3.11.1- Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i> .....   | 75 |
| 3.11.1.1- Extracción rápida.....  | 75 |
| 3.11.1.2- Purificación de proteína por resina cargada con níquel.....   | 76 |
| 3.11.2- Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....   | 77 |
| 3.11.3- Análisis <i>Western Blot</i> .....  | 77 |
| 3.11.3.1- Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana.....   | 77 |
| 3.11.3.2- Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....   | 78 |
| 3.12- Ensayo de unión a fosfolípidos.....   | 78 |
| 3.13- Estudio de localización celular de proteínas por microscopía confocal.....  | 79 |
| 3.14- Tratamiento de datos estadísticos.....  | 79 |
| 3.15- Herramientas de análisis bioinformático.....  | 79 |
| 4- RESULTADOS.....  | 83 |
| 4.1- Identificación del gen <i>BvCRIO4</i> .....  | 83 |
| 4.1.1- Aislamiento del gen <i>BvCRIO4</i> .....   | 83 |
| 4.1.2- Características generales del gen <i>BvCRIO4</i> .....   | 85 |
| 4.2- Estudio filogenético de <i>CRIO4</i> .....   | 91 |
| 4.3- Caracterización Bioquímica de <i>CRIO4</i> .....   | 93 |
| 4.3.1- Ensayo de complementación a <i>SEC14</i> de levadura.....  | 93 |
| 4.3.2- Fenotipo de la sobreexpresión de <i>CRIO4</i> en levadura.....   | 94 |
| 4.3.3- Ensayo de unión a fosfolípidos.....  | 95 |
| 4.4- Localización subcelular de <i>CRIO4</i> .....  | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.4.1- Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                     | 97  |
| 4.4.2- Transfección protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                 | 98  |
| 4.4.3- <i>Arabidopsis thaliana</i> , líneas de sobreexpresión de <i>CRIO4</i> .....    | 98  |
| 4.5- Coexpresión con <i>TAT2</i> en levadura .....                                     | 100 |
| 4.6- Estudio Genético de <i>CRIO4</i> .....  | 102 |
| 4.6.1- Patrón de expresión en <i>Beta vulgaris</i> .....                               | 102 |
| 4.6.2- Fenotipo de pérdida de función de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....             | 103 |
| 4.6.3- Fenotipo de sobreexpresión de <i>CRIO4</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 107 |
| 4.7- Coexpresión con <i>PIN2</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                  | 112 |
| 5- DISCUSIÓN .....   | 117 |
| 6- CONCLUSIONES .....  | 129 |
| 7- BIBLIOGRAFÍA .....  | 133 |

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1: Algunos agentes estresantes para las plantas .....   | 2  |
| Tabla 2: ADNc identificados en el rastreo de genes que confieran tolerancia a frío .....  | 84 |
| Tabla 3: Composición aminoacídica de CRIO4 .....  | 86 |
| Tabla 4: Tipos de motivos ricos en prolina. Encuadrados en rojo, los motivos que se encuentran en la proteína CRIO4 .....   | 89 |
| Tabla 5: Ortólogos de <i>CRIO4</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 91 |
| Tabla 6: Ortólogos de <i>CRIO4</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....   | 92 |
| <br>  |    |
| Figura 1: Transición de fases en la membrana plasmática debida al estrés por frío .....   | 6  |
| Figura 2: Modelo de la ruta de MKK.....   | 27 |
| Figura 3: Regulación de la ruta de señalización CBF durante el estrés por frío .....  | 11 |
| Figura 4: Estructura de dominios de proteínas tipo Sec14 en eucariotas .....  | 24 |
| Figura 5: Detalle de la estructura de Sec14p, con el bolsillo hidrofóbico abierto, y Sfh1p, con el bolsillo hidrofóbico cerrado.....  | 25 |
| Figura 6: Sitios de unión de la cabeza polar de PI y de PC, al dominio Sec14.....   | 26 |
| Figura 7: Esquema de la regulación de la PI4K por Sec14 .....   | 26 |
| Figura 8: Representación del intercambio heterotípico entre PC y PI en Sec14.....   | 27 |
| Figura 9: Esquema de la función de Sec14p en la ruta de secreción desde Golgi, en levadura.....   | 29 |
| Figura 10: Diversidad de resultados biológicos de las PITPs tipo Sec14 de levadura.....   | 30 |
| Figura 11: Localización subcelular de Tat2p bajo condiciones de alto y bajo contenido de triptófano en el medio.....  | 33 |
| Figura 12: Localización subcelular de Tat2p en células del mutante termosensible <i>sec14<sup>ts</sup></i> , bajo condiciones de bajo contenido de triptófano en el medio .....   | 33 |
| Figura 13: Modelo de localización de Tat2p .....  | 34 |
| Figura 14: Diagrama de la estructura de dominio de las PATLs en Arabidopsis .....   | 36 |
| Figura 15: Análisis filogenético de las PATLs de plantas .....  | 36 |
| Figura 16: Proteínas tipo Sec14 en eucariotas .....   | 37 |
| Figura 17: Patrón de expresión de <i>PATL1</i> en Arabidopsis.....  | 38 |
| Figura 18: Unión a fosfoinosítidos de <i>PATL1</i> .....  | 38 |
| Figura 19: Representación esquemática del flujo de auxinas en el ápice radicular .....  | 42 |
| Figura 20: Tráfico de membranas durante el comienzo la formación de la placa celular y su maduración.....   | 44 |
| Figura 21: Tráfico intracelular de PIN2 afectado por el estrés por frío .....   | 45 |
| Figura 22: Esquema de la producción de la biblioteca de ADNc de remolacha y diagrama del rastreo de dicha biblioteca de ADNc en busca de genes que confirieran tolerancia a frío por sobre expresión en levadura, donde se identificó el gen <i>BvCRIO4</i> ..... | 83 |
| Figura 23: Tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión del ADNc CRIO4 .....   | 84 |
| Figura 24: Secuencia de nucleótidos del gen <i>BvCRIO4</i> .....  | 85 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 25: Estructura de dominios de la proteína CRIO4 .....   | 86  |
| Figura 26: Predicción de sitios de fosforilación en CRIO4 con NetPhos 2.0 .....  | 87  |
| Figura 27: Predicción de sitios de fosforilación en CRIO4 con PhosPhAt 4.0 .....   | 87  |
| Figura 28: Diagrama de la estructura de dominios de CRIO4 comparada con la de las PATLs en <i>A. thaliana</i> .....  | 88  |
| Figura 29: Alineamiento de CRIO4 y PATL1 de <i>A. thaliana</i> que muestra la R266 de PATL1 ....   | 88  |
| Figura 30: Localización del gen <i>CRIO4</i> , denominado LOC104898006, en el cromosoma 1 de remolacha y estructura de exones e intrones del mismo gen .....         | 90  |
| Figura 31: Cladograma de <i>CRIO4</i> y la familia <i>PATLs</i> , a partir de secuencias aminoacídicas ...   | 92  |
| Figura 32: Ensayo de complementación a Sec14p de levadura con CRIO4 .....  | 93  |
| Figura 33: Gráfica del ensayo de complementación a Sec14p de levadura con el dominio Sec14 de CRIO4, en medio líquido .....  | 94  |
| Figura 34: Medios de cultivo empleados en la búsqueda de fenotipo de la sobreexpresión de <i>CRIO4</i> en levadura .....   | 94  |
| Figura 35: <i>Western Blot</i> de la proteína CRIO4 purificada mediante resina cargada con níquel .....  | 95  |
| Figura 36: Esquema del ensayo de unión a fosfolípidos .....  | 96  |
| Figura 37: Unión a fosfolípidos de CRIO4, comparada con PATL1 .....  | 96  |
| Figura 38: Expresión transitoria de <i>CRIO4</i> en células de la epidermis de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....   | 96  |
| Figura 39: Protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> transfectados con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP .....  | 98  |
| Figura 40: Expresión de la fusión CRIO4::GFP en líneas transgénicas estables de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 99  |
| Figura 41: Expresión de <i>CRIO4</i> en tejido vascular de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> , y acúmulos puntuales de CRIO4 .....                               | 100 |
| Figura 42. Coexpresión de TAT2::GFP y CRIO4, a 10°C y 28°C, y en medios de cultivo que contienen triptófano o en condiciones de ayuno de éste .....                  | 101 |
| Figura 43: Expresión de <i>CRIO4</i> en diferentes tejidos de plántulas de remolacha .....   | 102 |
| Figura 44: Expresión de <i>CRIO4</i> en hojas de remolacha, bajo condiciones de estrés por frío (4°C), estrés por calor (37°C) y estrés por sequía .....             | 103 |
| Figura 45: Expresión de <i>CRIO4</i> en hojas de remolacha, bajo condiciones de luz, oscuridad y luz azul .....  | 103 |
| Figura 46: Líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> empleadas .....  | 104 |
| Figura 47: RT-PCR de líneas mutantes por inserción de T-DNA para los genes <i>PATL3</i> y <i>PATL5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                          | 104 |
| Figura 48: Germinación de las líneas mutantes <i>patl3</i> , <i>patl5</i> y <i>patl3patl5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> a 24°C y 10°C .....                     | 105 |
| Figura 49: Medida de la longitud de raíces de las líneas mutantes <i>patl3</i> , <i>patl5</i> y <i>patl3patl5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> a 24°C y 10°C ..... | 105 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 50: Medida del área de los cotiledones y las semillas de las líneas mutantes <i>pat13</i> , <i>pat15</i> y <i>pat13pat15</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                              | 106 |
| Figura 51: Análisis <i>Northern blot</i> de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobreexpresan el gen <i>CRIO4</i> .....  | 107 |
| Figura 52: Medida del área de los cotiledones de las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....   | 108 |
| Figura 53: Cuantificación del número de hojas de la roseta y del número de silicuas del tallo principal, en plantas de las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 108 |
| Figura 54: Medida del crecimiento en longitud en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                                 | 109 |
| Figura 55: Medida del número de ramificaciones principales en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                    | 109 |
| Figura 56: Determinación del estadio de desarrollo en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                            | 110 |
| Figura 57: Expresión de la fusión CRIO4::GFP en células radiculares de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a varios estreses .....   | 111 |
| Figura 58: Localización subcelular de PIN2, en raíz de plántulas transgénicas PIN2:GFP-CRIO4, a 24°C y 10°C.....  | 112 |





## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| 35S                    | Promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor |
| ABA                    | Acido Abcísico   |
| ADN                    | Ácido desoxirribonucleico                                      |
| ADNc                   | ADN complementario   |
| APS                    | Persulfato de amonio   |
| ARN                    | Ácido ribonucleico   |
| ARNm                   | ARN mensajero  |
| BASTA                  | Glufosinato de amonio  |
| BSA                    | Albumina de Suero Bovino                                       |
| CTAB                   | Bromuro de cetiltrimetilamonio                                 |
| DMSO                   | Dimetil sulfóxido  |
| DTE                    | Ditioeritritol   |
| DTT                    | Ditiotreitol   |
| dTTP                   | Desoxitimidina trifosfato                                      |
| ECL                    | Quimioluminiscencia mejorada                                   |
| EDTA                   | Ácido etilen-diamino-tetracético                               |
| EtAcNa                 | Etanol Acetato de sodio  |
| EtOH                   | Etanol   |
| Gal                    | Galactosa  |
| Gent                   | Gentamicina  |
| GFP                    | Proteína verde fluorescente                                    |
| H <sup>+</sup> -ATPasa | Bomba de Protones Protón-ATPasa                                |
| Kan                    | Kanamicina   |
| LB                     | Borde izquierdo del T-DNA                                      |
| LB                     | Medio Luria Bertani de crecimiento de bacterias                |
| MAE                    | Tampón de electroforesis de RNA                                |
| MES                    | Ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico                          |
| MOPS                   | Ácido 2-(N-morfolino) propanosulfónico                         |
| MS                     | Medio de cultivo Murashige y Skoog                             |
| NASC                   | Nottingham Arabidopsis Stock Center                            |
| NPQ                    | <i>Quenching</i> no fotoquímico                                |
| OD                     | Densidad Óptica  |
| OLB                    | Tampón de marcaje  |
| ORF                    | Marco abierto de lectura                                       |
| PC                     | Fosfatidilcolina   |
| PCI                    | Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico                            |
| PCR                    | Reacción en cadena de la polimerasa                            |
| PEG                    | Polietilenglicol   |
| PI                     | Fosfatidilinositol   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| PI(3)P                | Fosfatidilinositol-3-fosfato   |
| PI(4)P                | Fosfatidilinositol-4-fosfato   |
| PI(4,5)P <sub>2</sub> | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato                                       |
| PI(5)P                | Fosfatidilinositol-5-fosfato   |
| PI4K                  | Fosfatidilinositol-4-quinasa   |
| PITP                  | Proteínas de transferencia de fosfatidilinositol                       |
| PSE                   | Tampón de hibridación de ácidos nucleicos                              |
| PtdCh                 | Fosfatidilcolina   |
| PtdEth                | Fosfatidiletanolamina  |
| PtdIns                | Fosfatidilinositol   |
| PVP                   | Polivinil Pirrolidona  |
| ROS                   | Especies reactivas de oxígeno  |
| rpm                   | Revoluciones por minuto  |
| SCD                   | Medio mínimo completo de crecimiento de levaduras                      |
| SD                    | Medio mínimo de crecimiento de levaduras                               |
| SDS                   | Dodecil sulfato de sodio   |
| SDS-PAGE              | Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico         |
| SOB                   | Medio rico de crecimiento de bacterias                                 |
| SOC                   | Medio rico de crecimiento de bacterias SOC suplementado con Glucosa    |
| SSC                   | Citrato salino sódico  |
| ssDNA                 | ADN de esperma de salmón   |
| t-BOOH                | Hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo                                   |
| TAE                   | Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos con base de ácido acético |
| TAIR                  | Base de datos de <i>Arabidopsis thaliana</i>                           |
| TBE                   | Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos con base de ácido bórico  |
| TCES                  | Tampón de extracción de ARN  |
| TE                    | Tampón-EDTA  |
| TEMED                 | N,N,N,N'-tetrametilnediamina   |
| TGN                   | Red del <i>trans</i> -Golgi  |
| Tris                  | Hidroximetil amoniometano  |
| YNB                   | Sales nitrogenadas para el crecimiento de levadura                     |
| YPD                   | Medio rico de crecimiento de levaduras                                 |

# **INTRODUCCIÓN**



## 1- INTRODUCCIÓN

### 1.1- Estrés por frío.

#### 1.1.1- Concepto de estrés en fisiología vegetal.

El término *estrés*, cuya definición había sido descrita en mecánica con mucha exactitud, fue usado por primera vez en un contexto biológico por Hans Selye en 1936, haciendo referencia a un síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes nocivos del ambiente de naturaleza física o química. Sin embargo, la definición de estrés en las plantas es bastante diferente de la definición de estrés en animales y seres humanos.

En la mayoría de los estudios con plantas, los autores utilizan el término "estrés" en un sentido muy amplio, y esto requiere el establecimiento de un concepto unificador de estrés en las plantas (Lichtenthaler, 1998). Probablemente debido a una extensión del significado físico (significado equivalente al de presión), muchas de estas definiciones, como la de J. Levitt en 1980, coinciden en la atribución de *estrés* a cualquier factor ambiental desfavorable para el organismo vivo que se examina. Y la capacidad del organismo para sobrevivir al factor desfavorable ha sido llamada *resistencia al estrés* (Gaspar *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos factores pueden tener simultáneamente efectos tanto beneficiosos como desfavorables (Nilsen y Orcutt, 1996). En este sentido, Lichtenthaler (1998) además de los conceptos de *estrés* (estado de una planta cuando se la somete a una agresión externa) y *tensión o esfuerzo* (más comúnmente denominado *resistencia al estrés*: respuesta de la planta al estrés antes de que ocurra algún daño), distingue también el concepto de *daño* (resultado de un estrés de tal intensidad que no puede ser compensado por la planta). Por tanto, es conveniente destacar que, aunque el estrés y sus respuestas vinculadas puedan estar presentes, esto no siempre implica la existencia de daño, aun cuando la planta esté sujeta a períodos largos o incluso a estrés continuo.

En esta memoria se tiene en cuenta la definición de Lambers *et al.* (1998) que entiende el estrés como cualquier factor ambiental, biótico o abiótico, que reduce la tasa de algún proceso fisiológico, por debajo de la tasa máxima que podría alcanzar. Estos mismos autores definen tres escalas temporales en la respuesta de las plantas al estrés (citado por Montoliu, 2010):

- *Fase de alarma*: es el efecto inmediato cuando se presenta el estrés. Ocurre en una escala de segundos a días. Las plantas reaccionan ralentizando o deteniendo sus funciones fisiológicas básicas, reduciendo su vigor, y activando mecanismos específicos para hacer frente al estrés. Las plantas que no poseen mecanismos adecuados de defensa o respuesta frente al estrés experimentan daños irreversibles y mueren. El desenlace es el mismo cuando la situación de estrés es muy intensa y supera la capacidad de respuesta de la planta.

- *Aclimatación*: es el ajuste morfológico y fisiológico que realiza la planta, como individuo, para compensar su peor funcionamiento después de la exposición al estrés. Ocurre en una escala de días a semanas. La activación de los mecanismos defensivos o de respuesta da lugar a

reajustes del metabolismo celular para adaptarse a las nuevas condiciones, a la activación de los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de las adaptaciones morfológicas.

-*Adaptación*: es la respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones, conduciendo a una compensación morfológica y fisiológica. Ocurre en una escala temporal mucho mayor que la aclimatación, y tras muchas generaciones.

### 1.1.2- Tipos de estrés.

Existen distintas clasificaciones de los factores de estrés aunque, en general, éstos pueden ser clasificados como estreses bióticos y abióticos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Los estreses bióticos son originados por la acción de otros seres vivos: animales, otras plantas (por competencia, alelopatía, etc.), microorganismos (bacterias y hongos), y otros agentes fitopatógenos (virus y viroides).

Los estreses abióticos, dependiendo del agente causal, pueden dividirse en físicos y químicos (Tabla 1). Entre los factores físicos se encuentran el estrés por déficit o exceso de agua, temperaturas extremas (calor, frío, congelación), salinidad (en su componente osmótico) y radiación UV. Y entre los factores químicos destacan la contaminación atmosférica por metales pesados, toxinas, salinidad (en su componente iónico o tóxico) y carencia de elementos minerales.

| Physical       | Chemical      | Biotic           |
|----------------|---------------|------------------|
| Drought        | Air pollution | Competition      |
| Temperature    | Heavy metals  | Allelopathy      |
| Radiation      | Pesticides    | Herbivory        |
| Flooding       | Toxins        | Diseases         |
| Wind           | Soil pH       | Pathogenic fungi |
| Magnetic field | Salinity      | Viruses          |

Tabla 1: Algunos agentes estresantes para las plantas.  
Fuente: Gaspar *et al.*, 2002.

### 1.1.3- Relevancia del estudio del estrés en plantas.

Hay numerosas razones para estudiar la fisiología de las plantas bajo condiciones de estrés, según Tambussi (2004), las más importantes son:

- El conocimiento de los factores de estrés en los vegetales puede resultar crucial para la elaboración de modelos predictivos (por ejemplo, el estudio de los posibles efectos del cambio climático).
- Desde una perspectiva ecofisiológica, el análisis de la interacción de las plantas con los factores ambientales es fundamental para comprender la distribución de las especies en los diferentes ecosistemas.

- El rendimiento de los cultivos está fuertemente limitado por el impacto de estreses ambientales.

Los estreses ambientales representan los factores que más limitan la productividad agrícola en todo el mundo. Estos estreses no solo tienen un impacto sobre las especies de cultivos actuales, sino que también son un obstáculo importante para la introducción de cultivos en zonas que actualmente no están siendo utilizadas para la agricultura (Gaspar *et al.*, 2002).

Es crucial comprender los procesos fisiológicos subyacentes en la tolerancia de los cultivos al estrés a la hora de establecer programas de mejora genética, tanto desde abordajes tradicionales como biotecnológicos (Ali Dib *et al.*, 1990).

#### **1.1.4- Mecanismos generales de respuesta al estrés.**

Las plantas están ligadas a su hábitat, no pueden huir de la amenaza de muchos agentes estresantes ambientales y antrópicos, y por lo tanto necesitan mecanismos especiales para evitar el estrés o adaptarse a él (Lichtenthaler, 1998). La flexibilidad de su metabolismo permite a las plantas hacer frente a su entorno en constante fluctuación (Gaspar *et al.*, 2002).

La manifestación de las respuestas de las plantas frente a unas condiciones ambientales adversas implica la puesta en marcha de una secuencia compleja de acciones. En primer lugar, se produce la percepción por la planta del estímulo estresante, siendo este proceso el aspecto menos conocido de esta secuencia de acciones. En general, la señal de estrés es detectada por receptores y seguidamente es procesada para su amplificación a través de cascadas o rutas de transmisión de la señal hasta el núcleo de las células.

La transducción de la señal produce cambios transitorios en los niveles de determinados iones (calcio) y moléculas (lípidos, especies reactivas de oxígeno, especies antioxidantes, óxido nítrico) que actúan como segundos mensajeros, amplificando la señal de estrés a través de la célula hasta inducir un cambio en una molécula efectora, como una quinasa o un factor de transcripción. Las hormonas también realizan una función importante en las rutas de transmisión intracelular de la señal de estrés. El ácido abscísico participa de forma activa en la señalización de muchas de las respuestas al estrés abiótico (Toumi *et al.*, 2010), y se ha descrito también la implicación del etileno, el ácido salicílico y el ácido jasmónico, en la transmisión de la señal de infección por patógenos (Dempsey *et al.*, 1999; Dong, 1998; Jameson y Clarke, 2002; Vlot *et al.*, 2009).

Finalmente tiene lugar la regulación de la expresión génica en el núcleo, donde se induce o reprime la expresión de diversos genes, o los factores de transcripción que los regulan, lo que a su vez provoca cambios en el metabolismo celular, que se traducen en alteraciones en el crecimiento y desarrollo de la planta. Estos cambios van encaminados hacia el restablecimiento de la homeostasis de la planta y según Azcón-Bieto y Talón (2008) pueden ser entre otros:

- Alteraciones en el desarrollo de las plantas. Normalmente se aprecia un menor desarrollo vegetativo, así como una reducción del número de estructuras reproductivas que aceleran su desarrollo para asegurar la siguiente generación.
- Muerte celular y abscisión de los tejidos dañados, lo que elimina el foco de infección en estrés biótico, disminuye la superficie de transpiración y permite reciclar nutrientes.
- Aumento o disminución en la actividad de rutas alternativas de disipación y obtención de energía, como la fermentativa.
- Cambios en la actividad hormonal. Además de participar en la percepción y transmisión de la señal, la modificación de los niveles hormonales puede incrementar la resistencia al estrés.
- Síntesis de nuevas proteínas, como la ubicuitina, las proteasas implicadas en la degradación de las proteínas dañadas, y las proteínas de choque térmico. Estas últimas no solo inducidas frente a temperaturas extremas, que actúan como chaperonas plegando proteínas desnaturalizadas por el estrés y previniendo la formación de agregados proteicos irreversibles.
- Síntesis y acumulación de compuestos osmoprotectores que actúan restaurando el potencial hídrico o bien como protectores de la estructura de membranas y macromoléculas.
- Síntesis de metabolitos secundarios protectores, como los fenilpropanoides.

### 1.1.5- Estrés por bajas temperaturas en plantas.

El frío es uno de los estreses abióticos más importantes, afecta severamente al crecimiento y desarrollo de las plantas, y limita su distribución geográfica. Solo un tercio del área total de la Tierra está libre de heladas y el 42% de la superficie terrestre soporta temperaturas por debajo de -20°C (Larcher, 1995).

En general, las plantas originarias de zonas templadas muestran un grado variable de tolerancia al frío y pueden aumentar su tolerancia a la congelación mediante su exposición a temperaturas bajas por encima de 0°C (proceso denominado aclimatación). Sin embargo, las plantas originarias de áreas tropicales y subtropicales son sensibles al frío y carecen del mecanismo de aclimatación (Miura y Furumoto, 2013). La mayoría de estas especies sufren daños durante el almacenamiento a temperaturas por encima del punto de congelación de los tejidos, pero inferiores a 15°C (Lukatkin *et al.*, 2012).

Para entender el efecto del frío sobre las plantas, conviene distinguir entre aquellas temperaturas que se encuentran por encima y por debajo de 0°C. Puesto que el término “estrés por bajas temperaturas” puede resultar arbitrario, en adelante se utilizará el concepto “estrés por frío” para designar al *chilling stress* (estrés causado por temperaturas comprendidas en el intervalo entre 0 y 15°C) y “estrés por congelación” para designar al *freezing stress* (estrés causado por temperaturas por debajo de 0°C). El trabajo de esta tesis se centra en la categoría de estrés por frío enfocándose en el estudio con plantas sometidas principalmente a 10°C.



Por otro lado, aunque cada especie de planta tiene unos requerimientos térmicos característicos para alcanzar un desarrollo óptimo, las plantas pueden ser divididas en tres grupos en función de su sensibilidad al frío (Goñi, 2010):

- *Plantas sensibles a las bajas temperaturas (chilling-sensitive)*: Especies que presentan síntomas de daño tras tiempos prolongados de exposición a temperaturas por debajo de 2-15°C. Se entiende por plantas moderadamente sensibles aquellas que se alteran en el intervalo entre 2 y 7°C, y muy sensibles cuando no soportan temperaturas por debajo de 15°C.

- *Plantas resistentes a las bajas temperaturas (chilling-resistant)*: Son capaces de tolerar bajas temperaturas por encima de 0°C pero son seriamente dañadas cuando comienza a formarse hielo en su interior.

- *Plantas resistentes a las heladas (frost-resistant)*: Especies capaces de soportar temperaturas por debajo de 0°C.

La respuesta al estrés por frío es un proceso complejo que implica muchos cambios a nivel celular. Se produce una reprogramación de la expresión génica, modificaciones en el metabolismo celular (Chinnusamy *et al.*, 2010), y cambios en compartimentos celulares (Miura y Furumoto, 2013). A continuación se detallan algunos de los procesos más importantes que tienen lugar durante la percepción y respuesta al estrés por frío.

#### 1.1.5.1- Percepción y transducción de la señal de frío.

Hasta la fecha no se ha identificado el mecanismo mediante el cual las plantas son capaces de detectar la bajada de temperatura. Se cree que múltiples sensores primarios podrían participar en la percepción del frío. Cada sensor percibiría un aspecto específico del estrés y estaría implicado en una de las ramas de las distintas rutas de señalización de frío (Miura y Furumoto, 2013). Las evidencias sugieren que las plantas son capaces de medir la temperatura absoluta, la tasa de variación, y el tiempo de exposición a las temperaturas bajas (Knight y Knight, 2012).

Varios estudios han demostrado que la rigidificación de la membrana, junto con la reorganización del citoesqueleto, la entrada de calcio y la activación de cascadas de quinasas (CDPKs y MAPKs), desencadena la respuesta al frío (Uemura y Steponkus, 1999; Orvar *et al.*, 2000; Xin y Browse, 2000; Sangwan *et al.*, 2002; Vergnolle *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2007). Actualmente, la hipótesis más ampliamente aceptada es que la reducción en la fluidez de la membrana causada por el estrés por frío, podría ser el evento primario de la percepción de frío que activaría los canales de calcio, activados por estrés mecánico, tanto en procariontas como en plantas (Shi *et al.*, 2015).

La disminución de la fluidez de las membranas como consecuencia de la exposición a bajas temperaturas está bastante bien caracterizada. El frío produce la llamada “transición de fases” (Figura 1), que si se prolonga en el tiempo, impide a la membrana mantener los gradientes iónicos y el metabolismo comienza a sufrir alteraciones. Finalmente, la muerte de la

célula puede sobrevenir si el daño se acentúa. En este sentido, ha recibido considerable atención el papel de la insaturación de los lípidos de membrana en la tolerancia a

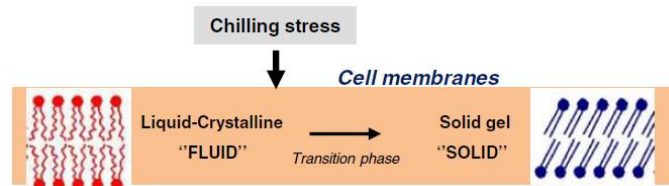


Figura 1: Transición de fases en la membrana plasmática debido al estrés por frío. Fuente: Theocharis *et al.*, 2012.

bajas temperaturas y, de hecho, éste ha sido considerado como uno de los factores críticos entre los mecanismos de tolerancia al frío (Tambussi, 2004). En plantas aclimatadas cambia la composición lipídica, tanto de la membrana plasmática como de los cloroplastos, de modo que el umbral de temperatura en el que se producen daños en la membrana es menor que el umbral de plantas no aclimatadas (Uemura y Steponkus, 1999). Esto se consigue al aumentar el contenido de ácidos grasos insaturados en las membranas adaptadas al frío, lo que aumenta su fluidez (Vogg *et al.*, 1998).

Otro posible mecanismo sensor de los cambios en la fluidez de la membrana es la desestabilización del citoesqueleto. En células vegetales, las temperaturas bajas provocan una rápida despolimerización de los microtúbulos y los microfilamentos, que vuelven a polimerizar con la subida de temperatura (Hepler y Hush, 1996; Ruelland *et al.*, 2010). La despolimerización, parcial y transitoria, de los microtúbulos es necesaria y suficiente para inducir eficientemente el proceso de aclimatación en trigo, sugiriendo que los microtúbulos actúan como sensores de temperaturas bajas (Schwarzerová *et al.*, 2006; Nick, 2012). En protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia* la disrupción del citoesqueleto mediante tratamientos químicos eleva la magnitud del incremento de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular que se produce en respuesta a frío (Mazars *et al.*, 1997), y aumenta la expresión de genes inducibles por frío como ocurre con la disminución de fluidez de la membrana (Örvar *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2001). Se ha sugerido que los microtúbulos limitan la permeabilidad de los canales de calcio mecanosensibles a través de la rigidificación de la membrana (Nick, 2012).

En un modelo simplista en el que la fluidez de la membrana actúa como un sensor, es difícil prever como este termómetro celular puede transmitir la temperatura absoluta como cambios biofísicos que probablemente sean transiciones de fase. Una solución a este problema podría ser que diferentes dominios en la membrana fueran responsables de comunicar un rango particular de temperaturas. Esto sucede en células de mamíferos, donde diferentes rangos de temperatura son transmitidos por distintos receptores y, donde también se producen cambios en la formación y composición de las balsas lipídicas en respuesta a frío (Bali *et al.*, 2009).

Actualmente, se está estudiando en *Arabidopsis thaliana* la implicación de los microdominios de membrana y sus componentes en la respuesta a las bajas temperaturas. Se ha observado que el frío induce cambios en la composición de estos microdominios, como la disminución de los componentes asociados al citoesqueleto (Minami *et al.*, 2009), pudiendo originar una reorganización del citoesqueleto de actina. Esto podría inducir la activación de los canales de calcio mecanosensibles de la membrana, provocando a su vez un aumento

transitorio de la concentración de calcio citosólico (Theocharis *et al.*, 2012). El  $\text{Ca}^{2+}$  que temporalmente aumenta en el citosol podría propagarse y llegar al núcleo a través de los complejos de poros nucleares, incrementando la concentración nuclear de  $\text{Ca}^{2+}$  e iniciando la señalización nuclear, del mismo modo que ocurre en células animales (Mauger, 2012).

El  $\text{Ca}^{2+}$  marcado por el estrés por frío puede ser decodificado por diferentes rutas. Las plantas poseen varios grupos de sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  que incluyen: CaM (calmodulina) y CML (CaM-like), CDPKs ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases), CCaMK ( $\text{Ca}^{2+}$ - y  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent protein kinase), CAMTA (CaM-binding transcription activator), CBLs (calcineurin B-like proteins) y CIPKs (CBL-interacting protein kinases) (Miura y Furumoto, 2013). Las CDPKs actúan como reguladores positivos (Saijo *et al.*, 2000), pero CaM3 es un regulador negativo de la expresión génica y la tolerancia al frío en plantas (Townley *et al.*, 2002). Las CBLs transmiten la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  interactuando y regulando la familia de las CIPKs (Huang *et al.*, 2011). Doherty *et al.* (2009) proporcionaron más evidencias del vínculo entre la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la inducción por frío de la ruta de los CBFs (CRT-Binding Factors), demostrando que activadores transcripcionales de unión a calmodulina (CAMTA) se unen a un elemento regulador en el promotor del gen *CBF2*.

Además del  $\text{Ca}^{2+}$ , hay otros segundos mensajeros que parecen estar implicados en la señalización mediada por las bajas temperaturas y que a su vez participan en el aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que indicaría que actúan como intermediarios en la transmisión de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ : ADP-ribosa cíclico (Sangwan *et al.*, 2001), inositol trifosfato (IP3) (Xiong *et al.*, 2001) y adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) (Thomas *et al.*, 2013). La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, mediada por inositol trifosfato (IP3), está aguas arriba de la expresión de los genes activados por la ruta de señalización de frío: *CBFs* y *COR* (cold responsive) (Chinnusamy *et al.*, 2007, 2010).

Por otra parte, Kumar y Wigge (2010) sugirieron la existencia de un mecanismo directo para la percepción de la temperatura al detectar que los nucleosomas de *Arabidopsis thaliana* que contienen la histona alternativa H2A.Z actúan como sensores de temperatura. Sin embargo, aunque sus resultados abren las puertas a la existencia de nuevos mecanismos que expliquen la percepción del frío, hasta el momento no se ha identificado en las plantas sensores específicos para bajas temperaturas.

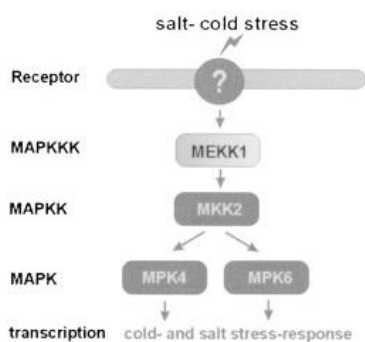


Figura 2: Modelo de la ruta de MKK2.  
Fuente: Teige *et al.*, 2004.

La fosforilación de proteínas en respuesta a frío y la supresión de la actividad de proteínas fosfatasas también pueden proporcionar a las plantas un modo de percibir la bajada de temperatura. La cascada MAPK (mitogen-activated protein kinase) está implicada en la regulación de la señalización y la tolerancia al frío (Figura 2). Durante la primera hora de exposición al frío, en *Arabidopsis thaliana*, se produce la acumulación de transcritos de *MEKK1* (una MAPKKK) (Mizoguchi *et al.*, 1996). *MEKK1* interacciona con *MKK2* (MAP kinase kinase 2) y ésta

fosforila a MPK4 y MPK6, especialmente en condiciones de estrés por frío. Las plantas que sobreexpresan *MKK2* muestran una actividad constitutiva de *MPK4* y *MPK6*, además de una inducción constitutiva de genes de respuesta a frío como *CBF2*, *CBF3*, etc (Teige *et al.*, 2004).

En alfalfa, se ha sugerido que es necesario la rigidificación de la membrana, el flujo de calcio y las CDPKs, para la activación de la cascada de MAPK en respuesta a frío (Sangwan *et al.*, 2002).

### 1.1.5.2- Regulación de la expresión génica.

Actualmente, la ruta de señalización de respuesta a frío mejor conocida es la cascada transcripcional ICE1-CBF-COR. En esta ruta los genes *CBF/DREB1* son rápidamente inducidos por frío y se unen a regiones de los promotores de los genes *COR* activando su transcripción. Recientes indicios muestran que la ruta CBF-dependiente está regulada por muchos importantes reguladores a niveles transcripcional, postranscripcional y postraduccionales (Miura y Furumoto, 2013; Shi *et al.*, 2015).

#### 1.1.5.2.1- Regulación transcripcional.

Durante el proceso de respuesta y aclimatación a bajas temperaturas se produce una extensa remodelación del transcriptoma. Estudios transcriptómicos en *Arabidopsis thaliana* han puesto de manifiesto que, en respuesta a frío, puede verse modificada la expresión de hasta 10.000 genes. Entre el 4% y el 12% del transcriptoma sufre alteraciones tras horas, días o semanas de exposición a temperaturas bajas (Hannah *et al.*, 2005). La mayoría de éstos genes codifican factores de transcripción o proteínas reguladoras de la transcripción (Lee *et al.*, 2005). Se estima que el 25% de los genes inducidos por frío codifican factores de transcripción (Robinson y Parkin, 2008). Entre éstos se incluyen las familias tipo CO (CONSTANS), HSF (*heat-shock factor*), ARF (*auxin response factor*) y la familia de factores de transcripción con dominio TCP (Hannah *et al.*, 2005).

En el promotor de muchos genes de plantas regulados por frío (genes *COR*, por ejemplo *COR15a* y *LTI78* de *Arabidopsis thaliana*, y *BN115* de *Brassica napus*) se puede encontrar una o varias copias de un elemento regulador *cis* denominado CRT (por *C-repeat*) o LTRE (por *Low Temperature Responsive Element*) (Baker *et al.*, 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Jiang *et al.*, 1996). Estos elementos inducen la expresión de genes en respuesta a frío y también estimulan la transcripción en respuesta a estrés por sequía por lo que se denominaron DRE (por *Drought Responsive Element*) (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

En *Arabidopsis* se identificó un pequeño grupo de proteínas de unión al motivo CRT/DRE, la familia CBF (por *CRT-Binding Factor*). Esta familia está compuesta por los genes *CBF1-4* y todos son activadores transcripcionales cuyo dominio de unión a ADN es de tipo AP2/EREBP

(*APETALA2/Ethylene-Responsive Element Binding Protein*) (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Los transcritos de *CBF1-3* se acumulan en respuesta a frío de forma rápida y transitoria, y también aunque en menor grado, en respuesta a ABA (Medina *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 2004). Sin embargo, *CBF4* se induce por sequía y por ABA pero no por frío (Haake *et al.*, 2002). Existe otro tipo de proteínas de unión a secuencias CRT/DRE denominadas DREB (*DRE-Binding protein*): DREB1 y DREB2. *DREB1* y sus homólogos son idénticos a los cuatro genes *CBF* (Liu *et al.*, 1998), de ahí que en muchos artículos los denominen *CBF/DREB1*. En *A. thaliana*, los genes *DREB1* son inducidos por frío y los genes *DREB2* se inducen en respuesta a sequía, salinidad y calor, y ligeramente en respuesta a frío y ABA (Liu *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2000; Sakuma *et al.*, 2006).

Los factores de transcripción CBF alteran la expresión de más de 100 genes, conocidos como regulones de CBF, que contribuyen a aumentar la tolerancia a congelación (Park *et al.*, 2015). Inicialmente se pensó que los 3 CBFs eran funcionalmente equivalentes pero estudios posteriores concluyeron que *CBF2* regula negativamente la expresión de *CBF1* y *CBF3* (Novillo *et al.*, 2004), y que estos últimos no están implicados en la regulación de la expresión de ninguno de los otros CBFs (Novillo *et al.*, 2007). De esta forma, se asegura una expresión precisa del regulón de los CBFs y el completo desarrollo del proceso de aclimatación en arabidopsis (Hernández, 2014).

Parece haber dos tipos de factores de unión a ADN que se unen a los mismos elementos reguladores *cis* y actúan como activadores transcripcionales en al menos cinco rutas de transducción de la señal diferentes: estrés por bajas temperaturas (*CBF1-3*), sequía (*DREB2B*), salinidad (*DREB2B* y *DDF1*), estrés por calor (*DREB2A-2B*), y respuesta a ABA (*CBF4*, y aunque en menor grado *CBF1-3*). Esto ayuda a explicar, al menos en parte, por qué muchos genes que se inducen tras la exposición al frío también se inducen por sequía (Ruelland *et al.*, 2009).

La expresión, inducida por frío, de los CBFs está regulada positivamente por varios factores de transcripción. *ICE1* (*inducer of CBF expression 1*) es un factor de transcripción de expresión constitutiva que, en condiciones de estrés por frío, es activado y se une a motivos MYC presentes en el promotor de *CBF3*, activando su transcripción. Pero sin embargo, no afecta a la expresión de *CBF1* ni *CBF2* (Chinnusamy *et al.*, 2003). En arabidopsis, también se ha identificado *ICE2* (homólogo de *ICE1*) que influye especialmente sobre la expresión de *CBF1* y en menor medida también en la de *CBF3*, aunque todavía no se ha demostrado su capacidad de unión a cajas MYC (Fursova *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, *CBF2* es activado cuando el factor de transcripción CAMTA3 se une a un motivo CM2 en su promotor (Doherty *et al.*, 2009). En *A. thaliana*, la familia de factores de transcripción de unión a calmodulina CAMTAs consta de tres miembros (*CAMTA1-3*), que actúan conjuntamente en la inducción rápida y transitoria de los CBFs en respuesta a temperaturas bajas. Es interesante señalar además, que los CAMTAs regulan un 15% de los genes inducibles por frío que no están bajo el control de los CBFs (Kim *et al.*, 2013).

El factor de transcripción MYB15 (una proteína de la familia R2R3-MYB), regula negativamente la expresión de los *CBFs*. Esta proteína, cuya expresión se induce por frío y está regulada a su vez por ICE1 (Agarwal *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007a), se une a los motivos MYB de los promotores de los genes *CBF* (Agarwal *et al.*, 2006).

ICE1 también podría estar regulando la expresión del factor de transcripción *ZAT12* (Benedict *et al.*, 2006). *ZAT12* es una proteína con un dominio tipo dedo de zinc cuya implicación en la respuesta a estrés oxidativo ha sido documentada (Davletova *et al.*, 2005). Se ha observado una coexpresión de *ZAT12* y *CBF1-3* en respuesta a temperaturas bajas que está regulada por el reloj circadiano (Fowler *et al.*, 2005). Sin embargo, *ZAT12* regula negativamente la expresión de los genes *CBF* (Vogel *et al.*, 2005). Los niveles de inducción de los *CBFs* también están regulados positivamente por varios componentes del reloj circadiano, como *CCA1* (*Circadian Clock-Associated 1*) y *LHY* (*Late Elongated Hypocotyl*), dos factores de transcripción tipo MYB (Fowler *et al.*, 2005; Nakamichi *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2011). A su vez, un estudio reciente ha definido un nuevo mecanismo transcripcional que integra la señalización de frío en el reloj circadiano, a través de la regulación de la expresión del gen *LUX*, que está mediada por *CBF1* (Chow *et al.*, 2014). Conjuntamente, estos datos sugieren la existencia de una regulación bidireccional entre la respuesta a frío y el reloj circadiano.

*HY5* (*Elongated Hypocotyl 5*) es otro factor de transcripción que regula positivamente la respuesta a bajas temperaturas, y ha sido establecido como un nexo de unión entre las rutas de señalización por luz y frío (Catalá *et al.*, 2011). Los niveles de *HY5* están controlados tanto a nivel transcripcional como postraduccional (Catalá *et al.*, 2011) (ver apartado 1.1.5.2.4).

Recientemente se ha descubierto que *EIN3*, uno de los factores de transcripción en la ruta de señalización del etileno, es un represor de los *CBFs* durante la respuesta al frío (Shi *et al.*, 2012).

Además de los factores de transcripción inducidos por frío *MYB15* y *ZAT12*, otros genes de expresión constitutiva actúan regulando la expresión de los genes *CBF*: *STRS1* y *STRS2* (RNA helicasas de tipo DEAD-box) parecen atenuar la expresión de los *CBFs* (Kant *et al.*, 2007); *FVE* reprime la expresión de *CBF* vía complejo histona deacetilasa (Kim *et al.*, 2004); y se ha sugerido que *FIERY2* (*FRY2*), un importante regulador negativo de la transcripción, podría inhibir la expresión de los genes *CBF* así como de algunos genes *COR* (Xiong *et al.*, 2002).

Por otra parte, aguas abajo de los genes *CBF*, los genes *COR* también están sometidos a una regulación transcripcional. *SFR6* induce la expresión de *KIN1*, *COR15A* y *LTI78* (Boyce *et al.*, 2003), sin afectar a la expresión de los *CBFs*. *LOV1*, un factor de transcripción con dominio NAC, no modifica la expresión de los genes *CBF* pero regula positivamente la expresión de *COR15A* (Yoo *et al.*, 2007). *HOS9* (factor de transcripción tipo homeodominio) y *HOS10* (factor de transcripción tipo R2R3-MYB) regulan negativamente la expresión de los genes *COR* (Zhu *et al.*, 2004). *HOS15*, actúa reprimiendo la expresión de los genes *COR* a través de la deacetilación de la histona H4 (Zhu *et al.*, 2008).

Todos estos resultados indican la existencia de una compleja red de regulación de la transcripción de los genes *CBF* y *COR* durante la respuesta al frío (Figura 3), que asegura el desarrollo completo y preciso del proceso de aclimatación.

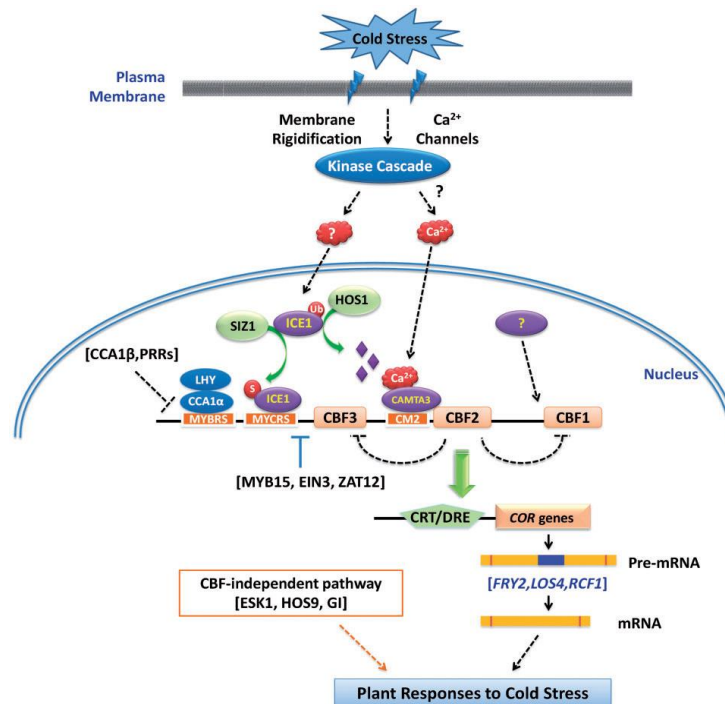


Figura 3: Regulación de la ruta de señalización CBF durante el estrés por frío.

Fuente: Shi *et al.*, 2015.

### 1.1.5.2.2- Regulación postranscripcional.

A temperaturas bajas, termodinámicamente se ve favorecida la formación de estructuras secundarias estables de RNA (Graumann y Marahiel, 1998; Polissi *et al.*, 2003). Las proteínas CSP (*Cold Shock Proteins*) actúan como chaperonas de RNA inhibiendo la estructura secundaria y favoreciendo su traducción (Nakaminami *et al.*, 2006). Existen evidencias genéticas de que CSP3, en *Arabidopsis thaliana*, regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Kim *et al.*, 2009). Por su parte, CSP2 regula negativamente este proceso a través del regulón de los *CBFs* (Sasaki *et al.*, 2013). Del mismo modo, las proteínas GRPs (*Glicine Rich Proteins*) también ejercen de chaperonas de RNAs. Dos de ellas, AtRZ-1A y GRP2, regulan positivamente el proceso de aclimatación en *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). Y se ha descrito la implicación de GRP7 en la tolerancia constitutiva a la congelación (Kim *et al.*, 2008).

El complejo de poro nuclear está compuesto por nucleoporinas (NUPs) y está implicado en el transporte de mRNAs y sRNAs al citoplasma (Cole y Scarcelli, 2006). En *Arabidopsis*, la mutación *nup160* provoca una expresión reducida de los *CBFs* al disminuir el transporte del mRNA a temperaturas bajas (Dong *et al.*, 2006a).

Estudios recientes han demostrado que la exposición a bajas temperaturas provoca la generación de variantes de *splicing* en genes involucrados en el control del reloj circadiano y en la producción de proteínas que controlan su *splicing* (Palusa *et al.*, 2007; James *et al.*, 2012; Marquez *et al.*, 2012). *RCF1* (*Regulator of CBF gene expression 1*) y *STA1* (*Stabilized 1*) son esenciales para mantener el adecuado *splicing* de muchos genes *COR* durante el estrés por frío (Lee *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2013).

Los microRNAs (miRNAs) tienen un papel evidente como reguladores postranscripcionales de la respuesta al estrés en plantas, actuando como represores promoviendo la degradación de ciertos mRNA o reduciendo su traducción (Sunkar *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* y arroz se ha identificado varios miRNAs regulados por frío (Sunkar y Zhu, 2004; Liu *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2010). Algunos miRNAs (miR397 y miR169 por ejemplo) están sobreexpresados en respuesta a frío en todas las especies vegetales, mientras que otros tienen un comportamiento diferente entre las distintas especies de plantas modelo estudiadas (Zhang *et al.*, 2009). Al menos en un caso, un miRNA específico está implicado en la tolerancia al estrés: miR398 se reprime por frío, y esto permite un aumento de los transcritos de *CDS1* y *CDS2*, que codifican superóxido dismutasas, y a su vez mejora la tolerancia al estrés oxidativo inducido por el frío (Sunkar y Zhu, 2004).

#### 1.1.5.2.3- Regulación traduccional.

Según Hernández (2014) se puede generalizar que en condiciones de estrés se produce una inhibición de la traducción para reducir el consumo de energía. Solo los mRNAs que participan en los procesos de respuesta al estrés escapan a este bloqueo traduccional (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2013).

En el apartado anterior se ha mencionado a la familia de proteínas CSP, que actúan como chaperonas de RNA. Se ha descrito que la proteína CSP1 de *Arabidopsis*, ayuda a una población concreta de mRNAs a unirse a los polisomas para ser traducidos a temperaturas bajas (Juntawong *et al.*, 2013). Es posible que este tipo de proteínas de unión a RNA sean las encargadas de determinar qué mRNAs específicos serán traducidos con mayor eficacia durante el proceso de aclimatación.

Existe un mecanismo conservado en plantas que inhibe la traducción mediante la fosforilación del factor de iniciación eIF2 (Muñoz y Castellano, 2012). En *Arabidopsis* se ha identificado la quinasa GCN2, capaz de fosforilar rápidamente al factor de iniciación eIF2 tras la exposición a 4°C (Lageix *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no se ha determinado como afecta la ausencia de GCN2 al desarrollo de la respuesta a frío.

Por otro lado, en *Arabidopsis*, se ha caracterizado el factor de elongación de la traducción LOS1, que regula positivamente el desarrollo de la aclimatación al frío (Guo *et al.*, 2002).



#### 1.1.5.2.4- Regulación postraduccional.

Los mecanismos postraduccionales que regulan la función de las proteínas implicadas en la respuesta a frío no han sido estudiados muy extensamente todavía. Se han descrito modificaciones postraduccionales de algunos componentes de la ruta de transducción de la señal de respuesta a frío (Barrero-Gil y Salinas, 2013). Las modificaciones postraduccionales incluyen, entre otras, fosforilación y defosforilación de proteínas, ubiquitilación, sumoilación, modificación lipídica y N-glicosilación. Estas modificaciones regulan aspectos clave de la función de las proteínas como localización subcelular, estabilidad, actividad o capacidad de interacción con otras proteínas. El 10% del genoma de *Arabidopsis thaliana* está implicado en fosforilación y ubiquitilación de proteínas, lo que pone de manifiesto la importancia de la regulación postraduccional en plantas (Mazzucotelli *et al.*, 2006; Lehti-Shiu y Shiu, 2012).

La fosforilación mediada por proteínas quinasas es uno de los mecanismos más comunes para transducir las señales ambientales y regular la función de las proteínas. La alteración de la fosforilación tiene un efecto significativo en el desarrollo del proceso de aclimatación de las plantas (Monroy *et al.*, 1998). Como se ha comentado anteriormente, varias familias de proteínas quinasas (MAPKs, CDPKs, CIPKs, etc.) están implicadas en la regulación de la respuesta a frío.

En cuanto a la defosforilación, las serina treonina fosfatasas han sido asociadas con la señalización y regulación de la respuesta a estrés por frío. La inhibición de la actividad de estas proteínas fosfatasas es necesaria para la inducción de varios genes de respuesta a frío en distintas especies, como *Arabidopsis*, alfalfa, patata o tomate (Monroy *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2006; País *et al.*, 2009). PP2A podría actuar como regulador negativo de la respuesta a frío, probablemente a través de la regulación de la biosíntesis de etileno (Skottke *et al.*, 2011). PP2CA regula negativamente la señalización de ABA y, en *Arabidopsis*, se ha visto que su expresión aumenta en respuesta a frío, y esto reduce el tiempo de exposición a temperaturas bajas requerido para desarrollar el proceso completo de aclimatación (Tähtiharju y Palva 2001).

La ubiquitilación consiste en la unión del péptido ubiquitina a residuos de lisina de las proteínas diana, llevando a la degradación de estas proteínas vía proteosoma 26S. La adición de la ubiquitina requiere la acción simultánea de tres enzimas ubiquitina ligasas (E1, E2 y E3), de las cuales, las ligasas E3 de ubiquitina proporcionan la especificidad de unión. HOS1 de *Arabidopsis thaliana*, una E3 ubiquitina ligasa con dominio RING (motivos de unión a zinc), regula negativamente la transducción de la señal de frío a través de la interacción y ubiquitilación de ICE1, dando lugar a su degradación a temperaturas bajas (Dong *et al.*, 2006b). COP1 es otra E3 ubiquitina ligasa con dominio RING de *Arabidopsis*, que participa en el proceso de aclimatación al frío. Ésta interactúa y ubiquitila a HY5, un factor de transcripción que regula positivamente el proceso de aclimatación (Catalá *et al.*, 2011). En *A. thaliana*, en respuesta a bajas temperaturas, se induce la expresión de CHIP, una E3 ubiquitina ligasa tipo U-box (Yan *et al.*, 2003), que ubiquitila la subunidad A de la fosfatasa PP2A y, sorprendentemente, aumenta su actividad en lugar de conducir a su degradación (Luo *et al.*,

2006). Como se ha mencionado antes, PP2A podría ser un regulador negativo de la respuesta a frío, por lo que es posible que CHIP también regule negativamente la respuesta a bajas temperaturas (Barrero-Gil y Salinas, 2013). También en *A. thaliana*, se ha descrito que la expresión de FBP7, una proteína F-box que participa en un complejo multimérico de E3 ubiquitinas ligasas con dominio RING, se induce por frío y su actividad es requerida para la síntesis de proteínas inducidas por frío (Calderón-Villalobos *et al.*, 2007). Se ha sugerido que FBP7 podría interactuar con LOS1, un factor de elongación necesario para el correcto desarrollo de la aclimatación al frío, regulando su actividad o su localización subcelular (Guo *et al.*, 2002).

La sumoilación es otro tipo de modificación postraduccional y tiene un importante papel en una gran variedad de procesos celulares incluyendo cambios en la actividad enzimática, regulación de la transcripción y de otros procesos relacionados con la cromatina, relocalización subcelular y protección frente a la degradación mediada por ubiquitina de algunas proteínas reguladoras (Gareau y Lima 2010). SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), un pequeño polipéptido muy similar a la ubiquitina, también se une covalentemente a residuos de lisina de las proteína diana a través de la acción de tres enzimas SUMO ligasas (E1, E2 y E3). Del mismo modo que la ubiquitilación, la sumoilación produce cambios conformacionales en las proteínas diana que pueden afectar su interacción con otras proteínas, su localización subcelular o su estabilidad (Mazzucotelli *et al.*, 2008; Miura y Hasegawa, 2010). En plantas se ha identificado un gran número de E3 ubiquitina ligasas, sin embargo, solo parece haber unas pocas E3 SUMO ligasas (Mazzucotelli *et al.*, 2008; Miura y Hasegawa, 2010). Se ha observado que aumenta la sumoilación cuando las plantas están sometidas a condiciones ambientales adversas (Miura *et al.*, 2007b), como la exposición a temperaturas bajas (Miura *et al.*, 2007a). SIZ1, una E3 SUMO ligasa de arabisidopsis, es responsable del aumento de sumoilación que tiene lugar en respuesta a frío y actúa como regulador positivo del proceso de aclimatación (Miura *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2007a). SIZ1 cataliza la sumoilación de ICE1, reduciendo su poliubiquitilación y aumentando su estabilidad (Miura *et al.*, 2007a). La regulación de la actividad de ICE1 viene determinada por un balance entre ubiquitilación y sumoilación. En condiciones normales de temperatura, HOS1 ubiquitila ICE1, promoviendo su degradación por el proteosoma. Pero al disminuir la temperatura se reprime la expresión de *HOS1* y se activa SIZ1, con lo que disminuye el grado de ubiquitilación de ICE1 y comienza a acumularse, induciendo a su vez la expresión de *CBF3* (Miura *et al.*, 2007a; Barrero-Gil y Salinas, 2013).

Las modificaciones lipídicas pueden ser relevantes para el desarrollo de la aclimatación al frío (Cheong *et al.*, 2003) y son importantes moduladores de la función proteica, determinando a menudo la localización subcelular, interacciones proteína-proteína y cambios conformacionales. Hay tres tipos de modificaciones lipídicas de las proteínas: prenilación, palmitoilación y N-miristoilación (Sorek *et al.*, 2009). CBL1, que actúa como regulador negativo de la respuesta a frío, puede sufrir palmitoilación y N-miristoilación siendo requeridas ambas modificaciones para su localización en la membrana plasmática (Baticic *et al.*, 2008). CPK3 (*Calcium-dependent Protein Kinase 3*), que es activada en respuesta a temperaturas bajas y

puede regular proteínas implicadas en la respuesta a frío, como RCI1A y ADH1 (Jarillo *et al.*, 1994; de Bruxelles *et al.*, 1996), necesita N-miristoilación para su localización en el tonoplasto y la membrana plasmática (Mehlmer *et al.*, 2010).

En el retículo endoplasmático se produce la N-glicosilación (adición de un oligosacárido a un residuo de asparagina) de muchas proteínas localizadas en el sistema de endomembranas o en el espacio extracelular. Esta modificación puede alterar la estabilidad, actividad o localización subcelular de las proteínas (Rayon *et al.*, 1998). Se ha descrito la modificación del patrón de N-glicosilación de 22 proteínas de arroz, en respuesta a temperaturas bajas (Komatsu *et al.*, 2009). Entre esas proteínas se encuentra una enolasa, cuyo homólogo en *Arabidopsis* es LOS2, un importante regulador de la aclimatación al frío (Komatsu *et al.*, 2009). LOS2 es un enzima bifuncional con actividad enolasa y también actúa como represor transcripcional. LOS2 se une al promotor de *ZAT10*, un gen inducible por frío que codifica un factor de transcripción implicado en la regulación de genes de respuesta a estrés oxidativo, y reprime su expresión (Lee *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2006). Es posible, aunque aún no se ha demostrado, que la N-glicosilación pueda regular la actividad de LOS2 como represor transcripcional de *ZAT10* en respuesta a temperaturas bajas.

#### 1.1.5.2.5- Regulación independiente de la ruta CBF.

Análisis transcriptómicos en *Arabidopsis thaliana* han revelado que solo el 12% de los genes de respuesta a frío son componentes del regulón de CBF (Fowler y Thomashow, 2002). Se ha descrito que el aumento de la tolerancia a congelación que ocurre tras la aclimatación al frío, solo depende parcialmente del módulo de regulación CBF-CRT/DRE (Park *et al.*, 2015). Esto sugiere que otros activadores/represores transcripcionales deben tener un papel significativo en la regulación de la respuesta al frío. En el apartado 1.1.5.2.1, se ha expuesto la función de ciertos factores de transcripción (como SFR6, LOV1, HOS9, HOS10 y HOS15) que regulan la expresión de los genes *COR* de manera independiente a la regulación por los genes *CBF*. Esto pone de manifiesto que el mecanismo de regulación de la respuesta a temperaturas bajas es complejo e implica una regulación combinada entre distintos factores de transcripción que están intensamente conectados.

El gen *ESK1* (*ESKIMO1*) actúa como regulador negativo de la aclimatación a frío. El mutante *eskimo1* de *A. thaliana* muestra una tolerancia a congelación constitutiva, sin aclimatación al frío. Esta tolerancia se produce sin cambios en la expresión de los componentes de la ruta CBF, pero con una gran acumulación de prolina. (Xin y Browse, 2000). *GI* (*GIGANTEA*), una proteína de localización nuclear implicada en floración y en el reloj circadiano, se induce por frío y regula positivamente la aclimatación al frío. El mutante *gi-3* muestra menor tolerancia a frío y el proceso de aclimatación alterado, sin verse afectada la expresión de los genes *CBF* (Cao *et al.*, 2005). A su vez, *GI* forma parte de la ruta de señalización de sacarosa que, entre otros procesos, también regula el reloj circadiano (Dalchau

*et al.*, 2011). Esto sugiere que distintas rutas de señalización activan diferentes aspectos de la aclimatación al frío.

Se ha debatido durante años si la ruta de señalización de frío mediada por ABA es independiente de la ruta CBF y actualmente continúa en estudio. Análisis transcriptómicos revelan que alrededor del 10% de los genes de respuesta a ABA también son genes de respuesta a frío (Kreps *et al.*, 2002). Aunque los niveles de ABA solo aumentan ligeramente en respuesta a bajadas de temperatura (Lång *et al.*, 1994), estudios genéticos indican que su percepción y acumulación son importantes para la expresión de genes de respuesta a frío (Gilmour y Thomashow, 1991; Mantyla *et al.*, 1995).

Algunos genes de respuesta a frío (*LT178*, *ADH*, *UGPase*, *AtCAMBP25*) no dependen del ABA para inducir su expresión (Lång *et al.*, 1994; de Bruxelles *et al.*, 1996; Ciereszko *et al.*, 2001; Perruc *et al.*, 2004), pero sin embargo otros (*RAB18*, *RC12A*) sí (Capel *et al.*, 1997; Llorente *et al.*, 2000). Ciertos genes *COR* (como *RD29A*, *RD22*, *COR15* y *COR47*) contienen en su promotor, además del motivo CRT/DRE, un elemento *cis* de respuesta a ABA conocido como ABRE (*ABA-Response cis-Elements*) (Uno *et al.*, 2000). La expresión génica dependiente de ABA está regulada por factores de transcripción de las familias bZIP, MYC y MYB (Theocharis *et al.*, 2012). Los factores de transcripción de unión a elementos ABRE son de tipo bZIP y se denominan ABFs (*Abre Binding Factors*) (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Los 4 genes *ABFs* identificados en *Arabidopsis* aumentan su expresión en respuesta a ABA. Además, *ABF1* y *ABF4* se inducen por frío (Choi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005), indicando que existen interacciones entre las rutas de señalización por temperaturas bajas y otros estreses abióticos. También se ha descrito que ABI3, una proteína de unión a elementos ABRE, está implicada en la respuesta a estrés por frío (Tamminen *et al.*, 2001). Otro estudio mostró que ABF2 interactúa con CBF3 *in vitro* (Lee *et al.*, 2010). Es más, se ha visto que el ABA es capaz de promover una modesta activación de algunos genes *COR* vía motivos CRT/DRE, junto con un aumento en los niveles del transcrito de *CBF1* y de su proteína (Knight *et al.*, 2004). Estos datos sugieren que las rutas de CBF y de ABA no son completamente independientes entre sí. Puede existir una ruta dependiente de ABA en respuesta a frío, pero ésta debe estar regulada negativamente por PP2CA (Tähtiharju y Palva, 2001). Según Ruelland *et al.* (2009), la aclimatación al frío, inicialmente, parece ser independiente de ABA, pero el ABA podría actuar más tarde en este proceso y ser necesario para adquirir la máxima tolerancia a frío y congelación.

Además de los motivos ABRE, se ha identificado otros motivos en los promotores de los genes *COR*: G-box (que contiene el núcleo de los motivos ABRE) y EE (*evening element*) (Kreps *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005). La existencia de genes sobreexpresados en respuesta a frío que carecían del motivo CRT/DRE y no respondían a ABA, motivó un estudio que reveló un papel de los elementos EE en la regulación de la respuesta a frío, independiente de los *CBFs* (Mikkelsen y Thomashow, 2009). Estos datos muestran que el reloj circadiano puede influenciar otros regulones de respuesta a frío además del regulón de CBF.

Por otra parte, mutantes con elevados niveles de citoquininas (*amp1*) muestran una aumentada división celular a 4°C, sin registrarse cambios en la expresión de los CBFs (Xia *et al.*, 2009). Tampoco se observan cambios de expresión de los CBFs a temperaturas bajas, en plantas que sobreexpresan hidroxilasa de ácido salicílico (NahG). Esto sugiere que los efectos de las citoquininas y el ácido salicílico sobre la regulación del crecimiento en frío es independiente del regulón de CBF. El ácido salicílico, además de su papel en defensa frente a patógenos, está implicado en la supresión del crecimiento de las plantas durante el estrés por frío y se acumula a bajas temperaturas (Scott *et al.*, 2004).

### 1.1.5.3- Respuestas estructurales y bioquímicas.

Los cambios ultraestructurales asociados al estrés por bajas temperaturas implican, entre otros, un hinchamiento de los cloroplastos y las mitocondrias, una deformación de los tilacoides, una reducción en el tamaño y número de granos de almidón, y la formación de pequeñas vesículas en la membrana de los cloroplastos (Kratsch y Wise, 2000). Por otro lado, la velocidad de los procesos biológicos cambia exponencialmente con la temperatura, por lo que el descenso de ésta también afecta a la regulación de la cinética del metabolismo de la planta (Johnson *et al.*, 1974).

La exposición a temperaturas bajas aumenta la probabilidad de contacto entre las cadenas laterales apolares de las proteínas y las moléculas de agua del medio, y esto afecta a la estabilidad y solubilidad de muchas proteínas globulares pudiendo llegar a provocar su desnaturalización (Privalov, 1990; Siddiqui y Caviocchioli, 2006). En este sentido, una de las respuestas mejor documentadas durante el estrés por frío, es la acumulación de proteínas hidrofílicas que presentan una hélice  $\alpha$  anfipática en su estructura (Thomashow, 1999; Eriksson *et al.*, 2011). Muchas de estas proteínas están codificadas por genes *COR*. Por ejemplo, la inducción de la proteína COR15a en *Arabidopsis thaliana* está asociada con el aumento *in vivo* de la tolerancia a la congelación de los cloroplastos (Artus *et al.*, 1996) y evita la transición a fase hexagonal II de las membranas plasmáticas (Steponkus *et al.*, 1998). Pero éstas no son las únicas proteínas hidrófilas acumuladas durante el estrés por frío, también se encuentran proteínas LTI (*low temperature induced*), RAB (*responsive to abscisic acid*), KIN (*cold induced*) y ERD (*early responsive to dehydration*). Entre ellas, el grupo más importante y mejor caracterizado está formado por la dehidrinas, proteínas que pertenecen al grupo II de las proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) (Bies-Etheve *et al.*, 2008). Se ha relacionado la acumulación de una dehidrina en trigo (Danyluk *et al.*, 1998) o la sobreexpresión de múltiples dehidrinas en *arabidopsis* (Puhakainen *et al.*, 2004) con su capacidad para tolerar la congelación. No obstante, aunque actualmente se desconoce el mecanismo de acción de estas proteínas, se ha sugerido que las dehidrinas podrían necesitar ser activadas por fosforilación inducida por frío (Theocharis *et al.*, 2012). Entre las funciones que se atribuyen a las dehidrinas destaca su papel en la prevención de la desestabilización de la membrana plasmática,

localizándose en zonas cercanas a ésta (Koag *et al.*, 2003). Asimismo, las dehidrinas poseen actividad crioprotectora (Bravo *et al.*, 2003) y anticongelante (Puhakainen *et al.*, 2004).

En plantas tolerantes a la congelación también se acumulan proteínas anticongelantes o AFPs (*antifreezing proteins*) que son secretadas al medio extracelular para evitar la presencia de hielo intercelular, letal para la célula por las roturas irreversibles que ocasiona en la membrana plasmática (Steponkus, 1984; Atici y Nalbantoglu, 2003; Griffith y Yaish 2004; Griffith *et al.*, 2005; Yaish *et al.*, 2006). Sin embargo, dentro de las AFPs de plantas no existe una secuencia consenso ni tampoco se ha logrado identificar una estructura como un dominio de unión a hielo. Mientras una proteína con una gran similitud a una dehidrina mostró una leve actividad anticongelante (Wisniewski *et al.*, 1999), la mayoría de AFPs observadas en plantas manifiestan secuencias similares a determinadas proteínas PR (*pathogenesis-related*) (Griffith y Yaish, 2004). En plantas no aclimatadas éstas proteínas también están presentes aunque con diferente localización y sin exhibir actividad anticongelante (Antikainen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2006). Estudios recientes han mostrado que, tras la exposición a temperaturas bajas, se inducen muchos genes PR y aumenta la resistencia frente a enfermedades, ligando la señalización de frío con la patogénesis en plantas (Seo *et al.*, 2010). Asimismo, se ha sugerido que a través de la acumulación de proteínas PR durante la aclimatación al frío, las plantas adquieren una defensa sistémica, no específica y preventiva frente a patógenos, y presentan mayor resistencia a enfermedades (Yeh *et al.*, 2000; Huang y Duman, 2002; Griffith y Yaish, 2004; Yaish *et al.*, 2006).

En células sometidas a estrés por frío se produce acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y éstas parecen tener una fuerte influencia sobre la regulación de la expresión génica (Lee *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004). Este incremento tiene su origen tanto en un descenso de la capacidad compensatoria del sistema antioxidante de la planta (Prasad *et al.*, 1994a; Tjus *et al.*, 2001) como en la fotoinhibición de los cloroplastos (Ensminger *et al.*, 2006). Estas moléculas tóxicas, correspondientes a formas parcialmente reducidas del O<sub>2</sub>, pueden dar lugar a una serie de efectos dañinos al reaccionar rápidamente con lípidos, proteínas o ADN, ocasionando en última instancia la muerte celular (Scandalios, 1993; Havaux y Niyogi, 1999; Nakano *et al.*, 2006; Kaniuga, 2008). Sin embargo, las ROS no son solamente productos tóxicos del metabolismo, sino que también se ha descrito su implicación en procesos que llevan a la consecución de la aclimatación (Suzuki *et al.*, 2011). En estos procesos las ROS actúan como moléculas señalizadoras, que finalmente modulan la expresión de varios genes entre los que se incluyen genes que codifican enzimas antioxidantes y proteínas reguladoras de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Neill *et al.*, 2002; Gechev *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2011). Se ha descrito que la sobreexpresión de algunas enzimas antioxidantes, como ascorbato peroxidasa, mejora la tolerancia a frío (Payton *et al.*, 2001). Asimismo, la exposición a temperaturas bajas provoca un aumento en los niveles de antioxidantes no enzimáticos solubles como ascorbato y glutatión, además de elevar la actividad de las principales deshidrogenasas generadoras de NADPH (Airaki *et al.*, 2011). Por otra parte, la aplicación de un pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

aumenta la capacidad antioxidante (principalmente glutatión) y la supervivencia de plantas de algunas especies sometidas a bajas temperaturas (Yu *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado previamente, el estrés por bajas temperaturas produce efectos a diversos niveles del aparato fotosintético. La exposición al frío promueve el cierre estomático (Perera *et al.*, 1995; Allen y Ort 2001) y provoca la fotoinactivación del fotosistema II (PSII) (Oquist y Huner, 2003). Además, los cloroplastos también podrían tener un papel en la percepción de la temperatura (Ivanov *et al.*, 2012; Miura y Furumoto, 2013). A temperaturas bajas, en las hojas se produce un desequilibrio entre la capacidad de absorción de energía lumínica y la capacidad de transformación de esta energía a través de la actividad metabólica. Esto provoca un exceso de excitación del PSII, que da como resultado la generación de ROS (Oquist y Huner, 2003). El llamado *quenching* no fotoquímico (NPQ), es el principal mecanismo protector del PSII en condiciones de estrés. En este proceso se regula el exceso de energía en el PSII para disiparla de forma inocua. Las xantofilas son cofactores esenciales del PSII con diferentes funciones en la protección de este fotosistema. En concreto, el ciclo de las xantofilas (el equilibrio entre zeaxantina, anteraxantina y violaxantina) controla la activación del NPQ (Johnson *et al.*, 2009). El NPQ aumenta en hojas de plantas sometidas a estrés por frío, junto con un aumento paralelo de los niveles de zeaxantina que protege los centros de reacción del PSII (Krol *et al.*, 1999). Del mismo modo, para proteger los procesos fotosintéticos de la exposición al frío también se produce un aumento en los niveles de plastoquinona A (Baena-Gonzalez *et al.*, 2001), y de flavonoides (Sharma *et al.*, 2007; Crifo *et al.*, 2011).

En respuesta a frío las plantas acumulan distintos solutos compatibles u osmolitos. Éstos consisten en un grupo heterogéneo de moléculas orgánicas de baja masa molecular, que pueden acumularse a elevadas concentraciones sin afectar al metabolismo celular. Entre ellos se incluyen algunos azúcares solubles, aminoácidos como la prolina, poliaminas o metilaminas como la glicina betaína (Hekneby *et al.*, 2006; Patton *et al.*, 2007; Ruelland y Zachowski, 2010).

La correlación entre la acumulación de azúcares solubles durante la aclimatación al frío y la tolerancia a la congelación ha sido descrita (Wanner y Junttila, 1999; Gusta *et al.*, 2004; Kamata y Uemura, 2004; Kaplan *et al.*, 2004). Se ha sugerido que esta acumulación otorga a los azúcares solubles funciones como osmoreguladores, crioprotectores y moléculas señalizadoras (Welling y Palva, 2006). La acumulación de carbohidratos ejerce un ajuste osmótico en la célula, disminuyendo la diferencia de potencial químico entre el agua líquida y el hielo extracelular. De este modo se frena la deshidratación (Steponkus, 1984; Gusta *et al.*, 2004) y se evita la nucleación del hielo (Uemura y Steponkus, 1999; Ruelland *et al.*, 2009). A su vez, los azúcares pueden actuar como moléculas antioxidantes, neutralizando a las ROS (Bohnert y Sheveleva, 1998; Bogdanović *et al.*, 2008) y estabilizando la membrana plasmática durante la deshidratación inducida por frío (Uemura *et al.*, 2003; Ruelland *et al.*, 2009). Por otra parte, el frío favorece la síntesis y acumulación de sacarosa (Wilhelm y McMaster, 1995). Esta acumulación es especialmente elevada en plantas expuestas a temperaturas frías y a irradiancias relativamente altas (Pollock, 1990), donde el consumo de carbohidratos es más limitado que su síntesis. Asimismo el frío y la sacarosa parecen mimetizar algunos de sus

efectos (Tognetti *et al.*, 2013). La sacarosa regula la síntesis de clorofila, antocianinas y flavonoides (Edelman *et al.*, 1971; Solfanelli *et al.*, 2006), induce la síntesis de fructanos (Pollock *et al.*, 2003) y aumenta los niveles de trehalosa 6-fosfato (Fernandez *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013), precursor de la trehalosa (osmolito protector frente a estreses, implicado en la respuesta a frío) (Lunn *et al.*, 2014). Por su parte, los fructanos son polímeros basados en fructosa que están implicados en la tolerancia a congelación, estabilizando las membranas y estimulando crioprotectores alternativos (Livingston III *et al.*, 2009). Aunque generalmente se sintetizan y localizan en la vacuola, en plantas sometidas a estrés por frío, se ha descrito la presencia de fructanos en el apoplasto, y se ha sugerido un modelo de transporte de fructanos desde la vacuola hasta el espacio extracelular basado en la formación de vesículas, e inducido por frío (Valluru *et al.*, 2008).

Por otro lado, también se ha descrito la correlación entre la acumulación de prolina y el aumento de la tolerancia a frío, en muchas plantas insensibles a las temperaturas bajas (cebada, centeno, trigo, vid, patata, garbanzo y *arabidopsis*) (Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Savoure, 2010; Kaur *et al.*, 2011). Y a su vez, la acumulación de prolina mitiga los daños producidos por las bajas temperaturas en plantas sensibles, aunque estas plantas no llegan a adquirir tolerancia al frío (Theocharis *et al.*, 2012). La prolina ejerce múltiples funciones en la tolerancia a estreses pudiendo actuar como mediador del ajuste osmótico e induce genes de respuesta a estrés osmótico, estabiliza proteínas y membranas, neutraliza ROS, regula la acidosis citoplasmática y aumenta la actividad del PSII (Kishor *et al.*, 2005; Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Savoure, 2010; Theocharis *et al.*, 2011).

Por su parte, la glicina betaína es un compuesto de amonio cuaternario sintetizado únicamente en el cloroplasto de algunas especies de plantas (Wyn-Jones y Storey, 1981). Así, en acumuladores naturales de glicina betaína como el trigo y la cebada se ha observado una clara correlación entre el incremento de la concentración de este compuesto y la resistencia a la congelación (Koster y Lynch, 1992; Kamata y Uemura, 2004). A su vez, plantas tratadas con glicina betaína exógena muestran una menor disminución de la actividad del PSII a temperaturas bajas (Park *et al.*, 2006). Las funciones de la glicina betaína incluyen la estabilización de la maquinaria transcripcional y traduccional, estabilización de complejos proteicos y membranas (Papageorgiou y Murata, 1995; Chen *et al.*, 2000), e inducción de la ruta de señalización mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sulpice *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004).

En cuanto a las poliaminas, se ha descrito que la acumulación de putrescina en condiciones de estrés por frío, es esencial para la correcta aclimatación al frío y la supervivencia a temperaturas de congelación (Cuevas *et al.*, 2008). Entre las funciones que se ha otorgado a las poliaminas en la tolerancia al frío, destacan su papel estabilizador de la membrana plasmática (Galston y Sawhney, 1990; Valero *et al.*, 2002), su capacidad de minimizar los daños del estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002) y su papel en la protección de las funciones fotosintéticas (Kotzabasis *et al.*, 1993; Navakoudis *et al.*, 2007).



Toda la información anteriormente expuesta pretende poner de manifiesto la importancia del estudio del estrés por frío en plantas. Su relevancia es la razón por la cual el objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir a ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la respuesta a frío en plantas, a través de la caracterización del gen *BvCRIO4* de remolacha.

## 1.2- Remolacha (*Beta vulgaris*). Importancia agronómica.

La remolacha (*Beta vulgaris*), pertenece a la subfamilia *Chenopodioideae*, que era considerada como una familia *per se*, pero recientemente, en vista de los estudios genéticos, ha sido reclasificada y ahora se incluye en la familia *Amaranthaceae* (Kadereit *et al.*, 2010). De entre las numerosas variedades cultivadas de esta especie destaca, por su importancia económica, la remolacha azucarera.

Se cree que la remolacha es una especie originaria de oriente medio y que de allí se extendió al sur de Europa y norte de África. Los primeros textos que describen su cultivo datan del año 800 a.C. Sin embargo, el cultivo de remolacha no fue ampliamente extendido en Europa hasta el siglo XVII, y la producción, a nivel industrial, de azúcar a partir de remolacha tardó un siglo más en desarrollarse. En 1747, el químico alemán Andreas Sigismund Marggraf demostró que los cristales de azúcar obtenidos a partir de remolacha eran idénticos a los de la caña de azúcar. Años después, la familia de mejoradores franceses Vilmorin, padre e hijo, iniciaron un proceso de selección de las mejores variedades de remolacha para aumentar la concentración de azúcar, que en las primeras remolachas cultivadas era un 6%. En la actualidad, se pueden encontrar variedades de remolachas con un 10-20% de azúcar (Cooke y Scott, 1993).

La remolacha es una importante fuente de producción de azúcar en áreas templadas de todo el planeta, siendo la principal fuente en Europa. De hecho, el 20% del suministro mundial de azúcar se produce a partir de remolacha (Agribusiness Handbook, 2009). La producción de azúcar está destinada tanto a la industria alimentaria como a la producción de bioetanol.

En España, el valor de la producción de la remolacha azucarera alcanzó en 2012 los 119.378 millones de euros, representando el 0,48% de la Producción de la Rama Vegetal (PRV) y el 0,28% de la Producción de la Rama Agraria (PRA) (Anuario de Estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), 2013). Dentro de la UE, la producción de azúcar española representa el 2,9%, y los principales países productores son Francia y Alemania (<http://www.magrama.gob.es/>). No obstante, la UE es el segundo mayor importador de azúcar a nivel mundial, con 4,1 mill t importadas en 2013 (datos de la Organización Internacional del Azúcar, ISO).

Aunque la remolacha se considera un cultivo de alto rendimiento, requiere meticulosas prácticas agronómicas para proteger la cosecha frente a estreses bióticos y abióticos. Desde el año 2000, las áreas de cultivo de remolacha han disminuido en Europa un 30%

aproximadamente debido a la política agraria común y a la falta de incentivos para los agricultores, sin embargo, la producción de variedades modernas ha aumentado (Moliterni *et al.*, 2015), indicando que éstas han evolucionado más y son capaces de hacer frente a diferentes condiciones ambientales y de cultivo. Estas variedades son fruto de varias estrategias de propagación como la introgresión de caracteres de resistencia y también de especies silvestres (Panella y Lewellen, 2007; Biancardi *et al.*, 2012). Los objetivos principales de mejora genética de la remolacha han sido aquellos relativos a la respuesta a estreses bióticos (De Biaggi, 2005; Skaracis y Biancardi, 2005) y abióticos (Vastarelli *et al.*, 2013), así como aquellos factores implicados en la calidad y forma de la raíz (Moliterni *et al.*, 2015).

El estrés por frío provoca pérdidas significativas en la producción y calidad del cultivo de remolacha en Europa y Norteamérica. La supervivencia de las plántulas de remolacha y la producción de sacarosa en plantas adultas puede verse seriamente limitada por temperaturas bajas, especialmente tras la exposición a temperaturas por debajo de 0°C en estadios tempranos del desarrollo (Moliterni *et al.*, 2015).

La sensibilidad al frío de la remolacha en campo abierto depende especialmente del estadio de desarrollo. Se ha descrito la letalidad total de plántulas de remolacha en estadio de cotiledón a -2°C, pero en el estadio de 3-4 hojas la muerte solo se alcanza a -10°C (Stevanato, 2005). También se ha documentado variabilidad en cuanto a sensibilidad y tolerancia al frío, en el germoplasma del género *Beta* (Kirchhoff *et al.*, 2012).

Es importante alcanzar un mayor conocimiento sobre los mecanismos que el frío activa en las plantas de remolacha, puesto que éstos afectan a procesos críticos para la acumulación de azúcares (Hoffman, 2010). Hasta la fecha, existen pocos estudios sobre la respuesta de la remolacha al frío. Wood en 1952, sugirió una correlación entre la tolerancia a frío y la resistencia frente a la infección por el hongo *Cercospora beticola*. Más recientemente, han recibido un fuerte impulso los estudios genómicos, proteómicos y metabólicos en remolacha, enfocándose en genes o proteínas que se expresan en la raíz o durante diferentes procesos del desarrollo (Bellin *et al.*, 2002; Catusse *et al.*, 2008) o también en aquellos que se expresan tras la exposición a múltiples condiciones estresantes, entre ellas, el estrés por frío (Pestsova *et al.*, 2008).

En 2013 se presentó la secuencia del genoma de remolacha (Dohm *et al.*, 2013), que presenta un total de 27.421 genes, de los cuales, 17.151 fueron anotados funcionalmente por homologías de secuencias. A su vez, se ha publicado un transcriptoma de referencia para plantas de remolacha adultas tratadas con giberelinas y en vernalización (Mutasa-Göttgens *et al.*, 2012) y se ha tratado de elucidar los componentes de la ruta de acumulación de sacarosa en la raíz de remolacha (Turesson *et al.*, 2014). Además, otro estudio de este mismo año ha presentado un análisis transcriptómico de los cambios producidos en plántulas de remolacha expuestas a estrés por frío (Moliterni *et al.*, 2015).

El objeto de estudio de la presente tesis ha sido la caracterización del gen de remolacha *BvCR104* y su implicación en la respuesta a frío, utilizando los sistemas modelo *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*.

### **1.3- Sistemas modelo.**

#### **1.3.1- *Saccharomyces cerevisiae*.**

Las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente relacionados con el progreso y el bienestar de la humanidad (Arias, 2012). Se han utilizado durante miles de años para elaborar cerveza, pan y hacer toda clase de alimentos y bebidas fermentados, especialmente la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque en el siglo XVII Antoni van Leeuwenhoek pudo observar la levadura por primera vez a través de un microscopio, no fue hasta el siglo XIX cuando Louis Pasteur demostró experimentalmente que las bebidas fermentadas son el resultado de la acción de la levadura viva transformando la glucosa en etanol (Alba-Lois y Segal-Kischinevzky, 2010). Desde entonces, nuestro conocimiento y comprensión acerca de las levaduras del género *Saccharomyces* ha aumentado hasta tal punto que hoy la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en el microorganismo eucariota más utilizado como sistema modelo en multitud de estudios bioquímicos, genéticos y de biología molecular y celular (Sherman, 2002).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular perteneciente a la clase de los hemiascomicetos. A pesar de su simplicidad, las células de esta levadura tienen las características fundamentales de las células eucariotas: poseen un núcleo diferenciado y separado del citoplasma por una membrana nuclear y su citoplasma tiene un espectro completo de orgánulos intracelulares y de estructuras citoesqueléticas.

Algunas de las ventajas que ofrece esta levadura como modelo biológico en investigación son: la facilidad de crecimiento (tiempo de replicación relativamente corto con una tasa de replicación de 1,5 a 2 horas a 30°C; Boekhout y Robert, 2003) y de manipulación en el laboratorio (patogenicidad inexistente, posee el estatus GRAS, del inglés *Generally Recognised as Safe*, otorgado por la FDA); posee un ciclo de vida que alterna una forma haploide y otra diploide, lo que puede generar estudios con mutantes en el primer caso y estudios de complementación en el segundo (Sherman, 2002); eficiente transformación genética mediante recombinación homóloga; la presencia de numerosas cepas mutantes auxotróficas; y la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996) que a su vez es relativamente pequeño (12 Mb), estando caracterizados además, el 74% del total de sus genes (Peña-Castillo y Hughes, 2007). Es por todo esto que los hallazgos realizados en este organismo pueden ser exportados a otros organismos superiores con relativa facilidad.

**1.3.1.1- SEC14.**

**1.3.1.1.1- Descripción dominio y familia.**

El gen de remolacha *BvCRIO4*, objeto de estudio de esta tesis, codifica una proteína tipo Sec14 (ver apartado 4.1.2). El dominio Sec14, también denominado CRAL-TRIO, representa una unidad estructural, ancestral y versátil, que está restringida a eucariotas (Sha *et al.*, 1998). Si bien la proteína Sec14 de levadura (Sec14p) es el prototipo de proteína basada en este dominio, hasta la fecha, el dominio Sec14 se encuentra en 1550 proteínas anotadas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En levadura, además de Sec14p, se expresan cinco proteínas de tipo Sec14 que constituyen la familia SFH (*Sec Fourteen Homologue*) (Li *et al.*, 2000). Por su parte, tanto *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* como *Arabidopsis thaliana* poseen más de 20 genes individuales que codifican distintos miembros de la familia Sec14. Incluso eucariotas simples expresan múltiples miembros de la familia Sec14 (Mousley *et al.*, 2012).

En eucariotas simples predominan proteínas constituidas únicamente por un dominio Sec14. Sin embargo, en eucariotas superiores es común encontrar también proteínas que contienen el dominio Sec14 asociado a otros módulos: como el dominio nodulina, en plantas superiores (Kapranov *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2005); el dominio GOLD (*Golgi dynamics*), en metazoos y plantas superiores (Anantharaman y Aravind, 2002); el dominio PRELI, específico de metazoos (Dee y Moffat, 2005); y un motivo GTPasa de función incierta (Habermehl *et al.*, 2004). Además, el dominio Sec14 se observa frecuentemente en proteínas que regulan la actividad de pequeñas GTPasas de las familias Ras, Rho y Rac (Debant *et al.*, 1996; Aravind *et al.*, 1999; Shang *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2004; Sirokmany *et al.*, 2005; Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007) (Figura 4).

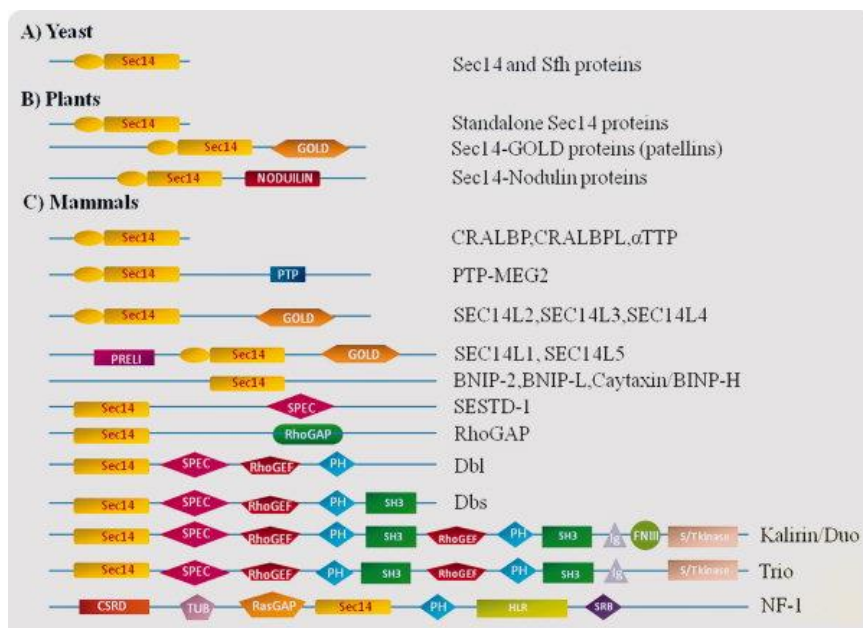


Figura 4: Estructura de dominios proteínas tipo Sec14 en eucariotas. Fuente: Ghosh y Bankaitis, 2011.

Las estructuras cristalizadas disponibles de proteínas tipo Sec14 incluyen: formas de Sec14p de levadura, de unión a detergentes; varias formas de Sfh1p de levadura, de unión a fosfolípidos; versiones de la proteína de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP), tanto unidas a ligando como sin unión; la proteína tipo Sec14-GOLD de mamíferos, Sec14L2; y formas de unión a detergentes y de unión a fosfolípidos, del dominio Sec14 de la neurofibromina (Sha *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2003; Stocker y Baumann, 2003; D'Angelo *et al.*, 2006; Welte *et al.*, 2007; Schaaf *et al.*, 2008).

El plegamiento de Sec14 está estructuralmente conservado y consta de 280 residuos aproximadamente, que forman una estructura globular con dos lóbulos (Figura 5). La región amino-terminal consiste en cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas, mientras que el lóbulo carboxi-terminal forma el bolsillo hidrofóbico de unión a fosfolípidos.

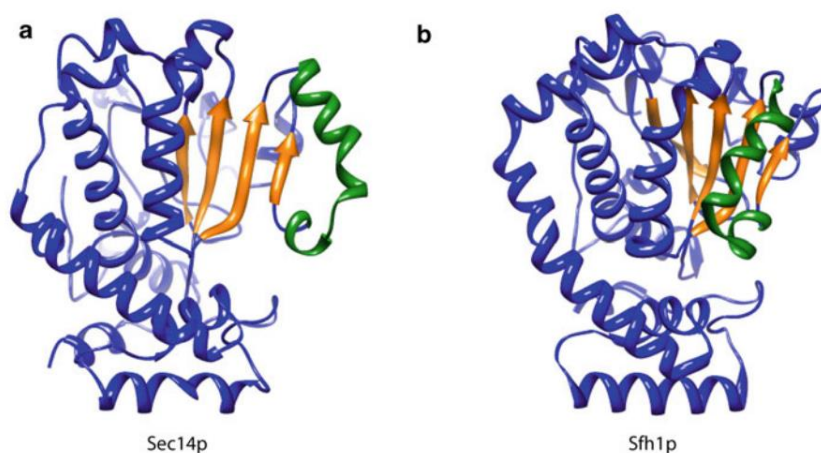


Figura 5: Detalle de la estructura de Sec14p, con el bolsillo hidrofóbico abierto (a), y Sfh1p, con el bolsillo hidrofóbico cerrado (b). Fuente: Mousley *et al.*, 2012.

Esta cavidad está formada por cinco láminas  $\beta$ , donde una de ellas se encuentra atrapada entre dos  $\alpha$ -hélices por un lado, y una “compuerta” formada por una hélice  $3_{10}$  junto con otras dos  $\alpha$ -hélices cortas, por el otro. La versión abierta de esta compuerta del bolsillo hidrofóbico se refiere a la conformación asociada a la membrana e implicada en el intercambio lipídico, y la versión cerrada es la conformación asociada al citoplasma, donde una molécula de fosfolípido se encuentra fuertemente unida al bolsillo hidrofóbico (Sha *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2007; Schaaf *et al.*, 2008; Mousley *et al.*, 2012). La transición de una conformación a otra está determinada por un desplazamiento de 18,73 Å de la compuerta formada por hélices (Tripathi *et al.*, 2014). Los estudios han demostrado que el movimiento de la compuerta de hélices es esencial para el intercambio lipídico mediado por Sec14. Estas transiciones implican grandes movimientos de esta estructura que están controlados por un cambiante elemento conformacional, denominado módulo G (Ryan *et al.*, 2007) y este elemento está conservado en miembros muy distantes de la familia Sec14. Además, se ha descrito que la hélice  $3_{10}$ , que compone la compuerta y es parte integrante del módulo G, es crítica para la estabilidad de la proteína (Sha *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2007).

### 1.3.1.1.2- Intercambio lipídico.

Es especialmente relevante que, tanto en Sec14p como en Sfh1p, las cabezas polares de fosfatidilinositol (PI) y de fosfatidilcolina (PC) se unen en sitios completamente diferentes (Figura 6). La cabeza polar de PC se hunde profundamente en el interior del bolsillo hidrofóbico, mientras que el sitio de unión a PI se sitúa hacia la superficie de la proteína. Este rasgo guió estudios de mutagénesis que mostraron que la molécula de Sec14 alberga la capacidad de unirse e intercambiar tanto PC como PI, con el objetivo de estimular la producción de fosfatidilinositol-4-fosfato (PI(4)P) (el producto de la actividad de la fosfatidilinositol-4-quinasa (PI4K)) (Schaaf *et al.*, 2008).

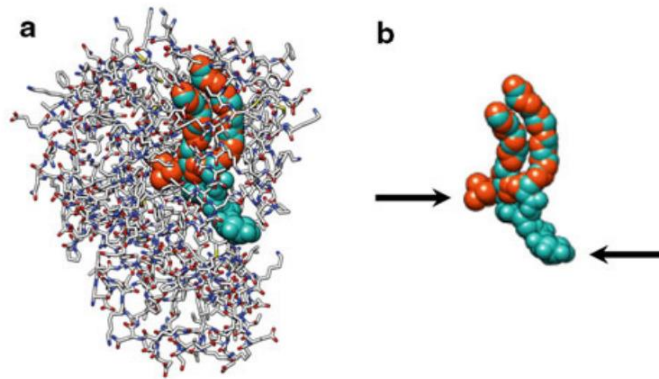


Figura 6: Sitios de unión (marcados con flechas) de la cabeza polar de PI (azul) y de PC (naranja), al dominio Sec14. Las cadenas de PI y PC ocupan la misma cavidad (azul/naranja). Fuente: Mousley *et al.*, 2012.

Además, tanto Sfh1p como Sec14p tienen la capacidad de acomodar en su interior moléculas de fosfolípidos con diferentes volúmenes (Schaaf *et al.*, 2008). Esto se consigue, en parte, cargando moléculas de agua en la parte vacía del sitio de unión a PC para equilibrar el complejo Sec14-PI, y recíprocamente, la parte vacía del sitio de unión a PI sería ocupada por ordenadas moléculas de agua en el complejo Sec14-PC (Schaaf *et al.*, 2008).

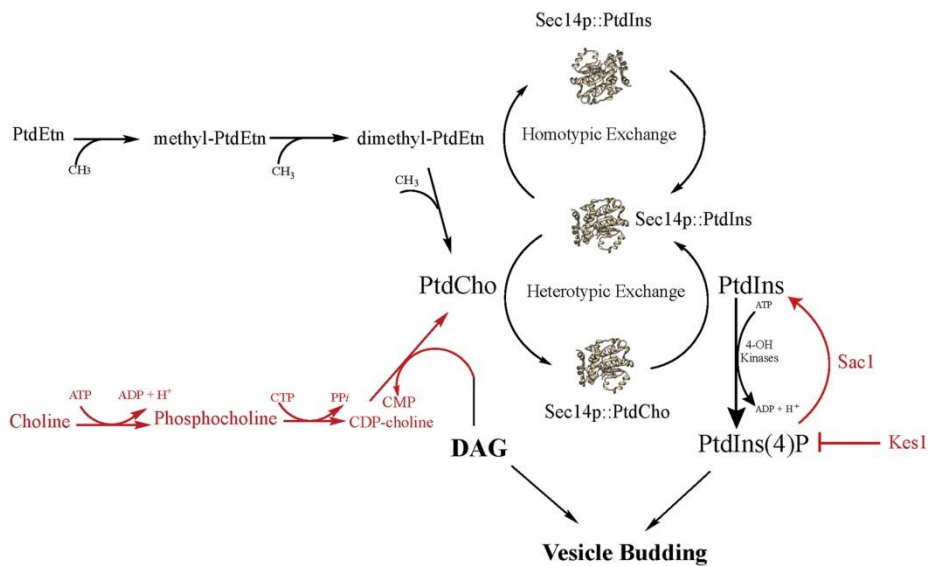


Figura 7: Esquema de la regulación de la PI4K por Sec14. Fuente: Grabon *et al.*, 2015.

Por otra parte, la estimulación de la actividad de la PI4K, por parte de Sec14, requiere reacciones de intercambio heterotípico (PI por PC, o PC por PI) (Tripathi *et al.*, 2014) (Figura 7), y el factor más importante para superar la diferencia de afinidad de unión a PI o a PC, es el flujo de agua hacia dentro y fuera del bolsillo hidrofóbico, lo que permite que estas reacciones de intercambio heterotípico puedan tener lugar. Tanto es así, que las diferencias, entre Sfh1p y Sec14p, en la regulación del flujo de moléculas de agua en el bolsillo hidrofóbico, podría ser la causa por la que Sfh1p no es capaz de sustituir la actividad de Sec14p (Schaaf *et al.*, 2011).

La afinidad de la PI4K por PI es mayor que su afinidad por PC, y a pesar de que en levadura las membranas son ricas en PI, el ciclo de intercambio heterotípico es esencial para permitir la actividad óptima de PI4K (Tripathi *et al.*, 2014) (Figura 8):

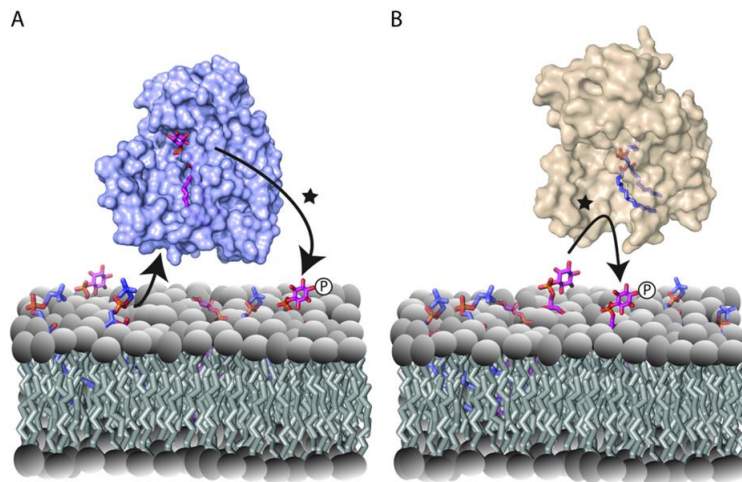


Figura 8: Representación del intercambio heterotípico entre PC (azul y naranja) y PI (rojo y morado) en Sec14. La estrella simboliza la fosforilación mediada por PI4K. Fuente: Bankaitis *et al.*, 2010.

Se desconoce el tiempo de permanencia de las moléculas de Sec14 en la membrana, pero una estimación razonable sugiere que una sola molécula de Sec14 podría realizar 10 ciclos de intercambio heterotípico en la superficie de la membrana, en 2 segundos de permanencia en ella (Mousley *et al.*, 2012).

Finalmente, es interesante mencionar que parece haber diversidad en la forma en que interactúan las PITPs tipo Sec14 con las PI4Ks. Sería lógico pensar que una interacción física directa entre el enzima y la proteína ofrecería la configuración más simple para la mencionada exposición óptima del ligando lipídico hacia la quinasa. Y en algunos casos así es, como en el de la colaboración entre Sfh4 (PITP tipo Sec14 de levadura) y Stt4 (PI4K) en la regulación de la descarboxilación de la fosfatidilserina (Riekhof *et al.*, 2014), donde parece importante una íntima interacción física. Pero sin embargo en otros casos, como la estimulación, por Sec14p, de las PI4Ks de levadura Pik1 y Stt4, no parece esencial una interacción física muy fuerte (Skinner *et al.*, 1993; Ile *et al.*, 2010). Quizás la quinasa solamente detecte la cabeza polar expuesta. Por tanto, los datos existentes parecen indicar que no siempre es necesaria una interacción física entre las PITPs y las quinastas.

### 1.3.1.1.3- Función biológica.

La diversidad de esta gran familia de proteínas que contienen el dominio Sec14, propicia que sus miembros participen en multitud de procesos celulares. Inicialmente se detectó que Sec14p era capaz de transferir fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina (PC) entre membranas *in vitro*, y fue clasificada como una proteína de transferencia de PI (PITP) (Bankaitis *et al.*, 1990). Si bien la transferencia de fosfolípidos entre membranas intracelulares *in vivo* puede ser un componente de la función de las PITPs tipo Sec14, los resultados del grupo de Dr. Bankaitis (Tripathi *et al.*, 2014) indican que, al menos, no es probable que las PITPs de la familia Sec14 sean, exclusivamente, transportadores de lípidos. Actualmente el creciente consenso sostiene la idea de que las PITPs tipo Sec14, actúan como sensores de la composición de la membrana (Ile *et al.*, 2006), integrando a su vez la estimulación de la producción de fosfoinosítidos (fosfatidilinositol-4-fosfato (PI(4)P)) con múltiples aspectos del metabolismo lipídico intracelular, y diversificando los resultados biológicos de la señalización por fosfoinosítidos (Schaaf *et al.*, 2008; Bankaitis *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2014).

Los estudios en levadura y plantas han mostrado múltiples roles de las PITPs tipo Sec14, regulando las rutas habituales de tráfico de membranas (Lopez *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000), el desarrollo de circuitos de tráfico de membranas para el crecimiento dimórfico y la esporulación en levadura (Lopez *et al.*, 1994; Nakase *et al.*, 2001; Rudge *et al.*, 2004) y la biogénesis de pelos radiculares en plantas (Vincent *et al.*, 2005). Asimismo, la importancia biológica de los miembros de la familia Sec14 es tal que, en levadura, Sec14p resulta esencial; y en humanos, disfunciones de las proteínas tipo Sec14 pueden dar como resultado enfermedades neurodegenerativas, ceguera y algunos cánceres (Bankaitis *et al.*, 1990; Sha *et al.*, 1998; Cichowski y Jacks 2001; Fishman *et al.*, 2004; Curwin y McMaster, 2008).

La actividad generada por la familia Sec14 produce interconexión entre el amplio lipidoma, la señalización por fosfoinosítidos y el control del tráfico de membranas. Sec14p no puede estimular la actividad de las fosfatidilinositol quinasas (PIKs) a menos que haya una cantidad suficiente de PC en las células, necesaria para facilitar las reacciones de intercambio heterotípico. Esto dispone a Sec14p para actuar como un sensor de PC que transmite información del metabolismo de PC hacia la síntesis de fosfoinosítidos. Esta actividad es coherente con los resultados de estudios genéticos que han demostrado que Sec14p coordina el metabolismo de PC y diacilglicerol (DAG) con la producción de PI(4)P, con el propósito de estimular el tráfico de membranas en la red trans-Golgi (TGN) y en compartimentos endosomales (Cleves *et al.*, 1989; Bankaitis *et al.*, 1990; Cleves *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002; Mousley *et al.*, 2012b). Cuando aumentan los niveles de PC a partir de la síntesis por la ruta de la CDP-colina, se produce la activación de Sec14p por el intercambio heterotípico entre PI y PC, lo que a su vez estimula la producción de fosfoinosítidos a través de la PI4K (Figura 9). Sin embargo, a pesar de lo expuesto anteriormente, algunos autores indican que la PI4K no parece ser suficientemente eficiente en la regulación de la señalización lipídica



y postulan que las PITPs tipo Sec14 podrían suplir las carencias de esta quinasa en su gestión del PI, turnándose ambos enzimas para coordinar el metabolismo lipídico y la señalización por fosfoinosítidos (Mousley *et al.*, 2012).

La síntesis de PI(4)P, producto de la acción de la PI4K, activaría efectores aguas abajo para promover la formación de vesículas emergentes de la red del *trans*-Golgi (TGN) y de los endosomas. Además, el PI(4)P también podría inhibir la colina fosfato citidiltransferasa, el enzima que determina el ratio en la ruta de la CDP-colina (Mousley *et al.*, 2012) (Figura 9).

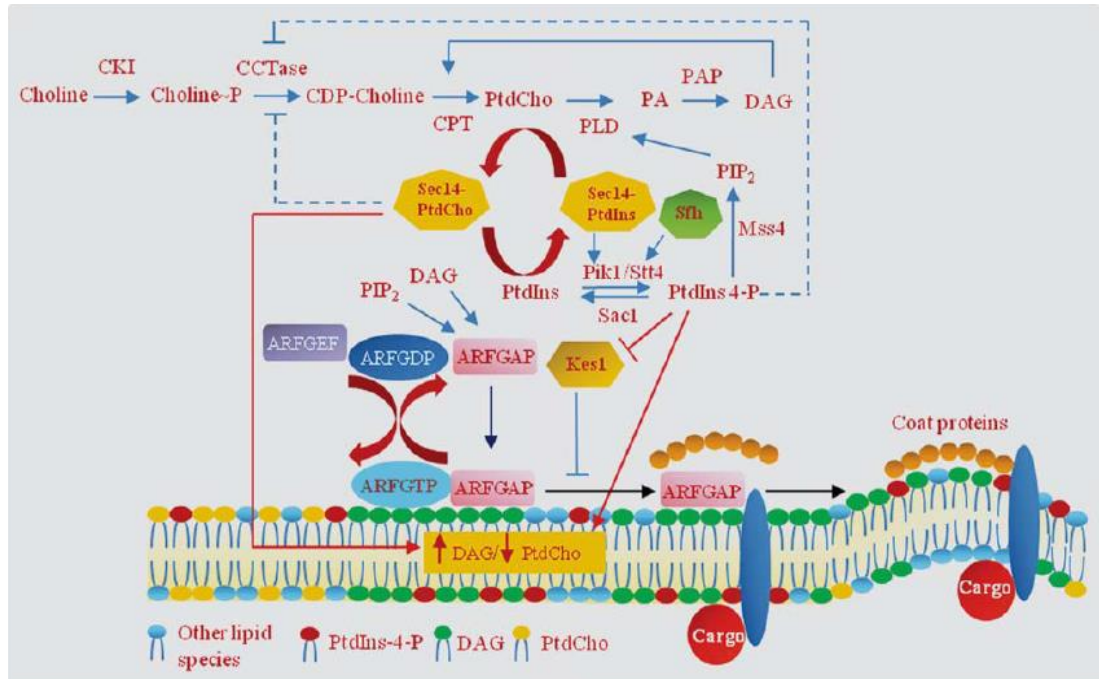


Figura 9: Esquema de la función de Sec14p en la ruta de secreción desde Golgi, en levadura. Fuente: Ghosh y Bankaitis, 2011.

El PI(4)P regula la función de secreción de Golgi a través de varios mecanismos. En primer lugar, este fosfoinosítido funciona como un adaptador requerido para reclutar proteínas de la periferia de la membrana, necesarias para la formación de vesículas. Entre las proteínas que recluta PI(4)P se encuentran proteínas de unión a clatrina (como AP-1, Carlton y Cullen 2005; Wang *et al.*, 2003), proteínas GGA con potencial actividad Arf1-GTP (Wang *et al.*, 2007; Demmel *et al.*, 2008), GTPasas Rab y los factores intercambiadores de nucleótido guanina (GEF) asociados (de Graaf *et al.*, 2004; Sciorra *et al.*, 2005; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010), proteínas de unión a oxisterol que interactúan con la señalización mediada por PI(4)P (Li *et al.*, 2002; Litvak *et al.*, 2005; Stefan *et al.*, 2011), y otras proteínas de unión o transporte de lípidos que además remodelan la composición lipídica de las membranas de Golgi. Por otra parte, el PI(4)P regula la actividad de otras proteínas residentes en el Golgi, como por ejemplo la flipasa Drs2, que posee un papel relevante en la regulación del tráfico de membranas (Chantalat *et al.*, 2004; Muthusamy *et al.*, 2009; Natarajan *et al.*, 2009). Además, el PI(4)P mantiene la integridad del sistema Golgi al inhibir, vía Sec2, ensamblajes inapropiados del complejo de secreción en las membranas del Golgi (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010). Asimismo, durante el proceso de exocitosis, las vesículas de secreción son marcadas para ser fusionadas

con la membrana plasmática, y en este proceso, el PI(4)P inhibe el reclutamiento prematuro de membranas de Golgi para la formación de vesículas de secreción. Finalmente, además de promover el tráfico anterógrado de membranas desde Golgi, estudios recientes han mostrado que el PI(4)P también regula el movimiento retrógrado del tráfico de membranas desde los endosomas hacia Golgi (Mousley *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2009).

Por otra parte, Sec14p también percibe la PC como una lectura del consumo de diacilglicerol (DAG), y su regulación asegura niveles óptimos en la reserva de DAG, necesario para el tráfico endosomal y de la red *trans*-Golgi (TGN) (Skinner *et al.*, 1995). El DAG es un lípido neutral que regula la emergencia de vesículas a lo largo de varios pasos de la ruta de secreción, incluyendo el transporte desde la TGN (Antonny *et al.*, 1997; Kearns *et al.*, 1997; Baron y Malhotra 2002; Yanagisawa *et al.*, 2002; Litvak *et al.*, 2005), y la formación de vesículas COP1 para el tráfico retrógrado desde las primeras cisternas del Golgi hasta volver al retículo endoplasmático (RE) (Asp *et al.*, 2009).

En cuanto a la diversidad de los resultados biológicos derivados de la señalización por fosfoinosítidos (Figura 10), en levadura se da un claro ejemplo donde cada una de las seis PITPs tipo Sec14 (Sec14p y las cinco proteínas Sfh), especifica un único resultado biológico para la señalización por PI4K, y muchas de ellas no presentan una marca estructural de unión a PC (Schaaf *et al.*, 2008; Bankaitis *et al.*, 2010). De hecho Sfh3p actúa de forma antagónica a Sec14p, a pesar de que ambas proteínas activan la misma PI4K (Ren *et al.*, 2014). En este caso, Sfh3p dirige la señalización de la PI4K hacia el metabolismo lipídico, mientras que Sec14p la orienta hacia el tráfico endosomal. Este resultado indica que las PITPs orientan la actividad de las PI4K hacia resultados distintos.

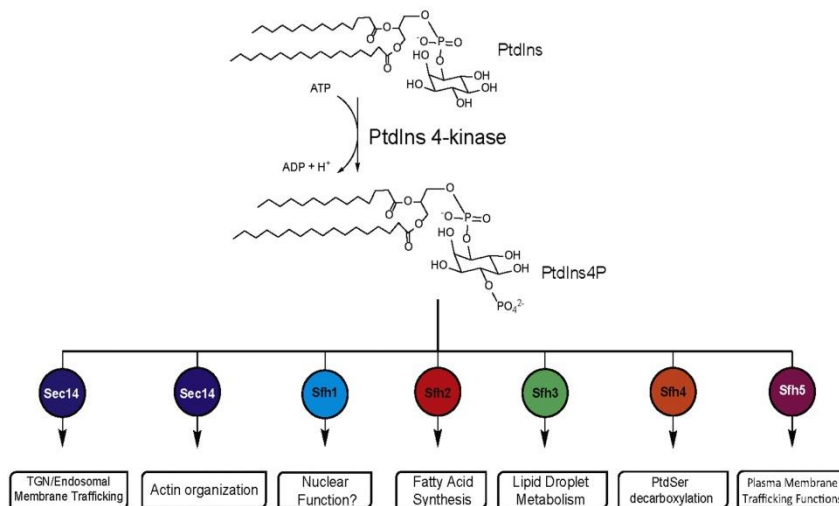


Figura 10: Diversidad de resultados biológicos de las PITPs tipo Sec14 de levadura. Fuente: Grabon *et al.*, 2015.

#### 1.3.1.1.4- Sec14p y balsas lipídicas.

La combinación de esteroides y esfingolípidos forma microdominios fuertemente empaquetados denominados balsas lipídicas (*lipid rafts*) que son insolubles en detergentes a temperatura ambiente. De ahí que las balsas lipídicas también hayan sido nombradas DIGs (*detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes*) o DRM (*detergent-resistant membranes*). Las balsas lipídicas son críticas para la localización intracelular de proteínas en células eucariotas (Simons y Ikonen, 1997; Brown y London, 1998; Brown y London, 2000; Simons y Ikonen, 2000; Ikonen, 2001).

En levadura, la concentración de ergosterol (el principal esteroide estructural en levadura) y esfingolípidos va aumentando progresivamente a lo largo de la ruta de secreción, hasta alcanzar su nivel más elevado en la membrana plasmática (Zinser *et al.*, 1993). Otras membranas, como la de la vacuola, son especialmente pobres en esfingolípidos y muestran un ratio bajo de ergosterol comparado con el de fosfolípidos (Zinser *et al.*, 1991; Hechtberger *et al.*, 1994; Schneiter *et al.*, 1999).

Se ha visto que la composición de esteroide afecta a la endocitosis en levadura (Heese-Peck *et al.*, 2002) y la reducción de esfingolípidos puede truncar completamente la estructura de las balsas lipídicas y causar la muerte celular (Bagnat *et al.*, 2000). Las balsas lipídicas son importantes para el tráfico de membranas en levadura y están implicadas en la secreción de proteínas asociadas a las balsas como: Gas1p (proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol), Pma1p (protón ATPasa) y varias permeasas como Fur4p (permeasa de uracilo), Gap1p (permeasa de aminoácidos), Tat2p (permeasa de triptófano), Hxt1p (transportadora de hexosa) (Bagnat *et al.*, 2000; Bagnat *et al.*, 2001; Eisenkolb *et al.*, 2002; Abe y Iida, 2003; Dupre y Hagenauer-Tsapis, 2003; Hearn *et al.*, 2003; Malínská *et al.*, 2003; Umebayashi y Nakano, 2003; Lauwers y Andre, 2006; Okamoto *et al.*, 2006).

Además de lo mencionado hasta ahora sobre la función de Sec14p, un estudio reciente describe un nuevo rol para esta proteína. Curwin *et al.* (2013) sugieren que la función principal de Sec14p es asegurar la correcta localización y transporte de proteínas que residen en balsas lipídicas. Más concretamente, este estudio mostró que en células deficientes en Sec14p se produce la localización errónea de Pma1p (componente de uno de los principales tipos de balsas lipídicas) y de Fus-Mid-GFP (una proteína delatora del ensamblaje en balsas lipídicas). De forma similar, otro estudio demostró que Sec14p también es necesaria para la correcta localización de Tat2p (permeasa de alta afinidad para triptófano) en la membrana plasmática (Umebayashi y Nakano, 2003) (ver apartado 1.3.1.2). En condiciones normales, estas proteínas requieren su inclusión en balsas lipídicas de Golgi, para ser transportadas a la membrana plasmática, y defectos en la síntesis de esteroide y esfingolípidos comprometen la correcta localización y transporte de éstas (Wang y Chang, 2002; Umebayashi y Nakano, 2003; Proszynski *et al.*, 2005; Daicho *et al.*, 2009; Klemm *et al.*, 2009).

Otros estudios recientes también han relacionado la función de Sec14p con el metabolismo de esfingolípidos. Se ha documentado aumento de ceramidas y cambios en el

metabolismo de esfingolípidos complejos, en células deficientes en Sec14p (Mousley *et al.*, 2008). La inactivación de la fosfatidilinositol-4-fosfato fosfatasa (PI4P fosfatasa) Sac1 puede desviar la función de Sec14p, y se ha demostrado que el fosfatidilinositol producido por Sac1 es usado preferentemente como sustrato de Aur1 para convertir ceramidas en esfingolípidos complejos (Brice *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha determinado que Kes1, que también forma parte del *bypass* de Sec14p, estimula la actividad de la PI4P fosfatasa Sac1 (Stefan *et al.*, 2011) (Figura 7). Por lo tanto, los datos indican que la función de Sec14p y el metabolismo de esfingolípidos están relacionados tanto a través de interacciones genéticas como a través de la regulación de los propios niveles de esfingolípidos.

### 1.3.1.2- TAT2 y transporte de triptófano.

La disminución de la temperatura provoca cambios en el estado físico de la membrana plasmática que alteran significativamente la actividad de las enzimas asociadas a la misma y de los transportadores anclados en ella, produciendo un descenso en la adquisición de nutrientes. Se ha descrito una severa disminución en la entrada de aminoácidos como consecuencia de la degradación vacuolar de permeasas de alta afinidad para aminoácidos, producida por el descenso de la temperatura ambiental (Abe y Horikoshi, 2000). Más concretamente, el transporte de triptófano es un factor limitante del crecimiento bajo varias condiciones de estrés y se halla seriamente comprometido a temperaturas bajas. De hecho, en cepas de levadura auxótrofas para triptófano, el mayor factor limitante para el crecimiento a temperaturas bajas es la absorción de triptófano y después el fosfato inorgánico (Vicent *et al.*, 2015).

Los efectos del frío sobre la capacidad de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ven atenuados mediante la prototrofia a triptófano; y en cepas auxótrofas para triptófano, éstos se pueden mitigar mediante la adición de un exceso de triptófano en el medio de cultivo, a través de la sobreexpresión de permeasas de triptófano como Tat2p y Tat1p, y mediante la reversión de la auxotrofia por sobreexpresión del gen *TRP1* (codifica la fosforibosil antranilato isomerasa que cataliza el 3<sup>er</sup> paso en la biosíntesis de triptófano) (Vicent, 2009).

El gen *TAT2* codifica una permeasa de alta afinidad para triptófano y tirosina (Schmidt *et al.*, 1994) y es limitante bajo muchas condiciones que afectan a la fluidez de la membrana plasmática y/o a la absorción de triptófano (Bauer *et al.*, 2003; Daicho *et al.*, 2007; Khozoie *et al.*, 2009). Se ha documentado que la sobreexpresión de *TAT2* confiere tolerancia a frío y a alta presión (Abe y Horikoshi, 2000). La presión alta mimetiza el efecto del frío al provocar también una disminución de la fluidez de la membrana.

La sobreexpresión de *TAT2* da como resultado un notable aumento del transporte de triptófano a 10°C, el cual se correlaciona con un considerable incremento de la tasa de crecimiento a dicha temperatura (Vicent, 2009). A temperatura óptima de crecimiento, la localización subcelular de Tat2p depende de la concentración de triptófano en el medio de

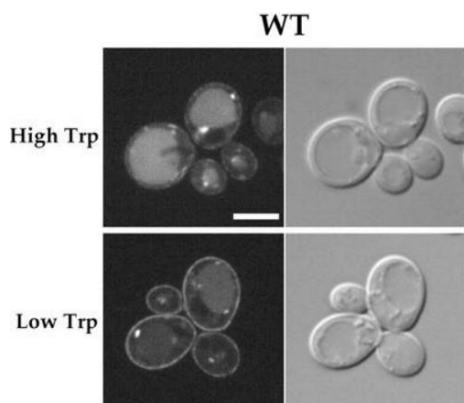


Figura 11: Localización subcelular de Tat2p bajo condiciones de alto y bajo contenido de triptófano en el medio. Fuente: Umebayashi y Nakano, 2003.

cultivo (Figura 11). Cuando la concentración de triptófano en el medio es alta, Tat2p se localiza en compartimentos prevacuolares y en la vacuola; pero si el medio es pobre en triptófano, Tat2p va a la membrana plasmática para facilitar la entrada de triptófano en la célula.

En condiciones de estrés por frío, la pérdida de fluidez de la membrana provoca una disminución de la absorción de triptófano y Tat2p es enviada a la membrana plasmática (aun cuando la concentración de triptófano en el medio es elevada), de forma similar a una situación de ayuno de triptófano (Beck

*et al.*, 1999; Umebayashi y Nakano, 2003).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, Tat2p es una proteína de membrana asociada a balsas lipídicas. Sin embargo, en condiciones normales, Tat2p se localiza predominantemente en endosomas tardíos y dentro de la fracción lipídica mayoritaria (parte de la membrana plasmática que no contiene balsas lipídicas) (Abe y Iida, 2003; Umebayashi y Nakano, 2003). La ordenación hacia vacuola de Tat2p y su subsiguiente degradación se producen en respuesta a varias condiciones ambientales como ayuno de nutrientes, alta concentración de triptófano, estrés por alta presión o la droga anticancer 4-fenilbutirato (Beck *et al.*, 1999; Abe y Horikoshi, 2000; Abe y Iida, 2003; Umebayashi y Nakano, 2003; Liu *et al.*, 2004; Miura y Abe, 2004). Tat2p es transportada a la membrana plasmática a través de su asociación con balsas lipídicas y es enviada a vacuola cuando se producen alteraciones en las balsas lipídicas (Bagnat *et al.*, 2001) (Figura 13).

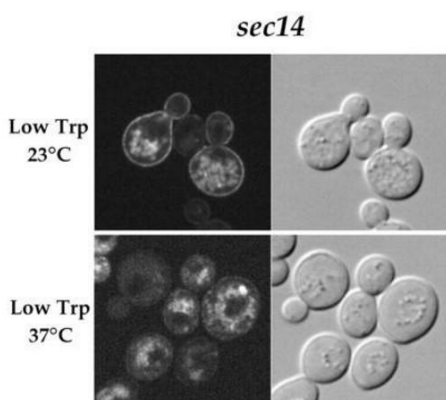


Figura 12: Localización subcelular de Tat2p en células del mutante termosensible *sec14<sup>ts</sup>*, bajo condiciones de bajo contenido de triptófano en el medio. Fuente: Umebayashi y Nakano, 2003.

También se ha comentado anteriormente que la proteína Sec14p está implicada en la correcta localización de Tat2p en balsas lipídicas, para ser enviada a la membrana plasmática. Experimentos con mutantes *sec* indican que Tat2p se asocia con las balsas lipídicas en el Golgi y que Sec14p es requerida para su salida del Golgi (Stevens *et al.*, 1982; Umebayashi y Nakano, 2003). Con una concentración baja de triptófano en el medio, la presencia de Sec14p permite el transporte de Tat2p a la membrana plasmática, aunque una porción de Tat2p se mantiene ligada a compartimentos intracelulares. La deficiencia de Sec14p imposibilita

el transporte de Tat2p a la membrana plasmática, aun en condiciones de baja concentración de triptófano en el medio, y la localización de Tat2p queda restringida a compartimentos prevacuolares (Umebayashi y Nakano, 2003) (Figura 12).

La distribución de Tat2p hacia la membrana plasmática o hacia endosomas y vacuola, se determina en la red *trans*-Golgi (TGN), y la última etapa que determina su localización depende de su ubiquitilación (Umebayashi, 2003) (Figura 13). La degradación vacuolar de Tat2p requiere de su ubiquitilación mediada por Npr1 (Schmidt *et al.*, 1998) y Rsp5 (Beck *et al.*, 1999; Abe y Iida, 2003; Umebayashi y Nakano, 2003), y en la interacción entre Rsp5 y Tat2p están implicadas las proteínas adaptadoras Bul1 y Bul2, también necesarias para el proceso de ubiquitilación de Tat2p (Abe y Iida, 2003; Umebayashi y Nakano, 2003). Se ha indicado que Rsp5 se encuentra tanto en balsas lipídicas como fuera de ellas (Wang *et al.*, 2001). Y Daicho *et al.* (2009), han sugerido que Rsp5 se encuentra y realiza la ubiquitilación de Tat2p en el TGN, probablemente fuera de las balsas lipídicas. Además han planteado un modelo en el que la proteína Tat2 que escapa de la ubiquitilación en la fracción lipídica mayoritaria puede ser translocada a balsas lipídicas y, por tanto, enviada a la membrana plasmática; y la proteína Tat2 ubiquitilada por Rsp5 es transportada al endosoma tardío, desde donde puede continuar hacia la vacuola para su degradación.

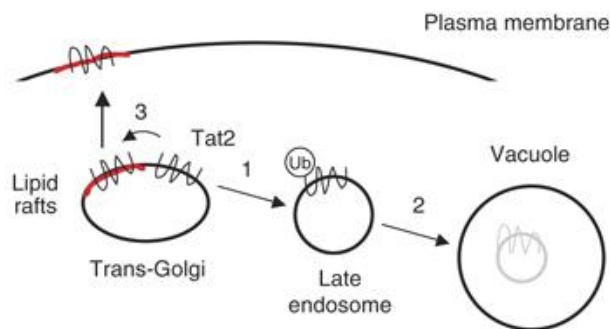


Figura 13: Modelo de localización de Tat2p. Tat2p es ubiquitilada por Rsp5 en la red *trans*-Golgi, en zonas de la membrana distintas de las balsas lipídicas, y es transportada hacia endosoma tardío (1). Algunas proteínas pueden continuar hasta la vacuola para su degradación (2). La proteína Tat2 no ubiquitilada es trasladada al interior de las balsas lipídicas para ser enviada a la membrana plasmática (3). Fuente: Daicho *et al.*, 2009.

El ergosterol, componente de las balsas lipídicas, es necesario para la correcta asociación de Tat2p a las balsas lipídicas y su transporte desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática en células de levadura (Abe y Iida, 2003; Umebayashi y Nakano, 2003). Defectos en la biosíntesis de ergosterol producen anomalías en la estructura de las balsas lipídicas que conducen a localización y transporte de Tat2p defectuosos (Umebayashi y Nakano, 2003; Daicho *et al.*, 2009). Podría existir un sistema fisiológico que regule la localización de los transportadores de nutrientes mediante la alteración de la biosíntesis de esteroides, sin afectar notablemente la función de otras proteínas de la membrana plasmática.

Por lo tanto, todo lo expuesto hasta ahora parece indicar que sin la existencia de balsas lipídicas funcionales (mutantes de biosíntesis de ergosterol) y sin Sec14p, Tat2p no puede ser transportada a la membrana plasmática, ni siquiera bajo condiciones de ayuno de triptófano.

### 1.3.2- *Arabidopsis thaliana*.

A lo largo del siglo pasado, la mayoría de los estudios en plantas se realizaron con especies de interés económico para poder mejorar sus cultivos. Estas especies generalmente presentan dificultades para su estudio, ya que en la mayoría de los casos sus genomas son de gran tamaño y tienen un elevado grado de ploidía, lo que dificulta su manipulación y análisis (Meyerowitz, 2001). El uso de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio en plantas en el laboratorio fue relativamente tardío. En 1907, el Dr. F. Laibach descubrió el número de cromosomas de *Arabidopsis thaliana* ( $2n=10$ ), y fue el primero en sugerir su potencial para la experimentación genética, entre otras razones por la brevedad de su ciclo vital. Posteriormente, Rédei (1975) ensalzó convincentemente las virtudes de *A. thaliana* como especie en la que el análisis genético es factible y productivo, sin embargo, no fue hasta finales de la década de los ochenta cuando esta planta se convirtió en uno de los organismos experimentales de elección preferente en biología vegetal (Meyerowitz, 1994).

*Arabidopsis thaliana* es una planta vascular, una angiosperma que pertenece a la clase de la Dicotiledóneas, a la subclase de las Dilénidas, al orden de las Caparales y a la familia de las Brassicáceas o Crucíferas (Strasburger *et al.*, 1994). Es una especie nativa de Europa, Asia, y el noroeste de África, aunque se ha descrito su presencia en casi todo el planeta, con la excepción de Sudamérica (Rédei, 1970).

A pesar de su escaso valor económico, esta especie reúne una serie de características que la han convertido rápidamente en el objeto de estudio por excelencia de la mayoría de los laboratorios dedicados a la biología experimental de plantas. Entre ellas destacan su capacidad de crecimiento bajo condiciones controladas, su pequeño tamaño (unos 30-50 cm de altura, que posibilita siembras de hasta 10.000 plantas/m<sup>2</sup>), su ciclo de vida corto (aproximadamente unas 6 semanas, cuando es cultivada a 25°C bajo fotoperiodo de 16 horas de luz), la capacidad de producir hasta 10.000 semillas por planta (Meyerowitz, 1987) y posee un genoma pequeño (125 Mb, aproximadamente 25.500 genes) que se encuentra completamente secuenciado desde el año 2.000 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) y que además contiene un bajo porcentaje de secuencias repetitivas de ADN (10-15%). Además, las herramientas de biología molecular como la mutagénesis, etiquetado de genes, rastreo de mutantes, clonaje posicional o la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*, pueden llevarse a cabo en *A. thaliana* (Clough y Bent, 1998).

Por todo ello, la comunidad científica emplea esta especie como organismo modelo, y se han obtenido colecciones de líneas mutantes que se encuentran disponibles en centros como el NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*) y el ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Centre*), que resultan muy útiles en trabajos de genómica funcional.

### 1.3.2.1- Patelinas, familia multigénica.

El gen *CRIO4* de remolacha, objeto de estudio en esta tesis, es ortólogo a los genes *PATLs* de *Arabidopsis thaliana* (ver apartado 4.2). Las *PATLs* o Patelinas (en inglés *Patellins*, nombre derivado del latín *patella* (Peterman *et al.*, 2004a)) son una familia de proteínas tipo *Sec14* de *Arabidopsis thaliana* compuesta por seis miembros. *PATL1* fue la primera de esta familia en ser caracterizada, y se descubrió durante un escrutinio bioquímico para identificar proteínas de unión a F-actina (Peterman y Ohol, 2003; Peterman *et al.*, 2004a).

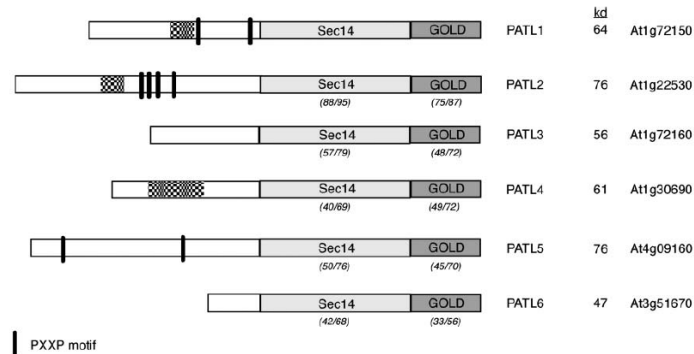


Figura 14: Diagrama de la estructura de dominio de las *PATLs* en *Arabidopsis*.  
Fuente Peterman *et al.*, 2004a.

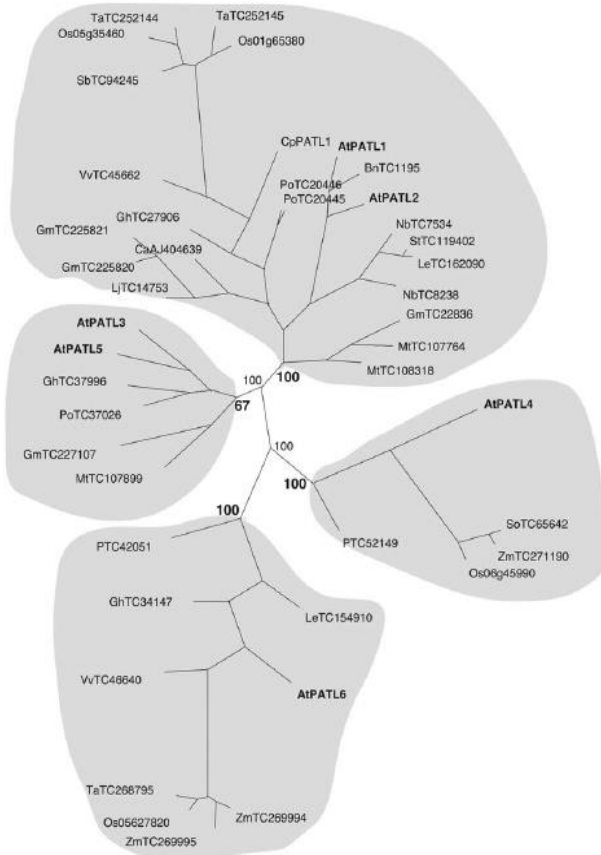


Figura 15: Análisis filogenético de las *PATLs* de plantas.  
Fuente: Peterman *et al.*, 2006a.

En la Figura 14 se observa la estructura de dominios de las proteínas de la familia *PATL*, que poseen una región N-terminal variable en longitud y composición, siendo este dominio muy ácido con un punto isoelectrico (pI) cercano a 4, excepto en *PATL6*, debido a un inusual alto porcentaje de aminoácidos cargados, especialmente ácido glutámico (Peterman *et al.*, 2004a). Este dominio N-terminal ácido puede causar movilidad anómala de la proteína en geles SDS (Sedbrook *et al.*, 2002; Peterman *et al.*, 2004a; Minami *et al.*, 2009). En el extremo N-terminal también se encuentran motivos *Coiled coil*, un motivo de plegamiento y oligomerización de proteínas (Burkhard *et al.*, 2001), y secuencias PXXP de unión a dominios SH3 (Feng *et al.*, 1994). Los dominios SH3 participan en interacciones proteína-proteína implicadas en dinámicas de



citoesqueleto, rutas de señalización tirosina quinasa y tráfico vesicular (Kay *et al.*, 2000). El extremo C-terminal de las PATLs está muy conservado y contiene los dominios Sec14 y GOLD, que se encuentran en otras proteínas eucariotas implicadas en el tráfico de membranas (Peterman *et al.*, 2004b). En apartados previos de esta tesis se ha hablado extensamente de la proteína Sec14 de levadura, y el dominio Sec14 de las PATLs conserva los mismos residuos que son críticos, en Sec14p, para la unión y transferencia de fosfolípidos (Peterman *et al.*, 2004a). Por su parte, el dominio GOLD se encuentra en proteínas eucariotas implicadas en la función de Golgi y en el tráfico lipídico (Anantharaman y Aravind, 2002).

Análisis filogenéticos dividen a las PATLs de plantas en cuatro ramas, estando las seis PATLs de *Arabidopsis thaliana* repartidas entre éstas, lo que podría sugerir solapamiento en la función entre los miembros de esta familia (Peterman *et al.*, 2006a) (Figura 15).

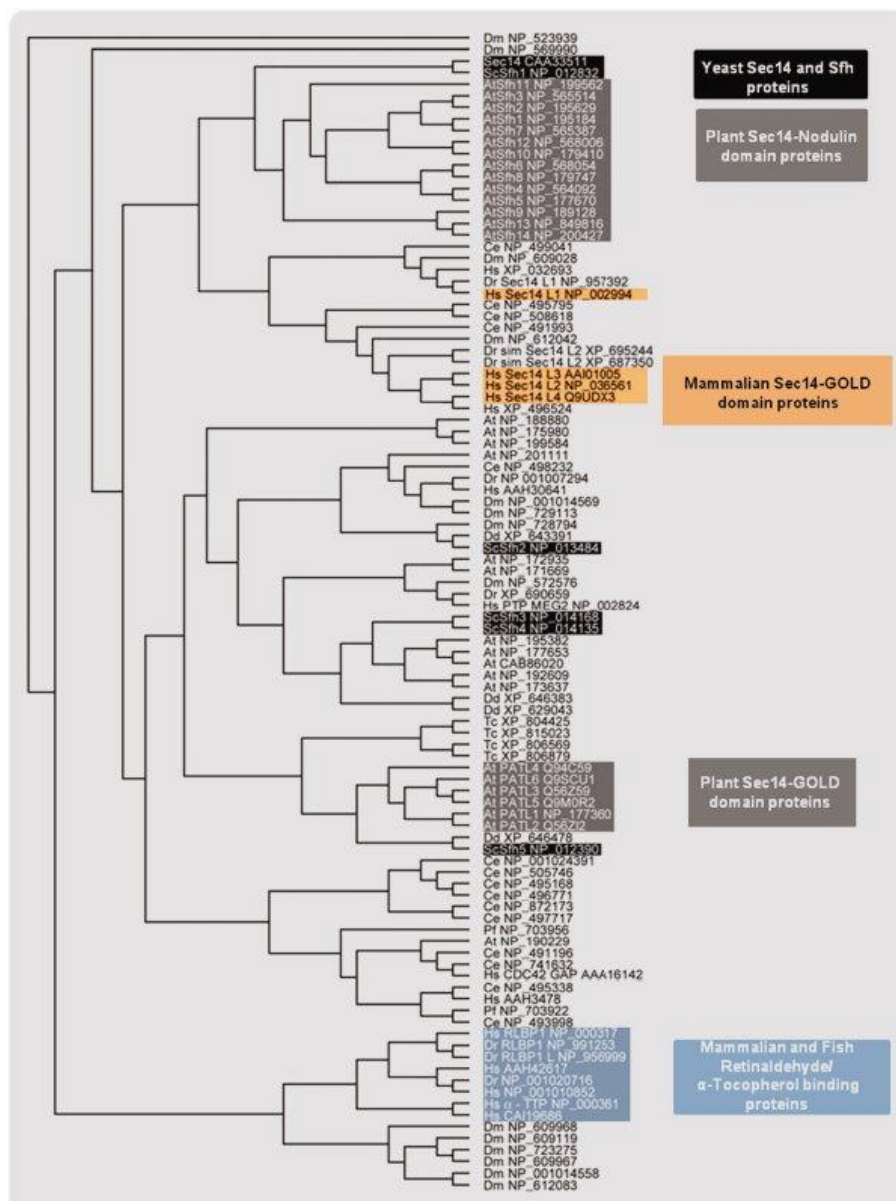


Figura 16: Proteínas tipo Sec14 en eucariotas. Fuente: Ghosh y Bankaitis, 2011.

Por otra parte, el análisis filogenético de las 31 proteínas de *A. thaliana* con dominio Sec14 indica que la familia de las PATLs surgió durante la evolución y el dominio Sec14 de las PATLs es el más diferente respecto de Sec14p de levadura (Peterman *et al.*, 2006b). De hecho, las PATLs tienen más similitud con SFH5p de levadura (homólogo de Sec14p) y con las proteínas tipo Sec14 de humanos, que con Sec14p (Figura 16). Es más, aun estando relacionados en origen, se ha sugerido que el dominio Sec14 de las PATLs y la proteína Sec14 de levadura son funcionalmente diferentes, puesto que ni PATL1 ni una versión truncada de la proteína que solo contiene el dominio Sec14 de PATL1, pueden complementar la función de Sec14p en levadura, al igual que ocurre con las proteínas de humanos tipo Sec14 (Peterman *et al.*, 2006).

PATL1 se encuentra en todos los tejidos analizados (Figura 17) aunque es más abundante en hojas y raíces (Peterman *et al.*, 2004a) y además presenta un patrón de expresión vascular (Rackaityte, 2013).

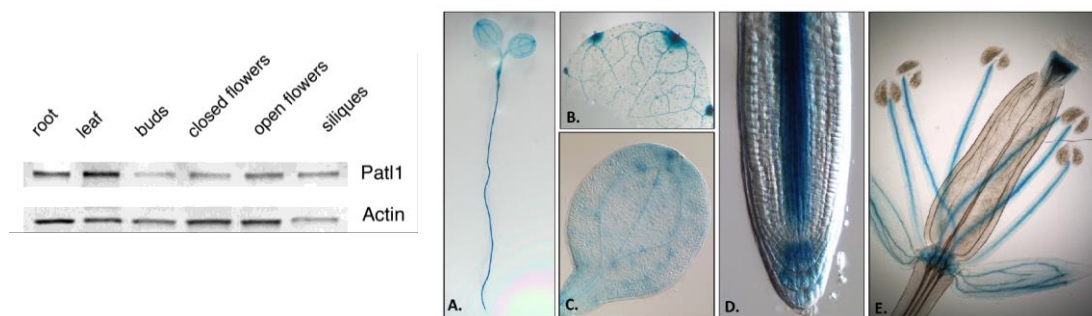


Figura 17: Patrón de expresión de *PATL1* en *Arabidopsis thaliana*. Fuentes: Peterman *et al.*, 2004; Rackaityte, 2013.

En las raíces de *A. thaliana*, PATL1 se concentra en la zona de división celular. Estudios de fraccionamiento bioquímico indican que PATL1, al igual que Sec14p de levadura, es una proteína periférica a la membrana (Peterman *et al.*, 2004a). Los eventos de tráfico de membranas son fundamentales para la construcción de la placa celular durante la citocinesis en células vegetales. PATL1 se localiza en la placa celular (Figura 20), que dará lugar a la lámina media, en el momento de la división celular y permanece allí durante algún tiempo tras la citocinesis (Peterman *et al.*, 2004a).

Se ha descrito acumulación de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) en el borde de la placa celular durante su fusión con la membrana plasmática materna (van Leeuwen *et al.*, 2007), lo que sugiere un papel de estos fosfoinosítidos en los pasos finales de la formación de la placa celular.

PATL1 se une específicamente a algunos fosfoinosítidos (Figura 18), importantes reguladores del tráfico de membrana, como PI(3)P, PI(5)P y PI(4,5)P<sub>2</sub> (Peterman *et al.*, 2004a), con una fuerte preferencia por PI(5)P (Peterman *et al.*, 2004a; Peterman *et al.*, 2007), que siendo el fosfoinosítido menos caracterizado, tiene un papel crítico en la

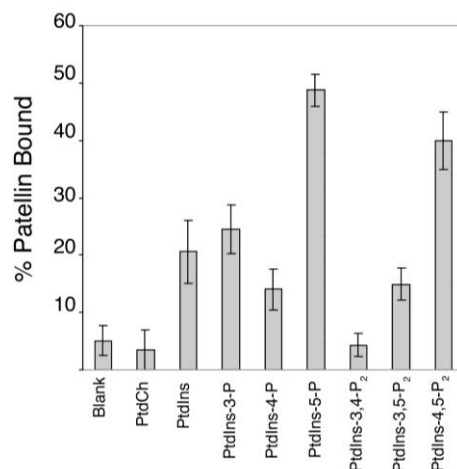


Figura 18: Unión a fosfoinosítidos de *PATL1*. Fuente: Peterman *et al.*, 2004a.

señalización celular (Alvarez-Venegas *et al.*, 2006; Shisheva, 2013).

Aunque la secuencia de PATL1 contiene dos sitios potenciales de unión a fosfoinosítidos, el dominio Sec14 y un motivo rico en lisina encontrado en el dominio GOLD (Peterman *et al.*, 2004a; Peterman *et al.*, 2007), estudios de homología con la secuencia de Sec14p y ensayos de unión a fosfolípidos de PATL1 y una versión truncada de PATL1 que carece del dominio GOLD, han puesto de manifiesto que la Arg266 del dominio Sec14 de PATL1, es el residuo que más probablemente otorgue la especificidad de interacción con PI(5)P, debido a su proximidad con el fosfato en la posición 5 del anillo inositol (Ferris *et al.*, 2010). Se ha sugerido que PATL1 tiene un papel en los eventos de tráfico de membrana asociados a la placa celular durante su expansión y maduración, involucrando por tanto a los fosfoinosítidos en la biogénesis de la placa celular y también en las últimas etapas de la citoquinesis (Peterman *et al.*, 2004a; van Damme *et al.*, 2008).

El solapamiento en el patrón de expresión de las PATLs estudiadas y el fenotipo de la pérdida de función del gen, parecen corroborar la posible redundancia funcional que preveían los análisis filogenéticos (Lee *et al.*, 2010). La mutación de *PATL1* por inserción de T-DNA, no exhibe defectos en la citoquinesis, probablemente debido a la redundancia funcional proporcionada por otros miembros de la familia de las PATLs. PATL1 y PATL3 muestran un patrón de expresión solapante en hidátodos, células oclusivas y tricomas de hojas jóvenes, en el tejido vascular de hojas, tallo, sépalos, filamentos de las anteras y en la región superior del pistilo justo por debajo de las papilas estigmáticas; sin embargo, solo PATL1 se expresa también en la cofia radicular. Estos datos sugieren que PATL1 y PATL3 podrían tanto actuar de forma solapada como tener funciones diferentes. Es interesante mencionar que el patrón de expresión observado en PATL1 y PATL3 es muy similar al observado para DR5 (elemento sintético de respuesta a auxinas), lo que podría indicar una conexión de las PATLs con la señalización de auxinas (Levy y Peterman, 2009; Rackaityte, 2013).

Durante el desarrollo, el flujo de auxinas es canalizado direccionalmente para establecer un patrón vascular. El trabajo de Rackaityte (2013) ha mostrado datos reveladores sobre el papel de las PATLs en el establecimiento del patrón vascular y su posible interacción con auxinas. PATL2, del mismo modo que PATL1, se expresa en tejidos vasculares, y datos de estudios de expresión con microarrays indican que PATL1 y PATL2 pueden estar implicados en la diferenciación del xilema. PATL1 y PATL2 son necesarias para el completo desarrollo del patrón vascular en cotiledones. En el doble mutante *pat1pat2*, los cotiledones muestran mayor número de huecos, inversión del orden de las venas, defectos distales y finales libres. Los defectos en el patrón vascular están asociados con la adquisición de una inadecuada diferenciación del procambium. *PATL1* y *PATL2* se expresan en células preprocambiales del embrión y el primordio foliar en desarrollo, y en células vasculares maduras de los cotiledones, lo que podría sugerir su implicación en el establecimiento del procambium y la diferenciación vascular. Además, el patrón de expresión de DR5 (elemento sintético de respuesta a auxinas), también se encuentra alterado en el mutante *pat1pat2*, lo que respalda la hipótesis de que PATL1 y PATL2 regulan el transporte polar de auxinas durante la canalización, quizás al influir

en la localización de las PINs. En este mismo estudio se ha propuesto que PATL1 y PATL2 actúan junto con ARF-GAPs, necesarias para el transporte polar de auxinas durante el establecimiento del patrón vascular, sugiriendo un nuevo papel para las proteínas tipo Sec14 de plantas (Rackaityte, 2013). En otro estudio (Isono *et al.*, 2010), se muestra otro posible enlace entre las PATLs y el transporte de auxinas, al describir la interacción de PATL1 y PATL2 con AMSH3, enzima de desubcutilación requerido para la eficiente endocitosis de PIN2.

Por otra parte, varios estudios proteómicos y transcriptómicos han mostrado que PATL1, PATL2 y PATL4 están reguladas por brasinostenoides (BRs), viéndose su expresión afectada tanto en mutantes insensibles (*bri1*) como hipersensibles (*bzr1*) a BRs (Goda *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008). Esto sugiere una función de las PATLs en el crecimiento regulado por BRs. Los BRs afectan a muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, y diversos estudios han confirmado la capacidad de esta fitohormona para modular la respuestas de las plantas frente a diferentes estreses ambientales (Krishna, 2003; Divi y Krishna, 2009). Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* tratadas con BRs, mejoran su tolerancia al estrés por frío (Kagale *et al.*, 2007). Del mismo modo, en *A. thaliana*, plantas mutantes *bri1* aumentan su tolerancia al frío tras un tratamiento exógeno de BRs (Kim *et al.*, 2010). En este mismo estudio, se ha encontrado elevados niveles de expresión de CBFs/DREB1s asociados tanto a la mutación como a la sobreexpresión del gen *BRI1*, confirmando la implicación de los BRs en la respuesta a frío. Dado que la función de las PATLs aún no está completamente determinada, futuros estudios sobre el papel de las PATLs en la respuesta a brasinosteroides podrían dar nuevos indicios que ayuden a explicar el papel del tráfico vesicular en la respuesta a frío.

Es interesante destacar que se ha localizado un sitio de fosforilación en el bolsillo hidrofóbico de unión a fosfoinosítidos de PATL2 (Jones *et al.*, 2009). Y los indicios existentes de la implicación de PATL2 en la señalización de citoquininas (Dortay *et al.*, 2008) han sido corroborados por un estudio proteómico en *Arabidopsis thaliana*, que ha detectado que PATL2 está involucrada en la respuesta temprana a citoquininas (Černý *et al.*, 2011).

#### 1.3.2.1.1- Patelinas y balsas lipídicas

Se cree que las balsas lipídicas en plantas (microdominios de la membrana plasmática ricos en esteroides y esfingolípidos, y resistentes a detergentes) están implicadas en muchos procesos celulares como la transducción de señales, el tráfico de membranas y en el metabolismo de la pared celular (Peskan *et al.*, 2000; Mongrand *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2004; Bhat y Panstruga, 2005; Borner *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2006; Laloi *et al.*, 2007; Lefebvre *et al.*, 2007).

La aclimatación al frío provoca cambios en la composición lipídica de las balsas que afectan al número y tamaño de éstas, y se ha sugerido que los esteroides están sumamente implicados en la formación de balsas lipídicas durante el proceso de aclimatación al frío (Xu *et*

*al.*, 2001; Beck *et al.*, 2007; Minami *et al.*, 2009). Un estudio ha detectado que la composición lipídica y proteica de las balsas lipídicas en la membrana plasmática de células de *Arabidopsis thaliana* cambia tanto cualitativamente como cuantitativamente durante la aclimatación al frío (Minami *et al.*, 2009). La proporción de esteroides libres aumenta en las balsas lipídicas tras la aclimatación, y este aumento conlleva una ligera disminución de fosfolípidos. Los cambios que el frío provoca en la composición lipídica de las balsas puede modificar la función de las proteínas que se encuentran en ellas. El ratio proteína-lípido es mayor en las balsas lipídicas que en el resto de la membrana plasmática, y durante la aclimatación al frío, la especificidad de las proteínas reclutadas en las balsas lipídicas aumenta.

La clasificación funcional de las proteínas de respuesta a frío de las balsas lipídicas, sugiere que éstas funcionan como plataformas de transporte a través de la membrana plasmática, tráfico intracelular de vesículas e interacción con el citoesqueleto. Entre las proteínas que aumentan en las balsas lipídicas durante la aclimatación al frío, se encuentran entre otras, H<sup>+</sup>-ATPasas, aquaporinas y proteínas relacionadas con endocitosis como clatrininas y dinaminas. Las H<sup>+</sup>-ATPasas regulan el pH citoplasmático y el potencial de membrana, y se ha documentado un aumento de las H<sup>+</sup>-ATPasas en *Helianthus tuberosus* durante la aclimatación al frío (Ishikawa y Yoshida, 1985). Además, como se ha comentado en apartados anteriores de esta tesis, la H<sup>+</sup>-ATPasa de levadura (Pma1p) también se localiza en las balsas lipídicas (Bagnat *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002), y su correcta localización depende de la proteína Sec14p (Curwin *et al.*, 2013). Por su parte, las aquaporinas transportan agua a través de las membranas y su sobreexpresión en levadura aumenta la permeabilidad al agua osmótica a temperaturas bajas (Soveral *et al.*, 2006), lo que ayuda a contrarrestar la formación de cristales de hielo y aumenta la tolerancia a congelación (Tanghe *et al.*, 2002). Por tanto, es posible que un aumento en la proporción de aquaporinas en las balsas lipídicas de plantas mejore la permeabilidad al agua osmótica de la membrana plasmática a temperaturas bajas y de congelación, con el consecuente aumento de supervivencia de la célula.

También se ha identificado a PALT1 y PATL2 entre las proteínas de respuesta a frío asociadas a balsas lipídicas (Minami *et al.*, 2009). El nivel de PATL1 en las balsas lipídicas, disminuye transitoriamente tras 4 días de aclimatación al frío, pero vuelve a aumentar en tiempos posteriores. Estos datos dan pie a pensar en la implicación de las PATLs en la aclimatación al frío en plantas, mediada por las balsas lipídicas. Es interesante mencionar que en otro estudio donde también se relacionan H<sup>+</sup>-ATPasa, aquaporinas y PATL2 en respuesta a estrés abiótico, se identificó un sitio de fosforilación en PATL2 en respuesta a estrés salino (EILQSEpSFKEEGYLASELQEA EK) (Hsu *et al.*, 2009). Este mismo sitio de fosforilación (pSFKEE) también ha sido encontrado en PATL3 en un estudio de respuesta a hormonas (Chen *et al.*, 2010) y en PATL3, PATL4 y PATL5 en un estudio que identifica proteínas de *Arabidopsis* asociadas al núcleo (Jones *et al.*, 2009). En este último estudio se ha identificado otro sitio de fosforilación en el dominio Sec14 de PATL2 (TFGSIIpSPR). Estos datos parecen indicar un papel de las PATLs en la señalización frente a diferentes estímulos.

También se ha sugerido que las balsas lipídicas sirven de plataforma para la entrada de patógenos en la célula de la planta huésped (Bhat *et al.*, 2005). Además, se ha propuesto un papel en la endocitosis (Bloch *et al.*, 2005; Yalovsky *et al.*, 2008) y en el fomento del crecimiento mediado por hongos (Shahollari *et al.*, 2007), de algunas proteínas asociadas a las balsas lipídicas de plantas. En este sentido es importante destacar que se ha observado que la sobreexpresión de *PATL3* y *PATL6* afecta a la correcta localización de la proteína de movimiento (MP) del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) provocando un transporte viral intracelular menos eficiente y disminuyendo su movimiento intercelular, lo que a su vez se traduce en una disminución de la infección (Peiro *et al.*, 2014). También es interesante mencionar que se ha identificado un fragmento C-terminal de la proteína de humanos SEC14L1a, proteína tipo Sec14-GOLD ortóloga a las PATLs, que inhibe la replicación del virus HIV-1 (Urano *et al.*, 2010).

### 1.3.2.2- PIN2 y auxinas.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento (Reinhardt *et al.*, 2000; Bhalerao *et al.*, 2002; Friml *et al.*, 2002; Bhalerao y Bennett, 2003; Fleming, 2006; Tanaka *et al.*, 2006; Teale *et al.*, 2006; Benjamins y Scheres, 2008; Mockaitis y Estelle, 2008). La distribución de auxinas en la planta se realiza a través de dos rutas. En la primera de ellas, que sirve como sistema de transporte rápido, las auxinas son transportadas a través del floema hasta largas distancias (Cambridge y Morris, 1996; Swarup *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 2002). El segundo tipo de transporte se refiere a cortas distancias, donde las auxinas son transportadas por proteínas específicas de forma intercelular, de forma predominantemente unidireccional, estableciendo de este modo un sistema de transporte polar

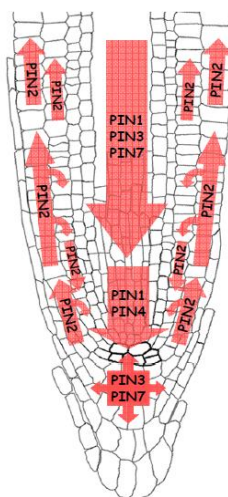


Figura 19: Representación esquemática del flujo de auxinas en el ápice radicular. Fuente: Bliou *et al.*, 2005.

de auxinas (Murphy *et al.*, 2002; Swarup *et al.*, 2004; Geisler *et al.*, 2005; Terasaka *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Blakeslee *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2007; Mravec *et al.*, 2008; Swarup *et al.*, 2008). Las proteínas transportadoras de auxinas, PINs, se localizan en la membrana plasmática con una determinada polaridad (Wisniewska *et al.*, 2006) y dirigen el flujo de auxinas (Petrasek *et al.*, 2006; Mravec *et al.*, 2009; Titapiwatanakun *et al.*, 2009). En *Arabidopsis thaliana* existen ocho miembros de la familia *PIN*, y sus mutantes muestran defectos en procesos típicamente regulados por las auxinas como tropismos, desarrollo embrionario, patrón del meristemo radicular, organogénesis y diferenciación del tejido vascular (Galweiler *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002; Friml *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Bliou *et al.*, 2005; Scarpella *et al.*, 2006). En el meristemo radicular, las proteínas PIN muestran una compleja distribución que establece la

polaridad celular (Blilou *et al.*, 2005) (Figura 19). La localización apical de PIN2, en la epidermis y en el lateral de la cofia, promueve el flujo basipétalo de auxinas hacia la zona de elongación, donde la acumulación de auxinas produce inhibición de la expansión celular y da lugar a la curvatura de la raíz (Young *et al.*, 1990; Luschign *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998; Ottenschlager *et al.*, 2003). Este transporte de auxinas hacia la base de la raíz, mediado por PIN2, es esencial para la regulación del tamaño del meristemo (Blilou *et al.*, 2005) y está implicado en la respuesta a los cambios de gravedad (Rashotte *et al.*, 2000).

La distribución polar de las PIN está regulada dinámicamente por continuas rondas de endocitosis y reciclaje de vesículas hacia el lado apropiado de la célula (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2001; Geldner *et al.*, 2003). El reciclaje de las PIN hacia y desde la membrana plasmática está mediado por proteínas de la familia ARF (*small G-proteins of the ADP-ribosylation factor*) (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2003). La aplicación de brefeldina A (BFA), toxina de origen fúngico que bloquea el tráfico de reciclaje desde endosoma hasta la membrana plasmática, inhibe la actividad de ciertas ARF-GEFs (*guanine-nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factor GTPases*), provocando una acumulación intracelular de las PIN en los llamados “cuerpos de brefeldina” (*brefeldin bodies*) (Geldner *et al.*, 2001) (Figura 21: E, E' y F). Sin embargo, la localización apical de PIN2 en células de la epidermis parece ser parcialmente resistente a los tratamientos de BFA (Geldner *et al.*, 2003; Kleine-Vehn *et al.*, 2008), lo que podría indicar que su reciclaje está regulado por ARF-GEFs insensibles a BFA.

Los niveles de auxinas coordinan la división y diferenciación celular. Durante la división celular, PIN2 es enviada a la placa celular (Figura 20). Se estima que cerca del 70% de la membrana de la placa celular se elimina durante el proceso de maduración de la placa celular para convertirse en pared celular (Otegui *et al.*, 2001). La extracción de la membrana por endocitosis es necesaria para establecer la identidad de la membrana de la placa celular como membrana plasmática y para restablecer la polaridad en la célula. Este proceso se realiza mediante la acumulación inicial de PIN2, en ambos lados de la placa celular durante las primeras fases de la formación de ésta y la endocitosis de PIN2 desde el lado basal de la célula una vez que la placa celular está construida (van Damme *et al.*, 2008). La extracción de PIN2 en un lado específico desde la base de la membrana plasmática hija, está controlada por la composición de esteroides de la membrana (Boutte *et al.*, 2006; Men *et al.*, 2008), lo que sugiere un papel de los esteroides en el establecimiento de la polaridad de PIN2 tras la citoquinesis.

La inhibición química de la biosíntesis de esfingolípidos produce una reducción de la tasa de endocitosis, y esto dificulta el establecimiento de la polaridad de PIN2 tras la citoquinesis, que a su vez, afecta a la distribución de auxinas en el ápice de la raíz tanto antes como después del estímulo de gravedad. Consecuentemente, el crecimiento de la raíz y la respuesta gravitropica se ven alterados (Pinoso, 2010).

Aunque los esteroides y esfingolípidos son los principales componentes de las balsas lipídicas (Zappel y Panstruga, 2008) y se ha descrito la presencia de PIN1 en ellas (Titapiwatanakun *et al.*, 2009), aún no se ha establecido un vínculo directo entre la regulación de la polaridad de PIN2 y estos microdominios lipídicos. Hasta la fecha, PIN2 no se ha podido

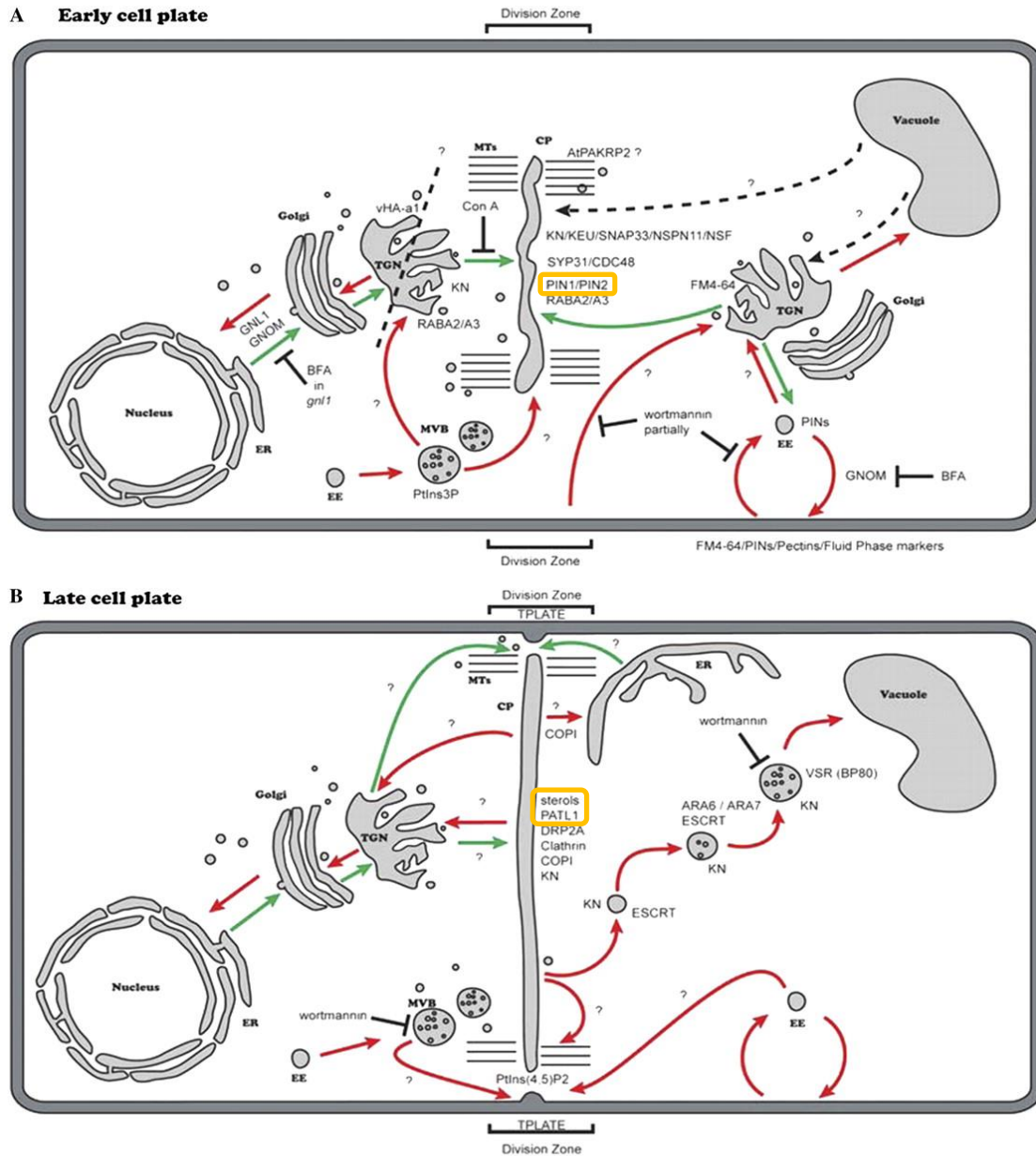


Figura 20: Tráfico de membranas durante el comienzo la formación de la placa celular (A) y su maduración (B).  
Fuente: van Damme *et al.*, 2008.

aislar de fracciones de membrana ricas en esteroles y esfingolípidos (Titapiwatanakun *et al.*, 2009; Pinosa, 2010), sin embargo, sí se ha descrito la agrupación de PIN2 en dominios de la membrana plasmática en células de la epidermis y el córtex de la raíz en *A. thaliana* (Pinosa, 2010).

Además de los esteroides y esfingolípidos, el metabolismo de los fosfolípidos de la membrana también está implicado en el tráfico de las PIN. La fosfolipasa A2 (PLA2) es una hidrolasa de fosfolípidos de membrana y su supresión interrumpe la localización de las PINs en la membrana plasmática, causando su internalización (Lee *et al.*, 2010). Aunque actualmente solo se especula el mecanismo por el que PLA2 regula el tráfico de las PIN, esta fosfolipasa, que se localiza en el Golgi, podría estar implicada en la modificación de los fosfolípidos de la membrana para el tráfico de vesículas transportadoras desde el Golgi hasta la membrana plasmática (Chen y Baluška, 2013).



Por otra parte, los brasinosteroides (BR) extienden el dominio de expresión de *PIN2* desde el meristemo radicular hasta la zona de elongación, aumentando así el gravitropismo de la raíz (Li *et al.*, 2005). Este efecto de los BR sobre el gravitropismo de la raíz podría ser logrado a través de la acción de ROP2, ya que los BR regulan la expresión y localización subcelular de ROP2, y ésta, modula la polaridad de *PIN2* a través de F-actina (Li *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2012).

En cuanto al papel de las auxinas en la respuesta a estrés abiótico, y más concretamente a estrés por temperaturas bajas, Morris (1979) inicialmente observó que la disminución de la temperatura afecta a la velocidad del transporte exógeno de auxinas. Posteriormente se demostró que el estrés por frío inhibe, de forma reversible, el gravitropismo de las inflorescencias en arabisopsis, el cual está regulado por auxinas (Fukaki *et al.*, 1996; Wyatt *et al.*, 2002; Nadella *et al.*, 2006). Durante el estrés por frío la planta conserva la capacidad de percibir la señal de gravedad, por lo que el estrés solo afecta al proceso de respuesta (Sack, 1991; Wyatt *et al.*, 2002; Rahman, 2013). Shibasaki *et al.* (2009) confirmaron que el estrés por frío bloquea la respuesta a la gravedad reversiblemente, afectando principalmente al transporte de auxinas, inhibiendo selectivamente el tráfico intracelular de los transportadores de auxinas, PINs. La reducción del reciclaje intracelular de *PIN2* y *PIN3*, debido al estrés por frío, afecta a su funcionalidad y da como resultado una reducción en el transporte basipétalo de auxinas y disminuye la capacidad de las raíces para establecer un gradiente de auxinas (Shibasaki *et al.*, 2009).

El estrés por frío afecta al transporte dinámico de reciclaje intracelular de *PIN2*, pero no a su localización polar. En condiciones normales de temperatura, se pueden observar numerosas pequeñas agrupaciones o cuerpos de *PIN2* (*PIN2 endosomal bodies*) en el citosol, ya que *PIN2* está continuamente siendo transportada entre la membrana plasmática y los compartimentos endosomales (Figura 21: A, A' y B). En las células sometidas a un tratamiento con frío, el reciclaje endosomal es suprimido y no se observan los cuerpos endosomales de *PIN2* (Figura

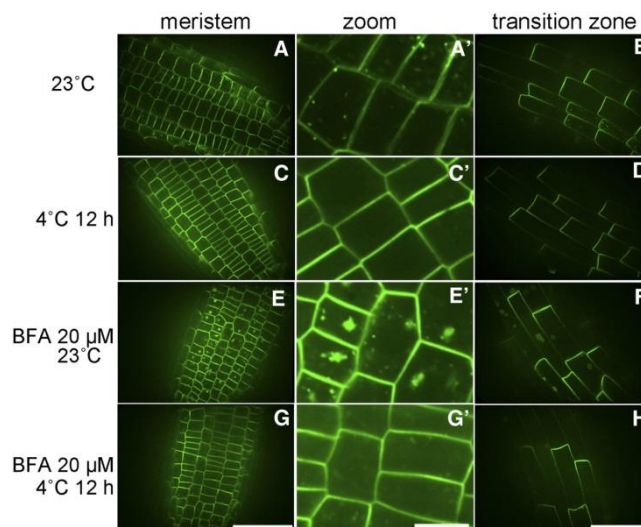


Figura 21: Tráfico intracelular de *PIN2* afectado por el estrés por frío. Fuente: Shibasaki *et al.*, 2009.

21: C, C' y D). No obstante, este efecto del frío sobre el transporte intracelular de PIN2 es transitorio, pudiendo restaurarse al volver a alcanzar un rango de temperaturas no estresantes (Shibasaki *et al.*, 2009).

## **OBJETIVOS**



## 2- OBJETIVOS

Esta tesis doctoral ha pretendido caracterizar el gen *CRIO4* de *Beta vulgaris*, enfocándose especialmente en su papel en estrés por frío. Para realizar este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Análisis *in silico* de la estructura proteica de CRIO4 e identificación de proteínas ortólogas en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*.
- Caracterización bioquímica de la proteína CRIO4 y evaluación de su actividad como transferasa de fosfolípidos.
- Análisis de la implicación de CRIO4 en la absorción de triptófano en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Estudio de la localización subcelular de la proteína CRIO4 mediante marcaje con la proteína fluorescente GFP y generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan de forma estable una fusión CRIO4:GFP.
- Determinación del patrón de expresión de *CRIO4* en *Beta vulgaris*.
- Análisis del fenotipo de sobreexpresión de *CRIO4* en *Saccharomyces cerevisiae* y, a partir de la generación de líneas transgénicas, también en *Arabidopsis thaliana*.
- Estudio del fenotipo de la disrupción del gen, a partir de líneas mutantes de genes ortólogos de *CRIO4* en *Arabidopsis thaliana*, *PATLs*, y generación de líneas mutantes dobles.
- Análisis de la implicación de CRIO4 en el transporte intracelular de auxinas en *Arabidopsis thaliana*.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1- Material biológico

##### 3.1.1- *Beta vulgaris*

Se utilizaron plantas de remolacha (*Beta vulgaris* cv. Dita) crecidas en invernadero bajo las condiciones que se especifican en el apartado 3.3.

##### 3.1.2- *Arabidopsis thaliana*

Como línea silvestre se empleó el ecotipo Columbia (Col-0), y las líneas transgénicas de *A. thaliana* generadas en este trabajo, así como las líneas con mutaciones en genes de la familia *PATELLIN* utilizados se describen a continuación.

#### Líneas Mutantes:

- *pat13*: Mutante de pérdida de función del locus At1g72160, de la colección Salk (The Salk Institute for Biological Studies). Se encuentra en el fondo genético Col-0 y fue obtenido por inserción de T-DNA. Código NASC (Nottigham *Arabidopsis* Stock Centre) N593-994. Proporciona tolerancia al antibiótico kanamicina.

- *pat15*: Se partió de cuatro líneas mutantes de pérdida de función del locus At4g09160:

- 199-G07: de la colección GABI-KAT del NASC. Se encuentra en el fondo genético Col-0 y fue obtenido por inserción de T-DNA. Proporciona tolerancia al antibiótico sulfadiazina.
- N503-134: de la colección Salk. Se encuentra en el fondo genético Col-0 y fue obtenido por inserción de T-DNA. Proporciona tolerancia al antibiótico kanamicina.
- N624-448: de la colección Salk. Se encuentra en el fondo genético Col-0 y fue obtenido por inserción de T-DNA. Proporciona tolerancia al antibiótico kanamicina.
- N62-446: de la colección Salk. Se encuentra en el fondo genético Col-0 y fue obtenido por inserción de T-DNA. Proporciona tolerancia al antibiótico kanamicina.

- *pat13pat15*: Doble mutante obtenido del cruce de las líneas N593-994 y 199-G07.

#### Líneas Transgénicas:

-CRIO4: línea de fondo genético Col-0 transformada con el plásmido pJM729-CRIO4 que contiene la fusión 35S::CRIO4, para la sobreexpresión del gen *BvCRIO4* y su análisis fenotípico.

-CRIO4-GFP: línea de fondo genético Col-0 transformada con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP que contiene la fusión 35S::CRIO4::GFP, para la sobreexpresión del gen *BvCRIO4* y su análisis mediante microscopía confocal.

-PIN2-GFP: Cedida por el Dr. Scheres (Xu y Scheres, 2005).

### 3.1.3- *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, es una enterobacteria empleada frecuentemente en experimentos de biología molecular. En este trabajo se ha utilizado la cepa DH5 $\alpha$  descrita a continuación:

**DH5 $\alpha$ :** (F'  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44* $\lambda$ -*thi-1 gyrA96 relA1*). Fue empleada de forma convencional, transformándola por choque térmico, como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos.

### 3.1.4- *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas se encuentran descritas a continuación:

**W303-1A:** *MATa can1-100 his3-11,15 leu2,3, 112 trp1-1 ura3-1 GAL<sup>+</sup>*. Cepa utilizada para la expresión de proteína recombinante y para análisis de coexpresión.

**CTY182:** *MATa ura3-52, his3-200, lys2-801, (SEC14)*. Cepa empleada en análisis de complementación.

**CTY1-1A:** *MATa, sec14-1, ura3-52, his3-200, lys2-801, (sec14-1<sup>ts</sup>)*. Cepa empleada en análisis de complementación.

### 3.1.5- *Agrobacterium tumefaciens*

Se empleó la cepa **GV3101::pMP90RK** tanto en la transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana* mediante infiltración foliar, como en la transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante infiltración floral para generar líneas transgénicas estables. Como su nombre indica, contiene el plásmido Ti desarmado pMP90RK (pTiC58  $\Delta$ T-DNA) (Gent<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup>) (Hellens *et al.*, 2000).

### 3.1.6- *Nicotiana benthamiana*

*Nicotiana benthamiana*, es una planta herbácea, muy similar al tabaco, empleada en investigación para estudios genéticos. Utilizada en el pasado como estimulante antes de la introducción y comercialización del tabaco, en este trabajo se ha utilizado como herramienta para la expresión transitoria de fusiones proteicas con el objetivo de identificar posibles localizaciones subcelulares.

### 3.1.7- Vectores de clonación y transformación

**pBluescriptSK(+):** plásmido multicopia empleado como vector convencional de clonación. Posee un sitio de clonación múltiple (MCS), el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el fragmento *lazZ $\alpha$*  para confirmar por complementación la presencia del inserto en el sitio de clonación.

**pYPGE15:** Plásmido multicopia usado para el análisis de complementación. Contiene la región promotora del gen *PGK* y la región terminadora del gen *CYC1*. Además posee un sitio múltiple de clonación (*polylinker*), el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *URA3* de levadura (Brunelli y Pall, 1993).

**pYPGE15-CRIO4:** plásmido pYPGE15 que contiene la secuencia codificante del gen *BvCRIO4*, clonada entre los sitios *EcoRI* y *XhoI* del *polylinker*.

**pYPGE15-SEC14(CRIO4):** plásmido pYPGE15 que contiene la secuencia que codifica el dominio Sec14 de la proteína codificada por el gen *BvCRIO4*, clonada entre los sitios *BamHI* y *XhoI* del *polylinker*.

**pYEplac195-SEC14:** Plásmido multicopia usado para el análisis de complementación. Contiene el gen *SEC14* de levadura, el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *URA3* de levadura. Cedido por el Dr. Bankaitis (Schnabl *et al.*, 2003).

**pCM259:** Plásmido multicopia utilizado para la expresión y aislamiento de proteína recombinante en *S. cerevisiae*, derivado del plásmido pCM190 (Gari *et al.*, 1997). Contiene un MCS que permite clonar un gen en pauta de lectura con 6 histidinas y 3 copias del epítipo HA bajo el control de un promotor regulable por tetraciclina (*tetO-CYC1*). Además presenta el gen bacteriano de resistencia a ampicilina y el gen *URA3* de levadura.

**pCM259-CRIO4:** Plásmido pCM259 que contiene la secuencia codificante del gen *BvCRIO4*, clonado en el sitio *PmeI*.

**pJM729:** Derivado de pXCS-HAStrep (Witte *et al.*, 2004), un vector binario utilizado para la transformación de plantas mediante *A. tumefaciens*. Además de los bordes del T-DNA contiene el gen *pat* (que confiere resistencia al glufosinato), el gen de resistencia bacteriana a los antibióticos ampicilina y carbenicilina, los epítipos HA y StrepII, y el promotor 35S y el terminador pA35S flanqueando un sitio de clonación múltiple (MCS). Se añadió al plásmido original un fragmento de 1000 bp en el interior del MCS que introduce nuevos sitios de corte y facilita los distintos pasos de clonación.

**pJM743:** derivado de pJM729 e igual a éste salvo por contener la secuencia que codifica la proteína sGFP fusionada al terminador *NOS*, entre los sitios *BamHI* y *EcoRI*.

**pJM729-CRIO4:** Plásmido derivado de pJM729 que contiene la secuencia codificante del gen *BvCRIO4* incorporando un codón de parada, clonada en el sitio *BamHI* y dando como resultado una fusión 35S::GRIO4.

**pJM729-CRIO4::GFP:** Plásmido derivado de pJM743 que contiene la secuencia codificante del gen *BvCRIO4*, clonada entre los sitios *HindIII* y *BamHI* y dando como resultado una fusión 35S::GRIO4::GFP.

**p19:** plásmido inhibidor del silenciamiento usado para transformar plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

**pKU76:** de Umebayashi y Nakano (2003), derivado de pYCplac33 (Gietz y Sugino, 1988). Plásmido centromérico que contiene una fusión del gen *TAT2* de levadura a *GFP*. Además contiene el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina, el gen *URA3* de levadura y un sitio de clonación múltiple (MCS).

**Lynne116:** Plásmido pYCplac111 cedido por la Dra. Yenush (IBMCP). Plásmido centromérico que contiene el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina, el gen *LEU2* de levadura y un sitio de clonación múltiple (MCS).

**pYCplac111-TAT2::GFP:** Derivado de Lynne116 que contiene la fusión TAT2::GFP clonada entre los sitios *PstI* y *EcoRI* del MCS. Contiene además, el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *LEU2* de levadura.

### 3.2- Medios de cultivo

Todos los medios de crecimiento utilizados en cultivo *in vitro* se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión. Las sustancias termolábiles empleadas en la preparación de algunos medios fueron añadidas al medio de cultivo ya estéril y enfriado por debajo de los 50°C.

#### 3.2.1- Medios para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

**Medio MS (Murashige-Skoog):** Es el medio utilizado habitualmente para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*. Está compuesto por sacarosa al 1% (m/v), sales MS (Sigma-Aldrich) al 0,4% (m/v) y 10 mM de MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico). Para los casos en los que se preparó medio sólido se añadió agar al 0,8% (m/v). El pH se ajustó a 5.7 con Tris base.

#### 3.2.2- Medios para el crecimiento de bacterias

**Medio LB (Luria Bertani):** Medio empleado para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Está compuesto por triptona al 1% (m/v), extracto de levadura al 0.5% (m/v) y NaCl al 1% (m/v). El pH fue ajustado a 7 con NaOH. Para preparar medio sólido se añadió agar al 2% (m/v).

**Medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression):** Medio de cultivo empleado para el crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Se usa principalmente después de transformaciones mediante choque térmico o electroporación, ya que al ser un medio más rico que el LB, produce mayor número de unidades formadoras de colonias. Está compuesto por triptona (2% m/v), extracto de levadura (0,5% m/v), cloruro de sodio (10 mM), cloruro de potasio (2,5 mM) y cloruro de magnesio (10 mM). Una vez autoclavado, se agrega una solución estéril de glucosa (20 mM). El medio se ajusta a pH 7.

**Medio SOB (Super Optimal Broth):** Medio de cultivo empleado en el crecimiento de *E. coli* para la preparación de células quimio-competentes. Su composición; triptona (2% m/v), extracto de levadura (0,5% m/v), cloruro de sodio (10 mM), cloruro de potasio (2,5 mM) y cloruro de magnesio (10 mM), es igual a la del medio SOC (apartado anterior), pero sin la adición de glucosa. El medio se ajusta a pH 7.

### 3.2.3- Medios para el crecimiento de levadura

**Medio YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adenine):** Se trata de medio de cultivo rico y está compuesto por glucosa (2% m/v), extracto de levadura (1% m/v), peptona (2% m/v). Una vez autoclavado, se agregó una solución estéril de adenina (30 µg/mL). Cuando es necesario como medio sólido, se añade agar bacteriológico (2% m/v).

**Medio mínimo SD (Synthetic Dextrose):** Está compuesto por glucosa (2% m/v), YNB (Yeast Nitrogen Base, al 0,7% m/v), ácido succínico (50 mM), pH 5,5 ajustado con Tris. Cuando es necesario como medio sólido, se añade agar bacteriológico (2% m/v). Según las necesidades de cada experimento en base a las cepas empleadas y los plásmidos que contienen, se añaden aminoácidos y bases púricas o pirimidínicas al medio en las siguientes concentraciones: adenina (30 µg/mL), triptófano (100 µg/mL), histidina (30 µg/mL), lisina (100 µg/mL), leucina (100 µg/mL), uracilo (30 µg/mL).

**Medio mínimo completo SCD:** Es el medio mínimo complementado con vitaminas y aminoácidos en las siguientes concentraciones: 20 mg/L arginina, 20 mg/L lisina, 20 mg/L metionina, 30 mg/L isoleucina, 30 mg/L serina, 30 mg/L treonina, 30 mg/L tirosina, 30 mg/L valina, 50 mg/L fenilalanina 85 mg/L inositol y 90 mg/L ácido p-aminobenzóico. Cuando es necesario como medio sólido, se añade agar bacteriológico (2% m/v).

### 3.2.4- Sustancias termolábiles de selección

Cuando es necesario, los diferentes medios de cultivo se suplementan con diferentes antibióticos, una vez el medio ha sido esterilizado y enfriado por debajo de 50°C. Se preparan soluciones concentradas de cada antibiótico siguiendo las siguientes indicaciones:

- Ampicilina: Se prepara una solución concentrada de 100 mg/mL en agua *MilliQ*, se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C. Se utiliza a una concentración final de 50 o 100 µg/mL.
- Doxiciclina: Se disuelve en una mezcla de etanol absoluto y agua *MilliQ* estéril al 50% y se prepara una solución concentrada de 5 mg/mL. Se añade al medio a una concentración final de 20 µg/mL.
- Kanamicina: Se prepara una solución concentrada de 50 mg/mL en agua *MilliQ*, se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C. Se utiliza a una concentración final de 25 o 50 µg/mL.
- Rifampicina: Se prepara una solución concentrada de 50 mg/mL en agua *MilliQ*, añadiendo una solución de NaOH 2N, gota a gota, para su completa disolución. La solución se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C. Se utiliza a una concentración final de 50 µg/mL.
- Sulfadiacina: Se prepara una solución concentrada de 7,5 mg/mL en agua *MilliQ*, se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C. Se utiliza a una concentración final de 5,25 µg/mL.
- Glufosinato-BASTA. Herbicida empleado en la selección de plantas modificadas genéticamente. Se prepara una solución concentrada de 25 mg/mL, y se utiliza a una concentración final de 25 mg/L.

### 3.3- Manipulación y crecimiento de *Beta vulgaris*

Las plantas se crecen en invernadero en una mezcla 1:1 de arena y vermiculita exfoliada (Asfaltex), con fotoperiodo de día largo, a 25°C y con las mismas condiciones de riego que las descritas para *Arabidopsis thaliana* en el apartado 3.4.3-Condiciones de cultivo en invernadero.

### 3.4- Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

#### 3.4.1- Esterilización de semillas

Las semillas se trataron en primer lugar con una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 al 0,1% (v/v) en agitación durante 25 minutos. Después se eliminó el etanol, se añadió una solución de lejía al 2,5% (v/v) y Tritón X-100 al 0,05% (v/v), y se mantuvo en agitación las semillas con la solución durante 9 minutos. A continuación se eliminó la lejía y se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se mantuvieron en agua estéril a 4°C y en oscuridad durante 2 días, para que tuviera lugar la estratificación.

#### 3.4.2- Condiciones de cultivo in vitro

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* en medio sólido se puede realizar tanto en posición horizontal, como en posición vertical. Para el cultivo en horizontal, se emplean placas petri de 9 cm de diámetro con 25 mL de medio MS cada una. Para el cultivo en vertical, se emplean placas petri cuadradas, de 12x12 cm con 75 mL de medio MS cada una. En ambos casos, las placas se sellan con cinta porosa (Micropore) y se incuban en una cámara con condiciones controladas de 24°C de temperatura, fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) y una intensidad de luz de  $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En algunos ensayos la incubación se llevó a cabo en una cámara con una temperatura de 10°C.

#### 3.4.3- Condiciones de cultivo en invernadero

Las plantas de *A. thaliana* se crecen en una mezcla 2:1 de turba (Biolan): vermiculita exfoliada (Asfaltex). Las macetas se colocan en bandejas que se irrigan 2 veces por semana. Las condiciones de crecimiento en el invernadero son de día largo, 23°C de temperatura, 70% de humedad relativa y una intensidad de luz aproximada de  $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Para el riego de las plantas se ha empleado una solución nutritiva compuesta por los siguientes macro y micronutrientes: 4 mM  $\text{KNO}_3$ , 4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1,5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,035% (m/v) EDTA- $\text{FeSO}_4$ , 70  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 14  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0,2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$  y 0,01  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . El pH de la solución es 6,5.

### 3.4.4- Fertilización cruzada para obtención de dobles mutantes

Para obtener la línea doble mutante *pat3pat5* se cruzaron las líneas mutantes *pat3* (mutante de pérdida de función del locus At1g72160) y *pat5* (mutante de pérdida de función del locus At4g09160) mediante polinización manual de flores emasculadas. Inmediatamente antes del estadio de antesis, a las flores de las plantas que actuaron como parental femenino se les retiraron sépalos, pétalos y estambres con ayuda de unas pinzas y una lupa. Posteriormente, se pusieron en contacto las anteras maduras del parental masculino con el pistilo de la planta receptora. Las silicuas maduras resultantes de estos cruces se recogieron una vez las valvas empezaron a abrirse.

Las semillas resultantes constituyeron la generación  $F_1$ , siendo todas heterocigotas para los dos loci mutantes de las plantas parentales. La  $F_1$  se sembró en medio selectivo y se recogieron sus semillas (generación  $F_2$ ). Debido a la segregación genética, en la  $F_2$  se encuentran todos los genotipos, de modo que aquellas líneas cuyas semillas muestran una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) para el compuesto selectivo se analizaron mediante PCR para confirmar dobles mutantes homocigotos.

### 3.4.5- Transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens*

Se emplean de 5 a 8 plantas por maceta de 12 cm de diámetro, cultivadas en invernadero. Cuando cada individuo posee una inflorescencia primaria de alrededor de 10 centímetros de longitud, se corta el ápice de ésta para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. Unos 7 o 10 días después se realiza la transformación de las plantas según el método publicado por Bent (2000).

Inicialmente se agrega 1 mL de cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector de interés, a 200 mL de medio LB con los antibióticos apropiados, y se incuba en agitación a 28°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 15 minutos, y se resuspenden en 400 mL de solución de transformación compuesta por sacarosa 5% (m/v), cloruro de magnesio 10 mM, MES 1 g/L y el detergente Silwet L-77 al 0,02% (v/v) (Lehle Seeds).

La solución de transformación se coloca en un recipiente donde se introduce la parte aérea de las plantas durante 1 minuto. Luego, se cubren las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación. Después de 2 días de cocultivo, se retiran las bolsas y se mantienen las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas  $T_1$ .

#### 3.4.5.1- Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos

Las plantas empleadas en la transformación se denominan plantas  $T_0$ . La población de semillas transgénicas  $T_1$  obtenida, se esterilizan y siembran en medio de cultivo MS sólido

suplementado con el compuesto de selección BASTA. Tras 7-10 días, las plántulas transformantes ( $T_1$ ) resistentes se trasplantan a tierra para obtener la generación  $T_2$ . Las semillas  $T_2$  se siembran de nuevo en medio MS sólido suplementado con BASTA para observar la segregación de la línea. Las plántulas de las líneas transgénicas cuyas semillas muestran una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) para el compuesto selectivo, se trasplantan a tierra para obtener la generación  $T_3$ . Se espera una segregación 3:1 cuando existe una sola integración del transgén en el genoma. Finalmente, las semillas  $T_3$  se siembran en medio MS sólido suplementado con BASTA para identificar los individuos homocigotos.

### **3.4.6- Análisis fenotípicos**

#### **3.4.6.1- Ensayo de germinación**

Este ensayo permite determinar la respuesta de la planta en los primeros estadios de desarrollo. Para ello, las semillas se siembran en medio sólido y se observa el porcentaje de plántulas con cotiledones expandidos y verdes a los 7 días (24°C) o a las 4 semanas (10°C). Se realizan tres repeticiones en cada condición, y se calcula la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas.

#### **3.4.6.2- Medida de longitud de raíces**

Se sembraron en placa Petri 20 semillas de cada línea. A los tres días, las plántulas se trasladaron a placas cuadradas, colocándolas todas sobre una misma línea, y con la raíz sobre la superficie del medio sólido. Las placas se colocaron verticalmente (de manera que las raíces continuaran creciendo sobre la superficie del medio) y se incubaron durante 7 días a 24°C y durante 23 días a 10°C. Las placas se escanearon y se midió la longitud de la raíz principal con el programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004).

#### **3.4.6.3- Medida de área de cotiledones**

Gracias a las fotografías tomadas durante el ensayo de germinación, se miden las áreas de todos los cotiledones presentes con ayuda del programa ImageJ-Fiji. Y se calcula el área media de los cotiledones, para cada una de las líneas analizadas.

#### **3.4.6.4- Medida de área de semillas**

De la misma forma que para en el apartado anterior, se realizan fotografías de semillas y se miden las áreas de todas las semillas presentes con ayuda del programa ImageJ-Fiji. Y se calcula el área media de las semillas, para cada una de las líneas analizadas.



#### **3.4.6.5- Medida de longitud de tallos**

Para la determinación de la longitud del tallo, plántulas de 7 días germinadas en placa fueron traspasadas a tierra en cestillos individuales, y se mantuvieron en invernadero hasta el estadio de roseta. A partir de este punto, las plantas se dejaron crecer durante 5-6 semanas en condiciones de invernadero, o bien a 10°C de temperatura, antes de tomar la medida del tallo principal de cada planta. Se realizaron tres repeticiones en cada condición, y se calculó la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas.

#### **3.4.6.6- Ensayo de número de ramificaciones**

En este ensayo se procedió de la misma forma que en el apartado anterior para la medida de longitud de tallos, para finalmente cuantificar el número de ramificaciones que contenía cada planta. Se realizaron tres repeticiones en cada condición, y se calculó la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas

#### **3.4.6.7- Ensayo de número de hojas de roseta**

Plántulas de 7 días germinadas en placa fueron traspasadas a tierra en cestillos individuales, y se cultivaron en condiciones de invernadero hasta el estadio de roseta. Durante su desarrollo hasta la completa formación de la roseta, se cuantificó el número de hojas cada 2-3 días. Se realizaron tres repeticiones para cada línea, y se calculó la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas.

#### **3.4.6.8- Ensayo de número de silicuas**

En este ensayo, plántulas de 7 días germinadas en placa fueron traspasadas a tierra en cestillos individuales, y se mantuvieron en invernadero hasta el estadio de roseta. A partir de este punto, las plantas se dejaron crecer durante 4 semanas en condiciones de invernadero, para posteriormente cuantificar el número de silicuas formadas en el tallo principal de cada planta. Se realizaron tres repeticiones para cada línea, y se calculó la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas.

#### **3.4.6.9- Ensayo de estadio de desarrollo**

Para la determinación del estadio de desarrollo, plántulas de 7 días germinadas en placa fueron traspasadas a tierra en cestillos individuales, y se mantuvieron en invernadero hasta el estadio de roseta. A partir de este punto, las plantas se dejaron crecer en condiciones de invernadero, o bien a 10 °C de temperatura. Se estimaron 5 estadios de desarrollo diferentes: roseta, emergencia de escape floral, establecimiento de inflorescencias, inflorescencias

maduras y primeras silicuas. Se realizaron 2 anotaciones diferentes del estadio de desarrollo para cada condición de crecimiento: a 24°C las anotaciones se realizaron en los días 19 y 24 de cultivo en tierra; a 10°C las anotaciones se realizaron en los días 31 y 38 de cultivo en tierra.

### **3.5- Manipulación y crecimiento de *Escherichia coli***

Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido, se utilizan tubos estériles de polipropileno de 15 o 50 mL, o matraces de erlenmeyer estériles de diferentes tamaños, que se colocan en un incubador orbital a 37°C con una velocidad de agitación de entre 200 y 250 rpm. Para el crecimiento en medio sólido, de forma rutinaria, se emplean placas petri de 9 cm de diámetro con 25 mL de medio LB, y se colocan invertidas en una estufa a 37°C.

#### **3.5.1- Preparación de células competentes**

Se añaden 400 µL de un cultivo saturado de *E. coli* (cepa DH5α) a 200 mL de medio SOB y se incuba a temperatura ambiente hasta alcanzar una absorbancia ( $A_{\lambda=660}$ ) de 0,5-0,7. Se recogen las células por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 5 minutos, y se resuspenden en 10 mL de TB (*Transformation Buffer*) frío (0,48% m/v Pipes, 16 mM CaCl<sub>2</sub>, 170 mM KCl, 40 mM MnCl<sub>2</sub>, ajustar a pH 6,7). Tras una incubación de 10 minutos en hielo, se realiza otra centrifugación en frío de 5 min a 5000 rpm. Finalmente, las células se resuspenden en 10 mL de TB frío y se agregan 750 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubar de nuevo 10 minutos en hielo, se distribuyen las células en alícuotas de 100 µL que se guardan a -80°C.

#### **3.5.2- Transformación de células competentes**

Se añade el plásmido, o mezcla de ligamiento, a una alícuota de células competentes y se coloca 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se realiza un choque térmico de 1 minuto a 42°C, e inmediatamente se coloca en hielo durante 2 minutos. A continuación, se agregan 900 µL de medio LB y se incuba 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, se extienden 150 µL en una placa de LB con el antibiótico adecuado, según el plásmido empleado.

### **3.6- Manipulación y crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae***

Las células de levadura se cultivaron y manipularon según métodos estándar (Guthrie y Fink, 1991) a 28°C en agitación (180-200 rpm).

### **3.6.1- Preparación de células competentes para choque térmico**

A partir de 1 mL de cultivo saturado de células crecido toda la noche en medio SD líquido (suplementado con los aminoácidos correspondientes a la auxotrofia de cada cepa), se inoculan 200 mL de medio SD líquido (con 800  $\mu$ L de un precultivo saturado, diluyendo el inóculo 250 veces) y se incuban a 28°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> (densidad óptica a 600 nanómetros) menor de 0,6-0,8. Se realizan varias centrifugaciones sucesivas de 5 minutos a 2000 rpm, hasta tener recogidos los 200 mL de células en un tubo de 50 mL. Se lavan las células con 5 mL de tampón Li-TE (Acetato de litio 100 mM, Tris pH 7,5 10 mM y EDTA 0,4 mM), y se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones. Se resuspenden nuevamente en 1 mL de tampón Li-TE, incubándolas durante 30 minutos a 28°C, añadiendo posteriormente 100  $\mu$ L de ssDNA 1% (ADN de esperma de salmón), y repartiendo las células en alícuotas de 50  $\mu$ L cada una. Se procede inmediatamente con la transformación de alta eficiencia, o si se desean conservar a -80°C, se mezcla el contenido de cada tubo con 12  $\mu$ L de glicerol 80%, y se introducen directamente en el congelador hasta su uso.

### **3.6.2- Transformación de células competentes por el método de alta eficiencia**

Se añaden entre 5 y 10  $\mu$ L de ADN plasmídico a 50  $\mu$ L de células competentes. Si las células estaban almacenadas a -80°C, se dejan 10 minutos en hielo antes de añadir el plásmido. Se agregan 600  $\mu$ L del tampón PEG-LiTE (PEG 4000 40% m/v, acetato de litio 100 mM, Tris pH 7,5, 10 mM y EDTA 0,4 mM). Esta solución debe prepararse justo antes de proceder con la transformación. Se incuba la mezcla durante 30 minutos a 28°C, y posteriormente se somete a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugan brevemente las células, retirando 500  $\mu$ L del sobrenadante, y resuspendiendo el precipitado celular en el volumen restante, extendiéndolo en medio sólido selectivo con la ayuda de perlas de vidrio.

### **3.6.3- Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos)**

Para los ensayos de crecimiento en medio sólido se realizaron diluciones decimales seriadas (1/10, 1/100, 1/1000) de cultivos líquidos de las cepas de interés, y se transfirieron aproximadamente 3  $\mu$ L de cada dilución con la ayuda de un replicador a placas de medio sólido con las condiciones diferenciales a estudiar. Posteriormente se incubaron las placas a 28°C durante 3-5 días en posición invertida. En el análisis del crecimiento se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de las colonias.

### **3.7- Manipulación y crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens***

Para el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizan tubos o matraces estériles que se colocan en un incubador orbital a 28°C, con una velocidad de agitación de entre 200 y 250 rpm. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se colocan invertidas en una estufa a 28°C.

#### **3.7.1- Preparación de células competentes**

Se genera un cultivo saturado de *A. tumefaciens* de 10 mL de LB con ampicilina. Se inoculan 100 mL de medio LB sin antibiótico con 1 mL de cultivo saturado, y se incuba a 28°C durante una noche. Las células de este cultivo se recogen por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 15 minutos y se lavan 2 veces con agua estéril fría. Finalmente se resuspenden las células en 4 mL de glicerol frío al 10% (v/v) y se dividen en alícuotas de 0,2 mL que se guardan a -80°C.

#### **3.7.2- Transformación mediante electroporación**

Se agrega el plásmido a transformar a una alícuota de células competentes y la mezcla se coloca en una cubeta de electroporación, previamente enfriada, de 0,2 cm de separación entre electrodos. La electroporación se realiza utilizando el aparato Gene Pulser (Bio-Rad) a 1 k $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 2 kV. Tras la electroporación, se agregan 0,9 mL de medio SOC y se incuba durante 2-3 horas a 28°C en agitación. Finalmente se extienden las células en una placa de LB con el antibiótico de selección.

### **3.8- Manipulación y crecimiento de *Nicotiana benthamiana***

#### **3.8.1- Cultivo en invernadero**

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivan en unas condiciones similares a las de *Arabidopsis thaliana*. En este caso, debido al porte de la planta se utilizan macetas redondas de 12 cm de diámetro, y la solución nutritiva empleada en el riego fue la misma que la descrita para *arabidopsis*.

#### **3.8.2- Transformación transitoria en *Nicotiana benthamiana***

En este método se emplean plantas de aproximadamente 20 días de edad, y se transforman con una mezcla de 2 tipos de *A. tumefaciens*, uno con la construcción de interés, y otro con la construcción que codifica la proteína p19, que inhibe el silenciamiento génico en *N. benthamiana*. Inicialmente, para cada tipo de *A. tumefaciens* se agrega 1 mL de cultivo

saturado a 100 mL de medio LB con los antibióticos apropiados, y se incubó en agitación a 28°C durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, las células se recogen por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 15 minutos, y se resuspenden en el volumen necesario de solución de infiltración (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES y acetosiringona 200 µM, a pH 5,6) para obtener una solución con una OD<sub>600</sub> de 1, y se incuban a 28°C con agitación durante 3-4 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, mezclamos 5 mL de cada cultivo de *Agrobacterium*, portando la construcción con el gen de interés y la construcción que expresa la proteína 19.

Por último, con ayuda de una jeringuilla de 2 mL, tomamos la mezcla de las distintas líneas de *A. tumefaciens*, y presionando sobre el envés de la hoja y apretando el émbolo, introducimos la solución bacteriana en los espacios intercelulares del mesófilo esponjoso de la hoja de *N. benthamiana* a través de los estomas. Entre 3 y 5 días después de la infiltración, podremos observar estas hojas en el microscopio de fluorescencia.

### **3.8.3- Obtención de protoplastos a partir de hojas de *Nicotiana benthamiana***

Las células vegetales sin pared celular o protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo propuesto por Martínez *et al.* (2011). Hojas de plantas de *N. benthamiana* se cortaron cuidadosamente en tiras de 0,5-1 mm de ancho con un bisturí y se desecharon las nervaduras. Los limbos resultantes se incubaron un mínimo de 3 horas a 22-25°C en oscuridad en una solución de digestión de paredes celulares (1-1,5% de celulasa RS, 0,2-0,4% de macerozima R10, 0,4 M de manitol). Tras el tiempo de incubación, la solución se agitó suavemente para favorecer la liberación de los protoplastos y se filtró cuidadosamente con un filtro de nylon de 35-75 µm de diámetro. La suspensión de protoplastos se centrifugó a 100g durante 1 minuto. El precipitado resultante se lavó con tampón W5 (2 mM MES, pH 5,7, suplementado con 154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub> y 5 mM KCl.), y tras una segunda centrifugación en las mismas condiciones se resuspendió en 500 µL de tampón W5. Se incubó la solución resultante en hielo durante 30 minutos. Finalmente se centrifugó la suspensión de protoplastos a 100g durante 1 minuto, y se resuspendió el precipitado en un tampón MMg (4 mM MES, pH 5,7, suplementado con 0,4 M manitol y 15 mM MgCl<sub>2</sub>).

### **3.8.4- Transfección de protoplastos de *Nicotiana benthamiana***

En un tubo de 1,5 mL se añade 10 µL del ADN plasmídico (3 µg/µL) de interés y 100 µL de protoplastos (1x10<sup>6</sup> protoplastos/mL), y se mezcla cuidadosamente. Se añade 100 µL de tampón PEG/Ca (40% PEG4000, 0,2 M Manitol, 125 mM CaCl<sub>2</sub>) y tras mezclar suavemente, se incubó a temperatura ambiente durante 60 segundos. Seguidamente se diluye la mezcla con 500 µL de tampón W5. Se centrifuga a 100g durante 1 minuto, y el precipitado se lava con 1 mL de tampón W5. Finalmente se incuban los protoplastos en tampón W5 a 25°C hasta su análisis mediante microscopía confocal.

### **3.9- Purificación, manipulación y análisis de ácidos nucleicos**

#### **3.9.1- Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli***

Se centrifugan de 1,5 a 3 mL de cultivo saturado crecido en LB durante toda la noche, a 14000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado celular se resuspende en 200  $\mu$ L de tampón GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8 25 mM, EDTA pH 8 10 mM), mediante pipeteo. Se añaden 300  $\mu$ L de tampón de lisis (NaOH 0,2 N y SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añaden 300  $\mu$ L de tampón KOAc 3 M, pH 4,8 (también puede ser NaOAc pH 4,8), y se procede de igual forma que en el paso anterior. A continuación, se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se recupera el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo. Es muy importante en este paso no arrastrar restos celulares. Se agregó 900  $\mu$ L de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Tras la incubación, se centrifugó 20 minutos a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua *MiliQ* estéril.

En caso de que sea necesario secuenciar el plásmido aislado, se realiza previamente un tratamiento con ARNasa y fenol:cloroformo:isoamílico (PCI) en proporción 25:24:1, del siguiente modo: Se añade agua estéril hasta un volumen final de 100  $\mu$ L, y se agrega 1,5  $\mu$ L ARNasa 1% (m/v). La mezcla se incuba a 37°C durante 40 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añaden 100  $\mu$ L de PCI, se mezcla y se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos. Después se toma la fase acuosa superior, se coloca en un tubo nuevo, se añade el doble de volumen de etanol acetato sódico (1 mL acetato sódico 3 M en 20 mL de etanol absoluto: EtAcNa) y se incuba a -20°C un mínimo de 2 horas. Finalmente, se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos, se lava el precipitado con etanol 70%, se deja secar el precipitado para eliminar el etanol y se resuspende en 15  $\mu$ L de agua *MiliQ* estéril.

#### **3.9.2- Aislamiento de ADN plasmídico de *S. cerevisiae***

Se crecen 5 mL de cultivo de levadura hasta saturación, en el medio selectivo para el plásmido de interés (aproximadamente 24 horas). Se recogen las células en un microtubo de 1,5 mL centrifugando a 14 000rpm durante 1 minuto y repitiendo tantas veces sea necesario hasta completar con la totalidad del cultivo. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspende el precipitado celular en 200  $\mu$ L de tampón de lisis (TE 1X, 0,1 M NaCl, 2% Triton x100 y 1% SDS), 200  $\mu$ L de PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico) y 200  $\mu$ g de bolas de diámetro 0,5 mm. Se incuba a temperatura ambiente con agitación durante 5 minutos. Se añaden 200  $\mu$ L de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) y se incuba en el agitador durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto, se toma la fase superior y se pasa a un microtubo nuevo. Para precipitar el ADN se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto y se incuba a -80°C durante 1 hora. Después se centrifuga a 14000 rpm durante 10

minutos, el precipitado se lava dos veces con etanol 70% y se deja secar. Finalmente, el ADN se resuspende en 10  $\mu$ L de TE1X y se utiliza para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* mediante choque térmico.

### 3.9.3- Aislamiento de ADN genómico de *A. thaliana*

Se ha empleado una adaptación del método del CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) descrito por McKinney *et al.* (1995). Aproximadamente un gramo de tejido vegetal se homogeneiza en mortero usando nitrógeno líquido. Este homogeneizado se coloca en un tubo falcon de 10 mL, se le añaden 2 mL de tampón de extracción CTAB 2% (2% m/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 1% m/v PVP Mr 40000) y se incuba a 60°C durante 15 minutos. A continuación se agregan 2 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla mediante agitación en vórtex y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos. Se toma la fase acuosa superior, se añaden 0,1 volúmenes de una solución de CTAB 10% m/v y NaCl 0,7M, y se calienta a 60°C durante 2 minutos.

A continuación, se añaden dos volúmenes de agua *MilliQ* estéril fría para inducir la precipitación del complejo CTAB/ADN. Los tubos se incuban en hielo durante 3 horas y se recoge el precipitado mediante centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 0,4 mL de una solución de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8) y NaCl 1M, se añaden 0,8 mL de etanol absoluto frío para inducir la precipitación del ADN y se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el ADN precipitado se lava dos veces con etanol 70% (agregando 1 mL de esta solución, centrifugar y eliminar el sobrenadante), y el precipitado final se resuspende en 20  $\mu$ L de agua *MilliQ* estéril.

### 3.9.4- Aislamiento de ADN genómico de *B. vulgaris*

Se procede de la misma manera que en el aislamiento de ADN genómico de *A. thaliana*, utilizando una adaptación del método del CTAB descrito en el apartado anterior.

### 3.9.5- Tratamiento de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizan en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizan de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

### 3.9.6- Reacciones de ligación de ADN

Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando 0.05 U/ $\mu$ L de T4 ADN ligasa. En los ensayos de clonación para la creación de plásmidos recombinantes, se utilizó una relación molar inserto:vector de entre 5:1 y 10:1. Para la ligación de fragmentos de extremos romos el ADN se

incubó con la ligasa 16 horas a 22°C, y para la ligación de extremos cohesivos la incubación fue de 16 horas a 16 °C. Acto seguido, se transforma el producto de la ligación en células competentes de *E. coli*.

### **3.9.7- Electroforesis de ADN**

Para comprobar la integridad y concentración del ADN plasmídico, ADN genómico y de los productos de la PCR, se emplean geles de diferente porcentaje de agarosa (m/v), principalmente entre 0,7 y 1,5%, fundida en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM TrisBase, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contienen 0,05% (m/v) de bromuro de etidio. La visualización del ADN se realiza iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda.

Como tampones de carga se utilizan: Tampón 6X naranja (50% v/v glicerol, 60 mM Tris-HCl pH 8, 6 mM EDTA y 0,35% m/v Orange G) y tampón 6X azul (40% m/v sacarosa, 0,1 M EDTA y 0,25% m/v azul de bromofenol). Como marcadores de tamaño y peso molecular se utilizan los patrones comerciales 1Kb y  $\lambda$ HindIII.

### **3.9.8- Purificación de fragmentos de ADN**

Para la purificación de ADN de PCR o digestiones, se separó el fragmento de interés por electroforesis en geles de agarosa 0.7% o 1% (según su tamaño) fundida en tampón TBE (descrito en el apartado anterior), con bromuro de etidio al 0.001% y guanosina 0.2 mM (Gründemann y Schönig, 1996) para proteger el ADN de posibles roturas y mutaciones causadas por la luz UV durante la visualización. Utilizando un transiluminador UV se cortó el bloque de gel que contenía el fragmento de interés. El ADN se extrajo del gel y se purificó según las instrucciones del kit *GENEJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas).

### **3.9.9- Aislamiento de ARN de *A. thaliana***

Se homogeneiza con mortero 0,5-1 gramo de tejido vegetal congelado, se coloca en un tubo falcon y se agregan 1 mL de PCI y 1 mL de TCES (Tris 0.2 M, NaCl 0.2 M, EDTA 50 mM, SDS 2% m/v, ajustado a pH 8 con HCl). El homogeneizado se incuba a 50°C durante 15 minutos. A continuación, se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos, se toma la fase superior acuosa y se coloca en un nuevo tubo donde se añade un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla en vórtex y se vuelve a centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se pasa la fase superior a un tubo nuevo y el ARN se precipita agregando un volumen de LiCl 6 M y colocándolo a -20°C durante 4-5 horas. Finalmente, se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos y a 4°C, el precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en 30  $\mu$ L de agua estéril libre de ARNasas.



Para conocer la concentración de ARN de las muestras se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000*, para comprobar la integridad del ARN se empleó geles no desnaturalizantes y para su purificación se usó el kit *RNeasy® Plant Mini Kit* de QIAGEN.

### 3.9.10- Aislamiento de ARN de *B. vulgaris*

Se procede de la misma manera que en el aislamiento de ARN de *A. thaliana*, utilizando el método descrito en el apartado anterior.

### 3.9.11- Electroforesis de ARN

*Condiciones no desnaturalizantes:* Se emplean estas condiciones para observar la integridad del ARN aislado. Se preparan geles de agarosa 1% TAE 1X y las muestras se preparan con el tampón de carga 1,25X (55% v/v formamida, 20% v/v formaldehído, 12,5% v/v MAE 10X [200 mM MOPS (ácido 2-(N-morfolino) propanosulfónico), 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA y ajustado a pH 7 con NaOH], 8% v/v glicerol, 0,05% p/v azul de bromofenol y 0,001% p/v de bromuro de etidio) y se calientan a 56°C durante 10 minutos, antes de cargarlas en el gel. El gel se deja correr 1-2 horas a 50 voltios, y se visualiza bajo luz ultravioleta con la ayuda de un documentador de geles.

*Condiciones desnaturalizantes:* Estas condiciones se emplean en el análisis *Northern blot*. Se utilizan geles de agarosa 1% en tampón MAE (10% v/v MAE 10X [200 mM MOPS, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA y ajustado a pH 7 con NaOH] y 2,2% v/v formaldehído 37%). Como tampón de electroforesis se emplea 10% (v/v) MAE 10X y 1,1% (v/v) formaldehído 37%. Las muestras de ARN se mezclan con el tampón de carga 1,25X con bromuro de etidio (200:1) y se calientan a 56°C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel. Como marcador de tamaño se utiliza el "RNA ladder" (Invitrogen).

### 3.9.12- Marcaje radioactivo de sondas

El ADN empleado para la síntesis de sondas radioactivas en los experimentos de *Northern blot*, se obtiene a partir de una digestión con el enzima de restricción *EcoRI* del plásmido pYPGE15-CRIO4. De esta forma se consigue un fragmento N-terminal del gen *BvCRIO4* de 745 bp que se purifica a partir de gel de agarosa tras la electroforesis (tal como se explica en el apartado 3.9.8- Purificación de fragmentos de ADN).

Para el marcaje radioactivo de las sondas se usa el método de marcaje por hexanucleótidos ("*random priming*"). Para ello, se parte de 120 ng de ADN molde en 15 µL de agua estéril y se desnaturaliza incubando a 95°C durante 10 minutos. A continuación, se coloca el microtubo en hielo y se agregan 5 µL de OLB 5X (0,1 M MES pH 6,8, 5 mM DTT (ditiotreitolo), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mg/mL hexanucleótidos al azar "*hexanucleotides random primers*" (Boehringer), 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dTTP), 1 µL del fragmento klenow de la

ADN polimerasa de *E. coli* (10 U/ $\mu$ L), 2,5  $\mu$ L de BSA 10X (Albúmina de Suero Bovino) y 2,5  $\mu$ L de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ L) como nucleótido radioactivo. Finalmente, la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 8-10 horas y, transcurrido ese tiempo, se añaden 200  $\mu$ L de TE para detener la reacción. A continuación, se desnaturaliza el ADN nuevamente incubando a 95°C durante 10 minutos y ya puede ser añadido al tubo de hibridación con la membrana a hibridar.

### 3.9.13- Análisis Northern blot

Se parte de 30  $\mu$ g de ARN y se realiza una electroforesis en un gel en condiciones desnaturalizantes usando un voltaje de 40-50 V durante 4-5 horas. Al terminar la electroforesis, el gel se lava 2 veces con una solución de SSC 10X (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato trisódico, ajustado a pH 7 con HCl) durante 20 minutos cada lavado para eliminar el formaldehído del gel. El ARN se transfiere a una membrana de nailon Hybond N (Amersham) por capilaridad durante toda la noche, empleando tampón SSC (citrato salino sódico) 10X. Finalmente, el ARN se fija covalentemente a la membrana mediante radiación ultravioleta usando un aparato Stratilinker (Stratagene).

La membrana con el ARN fijado se coloca en un tubo de hibridación ThermoHybaid (Thermo), se añaden 5 mL de tampón de hibridación PSE y se deja durante 20 minutos en un horno con agitación circular a 65°C. Después se agrega la sonda radioactiva, para detectar el ARN en la membrana, al tampón de hibridación y se deja durante 16-18 horas a 65°C en agitación. Posteriormente, se realizan dos lavados de la membrana de 10 minutos a 65°C con una solución SSC 4X, 0,1% (m/v) SDS y un lavado de 10 minutos con la solución SSC 0,4X, 0,1% (m/v) SDS. Terminados los lavados, la membrana se seca a temperatura ambiente y se envuelve en plástico tipo Saran Wrap. Finalmente, la membrana se expone con una película Hyperfilm (Amersham) a -80°C en un casete de revelado Hypercassette (Amersham) con pantallas intensificadoras. Las películas son reveladas con el procesador automático X-omat 2000 (Kodak).

### 3.9.14- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN específico se realiza mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la capacidad de las ADN polimerasas de replicar un fragmento concreto de ADN mediante unos cebadores específicos y unos ciclos adecuados de temperatura (Saiki *et al.*, 1985).

#### 3.9.14.1- Oligonucleótidos cebadores

El diseño de los cebadores u oligonucleótidos (también llamados oligos), es un paso clave en todos los ensayos en los que intervenga la reacción en cadena de la polimerasa.

Las condiciones generales del diseño son una longitud óptima de 20 nucleótidos, con una presencia en G/C del 60% aproximadamente, y preferentemente, se diseñaban cebadores con una G o una C como última base en 3', de modo que la unión en este punto sea lo más fuerte posible, facilitando la unión de la ADN polimerasa.

Para el diseño de los cebadores utilizados para el estudio de la expresión génica mediante PCR previa transcripción reversa, además se tuvo en cuenta que la extracción de ARN podría contaminarse con ADN genómico, por lo que uno de los cebadores de cada gen a amplificar se encuentra siempre separado del otro por un intrón, es decir, que los cebadores corresponden a dos exones consecutivos. De este modo se asegura amplificar solamente ADNc.

Las secuencias de los cebadores se analizan mediante el programa Vector NTI, para confirmar que las parejas de oligos empleadas en cada amplificación no forman dímeros entre sí, inhibiendo así parte de la reacción. Además, cuando se tratan de análisis de expresión, se comprueban mediante el programa de alineamiento BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la página del TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), para confirmar que dichos cebadores no hibriden en otras regiones del genoma de Arabidopsis.

Todos los cebadores utilizados en este trabajo han sido sintetizados por la empresa Isogen Life Science, y a continuación se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de PCR, PCR diagnóstica y RT-PCR semicuantitativa.

#### **Oligonucleótidos empleados para las PCR diagnósticas:**

##### *Pat13:*

P3-N593994-LP: 5'-AACCCCACCAGAGCTAAAATC-3'

P3-N593994-RP: 5'-TTGGAATTGATGCTAAAACGAG-3'

##### *Pat15:*

P5-199-G07-LP: 5'-TAGAGGTTCTCAACCACACGG-3'

P5-199-G07-RP: 5'-TCTGAGCAATCATAAAGTCATTGG-3'

P5-N503-134-LP: 5'-AAACTCCGCTCCATACGAAAC-3'

P5-N503-134-RP: 5'-TTGTGTTTCATGCAAGGACAAG-3'

P5-N624-448/N62-446-LP: 5'-CTGCCAACTTCTCCAACCTTG-3'

P5-N624-448/N62-446-RP: 5'-TTTGTAGCTGGTGGTGGTTTCC-3'

##### Oligos LB:

LBa1: 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

LBb1: 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'

LB-6313R: 5'-TCAAACAGGATTTTCGCCTGCT-3'

#### **Oligonucleótidos empleados en la RT-PCR semicuantitativa:**

##### *Pat13:*

PATL3-D: 5'-GCAGATACCACCAAG-3'

PATL3-R: 5'-CTGTTTGAAGACAACTCAGG-3'

*Patl5:*

PATL5-D: 5'-CTATATGGGGTGTGCC-3'

PATL5-R: 5'-ATCCACACTTAGTCCACCA-3'

*ACT8:*

ACT8-D: 5'-CAT GGA GAA GAT TTG GCA TCA CAC-3'

ACT8-R: 5'-GAG GAT AGC ATG TGG AAG TGA GAA-3'

**Oligonucleótidos empleados en la construcción pCM259-CRIO4:**

CRIO4-RECOM-D: 5'-TATGACGTTCCAGATTACGCTGGTTTAATGGCGGAAGAAACCCAT-3'

CRIO4-RECOM-R: 5'-CTGCAGGGCCCTAGCGGCCGCGTTTCACTGAGAAGTCTTGACCTT-3'

**Oligonucleótidos empleados en la construcción pJM729CRIO4:**

CRIO4-HASTREP-D: 5'-GTGAAGCTTATGGCGGAAGAAACCCAT-3'

CRIO4-STOP-HASTREP-R: 5'-GGGAAGCTTTCCTGAGAAGTCTTGAC-3'

**Oligonucleótidos empleados en la construcción pJM729CRIO4::GFP:**

CRIO4-HASTREP-D: 5'-GTGAAGCTTATGGCGGAAGAAACCCAT-3'

CRIO4-GFP-R: 5'-GTAGGATCCCTGAGAAGTCTTGACCTT-3'

**Oligonucleótidos empleados en la construcción pYPGE15-SEC14(CRIO4):**

pYPGE-SEC14-D: 5'-

AGATCTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGGATGAAGATCTTGGA-3'

pYPGE-SEC14-R: 5'-

CCACCAAAGGCCATCTTGGAACCGGGCCCCCCTCGAGTCACTCACCAAACCTTACT-3'

**Oligonucleótidos empleados en la construcción pYCplac111-TAT2::GFP:**

TAT2-D: 5'-TCTGGCTCGATGTCTGAA-3'

TAT2-R: 5'-TGTCTCACGTACCATGGA-3'

**3.9.14.2- Condiciones de PCR**

Las reacciones de PCR se llevan a cabo de forma rutinaria en microtubos estériles, donde se realiza una mezcla de los siguientes reactivos:

- 1 µL (10 ng) ADN molde
- 2 µL Tampón PCR 10X
- 2 µL dNTPs 10 mM
- 1 µL Cebador sentido (0,1 µg/µL)
- 1 µL Cebador antisentido (0,1 µg/µL)
- 1 µL Polimerasa (*Taq*) 1U/µL

- Volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ estéril

En las reacciones rutinarias se utiliza la enzima *Taq* polimerasa (Biotools). Todas las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf), y para cada reacción de PCR se usó el programa más adecuado atendiendo a la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos específicos y el tamaño de amplicón. El programa generalmente usado es el siguiente:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos.
- 35 ciclos de:
  - Desnaturalización: 1 minuto a 95°C.
  - Hibridación de los cebadores: 1 minuto a una temperatura de anillamiento 4°C inferior a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los oligonucleótidos
  - Extensión: 1 minuto por kb a amplificar, a 72°C.
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

### 3.9.14.3- PCR diagnóstica

Para el genotipado de mutantes homocigotos de inserción de T-DNA, de las líneas suministradas por el NASC (SALK, SAIL o GABI-KAT) se realizaron PCR diagnósticas, utilizando un par de oligonucleótidos (LP y RP) que hibridan en el ADN del genoma de *A. thaliana*, localizados uno a cada lado del T-DNA, y un tercer oligonucleótido que hibrida en el interior del T-DNA (BP). Tras la amplificación, las líneas homocigotas presentan tan solo la banda correspondiente a la amplificación con LP y BP, mientras que las heterocigotas presentan, además de esa banda, la resultante de la amplificación con LP y RP. El diseño de oligonucleótidos LP y RP, se realiza con la aplicación “*T-DNA primer Design*” de la página web: <http://signal.salk.edu/tDNAprimers.2.html>

### 3.9.14.4- RT-PCR semicuantitativa

En primer lugar se trató con ADNasa el ARN previamente aislado para eliminar restos de ADN genómico. Para ello, se parte de 2  $\mu\text{g}$  de ARN en un volumen de 7  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ estéril en un tubo estéril, y se añaden 2  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción RT X5 (50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 10 mM de DTT), y 1  $\mu\text{L}$  de ADNasa (10 U/ $\mu\text{L}$ ). La mezcla se incubó 15 minutos a 37°C y 15 minutos más a 65°C.

Tras el tratamiento con ADNasa se inicia la síntesis de ADNc. Para ello, al tubo anterior se añade 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM (compuesto por una mezcla 2,5 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato), 2  $\mu\text{L}$  de oligo p(dT)<sub>15</sub> 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (cebador para el ARNm), 6  $\mu\text{L}$  de tampón RT X5, 4  $\mu\text{L}$  de DTT 0,1 M, 0,7  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa 20 U/ $\mu\text{L}$  y 8  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ estéril. La mezcla se incubó 75 minutos a 37°C y después 5 minutos a 65°C para inactivar el enzima.

La posterior reacción de PCR para amplificar los ADNc de interés se realizó según lo explicado en el apartado "Condiciones de PCR", utilizando 1 µL de ADNc sintetizado. Como control de la RT-PCR se empleó un gen de expresión constitutiva, *ACT8* (At1g49240).

### 3.10- Diseño y obtención de las construcciones plasmídicas para experimentos de transformación de plantas y levaduras

**pCM259-CRIO4:** La secuencia codificante del gen *BvCRIO4* ubicado en el plásmido pYPGE15-CRIO4 fue amplificada mediante PCR con los oligos CRIO4-RECOM-D y CRIO4-RECOM-R para clonarlo en el sitio *PmeI* del MCS del vector de expresión pCM259, y situarlo en fase con una secuencia que codifica 3 repeticiones del epítipo HA y 6 histidinas, obteniendo así la construcción pCM259-CRIO4. Este plásmido contiene además un promotor regulable por tetraciclina/doxiciclina (*tetO-CYC1*), el gen bacteriano de resistencia a ampicilina y el gen *URA3* de levadura. Para conseguir la recombinación del fragmento de PCR amplificado con la secuencia recombinante del plásmido pCM259, se usó una combinación vector:inserto de 1:5 para transformar la cepa de levadura W303. De las colonias que crecieron en medio selectivo, se extrajo el plásmido y se comprobó mediante PCR con los mismos oligos, y también mediante corte con *PstI*, que contenían los fragmentos adecuados en función del tamaño del inserto. La proteína recombinante con las 6 histidinas es capaz de unirse y ser retenida por iones  $Ni^{2+}$ , lo que permite la purificación de la proteína recombinante a partir de extracto crudo en columnas con una resina previamente cargada con  $NiSO_4$  (proceso descrito en el apartado 3.11.1.2- Purificación de proteína por resina cargada con níquel).

**pYPGE15-SEC14(CRIO4):** La secuencia de 528 nucleótidos que codifica el dominio Sec14 de la proteína codificada por el gen *BvCRIO4*, fue amplificada a partir del plásmido pYPGE15-CRIO4 mediante PCR con los oligos CRIO4-SEC14-D y CRIO4-SEC14-R, y clonada entre los sitios *BamHI* y *XhoI* del *polylinker* del plásmido pYPGE15. Esta construcción se obtuvo mediante recombinación, transformando la cepa CTY1-1A de levadura con una combinación del plásmido pYPGE15 y el fragmento amplificado por PCR, en una proporción vector:inserto de 1:10. De las colonias que crecieron en medio selectivo, se extrajo el plásmido y se usó como molde para una PCR de comprobación con los mismos oligos, para comprobar si el plásmido integraba el fragmento de tamaño adecuado. Esta construcción se usó para ensayos de complementación en levadura.

**pJM729CRIO4:** La secuencia codificante del gen *BvCRIO4* ubicado en el plásmido pYPGE15-CRIO4 fue amplificada mediante PCR con los oligos CRIO4-HASTREP-D y CRIO4-STOP-HASTREP-R (el oligo CRIO4-STOP-HASTREP-R mantiene el codón de parada de la traducción del gen). El fragmento amplificado se introdujo en el plásmido pBluescript SK+ en el sitio *EcoRV*. La construcción obtenida se secuenció para comprobar que el fragmento clonado correspondía al gen de interés y que no se habían producido mutaciones en la secuencia. La construcción se digirió con el enzima de restricción *BamHI* (cuya secuencia diana estaba

presente en los oligos utilizados para la amplificación, permitiendo así incorporarla en los extremos del gen) para su clonación en el plásmido pJM729 en la orientación adecuada para su expresión. Esta nueva construcción, denominada CRIO4, se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK mediante electroporación, para posteriormente transformar *Arabidopsis thaliana* y construir líneas transgénicas que contienen una fusión 35S::GRIO4.

**pJM729CRIO4::GFP:** La secuencia codificante del gen *BvCRIO4* ubicado en el plásmido pYPGE15-CRIO4 fue amplificada mediante PCR con los oligos CRIO4-HASTREP-D y CRIO4-GFP-R. El fragmento amplificado se introdujo en el plásmido pBluescript SK+ en el sitio *EcoRV*. La construcción obtenida se secuenció para comprobar que el fragmento clonado correspondía al gen de interés y que no se habían producido mutaciones en la secuencia. La construcción se digirió con los enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* (cuya secuencia diana estaba presente en los oligos utilizados para la amplificación, permitiendo así incorporarla en los extremos del gen) para su clonación en el plásmido pJM743 en la orientación adecuada para su expresión. Este plásmido derivado de pXCS-HASstrep contiene la secuencia que codifica la proteína sGFP fusionada al terminados NOS, de modo que esta construcción da como resultado una fusión 35S::GRIO4::GFP. Se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* mediante GV3101::pMP90RK electroporación, para realizar estudios de localización subcelular en plantas.

**pYCplac111-TAT2::GFP:** El plásmido pKU76 fue digerido con los enzimas de restricción *PstI* y *EcoRI* para extraer la secuencia codificante de la fusión TAT2::GFP, para introducirla en el plásmido pYCplac111 mediante una reacción de ligación en la cual se usó una proporción vector:inserto de 1:1. Se transformó *E. coli* con el producto de la ligación y a partir de las colonias que crecieron en medio selectivo, se hizo una extracción de ADN plasmídico. Para comprobar la presencia del inserto, se usó este ADN plasmídico como molde en una PCR con los oligos TAT2-D y TAT2-R, y también se realizó una digestión con los enzimas *PstI* y *EcoRI*. Este plásmido, que además contiene el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *LEU2* de levadura, fue usado para ensayo de coexpresión en levadura.

### 3.11- Manipulación de proteínas

#### 3.11.1- Extracción de proteínas de *S. cerevisiae*

##### 3.11.1.1- Extracción rápida

Se siguió el protocolo descrito por Kushnirov (2000) para la obtención de extractos proteicos. Las células de levadura fueron cultivadas en medio líquido hasta fase logarítmica, y de un volumen equivalente a una OD<sub>600</sub> de 2,5, se recogió el precipitado mediante centrifugación a 2500 rpm durante 4 minutos. Se resuspendió las células en 100 µL agua *MilliQ* estéril, se añadió 100 µL de NaOH 0,2 M y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el precipitado mediante 1 minuto de centrifugación a velocidad máxima y se

resuspendió en 50 µL de tampón de carga (0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% glicerol, 2% SDS, 4% β-Mercaptoetanol, 0,0025% Azul de bromofenol). Por último se hierve la muestra 3 minutos a 95°C.

### 3.11.1.2- Purificación de proteína por resina cargada con níquel

Para purificar la proteína recombinante CRIO4 se transformó la cepa W303 de *S. cerevisiae* con el plásmido pCM259-CRIO4. A partir de un cultivo líquido saturado en medio SD con doxiciclina (20 µg/mL) se inoculan 400 µL en 400 µL de medio YPD con doxiciclina (20 µg/mL) y se incuba en agitación a 28°C hasta que el cultivo alcance una OD<sub>600</sub> de 0,1-0,2. Se recogen las células por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se realizan 3 lavados con 150 mL de agua *MilliQ* estéril. Seguidamente se resuspenden las células en 400 mL de YPD sin doxiciclina para estimular la expresión de la proteína y se incuba de nuevo en agitación a 28°C hasta que el cultivo alcance una OD<sub>600</sub> de 0,4-0,6. Se recogen las células por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se lavan con 150 mL de agua *MilliQ* estéril. Posteriormente las células se resuspenden en 2 mL de tampón de fraccionamiento (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 M KCl, 10% glicerol (m/v), 5 mM imidazol, y una pastilla de inhibidores de proteasas, *Complete Mini EDTA-free* (Roche) por cada 10 mL de tampón) y se añaden bolas de cristal de 5,5 mm de diámetro, justo por debajo de la superficie de resuspensión, para romper las células mediante 6 ciclos de vórtex de un minuto y un minuto de incubación en hielo. Después se agregan 2 mL de tampón de fraccionamiento y se centrifuga en frío a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se centrifuga en frío a 5000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante, constituye la fracción soluble de proteínas (proteínas citoplasmáticas y periplasmáticas), se coloca en un tubo nuevo y se mezcla con la resina de agarosa His-Bind (Novagen) previamente lavada y cargada como se explica en las instrucciones del fabricante. La mezcla se incuba en agitación suave a 4°C durante 4 horas, así la proteína recombinante con la cola de histidinas se une a los iones de níquel inmovilizados en la resina. Posteriormente se realiza un lavado de la resina con 10 mL de tampón de unión (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 M KCl, 10% glicerol (m/v), 5 mM imidazol) y 3 lavados (el primero con 10 mL y los dos siguientes con 400 µL) con tampón de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,15 M KCl, 60 mM imidazol), en agitación suave durante 5 minutos a 4°C cada uno. El imidazol compite con las proteínas por la unión de los iones níquel de la columna y a estas concentraciones elimina las uniones inespecíficas de otras proteínas a la columna.

Finalmente la proteína recombinante es purificada utilizando 500 µL de tampón de elución (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,1 M KCl, 10% glicerol (m/v), 300 mM imidazol), incubando en agitación suave durante 30 minutos a 4°C y eluyendo la proteína purificada en una columna. El aumento de concentración de imidazol provoca que éste sustituya a las histidinas de la proteína recombinante en la unión con los iones de níquel de la columna.



### **3.11.2- Cuantificación de proteínas por el método Bradford**

Éste es un método rápido y de sensibilidad media para cuantificar la cantidad de proteína presente en una muestra por colorimetría a  $\lambda=595$  nm. La determinación de la concentración de proteína total en cada muestra se hizo por comparación de intensidad colorimétrica con una muestra conocida de seroalbúmina bovina (BSA) con la que se realizó una recta de calibrado. El reactivo utilizado capaz de cambiar de color en función de la concentración de proteína fue 5X BioRad Assay kit (BioRad) diluido 5 veces en agua. Se utilizaron 200  $\mu$ L de BioRad diluido y en cada pocillo de la placa multipocillo se cargaron cantidades crecientes y conocidas de BSA para obtener la recta de calibrado; igualmente se cargaron tres réplicas de diluciones de la muestra extraída y se llevaron a cabo los cálculos de regresión para determinar la concentración de nuestra muestra.

### **3.11.3- Análisis *Western Blot***

#### **3.11.3.1- Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana**

Previamente a la electroforesis, a la muestra de proteínas se le añade de forma rutinaria, tampón de muestra 5X (SDS 7,5% p/v, ditioneitol 0,1M, EDTA 10 mM, sacarosa 30%, 0,25 mg/mL Azul de bromofenol y 0,3M Tris, pH 6,8 ajustado con HCl), y se incubaba a 95°C durante 5 minutos. El calentamiento desnaturaliza posibles proteasas presentes en la muestra. Una vez transcurrido ese tiempo, se depositan las muestras en hielo hasta que sean cargadas en el gel.

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) empleando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (4% acrilamida:bisacrilamida 30:0,8, 0,1% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% APS (persulfato de amonio), 0,1% TEMED (N,N,N,N'-tetrametilenediamina)) y una zona inferior de separación (8% acrilamida:bisacrilamida 30:0,8, 0,1% SDS, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 1% APS, 0,1% TEMED). La concentración de acrilamida en la zona de separación se ajusta (entre el 6 y el 12%) en función del tamaño de las proteínas de interés. Una vez cargadas las proteínas en el gel, éste se sumerge en tampón de electroforesis (0,19 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3 ajustado con Tris Base). Mientras la muestra recorre la primera fase de los geles (empaquetamiento) se somete a una corriente eléctrica de 80 V mientras que una vez el frente alcanza la fase de separación se incrementa la corriente a 120 V.

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Millipore). Para la transferencia se utilizó el sistema MiniProtean 3 (BioRad) usando tampón de transferencia TOWBIN (Glicina 0,19M, SDS 0,01% m/v, pH 8,3 ajustado con Tris, y 20% metanol v/v). La transferencia se realizó bajo una diferencia de potencial constante de 100 V durante 1,5 horas, a una temperatura de 4°C.

### 3.11.3.2- Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana

Para la detección de las proteínas a analizar, en primer lugar se bloquearon los sitios de unión no específicos sumergiendo la membrana en una solución de bloqueo (2% leche desnatada, 0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente se retiró la solución de bloqueo y se añadió 10 mL de solución de bloqueo fresca a la que se le ha añadido el anticuerpo primario (anti-HA, dilución 1:5000), y se incubó durante 16 horas en agitación a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos de 10 min cada uno con solución de lavado (0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6), tras los cuales se sustituyó la solución de lavado usada por 10 mL de solución de lavado nueva a la que se le ha añadido el anticuerpo secundario (ECL anti-Mouse (Amersham), dilución 1:5000), y se dejó en incubación durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente, se realizan otros tres lavados consecutivos con solución de lavado para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

La detección de la proteína de interés se realizó usando un sistema de quimioluminiscencia (*ECL prime Western Blotting Detection System*, Amersham Biosciences) según las especificaciones del fabricante. Para detectar la señal quimioluminiscente, la membrana se expuso con una película *Hyperfilm* (Amersham) en un casete de revelado *Hypercassette* (Amersham) con pantallas intensificadoras. Las películas son reveladas con el procesador automático X-omat 2000 (Kodak).

### 3.12- Ensayo de unión a fosfolípidos

Se realizó un ensayo basado en el protocolo de Schapire *et al.* (2008). Para ello, 100 µg de fosfolípidos disueltos en cloroformo se secaron manualmente bajo un flujo de nitrógeno gas, hasta formar una fina capa repartida por el fondo del tubo. Los lípidos secados se resuspendieron en 100 µL de tampón A (10 mM MOPS, 150 mM KCl, 0,1 mM EDTA, pH 7) y se agitaron en vórtex durante 20 minutos para formar las vesículas LMV (*large multilamellar vesicles*). Las vesículas se recolectaron mediante 20 minutos centrifugación a 13200 rpm a temperatura ambiente. El precipitado de vesículas se resuspendió en tampón A y se añadió 5 µg de proteína (previamente centrifugada durante 10 minutos a 13200 rpm y 4°C, para eliminar impurezas que precipiten), siendo el volumen final de la mezcla 1 mL. Se incubó a 27°C y en agitación suave (250 rpm) durante 15 minutos. La proteína unida a las vesículas de fosfolípidos se recoge en el precipitado mediante 10 minutos de centrifugación a 13200 rpm y 4°C. Se realizan 3 lavados con 500 µL de tampón A y finalmente el precipitado se resuspende en 15 µL Laemli 2X. Las muestras se analizan por Western.

Se realizaron 3 tipos de vesículas constituidas por fosfolípidos distintos: fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina todos de la marca Sigma-Aldrich.

### 3.13- Estudio de localización celular de proteínas por microscopía confocal

El tejido vegetal y las células de levadura se observaron utilizando un microscopio confocal. En este tipo de microscopía se ha empleado un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania). Se trata de un microscopio DMIR2 invertido, y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de láser (458nm, 488nm, 514nm y 534nm). También se ha utilizado un microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) con 7 líneas de láser (405nm, 458nm, 488nm, 514nm, 561nm, 594nm y 633nm). La detección de la señal GFP se realizó mediante su excitación por un láser de Argón (488 nm) y la emisión se visualizó mediante un paso de luz de 30 nm de ancho centrado en 515 nm.

### 3.14- Tratamiento de datos estadísticos

El análisis estadístico utilizado para comparar dos tipos de muestras se llevó a cabo mediante una prueba *t de Student* para diferencia de medidas de muestras independientes utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de la *suite* Microsoft Office. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### 3.15- Herramientas de análisis bioinformático

La secuencia del gen *BvCRIO4* y la proteína codificada en ella se analizaron con varias herramientas bioinformáticas citadas a continuación:

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (NCBI BLAST). Alineamiento de secuencias.
- <http://www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp> (TAIR WU-BLAST (*A. thaliana*)). Alineamiento de secuencias.
- [http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) (*Reverse Complement*). Herramienta que permite obtener la secuencia reversa, complementaria o reversa-complementaria de una secuencia de nucleótidos dada.
- <http://web.expasy.org/translate/> (ExPaSy Translate tool). Traducción de secuencias.
- <http://prosite.expasy.org/> (PROSITE ScanProsite tool). Búsqueda de patrones y dominios en proteínas.
- <http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search> (InterProScan EMBL-EBI). Búsqueda de dominios proteicos conservados.
- <http://web.expasy.org/protparam/> (ExPaSy ProtParam). Características fisicoquímicas de una proteína.
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (ExPaSy NetPhos 2.0). Predicción de sitios de fosforilación.

- <http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/> (PhosPhAt 4.0). Base de datos que recopila los sitios de fosforilación de proteínas de Arabidopsis identificados *in vivo*.
- <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils> (COILS/PCOILS). Predicción de motivos Coiled coil.
- [http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cc/pred\\_cchmm.cgi](http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cc/pred_cchmm.cgi) (CCHMM). Predicción de motivos Coiled coil.
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Clustal Omega; EMBL-EBI). Herramienta que permite hacer alineamientos de secuencias y árboles filogenéticos.
- <https://genevestigator.com/gv/>. Base de datos de experimentos de microarrays.
- <http://bar.utoronto.ca/>. (*The Bio-Analytic Resource for Plant Biology*). Contiene varias herramientas para estudios de expresión genética y localización subcelular de proteínas.
- <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress/> (T-DNA Express SIGnAL SALK INSTITUTE). Muestra todos los mutantes de inserción de T-DNA en *Arabidopsis thaliana*.
- <http://www.yeastgenome.org/> (*Saccharomyces Genome Database*).
- TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>)
- EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*; <http://www.embl.org/>).
- NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **RESULTADOS**



## 4- RESULTADOS

### 4.1- Identificación del gen *BvCRIO4*.

#### 4.1.1- Aislamiento del gen *BvCRIO4*.

Para identificar genes cuya función es limitante en condiciones de estrés se ha utilizado en el pasado una estrategia basada en la sobreexpresión de bibliotecas de ADNc en sistemas heterólogos. De este modo, usando el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* como sistema heterólogo, se ha podido identificar genes de plantas implicados en resistencia a estrés salino como las proteínas SR (Forment *et al.*, 2002) o la lipasa LTL1 (Naranjo *et al.*, 2006).

El Prof. Roc Ros, en un trabajo previo dentro del grupo del Prof. Ramón Serrano, construyó una biblioteca de ADNc a partir de hojas de plantas de remolacha (*Beta vulgaris*) sometidas a un tratamiento salino (Kanhonou *et al.*, 2001; Figura 22). La sobreexpresión de esta biblioteca en levadura ha permitido identificar genes que confieren tolerancia a salinidad como la subunidad catalítica de la caseína kinasa, *BvCKA2* (Kanhonou *et al.*, 2001), o el factor de iniciación de la traducción, *eIF1A* (Rausell *et al.*, 2003), así como también genes que confieren tolerancia a sequía (estrés osmótico) como el enzima *BvSAT1* (Mulet *et al.*, 2004a) y una hemoglobina no simbiótica de tipo II, *BvGLB2* (Mulet *et al.*, 2004b, Timoneda, 2012).

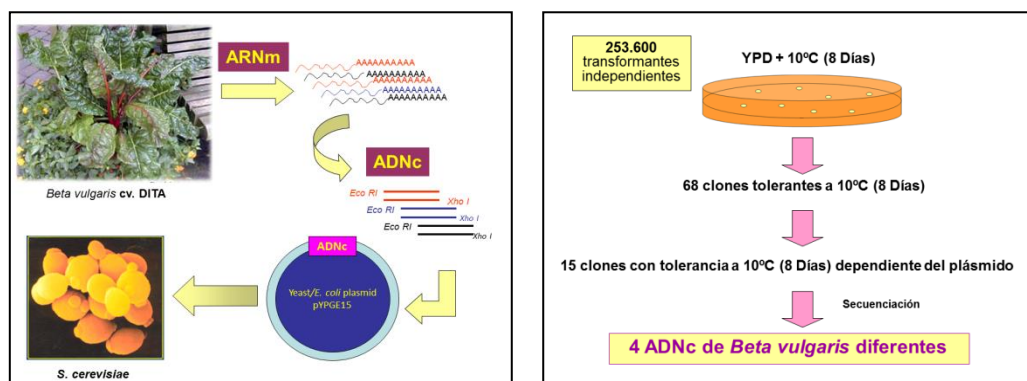


Figura 22: Esquema de la producción de la biblioteca de ADNc de remolacha (izquierda) y diagrama del rastreo de dicha biblioteca de ADNc en busca de genes que confirieran tolerancia a frío por sobre expresión en levadura, donde se identificó el gen *BvCRIO4* (derecha).

El estrés por frío, por salinidad y por sequía solapan algunos de sus mecanismos moleculares de respuesta (Mahajan y Tuteja, 2005). En otro trabajo previo del grupo, el Dr. Mulet inició un estudio con un planteamiento similar para tratar de identificar genes que aumentaran la tolerancia a estrés por frío. Para ello, la cepa de levadura W303-1A diploide se transformó con dicha biblioteca de ADNc de remolacha y se incubó ésta a 10°C durante 8 días en distintos medios de crecimiento (Tabla 2). Esto permitió identificar 6 genes de *Beta vulgaris* que fueron nombrados *CRIO1* a 6. De entre estos genes, los 4 primeros fueron identificados a partir de ADNc aislados de colonias transformantes crecidas sobre medio YPD (Figura 22; Tabla 2). Partiendo de 253.600 transformantes independientes, se obtuvieron 68 clones tolerantes a la condición de crecimiento a 10°C, de los cuales solo 15 conferían tolerancia a

estas condiciones de forma dependiente del plásmido. Tras secuenciarlos, se identificaron 4 ADNc diferentes, entre los cuales se encontraba *CRIO4*, gen objeto de estudio de esta tesis.

Este estudio se realizó gracias a un convenio de colaboración con la compañía belga de biotecnología CROP DESIGN (adquirida por la compañía alemana BASF en 2006) y los genes identificados se encuentran incluidos en las patentes STRESS TOLERANCE PCT/EP04/050513 y WO 2004/090141.

| ADNc aislados a 10°C |                  |   |
|----------------------|------------------|---|
| Medio                | ADNc             | Características   |
| YPD                  | <i>CRIO1</i> (8) | Ortólogo de <i>ScDID1</i> / <i>AtSNF7</i> / <i>CHMP4</i> / <i>VPS32</i> |
|                      | <i>CRIO2</i> (2) | Homólogo de <i>CRIO1</i>  |
|                      | <i>CRIO3</i> (4) | Ortólogo de <i>ScDID2</i> / <i>AtVPS46</i> / <i>CHMP1</i>               |
|                      | <i>CRIO4</i> (1) | Ortólogo de <i>PDR16</i> / <i>SEC14</i>                                 |
| SD                   | <i>CRIO5</i> (1) | Proteína con dominio Ring-Finger.                                       |
|                      | <i>CRIO6</i> (1) | Proteína intrínseca del tonoplasto (TIP).                               |

Tabla 2: ADNc identificados en el rastreo de genes que confieran tolerancia a frío. Se empleó medio YPD y SD, en condiciones de crecimiento de 10°C. Se muestran los ADNc según fueron nombrados (entre paréntesis el número de veces que fueron aislados) y las características de cada uno.

Según los resultados del Dr. Mulet, los genes *CRIO1* a 3 se localizan en el endosoma tardío en células vegetales, formando parte del complejo ESCRTIII. Este complejo es responsable de la distribución de proteínas monoubicuitiladas de la membrana plasmática hacia el endosoma tardío y su posterior degradación en la vacuola, o de su reciclaje. La sobreexpresión de estos genes en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* aumenta la tolerancia a frío, indicando que la función del complejo ESCRT podría verse afectada a temperaturas subóptimas (comunicación personal).

La proteína codificada por *CRIO5* contiene un dominio RING finger, por lo que es probable que actúe como una E3 ubiquitina ligasa. Una proteína de este tipo podría ser la enzima encargada de marcar las proteínas de membrana que entran en la ruta endocítica, dirigida por el sistema ESCRT, para su degradación o reciclaje. Esto daría coherencia a los resultados conjuntos de los genes identificados en este rastreo (Marí-Carmona, 2012).

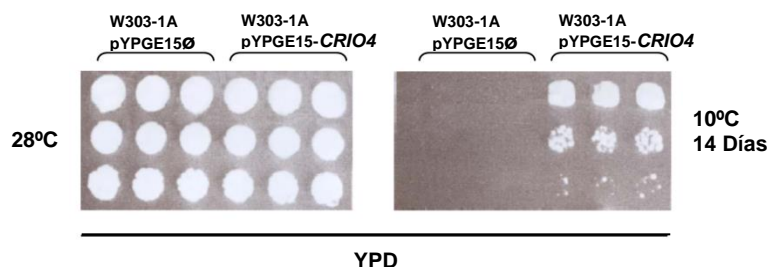


Figura 23: Tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión del ADNc *CRIO4*. En medio YPD se cultivó la cepa silvestre W303-1A transformada con el plásmido pYPGE15-*CRIO4*, y tras 14 días de incubación a 10°C se observó la capacidad de crecimiento en estas condiciones dependiente del plásmido. Como control se usó la misma cepa transformada con el plásmido pYPGE15.

El gen *CRIO6* codifica una acuaporina de tipo TIP y el trabajo de la presente tesis se centra en la caracterización de gen *CRIO4*. La tolerancia al frío conferida por la sobreexpresión



de *CRIO4* se muestra en la Figura 23, y las características generales de *CRIO4* se explican en el siguiente apartado.

#### 4.1.2- Características generales del gen *BvCRIO4*.

El ADNc correspondiente a *CRIO4*, hallado en el rastreo descrito en el apartado anterior, tiene una longitud de 2150 nucleótidos, conteniendo un marco abierto de lectura (*Open reading frame*, ORF) de 1751 nucleótidos (Figura 24). El codón de inicio de la traducción se encuentra en la posición 70, y el codón de parada acaba en la posición 1821.

| BvCRIO4 |             |             |             |            |             |             |
|---------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 1       | TNNCCGGGC   | TGCAGGAATT  | CGGCACGAGC  | TCATTTCTCT | ACATCAAAA   | CACAACAAAG  |
| 61      | AGATCACCCA  | TGGCGGAAGA  | AACCCATAAG  | CCAGAATCAA | CGGTGGCTGA  | AGTGGTGGTT  |
| 121     | CCAGTAGCCG  | AGAAACCAGC  | TGAGAAGCCA  | GCTGAGAAGG | CAGTTCCTACC | ACCTGAAGCT  |
| 181     | GAGAACTAG   | CTGCAGCTGA  | ATCAGCTGAA  | GCCGAGAAGC | CAGCTGATT   | AGCCGAGGCT  |
| 241     | AAGATAGTTC  | AACAAGTCTC  | ATTCAAAGAG  | GAGACTAATG | TTGCAAGTGA  | GCTACCTGAG  |
| 301     | CTACATAGAA  | AGGCTCTCGA  | GGACTTGAA   | AAACTTATTC | AAGAAGCCCT  | CGAGAAGCAC  |
| 361     | GAGTTCCTTT  | CTCCTCCTCC  | TCCGCCCTCCG | CCTGCTCCAG | CTAAAGTTGA  | GGAGAAGGCG  |
| 421     | GAAGAGAAGA  | AAGAGGAACA  | ACCTCCATCC  | ACCACCTCCA | CCACCACCAC  | CACCACCACC  |
| 481     | GCGGTTTCAG  | ATGAGGTTGC  | TGTTGCTCCT  | CCATCCGAA  | AGGCCCGAA   | AAC TGACGAG |
| 541     | GCCTCTCCGA  | AAGTGAGGA   | GGAGCCTGCA  | AAAATAGTTG | AGCAACCACC  | TACAACACC   |
| 601     | GCAGAAGAAC  | CTGAACCAGC  | AAAAACACT   | GAGGTGTTG  | TTGCTGAAGA  | GGAGAAAAC   |
| 661     | GGTGAGGATA  | TTAAAGAAAC  | TATAGTAGTC  | GAGGTTGCGA | CAACTACAGC  | AGCACCAGTA  |
| 721     | CTAACAGAAC  | CAGAATCTGT  | TGAGGAGACA  | CCAAAAGAA  | CTGAAATTGT  | AGTGGAAAGAA |
| 781     | TCACCAAAGG  | AGCCAGAAGA  | AGTATCAATA  | TGGGAAATTC | CACTTCTTGC  | TGATGAAAGA  |
| 841     | AGTGATGTAA  | TTCTATTGAA  | ATTCTTAAGA  | GCAAGAGATT | ATAGAGTGAA  | AGATGCTTTC  |
| 901     | ACTATGATTA  | GAAACTGTC   | TCGTTGGAGA  | AAAGAATTTG | AGGTTGATT   | TTTACTTGAT  |
| 961     | GAAGATCTTG  | GAAATGATTA  | TGAGAAAGTT  | GTTTTTACAC | ATGGAGTTGA  | TAAACAAGGT  |
| 1021    | CGTCTGTTT   | GTTATAATGT  | GTTTGGAGAG  | TTTCAAATA  | AGGAACTTTA  | TCAGAATACT  |
| 1081    | TTCTCTGATG  | CAGAAAAAAG  | GAAAAAGTTC  | TTGAGATGGT | TGATTCAAAT  | CCTTGAAAAA  |
| 1141    | ACTATTAGAA  | CTCTTGATTT  | TAGTCCTGAA  | GGAATTAAT  | CTTTTGTTCT  | TGTTAATGAT  |
| 1201    | TTGAAGAAAT  | CTCCTGGGTA  | TGTAAGAGA   | GATCTTTACA | AAATTTATGA  | CAAGTTTCTT  |
| 1261    | GAGATTCCT   | AGGATAATTA  | CCAGAATTT   | GCTGCTAAAC | AGTTGTGCAT  | CAATGTTTCA  |
| 1321    | TGGTGGTACT  | TGGCATACAA  | CTGGATCTAT  | TTGACTGTAT | TTACACGCAG  | GAGCAAGAGC  |
| 1381    | AAATTTGTGT  | TTGCAAGCCC  | ATCTAAAAC   | GCTGAGACCC | TTTTCAAGTA  | CATAGCTCCT  |
| 1441    | GAGCAGGTGC  | CTGTTCAATT  | TGGTGGGCAC  | AGTAAGTTG  | GTGAGCATGA  | GTTTTCCCT   |
| 1501    | GCTGACTACTG | TCACTGAAAGT | TACCATCAAG  | CCTGGCAGTA | AAACATCCCGT | TGAATTTGCA  |
| 1561    | TTTTCTGAGG  | AAACTGAGTT  | GGTATGGGAG  | CCTAGAGTAA | TTGGATGGGA  | TGTAAGTTAC  |
| 1621    | GGAGCCGAAT  | TCTTACCAAC  | AAAGGAAGGA  | GGATACACTC | TAAACATTGC  | CAAGCCAAAG  |
| 1681    | AAGGTAACAC  | CAGCTGATGA  | ACCAATCATT  | TGTGACACTT | TCAAGGTTAC  | TGAGCCAGGA  |
| 1741    | AAGGTTGTAA  | TTACAATTGA  | CAACCAAAGT  | TCAAAGAAGA | AGAAGCTCCT  | TTACAGGCTC  |
| 1801    | AAGGTCAGA   | CTTCTCAGTG  | ATTTTATCAT  | AATCAATTT  | ACAACATTT   | AATTCATTC   |
| 1861    | AAAAATCATA  | GTGACTCTTA  | ATAAGTTACT  | TTTTTTATT  | TATTTTATA   | GGAGTTTGG   |
| 1921    | GAATTAATTA  | TTTATTTTT   | GTTTTTTTT   | TGTATTTTGT | TGGATTTTT   | TTTTCTTTTT  |
| 1981    | TGGGGTGTG   | TCCTGGTCT   | TGTGTTCTC   | AAGTTTGGAG | GACATATACA  | GAGGAAGAAA  |
| 2041    | GGGGTGCAA   | AACTGTGTGA  | ATTGATACTC  | TTTTTGTCTG | TATATTTCTA  | TTCTATGTAA  |
| 2101    | ATTTAATTA   | TGGTTGTGA   | GTTTGTGCTA  | AAATTATAAA | TTTTCAATTC  |             |

Figura 24: Secuencia de nucleótidos del gen *BvCRIO4*. El ORF se muestra en negra.

*CRIO4* codifica una proteína tipo Sec14 que conserva la misma estructura de dominios que las PATLs (*Patellins*) de *Arabidopsis thaliana*. La proteína *CRIO4* está compuesta por 583 aminoácidos y su peso molecular estimado es de 65,33 kDa (Figura 25).

## Resultados

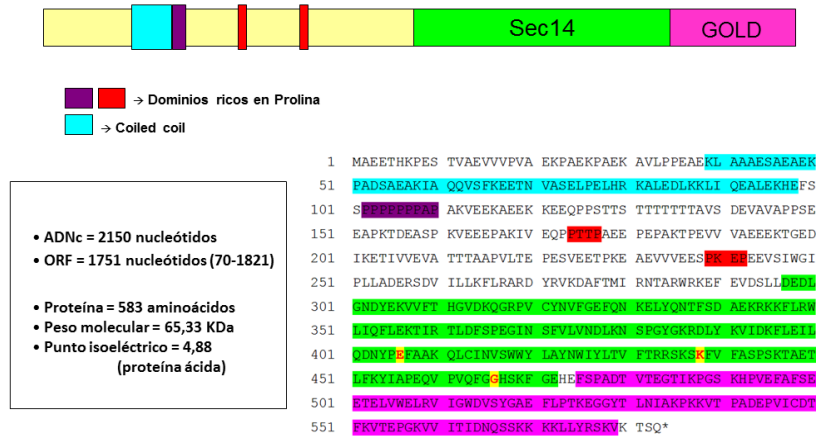


Figura 25: Estructura de dominios de la proteína CRIO4. Dentro del dominio Sec14, en verde, pueden observarse sombreados en amarillo, los tres residuos (E, K, G) críticos para la unión y transferencia de fosfolípidos.

Su composición aminoacídica revela una elevada cantidad relativa de ácido aspártico y ácido glutámico (Tabla 3), lo que le confiere un carácter ácido presentando un punto isoeléctrico (pI) de 4,88 (Figura 25). Posee además un coeficiente de inestabilidad de 53,33, lo que sugiere que se trata de una proteína poco estable (ProtParam-ExpPASy; Gasteiger *et al.*, 2005).

| Aminoácido | Nº residuos | %    | Aminoácido | Nº residuos | %   |
|------------|-------------|------|------------|-------------|-----|
| Ala        | 51          | 8,7  | Lys        | 58          | 9,9 |
| Arg        | 17          | 2,9  | Met        | 2           | 0,3 |
| Asn        | 14          | 2,4  | Phe        | 26          | 4,5 |
| Asp        | 25          | 4,3  | Pro        | 50          | 8,6 |
| Cys        | 3           | 0,5  | Ser        | 35          | 6,0 |
| Gln        | 15          | 2,6  | Thr        | 44          | 7,5 |
| Glu        | 82          | 14,1 | Trp        | 8           | 1,4 |
| Gly        | 19          | 3,3  | Tyr        | 14          | 2,4 |
| His        | 7           | 1,2  | Val        | 53          | 9,1 |
| Ile        | 23          | 3,9  | Leu        | 37          | 6,3 |

Tabla 3: Composición aminoacídica de CRIO4.

Las modificaciones postraduccionales de proteínas son importantes moduladores de su función (van Kasteren, 2012). Se ha descrito que la fosforilación-defosforilación, regulación postraduccionales que afecta a proteínas implicadas en la gran mayoría de procesos biológicos en plantas, no solo puede alterar su función, sino también su localización subcelular y la interacción con otras proteínas o su estabilidad (Luan, 2003). La secuencia de CRIO4 ha sido analizada con la herramienta bioinformática NetPhos 2.0 (ExpPASy; Blom *et al.*, 1999), que predice la potencialidad de una secuencia de aminoácidos de ser fosforilada en sus residuos de serina, tirosina o treonina (Figura 26).

## Resultados

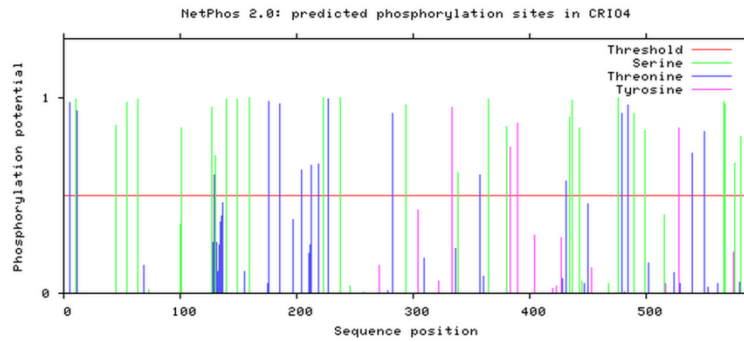


Figura 26: Predicción de sitios de fosforilación en CRI04 con NetPhos 2.0.

El resultado revela que en la secuencia de CRI04 existen 26 residuos de serina, 16 residuos de treonina y 4 de tirosina con una elevada probabilidad de ser fosforilados *in vivo* (Figura 26). Sin embargo, la herramienta NetPhos utiliza algoritmos de predicción basados en sustratos de quinasas de mamíferos, algunas de las cuales no tienen ortólogos en *Arabidopsis thaliana*, lo que puede dar lugar a la identificación de sitios de fosforilación en una secuencia a analizar, que no se fosforilan en plantas. Por esta razón, la secuencia de CRI04 también fue sometida a análisis en la base de datos PhosPhAt 4.0 (Heazlewood *et al.*, 2008; Durek *et al.*, 2010), donde se encuentra recopilado el total de sitios de fosforilación de proteínas de arabisopsis identificados *in vivo* por distintos grupos de investigación en diferentes trabajos. Los resultados de PhosPhAt 4.0 predicen 13 residuos de serina, 23 residuos de treonina y 3 de tirosina con una elevada probabilidad de ser fosforilados *in vivo* (Figura 27).

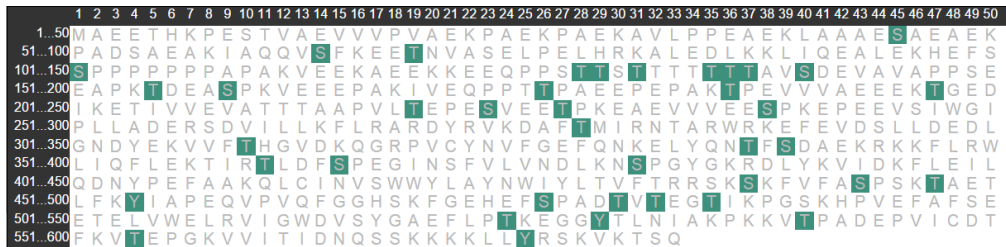


Figura 27: Predicción de sitios de fosforilación en CRI04 con PhosPhAt 4.0.

Estos resultados indican un elevado número de potenciales sitios de fosforilación en CRI04, lo que es especialmente interesante si tenemos en cuenta los resultados de otros estudios que han descrito varios sitios de fosforilación en las PATLs de *Arabidopsis thaliana*. La fosforilación de dichos residuos juega un papel relevante en la función de las PATLs en respuesta a distintos estímulos como estrés salino (Hsu *et al.*, 2009), hormonas (Chen *et al.*, 2010) y también en un estudio que identifica proteínas de arabisopsis asociadas al núcleo (Jones *et al.*, 2009). Estos datos abren la posibilidad a pensar en un posible papel de CRI04 en la señalización frente a diferentes estímulos.

Para predecir qué tipo de proteína es CRI04 y por tanto cual puede ser su función, se realizó una búsqueda de dominios proteicos conservados usando las herramientas bioinformáticas ScanProsite (ScanProsite-ExPASy; De Castro *et al.*, 2006) e InterProScan (InterProScan-EMBL-EBI; Jones *et al.*, 2014). Esto permitió confirmar la presencia de los dominios Sec14 y GOLD en el extremo C-terminal.

Como se ha comentado anteriormente, CRIO4 posee la misma estructura de dominios que las PATLs de *Arabidopsis thaliana* (Figura 28).

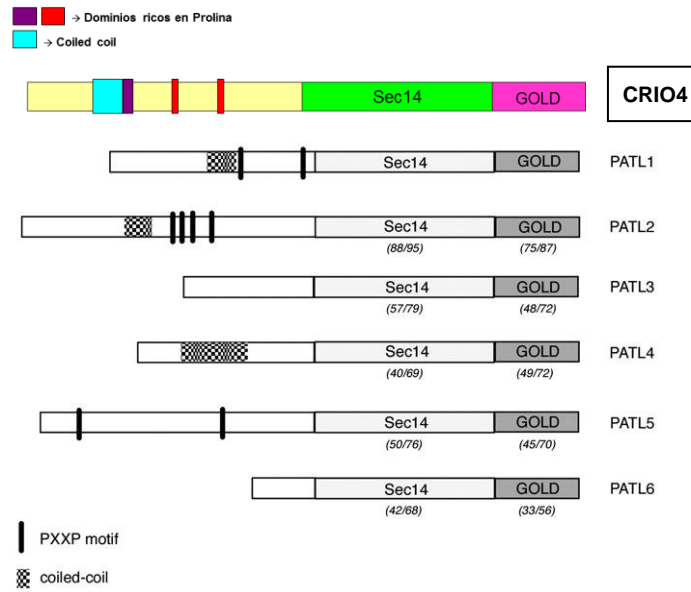


Figura 28: Diagrama de la estructura de dominios de CRIO4 comparada con la de las PATLs en Arabidopsis.  
 Fuente: Peterman *et al.*, 2004a.

En la Figura 25 se puede observar que, dentro del dominio Sec14 de CRIO4, están conservados los tres residuos (E, K, G) que son críticos para la unión y transferencia de fosfolípidos en Sec14p de levadura, y que también conservan las PATLs (Peterman *et al.*, 2004a). Además, como se ha comentado en la introducción, la R266 de PATL1 es el residuo que más probablemente otorgue la especificidad de interacción con PI(5)P (Ferris *et al.*, 2010). Éste fosfoinosítido, tiene un papel crítico en la señalización celular (Alvarez-Venegas *et al.*, 2006; Shisheva, 2013), y como se muestra en la (Figura 29), este mismo residuo de arginina también está conservado en CRIO4. Este resultado podría sugerir una función de CRIO4 en señalización, si futuros ensayos confirman su capacidad de unión con PI(5)P.

```

CRIO4  EPEEVSIIWGIPLLADERSDVILLKFLRAR
PATL1  EPEEVSIIWGVPLLQDERSDVILTKFLRAR
*****.**** ***** *****
    
```

Figura 29: Alineamiento de CRIO4 y PATL1 de Arabidopsis que muestra la R266 de PATL1, que confiere especificidad de unión a PI(5)P, y como este residuo también está conservado en CRIO4.

En el extremo C-terminal de CRIO4 se encuentra un dominio GOLD. Este dominio, que se caracteriza por ser rico en láminas  $\beta$ , se encuentra en proteínas que tienen una función relacionada con el complejo Golgi, y la clasificación o secreción de proteínas, donde está implicado en interacciones proteína-proteína (Anantharaman y Aravind, 2002). Existen dos categorías de proteínas que contienen el dominio GOLD. Por un lado, este dominio se encuentra aislado, en algunas proteínas como las proteínas tipo p24. En la segunda categoría de proteínas, el dominio GOLD se encuentra asociado a diversos dominios de unión a lípidos o asociados a membrana, tales como Sec14 (Aravind *et al.*, 1999), FYVE (Stenmark y Aasland, 1999) y PH (Haslam *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993). Dentro de esta segunda categoría, el

## Resultados

dominio GOLD se localiza en los extremos de la proteína, tanto en el N-terminal (como la proteína Osh3p de levadura), como en el extremo C-terminal (proteínas tipo Sec14 y tipo FYVE). Algunas de las proteínas con dominio GOLD, como FYCO1, las proteínas tipo p24, y PATL1, PATL2 y PATL4 (Figura 28), también contienen regiones *Coiled coil*, lo que podría facilitar la formación de oligómeros ayudando a generar multitud de interacciones con diferentes ligandos. Se ha sugerido que las proteínas que contienen el dominio GOLD junto con otros dominios de unión a lípidos o membrana, podrían actuar como adaptadores dobles ayudando al ensamblaje de complejos proteicos en las membranas o colocando moléculas específicas en la membrana de vesículas transportadoras (Anantharaman y Aravind, 2002).

Por otro lado, la región N-terminal de la proteína CRIO4 contiene dos tipos diferentes de motivos ricos en prolina: dos motivos PXXP y un motivo Poliprolina. Se ha descrito que los dominios SH3 se unen a las secuencias PXXP (Feng *et al.*, 1994). Los dominios SH3 participan en interacciones proteína-proteína implicadas en dinámicas de citoesqueleto, rutas de señalización tirosina quinasa y tráfico vesicular (Kay *et al.*, 2000).

| Protein <sup>a</sup>  | Species <sup>b</sup> | Sequence(s) <sup>c</sup> | Accession No. <sup>d</sup> |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>PRM1 consensus</b> |                      | <b>XPPPPP</b>            |                            |
| VASP                  | Hs                   | <b>GPPPPP (X4)</b>       | S51797                     |
| Mena                  | Mm                   | <b>APPPPPP</b>           | U72520                     |
|                       |                      | <b>GPPPPPP</b>           |                            |
|                       |                      | <b>GPPPPPPPPP</b>        |                            |
|                       |                      | <b>APPPPPPPP</b>         |                            |
| EVL                   | Mm                   | <b>GPPPPPPPPP</b>        | U72519                     |
| WASP                  | Hs                   | <b>LPPPPPP</b>           | A55197                     |
|                       |                      | <b>GPPPPPP</b>           |                            |
|                       |                      | <b>LPPPPPP</b>           |                            |
| hDia1                 | Hs                   | <b>IPPPPP (X5)</b>       | O60610                     |
| Formin                | Mm                   | <b>IPPPPP</b>            | Q05860                     |
|                       |                      | <b>SPPPPPPPPPP</b>       |                            |
|                       |                      | <b>GPPPPPPPPP (X2)</b>   |                            |
|                       |                      | <b>APPPPP</b>            |                            |
| Ezrin                 | Hs                   | <b>APPPPPPP</b>          | A34400                     |
| WIP                   | Hs                   | <b>APPPPP (X2)</b>       | NP_003378                  |
|                       |                      | <b>LPPPPPP</b>           |                            |
| Zyxin                 | Hs                   | <b>IPPPPP</b>            | G02845                     |
| Drebrin 1             | Hs                   | <b>LPPPPPP</b>           | NP_004386                  |
| Gephyrin              | Hs                   | <b>LPSPPPP</b>           | CAC10537                   |
| <b>PRM2 consensus</b> |                      | <b>XXXXFPPPPXXXX</b>     |                            |
| ActA                  | Lm                   | <b>NASDFPPPTDEE</b>      | B43868                     |
|                       |                      | <b>SSPEFPPPTDEE</b>      |                            |
|                       |                      | <b>SSPEFPPPTDEE</b>      |                            |
|                       |                      | <b>NFSDFPPIPTEEE</b>     |                            |
| Zyxin                 | Hs                   | <b>PEDEFLPPPLA</b>       | G02845                     |
|                       |                      | <b>LGGAFFPPPIE</b>       |                            |
|                       |                      | <b>EEEIFPSPPPE</b>       |                            |
| Vinculin              | Hs                   | <b>QEPDFPPPPDLE</b>      | M33308                     |
| Fyb                   | Hs                   | <b>SGGIFPPPPDDDI</b>     | AAF62400                   |
|                       |                      | <b>EGSSFFAPPKQLD</b>     |                            |
|                       |                      | <b>SKPTFWPPGNKP</b>      |                            |
| WIP                   | Hs                   | <b>FISDLPPPEPYVQ</b>     | NP_003378                  |
| <b>PRM3 consensus</b> |                      | <b>**PXXP**</b>          |                            |
| <b>PRM4 consensus</b> |                      | <b>PPLP</b>              |                            |
| <b>PRM5 consensus</b> |                      | <b>PPXY</b>              |                            |
| <b>PRM6 consensus</b> |                      | <b>PSP</b>               |                            |

Tabla 4: Tipos de motivos ricos en prolina. Encuadrados en rojo, los motivos que se encuentran en la proteína CRIO4. Fuente: Holt y Koffer, 2001.

El motivo poliprolina que contiene CRIO4 coincide con la secuencia consenso de motivos poliprolina (Tabla 4) que se han encontrado en todas las proteínas a las que se une la profilina (Holt y Koffer, 2001). La profilina es una proteína de unión a actina involucrada en el equilibrio dinámico de ensamblaje del citoesqueleto de actina (Holt y Koffer, 2001; Sun *et al.*, 2013).

Además de su unión a péptidos con repeticiones del aminoácido prolina, las profilinas también tienen la capacidad de unirse a fosfoinosítidos, lo que les permite interactuar con membranas. En plantas, se ha descrito la implicación de la profilinas en: la interacción entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática (Banno y Chua, 2000; Baluska *et al.*, 2001; Cheung y Wu 2004; Favery *et al.*, 2004; Ingouff *et al.*, 2005), el movimiento y localización de organelos mediado por el citoesqueleto de actina (Oikawa *et al.*, 2003; Schmidt von Braun y Schleiff, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011) y el transporte de vesículas (Aparicio-Fabre *et al.*, 2006; Takac *et al.*, 2011).

Se han usado distintos servidores de predicción de regiones *Coiled coil* para analizar la secuencia de CRIO4 en busca de uno de estos motivos. En primer lugar, se obtuvo una alta probabilidad de la existencia de un motivo *Coiled coil* mediante la herramienta bioinformática COILS/PCOILS (Biegert *et al.*, 2006) que posteriormente se confirmó con la herramienta bioinformática CCHMM (Fariselli *et al.*, 2007). En la Figura 25 se muestra la región *Coiled coil* comprendida entre los residuos K39 y E98 de la secuencia de aminoácidos de CRIO4, situándose hacia el extremo N-terminal. Los motivos *Coiled coil* se encuentran en aproximadamente el 10% de todas las proteínas (McFarlane *et al.*, 2009) y son responsables del plegamiento y la oligomerización de proteínas de una manera muy específica (Burkhard *et al.*, 2001). Las proteínas que contienen motivos *Coiled coil* muestran una gran diversidad de funciones estando implicadas, entre otros procesos, en regulación genética, división celular y fusión de membranas (McFarlane *et al.*, 2009). Esto demuestra la importancia de la oligomerización de proteínas en los sistemas biológicos.

Finalmente, la reciente secuenciación del genoma de remolacha en 2013, ha permitido conocer que el gen *CRIO4*, denominado LOC104898006 y descrito como patellin-3, se encuentra en el cromosoma 1 de *Beta vulgaris*, en la región NC\_025812.1, entre las coordenadas 1679580-1682912. La secuencia de ADN genómico comprende 3333 nucleótidos que engloban 4 exones en las posiciones (1-1426, 1758-1882, 2000-2141, 2770-3333) (Figura 30).

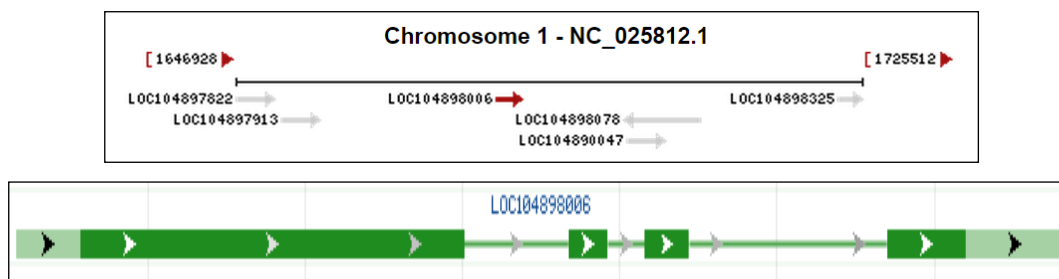


Figura 30: Localización del gen *CRIO4*, denominado LOC104898006, en el cromosoma 1 de remolacha (arriba) y estructura de exones e intrones del mismo gen (abajo). Fuente: GeneBank; Benson *et al.*, 2013.

#### 4.2- Estudio filogenético de *CRIO4*.

Con la intención de identificar los genes ortólogos a *CRIO4*, se realizó un análisis de similitud de secuencias con el programa BLASTp del NCBI (utilizando el algoritmo PSI-BLAST, que proporciona una mayor sensibilidad) en varias bases de datos de proteínas. De este modo se identificó en levadura el gen *SEC14* (*YMR079W*) en primera posición en el orden de homología y los miembros de la familia *SFH* en el siguiente orden: *SFH3* (*YNL231C*), *SFH1* (*YKL091C*), *SFH4* (*YNL264C*), *SFH5* (*YJL145W*) y *SFH2* (*YLR380W*) (Tabla 5). La familia de genes *SFH* (*Sec Fourteen Homologue*) (Li *et al.*, 2000), se caracteriza porque sus miembros son homólogos de *SEC14*.

| Gen                       | Score | p-valor | Identidad |
|---------------------------|-------|---------|-----------|
| <b>YMR079W</b> SEC14      | 67.8  | 6e-13   | 29%       |
| <b>YNL231C</b> SFH3/PDR16 | 67.4  | 1e-12   | 29%       |
| <b>YKL091C</b> SFH1       | 58.9  | 6e-10   | 27%       |
| <b>YNL264C</b> SFH4/PDR17 | 48.9  | 9e-07   | 25%       |
| <b>YJL145W</b> SFH5       | 46.2  | 7e-06   | 25%       |
| <b>YLR380W</b> SFH2/CSR1  | 40.0  | 7e-04   | 21%       |

Tabla 5: Ortólogos de *CRIO4* en *Saccharomyces cerevisiae*. Fuente: NCBI-BLASTp.

Del mismo modo, el programa BLASTp permitió identificar como ortólogos de *CRIO4* en *Arabidopsis thaliana*, a la familia de las Patelinas cuyos genes aparecen en el siguiente orden de homología: *PATL3* (At1g72160), *PATL2* (At1g22530), *PATL5* (At4g09160), *PATL1* (At1g72150), *PATL4* (At1g30690) y *PATL6* (At3g51670) (Tabla 6). Estos mismos datos fueron corroborados mediante un alineamiento con la herramienta WU-BLAST de la base de datos de *Arabidopsis thaliana* (TAIR).

Del total de los seis genes de la familia *PATLs*, cuatro de ellos se ubican en el cromosoma 1 (*PATL1*, *PATL2*, *PATL3* y *PATL4*), donde dos de ellos, *PATL1* (At1g72150) y *PATL3* (At1g72160) se sitúan en tándem. El hecho de que *PATL1* y *PATL3* se sitúen en tándem es especialmente notable si se tiene en cuenta que estos genes parecen tener redundancia funcional y muestran un patrón de expresión solapante (ver apartado 1.3.2.1. de Introducción). Los restantes dos genes de la familia *PATLs* se disponen uno en el cromosoma 3 (*PATL6*) y otro en el cromosoma 4 (*PATL5*).

La herramienta bioinformática Clustal Omega (EMBL-EBI; Goujon *et al.*, 2010) permite obtener árboles filogenéticos basados en homología de secuencias. Se sometió a análisis con Clustal Omega el conjunto de las secuencias de todas las *PATLs* de *Arabidopsis thaliana* y de *CRIO4* y el árbol filogenético generado se muestra en la Figura 31.

Las *PATLs* se encuentran agrupadas en 4 ramas diferentes del análisis filogenético de las *PATLs* de plantas (Figura 15). En cuanto a homología, *CRIO4* parece ser más cercano a *PATL3*, estando *PATL3* y *PATL5* en la misma rama del árbol filogenético. Sin embargo, el análisis filogenético enmarca a *CRIO4* más próximo a la rama de *PATL1* y *PATL2*.

## Resultados

| Gen  | Score | p-valor | Identidad |
|--|-------|---------|-----------|
| AT1G72160 PATL3  | 483   | 1e-147  | 60%       |
| AT1G22530 PATL2  | 424   | 3e-139  | 58%       |
| AT4G09160 PATL5  | 419   | 2e-137  | 56%       |
| AT1G72150 PATL1  | 399   | 4e-131  | 48%       |
| AT1G30690 PATL4  | 326   | 2e-103  | 38%       |
| AT3G51670 PATL6  | 292   | 6e-92   | 43%       |
| AT1G19650 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 68.2  | 7e-12   | 28%       |
| AT3G24840 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 67.4  | 1e-11   | 26%       |
| AT2G21520 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 66.6  | 2e-11   | 28%       |
| AT4G34580 ATSFH1/COW1/SRH1   | 65.9  | 3e-11   | 25%       |
| AT4G08690 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 64.3  | 4e-11   | 25%       |
| AT2G21540 ATSFH3/SEC14-LIKE 3/SFH3                                 | 64.3  | 9e-11   | 25%       |
| AT2G18180 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 62.4  | 4e-10   | 25%       |
| AT2G16380 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 62.4  | 5e-10   | 24%       |
| AT4G36490 ATSFH12/SEC14-LIKE 12/SFH12                              | 61.2  | 8e-10   | 25%       |
| AT4G39170 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 60.8  | 1e-09   | 25%       |
| AT1G75370 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 60.8  | 2e-09   | 25%       |
| AT4G39180 ATSEC14  | 59.7  | 3e-09   | 24%       |
| AT5G47510 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 52.4  | 4e-07   | 25%       |
| AT1G55690 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 49.7  | 4e-06   | 31%       |
| AT3G22410 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 47.0  | 2e-05   | 25%       |
| AT5G56160 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 46.6  | 4e-05   | 26%       |
| AT5G47730 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 42.0  | 8e-04   | 36%       |
| AT4G36640 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 39.3  | 0.004   | 24%       |
| AT1G55840 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 38.9  | 0.007   | 36%       |

Tabla 6: Ortólogos de *CRIO4* en *Arabidopsis thaliana*. Fuente: NCBI-BLASTp.

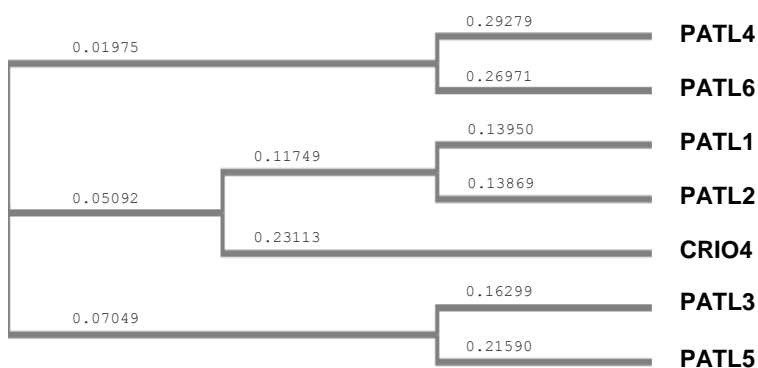


Figura 31: Cladograma de *CRIO4* y la familia *PATLs*, a partir de secuencias aminoacídicas. Fuente: Clustal Omega EMBL-EBI (Goujon *et al.*, 2010).



### 4.3- Caracterización Bioquímica de CRIO4.

#### 4.3.1- Ensayo de complementación a *SEC14* de levadura.

Con el fin de evaluar la función de CRIO4 se realizó un ensayo de complementación a Sec14p en levadura. En este ensayo se utilizó la cepa de levadura CTY1-1A que contiene un alelo termosensible del gen *SEC14* (*sec14-1<sup>ts</sup>*), puesto que este gen es esencial en levadura y su mutación es letal. El alelo *sec14-1<sup>ts</sup>* permite a esta cepa crecer a temperatura de crecimiento óptima (28°C), pero a temperaturas superiores su crecimiento se ve inhibido. La cepa CTY1-1A fue transformada con el plásmido pYPGE15-CRIO4, para sobreexpresar el gen CRIO4. El ensayo de crecimiento se realizó sobre placas con medio YPDA, y se incubó a 28°C y a 37°C (Figura 32, cuadrante superior derecho).

Como controles positivos de crecimiento se utilizó la cepa silvestre CTY182 transformada con el plásmido pYPGE15 vacío (Figura 32, cuadrante superior izquierdo), y la cepa CTY1-1A transformada con el plásmido pYEplac195-*SEC14*, que contiene el gen *SEC14* (Figura 32, cuadrante inferior izquierdo). Como control negativo se transformó la cepa CTY1-1A con el plásmido pYPGE15 vacío (Figura 32, cuadrante inferior derecho).

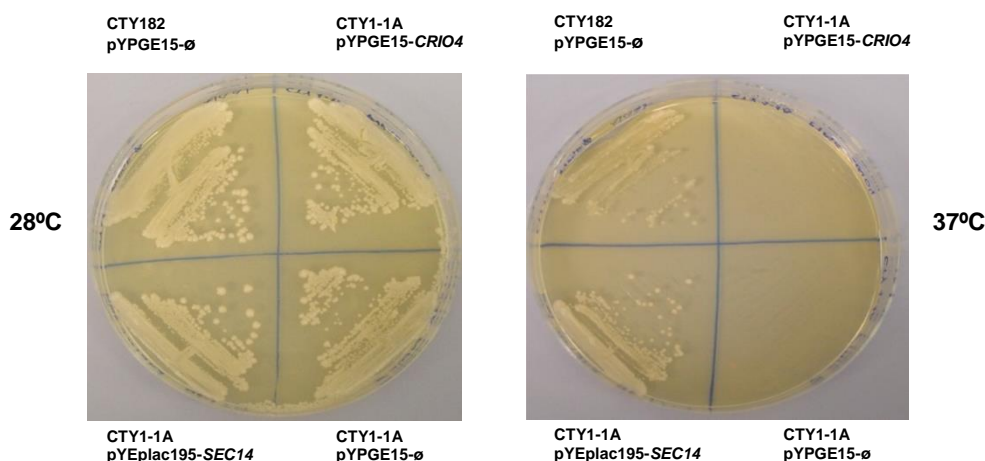


Figura 32: Ensayo de complementación a Sec14p de levadura con CRIO4.

El resultado de este ensayo muestra claramente que CRIO4 no complementa a Sec14p de levadura. No obstante, pese a ser genes ortólogos, la estructura de dominios de la proteína CRIO4 muestra una mayor complejidad que Sec14p. CRIO4, además del dominio Sec14, presenta un amplio extremo N-terminal que contiene varios motivos y un dominio GOLD en el extremo C-terminal. Estas diferencias estructurales podrían interferir en la actividad de CRIO4 e imposibilitar su complementación de la función de Sec14p en levadura.

Esto motivó la realización de un nuevo ensayo de complementación a Sec14p conteniendo, además de las transformaciones expuestas anteriormente, la cepa CTY1-1A transformada con el plásmido pYPGE15-SEC14 (CRIO4) que contiene la secuencia que codifica el dominio Sec14 de la proteína codificada por el gen CRIO4. En esta ocasión, el ensayo de complementación se realizó en medio YPDA líquido partiendo de 1,5 mL de cultivo a una OD=0,1. Los cultivos, previamente crecidos a 28°C, se incubaron durante una noche a

32°C, 34°C y 36°C, en agitación suave, y los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 33.

Estos resultados finales confirman que ni CRI04, ni una versión truncada de esta proteína que solo contiene su dominio Sec14, son capaces de complementar a Sec14p de levadura.

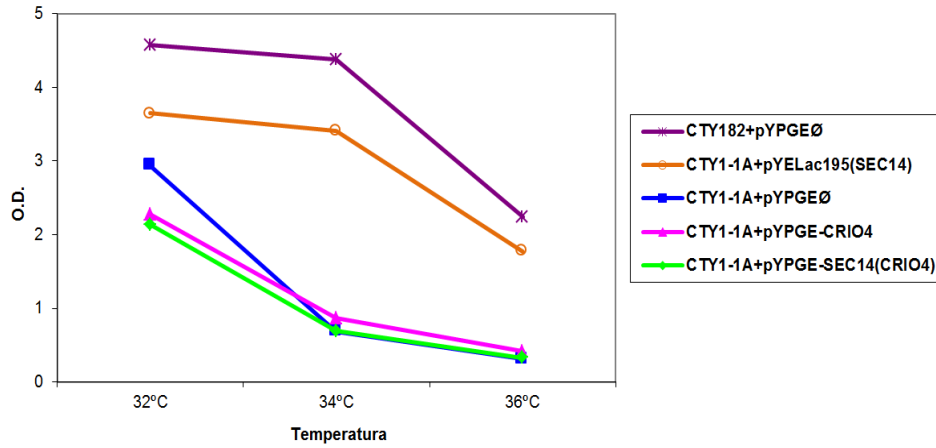


Figura 33: Gráfica del ensayo de complementación a Sec14p de levadura con el dominio Sec14 de CRI04, en medio líquido.

#### 4.3.2- Fenotipo de la sobreexpresión de *CRI04* en levadura.

Además de la mencionada tolerancia al frío conferida por la sobreexpresión de *CRI04* en levadura, para encontrar fenotipos adicionales de la sobreexpresión de *CRI04*, se realizaron estudios de crecimiento de levaduras sometidas a distintos estreses. El crecimiento de la cepa de levadura W303-1A transformada con el plásmido pYPGE15-*CRI04*, se analizó mediante goteos sobre placas petri que contenían los distintos medios de cultivo indicados en la tabla de la Figura 34 y se incubaron a 28°C. Como control se usó la misma cepa transformada con el plásmido pYPGE15 vacío.

|                                |                               |
|--------------------------------|-------------------------------|
| YPD + 0.1 M CaCl <sub>2</sub>  | YPD + 0.8 µg/mL Canavanina    |
| YPD + 0.12 M CaCl <sub>2</sub> | YPD + 1 µg/mL Canavanina      |
| YPD + 0.15 M CaCl <sub>2</sub> | YPD + 0.25 µg/mL Tunicamicina |
| YPD + 0.2 M CaCl <sub>2</sub>  | YPD + 0.5 µg/mL Tunicamicina  |
| YPD + 0.15 M NaCl              | YPD + 20 mM β-Mercaptoetanol  |
| YPD + 0.2 M NaCl               | YPD + 35 mM β-Mercaptoetanol  |
| YPD + 1 M NaCl                 | YPD + 40 mM β-Mercaptoetanol  |
| YPD + 0.1 M LiCl               | YP EtOH 2%                    |
| YPD + 0.15 M LiCl              | YP EtOH 3%                    |
| YPD + 0.2 M LiCl               | YP Gal 2%                     |
| YPD + 0.35 M LiCl              | YP Glicerol 2%                |
| YPD pH 7                       | YP Glicina 3M                 |
| YPD pH 7.5                     | DTE 8 mM                      |
| YPD pH 8                       | YPD + 3 mM t-BOOH             |
| YPD pH 9                       |                               |

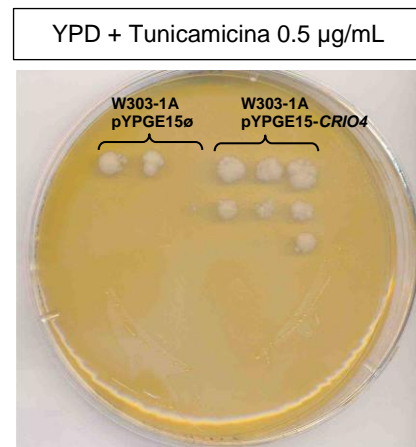


Figura 34: Medios de cultivo empleados en la búsqueda de fenotipo de la sobreexpresión de *CRI04* en levadura.

De entre todos los medios de cultivo empleados solamente se observó tolerancia a tunicamicina obtenida por la sobreexpresión de *CRIO4* en levadura (Figura 34). La tunicamicina es un antibiótico y antiviral, obtenido de *Streptomyces lysosuperificus*, que contiene N-acetilglucosamina e inhibe la glicosilación de las proteínas. Los carbohidratos de las glicoproteínas tienen, entre otras, funciones relacionadas con el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso, y se ha descrito que la adición de tunicamicina puede inducir la respuesta a proteínas desplegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR, en inglés), que es una respuesta especializada causada por desnaturalización de proteínas en el retículo endoplasmático (Korenykh y Walter, 2012).

#### 4.3.3- Ensayo de unión a fosfolípidos.

Para caracterizar funcionalmente el dominio Sec14 de CRIO4 se quiso explorar la capacidad de CRIO4 de interactuar con fosfolípidos, y para esto se realizó un ensayo de cosedimentación con vesículas formadas por distintos fosfolípidos.

Previamente, para purificar la proteína recombinante CRIO4 se transformó la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* con el plásmido pCM259-CRIO4. En primer lugar se realizó una cinética de inducción proteica y se purificó la proteína CRIO4 mediante una extracción rápida (método descrito en el apartado 3.11.1.1 de Materiales y Métodos), que permitió determinar el tiempo de mejor expresión proteica tras 3 horas de inducción. Este fue el periodo de tiempo seleccionado para realizar la purificación de la proteína CRIO4 mediante resina cargada con níquel (método descrito en el apartado 3.11.1.2 de Materiales y Métodos).

La proteína CRIO4 purificada se sometió a análisis *Western Blot* (apartado 3.11.3 de Materiales y Métodos) y pese a no poder percibirse visualmente en el gel tras la tinción con Coomassie, sí se pudo detectar la proteína tras su transferencia a membrana y posterior inmunodetección (Figura 35).

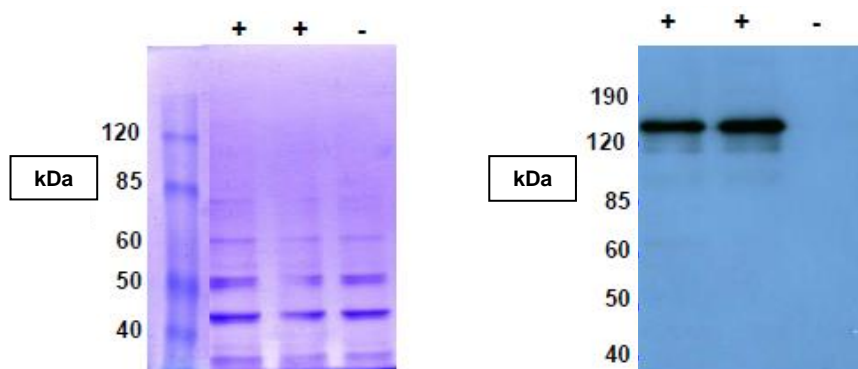


Figura 35: *Western Blot* de la proteína CRIO4 purificada mediante resina cargada con níquel. Gel de SDS-PAGE tras tinción con Coomassie (izquierda). Película revelada por quimioluminiscencia tras la inmunodetección (derecha). En las imágenes se muestra la purificación proteica a partir de dos colonias diferentes de levadura W303-1A transformadas con el plásmido pCM259-CRIO4 (+), y a partir de una colonia de levadura W303-1A transformada con el plásmido pCM259 vacío (-), que se utilizó como control negativo de la expresión de *CRIO4*.

No obstante, pese a tener un peso molecular estimado de 65,33 kDa, la proteína CRI04 se desplaza en el gel de electroforesis con una masa molecular superior a 120 kDa. Si bien esta masa aparente podría indicar una dimerización, lo más probable es que sea una migración anómala debido al carácter ácido de la proteína CRI04 (pI 4,88). Las migraciones anómalas de proteínas ácidas en geles SDS son comunes (Armstrong y Roman, 1993; Sedbrook *et al.*, 2002) y en estudios anteriores se ha descrito la misma alteración en PATL1 (Peterman *et al.*, 2004a; Minami *et al.*, 2009). Es más, esta migración anómala desaparece si se elimina el dominio N-terminal en PATL1 (Peterman *et al.*, 2004a).

Una vez purificada la proteína se cuantificó por el método Bradford (apartado 3.11.2 de Materiales y Métodos) y se realizó un ensayo de unión a fosfolípidos siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.12 de Materiales y Métodos (Figura 36).

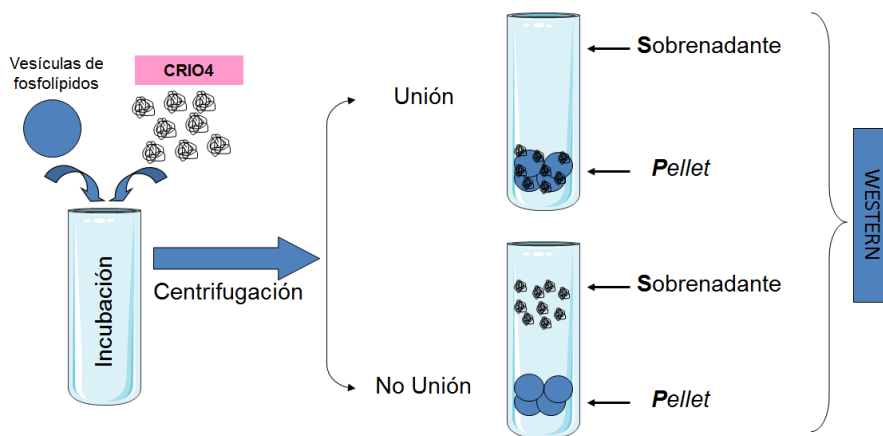


Figura 36: Esquema del ensayo de unión a fosfolípidos.

En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos con CRI04 comparándolos con los resultados que Peterman *et al.* (2004a) obtuvo con PATL1. CRI04, del mismo modo que PATL1, se une principalmente a fosfatidilinositol. Sin embargo a diferencia de PATL1, CRI04 se une también a fosfatidiletanolamina, aunque en menor grado, y no establece unión con fosfatidilcolina.

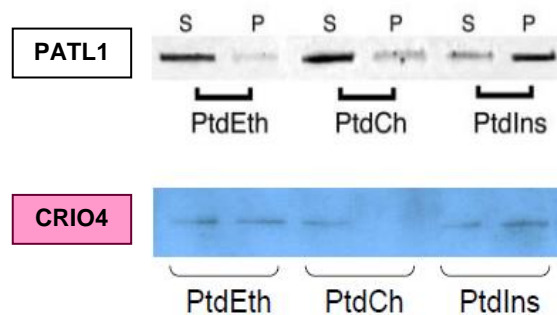


Figura 37: Unión a fosfolípidos de CRI04, comparada con PATL1.

#### 4.4- Localización subcelular de CRIO4.

##### 4.4.1- Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

El análisis de la localización subcelular de CRIO4 se inició con un estudio de la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

En primer lugar, se realizaron dos transformaciones diferentes de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK, una con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP, para sobreexpresar una versión de la proteína CRIO4 fusionada a la proteína verde fluorescente GFP, y otra transformación con el plásmido p19 para inhibir el silenciamiento génico. Las transformaciones de *A. tumefaciens* se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos.

Seguidamente, una mezcla de ambas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fue utilizada para transformar plantas de *Nicotiana benthamiana*, utilizando el método de agroinfiltración en hojas detallado en el apartado 3.8.2 de Materiales y Métodos. Entre 3 y 5 días después de la infiltración, se analizaron las hojas mediante microscopía confocal.

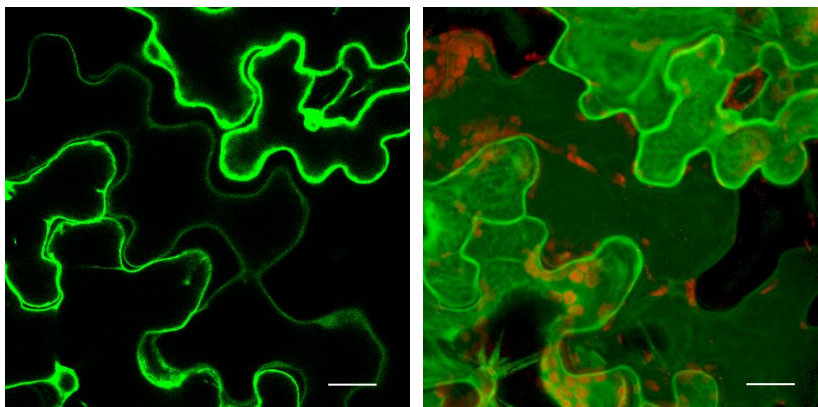


Figura 38: Expresión transitoria de *CRIO4* en células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Imagen de microscopía confocal. En verde se muestra la expresión de la fusión *CRIO4*::GFP y el color rojo corresponde a la autofluorescencia emitida por los cloroplastos. Fotografía simple en un plano (izquierda) y proyección de una serie de fotografías tomadas a lo largo de varios planos (derecha), de las mismas células. Las barras indican una longitud de 20  $\mu\text{m}$ .

Los resultados muestran una expresión de *CRIO4* asociada a la membrana plasmática (Figura 38), tal y como se esperaba puesto que las proteínas codificadas por los ortólogos de *CRIO4*, *SEC14* y *PATL1*, han sido descritas con anterioridad como proteínas de la periferia de la membrana (Peterman *et al.*, 2004a). Tampoco se descarta la asociación de *CRIO4* a la membrana vacuolar, aunque es difícil su observación puesto que el citoplasma de estas células es muy pequeño. Sería necesario realizar análisis de coexpresión con marcadores de la membrana vacuolar para poder confirmar o descartar esta posibilidad.

Además, *CRIO4* también parece formar una estructura reticular en el interior de la célula. Este tipo de estructura ha sido descrita como asociada al retículo endoplasmático y estudios adicionales de coexpresión con proteínas marcadoras del retículo serían necesarios para confirmar esa posible colocalización.

#### 4.4.2- Transfección protoplastos de *Nicotiana benthamiana*.

En una segunda aproximación al estudio de la localización subcelular de CRIO4, se realizó una transfección de protoplastos de *Nicotiana benthamiana*. En primer lugar, se aislaron protoplastos de hojas de *N. benthamiana* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.8.3 de Materiales y Métodos. Posteriormente, los protoplastos obtenidos fueron transfectados con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP siguiendo el método de transfección descrito en el apartado 3.8.4 de Materiales y Métodos.

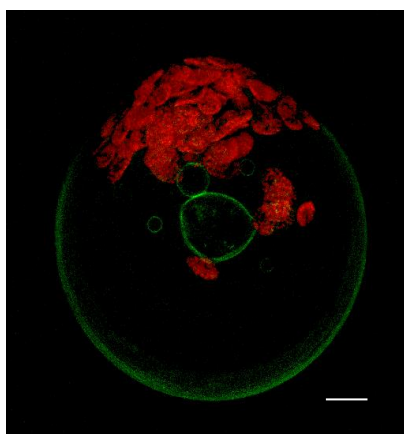


Figura 39: Protoplastos de *Nicotiana benthamiana* transfectados con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP. Imagen de microscopía confocal. En verde se muestra la expresión de la fusión CRIO4::GFP y el color rojo corresponde a la autofluorescencia emitida por los cloroplastos. La barra indica una longitud de 8  $\mu$ m.

Este análisis mostró de nuevo la asociación de CRIO4 con la membrana plasmática, confirmando los resultados obtenidos con la expresión transitoria mediante agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana* descritos en el apartado anterior. Así mismo, en la Figura 39 se observa nítidamente la expresión de CRIO4 en membranas intracelulares, formando parte de vesículas de distintos tamaños y claramente definidas. Este resultado da pie a intuir un papel de CRIO4 en el tráfico intracelular, función que estaría en sintonía con la de sus ortólogos, anteriormente descrita en la Introducción.

#### 4.4.3- *Arabidopsis thaliana*, líneas de sobreexpresión de CRIO4.

Para continuar con el estudio de la localización subcelular de CRIO4, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan, de forma estable, una fusión de la proteína CRIO4 y la proteína verde fluorescente GFP. Para ello, se empleó el protocolo de transformación mediante infiltración floral detallado en el apartado 3.4.5 de Materiales y Métodos. En esta transformación se usó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK (apartado 3.1.5 Materiales y Métodos) transformada con el plásmido pJM729-CRIO4::GFP, para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Tras la selección de las líneas transgénicas estables se analizó mediante microscopía confocal la radícula de plántulas de 5 días tras la germinación, sometidas a crecimiento en vertical y a 24°C. En este caso, se optó por analizar raíces para evitar los problemas derivados de la autofluorescencia de los cloroplastos en las hojas.

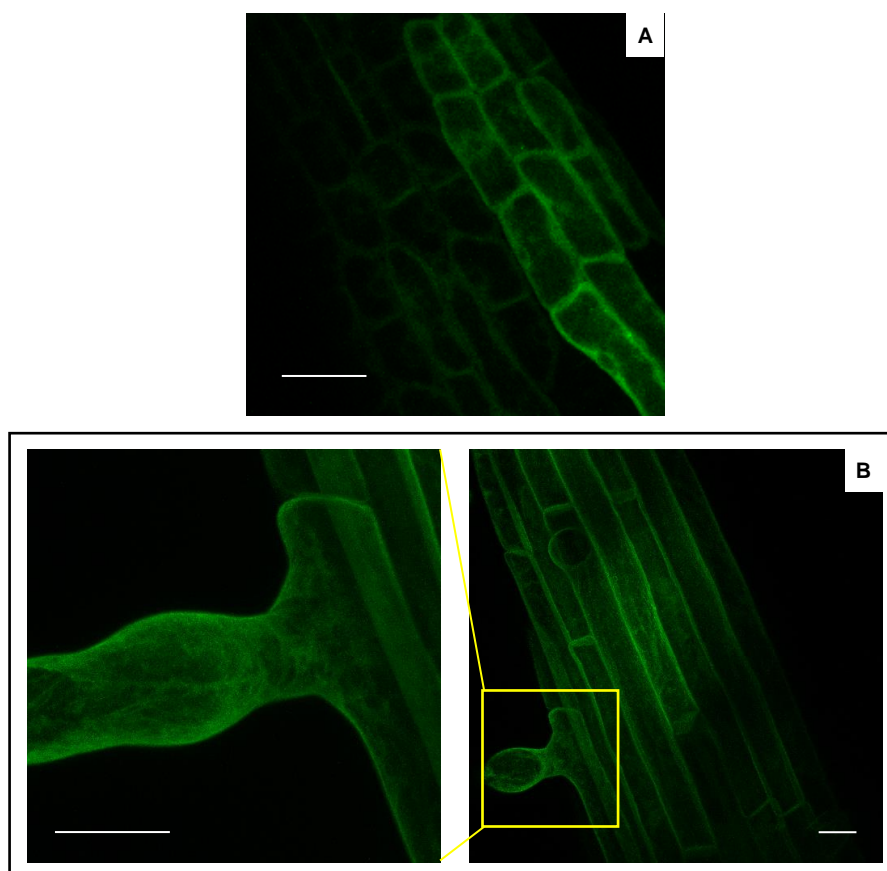


Figura 40: Expresión de la fusión CRI04::GFP en líneas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana*. Imagen de microscopía confocal. En verde se muestra la expresión de la fusión CRI04::GFP. Fotografía simple en un plano (A) y proyección de una serie de fotografías tomadas a lo largo de varios planos (B), tomadas en células diferentes. Las barras indican una longitud de 20  $\mu$ m.

En la Figura 40 A se observa que CRI04 se localiza preferentemente en la zona adyacente a la membrana plasmática, y también parece estar rodeando a la membrana nuclear. Al hacer una proyección de una serie de imágenes tomadas en distintos planos de una célula (Figura 40 B) se puede observar como CRI04, además de estar asociada a la membrana plasmática, también se localiza en el citoplasma, donde parece establecer un patrón reticular. Este patrón es similar al observado en la expresión transitoria de *CRI04* en hojas de *Nicotiana benthamiana*, mostrado anteriormente en el apartado 4.1 de Resultados.

Cabe destacar la mayor expresión de CRI04 en el tejido vascular de la raíz (Figura 41). Este resultado tendría sentido si se toma en consideración los datos obtenidos por Rackaityte (2013) donde se describe la expresión de *PATL1* y *PATL2* en tejidos vasculares, sugiriendo además la implicación de estas proteínas en el establecimiento del patrón vascular a través de su posible interacción con auxinas.

Otro apunte se refiere a la observación puntual de ciertas agrupaciones de CRI04, que en la Figura 41 se muestran como pequeños punteados aislados. En un principio esta observación

no fue tomada en cuenta, sin embargo, a raíz de los datos de Minami *et al.* (2009) que describen la asociación a balsas lipídicas de las PATLs, y de los datos de la expresión de *CRIO4* tras un choque térmico que se muestran más adelante (apartado 6.3 de Resultados), sería interesante retomar el estudio de éstas agrupaciones de *CRIO4*, a través quizás, del análisis de su posible asociación a balsas lipídicas.

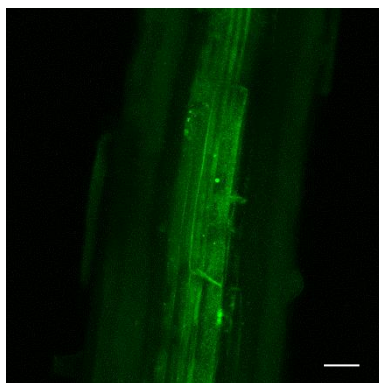


Figura 41: Expresión de *CRIO4* en tejido vascular de raíces de *Arabidopsis thaliana*, y acúmulos puntuales de *CRIO4*. Imagen de microscopía confocal. En verde se muestra la expresión de la fusión *CRIO4::GFP*. La barra indica una longitud de 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5- Coexpresión con *TAT2* en levadura.

Para evaluar si la expresión de *CRIO4* podía afectar a la localización de Tat2p, y por tanto a la absorción de triptófano, se estudió la coexpresión de Tat2p y *CRIO4* en levadura. Para ello, se usó la cepa de levadura W303 transformada con los plásmidos pYCplac111-TAT2::GFP y pYPGE15-CRIO4. Y como control de la expresión de Tat2p, se usó la cepa de levadura W303 transformada con el plásmido pYCplac111-TAT2::GFP. Las células se crecieron en agitación durante una noche a 28°C, en medio SD-L+U+H+W (cepa W303 transformada con pYCplac111-TAT2::GFP) o en medio SD-L-U+H+W (cepa W303 transformada con pYCplac111-TAT2::GFP y pYPGE15-CRIO4) para inducir su crecimiento. Tras esto, se repartió cada cultivo en 4 tubos nuevos. Cada cultivo se lavó con agua estéril y después se añadió medio fresco con o sin triptófano, y se incubaron a 10°C o a 28°C. Las células crecidas a 28°C en medio sin triptófano fueron analizadas mediante microscopía confocal tras 3 horas de ayuno de triptófano. Las células crecidas a 10°C, con o sin triptófano, fueron analizadas mediante microscopía confocal tras 23 horas de cultivo a esta temperatura.

En células crecidas en las condiciones más favorables, a 28°C y con alta concentración de triptófano en el medio de cultivo, Tat2p se localiza en vacuola y compartimentos prevacuolares, tal y como era de esperar en base a los resultados de estudios previos (Figura 11). Pero cuando en estas mismas condiciones las células también sobreexpresan *CRIO4*, Tat2p se localiza tanto en la vacuola como en la membrana plasmática (Figura 42).



## Resultados

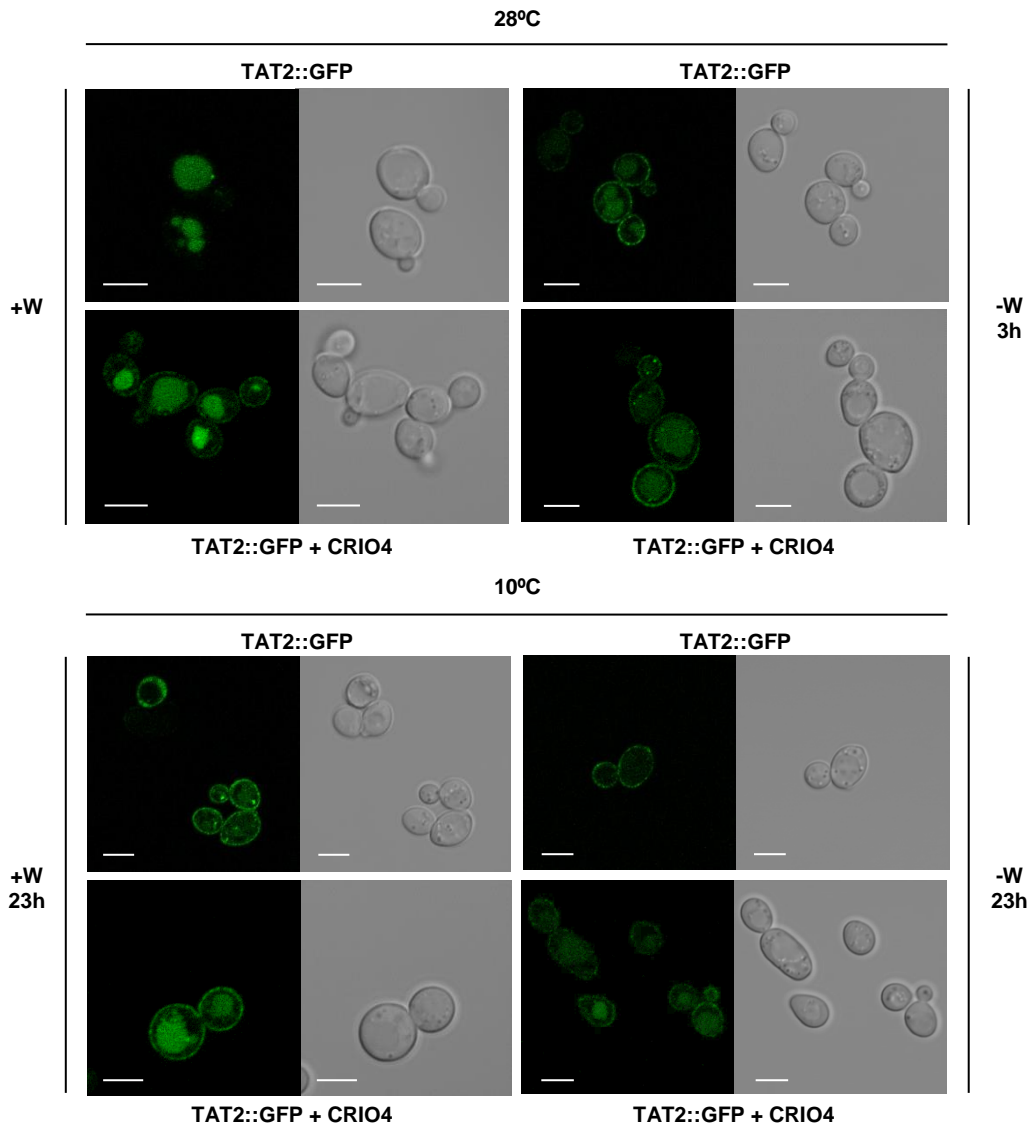


Figura 42. Coexpresión de TAT2::GFP y CRIO4, a 10°C (abajo) y 28°C (arriba), y en medios de cultivo que contienen triptófano (izquierda) o en condiciones de ayuno de éste (derecha). Las barras indican una longitud de 5  $\mu\text{m}$ .

A 28°C y en ayuno de triptófano, Tat2p se localiza principalmente en la membrana plasmática; y en las células que también sobreexpresan CRIO4, Tat2p se localiza en la vacuola y en la membrana plasmática con la misma intensidad.

En condiciones de estrés por frío, Tat2p va a la membrana plasmática en cualquier caso, pero ante la coexpresión con CRIO4, Tat2p se localiza también en la vacuola, especialmente si hay triptófano en el medio de cultivo. Parece haber además, una mayor expresión de Tat2p cuando coexpresa con CRIO4, especialmente a 10°C.

Los datos de este experimento parecen indicar una estimulación del transporte de Tat2p hacia la membrana plasmática por parte de CRIO4, sin afectar a la ruta de degradación vacuolar.

#### 4.6- Estudio Genético de *CRIO4*.

##### 4.6.1- Patrón de expresión en *Beta vulgaris*.

El estudio de la expresión de *CRIO4* en remolacha (*Beta vulgaris*) se basó en diversos análisis *Northern blot*. Para ello, se aisló el ARN usando el protocolo descrito en el apartado 3.9.10 de Materiales y Métodos. A partir del ARN purificado se realizó una electroforesis de ARN en condiciones no desnaturalizantes para observar la integridad del ARN aislado. Una vez confirmada su integridad, se realizó otra electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en base al protocolo del apartado 3.9.11 de Materiales y Métodos, tras la cual el ARN fue transferido a una membrana de nailon, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.9.13. Seguidamente, la membrana se incubó con una sonda radioactiva, la cual fue generada tal y como se explica en el apartado 3.9.12 de Materiales y Métodos.

En primer lugar se realizó un análisis *Northern* a partir de muestras de diferentes tejidos de plántulas de remolacha crecidas en las condiciones descritas en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. El resultado muestra que, si bien *CRIO4* se expresa en todos los tejidos analizados, su mayor expresión parece concentrarse en hoja y raíz (Figura 43). Por esta razón, se decidió tomar muestras de hojas en los siguientes ensayos de expresión en remolacha.

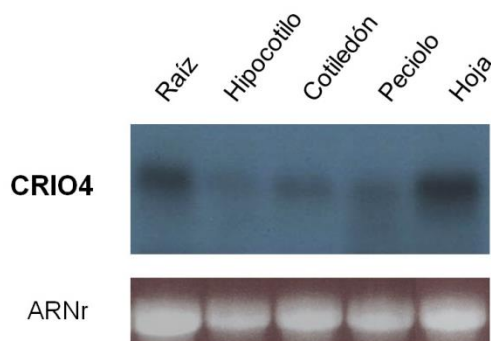


Figura 43: Expresión de *CRIO4* en diferentes tejidos de plántulas de remolacha. Análisis *Northern blot*.

En segundo lugar, se realizó un análisis *Northern* a partir de muestras de hojas de plantas de remolacha sometidas a diferentes condiciones de estrés: estrés por frío (4°C), estrés por calor (37°C) y estrés por sequía. En las condiciones de crecimiento a 4°C y 37°C, se recogieron muestras en los siguientes intervalos: 0h (control), 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 1 día, 2 días, 3 días, 5 días y 7 días. Para la condición de crecimiento bajo estrés por sequía, se tomó la primera muestra el día 0 (control) y se suspendió el riego. Las siguientes muestras fueron tomadas en los siguientes intervalos: 6, 8, 9, 10, 11 y 12 días.

Los resultados de la Figura 44 parecen indicar que la expresión de *CRIO4* aumenta a tiempos cortos de exposición al estrés, y disminuye tras exposiciones largas, tanto en estrés por frío como en estrés por calor. Sin embargo, nuevas réplicas experimentales serían necesarias para confirmar estas observaciones. En cuanto al estrés por sequía, la expresión de *CRIO4* presenta un patrón desigual, no pudiéndose obtener una conclusión clara.

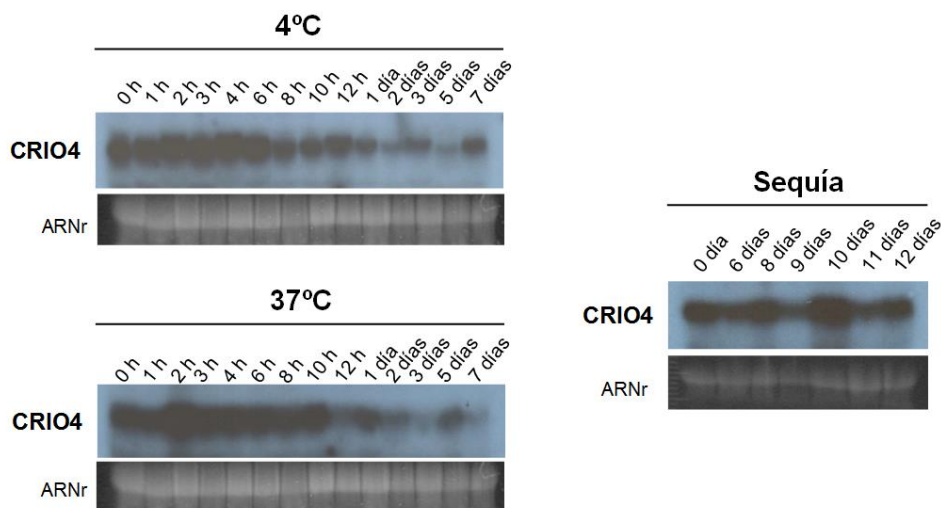


Figura 44: Expresión de *CRIO4* en hojas de remolacha, bajo condiciones de estrés por frío (4°C), estrés por calor (37°C) y estrés por sequía. Análisis *Northern blot*.

Por otra parte, en la literatura se describe la existencia de numerosos indicios de la conexión entre las rutas de señalización mediada por luz y frío, ésto motivó la realización de un análisis *Northern* a partir de muestras de hojas de plantas de remolacha crecidas en luz, oscuridad y luz azul, a diferentes intervalos de tiempo. El resultado, aunque un tanto irregular, parece mostrar un patrón de expresión de *CRIO4* oscilante, con un pico de expresión a las 6 horas en todos los tratamientos (Figura 45). Un patrón de expresión tal podría estar relacionado con una expresión en respuesta al ritmo circadiano.

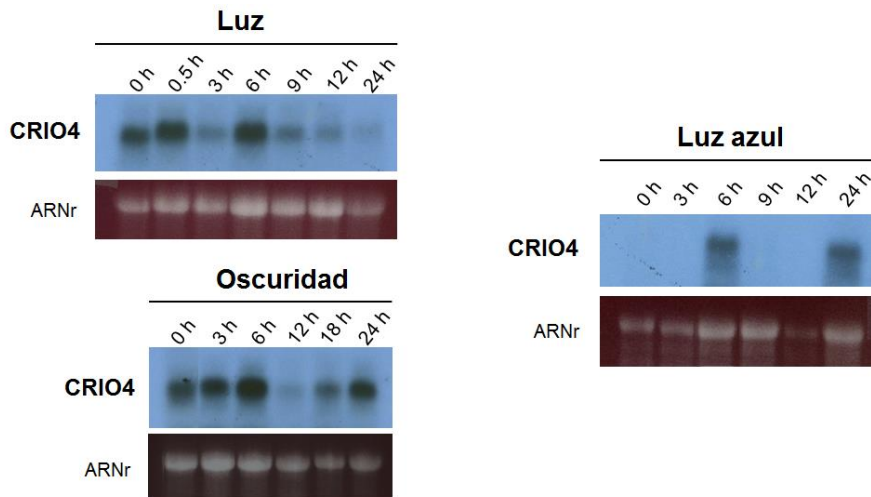


Figura 45: Expresión de *CRIO4* en hojas de remolacha, bajo condiciones de luz, oscuridad y luz azul. Análisis *Northern blot*.

#### 4.6.2- Fenotipo de pérdida de función de *Arabidopsis thaliana*.

Los genes ortólogos de *CRIO4* han sido previamente descritos (apartado 4.2 de Resultados). Entre éstos se encuentran los genes de la familia *PATL* de *Arabidopsis thaliana*. En primer lugar en orden de homología se encuentra *PATL3* y, en la Figura 15, se ha mostrado

un árbol filogenético que engloba a *PATL3* y *PATL5* en la misma rama. Por esta razón se optó por comenzar el estudio del fenotipo de pérdida de función en *Arabidopsis thaliana*, evaluando la disrupción de estos dos genes.

Para este estudio se han utilizado las líneas mutantes que se describen en la Figura 46. Estas líneas provienen de la colección del NASC (Nottigham *Arabidopsis* Stock Centre) y sus características han sido descritas en el apartado 3.1.2 de Materiales y Métodos.

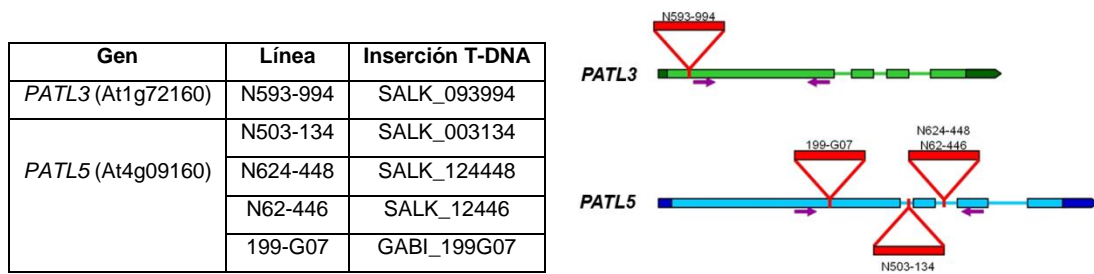


Figura 46: Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* empleadas. Las flechas púrpuras sobre el diagrama muestran la situación de los cebadores diseñados para el análisis de RT-PCR semicuantitativa.

Se genotipó varias plantas de cada línea mediante PCR diagnóstica según se explica en el apartado 3.9.14.3 de Materiales y Métodos, y se seleccionó líneas homocigotas mutantes para continuar con los ensayos. Después se realizó un análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa (apartado 3.9.14.4 de Materiales y Métodos) para comprobar si realmente eran mutantes de pérdida de función (Figura 47). Se observó la expresión que mostraban las líneas mutantes y finalmente, de entre aquellas que mostraban expresión nula, se eligió las líneas N593-994 (mutante para *PATL3*) y 199-G07 (mutante para *PATL5*) para obtener el doble mutante *patl3patl5* a través de fertilización cruzada (técnica detallada en el apartado 3.4.4 de Materiales y Métodos).

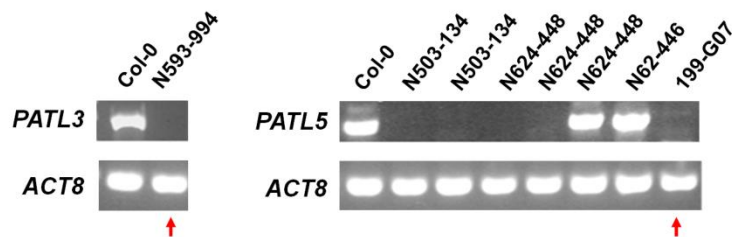


Figura 47: RT-PCR de líneas mutantes por inserción de T-DNA para los genes *PATL3* y *PATL5* de *Arabidopsis thaliana*. Como control positivo de expresión se usó el gen *ACT8*. Las flechas rojas señalan las líneas mutantes elegidas para la obtención del doble mutante *patl3patl5*.

Una vez obtenidas líneas homocigotas de los mutantes simples *patl3* y *patl5*, y del doble mutante *patl3patl5*, se inició su estudio fenotípico.

En primer lugar, para comprobar la capacidad germinativa de las líneas mutantes, se realizó un ensayo de germinación según lo explicado en el apartado 3.4.6.1 de Materiales y Métodos. Además, se quiso comprobar la sensibilidad de las semillas a las bajas temperaturas y si el frío tenía algún efecto sobre su germinación, por lo que también se realizó el mismo ensayo a 10°C.

## Resultados

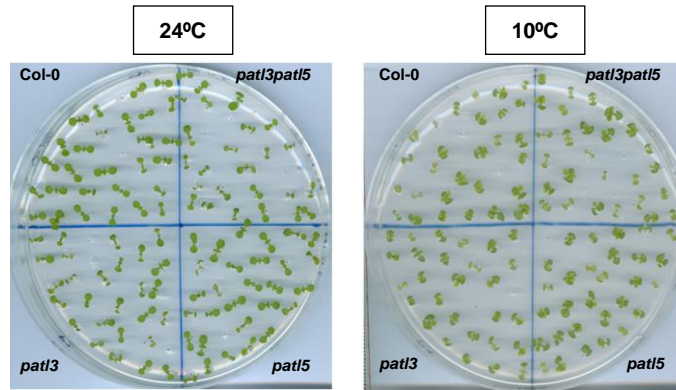


Figura 48: Germinación de las líneas mutantes *patl3*, *patl5* y *patl3patl5* de *Arabidopsis thaliana* a 24°C y 10°C. Como control se usó la línea silvestre con ecotipo Col-0.

El resultado del ensayo de germinación indica que todas las líneas germinan de manera similar, con porcentajes próximos al 100%, no pudiendo destacar ningún fenotipo aparente ni al comparar las líneas mutantes con la línea silvestre, ni en las distintas condiciones de temperatura estudiadas (Figura 48). Además, el tratamiento de frío, aunque ralentiza la germinación, no parece afectar a su desarrollo.

A continuación para evaluar el crecimiento de las distintas líneas, se llevó a cabo un estudio de la longitud de las raíces, midiendo la longitud de la raíz principal tal y como se explica en el apartado 3.4.6.2 de Materiales y Métodos. Este estudio se realizó tanto a temperatura normal de crecimiento (24°C), como tras un tratamiento de frío (10°C).

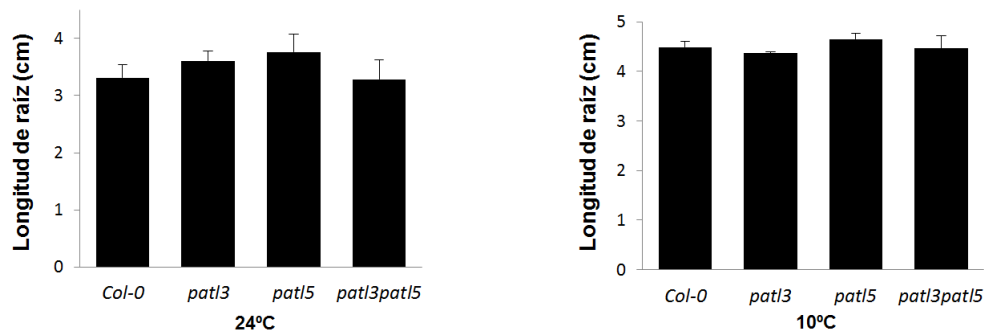


Figura 49: Medida de la longitud de raíces de las líneas mutantes *patl3*, *patl5* y *patl3patl5* de *Arabidopsis thaliana* a 24°C (7 días) y 10°C (23 días). Como control se usó la línea silvestre con ecotipo Col-0. El análisis estadístico *t* de Student no indicó diferencias significativas.

En la Figura 49 se observa que a temperatura normal de crecimiento, las raíces de las líneas mutantes simples parecen tener una longitud mayor que la línea silvestre, siendo la longitud de las raíces de la línea *patl5* ligeramente mayor que la de la línea *patl3*. Sin embargo, la línea doble mutante *patl3patl5* no parece mostrar diferencias respecto a la línea silvestre. No obstante, las diferencias encontradas a 24°C no son significativas y parecen desaparecer en las raíces crecidas a 10°C, donde todas las líneas mutantes aparentan tener una longitud muy similar a la línea silvestre, con la excepción de la línea *patl5* que parece ser levemente mayor. Es decir, las leves diferencias de longitud radicular entre las plántulas crecidas en condiciones normales de temperatura parecen desaparecer cuando el crecimiento se realiza en condiciones

de estrés pro frío (10°C), no apreciándose diferencias significativas entre las diferentes líneas mutantes y la línea silvestre.

Finalmente se analizó el área de los cotiledones y de las semillas siguiendo las instrucciones descritas en los apartados 3.4.6.3 y 3.4.6.4 de Materiales y Métodos.

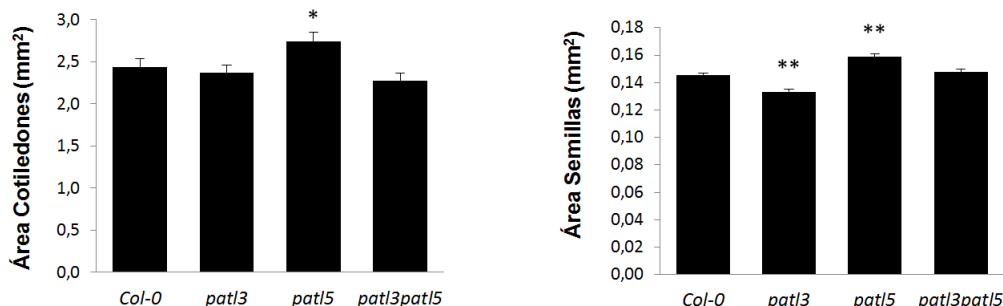


Figura 50: Medida del área de los cotiledones y las semillas de las líneas mutantes *patl3*, *patl5* y *patl3patl5* de *Arabidopsis thaliana*. Como control se usó la línea silvestre con ecotipo Col-0. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t* de Student. Un asterisco (\*) indica que existe significación estadística con un valor  $p < 0,05$ , respecto a las plantas control. Dos asteriscos (\*\*) indican que existe significación estadística con un valor  $p < 0,01$ .

Los resultados de la Figura 50 muestran que el área de los cotiledones de la línea *patl5* es mayor que el de la línea silvestre y el de las otras líneas mutantes. No obstante, el área de cotiledones de las líneas mutantes *patl3* y *patl3patl5* es levemente menor que el de la línea silvestre, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

En cuanto a las semillas, el área de la línea mutante *patl3* es menor que el de la línea silvestre. Sin embargo, el área de semillas de la línea mutante *patl5* es mayor que el de la línea silvestre. A su vez, el doble mutante *patl3patl5* parece tener un área de semillas similar a la de la línea silvestre. Por tanto, los resultados parecen indicar una variabilidad en el fenotipo de las diferentes líneas mutantes entre sí y en comparación con la línea control Col-0.

En otro trabajo del grupo se estudió más extensamente el fenotipo de líneas mutantes para todos los miembros de la familia *PATLs* (Aguilella-Segura, 2012). Los resultados de este estudio, basado en ensayos de germinación y estudio del fenotipo de plantas crecidas en tierra, mostraron que, en plantas crecidas a temperatura normal de crecimiento, no se aprecian diferencias significativas en el crecimiento en longitud entre las líneas mutantes simples de todos los genes *PATLs* y la línea silvestre. Sin embargo, existe una gran variabilidad entre las diferentes líneas en su crecimiento en longitud en condiciones de estrés por frío, siendo la línea mutante *patl2* la que presentó un crecimiento menor, mostrando por tanto mayor sensibilidad al frío. Las líneas mutantes *patl1* y *patl4*, mostraron el mayor crecimiento en longitud a temperaturas bajas. Esta variabilidad se observó también en algunas mutaciones dobles estudiadas, donde bajo condiciones de estrés por frío, el mutante *patl3patl5* muestra un crecimiento en longitud menor que la línea silvestre, y sin embargo el mutante *patl3patl6* presenta una longitud mayor que la línea silvestre.

En este mismo estudio, también se detectó una mejor germinación de todas las líneas mutantes analizadas en comparación con la línea silvestre, en condiciones de estrés osmótico y salinidad. No obstante se observó un empeoramiento en la germinación de todas las líneas

mutantes simples, en condiciones de estrés por cationes tóxicos, en comparación con la germinación de la línea silvestre. Estos resultados indican que la ausencia de estos genes podría afectar al paso de iones a través de la membrana.

#### 4.6.3- Fenotipo de sobreexpresión de *CRIO4* en *Arabidopsis thaliana*.

Para evaluar el fenotipo de la sobreexpresión del gen *CRIO4* en *Arabidopsis thaliana*, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan, de forma estable, una fusión 35S::*CRIO4*. Para ello, se empleó el protocolo de transformación mediante infiltración floral detallado en el apartado 3.4.5 de Materiales y Métodos. En esta transformación se usó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK (apartado 3.1.5 Materiales y Métodos) transformada con el plásmido pJM729-*CRIO4* (apartado 3.10 Materiales y Métodos), para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Tras la selección de las líneas transgénicas estables del modo explicado en la sección 3.4.5.1 de Materiales y Métodos, se realizó un análisis *Northern blot* (siguiendo los protocolos de los apartados 3.9.9, 3.9.11, 3.9.12 y 3.9.13) para seleccionar las líneas transgénicas con mayor expresión del transgen. Se seleccionaron las líneas transgénicas *CRIO4*-2 y *CRIO4*-7, por su mayor expresión (Figura 51), y a partir de ellas se realizaron los siguientes estudios fenotípicos.

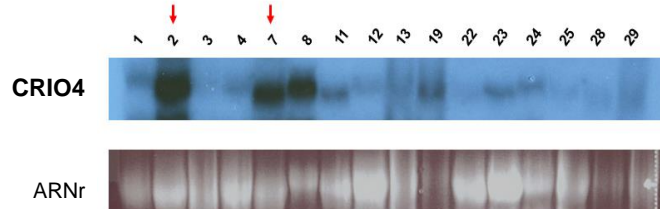


Figura 51: Análisis *Northern blot* de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *CRIO4*. Se seleccionaron las líneas *CRIO4*-2 y *CRIO4*-7, marcadas por la flecha roja, por su mayor expresión.

A continuación se muestran los resultados de varios análisis fenotípicos en los que se ha usado como control la línea silvestre Col-0 para comparar el resultado de las líneas transgénicas *CRIO4*-2 y *CRIO4*-7. En primer lugar, siguiendo las instrucciones descritas en el apartado 3.4.6.3 de Materiales y Métodos, se analizó el área de los cotiledones, obteniendo como resultado un área significativamente mayor en los cotiledones de las líneas transgénicas (Figura 52).

## Resultados

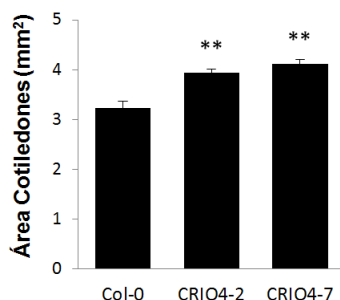


Figura 52: Medida del área de los cotiledones de las líneas transgénicas CRI04-2 y CRI04-7 de *Arabidopsis thaliana*. Como control se usó la línea silvestre con ecotipo Col-0. Dos asteriscos (\*\*) indican que existe significación estadística con un valor  $p < 0,01$ , según análisis *t* de Student.

Se cuantificó el número de hojas de la roseta, así como el número de silicuas formadas en el tallo principal en plantas crecidas en tierra a 24°C y cuyos resultados se muestran en la Figura 53. En el primer caso, tras 19 días de su traspaso a tierra, las plantas de las líneas transgénicas CRI04-2 y CRI04-7 mostraron un número de hojas en la roseta ligeramente inferior a las plantas de la línea silvestre. En cuanto al número de silicuas, no se apreció diferencias significativas entre las líneas transgénicas y la línea silvestre.

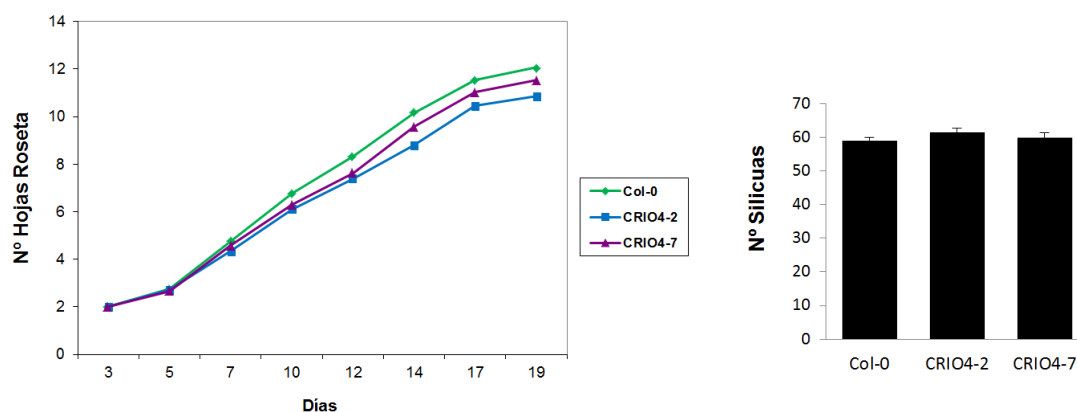


Figura 53: Cuantificación del número de hojas de la roseta y del número de silicuas del tallo principal, en plantas de las líneas transgénicas CRI04-2 y CRI04-7 de *Arabidopsis thaliana*. Como control se usó la línea silvestre con ecotipo Col-0. En el ensayo de número de silicuas, el análisis estadístico *t* de Student no indicó diferencias significativas.

Seguidamente se realizó una serie de análisis fenotípicos de plántulas crecidas en tierra, diferenciando entre los resultados obtenidos a temperatura normal de crecimiento (24°C) y en condiciones de estrés por frío (10°C).

En la Figura 54 se muestran los resultados de la medida del crecimiento en longitud de las plantas (Materiales y Métodos apartado 3.4.6.5). Se puede observar que existen claras diferencias de crecimiento entre las distintas temperaturas estudiadas. A temperatura normal de crecimiento, no se distinguen diferencias significativas entre el crecimiento en longitud de las plantas de las líneas transgénicas y la línea silvestre. Sin embargo, el crecimiento a bajas temperaturas delata una mayor longitud de las líneas transgénicas respecto a la línea silvestre.



## Resultados

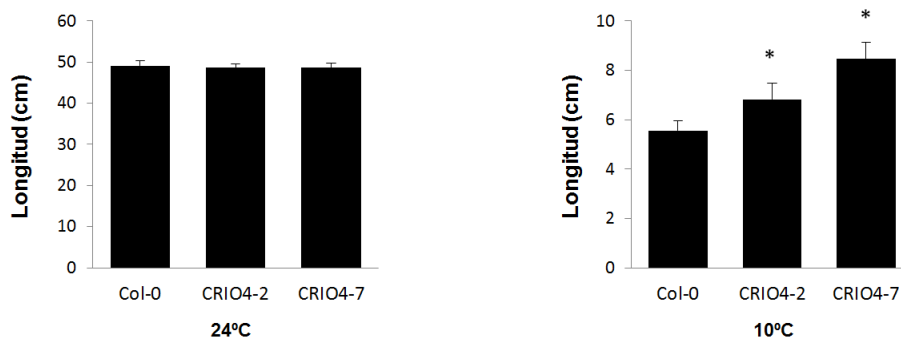


Figura 54: Medida del crecimiento en longitud en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRI04-2 y CRI04-7 de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los resultados de crecimiento a 24°C (izquierda) y a 10°C (derecha). Se realizó un análisis estadístico *t* de Student. Un asterisco (\*) indica que existe significación estadística con un valor  $p < 0,05$ , respecto a las plantas control.

Del mismo modo se cuantificó el número de ramificaciones principales en las mismas plantas que en el ensayo anterior y bajo las mismas condiciones, de la forma descrita en el apartado 3.4.6.6 de Materiales y Métodos.

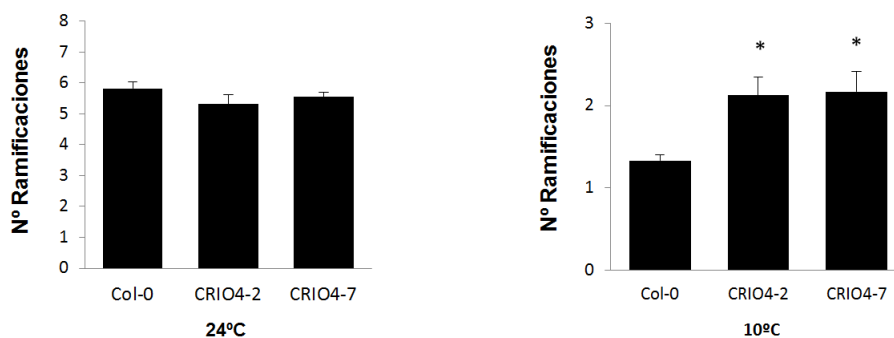


Figura 55: Medida del número de ramificaciones principales en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRI04-2 y CRI04-7 de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los resultados de crecimiento a 24°C (izquierda) y a 10°C (derecha). Se realizó un análisis estadístico *t* de Student. Un asterisco (\*) indica que existe significación estadística con un valor  $p < 0,05$ , respecto a las plantas control.

El resultado fue similar al descrito en el ensayo anterior, no pudiéndose apreciar diferencias significativas en el crecimiento a 24°C (Figura 55). En condiciones de crecimiento a 10°C, las líneas transgénicas presentaron un número de ramificaciones principales mayor que el de la línea silvestre.

El mayor crecimiento en longitud y el mayor desarrollo de ramificaciones principales que se produce en las líneas transgénicas creciendo a temperaturas bajas, en comparación con la línea silvestre, parece indicar que la sobreexpresión de *CRIO4* podría mejorar el crecimiento de las plantas aumentando su tolerancia al estrés por frío.

Para confirmar estos indicios, a continuación se analizó la evolución de los estadios de desarrollo de las líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre, en plantas crecidas en tierra a 24°C y 10°C. El protocolo de este ensayo fue descrito en el apartado 3.4.6.9 de Materiales y Métodos. Se estimaron 5 estadios de desarrollo diferentes para analizar: roseta,

## Resultados

emergencia de escapo floral, establecimiento de inflorescencias, inflorescencias maduras y primeras silicuas.

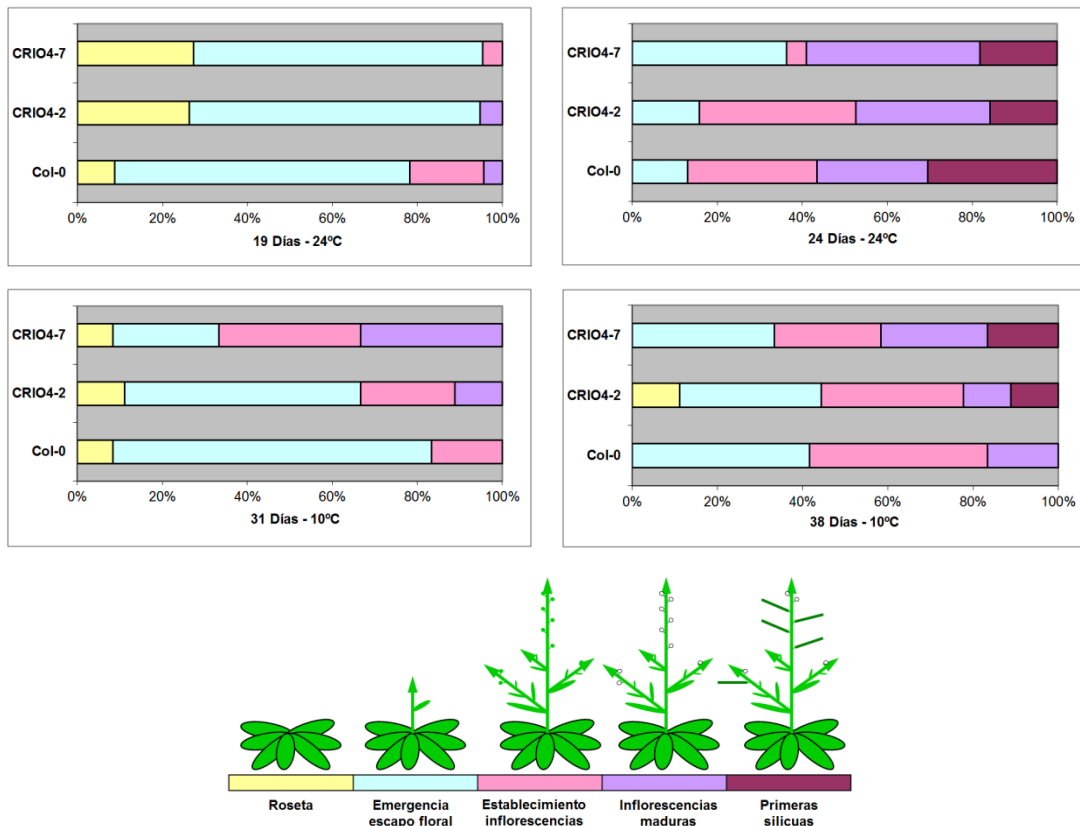


Figura 56: Determinación del estadio de desarrollo en plantas de la línea silvestre Col-0 y las líneas transgénicas CRIO4-2 y CRIO4-7 de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los resultados de crecimiento a 24°C (arriba) y a 10°C (derecha), expresado como el porcentaje de plantas en cada uno de los 5 estadios de desarrollo estudiados: roseta (amarillo), emergencia de escapo floral (celeste), establecimiento de inflorescencias (rosa), inflorescencias maduras (malva) y primeras silicuas (púrpura). Las gráficas de la izquierda corresponden a la primera anotación (19 días a 24°C y 31 días a 10°C), y las gráficas de la derecha corresponden a la segunda anotación de confirmación (24 días a 24°C y 38 días a 10°C).

Se realizó una primera anotación del porcentaje de plantas en las distintas fases de desarrollo el día 19 de cultivo a 24°C y el día 31 de cultivo a 10°C (Figura 56). Se observó que, a 24°C, la línea silvestre parece mostrar un ligero adelanto en su desarrollo respecto a las líneas transgénicas, puesto que aproximadamente el 20% de las plantas de la línea silvestre se encuentran entre los estadios de establecimiento de inflorescencias e inflorescencias maduras, frente a menos del 10% de plantas de las líneas transgénicas que se encuentran entre esos estadios. Sin embargo, a 10°C, el adelanto del desarrollo de la línea silvestre, no solo desaparece, sino que se invierte la situación y en estas condiciones de crecimiento las líneas transgénicas muestran un claro adelantamiento en su desarrollo respecto a la línea silvestre. A 10°C, más del 60% de las plantas de la línea CRIO4-7 y en torno al 35% de las plantas de la línea CRIO4-2, se encuentran entre los estadios de establecimiento de inflorescencias e inflorescencias maduras, frente al 17% de las plantas de la línea silvestre.

Para confirmar estos datos, se realizó posteriormente una segunda anotación del porcentaje de plantas en las distintas fases de desarrollo, el día 24 de cultivo a 24°C y el día 38

de cultivo a 10°C (Figura 56). Los resultados volvieron a corroborar los datos de la primera observación pudiendo concluir que la sobreexpresión de *CRIO4* produce una mejora en el desarrollo y crecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo bajo condiciones de estrés por frío.

Finalmente se realizó un ensayo sobre los cambios de expresión, frente a distintas condiciones de estrés, en líneas transgénicas de sobreexpresión de *CRIO4*. Para ello se usó la línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresa la fusión *CRIO4::GFP*, empleada en el estudio de la localización subcelular de *CRIO4* y descrita previamente.

Del mismo modo que en el apartado 4.3 de Resultados, en esta ocasión se analizó mediante microscopía confocal la radícula de plántulas crecidas en vertical 5 días tras la germinación. Como control se fotografió la expresión de *CRIO4::GFP* de plantas crecidas a 24°C en medio MS sólido, y se evaluó el cambio de expresión tras un tratamiento de frío (10°C durante 16 horas) y un choque térmico (50°C durante 1 hora). En base a los resultados de un trabajo previo del grupo que apuntaban a un papel de las PATLs en la respuesta al estrés osmótico (Aguilella-Segura, 2012), se decidió evaluar también el posible cambio de expresión en las células de plántulas crecidas durante 16 horas en medio MS sólido suplementado con 280 mM de Manitol.

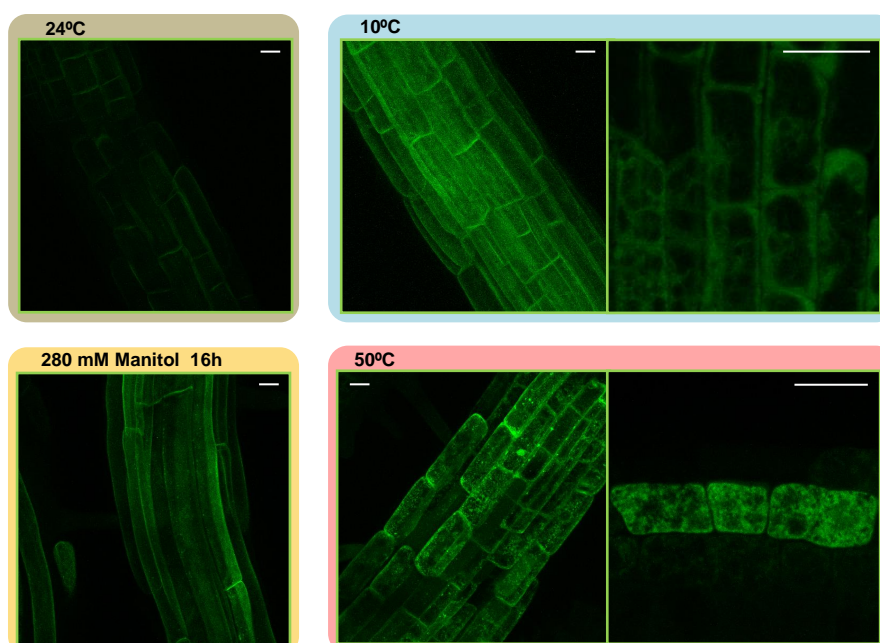


Figura 57: Expresión de la fusión *CRIO4::GFP* en células radiculares de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a varios estreses. Imagen de microscopía confocal. Todas las fotografías fueron tomadas con los mismos parámetros del software Zeiss e intensidad de láser, para que las fotografías pudieran ser comparables. Las barras indican una longitud de 15  $\mu\text{m}$ .

Los resultados muestran que a temperatura normal de crecimiento *CRIO4* tiene una expresión basal que aumenta considerablemente tras todos los tratamientos de estrés, especialmente tras el estrés por frío y el choque térmico (Figura 57). Es especialmente notable la observación de los acúmulos de *CRIO4*, previamente observada y descrita en el apartado 4.3 de Resultados, tras el choque térmico. Los pequeños puntos aislados observados de forma

puntual en la Figura 41, aparecen ahora repartidos a lo largo de toda la célula. Este resultado parece motivar aún más la necesidad de estudios adicionales para analizar la posible asociación de CRIO4 con balsas lipídicas, hecho ya descrito sobre las PATLs, sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana*, en respuesta a frío (Minami *et al.*, 2009).

#### 4.7- Coexpresión con *PIN2* en *Arabidopsis thaliana*.

Con el fin de estudiar el efecto de CRIO4 sobre el transporte de auxinas, se procedió a analizar el reciclaje intracelular de *PIN2*, como indicador de respuesta gravitópica, en condiciones de estrés por frío.

Para ello se cruzaron las líneas transgénicas *PIN2:GFP* y *CRIO4*. En esta ocasión se usó como parental materno la línea *CRIO4* para facilitar la selección posterior de las nuevas líneas transgénicas *PIN2:GFP-CRIO4*.

Plántulas crecidas 4 días tras la germinación fueron incubadas durante 16 horas a 10°C en las mismas condiciones de fotoperiodo que las plantas control (descritas en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos), que continuaron creciendo a 24°C. Tras este periodo, se examinó la localización subcelular de *PIN2* en las raíces mediante microscopía confocal. Como control de la expresión de *PIN2* se utilizó la línea transgénica *PIN2:GFP*.

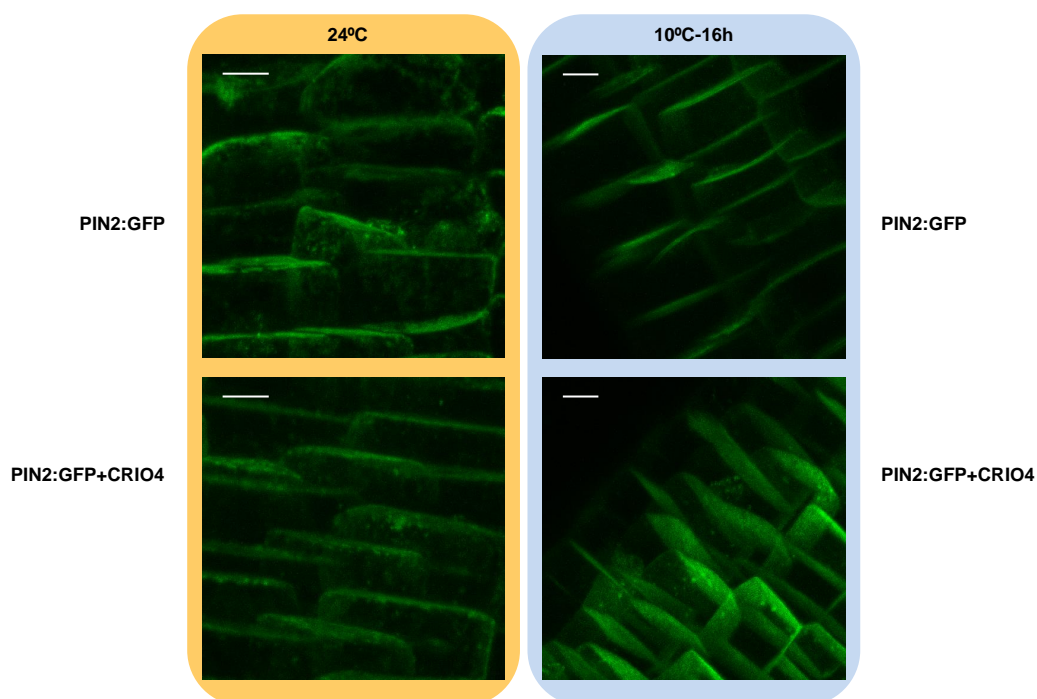


Figura 58: Localización subcelular de *PIN2*, en raíz de plántulas transgénicas *PIN2:GFP-CRIO4*, a 24°C y 10°C (abajo). Como control se usó la línea transgénica *PIN2:GFP* (arriba). Las barras indican una longitud de 5  $\mu\text{m}$ .

En los resultados que se muestran en la Figura 58 se aprecia que la localización de *PIN2* en las plantas control (línea *PIN2:GFP*), coinciden con los datos de estudios previos (Shibasaki *et al.*, 2009; Figura 21 A a D) donde se puede observar los cuerpos de *PIN2* a temperatura

óptima de crecimiento, pero desaparecen durante el tratamiento de frío. El estrés por frío suprime el reciclaje endosomal de PIN2 y esto provoca la desaparición visual de los cuerpos de PIN2. Sin embargo, la sobreexpresión de *CRIO4* permite observar los cuerpos de PIN2 también tras el tratamiento de frío, esto podría indicar que *CRIO4* reactiva el transporte intracelular de PIN2. Esta observación, a su vez, estaría en sintonía con los indicios previos acerca de la regulación del tráfico de axinas por parte de las PATLs (Isono *et al.*, 2010; Rackaityte, 2013).



## **DISCUSIÓN**





## 5- DISCUSIÓN

La técnica de rastreo de genes basada en la sobreexpresión de bibliotecas de ADNc en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, ha permitido en el pasado identificar genes de plantas implicados en resistencia al estrés salino como *SR* (Forment *et al.*, 2002), *LTL1* (Naranjo *et al.*, 2006), *BvCKA2* (Kanhonou *et al.*, 2001), *eIF1A* (Rausell *et al.*, 2003); y al estrés osmótico como *BvSAT1* (Mulet *et al.*, 2004a) y *BvGLB2* (Mulet *et al.*, 2004b, Timoneda, 2012). Es sabido que el estrés por frío, por salinidad y por sequía solapan algunos de sus mecanismos moleculares de respuesta (Mahajan y Tuteja, 2005), por lo que se usó la misma estrategia anterior para tratar de identificar genes que aumentaran la tolerancia de las plantas al estrés por frío, a partir de una biblioteca de ADNc de remolacha (*Beta vulgaris*) generada con hojas de plantas sometidas a estrés salino (Kanhonou *et al.*, 2001).

Este rastreo permitió identificar 6 genes de remolacha que fueron nombrados *CRIO1* a *6*, cuya sobreexpresión otorga a la cepa de levadura W303-1A la capacidad de crecer a 10°C. Estos genes están recogidos en las patentes STRESS TOLERANCE PCT/EP04/050513 y WO 2004/090141. Los genes *CRIO1* a *3* se localizan en el endosoma tardío en células vegetales, formando parte del complejo ESCRTIII, responsable de la distribución de proteínas monoubicuitiladas de la membrana plasmática hacia el endosoma tardío y su posterior degradación en la vacuola, o de su reciclaje. La sobreexpresión de estos genes en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* aumenta la tolerancia a frío, por lo que la función del complejo ESCRT podría verse afectada a temperaturas bajas. El gen *CRIO5* codifica una proteína con dominio RING finger, que podría actuar como una E3 ubiquitina ligasa, por lo que podría ser la enzima encargada de marcar las proteínas de membrana que entran en la ruta endocítica, dirigida por el sistema ESCRT, para su degradación o reciclaje (Marí-Carmona, 2012). Esto daría coherencia a los resultados conjuntos de algunos de los genes identificados en este rastreo. Por otra parte, el gen *CRIO6* codifica una acuaporina de tipo TIP, y entre estos genes también se encontraba *CRIO4*, cuya caracterización ha sido el objeto de estudio de esta tesis.

El ADNc correspondiente a *CRIO4* codifica una proteína tipo Sec14. A su vez, un análisis filogenético mostró que *CRIO4* es ortólogo a *SEC14* y la familia *SFH* de levadura, y a la familia *PATL* de *Arabidopsis thaliana* compuesta por seis genes. Tras la reciente secuenciación del genoma de remolacha en 2013, ahora podemos saber que el gen *CRIO4*, denominado LOC104898006 y descrito como patellin-3, se encuentra en el cromosoma 1 de *Beta vulgaris*, en la región NC\_025812.1, entre las coordenadas 1679580-1682912.

Las diferentes herramientas bioinformática utilizadas en el análisis *in silico* han permitido confirmar diversos motivos y dominios conservados en la proteína *CRIO4*, mostrando ésta una estructura multidominio muy semejante a las *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*. En su extremo C-terminal contiene dos dominios muy conservados: el dominio Sec14 y el dominio GOLD.

En la Introducción se ha hablado extensamente del dominio Sec14, dominio de unión y transferencia de fosfolípidos encontrado en una gran cantidad de proteínas eucariotas implicadas en multitud de procesos celulares. Estas proteínas regulan las rutas habituales de

tráfico de membranas (Lopez *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000), y actúan como sensores de la composición de la membrana (Ile *et al.*, 2006), integrando a su vez la estimulación de la producción de fosfoinosítidos con múltiples aspectos del metabolismo lipídico intracelular, diversificando así los resultados biológicos de la señalización por fosfoinosítidos (Schaaf *et al.*, 2008; Bankaitis *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2014). Además, en levadura se ha sugerido que la función principal de Sec14p, prototipo de proteína basada en el dominio Sec14, es asegurar la correcta localización y transporte de proteínas que residen en balsas lipídicas (Curwin *et al.*, 2013). Este apunte es interesante si tenemos en cuenta que se ha descrito la asociación a balsas lipídicas de algunas PATLs de *Arabidopsis thaliana*, en respuesta a frío (Minami *et al.*, 2009). Estos datos dan pie a pensar en la implicación de las PATLs, y por tanto quizás también de CRIO4, en la aclimatación al frío en plantas, mediada por las balsas lipídicas.

En la secuencia de aminoácidos de CRIO4 se ha mostrado que, dentro de su dominio Sec14, están conservados los tres residuos (E, K, G) que son críticos para la unión y transferencia de fosfolípidos en Sec14p de levadura, y que también conservan las PATLs de *Arabidopsis thaliana* (Peterman *et al.*, 2004a). Además, un alineamiento de las secuencia de CRIO4 y PATL1 ha revelado que en CRIO4 también está conservado el residuo R266 de PATL1, del que se ha sugerido que otorga la especificidad de interacción con fosfatidilinositol-5-fosfato (PI5P) (Ferris *et al.*, 2010). Este fosfoinosítido, tiene un papel crítico en la señalización celular (Alvarez-Venegas *et al.*, 2006; Shisheva, 2013), por lo que el resultado mostrado podría sugerir una función de CRIO4 en señalización, si futuros ensayos confirman su capacidad de unión con PI5P.

El tipo de dominio GOLD, que se encuentra en el extremo C-terminal de CRIO4, se caracteriza por ser rico en láminas  $\beta$  y se encuentra en proteínas que tienen una función relacionada con el complejo Golgi, y la clasificación o secreción de proteínas, donde está implicado en interacciones proteína-proteína (Anantharaman y Aravind, 2002). Este dominio suele encontrarse asociado a diversos dominios de unión a lípidos o asociados a membrana, tales como Sec14 (Aravind *et al.*, 1999), FYVE (Stenmark y Aasland, 1999) y PH (Haslam *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993), en proteínas donde siempre se localiza en los extremos (Anantharaman y Aravind, 2002). En proteínas tipo Sec14, como CRIO4, el dominio GOLD se encuentra en el extremo C-terminal. Se ha sugerido que las proteínas que contienen el dominio GOLD junto con otros dominios de unión a lípidos o membrana, podrían actuar como adaptadores dobles, ayudando al ensamblaje de complejos proteicos en las membranas o colocando moléculas específicas en la membrana de vesículas transportadoras (Anantharaman y Aravind, 2002).

En la región N-terminal de la proteína CRIO4 se encuentran dos tipos diferentes de motivos ricos en prolina: dos motivos PXXP y un motivo Poliprolina. Los dominios SH3, cuya unión a secuencias PXXP ha sido descrita (Feng *et al.*, 1994), participan en interacciones proteína-proteína implicadas en dinámicas de citoesqueleto, rutas de señalización tirosina quinasa y tráfico vesicular (Kay *et al.*, 2000). Por su parte, el motivo poliprolina que contiene

CRIO4 es característico de proteínas a las que se une la profilina, proteína con capacidad de unión a actina y a fosfoinosítidos (Holt y Koffer, 2001). En plantas, se ha descrito la implicación de la profilinas en: la interacción entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática (Banno y Chua, 2000; Baluska *et al.*, 2001; Cheung y Wu, 2004; Favery *et al.*, 2004; Ingouff *et al.*, 2005), el movimiento y localización de organelos mediado por el citoesqueleto de actina (Oikawa *et al.*, 2003; Schmidt von Braun y Schleiff, 2008; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011) y el transporte de vesículas (Aparicio-Fabre *et al.*, 2006; Takac *et al.*, 2011).

Tanto el dominio Sec14 como los dos motivos poliprolina parecen dirigir la función de CRIO4 hacia el tráfico vesicular. Por tanto, parece que, en teoría, CRIO4 podría interactuar con las membranas tanto de forma directa a través de su dominio Sec14, como de forma indirecta a través de la asociación de las profilinas con su motivo poliprolina. PATL1 fue identificada durante un escrutinio bioquímico para identificar proteínas de unión a F-actina (Peterman y Ohol, 2003; Peterman *et al.*, 2004a), en base a este dato, parece intuirse un papel de este tipo de proteínas en dinámicas de citoesqueleto asociadas al tráfico de vesículas. Sería interesante confirmar la posible unión de profilinas al motivo poliprolina de CRIO4 en futuros estudios, puesto que de ser así, se podría abrir una nueva vía de investigación para comprender mejor el papel del citoesqueleto en el transporte vesicular. A su vez, el dominio GOLD de CRIO4, podría estar ayudando al ensamblaje de complejos proteicos en las membranas o colocando moléculas específicas en la membrana de las vesículas transportadoras.

También se ha confirmado la existencia en CRIO4 de un motivo *Coiled coil*. Estos motivos son responsables de un tipo específico de plegamiento y la oligomerización de proteínas (Burkhard *et al.*, 2001) y se encuentran en proteínas implicadas en una gran diversidad de procesos celulares como regulación genética, división celular y fusión de membranas (McFarlane *et al.*, 2009). Algunas de la proteínas con dominio GOLD, como PATL1, PATL2 y PATL4, también contienen regiones *Coiled coil*, lo que podría facilitar la formación de oligómeros ayudando a generar multitud de interacciones con diferentes proteínas. Teniendo en cuenta la potencialidad del dominio GOLD de interactuar con multitud de ligandos y la capacidad de oligomerización que otorgan los motivos *Coiled coil*, sería necesario analizar en estudios futuros, las diferentes proteínas con las que interactúa CRIO4 para poder comprender mejor su función.

Otros datos del análisis *in silico*, han mostrado que la proteína CRIO4 posee un carácter ácido que, como posteriormente se observó, provoca una migración anómala en geles SDS. Por otra parte, distintas herramientas bioinformáticas han detectado la existencia, en la proteína CRIO4, de múltiples potenciales sitios de fosforilación, resultado especialmente relevante si se tiene en cuenta los resultados de estudios previos que describen varios sitios de fosforilación en las PATLs de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a diferentes estímulos como estrés salino (Hsu *et al.*, 2009), respuesta a hormonas (Chen *et al.*, 2010) y también en un estudio que identifica proteínas de arábido asociadas al núcleo (Jones *et al.*, 2009). Estos datos abren la posibilidad a pensar en un posible papel de CRIO4 en la señalización frente a diferentes estímulos.

Los resultados mostrados en el ensayo de complementación en levadura, confirman que ni CRIO4, ni una versión truncada de esta proteína que solo contiene su dominio Sec14, son capaces de complementar a Sec14p de levadura por lo que deben ser funcionalmente diferentes. Es interesante destacar que algunos miembros de la familia de proteínas SFH (homólogos a *SEC14* en levadura) (Schnabl *et al.*, 2003; Griac, 2007), así como PATL1 y las proteínas tipo Sec14 en humanos (Peterman *et al.*, 2006) tampoco pueden complementar la función de Sec14p.

Además de la tolerancia a frío, también se ha observado tolerancia a tunicamicina otorgada por la sobreexpresión de *CRIO4* en levadura. La tunicamicina inhibe la glicosilación de las proteínas. Los carbohidratos de las glicoproteínas, además de determinar el destino de la proteína en los compartimentos intracelulares y las interacciones célula-célula, tienen funciones relacionadas con el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso, y se ha descrito que la adición de tunicamicina puede inducir la respuesta a proteínas desplegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR, en inglés), que es una respuesta al estrés, conservada entre especies, y causada por desnaturalización de proteínas en el retículo endoplasmático (Korennykh y Walter, 2012). Esta respuesta especializada tiene dos objetivos principales: por un lado, detener la traducción de proteínas y activar las vías de señalización que permitan incrementar la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas, para así recuperar el funcionamiento normal de la célula; finalmente, si la recuperación fuera inviable, la UPR se dirige hacia la apoptosis. CRIO4 podría asumir un papel en la glicosilación de proteínas y su vinculación con el estrés por frío. La relación entre la N-glicosilación y la respuesta a temperaturas bajas en plantas, ha sido previamente descrita en la literatura. Como ejemplo, el trabajo de Komatsu *et al.* (2009) mostró la modificación del patrón de N-glicosilación de 22 proteínas de arroz, entre las que se encuentra un homólogo a LOS2 de *Arabidopsis thaliana*, importante regulador de la aclimatación al frío (Lee *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2006).

Tras la purificación de la proteína CRIO4, el análisis *Western Blot* mostró que ésta presenta una migración anómala probablemente debido al carácter ácido otorgado principalmente por su extremo N-terminal. Esta misma alteración también ha sido observada en PATL1 (Peterman *et al.*, 2004a; Minami *et al.*, 2009) y en otras proteínas asociadas a balsas lipídicas en respuesta a frío (Minami *et al.*, 2009).

El ensayo de unión a fosfolípidos realizado, ha mostrado la capacidad de CRIO4 para establecer uniones con fosfatidilinositol (PI) y, aunque en menor grado, con fosfatidiletanolamina (PE). Comparando estos datos con los de PATL1 obtenidos por Peterman *et al.* (2004a), ambas proteínas tienen una fuerte afinidad de unión con PI y en futuros análisis sería interesante determinar la especificidad de unión de CRIO4 frente a diferentes especies de fosfoinosítidos. A diferencia de PATL1 y Sec14p, CRIO4 no fue capaz de establecer unión con fosfatidilcolina (PC). Por su parte, ninguna de las proteínas SFH de levadura, familia de homólogos de *SEC14* y ortólogos de *CRIO4*, muestra una actividad significativa de transferencia de PC (Li *et al.*, 2000). Sfh1p no puede reemplazar la función de Sec14p (Li *et al.*,

2000; Schnabl *et al.*, 2003) y, como se ha explicado en la Introducción, se piensa que la causa de esta falta de complementación está determinada por las diferencias, entre Sfh1p y Sec14p, en la regulación del flujo de moléculas de agua en el bolsillo hidrofóbico, factor esencial que determina la diferencia de afinidad de unión a PI y a PC (Schaaf *et al.*, 2011). Es posible que ésta también sea la causa de la falta de afinidad por PC que presenta CRIO4 y, a su vez, ésta imposibilidad de unión a PC podría explicar, al menos en parte, por qué CRIO4 no puede complementar la función de Sec14p en levadura.

Los resultados obtenidos en las distintas aproximaciones al estudio de la localización subcelular de CRIO4 realizadas en esta tesis, muestran una expresión de CRIO4 asociada a la membrana plasmática, tal y como se esperaba puesto que las proteínas codificadas por los genes ortólogos de *CRIO4*, *SEC14* y *PATL1*, han sido descritas con anterioridad como proteínas de la periferia de la membrana (Peterman *et al.*, 2004a). Así mismo, el ensayo de transfección de protoplastos de *Nicotiana benthamiana* también permitió observar nítidamente la localización de CRIO4 en membranas intracelulares, formando parte de vesículas de distintos tamaños y claramente definidas. Este resultado podría indicar un papel de CRIO4 en el tráfico intracelular, función que estaría en sintonía con la de sus ortólogos, anteriormente descrita en la Introducción. Además, en la línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresa de forma estable la fusión CRIO4::GFP se ha observado que CRIO4, además de localizarse preferentemente en la zona adyacente a la membrana plasmática, también podría estar rodeando a la membrana nuclear.

Tanto en esta línea transgénica de *Arabidopsis* que sobreexpresa de forma estable la fusión CRIO4::GFP como en el caso de la expresión transitoria de *CRIO4* en hojas de *Nicotiana benthamiana*, CRIO4 también parece formar una estructura reticular en el interior de la célula. Este tipo de estructura ha sido descrita como asociada al retículo endoplasmático, no obstante, serían necesarios estudios adicionales de coexpresión con proteínas marcadoras del retículo para confirmar esa posible colocalización. Por otra parte, un dato que resulta interesante mencionar, es que *CRIO4* parece mostrar una expresión mayor en el tejido vascular de la raíz. Este resultado tendría sentido si se toman en consideración los datos obtenidos por Rackaityte (2013), comentados en la Introducción, donde se describe la expresión de *PATL1* y *PATL2* en tejidos vasculares. Los datos de ese estudio también sugieren la implicación de estas proteínas en el establecimiento del patrón vascular a través de su interacción con auxinas.

En levadura, el transporte de triptófano es un factor limitante del crecimiento bajo varias condiciones de estrés y, en cepas auxótrofas para triptófano, el mayor factor limitante para el crecimiento a temperaturas bajas es la absorción de triptófano (Vicent *et al.*, 2015). Por esta razón, para intentar comprender el mecanismo por el cual la sobreexpresión de *CRIO4* confiere a las células de levadura la capacidad de crecer a temperaturas bajas, se realizó un ensayo de coexpresión de *CRIO4* y *TAT2* de levadura. El gen *TAT2* codifica una permeasa de alta afinidad para triptófano (Schmidt *et al.*, 1994) y se ha documentado que su sobreexpresión confiere tolerancia a frío (Abe y Horikoshi, 2000). A temperatura óptima de crecimiento, la

localización subcelular de Tat2p depende de la concentración de triptófano en el medio de cultivo, situándose esta proteína en compartimentos prevacuolares y vacuola, si la concentración de triptófano en el medio es alta; o en la membrana plasmática, si el medio es pobre en triptófano. La pérdida de fluidez de la membrana que se produce a temperaturas bajas, provoca una disminución de la absorción de triptófano, y Tat2p es enviada a la membrana plasmática, de igual forma que ante el ayuno de triptófano (Beck *et al.*, 1999; Umebayashi y Nakano, 2003). Resultados de estudios anteriores indican que Sec14p está implicada en la incorporación de Tat2p en balsas lipídicas, proceso esencial para su redireccionamiento hacia la membrana plasmática (Stevens *et al.*, 1982; Umebayashi y Nakano, 2003). Los resultados del ensayo de coexpresión de *CRIO4* con *TAT2p* de levadura mostrados en esta tesis, parecen indicar una estimulación del transporte de Tat2p hacia la membrana plasmática por parte de *CRIO4*, sin afectar a la ruta de degradación vacuolar, en todas las condiciones estudiadas. Esta inducción del transporte a la membrana plasmática podría devenir en una absorción de triptófano mejorada, explicando así la mayor tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión de *CRIO4* en levadura.

Para analizar la expresión de *CRIO4* en remolacha (*Beta vulgaris*) se realizaron diversos análisis *Northern blot* que mostraron, en primer lugar, que la expresión de *CRIO4* se extiende a todos los tejidos analizados, si bien la mayor expresión se concentra en hoja y raíz. Este resultado es similar al de *PATL1* de *Arabidopsis thaliana* cuya expresión ha sido encontrada en todos los tejidos, aunque es más abundante en hojas y raíces (Peterman *et al.*, 2004a). Además *PATL1* presenta un patrón de expresión vascular (Rackaityte, 2013).

Seguidamente, los análisis de expresión en respuesta a distintos estreses abióticos revelaron que, tras los tratamientos de estrés por frío y de estrés por calor, la expresión de *CRIO4* aumenta a tiempos cortos de exposición al estrés y disminuye tras exposiciones largas. Sin embargo, la expresión de *CRIO4* presenta un patrón desigual en respuesta al estrés por sequía, no pudiéndose obtener una conclusión clara.

Por otro lado, en la literatura se ha descrito la existencia de numerosos indicios de la conexión entre las rutas de señalización por luz y por frío. Por ejemplo, la expresión de los genes *CBF* no solo se ve inducida por las temperaturas bajas, sino que también está controlada por la calidad lumínica y el ritmo circadiano (Fowler *et al.*, 2005; Franklin y Whitelam, 2007). Estos datos motivaron el análisis de expresión de *CRIO4* en hojas de plantas de remolacha crecidas en luz, oscuridad y luz azul. El resultado, si bien fue un tanto irregular, muestra un patrón de expresión de *CRIO4* oscilante, con un pico de expresión coincidente a las 6 horas. Un patrón de expresión tal podría estar relacionado con una expresión en respuesta al ritmo circadiano.

Las *PATLs* de plantas se dividen en cuatro ramas de un árbol filogenético, y las seis *PATLs* de *Arabidopsis* se encuentran repartidas entre estas ramas, sugiriendo un posible solapamiento en la función entre los miembros de esta familia (Peterman *et al.*, 2006a). Un análisis filogenético de *CRIO4* y las *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*, situó a *CRIO4* más próximo a la rama que contiene a *PATL1* y *PATL2*. Sin embargo, en el análisis de homología

realizado, *CRIO4* parece ser más cercano a *PATL3*, estando *PATL3* y *PATL5* en la misma rama del árbol filogenético. Por esta razón, posteriormente se optó por comenzar el estudio del fenotipo de pérdida de función de *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*, evaluando la disrupción de estos dos genes. Para ello se adquirió líneas mutantes *patl3* y *patl5* de la colección del NASC (*Nottigham Arabidopsis Stock Centre*) y, tras su evaluación y cruzamiento, se generó el doble mutante *patl3patl5* obtenido en el trabajo de esta tesis.

En primer lugar, se evaluó la capacidad germinativa de todas las líneas mutantes en comparación con la línea silvestre Col-0, tanto a temperatura óptima de crecimiento como en condiciones de estrés por frío. El resultado del ensayo indicó que todas las líneas germinan de manera similar, con porcentajes próximos al 100%, no pudiendo destacar diferencias significativas. Si bien, el tratamiento de frío, aunque ralentiza la germinación, no parece afectar a su desarrollo. En el estudio de longitud de raíces, las ligeras diferencias entre las plántulas crecidas en condiciones normales de temperatura, parecen desaparecer cuando el crecimiento se realiza a 10°C, donde todas las líneas mutantes aparentan tener una longitud muy similar a la línea silvestre. En cuanto a la medida del área de cotiledones y de semillas, los resultados indican que el mutante *patl5* muestra un área mayor que la línea silvestre en ambos casos. Y las líneas mutantes *patl3* y *patl3patl5*, parecen mostrar un área, tanto de cotiledones como de semillas, similar o ligeramente menor que la línea silvestre.

En otro trabajo del grupo se estudió extensamente el fenotipo de líneas mutantes para todos los miembros de la familia *PATLs* (Aguilella-Segura, 2012). Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas en el crecimiento en longitud, entre las líneas mutantes simples de todos los genes *PATLs* y la línea silvestre, en plantas crecidas a temperatura óptima de crecimiento. No obstante, en plantas crecidas en condiciones de estrés por frío, se observó una gran variabilidad en el crecimiento en longitud de las diferentes líneas mutantes. Esta variabilidad también fue observada en las dobles mutaciones estudiadas.

La gran variabilidad en los resultados fenotípicos obtenidos de las diferentes líneas mutantes en genes *PATLs* podría ser debida a la redundancia funcional que preveían los análisis filogenéticos, que a su vez es coherente con el solapamiento en el patrón de expresión observado en las *PATLs* estudiadas hasta la fecha (Lee *et al.*, 2010).

En el estudio de Aguilella-Segura (2012), también se detectó una mejor germinación, en condiciones de estrés osmótico y salinidad, de todas las líneas de mutantes *patl* analizadas en comparación con la línea silvestre. Sin embargo, se observó un empeoramiento en la germinación de las líneas mutantes, en condiciones de estrés por cationes tóxicos. Estos resultados indican que la ausencia de estos genes podría afectar al paso de iones a través de la membrana.

Para evaluar el fenotipo de la sobreexpresión del gen *CRIO4* se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan una fusión 35S::*CRIO4*, y a partir de ellas se realizaron varios análisis fenotípicos. Los primeros estudios se realizaron a temperatura óptima de crecimiento, donde las líneas transgénicas, en comparación con la línea silvestre, mostraron un área de los cotiledones significativamente mayor y un número de hojas

en la roseta ligeramente inferior. En cuanto al número de silicuas formadas en el tallo principal de plantas crecidas en tierra, no se apreciaron diferencias significativas entre las líneas transgénicas y la línea silvestre.

En los siguientes análisis se realizó un estudio comparativo del fenotipo de plántulas crecidas en tierra tanto a temperatura óptima de crecimiento como en condiciones de estrés por frío, donde se observaron claras diferencias en los resultados entre las distintas temperaturas estudiadas. A temperatura óptima de crecimiento, no se distinguen diferencias significativas entre el crecimiento en longitud de las líneas transgénicas y la línea silvestre. Sin embargo, el crecimiento de las líneas transgénicas a bajas temperaturas mostró una mayor longitud respecto a la línea silvestre. Del mismo modo, no se encontraron diferencias importantes en el número de ramificaciones principales en plantas crecidas a temperatura óptima, pero a 10°C las líneas transgénicas presentaron un número de ramificaciones principales mayor que el de la línea silvestre. El mayor crecimiento en longitud y desarrollo de ramificaciones que se produce en las líneas transgénicas creciendo a temperaturas bajas, en comparación con la línea silvestre, parece indicar que la sobreexpresión de *CRIO4* podría mejorar el crecimiento de las plantas aumentando su tolerancia al estrés por frío. Estos indicios fueron confirmados en el posterior análisis de estadios de desarrollo donde, a temperaturas bajas, las líneas transgénicas muestran un claro adelantamiento en su desarrollo respecto a la línea silvestre.

Resultados previos apuntan a un papel de las PATLs en la respuesta a estrés osmótico (Aguilella-Segura, 2012) y, en los análisis de expresión realizados en esta tesis, se ha observado un aumento de la expresión de *CRIO4* en remolacha, inducida por tiempos cortos de exposición a estrés por frío y por calor. En base a estos datos, se decidió evaluar también el posible cambio de expresión de *CRIO4* en las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, sometidas a estos tipos de estrés. Para ello, se analizó, mediante microscopía confocal, la localización subcelular de *CRIO4* en células de la radícula de plántulas de la línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresa la fusión *CRIO4::GFP*. Los resultados han mostrado que la expresión de *CRIO4* aumenta considerablemente tras todos los tratamientos de estrés, especialmente tras el estrés por frío y el choque térmico. Por otra parte, la observación puntual de agrupaciones de *CRIO4* en forma de característicos puntos aislados dentro de la célula descrita previamente en el estudio de la localización subcelular de *CRIO4*, se hizo especialmente notable tras el tratamiento de choque térmico, donde se produjo un aumento de estas agrupaciones y los acúmulos de *CRIO4* aparecieron repartidos a lo largo de toda la célula. Este resultado parece motivar aún más la necesidad de estudios adicionales para analizar la posible asociación de *CRIO4* con balsas lipídicas, hecho ya descrito sobre las PATLs, en respuesta a frío (Minami *et al.*, 2009).

Finalmente, en este trabajo se ha pretendido estudiar el efecto de *CRIO4* sobre el transporte de auxinas, en condiciones de estrés por frío, a través del análisis del reciclaje intracelular de *PIN2*, como indicador de respuesta gravitrópica. En la Introducción se ha explicado el papel de *PIN2* en la respuesta al estímulo de gravedad, y como esta respuesta se



ve afectada por la disminución de la temperatura. En condiciones normales de temperatura, se produce un transporte continuo de PIN2 entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares, pudiéndose observar numerosos cuerpos de PIN2 en el citosol. Pero el estrés por frío suprime el reciclaje endosomal de PIN2 y desaparecen los cuerpos de PIN2 (Shibasaki *et al.*, 2009). Los resultados mostrados en esta tesis coinciden con el estudio de Shibasaki *et al.* (2009) en cuanto a la localización subcelular de PIN2 tras un tratamiento de frío. Sin embargo, la sobreexpresión de *CRIO4* permite observar los cuerpos de PIN2 también tras el tratamiento de frío, esto podría indicar que *CRIO4* reactiva el transporte intracelular de PIN2. Este resultado, estaría a su vez, en sintonía con los indicios previos acerca de la regulación del tráfico de auxinas por parte de las PATLs, donde una reciente hipótesis otorga un papel a PATL1 y PATL2 en la regulación del transporte de auxinas, tanto al influir en la localización de las PINs (Rackaityte, 2013) como por su interacción con AMSH3, enzima de desubiquitilación requerido para la eficiente endocitosis de PIN2 (Isono *et al.*, 2010). Estos datos parecen indicar una función de las PATLs regulando tanto la endocitosis como la exocitosis de PIN2, por lo que de la misma manera, *CRIO4* también podría tener un papel en la regulación de ambas rutas.



## **CONCLUSIONES**



## 6- CONCLUSIONES

1. El gen *CRIO4* de remolacha (*Beta vulgaris*), también denominado LOC104898006, codifica una proteína tipo Sec14 y es ortólogo a *SEC14* y la familia *SFH* de levadura, y a la familia *PATL* de *Arabidopsis thaliana*.
2. La proteína *CRIO4*, muestra una estructura multidominio muy semejante a las *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*, con los dominios Sec14 y GOLD en el extremo C-terminal, y motivos poliprolina y *Coiled coil* en su extremo N-terminal. El conjunto de dominios y motivos que componen la estructura de la proteína *CRIO4* señalan hacia una función en el tráfico vesicular, y el elevado número de potenciales sitios de fosforilación identificados en el análisis *in silico* indican un posible papel en señalización.
3. El análisis *in silico* ha confirmado que *CRIO4* conserva los tres residuos (E, K, G) que son críticos para la unión y transferencia de fosfolípidos en Sec14p de levadura, así como el residuo R266 de *PATL1*, que otorga la especificidad de interacción con fosfatidilinositol-5-fosfato (PI5P), fosfoinosítido clave en señalización celular. A su vez, el ensayo de unión a fosfolípidos ha mostrado que *CRIO4* se une a fosfatidilinositol y a fosfatidiletanolamina, aunque carece de capacidad de unión a fosfatidilcolina, lo que confirma la funcionalidad de su dominio SEC14, como transferasa de fosfolípidos.
4. *CRIO4*, al igual que algunos miembros de la familia de proteínas *SFH* y *PATL1*, no puede complementar a Sec14p de levadura por lo que deben ser funcionalmente diferentes. Además, es posible que la falta de complementación esté asociada a la diferencia de afinidad por fosfatidilcolina.
5. En levadura, la sobreexpresión del gen *CRIO4* confiere tolerancia al frío y a tunicamicina (inhibidor de la glicosilación). Así mismo, la coexpresión de *CRIO4* y *TAT2* estimula el transporte de Tat2p hacia la membrana plasmática, sin afectar a la ruta de degradación vacuolar, en todas las condiciones estudiadas. La inducción, por parte de *CRIO4*, del transporte de Tat2p a la membrana plasmática podría explicar la mayor tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión de *CRIO4* en levadura, al mejorar la absorción de triptófano en esas condiciones.
6. En plantas, la localización subcelular de *CRIO4* está asociada preferentemente a la membrana plasmática y a membranas intracelulares, si bien también parece establecer un patrón reticular.
7. Los análisis de expresión en remolacha indican que *CRIO4* se expresa en todos los tejidos analizados, aunque es más abundante en hojas y raíces. También se ha

## Conclusiones

- descrito que su expresión se induce a tiempos cortos en respuesta a estrés por frío o por calor.
8. El análisis fenotípico de las líneas mutantes de genes *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*, delató una gran variabilidad entre ellas que podría ser debida a la redundancia funcional entre los distintos miembros de la familia.
  9. Los distintos estudios fenotípicos de sobreexpresión del gen *CRIO4* en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, han mostrado que la sobreexpresión de *CRIO4* parece mejorar el crecimiento de las plantas a temperaturas bajas, aumentando así su tolerancia al estrés por frío.
  10. La expresión de *CRIO4* en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, aumenta tras tratamientos de estrés por frío, choque térmico y estrés osmótico. Y se han observado acúmulos de *CRIO4* tanto de forma esporádica en células de *Arabidopsis thaliana* no sometidas a estrés, como abundantemente en células tratadas con un choque térmico. Esta observación, junto con datos revisados sobre los ortólogos de *CRIO4*, podría sugerir una asociación de *CRIO4* con balsas lipídicas.
  11. La sobreexpresión de *CRIO4* parece reactivar el transporte intracelular de *PIN2* durante el estrés por frío, ya que se observan característicos cuerpos de *PIN2* que comúnmente solo se observan a temperatura óptima de crecimiento, cuando se produce un reciclaje continuo de *PIN2* entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares.

## **BIBLIOGRAFÍA**





## 7- BIBLIOGRAFÍA

- **Abe F., Horikoshi K.** (2000) Tryptophan permease gene *TAT2* confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 20: 8093-8102.
- **Abe F., Iida H.** (2003) Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol. Cell Biol.*, 23(21): 7566-7584.
- **Abramoff M.D., Magalhaes P.J., Ram S.J.** (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*; 11 (7): 36-42.
- **Agarwal M., Hao Y., Kapoor A., Dong C.H., Fujii H., Zheng X., Zhu J.K.** (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 37636-37645.
- **Agribusiness Handbook** (2009) Sugar beet-white sugar. Food and Agriculture Organization of the United Nations (ed.), Rome.
- **Aguilella-Segura, A.** (2012) Caracterización de los mutantes del gen patellin "PATL" de *Arabidopsis thaliana*, involucrados en resistencia a bajas temperaturas. *Trabajo Fin de Master*. Universidad Politécnica de Valencia.
- **Airaki M., Leterrier M., Mateos R.M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J.B., del Rio L.A., Palma J.M., Corpas F.J.** (2011) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum L.*) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ.*, 35: 281-295.
- **Alba-Lois L., Segal-Kischinevsky C.** (2010) Beer & Wine Makers. *Nature Education*, 3(9): 17.
- **Ali Dib T., Monneveux P., Araus J.L.** (1990) Breeding durum wheat for drought tolerance. Analytical, synthetical approaches, and their connections. In: Symposium on Wheat breeding. Prospects and future approaches. Varna, Bulgaria, pp. 1-33.
- **Allen D.J., Ort D.R.** (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci.*, 6(1): 36-42.
- **Alvarez-Venegas R., Xia Y., Lu G., Avramova Z.** (2006) Phosphoinositide 5-phosphate and phosphoinositide 4-phosphate trigger distinct specific responses of *Arabidopsis* genes: genome-wide expression analyses. *Plant Signal Behav.*;1(3):140-51.
- **Anantharaman V., Aravind L.** (2002) The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.*; 3: 0023.0021–0023.0027.
- **Antikainen M., Griffith M., Zhang J., Hon W.C., Yang D., Pihakaski-Maunsbach K.** (1996) Immunolocalization of antifreeze proteins in winter Rye leaves, crowns, and roots by tissue printing. *Plant Physiol*, 110: 845-857.
- **Antonny B., Huber I., Paris S., Chabre M., Cassel D.** (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J. Biol. Chem.*, 272(49): 30848-30851.

- **Anuario de Estadística Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente** (MAGRAMA), 2013.
- **Aparicio-Fabre R., Guillen G., Estrada G., Olivares-Grajales J., Gurrola G., Sanchez,F.** (2006) Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline-binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant J.* 47, 491–500.doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02787.x
- **Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*; 408(6814):796-815.
- **Aravind L., Neuwald A.F., Ponting C.P.** (1999) Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr. Biol.*, 9(6): R195-R197.
- **Arias López P.** (2012) Análisis genómico de la integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
- **Armstrong DJ, Roman A** (1993) The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 192: 1380–1387.
- **Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C., Thomashow M.F.** (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 13404-13409.
- **Asp L., Kartberg F., Fernandez-Rodriguez J., Smedh M., Elsner M., Laporte F., Bárcena M., Jansen K.A., Valentijn J.A., Koster A.J., Bergeron J.J., Nilsson T.** (2009) Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell*, 20(3): 780-790.
- **Atici O., Nalbantoglu B.** (2003) Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, 64: 1187-1196.
- **Azcón-Bieto J., Talón M.** (2008) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2nd ed.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, pp. 577-597.
- **Baena-Gonzalez E., Gray J.C., Tyystjarvi E., Aro E.M., Maenpaa P.** (2001) Abnormal regulation of photosynthetic electron transport in a chloroplast *ycf9* inactivation mutant. *J. Biol. Chem.*, 276: 20795-20802.
- **Bagnat M., Chang A., Simons K.** (2001) Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell* 12: 4129 – 4138.
- **Bagnat M., Keranen S., Shevchenko A., Simons K.** (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(7): 3254-3259.
- **Baker S.S., Wilhelm K.S., Thomashow F.** (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* *cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*, 24: 701-713.

- **Bali R, Savino L, Ramirez DA, Tsvetkova NM, Bagatolli L, Tablin F, Crowe JH, Leidy C.** (2009) Macroscopic domain formation during cooling in the platelet plasma membrane: an issue of low cholesterol content. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788: 1229-1237.
- **Baluska F., vonWitsch M., Peters M., Hlavacka A., Volkmann D.**(2001). Mastoparan alters subcellular distribution of profilin and remodels F-actin cytoskeleton in cells of maize root apices. *PlantCellPhysiol.*; 42, 912–922.doi: 10.1093/pcp/pce116
- **Bankaitis V.A., Aitken J.R., Cleves A.E., Dowhan W.** (1990) An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature*, 347: 561-562.
- **Bankaitis V.A., Ile K.E., Nile A.H., Ren J., Ghosh R., Schaaf G.** (2012) Thoughts on Sec14-like Nanoreactors and Phosphoinositide Signaling. *Adv. Biol. Regul.*, 52(1): 115-121. doi:10.1016/j.jbior.2011.11.001
- **Bankaitis V.A., Mousley C.J., Schaaf G.** (2010) The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3): 150-60. doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.008. Epub 2009 Nov 18.
- **Bann H., Chua N.H.**(2000).Characterization of the *arabidopsis* formin-like protein AFH1 and its interacting protein. *PlantCellPhysiol.*; 41, 617–626.doi: 10.1093/pcp/41.5.617
- **Baron C.L., Malhotra V.** (2002) Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science*, 295: 325-328.
- **Barrero-Gil J., Salinas J.** (2013) Post-translational regulation of cold acclimation response. *Plant Science*, 205-206: 48-54.
- **Batistic O., Sorek N., Schültke S., Yalovsky S., Kudla J.** (2008) Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20: 1346-1362.
- **Bauer B.E., Rossington D., Mollapour M., Mamnun Y., Kuchler K., Piper P.W.** (2003) Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *Eur. J. Biochem.*, 270: 3189-3195.
- **Beck J.G., Mathieu D., Loudet C., Buchoux S., Dufourc E.J.** (2007) Plant sterols in 'rafts': a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* 21: 1714 – 1723.
- **Beck T., Schmidt A., Hall M.N.** (1999) Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.*, 146: 1227-1238.
- **Bellin D., Werber M., Theis T., Schulz B., Weisshaar B., Schneider K.** (2002) EST sequencing, annotation and microarray transcriptome analysis identify preferentially root-expressed genes in sugar beet. *Plant Biol.*, 4: 700-710.
- **Benedict C., Geisler M., Trygg J., Huner N., Hurrly, V.** (2006) Consensus by democracy. Using meta-analyses of microarray and genomic data to model the cold acclimation signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141: 1219-1232.
- **Benjamins R, Scheres B** (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.*; 59: 443-465.

- **Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers EW.** (2013) GenBank. *Nucleic Acids Res.*; 41(Database issue):D36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195. Epub 2012 Nov 27.
- **Bent AF.** 2000. "Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species". *Plant Physiol.*; 124:1540-1547.
- **Bhalerao RP, Bennett MJ** (2003) The case for morphogens in plants. *Nat. Cell Biol.*; 5: 939-943.
- **Bhalerao RP, Eklof J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G** (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. *Plant J.*; 29: 325-332.
- **Bhat R.A., Miklis M., Schmelzer E., Schulze-Lefert P., Panstruga R.** (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 102: 3135-3140.
- **Bhat R.A., Panstruga R.** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta*; 223: 5-19.
- **Biancardi E., Panella L.W., Lewellen R.T.** (2012) Beta maritima: the origin of beets. Springer, New York.
- **Biegert A., Mayer C., Remmert M., Söding J., Lupas A.N.** (2006) The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*; 34(Web Server issue): W335-9.
- **Bies-Etheve N., Gaubier-Comella P., Debures A., Lasserre E., Jobet E., Raynal M., Cooke R., Delseny M.** (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 67: 107-124.
- **Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*; 19: 131-147.
- **Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*; 433: 39-44.
- **Bloch , D. , Lavy , M. , Efrat , Y. , Efroni , I. , Bracha-Drori , K. , Abu-Abied , M. , et al.** (2005) Ectopic expression of an activated RAC in *Arabidopsis* disrupts membrane cycling. *Mol. Biol. Cell*; 16: 1913-1927.
- **Blom N, Gammeltoft S, Brunak S.** (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*; 294: 1351-1362.
- **Boekhout V., Robert V.** (2003) Yeasts in Food: Beneficial and detrimental aspects. Behr's Verlag. ISBN 978-3-86022-961-3.
- **Bogdanović J., Mojović M., Milosavić N., Mitrović A., Vucinić Z., Spasojević I.** (2008) Role of fructose in the adaptation of plants to cold induced oxidative stress. *The European Biophysical Journal*; 37: 1241-1246.

- **Bohnert H.J., Sheveleva E.** (1998) Plant stress adaptations-making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1: 267-274.
- **Borner G.H., Sherrier D.J., Weimar T., Michaelson L.V., Hawkins N.D., Macaskill A., et al.** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*: evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.*; 137: 104-116.
- **Boutte Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J, Satiat-Jeunemaitre B** (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J. Cell Sci.*; 119: 1255-1265.
- **Boyce J.M., Knight H., Deyholos M., Openshaw M.R., Galbraith D.W., Warren G., Knight M.R.** (2003) The *sfr6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via *CBF/DREB1* and *DREB2* and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant Journal*; 34: 395-406.
- **Bravo L.A., Gallardo J., Navarrete A., Olave N., Martinez J., Alberdi M., Close T.J., Corchera L.J.** (2003) Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum*, 118: 262-269.
- **Brice S.E., Alford C.W., Cowart L.A.** (2009) Modulation of sphingolipid metabolism by the phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase Sac1p through regulation of phosphatidylinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 284(12): 7588-7596.
- **Brown D.A., London E.** (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, 14: 111-136.
- **Brown D.A., London E.** (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, 275(23): 17221-17224.
- **Brunelli, J.P. and Pall, M.L.** (1993) A series of yeast/*Escherichia coli*  $\lambda$  expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision. *Yeast*, 9: 1309–1318.
- **Burkhard P., Stetefeld J., Strelkov S.V.** (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.*; 11: 82–88.
- **Calderón-Villalobos L.I.A., Nill C., Marrocco K., Kretsch T., Schwechheimer C.** (2007) The evolutionarily conserved *Arabidopsis thaliana* F-box protein AtFBP7 is required for efficient translation during temperature stress. *Gene*; 392: 106-116.
- **Cambridge AP, and Morris, D.A.** (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*; 199: 583-588.
- **Cao S., Ye M., Jiang S.** (2005) Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*; 24: 683-690.
- **Capel J., Jarillo J.A., Salinas J., Martínez-Zapater J.M.** (1997) Two homologous low-temperature-inducible genes from *Arabidopsis* encode highly hydrophobic proteins. *Plant Physiology*; 115: 569-576.
- **Carlton J.G., Cullen P.J.** (2005) Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol.*; 15(10): 540-547.

- **Catalá R., Medina J., Salinas J.** (2011) Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108: 16475-16480.
- **Catusse J., Strub J.M., Job C., van Dorselaer A., Job D.** (2008) Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 105: 10262-10267.
- **Černý M., Dyčka F., Bobál'ová J., Brzobohatý B.** (2011) Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of Arabidopsis thaliana identified by proteome and phosphoproteome profiling. *Journal of Experimental Botany*; 62(3), pp: 921–937.
- **Chantalat S., Park S.K., Hua Z., Liu K., Gobin R., Peyroche A., Rambourg A., Graham T.R., Jackson C.L.** (2004) The Arf activator Gea2p and the P-typeATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 117(5): 711-722.
- **Chen R., Baluška F.** (eds.) (2013) *Polar Auxin Transport, Signaling and Communication in Plants 17*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-35299-7\_1.
- **Chen W.P., Li P.H., Chen T.H.H.** (2000) Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays L.* *Plant, Cell and Environment*, 23: 609-618.
- **Chen Y., Hoehenwarter W., Weckwerth W.** (2010) Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in Arabidopsis thaliana using TiO<sub>2</sub>-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment. *Plant J.*; 63(1): 1-17. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04218.x. Epub 2010 Mar 31.
- **Cheong Y.H., Kim K.N., Pandey G.K., Gupta R., Grant J.J., Luan S.** (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15: 1833-1845.
- **Cheung A.Y., Wu H.M.** (2004).Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *PlantCell*; 16, 257–269.doi:10.1105/tpc.016550
- **Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M., Zhu J.K.** (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes and Development*, 17: 1043-1054.
- **Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K.** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.*,12: 444-451.
- **Chinnusamy V., Zhu J.K., Sunkar R.** (2010) Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods Mol. Biol.*, 639:39-55.
- **Cho M, Lee SH, Cho HT** (2007) P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*; 19: 3930-3943.
- **Choi H.I., Hong J.H., Ha J.O., Kang J.Y., Kim S.Y.** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 1723-1730.
- **Chow B.Y., Sanchez S.E., Breton G., Pruneda-Paz J.L., Krogan N.T., Kay S.A.** (2014) Transcriptional regulation of LUX by CBF1 mediates cold input to the circadian clock in

Arabidopsis. *Current Biology*; 24(13): 1518-24. Doi: 10.1016/j.cub.2014.05.029. Epub 2014 Jun 19.

- **Cichowski K., Jacks T.** (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*; 104 (4): 593-604.
- **Ciereszko I., Johansson H., Kleczkowski L.A.** (2001) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. *Biochemical Journal*; 354: 67-72.
- **Cleves A.E., McGee T.P., Whitters E.A., Champion K.M., Aitken J.R., Dowhan W., Goebel M., Bankaitis V.A.** (1991) Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell*; 64(4): 789-800.
- **Cleves A.E., Novick P.J., Bankaitis V.A.** (1989) Mutations in the *SAC1* gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J. Cell Biol.*; 109: 2939- 2950.
- **Clough S.J., Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*; 16:735-43.
- **Cole C.N., Scarcelli J.J.** (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*; 18: 299-306.
- **Cooke D.A., Scott R.K.** (1993) The Sugar Beet Crop. Chapman and Hall, Publishers. 675 pp.
- **Crifo T., Puglisi I., Petrone G., Recupero G.R., Lo Piero A.R.** (2011) Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: implication of the flavonoid biosynthetic pathway. *Gene*; 478: 1-9.
- **Cuevas J.C., Lopez-Cobollo R., Alcazar R., Zarza X., Koncz C., Altabella T., Salinas J., Tiburcio A.F., Ferrando A.** (2008) Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol.*; 148:1094-1105.
- **Curwin A.J., LeBlanc M.A., Fairn G.D., McMaster C.R.** (2013) Localization of Lipid Raft Proteins to the Plasma Membrane Is a Major Function of the Phospholipid Transfer Protein Sec14. *PLoS One*; 8(1): e55388. doi: 10.1371/journal.pone.0055388.
- **Curwin A.J., McMaster C.R.** (2008) Structure and function of the enigmatic Sec14 domain-containing proteins and the etiology of human disease. *Future Lipidol.*; 3(4): 399-410.
- **Daicho K., Makino N., Hiraki T., Ueno M., Uritani M., Abe F., Ushimaru T.** (2009) Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. *FEMS Microbiol. Lett.*; 298(2): 218-227. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01722.x. Epub 2009 Jul 13.
- **Daicho K., Maruyama H., Suzuki A., Ueno M., Uritani M., Ushimaru T.** (2007) The ergosterol biosynthesis inhibitor zaragozic acid promotes vacuolar degradation of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*; 1768: 1681-1690.
- **Dalchau N., Baek S.J., Briggs H.M., Robertson F.C., Dodd A.N., Gardner M.J., Stancombe M.A., Haydon M.J., Stan G.B., Gonçalves J.M., Webb A.A.** (2011) The

circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 108: 5104-5109. doi.org/10.1073/pnas.1015452108.

- **Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N., Sarhan F.** (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *The Plant Cell*; 10: 623-638.
- **Davletova S., Schlauch K., Coutu J., Mittler R.** (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*; 13: 847-856.
- **de Biaggi M.** (2005) Rhizomania. In: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds) genetics and breeding of sugar beet. Science Publisher, Enfield, pp 80-85.
- **de Bruxelles G.L., Peacock W.J., Dennis E.S., Dolferus R.** (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; 111: 381-391.
- **De Castro E., Sigrist C.J.A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A., Hulo N.** (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.*; 34(Web Server issue): W362-5.
- **de Graaf P., Zwart W.T., van Dijken R.A., Deneka M., Schulz T.K., Geijsen N., Coffey P.J., Gadella B.M., Verkleij A.J., van der Sluijs P., van Bergen en Henegouwen P.M.** (2004) Phosphatidylinositol 4-kinase beta is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell*; 15(4): 2038-2047.
- **Debant A., Serra-Pagès C., Seipel K., O'Brien S., Tang M., Park S.H., Streuli M.** (1996) The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93(11): 5466-5471.
- **Dee C.T., Moffat K.G.** (2005) A novel family of mitochondrial proteins is represented by the *Drosophila* genes slmo, preli-like and real-time. *Dev. Genes Evol.*; 215: 248-254.
- **Demmel L., Gravert M., Ercan E., Habermann B., Müller-Reichert T., Kukhtina V., Haucke V., Baust T., Sohrmann M., Kalaidzidis Y., Klose C., Beck M., Peter M., Walch-Solimena C.** (2008) The clathrin adaptor Gga2p is a phosphatidylinositol-4-phosphate effector at the Golgi exit. *Mol. Biol. Cell*; 19(5): 1991-2002.
- **Dempsey D.A., Shah J., Klessig D.F.** (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*; 18: 547-575.
- **Deng Z., Zhang X., Tang W., Osés-Prieto J.A., Suzuki N., Gendron J.M., Chen H., Guan S., Chalkley R.J., Peterman T.K., Burlingame A.L., Wang Z.Y.** (2007) A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis*. *Mol. Cell. Proteomics.*; 6(12): 2058-71. Epub 2007 Sep 11.
- **Divi U.K., Krishna P.** (2009) Brassinosteroids confer stress tolerance. In *Plant Stress Biology* (Hirt, H., ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim pp. 119–135.



- **Doherty C.J., van Buskirk H.A., Myers S.J., Thomashow M.F.** (2009) Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*; 21: 972-984.
- **Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgräwe D., Capella-Gutiérrez S., Zakrzewski F., Tafer H., Rupp O., Sörensen T.R., Stracke R., Reinhardt R., Goesmann A., Kraft T., Schulz B., Stadler P.F., Schmidt T., Gabaldón T., Lehrach H., Weisshaar B., Himmelbauer H.** (2013) The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature*; 505: 546-549.
- **Dong C.H., Agarwal M., Zhang Y., Xie Q., Zhu J.K.** (2006b) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 103: 8281-8286.
- **Dong C.H., Hu X., Tang W., Zheng X., Kim Y.S., Lee B.H., Zhu JK.** (2006a) A putative *Arabidopsis* nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Mol. Cell. Biol.*; 26: 9533-9543.
- **Dong M.A., Farré E.M., Thomashow M.F.** (2011) CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 108: 7241-7246.
- **Dong X.** (1998) SA, JA. Ethylene. And disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*; 1: 316-329.
- **Dortay H., Gruhn N., Pfeifer A., Schwerdtner M., Schmölling T., Heyl A.** (2008) Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteome Research*; 7: 3649-3660.
- **Dupre S., Haguenaer-Tsapis R.** (2003) Raft partitioning of the yeast uracil permease during trafficking along the endocytic pathway. *Traffic*; 4(2): 83-96.
- **Durek P, Schmidt R, Heazlewood JL, Jones A, MacLean D, Nagel A, Kersten B, Schulze WX.** (2010). PhosPhAt: the *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.*; 38:D828-34.
- **Echevarría-Zomeño S., Yáñez E., Fernández-Bautista N., Castro-Sanz A.B., Ferrando A., Castellano M.M.** (2013) Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*; 14: 4670-4683.
- **Edelman J., Hanson A.D.** (1971) Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. *Planta*, 98: 150-156. doi.org/10.1007/BF00385347.
- **Eisenkolb M., Zenzmaier C., Leitner E., Schneiter R.** (2002) A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol. Biol. Cell*; 13(12): 4414-4428.
- **Ensminger I., Busch F., Huner N.P.A.** (2006) Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*; 126: 28-44.

- **Eriksson S.K., Kutzer M., Procek J., Grobner G., Harryson P.** (2011) Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Lti30, a cold-induced plant stress protein. *Plant Cell*; 23:2391-2404.
- **Fang M., Kearns B.G., Gedvilaite A., Kagiwada S., Kearns M., Fung M.K.Y., Bankaitis V.A.** (1996) Kes1p shares homology with human oxysterol binding protein and participates in a novel regulatory pathway for yeast Golgi-derived transport vesicle biogenesis. *EMBO J.*; 15(23): 6447-6459.
- **Fariselli P., Molinini D., Casadio R., Krogh A.** (2007) Prediction of Structurally-Determined Coiled-Coil Domains with Hidden Markov Models. *Lect. Notes Comp. Sci.*; 4414: 292-302.
- **Favery B., Chelysheva L.A., Lebris M., Jammes F., Marmagne A., DeAlmeida-Engler J., et al.** (2004). *Arabidopsis* formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *PlantCell*; 16, 2529–2540.doi:10.1105/tpc.104.024372
- **Feng S., Chen J.K., Yu H., Simon J.A., Schreiber S.L.** (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*; 266: 1241–1247
- **Fernandez O., Vandestein L., Feil R., Baillieul F., Lunn J.E., Clément C.** (2012) Trehalose metabolism is activated upon chilling in grapevine and might participate in *Burkholderia phytofirmans* induced chilling tolerance. *Planta*; 236: 355-369.
- **Ferris C.C., Lim J., Elmore D., Peterman T.K.** (2010) Does the Sec14 domain of Patellin 1 bind PtdIns(5)P?. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2010-Montreal, Canada.*
- **Fishman G.A., Roberts M.F., Derlacki D.J., Grimsby J.L., Yamamoto H., Sharon D., Nishiguchi K.M., Dryja T.P.** (2004) Vowel mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) associated with retinitis punctata albescens: evidence of interfamilial genetic heterogeneity and fundus changes in heterozygotes. *Arch. Ophthalmol.*; 122(1): 70-75.
- **Fleming AJ** (2006) Plant signalling: the inexorable rise of auxin. *Trends Cell Biol.*; 16: 397-402.
- **Forment J., Naranjo M.A., Roldán M., Serrano R., Vicente O.** (2002) Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J.*; 30(5): 511-519.
- **Fowler S., Thomashow M.F.** (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*; 14: 1675-1690.
- **Fowler S.G., Cook D., Thomashow M.F.** (2005) Low temperature induction of *Arabidopsis* *CBF1*, *2*, and *3* is gated by the circadian clock. *Plant Physiology*; 137: 961-968.
- **Franklin K.A., Whitelam G.C.** (2007) Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.*; 39: 1410–1413.

- **Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G, Palme K** (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell*; 108: 661-673.
- **Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature*; 426: 147-153.
- **Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K** (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*; 415: 806-809.
- **Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1996) Gravitropic response of inflorescence stems in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.*; 110: 933–943.
- **Fursova O.V., Pogorelko G.V., Tarasov V.A.** (2009) Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*; 429: 98-103.
- **Galston A.W., Sawhney R.K.** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology*; 94: 406-410.
- **Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science*; 282: 2226-2230.
- **Gareau J.R., Lima C.D.** (2010) The SUMO pathway: Emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 11: 861-871.
- **Gari E., Piedrafita L., Aldea M., Herrero E.** (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*; 13: 837-848.
- **Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F. and Dommes J.** (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*; 37: 263-285.
- **Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A.** (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607.
- **Gechev T., Willekens H., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W., Toneva V., Minkov I.** (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol.*; 160: 509-515.
- **Geisler M., Blakeslee J.J., Bouchard R., Lee O.R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bailly A., Richards E.L., Ejendal K.F., Smith A.P., Baroux C., Grossniklaus U., Muller A., Hrycyna C.A., Dudler R., Murphy A.S., Martinoia E.** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.*; 44: 179-194.
- **Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A., Jurgens G.** (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates

- endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*; 112: 219-230.
- **Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G, Palme K** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*; 413: 425-428.
  - **Ghosh R., Bankaitis V.A.** (2011) Phosphatidylinositol transfer proteins: Negotiating the regulatory interface between lipid metabolism and lipid signaling in diverse cellular processes. *BioFactors*; 37(4): 290-308. doi: 10.1002/biof.180.
  - **Gietz R.D., Sugino A.** (1988) New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*; 74: 527-534.
  - **Gilmour S.J., Thomashow M.F.** (1991) Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*; 17: 1233-1240.
  - **Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M., Thomashow M.F.** (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant Journal*; 16: 433-442.
  - **Goda H., Sawa S., Asami T., Fujioka S., Shimada Y., Yoshida S.** (2004) Comprehensive comparison of auxinregulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; 134:1555–1573.
  - **Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G.** (1996) Life with 6000 genes. *Science*; 274: 563-567.
  - **Goñi, O.** (2010) Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3-β-glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de *Annona cherimola* Mill. por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>. *Tesis doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
  - **Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J., Lopez R.** (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research*; 38 Suppl: W695-9 doi:10.1093/nar/gkq313.
  - **Grabon A., Khan D., Bankaitis V.A.** (2015) Phosphatidylinositol transfer proteins and instructive regulation of lipid kinase biology. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1851(6): 724-735.
  - **Graumann P.L., Marahiel M.A.** (1998) *Trends Biochem. Sci.*, 23: 286-290.
  - **Griac P.** (2007) Sec14 related proteins in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*; 1771(6):737-745. Epub 2007 Mar 2. Review.
  - **Griffith M., Lumb C., Wiseman S.B., Wisniewski M., Johnson R.W., Marangoni A.G.** (2005) Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiol.*; 138:330-340.

- **Griffith M., Yaish M.W.** (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.*; 9: 399-405.
- **Gründemann D., Schömig E.** (1996) Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *BioTechniques*; 21: 898-903.
- **Guan Q., Wu J., Zhang Y., Jiang C., Liu R., Chai C., Zhu J.** (2013) A DEAD Box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*; 25: 342-356.
- **Guo Y., Xiong L., Ishitani M., Zhu J.K.** (2002) An Arabidopsis mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 99: 7786-7791.
- **Gusta L.V., Wisniewski M., Nesbitt N.T., Gusta M.L.** (2004) The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology*; 135: 1642-1653.
- **Guthrie C., Fink GR.** (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Academic Press*.
- **Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F., Zhang, J.Z.** (2002) Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*; 130: 639-648.
- **Habermehl D., Kempna P., Azzi A., Zingg J.M.** (2004) Recombinant SEC14-like proteins (TAP) possess GTPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 326(1): 254-259.
- **Hannah M.A., Heyer A.G., Hinch D.K.** (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*; 1: e26.
- **Haslam R.J., Koide H.B., Hemmings B.A.** (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature*; 363: 309-310.
- **Havaux M., Niyogi K.K.** (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 96: 8762-8767.
- **He L., Nada K., Kasukabe Y., Tachibana S.** (2002) Enhanced susceptibility of photosynthesis to low-temperature photoinhibition due to interruption of chill-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Plant Cell Physiology*; 43: 196-206.
- **Hearn J.D., Lester R.L., Dickson R.C.** (2003) The uracil transporter Fur4p associates with lipid rafts. *J. Biol. Chem.*; 278(6): 3679-3686.
- **Heazlewood JL, Durek P, Hummel J, Selbig J, Weckwerth W, Walther D, Schulze WX.** (2008). PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in Arabidopsis thaliana and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Res.*; 36:D1015-21.
- **Hechtberger P., Zinser E., Saf R., Hummel K., Paltauf F., Daum G.** (1994) Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 225(2): 641-649.

- **Heese-Peck A., Pichler H., Zanolari B., Watanabe R., Daum G., Riezman H.** (2002) Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol. Biol. Cell.*; 13 (8): 2664-2680.
- **Hekneby M., Antolín M.C., Sánchez-Díaz M.** (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environ. Exp. Bot.*; 55: 305-314.
- **Hellens Roger, Klee Harry, Mullineaux Philip.** (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.*; 5:446-451.
- **Hepler P.K., Hush J.M.** (1996) Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiology*; 112: 455-461.
- **Hernández T.** (2014) Identificación y caracterización funcional del complejo nuclear de proteínas LSM de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta de aclimatación a las temperaturas bajas. *Tesis doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
- **Hoffman C.M.** (2010) Root quality of sugar beet. *Sugar Tech.*; 12: 276-287.
- **Holt, M.R., Koffer A.** (2001) Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends in Cell Biology*; 11: 38-46.
- **Hsu J.L., Wang L.Y., Wang S.Y., Lin C.H., Ho K.C., Shi F.K., Chang I.F.** (2009) Functional phosphoproteomic profiling of phosphorylation sites in membrane fractions of salt-stressed *Arabidopsis thaliana*. *Proteome Science*; 7:42. doi: 10.1186/1477-5956-7-42.
- **Huang C., Ding S., Zhang H., Du H., An L.** (2011) CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*; 181: 57-64.
- **Huang T., Duman J.G.** (2002) Cloning and characterization of a termal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol. Biol.*; 48: 339-350.
- **Ikonen E.** (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13(4): 470-477.
- **Ile K.E., Kassen S., Cao C., Vihtelic T., Shah S.D., Huijbregts R.P.H., Alb J.G.Jr., Stearns G.W., Brockerhoff S.E., Hyde D.R., Bankaitis V.A.** (2010) The zebrafish class 1 phosphatidylinositol transfer protein family: PITPbeta isoforms and double cone cell outer segment integrity in retina. *Traffic*; 11(9): 1151-1167.
- **Ile K.E., Schaaf G., Bankaitis V.A.** (2006) Phosphatidylinositol transfer proteins and cellular nanoreactors for lipid signaling. *Nat. Chem. Biol.*; 2(11): 576-583.
- **Ingouff M., FitzGerald J.N., Guerin C., Robert H., Sorensen M.B., Van Damme D., et al.** (2005) Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nat. Cell Biol.*; 7, 374–380. doi:10.1038/ncb1238
- **Ishikawa M., Yoshida S.** (1985) Seasonal changes in plasma membranes and mitochondria isolated from Jerusalem artichoke tubers: possible relationship to cold hardiness. *Plant Cell Physiol.*; 90: 1088-1095.
- **ISO**, International Sugar Organization (www.isosugar.org/)
- **Isono E., Katsiarimpa A., Müller I.K., Anzenberger F., Stierhof Y.D., Geldner N., Chory J., Schwechheimer C.** (2010) The deubiquitinating enzyme AMSH3 is required for

- intracellular trafficking and vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*; 22(6):1826-37. doi: 10.1105/tpc.110.075952. Epub 2010 Jun 11.
- **Ivanov A.G., Rosso D., Savitch L.V., Stachula P., Rosembert M., Oquist G., Hurry V., Huner N.P.** (2012) Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.*; 113: 191-206.
  - **James A.B., Syed N.H., Bordage S., Marshall J., Nimmo G.A., Jenkins G.I., Herzyk P., Brown J.W., Nimmo H.G.** (2012) Alternative splicing mediates responses of the *Arabidopsis* circadian clock to temperature changes. *The Plant Cell*; 24: 961-981.
  - **Jameson P.E., Clarke S.F.** (2002) Hormone-Virus Interactions in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*; 21(3): 205-228.
  - **Jarillo J.A., Capel J., Leyva A., Martínez-Zapater J.M., Salinas J.** (1994) Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Mol. Biol.*; 25: 693-704.
  - **Jiang C., lu B., Singh J.** (1996) Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*; 30: 679-684.
  - **Johnson F.H., Eyring H., Sotver B.J.** (1974) *The theory of rate processes in biology and medicine*. Wiley, New York. pp. 703.
  - **Johnson M.P., Pérez-Bueno M.L., Zia A., Horton P., Ruban A.V.** (2009) The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of nonphotochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; 149(2): 1061-75. Doi: 10.1104/pp.108.129957. Epub 2008 Nov 14.
  - **Jones A.M.E., MacLean D., Studholme D.J., Serna-Sanz A., Andreasson E., Rathjen J.P., Peck S.C.** (2009) Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics*; 72 (3): 439-451.
  - **Jones P., Binns D., Chang H.Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A.F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S.Y., Lopez R., Hunter S.** (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics.*; 30(9): 1236-1240. doi: 10.1093/bioinformatics/btu031. Epub 2014 Jan 21.
  - **Juntawong P., Sorenson R., Bailey-Serre J.** (2013) Cold shock protein 1 chaperone mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*; 74: 1016-1028.
  - **Kadereit G., Mavrodiev E.V., Zacharias E.H., Sukhorukov A.P.** (2010) Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): Implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 Photosynthesis. *American Journal of Botany*; 97(10): 1664-1687.
  - **Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P.** (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta*; 225(2):353-64. Epub 2006 Aug 12.

- **Kamata T., Uemura M.** (2004) Solute accumulation in heat seedlings during cold acclimation: Contribution to increased freezing tolerance. *Cryo Letters*; 25: 311-322.
- **Kanhonou R., Serrano R., Palau R.R.** (2001) A catalytic subunit of the sugar beet protein kinase CK2 is induced by salt stress and increases NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.*; 47(5): 571-579.
- **Kaniuga Z.** (2008) Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Plant Biology*; 10: 171-184.
- **Kant P., Kant S., Gordon M., Shaked R., Barak S.** (2007) stress response suppressor1 and stress response suppressor2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiology*; 145: 814-830.
- **Kaplan F., Guy C.L.** (2004) Beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*; 135: 1674-1684.
- **Kapranov P., Routt S.M., Bankaitis V.A., de Bruijn F.J., Szczyglowski K.** (2001) Nodule-specific regulation of phosphatidylinositol transfer protein expression in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*; 13: 1369-1382.
- **Kaur G., Kumar S., Thakur P., Malik J.A., Bhandhari K., Sharma K.D., Nayyar H.** (2011) Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum L.*) to chilling stress at reproductive stage. *Sci. Hortic.*; 128: 174-181.
- **Kay B.K., Williamson M.P., Sudol M.** (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.*; 14: 231–24.
- **Kearns B.G., McGee T.P., Mayinger P., Gedvilaite A., Phillips S.E., Kagiwada S., Bankaitis VA.** (1997) Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature*; 387: 101-105.
- **Khozoie C., Pleass R.J., Avery S.V.** (2009) The antimalarial drug quinine disrupts Tat2p-mediated tryptophan transport and causes tryptophan starvation. *J. Biol. Chem.*; 284: 17968-74.
- **Kim H.J., Hyun Y., Park J.Y., Park M.J., Park M.K., Kim M.D., Kim H.J., Lee M.H., Moon J., Lee I., Kim J.** (2004) A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*; 36: 167-171.
- **Kim J.O., Kim J.S., Kang H.** (2005) Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*; 42: 890-900.
- **Kim J.S., Jung H.J., Lee H.J., Kim K.A., Goh C.H., Woo Y., Oh S.H., Han Y.S., Kang H.** (2008) Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55: 455-466.
- **Kim J.Y., Park S.J., Jang B., Jung C., Ahn S.J., Goh C., Cho K., Han O., Kang H.** (2007) Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant Journal*, 50: 439-451.



- **Kim M.H., Sasaki K., Imai R.** (2009) Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 23454-23460.
- **Kim SY, Kim BH, Lim CJ, Lim CO, Nam KH.** (2010) Constitutive activation of stress-inducible genes in a brassinosteroid-insensitive 1 (bri1) mutant results in higher tolerance to cold. *Physiol Plant*, 138(2):191-204. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01304.x. Epub 2009 Oct 6.
- **Kim T.E., Kim S.K., Han T.J., Lee J.S., Chang S.C.** (2002) ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 115: 370-376.
- **Kim Y.S., Park S., Gilmour S.J., Thomashow M.F.** (2013) Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 75: 364-376.
- **Kirchhoff M., Svirshchetskaya A., Hoffman C., Schechert A., Jung C., Kopisch-Obuch F.** (2012) High degree of genetic variation of winter hardiness in a panel of *Beta vulgaris* L. *Crop Sci.*, 52: 179-188.
- **Kishor P.B.K., Sangam S., Amrutha R.N., Laxmi P.S., Naidu K.R., Rao K, Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N.** (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.*, 88: 424-438.
- **Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer PB, Wisniewska J, Paciorek T, Benkova E, Friml J** (2008) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr. Biol.*; 18: 526-531.
- **Klemm R.W., Ejsing C.S., Surma M.A., Kaiser H.J., Gerl M.J., Sampaio J.L., de Robillard Q., Ferguson C., Proszynski T.J., Shevchenko A., Simons K.** (2009) Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology*, 185(4): 601-612.
- **Knight H., Zarka D.G., Okamoto H., Thomashow M.T., Knight, M.R.** (2004) Abscisic acid induces *CBF* gene transcription and subsequent induction of cold regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiology*, 135: 1710-1717.
- **Knight M.R., Knight H.** (2012) Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, 195: 737-751.
- **Koag M.C., Fenton R.D., Wilkens S., Close T.J.** (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology*, 131: 309-316.
- **Komatsu S., Yamada E., Furukawa K.** (2009) Cold stress changes the concanavalin A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths. *Amino Acids*, 36: 115-123.
- **Komatsu, S., Yang, G., Khan, M., Onodera, H., Toki, S., Yamaguchi, M.** (2007) Overexpression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277: 713-723.

- **Korenykh A, Walter P.** (2012) Structural basis of the unfolded protein response. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*; 28: 251-277.
- **Koster K.L., Lynch D.V.** (1992) Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma Rye. *Plant Physiology*; 98: 108-113.
- **Kotzabasis K., Christakis-Hampsas M.D., Roubelakis-Angelakis K.A.** (1993) A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines. *Analytical Biochemistry*; 214: 484-489.
- **Kratsch H.A., Wise R.R.** (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*; 23: 337-350.
- **Kreps J., Budworth P., Goff S., Wang R.** (2003) Identification of putative plant cold responsive regulatory elements by gene expression profiling and a pattern enumeration algorithm. *Plant Biotechnology Journal*; 1: 345-352.
- **Kreps J.A., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J.F.** (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*; 130: 2129-2141.
- **Krishna, P.** (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.*; 22: 289-297.
- **Krol M., Ivanov A.G., Jansson S, Kloppstech K., Huner N.P.** (1999) Greening under high light or cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the *Chlorina f2* mutant. *Plant Physiol.*; 120: 193-204.
- **Kumar S.V., Wigge P.A.** (2010) H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*; 140: 136-147.
- **Kushnirov V.V.** (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*; 06: 857-860.
- **Lageix S., Lanet E., Pouch-Pelissier M.N., Espagnol M.C., Robaglia C., Deragon J.M., Pelissier T.** (2008) Arabidopsis eIF2a kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology*; 8: 134.
- **Laibach F.** (1907) Zur Frage nach der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich. *Beih Botan Zentralbl*; 22: 191-210.
- **Laloi M., Perret A.M., Chatre L., Melser S., Cantrel C., Vaultier M.N., et al.** (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol.*; 143: 461 – 472.
- **Lambers H., Stuart-Chapin III F., Pons T.L.** (1998) Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag, New York.
- **Lång V., Mäntylä E., Welin B., Sundberg B., Palva E.T.** (1994) Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 104: 1341-1349.

- **Lanza M, Garcia-Ponce B, Castrillo G, Catarecha P, Sauer M, Rodriguez-Serrano M, Páez-García A, Sánchez-Bermejo E, T C M, Leo del Puerto Y, Sandalio LM, Paz-Ares J, Leyva A.** (2012) Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Dev. Cell.*; 22(6): 1275-85. doi: 10.1016/j.devcel.2012.
- **Larcher W.** (1995) Plants under stress, pp 321-375. *Physiological Plant Ecology*, 3rd ed. Springer. Berlín.
- **Lauwers E., Andre B.** (2006) Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell surface location. *Traffic*, 7(8): 1045-1059.
- **Lee B.H., Henderson D.A., Zhu J.K.** (2005) The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell*, 17: 3155-3175.
- **Lee B.H., Kapoor A., Zhu J., Zhu J.K.** (2006) STABILIZED1, a stress upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18: 1736-1749.
- **Lee B.H., Lee H., Xiong L., Zhu J.K.** (2002) A mitochondrial complex I defect impairs cold regulated nuclear gene expression. *The Plant Cell*, 14: 1235-1251.
- **Lee H., Guo Y., Ohta M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J.K.** (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.*, 21: 2692-2702.
- **Lee J., Rackaityte E., Peterman T.K.** (2010) Are Patellin1 and Patellin3 functionally redundant?. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2010-Montreal, Canada.*
- **Lee M.C., Hamamoto S., Schekman R.** (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H<sup>+</sup> - ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277: 22395-22401.
- **Lee O.R., Kim S.J., Kim H.J., Hong J.K., Ryu S.B., Lee S.H., Ganguly A., Cho H.T.** (2010) Phospholipase A(2) is required for PIN-FORMED protein trafficking to the plasma membrane in the Arabidopsis root. *Plant Cell.*; 22(6):1812-25. doi: 10.1105/tpc.110.074211. Epub 2010 Jun 4.
- **Lee S.J., Kang J.Y., Park H.J., Kim M.D., Bae M.S., Choi H.I., Kim S.Y.** (2010) DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant Physiol.*, 153: 716-727.
- **Lefebvre B., Furt F., Hartmann M.A., Michaelson L.V., Carde J.P., Sargueil-Boiron F., et al.** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.*; 144: 402-418.
- **Lehti-Shiu M.D., Shiu S.H.** (2012) Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B* 367: 2619-2639.
- **Levitt J.** (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. 1, 2nd ed. Academic Press, New York.

- **Levy S.V., Peterman T.K.** (2009) Spatial expression patterns of PATL1 and PATL3 suggest functional redundancy. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2009-Honolulu, Hawaii USA.*
- **Li L., Xu J., Xu Z., Xue H.** (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in Brassica and Arabidopsis. *Plant Cell*; 17(10):2738-53.
- **Li X., Rivas M.P., Fang M., Marchena J., Mehotra B., Chaudhary A., Feng L., Prestwich G.D., Bankaitis V.A.** (2002) Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.*, 157(1): 63-77.
- **Li X., Routt S.M., Xie Z., Cui X., Fang M., Kearns M.A., Bard M., Kirsch D.R., Bankaitis V.A.** (2000) Identification of a novel family of non classic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Mol. Biol. Cell*; 11(6): 1989-2005.
- **Lichtenthaler H. K.** (1998) The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851:187-98.
- **Litvak V., Dahan N., Ramachandran S., Sabanay H., Lev S.** (2005) Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat. Cell. Biol.*, 7(3): 225-234.
- **Liu H.H., Tian X., Li Y.J., Wu C.A., Zheng C.C.** (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14: 836-843.
- **Liu M., Brusilow W.S., Needleman R.** (2004) Activity of the yeast Tat2p tryptophan permease is sensitive to the anti-tumor agent 4-phenylbutyrate. *Curr. Genet.*, 46: 256-268.
- **Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Ab, H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406.
- **Livingston III D.P., Hinch D.K., Heyer AG.** (2009) Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell Mol. Life Sci.*, 66:2007-2023.
- **Llorente F., Oliveros J.C., Martínez-Zapater J.M., Salinas J.** (2000) A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, frs1, is a new aba3 allele. *Planta*, 211: 648-655.
- **Lopez M.C., Nicaud J.M., Skinner H.B., Vergnolle C., Kader J.C., Bankaitis V.A., Gaillardin C.** (1994) A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J. Cell Biol.*, 125(1): 113-127.
- **Luan S.** (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol.*; 54: 63-92.
- **Lukatkin A., Brazaitytė S., Bobinas C., Duchovskis P.** (2012) Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review. *Žemdirbystė=Agriculture*, 99(2): 111-124.

- **Lunn J.E., Delorge I., Figueroa C.M., Van Dijck P., Stitt M.** (2014) Small molecules: from structural diversity to signalling and regulatory roles. *The Plant Journal*, 79: 544-567.
- **Luo J., Shen G., Yan J., He C., Zhang H.** (2006) AtCHIP functions as an E3 ubiquitin ligase of protein phosphatase 2A subunits and alters plant response to abscisic acid treatment. *Plant J.*, 46: 649-657.
- **Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P., Fink G.R.** (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*; 12: 2175-2187.
- **Lv D.K., Bai X., Li Y., Ding X.D., Ge Y., Cai H., Ji W., Wu N., Zhu Y.M.** (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene*, 459: 39-47.
- **Mahajan S., Tuteja N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 444: 139-158.
- **Malínská K., Malínský J., Opekarová M., Tanner W.** (2003) Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell.*, 14(11): 4427-4436.
- **Mantyla E., Lang V., Palva E.T.** (1995) Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 107: 141-148.
- **Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P.J., Bennett M., Sandberg G.** (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*; 14: 589-597.
- **Marí-Carmona, C.** (2012) El gen *CRIO5* y su implicación en el estrés por frío en plantas. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- **Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyna M.** (2012) Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Research*, 22: 1184-1195.
- **Martínez F., Sardanyés J., Elena S.F., Darós J.A.** (2011). Dynamics of a plant RNA virus intracellular accumulation: stamping machine vs. geometric replication. *Genetics*; 188: 637-46.
- **Mauger J.P.** (2012) Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biol. Cell*, 104, 70-83.
- **Mayer B.J., Ren R., Clark K.L., Baltimore D.** (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*; 73: 629-630.
- **Mazars C., Thion L., Thuleau P., Graziana A., Knight M.R., Moreau M., Ranjeva R.** (1997) Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell Calcium*, 22: 413-420.
- **Mazzucotelli E., Belloni S., Marone D., De Leonardis A., Guerra D., Di Fonzo N., Cattivelli L., Mastrangelo A.** (2006) The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr. Genomics*, 7: 509-522.

- **Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Crosatti C., Guerra D., Stanca A.M., Cattivelli L.** (2008) Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Sci.*, 174: 420-431.
- **McFarlane A.A., Orriss G.L., Stetefeld J.** (2009) The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems. *Eur. J. Pharmacol.*; 625(1-3): 101-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.05.034. Epub 2009 Oct 14.
- **McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meegher RB.** (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant J.*; 8: 613-622.
- **Medina J., Bagues M., Terol J., Perez-Alonso M., Salinas J.** (1999) The *Arabidopsis* CBF family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, 119: 463-470.
- **Mehlmer N., Wurzinger B., Stael S., Hofmann-Rodrigues D., Csaszar E., Pfister B., Bayer R., Teige M.** (2010) The Ca(2+)-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 484-498.
- **Meier R., Tomizaki T., Schulze-Briese C., Baumann U., Stocker A.** (2003) The molecular basis of vitamin E retention: structure of human alpha-tocopherol transfer protein. *J. Mol. Biol.*, 331(3): 725-734.
- **Men S, Boutte Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M** (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates postcytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.*; 10: 237–244.
- **Meyerowitz E.M.** (1987) *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics*. 21:92-111.
- **Meyerowitz E.M.** (1994) Plant developmental biology: green genes for the 21st century. *BioEssays*. 16:621-625.
- **Meyerowitz E.M.** (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* 125: 15-19.
- **Mikkelsen M.D., Thomashow M.F.** (2009) A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 60: 328-339.
- **Min KC, Kovall RA, Hendrickson WA.** (2003) Crystal structure of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein bound to its ligand: Implications for ataxia with vitamin E deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(25): 14713-14718.
- **Minami A., Fujiwara M., Furuto A., Fukao Y., Yamashita T., Kamo M., Kawamura Y., Uemura M.** (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.*; 50(2):341-59. doi: 10.1093/pcp/pcn202. Epub 2008 Dec 23.
- **Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA).** (<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/remolacha-azucarera/#para5>)

- **Mittler R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J.K.** (2006) Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Lett.*, 580: 6537-6542.
- **Miura K., Furumoto T.** (2013) Cold Signaling and Cold Response in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 5312-5337.
- **Miura K., Hasegawa P.M.** (2010) Sumoylation and other ubiquitin-like posttranslational modifications in plants. *Trends Cell Biol.*, 20: 223-232.
- **Miura K., Jin J.B., Hasegawa P.M.** (2007b) Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 495-502.
- **Miura K., Jin J.B., Lee J., Yoo C.Y., Stirm V., Miura T., Ashworth E.N., Bressan R.A., Yun D.J., Hasegawa P. M.** (2007a) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 1403-1414.
- **Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yokoi S., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G., Baek D., Koo Y.D., Jin J.B., Bressan R.A., Yun D.J., Hasegawa P.M.** (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 7760-7765.
- **Miura T., Abe F.** (2004) Multiple ubiquitin-specific protease genes are involved in degradation of yeast tryptophan permease Tat2 at high pressure. *FEMS Microbiol. Lett.*, 239: 171-179.
- **Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K.** (1996) A gene encoding a mitogenactivated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 765-769.
- **Mizuno-Yamasaki E., Medkova M., Coleman J., Novick P.** (2010) Phosphatidylinositol-4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev. Cell*, 18(5): 828-840.
- **Mockaitis K., Estelle M.** (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*; 24: 55-80.
- **Moliterni V.M., Paris R., Onofri C., Orrù L., Cattivelli L., Pacifico D., Avanzato C., Ferrarini A., Delledonne M., Mandolino G.** (2015) Early transcriptional changes in *Beta vulgaris* in response to low temperature. *Planta*, 242(1): 187-201. doi: 10.1007/s00425-015-2299-z.
- **Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J.P., Hartmann M.A., et al.** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 36277-36286.

- **Monroy A.F., Sangwan V., Rajinder S.** (1998) Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold inactivation. *Plant J.*, 13: 653-660.
- **Montoliu A., 2010.** Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. *Tesis doctoral*. Universitat Jaume I.
- **Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J.J., et al.** (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell Proteomics* 5: 1396 – 1411.
- **Morris D.A.** (1979) The effect of temperature on the velocity of exogenous auxin transport in intact chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Planta*; 146: 603–605.
- **Mousley C., Yuan P., Gaur N.A., Trettin K.D., Nile A.H., Deminoff S., Dewar B.J., Wolpert M., Macdonald J.M., Herman P.K., Hinnebusch A.G., Bankaitis V.A.** (2012b) A sterol binding protein integrates endosomal lipid metabolism with TOR signaling and nitrogen sensing. *Cell*, 148(4): 702-715.
- **Mousley C.J., Davison J.M., Bankaitis V.A.** (2012a) Chapter 9: Sec14 Like PITPs Couple Lipid Metabolism with Phosphoinositide Synthesis to Regulate Golgi Functionality. *SUBCELLULAR BIOCHEMISTRY Volume 59. Phosphoinositides II: The Diverse Biological Functions*. Ed. Springer. ISBN 978-94-007-3014-4. DOI 10.1007/978-94-007-3015-1.
- **Mousley C.J., Tyeryar K., Ile K.E., Schaaf G., Brost R.L., Boone C., Guan X., Wenk M.R., Bankaitis V.A.** (2008) Trans-Golgi network and endosome dynamics connect ceramide homeostasis with regulation of the unfolded protein response and TOR signaling in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 19(11): 4785-4803.
- **Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrasek J, Skupa P, Chand S, Benkova E, Zazimalova E, Friml J** (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution dependent development. *Development*; 135: 3345-3354.
- **Mravec J, Skupa P, Bailly A, Hoyerova K, Krecek P, Bielach A, Petrasek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof YD, Dobrev PI, Schwarzerova K, Rolcik J, Seifertova D, Luschig C, Benkova E, Zazimalova E, Geisler M, Friml J** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*; 459: 1136-1140.
- **Mulet J.M., Alemany B., Ros R., Calvete J.J., Serrano R.** (2004a) Expression of a plant serine O-acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers osmotic tolerance and creates an alternative pathway for cysteine biosynthesis. *Yeast*; 21: 303–312.
- **Mulet J.M., Sanz A.I., Serrano R.** CropDesign N.V. (2004b) Plant Haemoglobin. Patent WO/2004/087755.
- **Muller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K.** (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *Embo J.*; 17: 6903-6911.



- **Muñoz A., Castellano M.M.** (2012) Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: is it a conserved or not so conserved process among Eukaryotes? *Comparative and Functional Genomics*, 2012: 406357.
- **Murphy A.S., Hoogner K.R., Peer W.A., Taiz L.** (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from Arabidopsis. *Plant Physiol.*; 128: 935-950.
- **Muthusamy B.P., Natarajan P., Zhou X., Graham T.R.** (2009) Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 1791(7): 612-619.
- **Nadella V., Shipp M.J., Muday G.K., Wyatt S.E.** (2006) Evidence for altered polar and lateral auxin transport in the gravity persistent signal (gps) mutants of Arabidopsis. *Plant Cell Environ.*; 29: 682–690.
- **Nakamichi N., Kusano M., Fukushima A., Kita M., Ito S., Yamashino T., Saito K., Sakakibara H., Mizuno T.** (2009) Transcript profiling of an Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant and Cell Physiology*, 50: 447-462.
- **Nakaminami K., Karlson D.T., Imai R.** (2006) Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103(26): 10122-10127.
- **Nakano R., Ishida H., Makino A., Mae T.** (2006) *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant and Cell Physiology*, 47: 270-276.
- **Nakase Y., Nakamura T., Hirata A., Routt S.M., Skinner H.B., Bankaitis V.A., Shimoda C.** (2001) The *Schizosaccharomyces pombe* spo20(+) gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sec14 plays an important role in forespore membrane formation. *Mol. Biol. Cell*, 12(4): 901-917.
- **Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakum, Y., Seki M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2000) Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*, 42: 657-665.
- **Naranjo M.A., Forment J., Roldán M., Serrano R., Vicente O.** (2006) Overexpression of Arabidopsis thaliana LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant Cell Environ.*; 29(10): 1890-900.
- **Natarajan P., Liu K., Patil D.V., Sciorra V.A., Jackson C.L., Graham T.R.** (2009) Regulation of a golgi flippase by phosphoinositides and an Arf-GEF. *Nat. Cell Biol.*, 11(12): 1421-1426.
- **Navakoudis E., Vrentzou K., Kotzabasis K.** (2007) A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. *Biochimica Biophysica Acta*, 1767: 261-271.
- **Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T.** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 1237-1247.

- **Nick P.** (2012) Microtubules and the tax payer. *Protoplasma*, 249 (Suppl 2):S81-S94.
- **Nilsen E.T., Orcutt D.M.** (1996) Physiology of plants under stress. In: Abiotic factors. John Wiley & Sons (eds.) INC, New York.
- **Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R., Salinas J.** (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 3985-3990.
- **Novillo F., Medina J., Salina, J.** (2007) Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104: 21002-21007.
- **Nunes C., O'Hara L.E., Primavesi L.F., Delatte T.L., Schluepmann H., Somsen G.W., Silv A.B., Feveireir P.S., Wingle A., Paul M.J.** (2013) The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiol.*, 162: 1720-1732.
- **Oikawa K., Kasahara M., Kiyosue T., Kagawa T., Suetsugu N., Taka- hashi F., et al.** (2003).Chloroplast unusual positioning1 is essential for proper chloroplast positioning. *PlantCell*; 15, 2805–2815.doi:10.1105/tpc. 016428
- **Okamoto M., Yoko-o T., Umemura M., Nakayama K., Jigami Y.** (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for the transport of detergent-resistant microdomain-associated membrane proteins Tat2p and Fur4p. *J. Biol. Chem.*, 281(7): 4013-4023.
- **Oquist G.,Huner N.P.** (2003) Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 329-355.
- **Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S.** (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.*, 23:785-794.
- **Otegui M.S., Mastronarde D.N., Kang B.H., Bednarek S.Y., Staehelin L.A.** (2001) Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography. *Plant Cell*; 13: 2033–2051.
- **Ottenschlager I., Wolff P., Wolverton C., Bhalerao R.P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M., Palme K.** (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 100: 2987-2991.
- **País S.M., González M.A., Téllez-Iñón M.T., Capiati D.A.** (2009) Characterization of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) protein phosphatases type 2A catalytic subunits and their involvement in stress responses. *Planta*, 230: 13-25.
- **Palusa S.G., Ali G.S., Reddy A.S.** (2007) Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant Journal*, 49: 1091-1107.
- **Panella L.W., Lewellen R.T.** (2007) Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives. *Euphytica*, 154: 383-400.

- **Papageorgiou G.C., Murata N.** (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function in the oxygen evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research*, 44: 243-252.
- **Park E.J., Jeknić Z., Chen T.H.** (2006) Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. *Plant and Cell Physiology*, 47: 706-714.
- **Park E.J., Jeknić Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., Chen T.H.** (2004) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant Journal*, 40: 474-487.
- **Park S., Lee C., Doherty C.J., Gilmour S.J., Kim Y., Thomashow M.F.** (2015) Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *The Plant Journal*, 82: 193-207.
- **Patton A.J., Cunningham S.M., Volenec J.J., Reicher Z.J.** (2007) Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: II. Carbohydrates and proline accumulation. *Crop Science Society of America*, Madison.
- **Payton P., Webb R., Korniyev D., Allen R., Holaday A.S.** (2001) Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *J. Exp Bot.*, 52(365): 2345-54.
- **Peiro A, Izquierdo-Garcia AC, Sanchez-Navarro JA, Pallas V, Mulet JM, Aparicio F.** (2014) Patellins 3 and 6, two members of the Plant Patellin family, interact with the movement protein of Alfalfa mosaic virus and interfere with viral movement. *Mol Plant Pathol.*; 15(9): 881-91. doi: 10.1111/mpp.12146. Epub 2014 Jun 5.
- **Peña-Castillo L., Hughes T. R.** (2007) Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics*, 176 (1): 7-14.
- **Perera L.K.R.R., Robinson M.F., T.A. Mansfield** (1995) Responses of the stomata of *Aster tripolium* to calcium and sodium ions in relation to salinity tolerance. *J. Exp. Bot.*, 46(6): 623-629. Doi: 10.1093/jxb/46.6.623
- **Perruc E., Charpentreau M., Ramirez B.C., Jauneau A., Galaud J.P., Ranjeva R., Ranty B.** (2004) A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Journal*, 38: 410-420.
- **Peskan T., Westermann M., Oelmüller R.** (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267: 6989 – 6995.
- **Pestsova P., Meinhard J., Menze A., Fischer U., Windhövel A., Westhoff P.** (2008) Transcript profiles uncover temporal and stress-induced changes of metabolic pathways in germinating sugar beet seeds. *BMC Plant Biol.*, 8: 122.
- **Peterman T.K., Le E., Pierson E.R., Schlegel L.M.** (2004b) Functional analysis of patellin1, a cell-plate localized, phosphoinositide-binding protein. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2004-Lake Buena Vista, FL USA.*

- **Peterman T.K., Oddone A., Dankwa S.** (2007) Functional characterization of the Sec14 domain of patellin1. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2007-Chicago, Illinois, USA.*
- **Peterman T.K., Ohol Y.** (2003) Patellin, a sec14p-like protein, is localized to the cell plate. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2003-Honolulu, Hawaii USA.*
- **Peterman T.K., Ohol Y.M., McReynolds L.J., Luna E.J.** (2004a) Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiol.*; 136(2):3080-3094.
- **Peterman T.K., Sequeira A., Leavitt H., Oddone A., Kremer M.** (2006b) Genome-wide analysis of the patellin family of Arabidopsis. *Book of abstracts, American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting 2006-Boston, Massachusetts, USA.*
- **Peterman T.K., Sequeira A.S., Samia J.A., Lunde E.E.** (2006a) Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*). *J Plant Physiol.*; 163(11):1150-8. Epub 2006 Mar 20.
- **Petrasek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M., Seifertova D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanova M., Dhonukshe P., Skupa P., Benkova E., Perry L., Krecek P., Lee O.R., Fink G.R., Geisler M., Murphy A.S., Luschnig C., Zazimalova E., Friml J.** (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*; 312: 914-918.
- **Phillips S.E., Sha B., Topalof L., Xie Z., Alb J.G., Klenchin V.A., Swigart P., Cockcroft S., Martin T.F., Luo M., Bankaitis V.A.** (1999) Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol. Cell*, 4(2): 187-197.
- **Pinosa F.** (2010) Analysis of PIN2 polarity regulation and Mob1 function in Arabidopsis root development. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde (Tesis Doctoral). Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- **Polissi A., De Laurentis W., Zangrossi S., Briani F., Longhi V., Pesole G., Dehò G.** (2003) Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Res. Microbiol.*, 154(8): 573-80.
- **Pollock C., Farrar J., Tomos D., Gallagher J., Lu C., Koroleva O.** (2003) Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *J. Exp. Bot.*, 54: 489-94.
- **Pollock C.J.** (1990) The response of plants to temperature change. *J. Agric. Sci.*, 115: 1-5. doi.org/10.1017/S0021859600073834.
- **Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A., Stewart C.R.** (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 6: 65-74.
- **Privalov P.L.** (1990) Cold denaturation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25: 281-306.

- **Proszynski T.J., Klemm R.W., Gravert M., Hsu P.P., Gloor Y., Wagner J., Kozak K., Grabner H., Walzer K., Bagnat M., Simons K., Walch-Solimena C.** (2005) A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(50): 17981-17986.
- **Puhakainen T., Hess M.W., Mäkelä P., Svensson J., Heino P., Palva E.T.** (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 54: 743-753.
- **Rackaityte E.** (2013) Sec14-like proteins, PATELLIN1 and PATELLIN2, are essential for procambial pattern establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Honors Thesis Collection*, Paper 156. Wellesley College Digital Scholarship and Archive.
- **Rahman A.** (2013) Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiol. Plant*; 147(1):28-35. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01617.x. Epub 2012 Apr 21. Review.
- **Rashotte A.M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J., Muday G.K.** (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; 122: 481-490.
- **Rausell A., Kanhonou R., Yenush L., Serrano R., Ros R.** (2003) The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *The Plant Journal*; 34: 257–267.
- **Rayon C., Lerouge P., Faye L.** (1998) The protein N-glycosylation in plants. *J. Exp. Bot.*, 49: 1463-1472.
- **Rédei G.P.** (1970) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliogr. Genet.*, 20:1-151.
- **Rédei GP.** (1975) *Arabidopsis* as a genetic tool. *Annu. Rev. Genet.*, 9:111-127.
- **Reinhardt D., Mandel T., Kuhlemeier C.** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*; 12: 507-518.
- **Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C.** (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*; 426: 255-260.
- **Ren J., Pei-Chen Lin C., Pathak M.C., Temple B.R., Nile A.H., Mousley C.J., Duncan M.C., Eckert D.M., Leiker T.J., Ivanova P.T., Myers D.S., Murphy R.C., Brown H.A., Verdaasdonk J., Bloom K.S., Ortlund E.A., Neiman A.M., Bankaitis V.A.** (2014) A phosphatidylinositol transfer protein integrates phosphoinositide signaling with lipid droplet metabolism to regulate a developmental program of nutrient stress-induced membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell*, 25(5): 712-27.
- **Riekhof W.R., Wu W.I., Jones J.L., Nikrad M., Chan M.M., Loewen C.J.R.** (2014) An assembly of proteins and lipid domains regulates transport of phosphatidylserine to phosphatidylserine decarboxylase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9): 5809-5819.
- **Robinson S.J., Parkin I.A.** (2008) Differential SAGE analysis in *Arabidopsis* uncovers increased transcriptome complexity in response to low temperature. *BMC Genomics*, 9: 434.

- **Rudge S.A., Sciorra V.A., Iwamoto M., Zhou C., Strahl T., Morris A.J., Thorner J., Engebrecht J.** (2004) Roles of phosphoinositides and of Spo14p (phospholipase D)-generated phosphatidic acid during yeast sporulation. *Mol. Biol. Cell*, 15(1): 207-218.
- **Ruelland E, Zachowski A.** (2010) How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.*, 69: 225-232. doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.011.
- **Ruelland E., Vaultier M.N., Zachowski A., Hurry V.** (2009) Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Advances in Botanical Research*, 49: 35-150.
- **Ryan M.M., Temple B.R., Phillips S.E., Bankaitis V.A.** (2007) Conformational dynamics of the major yeast phosphatidylinositol transfer protein Sec14: Insights into the mechanisms of PL exchange and diseases of Sec14-like protein deficiencies. *Mol. Biol. Cell*, 18(5): 1928-1942.
- **Sack F.D.** (1991) Plant gravity sensing. *Int. Rev. Cytol.*; 127: 193–252.
- **Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto K., Izui K.** (2000) Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.*, 23: 319-327.
- **Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.** (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; 230:1350-1354.
- **Sakuma Y., Maruyama K., Qin F., Osakabe Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103: 18822-18827.
- **Sambrook J., Russell D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, vol. 3.
- **Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R.S.** (2001) Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx. *The Plant Journal*, 27: 1-12.
- **Sangwan V., Orvar B.L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S.** (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.*, 31: 629-638.
- **Sasaki K., Kim M.H., Ima, R.** (2013) *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2 is a negative regulator of cold acclimation. *New Phytologist*, 198: 95-102.
- **Scandalios J.G.** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101: 7-12.
- **Scarpella E., Marcos D., Friml J., Berleth T.** (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev.*; 20: 1015-1027.
- **Schaaf G., Dynowski M., Mousley C.J., Shah S.D., Yuan P., Winklbauer E.M., de Campos M.K., Trettin K., Quinones M.C., Smirnova T.I., Yanagisawa L.L., Ortlund E.A., Bankaitis V.A.** (2011) Resurrection of a functional phosphatidylinositol transfer protein from a pseudo-Sec14 scaffold by directed evolution. *Mol. Biol. Cell*, 22(6): 892-905.

- **Schaaf G., Ortlund E.A., Tyeryar K.R., Mousley C.J., Ile K.E., Garrett T.A., Ren J., Woolls M.J., Raetz C.R., Redinbo M.R., Bankaitis V.A.** (2008) The functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the Sec14-superfamily. *Mol. Cell*, 29(2): 191-206.
- **Schapiro A.L., Voigt B., Jasik J., Rosado A., Lopez-Cobollo R., Menzel D., Salinas J., Mancuso S., Valpuesta V., Baluska F., Botella M.A.** (2008) Arabidopsis Synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *The Plant Cell*; 20: 3374-3388.
- **Schmidt A., Beck T., Koller A., Kunz J., Hall M.N.** (1998) The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.*, 17: 6924-6931.
- **Schmidt A., Hall M.N., Koller, A.** (1994) Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol. Cell Biol.*, 14: 6597-6606.
- **Schmidt von Braun S., Schleiff E.** (2008) The chloroplast outer membrane protein CHUP1 interacts with actin and profilin. *Planta*; 227, 1151–1159.doi: 10.1007/s00425-007-0688-7
- **Schnabl M., Oskolkova O.V., Holic R., Brezná B., Pichler H., Zágorsek M., Kohlwein S.D., Paltauf F., Daum G., Griac P.** (2003) Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur. J. Biochem.*; 270(15): 3133-3145.
- **Schneider R., Brügger B., Sandhoff R., Zellnig G., Leber A., Lampl M., Athenstaedt K., Hrastnik C., Eder S., Daum G., Paltauf F., Wieland F.T., Kohlwein S.D.** (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, 146(4): 741-754.
- **Schwarzerová K., Petrásek J., Panigrahi K.C., Zelenková S., Opatrný Z., Nick P.** (2006) Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma*, 227: 185-196. doi.org/10.1007/s00709-005-0139-x
- **Sciorra V.A., Audhya A., Parsons A.B., Segev N., Boone C., Emr S.D.** (2005) Synthetic gene array analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p identifies components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase signaling pathway. *Mol. Biol. Cell*, 16(2): 776-93.
- **Scott I.M., Clarke S.M., Wood J.E., Mur L.A.** (2004) Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 135:1040-1049.
- **Sedbrook J.C., Carroll K.L., Hung K.F., Masson P.H., Somerville C.R.** ( 2002 ) The *Arabidopsis* *SKU5* gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell*; 14: 1635 – 1648.
- **Selye H.** (1936) A syndrome produced by various nucuous agents. *Nature*, 138: 32-34.

- **Seo P.J., Kim M.J., Park J.Y., Kim S.Y., Jeon J., Lee Y.H., Kim J., Park C.M.** (2010) Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in Arabidopsis. *Plant J.*, 61: 661-671.
- **Sha B., Phillips S.E., Bankaitis V.A., Luo M.** (1998) Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol transfer protein Sec14. *Nature*, 391: 506-510.
- **Shahollari B., Peskan-Berghofer T., Oelmüller R.** (2004) Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant.* 122: 394 – 403.
- **Shahollari B., Vadassery J., Varma A. Oelmüller, R.** (2007) A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50: 1-13.
- **Shang X., Zhou Y.T., Low B.C.** (2003) Concerted regulation of cell dynamics by BNIP-2 and Cdc42GAP homology/Sec14p-like, proline-rich, and GTPase-activating protein domains of a novel rhoGTPase-activating protein, BPGAP1. *J. Biol. Chem.*, 278(46): 45903-45914.
- **Sharma N., Cram D., Huebert T., Zhou N., Parkin I.A.** (2007) Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plant's response to cold stress. *Plant Mol. Biol.*, 63: 171-184.
- **Sherman F.** (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.*, 350: 3-41.
- **Shi Y., Ding Y., Yang S.** (2015) Cold Signal Transduction and its Interplay with Phytohormones During Cold Acclimation. *Plant Cell Physiol.*, 56 (1): 7-15. Doi:10.1093/pcp/pcu115. Advance access publication on 3 September 2014.
- **Shi Y., Tian S., Hou L., Huang X., Zhang X., Guo H., Yang S.** (2012) Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24: 2578-2595.
- **Shibasaki K., Uemura M., Tsurumi S., Rahman A.** (2009) Auxin response in Arabidopsis under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell*; 21: 3823–3838.
- **Shisheva A.** (2013) PtdIns5P: news and views of its appearance, disappearance and deeds. *Arch Biochem Biophys.*; 538(2):171-80. doi: 10.1016/j.abb.2013.07.023. Epub 2013 Aug 2.
- **Siddiqui K.S., Cavicchioli R.** (2006) Cold-Adapted Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 403-433.
- **Simons K., Ikonen E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572.
- **Simons K., Ikonen E.** (2000) How cells handle cholesterol. *Science*, 290: 1721-1726.
- **Sirokmány G., Szidonya L., Káldi K., Gáborik Z., Ligeti E., Geiszt M.** (2005) Sec14 homology domain targets p50RhoGAP to endosomes and provides a link between Rab- and Rho GTPases. *J. Biol. Chem.*, 281(9): 6096-6105.



- **Skaracis G.N., Biancardi E.** (2005) Cercospora leaf spot. In: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds) Genetics and breeding of sugar beet. Science Publisher, Enfield, pp 88-90.
- **Skinner H.B., Alb J.G., Whitters E.A., Helmkamp G.M. Jr., Bankaitis, V.A.** (1993) Phospholipid transfer activity is relevant to but not sufficient for the essential function of the yeast SEC14 gene product. *EMBO J.*, 12(12): 4775-4784.
- **Skinner H.B., McGee T.P., McMaster C.R., Fry M.R., Bell R.M., Bankaitis V.A.** (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein effects a ligand-dependent inhibition of choline-phosphate cytidyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(1): 112-116.
- **Skottke K.R., Yoon G.M., Kieber J.J., DeLong A.** (2011) Protein phosphatase 2A controls ethylene biosynthesis by differentially regulating the turnover of ACC synthase isoforms. *PLoS Genet.*, 7: e1001370.
- **Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P.** (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 140: 637-46. doi.org/10.1104/pp.105.072579.
- **Sorek N., Bloch D., Yalovsky S.** (2009) Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12: 714-720.
- **Soveral G., Veiga A., Loureiro-Dias M.C., Tanghe A, Van Dijck P., Moura T.F.** (2006) Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology*, 152 : 1515-1521.
- **Stefan C.J., Manford A.G., Baird D., Yamada-Hanff J., Mao Y., Emr S.D.** (2011) Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell*, 144(3): 389-401.
- **Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Galweiler L, Palme K, Jurgens G** (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*; 286: 316-318.
- **Stenmark H., Aasland R.** (1999) FYVE-finger proteins - effectors of an inositol lipid. *J. Cell Sci.*; 112: 4175-4183.
- **Steponkus P.L.** (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 543-584.
- **Steponkus P.L., Uemura M., Joseph R.A., Gilmour S.J., Thomashow M.F.** (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 14570-14575.
- **Stevanato P.** (2005) Resistance to abiotic stresses. In: Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M (eds) Genetics and breeding of sugar beet. Science Publisher Inc., USA, pp 116-119.
- **Stevens T., Esmon B., Schekman R.** (1982) Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell*, 30: 439-448.

- **Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper A.F.W.** (1994) Tratado de Botánica, Ediciones Omega, Barcelona.
- **Sulpice R., Gibon Y., Cornic G., Lahrher F.R.** (2002) Interaction between exogenous glycine betaine and the photorespiratory pathway in canola leaf discs. *Physiologia Plantarum*, 116: 460-467.
- **Sun T., Li S., Ren H.** (2013) Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. *Front. Plant Sci.*; 4: 512. doi: 10.3389/fpls.2013.00512.
- **Sunkar R., Li Y.F., Jagadeeswaran G.** (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17: 196-203.
- **Sunkar R., Zhu J.K.** (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16: 2001-2019.
- **Suzuki M., Ketterling M.G., McCarty D.R.** (2005) Quantitative statistical analysis of cis-regulatory sequences in ABAVP1- and CBF/DREB1-regulated genes of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139: 437-447.
- **Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G.** (2011) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.*, 35: 259-270.
- **Swarup K., Benkova E., Swarup R., Casimiro I., Peret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beekman T., Laplace L., Bennett M.J.** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol.*; 10: 946-954.
- **Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D, Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I.D., Bennett M.J.** (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell*; 16: 3069-3083.
- **Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M.** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev.*; 15: 2648-2653.
- **Szabados L., Savoure A.** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15: 89-97.
- **Tähtiharju S., Palva T.** (2001) Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 26: 461-470.
- **Tambussi, E.A.** (2004) Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. *Tesis doctoral*. Universitat de Barcelona.
- **Tamminen I., Makela P., Heino P., Palva E.T.** (2001) Ectopic expression of ABI3 gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 25: 1-8.

- **Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J.** (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol. Life Sci.*; 63: 2738-2754.
- **Tang W., Deng Z., Oses-Prieto J.A., Suzuki N., Zhu S., Zhang X., Burlingame A.L., Wang Z.Y.** (2008) Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Mol. Cell. Proteomics*; 7(4): 728-38. doi: 10.1074/mcp.M700358-MCP200. Epub 2008 Jan 8.
- **Tanghe A., Van Dijck P., Dumortier F., Teunissen A., Hohmann S., Thevelein J.M.** (2002) Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5981-5989.
- **Tcherkezian J., Lamarche-Vane N.** (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. Cell*, 99(2): 67-86.
- **Teale W.D., Paponov I.A., Palme K.** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 7: 847-859.
- **Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H.** (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, 15:141-152.
- **Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F, Yazaki K** (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell*; 17: 2922-2939.
- **Theocharis A., Bordiec S., Fernandez O., Paquis S., Dhondt-Cordelier S., Baillieux F., Clément C., Ait Barka E.** (2011) *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low non-freezing temperatures. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 25: 241-249.
- **Theocharis A., Clément C., Barka E. A.** (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235:1091-1105.
- **Thomas L., Maronedze C., Ederli L., Pasqualini S., Gehring C.** (2013) Proteomic signatures implicate cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics*, 83: 47-59.
- **Thomashow, M.F.** (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 571-599.
- **Timoneda, A.** (2012) Introducción del gen *XERO2* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), caracterización y obtención de líneas. *Trabajo Final de Carrera*. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Rural.
- **Titapiwatanakun B., Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Yang H., Mravec J., Sauer M., Cheng Y., Adamec J., Nagashima A., Geisler M., Sakai T., Friml J., Peer W.A., Murphy**

- A.S.** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J.*; 57: 27-44.
- **Tjus S.E., Scheller H.V., Andersson B., Møller B.L.** (2001) Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology*, 125: 2007-2015.
  - **Tognetti J.A., Pontis H.G., Martínez-Noël G.M.A.** (2013) Sucrose signaling in plants. A world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior*, 8(3): e23316.
  - **Toumi I., Moschou P.N., Paschalidis K.A., Bouamama B., Ben Salem-Fnayou A., Ghorbel A.W., Mliki A., Roubelakis-Angelakis K.A.** (2010) Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *Journal of Plant Physiology*, 167: 519-525.
  - **Townley H.E., Knight M.R.** (2002) Calmodulin as a potential negative regulator of Arabidopsis COR gene expression. *Plant Physiol.*, 128: 1169-1172.
  - **Tripathi A., Nile A.H., Bankaitis V.A.** (2014) Sec14-like phosphatidylinositol-transfer proteins and diversification of phosphoinositide signalling outcomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 42(5):1383-1388. doi: 10.1042/BST20140187.
  - **Ueda S., Kataoka T., Satoh T.** (2004) Role of the Sec14-like domain of Dbl family exchange factors in the regulation of Rho family GTPases in different subcellular sites. *Cell. Signal.*, 16(8): 899-906.
  - **Uemura M., Steponkus P.L.** (1999) Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J. Plant Res.*, 112:245-254.
  - **Uemura M., Warren G., Steponkus P.L.** (2003) Freezing sensitivity in the *sfr4* mutant of Arabidopsis is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant Physiol.*, 131: 1800-1807.
  - **Umebayashi K.** (2003) The roles of ubiquitin and lipids in protein sorting along the endocytic pathway. *Cell Struct. Funct.*, 28: 443-453.
  - **Umebayashi K., Nakano A.** (2003) Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.*, 161: 1117-1131.
  - **Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11632-11637.
  - **Urano E., Ichikawa R., Morikawa Y., Yoshida T., Koyanagi Y., Komano J.** (2010) T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*; 28 Suppl 2:B68-74. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.084.
  - **Valero D., Martínez-Romero D., Serrano M.** (2002) The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 228-234.

- **Valluru R., Lammens W., Claupein W., Van den Ende W.** (2008) Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends in Plant Science*, 13(8): 409-414.
- **van Damme D., Inzé D., Russinova E.** (2008) Vesicle trafficking during somatic cytokinesis. *Plant Physiol.*; 147(4):1544-52. doi: 10.1104/pp.108.120303.
- **van Kasteren S.** (2012). Synthesis of post-translationally modified proteins. *Biochem Soc Trans.*; 40: 929-944.
- **Vastarelli P., Moschella A., Pacifico D., Mandolino G.** (2013) Water stress in *Beta vulgaris*: osmotic adjustment response and gene expression analysis in *ssp. vulgaris and maritima*. *Am. J. Plant Sci.*, 4: 11-16.
- **Verbruggen N., Hermans C.** (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753-759.
- **Vergnolle C., Vaultier M.N., Taconnat L., Renou J.P., Kader J.C., Zachowski A., Ruelland E.** (2005) The coldinduced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology*, 139: 1217-1233.
- **Vicent I.** (2009) Aislamiento e identificación de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la tolerancia a frío. *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.
- **Vicent I., Navarro A., Mulet J.M., Sharma S., Serrano R.** (2015) Uptake of inorganic phosphate is a limiting factor for *Saccharomyces cerevisiae* during growth at low temperatures. *FEMS Yeast Res.*, 15(3). pii: fov008. doi: 10.1093/femsyr/fov008.
- **Vincent P., Chua M., Nogue F., Fairbrother A., Mekeel H., Xu Y., Allen N., Bibikova T.N., Gilroy S., Bankaitis V.A.** (2005) A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *J. Cell Biol.*, 168: 801-812.
- **Vlot A.C., Dempsey M.A., Klessig D.F.** (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206.
- **Vogel J.T., Zarka D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F.** (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 41: 195-211.
- **Vogg G., Heim R., Gotschy B., Beck E., Hansen J.** (1998) Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). II. Seasonal changes in the fluidity of thylakoid membranes. *Planta*, 204: 201-206.
- **Wang G., McCaffery J.M., Wendland B., Dupre S., Haguenaer-Tsapis R., Huibregtse J.M.** (2001) Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Mol. Cell Biol.*, 21: 3564-3575.
- **Wang J., Sun H.Q., Macia E., Kirchhausen T., Watson H., Bonifacino J.S., Yin H.L.** (2007) PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol. Biol. Cell*, 18(7): 2646-2655.

- **Wang Q., Chang A.** (2002) Sphingoid base synthesis is required for oligomerization and cell surface stability of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(20): 12853-12858.
- **Wang R., Li R., Sun Z., Ren Y., Yue W.** (2006) Anti-freezing proteins and plant responses to low temperature stress. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 17: 551-556.
- **Wang Y.J., Wang J., Sun H.Q., Martinez M., Sun Y.X., Macia E., Kirchhausen T., Albanesi J.P., Roth M.G., Yin H.L.** (2003) Phosphatidylinositol-4-phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell*, 114(3): 299-310.
- **Wanner L.A., Junttila O.** (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120: 391-400.
- **Welling A., Palva E.T.** (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiol. Plant*, 127:167-181.
- **Wilhelm W., McMaster G.S.** (1995) Symposium On The Phyllochron: Importance of the Phyllochron in Studying Development and Growth in Grasses. *Crop. Sci.*, 35: 1-3. doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500010001x.
- **Williams M.E., Torabinejad J., Cohick E., Parker K., Drake E.J., Thompson J., Hortter M., Dewald D.B.** (2005) Mutations in the *Arabidopsis* phosphoinositidephosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns (4,5) P2 and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant Physiology*, 138: 686-700.
- **Wisniewska J., Xu J., Seifertova D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquie D., Benkova E., Scheres B., Friml J.** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*; 312: 883.
- **Wisniewski M.E., Webb R., Balsamo R., Close T.J., Yu X.M., Griffith M.** (1999) Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*, 105: 600-608.
- **Witte C.P., Noël L.D., Gielbert J., Parker J.E., Romeis T.** (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Molecular Biology*; 55 (1): 135-147.
- **Wood C.S., Schmitz K.R., Bessman N.J., Setty T.G., Ferguson K.M., Burd C.G.** (2009) PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J. Cell Biol.*, 187(7): 967-975.
- **Wood R.R.** (1952) Selection for cold tolerance and low temperatura germination in sugar beets. In: Proceedings of the General Meeting of the Am. Soc. Sugar Beet Technologists, pp 407-410.
- **Wu W.I., Routt S., Bankaitis V.A., Voelker D.R.** (2000) A new gene involved in the transport-dependent metabolism of phosphatidylserine, PSTB2/PDR17, shares sequence similarity with the gene encoding the phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein, SEC14. *J. Biol. Chem.*, 275(19): 14446-14456.

- **Wyatt S.E., Rashotte A.M., Shipp M.J., Robertson D., Muday G.K.** (2002) Mutations in the gravity persistence signal loci in *Arabidopsis* disrupt the perception and/or signal transduction of gravitropic stimuli. *Plant Physiol.*; 130: 1426–1435.
- **Wyn-Jones R.G., Storey R.** (1981) Betaines. En: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Paleg, L. G., Aspinall, D. (eds.), Academic Press, New York. pp: 171-204.
- **Xia X.J., Wang Y.J., Zhou Y.H., Tao Y., Mao W.H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q.** (2009) Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol*, 150:801-814.
- **Xin Z., Browse J.** (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.*, 23:893-902.
- **Xiong L., Lee B., Ishitani M., Lee H., Zhang C., Zhu J.K.** (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 15: 1971-1984.
- **Xiong L., Lee H., Ishitani M., Tanaka Y., Stevenson B., Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Zhu J.K.** (2002) Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 10899-19904.
- **Xu X., Bittman R., Duportail G., Heissler D., Vilcheze C., London E.** (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts): comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J. Biol. Chem.* 276: 33540-33546.
- **Xu J., Scheres B.** (2005) Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 Function in Epidermal Cell Polarity. *The Plant Cell*; 17: 525–536.
- **Yaish M.W., Doxey A.C., McConkey B.J., Moffatt B.A., Griffith M.** (2006) Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity. *Plant Physiol.*, 141:1459-1472.
- **Yalovsky S., Bloch D., Sorek N. Kost B.** (2008) Regulation of membrane trafficking, cytoskeleton dynamics, and cell polarity by ROP/RAC GTPases. *Plant Physiol.*; 147: 1527-1543.
- **Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1994) A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251-264.
- **Yan J., Wang J., Li Q., Hwang J.R., Patterson C., Zhang H.** (2003) AtCHIP, a U-Box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132: 861-869.
- **Yanagisawa L.L., Marchena J., Xie Z., Li X., Poon P.P., Singer R.A., Johnston G.C., Randazzo P.A., Bankaitis V.A.** (2002) Activity of specific lipid-regulated ADP ribosylation factor-GTPase-activating proteins is required for Sec14p-dependent Golgi secretory function in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 13(7): 2193-2206.

- **Yang W., Ren S., Zhang X., Gao M., Ye S., Qi Y., *etal.*** (2011) BENTUPPERMOST INTERNODE1 encodes the class II formin FH5 crucial for actin organization and rice development. *PlantCell*; 23, 661–680.doi:10.1105/tpc.110.081802
- **Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E.** (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.*; 16: 1123-1127.
- **Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M., Xiong F., Yang D.S., Wiseman S.B., Sarhan F., Danyluk J., Xue Y.Q., Hew C.L., Doherty-Kirby A., Lajoie G.** (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol.*, 124: 1251-1264.
- **Yoo S.Y., Kim Y., Kim S.Y., Lee J.S., Ahn J.H.** (2007) Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 2: e642.
- **Young L.M., Evans M.L., Hertel R.** (1990) Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.*; 92: 792-796.
- **Yu J.Q., Zhou Y.H., Huang L.F., Allen D.J.** (2002) Chill-induced inhibition of photosynthesis: genotypic variation within *Cucumis sativus*. *Plant Cell Physiol.*, 43(10): 1182-1188.
- **Zappel N.F., Panstruga R.** (2008) Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes. *Curr. Opin. Plant Biol.*; 11: 632-640.
- **Zhang J., Xu Y., Huan Q., Chong K.** (2009) Deep sequencing of Brachypodium small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10: 449.
- **Zhang Z., Zhang Y., Tan H., Wang Y., Li G., Liang W., *etal.*** (2011) RICE MORPHOLOGY DETERMINANT encodes the type II formin FH5 and regulates rice morphogenesis. *PlantCell*; 23, 681–700.doi:10.1105/tpc.110.081349
- **Zhu J., Jeong J.C., Zhu Y., Sokolchik I., Miyazaki S., Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bohnert H.J., Shi H., Yun D.J., Bressan R.A.** (2008) Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105: 4945-4950.
- **Zhu J., Verslus P.E., Zheng X., Lee B.H., Zhan X., Manabe,Y., Sokolchik I., Zhu Y., Dong C.H., Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.** (2004) HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 9966-9971.
- **Zinser E., Paltauf F., Daum G.** (1993) Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.*, 175(10): 2853-2858.
- **Zinser E., Sperka-Gottlieb C.D., Fasch E.V., Kohlwein S.D., Paltauf F., Daum G.** (1991) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 173(6): 2026-2034.



