



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



**Rol del transporte de citoquininas mediado por  
proteínas de la familia Azg en la señalización  
hormonal durante el desarrollo del sistema  
radical de plantas**

**(2014-2019)**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

---

**Autor:** Biol. Tomás María Tessi

**Director:** Dr. Marcelo Desimone

Córdoba, Argentina

**(2019)**





*“Apretar una cucharita entre los dedos y sentir su latido de metal, su advertencia sospechosa. Cómo duele negar una cucharita, negar una puerta, negar todo lo que el hábito lame hasta darle suavidad satisfactoria. Tanto más simple aceptar la fácil solicitud de la cuchara, emplearla para revolver el café.”*

Julio Cortázar  
*Historias de cronopios y de famas*



---

## Publicación científicas

Durante el transcurso del presente doctorado se participó de las siguientes producciones científicas:

- *Arabidopsis thaliana Ureide Permease 5 connects cell compartments involved in Ureide metabolism.* Lescano C.I., Bogino M.F., Martini C., Tessi T.M., González C., Schumacher K., Desimone M. Plant Physiology. En revisión.
- *Ureide metabolism in Arabidopsis thaliana is modulated by C:N balance.* Lescano C.I.; Devegili A.; Martini C.; Tessi T.M. ; González C.; Desimone M. Plant Biology. En revisión.
- *AZG2 new Auxin induced CKs transporter regulates lateral root emergence.* Tessi T.M., Brumm S., Winklbauer E., Lescano C.I., Maurino V.G., Wanke V., Harter K., Desimone M. En preparación.



# Índice

<b>I</b>	<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Desarrollo vegetal</b>	<b>4</b>
1.1.	Regulación del crecimiento . . . . .	4
1.2.	Desarrollo radical . . . . .	5
1.2.1.	Evolución del sistema radical . . . . .	5
1.2.2.	Configuración de la arquitectura radical y emergencia de las raíces laterales . . . . .	7
<b>2.</b>	<b>Cascadas de señalización hormonal</b>	<b>9</b>
2.1.	Señalización por auxinas . . . . .	9
2.2.	Auxinas y tejidos circundantes de la raíz . . . . .	10
2.3.	Señalización por citoquininas . . . . .	11
2.4.	Receptores de citoquininas: localización subcelular . . . . .	13
<b>3.</b>	<b>Transporte de hormonas</b>	<b>13</b>
3.1.	Transporte de citoquininas . . . . .	14
3.2.	Purinas y citoquininas . . . . .	16
3.3.	Transportadores AZG . . . . .	17
3.4.	Caracterización previa de <i>AtAzg1</i> y <i>AtAzg2</i> . . . . .	18
3.5.	Antecedentes de AZG2 en plantas . . . . .	20
<b>4.</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>22</b>
<b>II</b>	<b>Resultados</b>	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>Evolución Molecular</b>	<b>26</b>
5.1.	Filogenia . . . . .	26
5.2.	Sitios informativos de grupos . . . . .	27
5.3.	Identificación de nuevas variantes de AZG . . . . .	29
5.4.	Búsqueda de motivos específicos . . . . .	31
5.5.	Modelado computacional de la estructura tridimensional . . . . .	33
<b>6.</b>	<b>Discusión - Capítulo I</b>	<b>36</b>

<b>7. Interacción Proteína-Proteína</b>	<b>40</b>
7.1. Homo- y hetero- oligomerización . . . . .	41
7.2. Interacción de AZGs con receptores de citoquininas . . . . .	43
7.3. Interacción de AZGs con fosfotransferasas AHP . . . . .	45
<b>8. Discusión - Capítulo II</b>	<b>47</b>
<b>9. Rol del transportador AZG1 en la señalización hormonal</b>	<b>50</b>
9.1. AZG1 se expresa en distintos órganos y es inducido por citoquininas	50
9.2. Descripción del fenotipo de las líneas mutantes de AZG1 . . . . .	51
9.2.1. Las líneas mutantes de AZG1 no presentan diferencias morfológicas respecto a la condición silvestre . . . . .	51
9.2.2. AZG1 contribuiría a la identidad de las raíces laterales . . . . .	53
9.2.3. AZG1 forma parte de un mecanismo de señalización por citoquininas en raíces . . . . .	56
9.3. Localización subcelular . . . . .	58
9.3.1. AZG1 se localiza en la membrana plasmática . . . . .	58
<b>10. Discusión - Capítulo III</b>	<b>61</b>
<b>11. Rol del transportador AZG2 en la señalización hormonal</b>	<b>64</b>
11.1. AZG2 se expresa en corteza y epidermis radical, rodeando a pri- mordios de raíz lateral . . . . .	64
11.2. Azg2 actúa durante el desarrollo de los primordios de raíz lateral regulando su emergencia . . . . .	66
11.3. AZG2 es fundamental para la correcta percepción de citoquininas en raíces . . . . .	68
11.4. Las auxinas regulan la expresión de AZG2, estableciendo un ciclo de regulación cruzada con citoquininas . . . . .	70
11.5. AZG2 se localizaría en membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplasmático . . . . .	73
<b>12. Discusión - Capítulo IV</b>	<b>76</b>
<b>III Conclusión y perspectivas</b>	<b>82</b>
<b>IV Materiales y métodos</b>	<b>88</b>
<b>13. Materiales</b>	<b>90</b>
13.1. Organismos . . . . .	90

13.1.1. Plantas . . . . .	90
13.1.2. Bacterias . . . . .	90
13.1.3. Levaduras . . . . .	90
13.2. Reactivos generales . . . . .	90
13.3. Medios de crecimiento y antibióticos . . . . .	92
13.3.1. Medio MS . . . . .	92
13.3.2. Medio LB (Luria Broth) . . . . .	92
13.3.3. Antibióticos . . . . .	93
13.4. Materiales de Biología molecular . . . . .	93
13.4.1. Enzimas . . . . .	93
13.4.2. Kits . . . . .	94
13.4.3. Oligonucleótidos . . . . .	94
13.5. Plásmidos . . . . .	94
13.6. Vectores . . . . .	94
13.7. Construcciones desarrolladas por otros autores . . . . .	94
13.8. Equipos . . . . .	96
13.9. Software . . . . .	98
<b>14. Métodos</b>	<b>100</b>
14.1. Experimentos con plantas . . . . .	100
14.1.1. Condiciones generales de crecimiento . . . . .	100
14.1.2. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	100
14.2. Recuperación de líneas transgénicas . . . . .	101
14.2.1. Aplicación de hormonas . . . . .	101
14.2.2. Detección de actividad GUS . . . . .	102
14.2.3. Descripción de la expresión de <i>Azg1</i> . . . . .	102
14.2.4. Estudio de la arquitectura radical . . . . .	102
14.2.5. Estudio de ruptura de dominancia apical por corte de MAR . . . . .	103
14.2.6. Cuantificación de actividad de CK mediante <i>TCS<sub>n<sub>pro</sub></sub></i> :GFP . . . . .	103
14.2.7. Reconstrucción tridimensional del dominio de expresión de AZG2 . . . . .	103
14.2.8. Tinción GUS de semillas . . . . .	103
14.2.9. Estudio del reportero ARR5 <sub>pro</sub> :GUS en <i>azg2-1</i> . . . . .	104
14.2.10. Estudio de inducción de AZG2 por auxinas . . . . .	104
14.2.11. Estudio del fenotipo de líneas mutantes de AZG2 en pre- sencia de NAA . . . . .	104
14.3. Experimentos con ácidos nucleicos . . . . .	104
14.3.1. Electroforesis en gel y cuantificación de ácidos nucleicos . . . . .	104
14.3.2. Extracción de DNA de plantas . . . . .	105
14.3.3. PCR . . . . .	106
14.3.4. Detección de inserciones de T-DNA . . . . .	106



14.3.5. Clonado Gateway . . . . .	107
14.3.6. Amplificación de plásmidos . . . . .	107
14.3.7. Minipreparación ( <i>Miniprep</i> ) . . . . .	107
14.3.8. Análisis de secuencias . . . . .	108
14.4. Experimentos con microorganismos . . . . .	108
14.4.1. <i>Escherichia coli</i> . . . . .	108
14.4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . . . . .	109
14.4.3. Conservación de bacterias . . . . .	110
14.4.4. Experimentos Levaduras ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) . . . . .	110
14.4.5. Preparación de células competentes . . . . .	110
14.4.6. Transformación de células competentes . . . . .	111
14.4.7. Cruzamiento de levaduras . . . . .	111
14.4.8. Detección de interacción proteica por crecimiento . . . . .	112
14.5. Microscopía, procesamiento y análisis de Imágenes . . . . .	112
14.5.1. Microscopía óptica . . . . .	112
14.5.2. Microscopía de epifluorescencia . . . . .	112
14.5.3. Microscopía confocal láser de barrido (CLSM) . . . . .	112
14.5.4. Colocalización . . . . .	113
14.6. Análisis estadístico . . . . .	113
14.7. Bioinformática y evolución molecular . . . . .	113
14.7.1. Minería de datos y entrenamiento de los algoritmos de búsqueda . . . . .	113
14.7.2. Creación de filogramas y cladogramas . . . . .	114
14.7.3. Búsqueda de motivos de secuencia . . . . .	114
14.7.4. Modelado computacional . . . . .	114

## V Apéndice

131

# Abreviaturas

## Abreviaturas

<i>AMS</i>	Alineamiento múltiple de secuencias
<i>CK</i>	Citoquinina
<i>DO</i>	Densidad óptica
<i>GFP</i>	Proteína Verde Fluorescente
<i>GUS</i>	Beta Glucoronidasa
<i>MAR</i>	Meristema Apical Radical
<i>NAA</i>	Ácido Naftalen-Acético (auxina)
<i>OLT</i>	(Overlaying Tissues - tejidos circundantes de la raíz lateral)
<i>Pb / bp</i>	Pares de bases
<i>pro</i>	Promotor
<i>RE</i>	Retículo Endoplasmático
<i>RFP</i>	Proteína Roja Fluorescente
<i>RL</i>	Raíz Lateral
<i>RP</i>	Raíz Principal
<i>tZ</i>	trans Zeatina (citoquinina)
<i>u. a.</i>	Unidades Arbitrarias
<i>Wt</i>	Genotipo Silvestre (Wild-type)

## Nomenclatura

<i>Gen</i>	<i>AtAzg1</i> ( <i>At</i> - especie <i>Azg1</i> gen), <i>Azg1</i>
<i>Gen - Anotación</i>	AT5g50300 (AT especie - 5 cromosoma - g50300 locus)
<i>Proteína</i>	AZG1
<i>Plásmido</i>	<i>pMDC</i>
<i>Promotor</i>	<i>AZG1<sub>pro</sub></i> :
<i>Knock-out</i>	<i>azg1-1</i>
<i>Ecotipo</i>	<i>Col-0</i> , <i>Wt</i>
<i>Germoplasma</i>	SAIL_114E03

## Resumen

Las plantas han podido conquistar la tierra gracias a su plasticidad fenotípica. Parte de esta capacidad se explica por la posibilidad de generar nuevas estructuras a lo largo de la vida. En el presente trabajo se abordó la importancia de dos genes de la familia AZG (*AtAzg1* y *AtAzg2*) en el desarrollo radical. Los antecedentes mostraban que estos genes codifican para potenciales transportadores de purinas y de algunos de sus derivados como las citoquininas. Además, experimentos realizados en *Arabidopsis thaliana*, señalaron que podrían estar relacionados con la regulación de la arquitectura radical en estrecha relación con los sistemas hormonales de plantas. Partiendo de esta base, nos propusimos en primer lugar comprender el origen de la familia génica especialmente en relación con los sistemas de señalización hormonal. Mediante la búsqueda de secuencias relacionadas en el grupo de Viridiplantae, se pudo obtener el primer árbol filogenético con los potenciales homólogos de los genes de *A. thaliana*. La posibilidad de contar con un árbol permitió avanzar sustancialmente en el conocimiento acerca de la evolución de esta familia génica. Se pudo relacionar la diversificación de la familia con eventos específicos como la conquista de la tierra y la aparición de la raíz, así como también se observó que los orígenes de algunos sistemas de señalización coinciden con los de la familia génica AZG. Por otro lado, contar con gran número de genes homólogos de la familia, nos permite poner en relevancia secuencias altamente conservadas, así como señalar regiones que expliquen las diferencias entre las variantes de los distintos genes de la familia AZGs.

En el presente trabajo se continuó con la caracterización de los miembros de AZG de *A. thaliana*, AtAZG1 y AtAZG2, al estudiar la capacidad de ambos transportadores de interactuar con otras proteínas en el sistema de expresión heterólogo de levaduras. Para ello, se realizaron ensayos de interacción usando la técnica de *Split Ubiquitin System*. En primer lugar, se pudo establecer que los transportadores son capaces de interactuar tanto consigo mismos como con el otro miembro de la familia. Es decir, se observaron asociaciones del tipo AZG1-AZG1, AZG2-AZG2 y AZG1-AZG2. Por otro lado, resultó de interés conocer la capacidad de estos transportadores de interactuar con algunos miembros de la cascada de señalización por citoquininas, por lo que se seleccionaron como candidatos los receptores y las fosfotransferasas. Si bien la interacción de estas proteínas con AZGs habría resultado un interesante mecanismo de respuesta rápida para la regulación del transporte de la hormona, no se observó interacción entre AZGs con receptores de citoquininas y la interacción con las fosfotransferasas no fue concluyente.

A continuación, se estudió el rol de estos transportadores en plantas. En primer lugar, se avanzó en la caracterización de la expresión de AZG1. Se pudo determinar que este gen se expresa en diversos órganos y tejidos y

que es inducible por exposición a citoquininas. El estudio de distintas líneas mutantes del gen *AtAzg1*, mostraron que no existen diferencias evidentes en sus fenotipos al crecer en condiciones estándar. Sin embargo, motivados por observaciones hechas durante la descripción de la expresión, se estudió la importancia del gen en la dominancia apical radical. Gracias a esto, se determinó que AZG1 es importante para regular la regeneración del sistema radical tras la escisión del meristema apical radial. Para continuar el estudio de la relación de este gen con citoquininas, se estudió cómo se desarrollan los mutantes del gen en presencia de la hormona. Se pudo determinar que la arquitectura radical era distinta en líneas carentes del gen, así como en líneas que lo sobreexpresan, especialmente en el largo de la raíz principal. Para asegurar que esta diferencia se debe a la actividad de transportador se complementaron líneas deficientes en el transportador (*knock-out*), las cuales recobraron el fenotipo salvaje.

Por otro lado se continuó con la caracterización de AZG2 en plantas. Si bien existían estudios previos sobre la expresión del gen, en el presente trabajo se pudieron profundizar y determinar que su expresión está limitada solamente en un pequeño grupo de células rodeando los primordios de raíz lateral, correspondientes a la corteza y la epidermis. Además, se determinó que existe otro dominio de expresión del gen en semillas en proceso de germinación. Retomando su relación con hormonas, se observó que en líneas *knock-out* mediante el reportero de citoquininas *ARR5<sub>pro</sub>:GUS* existían diferencias en la señalización, especialmente tras la aplicación de la hormona. Esta diferencia en la señalización pudo ser cuantificada mediante el reportero de citoquininas *TCS<sub>n<sub>pro</sub></sub>:GFP*. Este reportero mostró que líneas que no tienen AZG2 presentan menor actividad de citoquininas, relacionando así los fenotipos descritos previamente para estas líneas al déficit en la señalización.

Finalmente, se abordó el estudio de la localización subcelular de los transportadores mediante el uso de proteínas AZG fusionadas a proteínas fluorescentes. AZG1 presentó una clara localización en la membrana plasmática en las distintas fusiones con proteínas fluorescentes evaluadas. Por otro lado, la fusión con AZG2 fue localizada en la membrana plasmática, aunque también se observó señal en el citosol. Mediante el uso de distintas construcciones y observando distintos tejidos, se pudo estimar que se trataría de retículo endoplasmático.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten profundizar el conocimiento sobre el vínculo entre estos transportadores y la señalización hormonal en plantas. Se lograron establecer modelos que nos permiten explicar la actividad de ambos transportadores, contemplando su posición en el contexto de señalización, su dominio de expresión así como su localización y su relación con otras vías de señalización. Como perspectivas, el estudio permitió abrir nuevas puertas a proyectos de investigación en curso que apuntan hacia el mejor entendimiento de la regulación de la arquitectura radical.



Parte I  
**Introducción**



# 1. Desarrollo vegetal

## 1.1. Regulación del crecimiento

Partiendo de nuestra naturaleza como animales, caracterizados por la locomoción, puede resultarnos extraño y sin dudas un gran desafío pensar en un organismo que desarrolla todo su ciclo vital sin moverse del lugar en que se asentó por primera vez. Soportando los cambios de estaciones, los días más cálidos y las noches más frías sin moverse de su lugar. Sin la posibilidad de buscar refugio, pero también sin la necesidad de hacerlo. Por difícil que nos parezca, y aunque lo aceptemos día a día sin sobresaltos, esta es la suficiencia que alcanzaron los organismos vegetales. Se trata de millones de años de evolución que forjaron la complejidad genotípica de las plantas generando organismos resilientes, capaces de afrontar un amplio abanico de condiciones sin tener que evadirlas.

Una de las características responsables de tal capacidad es la posibilidad de controlar el desarrollo de nuevas estructuras. En la parte aérea, las nuevas ramas y en el sistema radical las raíces laterales (RL) o adventicias determinarán la arquitectura de cada órgano. Esto le permite a las plantas ejecutar un plan de desarrollo flexible, en constante interacción con el ambiente para poder completar exitosamente su ciclo de vida. Esta constante interacción organismo-ambiente surge de la necesidad de la planta de obtener agua, nutrientes, cantidad y calidad de la luz, etcétera. A lo largo de la evolución las plantas han desarrollado múltiples mecanismos para percibir el ambiente, pero al tratarse de organismos pluricelulares generar una respuesta adecuada se torna complejo debido a la cantidad de información que se debe integrar y canalizar. Para ello la comunicación entre células es imprescindible y uno de los caminos que han evolucionado en éstos y otros organismos son las moléculas señales. Su función reside en informar sobre variaciones del ambiente biótico o abiótico que rodea a la planta. En este trabajo utilizaremos un concepto clásico de la fisiología para definir un grupo de moléculas señal, las fitohormonas u hormonas vegetales. Si bien existe un concepto arraigado para las hormonas animales, para las plantas la definición es más laxa al no existir glándulas ni tejidos blanco. La principal característica que convierte una molécula señal en una hormona vegetal es la capacidad de actuar a concentraciones extremadamente bajas y generar grandes respuestas (Taiz y Zeiger, 2010).

Las fitohormonas regulan y coordinan la fisiología con la morfogénesis, comunicando células, tejidos y órganos. Estas moléculas actúan durante toda la ontogenia vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia de los organismos (Va, 2015; Jan et al., 2018). Existen distintas clases de hormonas, entre ellas las denomi-

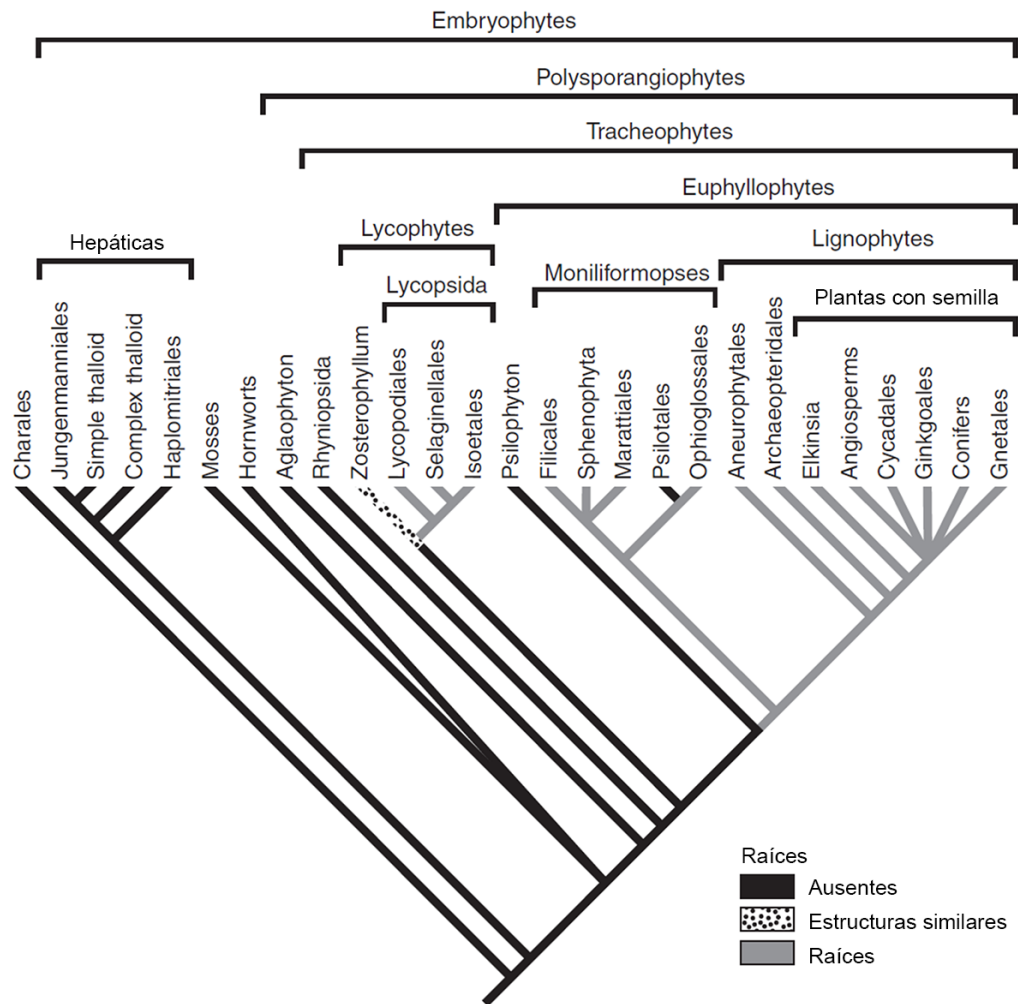


nadas hormonas clásicas auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico, giberelinas y etileno. Otras hormonas vegetales son los brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico, estrigolactonas y ácido jasmónico. Si bien no se puede delimitar la actividad de cada clase a cierto tipo de procesos, algunos de estos están principalmente regulados por hormonas específicas. Un ejemplo de esto es la preponderancia de dos de ellas, auxinas y CK en la regulación del desarrollo y morfogénesis vegetal (Bishopp et al., 2011). Esta característica hace que sean hormonas vitales, ya que la ausencia de alguna de éstas es letal para la planta (Taiz y Zeiger, 2010). Hace tiempo se conoce que estas dos hormonas son parte de una comunicación cruzada que gobierna distintos procesos de desarrollo, siendo un claro ejemplo la determinación de la dominancia apical (El-Showk et al., 2013). Como resultado de esta regulación, las plantas favorecen el crecimiento de una yema apical por sobre el resto de las yemas laterales o viceversa. En la parte aérea de las plantas la dominancia de la yema apical es establecida por un desbalance hacia auxinas, mientras que un incremento en la actividad de las yemas laterales está dado por un desbalance hacia CK. Este ejemplo demuestra que la regulación no depende únicamente de sus concentraciones, sino principalmente de un balance entre ambas hormonas (Akiyoshi et al., 1983). Curiosamente el mismo fenómeno ocurre con la raíz, pero con relaciones opuestas a las de los órganos aéreos (Aloni et al., 2006). Es decir, el aumento relativo de las auxinas promueve la formación de las RL, mientras que las CK las inhiben. Esta particularidad no se trata de una excepción sino que nos permite entender parte de la complejidad hormonal, donde no sólo importa si la hormona está presente y en qué proporción, sino que también hay otras variables influenciado la señalización como el tejido y la etapa del desarrollo (Vanstraelen y Benkova, 2012).

## 1.2. Desarrollo radical

### 1.2.1. Evolución del sistema radical

El estudio del origen de las plantas superiores ha sido de gran interés. Particularmente, en los últimos años se ha favorecido la hipótesis de que las Angiospermas derivan de las algas carófitas (Figura 1; Delwiche y Cooper, 2015). Las plantas presentan muchos mecanismos fisiológicos que se cree habrían aparecido en algas y que se conservan hasta la actualidad. Un ejemplo de esto son las vías de señalización por algunas hormonas (Wang et al., 2015). Sin embargo, existe una gran distancia evolutiva entre estos dos grupos. En este sentido, durante la historia evolutiva de las plantas, la conquista de la tierra, representó una bisagra adaptativa. Durante este proceso diversos linajes confluyeron hacia el establecimiento de un órgano de exploración subterránea, la raíz (Huang y Schiefelbein, 2015). Las primeras estructuras con función de anclaje y absorción de nutrientes fueron los



**Figura 1. Evolución del sistema radical.** Filogenia de taxones de relevancia evolutiva mostrando los orígenes del sistema radical. Se pueden observar dos eventos independientes donde aparecen estructuras de tipo radical. El primero se da en licopsida y más tarde en la evolución en un ancestro común extinto de eufilofitas. Tomado de Friedman, 2004.

rizoides. En principio se trataba de estructuras simples, difícilmente diferenciable de las estructuras aéreas, y se caracterizaban por la ausencia de endodermis y cofia (Kenrick y Strullu-Derrien, 2014). Aproximadamente hace unos 400 millones de años se encuentran en registros fósiles las primeras evidencias de raíces propiamente dichas. Actualmente se acepta que este órgano se desarrolló independientemente en distintos linajes, por lo menos en dos ocasiones. Esta premisa se basa en que el ancestro común de licófitas y eufilofitas, no poseía sistema radical pero los dos desarrollaron sistemas análogos (Figura 1; Friedman et al., 2004). Este es un ejem-

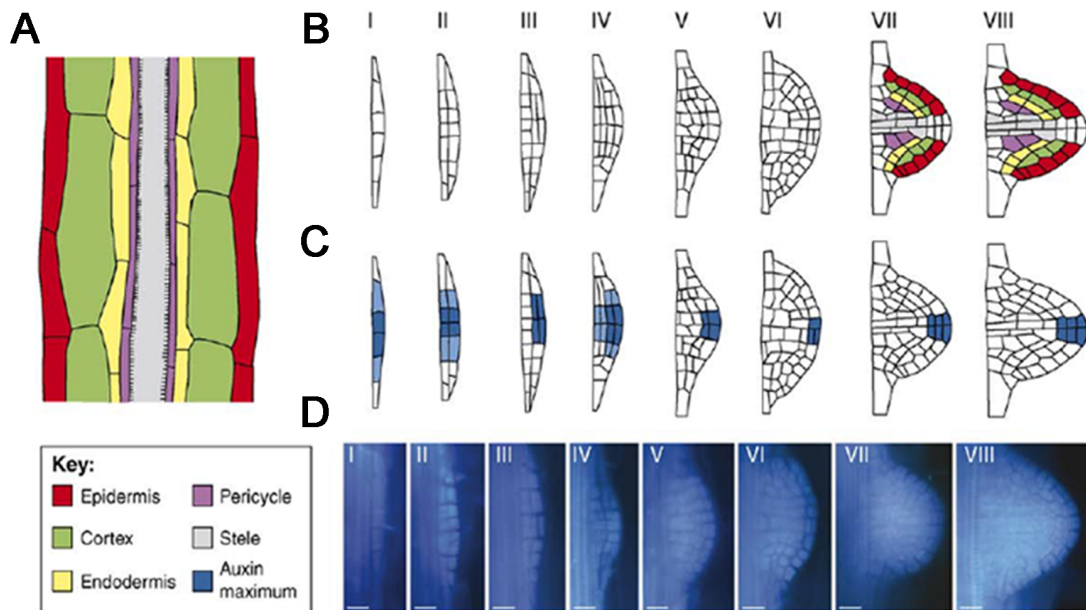
plo de especial interés evolutivo, en el cual dos linajes convergen hacia estructuras de alta similitud al estar sometidos a presiones de selección equivalentes (Seago y Fernando, 2013). Las licófitas ancestrales y las eufilófitas, presentan características comunes como pelos radicales en la epidermis, una endodermis para asegurar el paso unidireccional de agua, periciclo a partir del que se generan las RL y la presencia de cofia. Más allá de las similitudes morfológicas que presentan los distintos linajes, Huang y Schiefelbein (2015) encontraron al estudiar la expresión génica que comparten un programa de desarrollo común a nivel molecular. La posibilidad de establecer este paralelismo, nos alienta a indagar el pasado de nuestra(s) familia(s) génica(s) de interés en busca de evidencia sobre su posible función y relevancia en las distintas etapas de la evolución de las plantas vasculares.

### **1.2.2. Configuración de la arquitectura radical y emergencia de las raíces laterales**

Los programas genéticos del desarrollo, están sujetos a las necesidades de los organismos. Las plantas están continuamente permitiendo el ambiente, la rizosfera en el caso de las raíces, para responder a factores vitales como la disponibilidad de agua y de nutrientes (como nitrógeno, azufre o fósforo) y la orientación de la gravedad. Estos factores, junto con muchos otros, son moduladores de la arquitectura radical interviniendo directamente sobre la regulación del desarrollo. Esto convierte a la raíz en un órgano dinámico, cuya arquitectura se establece principalmente mediante la actividad de su meristema principal y de la generación de nuevos meristemas secundarios que permiten la formación de RL. La regulación del crecimiento y de la ramificación de la raíz está finamente regulada por balances hormonales con el fin de generar una respuesta global adecuada (Leyser y Fitter, 1998; Zhang y Forde, 2000; Kutz et al., 2002; López-Bucio et al., 2002; Ottenshläger et al., 2003; Cassab et al., 2013).

En Angiospermas, más específicamente en Eudicotiledóneas, grupo al cual pertenece nuestro modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*, la ramificación del sistema radical depende de la emergencia de RL. Estas raíces emergen a distancias específicas una de otra, en respuesta a un proceso que está determinado por la generación periódica de picos de concentración de auxinas en el meristema apical radical (MAR; De Smet et al., 2007). Esto, determina molecularmente células del periciclo, que a posteriori se dividirán secuencialmente para formar un primordio de RL (Figura 2A y 2B; Peret et al., 2009; Goh et al., 2016). Luego de la determinación, para la correcta formación de una RL es fundamental la generación de un gradiente de auxinas mediante transporte activo, con un pico de concentración en la zona distal del primordio en formación (Figura 2C; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro et al., 2001; Benkova et al., 2003).

Por otro lado, existen mecanismos regulatorios que intervienen en la formación



**Figura 2.** Anatomía de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (A y B) Disposición de los distintos tejidos radicales en (A) el cilindro de la raíz y (B) durante los distintos estadios de desarrollo de los primordios de RL (I al VIII). Se muestra también (C) los picos máximos de concentración de auxinas en primordios (interpretados según el reportero  $DR5_{pro}:GUS$ ) y (D) raíces teñidas con anilinas a partir de las cuales se obtuvieron los dibujos previos. Tomado de Peret, 2009.

de estos gradientes como una forma de interrumpir el desarrollo de los primordios. Las CK, por ejemplo, actúan sobre la localización subcelular polar del transportador PIN1, impidiendo que se forme el gradiente de auxinas en el primordio (Marhavy et al., 2011). Algunos estudios han demostrado que raíces tratadas con CK en concentraciones relativamente elevadas causan divisiones celulares desordenadas llevando a un primordio quiescente, que no se convertirá en una RL (Laplaze et al., 2007). Este es uno de los ejemplos de cómo actúan los balances hormonales a nivel molecular, aunque hasta el momento poco se conoce acerca de los mecanismos regulatorios de la emergencia de RL por CK. Si bien se conoce el efecto de esta hormona en raíces, este ha sido descrito mediante el aporte exógeno de hormonas o en desórdenes específicos, mas no en un mecanismo endógeno de regulación de la emergencia de RL (Stoeckle et al., 2018).

## 2. Cascadas de señalización hormonal

La capacidad de las hormonas de poder coordinar una gran diversidad de procesos como los mencionados, así como de interactuar entre ellas se basa en las características de sus vías de transducción de la señal o cascadas de señalización. Por ello, para entender cómo se regula la morfogénesis radical, primero es fundamental entender los mecanismos que operan debajo de esta. Las cascadas de señalización se pueden resumir genéricamente en una sucesión de pasos. El primero se trata de la unión de las hormonas a sus receptores. Existen distintos tipos de receptores, pudiendo ser receptores citosólicos (e.g. receptores de auxinas) o asociados a membranas (e.g. receptores de CK), ya sea membrana plasmática o endomembranas. El paso siguiente está a cargo de segundos mensajeros que se encargan de transmitir la señal y que además es uno de los pasos más importantes de la amplificación de la señal. En este nivel, la señal puede seguir dos caminos; (1) una vía rápida que no implica transcripción génica, sino que la célula utiliza recursos moleculares preformados para generar una respuesta (e.g. apertura y cierre de estomas); y (2) una respuesta más lenta en la cual mediante factores de transcripción se activan y/o reprimen genes específicos. La combinación de estos dos mecanismos, en conjunto con todas las redes de señalización que intervengan en el proceso resultará en una respuesta determinada (Alberts et al., 2007; Depuydt y Hardtke, 2011).

### 2.1. Señalización por auxinas

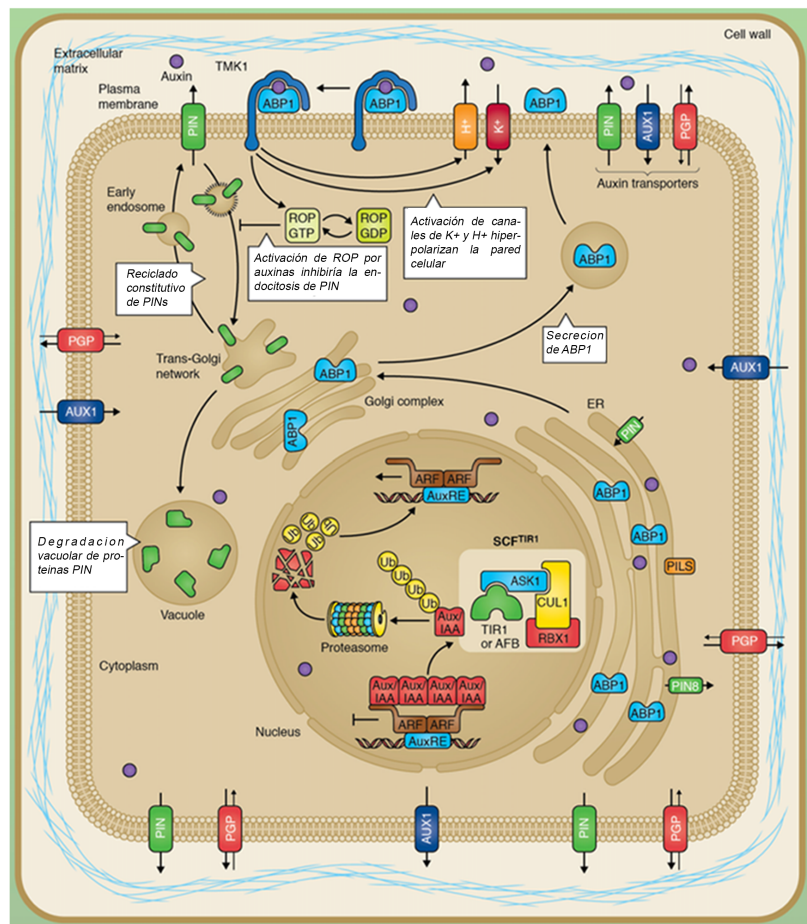
Si bien los pasos intermedios de la señalización por auxinas se conocen hace mucho tiempo, el inicio de la señalización ha sido descrito más recientemente. Aunque se han propuesto diversos receptores de auxinas (Napier et al., 2002), los datos no fueron del todo concluyentes, y recién en 2005 con la descripción de AtTIR1 se sentaron las bases del mecanismo (Dharmasiri et al., 2005). AtTIR1 es una proteína soluble del tipo F-box, que en presencia de auxinas forma el complejo SCF<sup>TIR1/AFBs</sup> para interactuar con sus blancos (proteínas Aux/IAA) mediando su degradación vía proteosoma (Figura 3). Las proteínas Aux/IAA son inhibidores de los factores de transcripción Auxin Response Factors (ARF) a los que se unen para evitar su homodimerización. La degradación de los Aux/IAA libera los ARFs, que unidos a ADN en las regiones conocidas como Auxin Response Element (AuxRE) activan o inhiben la expresión de genes de respuesta (Fukaki y Tasaka, 2009). Se ha observado además que diferentes Aux/IAA y ARF interactúan de forma modular, con preferencias de pares. Por ejemplo, Solitary-Root (SLR)/IAA14 (un Aux/IAA) y ARF7-ARF19 (dos ARF altamente emparentados) regulan diversos procesos del desarrollo radical (Fukaki et al., 2005). Otro ejemplo es Bodenlos (BDL)/IAA12-

Monopteros/ARF5 que también intervienen en la formación de nuevas raíces (De Smet et al., 2010). Además, existen otros factores de transcripción que actúan aguas debajo de los ARF y que le aportan un mayor nivel de especificidad a la señalización. Por ejemplo, ARF7 y ARF19 modulan el desarrollo de RL mediante factores de transcripción de la familia Lateral Organ Boundaries-Domain (LBD) (Okushima et al., 2007; Feng et al., 2012).

## 2.2. Auxinas y tejidos circundantes de la raíz

Uno de los principales escollos a superar por un primordio de RL para llegar a convertirse en un nuevo órgano funcional es atravesar las capas de tejido que lo separan de la rizosfera. Esta resulta otra etapa donde existen mecanismos regulatorios de la emergencia de RL en la que juegan un rol clave las células que rodean al primordio. Este grupo de células es conocido como tejidos circundantes de la RL

**Figura 3.** Señalización por auxinas. Resumen de los componentes involucrados en la señalización dependiente de auxinas. Se pueden observar los receptores TIR1 y ABP1, factores de transcripción ARF y sus represores Aux/IAA así como las distintas familias de transportadores de la hormona. Modificado de Grones, 2015.



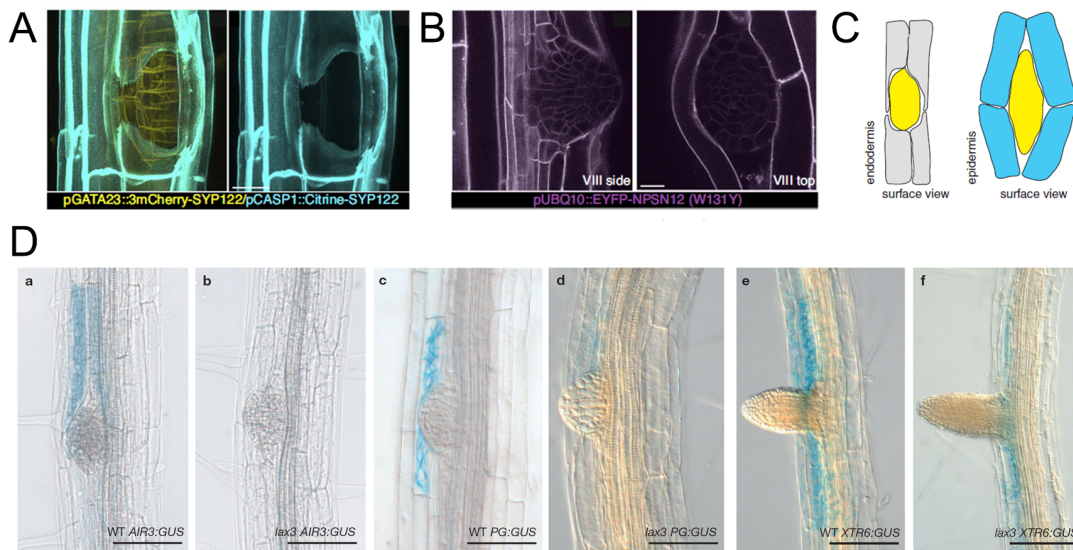
u OLT (por sus siglas en inglés: *overlying tissues*). Se trata de un dominio celular que ha cobrado relevancia gracias a que se le han atribuido funciones en la determinación de la morfología de las RL y cuya reorganización es vital durante el proceso de emergencia (Lucas et al., 2013; Vermeer y Geldner, 2015). La reorganización de estos tejidos es diferente según de qué capa celular se trate. En primer lugar, los primordios en crecimiento deben superar la endodermis (Figura 4A). Este tejido presenta un engrosamiento en sus paredes celulares radiales conocido como la banda de Caspari, con alto contenido de suberinas que la vuelven impermeable al paso de agua y solutos. Para que el primordio pueda atravesar esta barrera de difusión apoplástica sin afectar su integridad, las células endodermales pierden volumen hasta que sus membranas superior e inferior se tocan y se fusionan y permiten el paso del primordio (Vermeer et al., 2014).

A continuación en el progreso del primordio se encuentran la corteza y la epidermis (Figuras 4B y 4C). Estos tejidos responden de manera similar entre sí. Sus paredes celulares son remodeladas de forma tal que pares de células contiguas se separan formando un poro por el cual emergerá la futura RL. La regulación de esta remodelación ha sido relacionada con la actividad de un transportador de auxinas, LAX3. La actividad de este transportador permite a las auxinas promover la remodelación de la pared celular mediante la inducción de la expresión de enzimas como AIR3, ADPG2 y XTR6 (Figura 4D; Swarup et al., 2008). Otras enzimas de remodelado de pared celular como EXP14 y EXP17 también han sido reportadas como miembros importantes para la emergencia de RL (Lee y Kim, 2013; Lee et al., 2013).

### **2.3. Señalización por citoquininas**

Históricamente se ha posicionado a las CK como las hormonas antagónicas a auxinas (Skoog y Miller, 1957). Esto se debe a que llevan a cabo roles contrapuestos en muchos procesos del desarrollo (Ioio et al., 2007; Laplaze et al., 2007; Shimizu-Sato et al., 2009), aunque actualmente se sabe que actúan también de forma sinérgica en otros (Skalicky et al., 2018). A pesar de esto, el mecanismo de señalización por CK está pobremente descrito en comparación con el de auxinas (Muraro et al., 2011). El sistema de señalización de CK comienza con un sistema de dos componentes, análogo al ampliamente descrito en bacterias. El primer paso está a cargo de los receptores, proteínas de membrana del tipo histidina quinasa, que están presentes en forma de dímeros y tienen la capacidad de trans-fosforilarse (West y Stock, 2001). La activación de los receptores depende de un cambio conformacional dependiente a su vez de la unión a CK. La ausencia de ligando hace predominar la actividad fosfatasa por sobre la histidina quinasa, evitando que el fosfato pueda ser utilizado como señal (Kakimoto, 1996; Mähönen et al., 2000). Una vez activados los receptores transfieren el fosfato a proteínas de la familia





**Figura 4. Emergencia de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*.** (A) Tinción diferencial de células del primordio de RL (amarillo) y de la endodermis (turquesa) muestran cómo se deforman las membranas para ser atravesadas por el primordio de RL. (B) Primordio de RL en estadio avanzado pasando entre células de corteza y epidermis. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. (C) Esquema de la diferencia entre la remodelación de la endodermis y de la corteza radical. Tomado de Vermeer, 2018. (D) Expresión de los reporteros AIR3<sub>pro</sub>:GUS, PG<sub>pro</sub>:GUS y XTR6<sub>pro</sub>:GUS en plántulas Wt (a, c, y e) y KO *lax3* (b, d y f). La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Tomado de Swarup, 2008.

*Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer (AHP), que son los encargados de activar los factores de transcripción RR (del inglés response regulators). Sin embargo, dentro de los AHP de *Arabidopsis*, existe una excepción. AHP6 es una pseudo-fosfotransferasa, ya que tiene una mutación en una histidina altamente conservada dentro de la familia. Debido a esto, AHP6 es incapaz de transmitir la señal, funcionando como un inhibidor de la vía (Mahonen et al., 2006). Todas las AHP son proteínas solubles que llevan a cabo sus funciones migrando entre citosol y núcleo donde interactúan con los RR, que en *A. thaliana* son llamados ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR). Los ARR a su vez se diferencian en tres tipos según diferencias en su estructura; (1) los ARR tipo A carecen de un dominio de unión a ADN y atenúan la transcripción; (2) los ARR tipo B se unen a ADN y son activadores transcripcionales; y (3) los ARR tipo C que no están bien caracterizados pero son capaces de interferir la señalización por CK (Zürcher y Müller, 2016).



## 2.4. Receptores de citoquininas: localización subcelular

Determinar el lugar en el que se inicia la señalización por CK resulta fundamental. Tanto es así que en distintas publicaciones se han postulado modelos asumiendo supuestos acerca de dónde gatilla la señal, que han aumentado la controversia en el área (Zürcher et al., 2016; Lomin et al., 2017; Romanov et al., 2018). Dos publicaciones han mostrado independientemente, que los receptores AHK se encuentran principalmente localizados en el RE (Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Sin embargo, esta localización ha sido largamente discutida ya que no se ha podido descartar que estos receptores sean activos también en la membrana plasmática. A favor de esta última hipótesis, podemos mencionar al modelo de señalización propuesto por Zürcher et al. (2016). En este modelo el transportador PUP14, actúa aguas arriba de los receptores, ingresa CK activas al citosol, donde no pueden ser percibidas por los receptores en la membrana plasmática. La ausencia de PUP14 entonces, permitiría la unión de CK a los receptores (en membrana plasmática) con lo que progresará la transducción de señales. La consolidación de este modelo se cimienta en la interpretación de un experimento en el cual, la expresión conjunta del PUP14 en protoplastos con enzimas que degradan CK (Cytokinin Oxidase; CKX) en apoplasto o citosol, corroboran que la señal proviene de CK apoplásticas.

Por otro lado, respaldando los estudios que sugieren que la señalización se inicia en el lumen del RE, aparece la caracterización bioquímica de la interacción entre receptor y ligando. El pico de afinidad de los receptores AHK por CK se da a pH neutro levemente alcalino. A pH levemente ácido ( $\sim 5$ ) la afinidad baja considerablemente, volviéndose los receptores inactivos irreversiblemente a pH menor a 5 (Lomin et al., 2015; Romanov, 2018). Considerando esto y teniendo en cuenta que el pH apoplástico se encuentra entre 4 y 6, mientras que en el lumen del ER es de entre 7 y 8, es esperable que los AHK sean principalmente activos en RE. Actualmente, esto sigue siendo un tema en discusión y debido a ello los modelos que abarquen este punto deben contemplar ambas hipótesis.

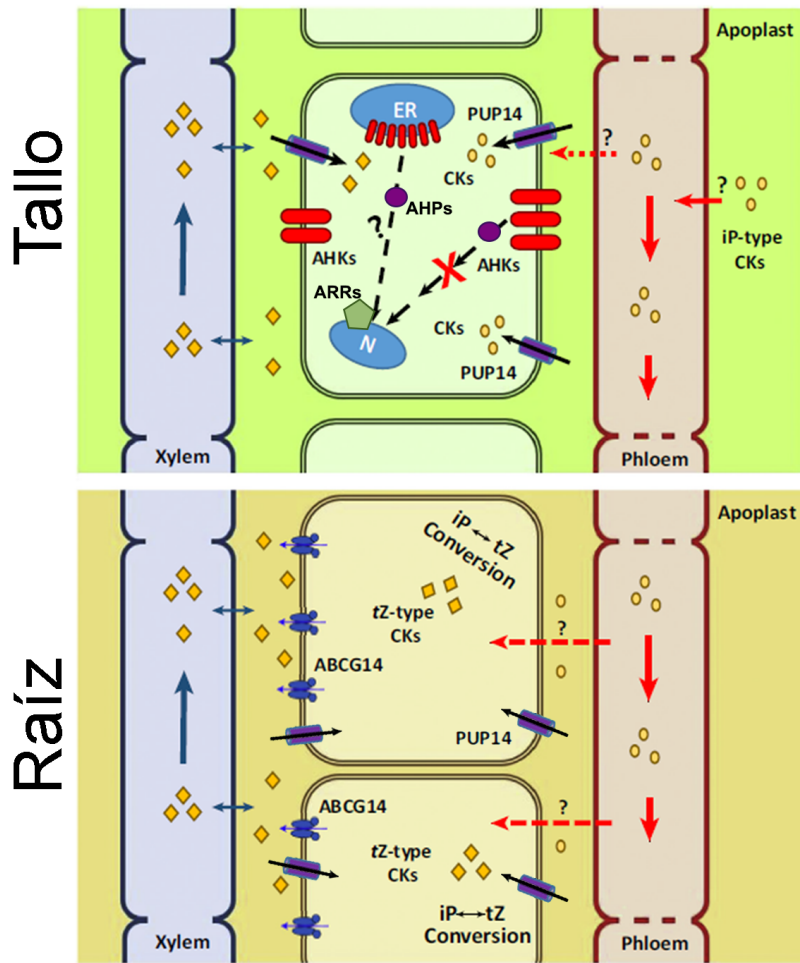
## 3. Transporte de hormonas

Las plantas regulan las concentraciones de hormonas principalmente mediante síntesis, degradación, conjugación (uniéndose covalentemente a azúcares, aminoácidos o péptidos) y transporte (Kleczkowski et al., 1995; Frebort et al., 2011). En la última década, el transporte de hormonas ha tomado un rol predominante, tanto en señalización a corta como a larga distancia. El transporte de auxinas ha sido estudiado en profundidad y han sido descritos transportadores de distintas familias (Figura 3; Grones y Friml, 2015). Existen cuatro tipos de transportadores: Pin-

Formed Proteins (PIN), la familia de genes Auxin Transporter Protein 1 (AUX1) y auxin Transporter-Like Protein (AUX1/LAX), P-Glycoproteins (PGP) de la familia de transportadores ATP-Binding Cassette (ABC), y los Pin-Likes (PILS). Algunos transportadores PIN como AtPIN1 y AtPIN2 tienen la particularidad de localizarse polarmente en las membranas celulares, otorgándole al transporte de auxinas una dirección específica. El transporte polar de auxinas se ha investigado profundamente y se lo considera un módulo común de interacción e integración de vías de distintas hormonas, independientemente del contexto de desarrollo en el que se encuentre (Vanstraelen y Benkova, 2012). Por lo tanto, el flujo correcto de hormonas, así como la determinación y mantenimiento de gradientes hormonales resultantes de éste, son procesos vitales durante el desarrollo (Adamowski y Friml, 2015).

### 3.1. Transporte de citoquininas

Como se mencionó en el párrafo anterior, existe un vasto conocimiento sobre el transporte de auxinas. Conocer múltiples transportadores, la dirección en que transportan, su afinidad por los sustratos y otras caracterizaciones, han permitido no solamente entender cómo regulan su desarrollo las plantas, sino también generar modelos y poder predecir el comportamiento ante diferentes condiciones (Liu et al., 2014; Morales-Tapia y Cruz-Ramirez, 2016). La contracara de esta situación la ocupan las CK, para las cuales los avances más significativos han ocurrido recientemente y todavía no son comparables con lo que conocemos sobre el transporte de auxinas (Muraro et al., 2011). Sin embargo, se han descrito distintos procesos que evidencian la necesidad de transportadores de CK tanto para transporte a corta como a larga distancia (Bürkle et al., 2003). Hace tiempo se conoce que las CK sintetizadas en la raíz, actúan como señal de la disponibilidad de nitrato a la parte aérea de la planta (Samuelson et al., 1992; Takei et al., 2004; Kiba et al., 2013). A pesar de ello, durante muchos años sólo dos proteínas, AtPUP1 y AtPUP2, habían sido propuestas como transportadores de CK (Bürkle et al., 2003). Bürkle se basa en la capacidad de CK por competir por el transporte de adenina en células vegetales, para señalar que se transportarán por un mismo sistema. Sin embargo, esto no sería así para los ribósidos de CK ya que no son buenos competidores. Para explicar el movimiento de este segundo grupo, se postularon a transportadores de nucleósidos, los Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT), como posibles transportadores de conjugados de CK a larga distancia (Hirose et al., 2005; Sun et al., 2005). Ya que las CK son principalmente transportadas a larga distancia en su versión conjugada, los transportadores ENT permitirían entender cómo se mueven estas hormonas de fuente a destino. Sin embargo, no se pudo establecer un rol fisiológico claro para ninguno de estos transportadores en las plantas (Kudo et al., 2010).



**Figura 5. Transporte de CK.** Las CK se mueven de raíz a tallo gracias a la actividad de ABCG14. PUP14 es el transportador encargado del ingreso de las CK a las células vegetales tanto en raíz como en tallo. Sin embargo, como se puede observar existen incógnitas (?) acerca de como atraviesa las membranas biológicas en lugares claves para la homeostasis hormonal. El mecanismo de señalización se compone de receptores (AHK), que fosforilan a las fosfotransferasas (AHP) y a su vez estas transmiten la señal a los factores de transcripción (ARR). Estos últimos serán los encargados de la regulación génica. Si bien el mecanismo de señalización se ilustra en el tallo, ocurre igualmente en raíz. Modificado de Kang, 2017.

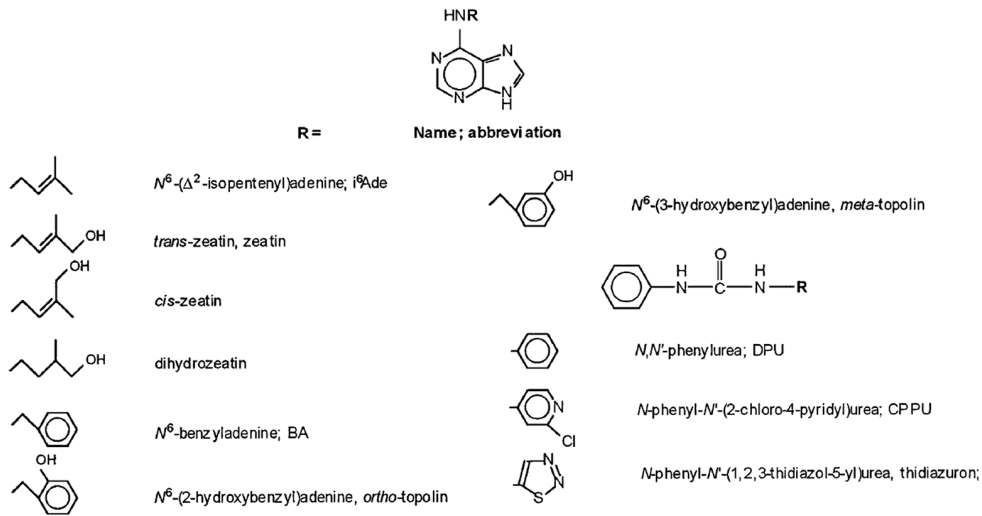
Más recientemente dos publicaciones propusieron a ABCG14 como un exportador de CK. ABCG14 tiene una expresión basal en toda la planta, aunque su principal sitio de expresión es la raíz, asociado a la vasculatura (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014). En ambos trabajos se demuestra la importancia de ABCG14 en el transporte a larga distancia de CK, desde raíz a la parte aérea (Figura 5). Este argumento se sustenta en el fenotipo de las plantas que tienen interrumpido

el gen del transportador (nombradas de aquí en adelante como líneas knock-out - KO) ya que presentan trastornos del desarrollo relacionados con el exceso de CK en la raíz y la falta de CK en la parte aérea. Por otro lado, en 2016 se publicó la caracterización de un miembro de la familia PUP (Purine Permease) como transportador de CK (Zürcher et al., 2016). Se trata de PUP14, el cual se encarga de acumular CK en el citosol a modo de sumidero, evitando entonces que alcancen el dominio sensitivo de los receptores de CK. Se sugiere que la alta afinidad de este transportador (aunque no se conoce su  $K_m$ ) por CK permitiría que las hormonas se internalicen, antes de unirse a su receptor en la membrana plasmática. De esta forma, regularía la concentración local de CK, explicando su función vital durante el desarrollo embrionario y otros procesos de desarrollo (Figura 5). Sin embargo, el modelo planteado está en discusión ya que implica la presencia de receptores en membrana plasmática, mientras que importantes evidencias indican que la señalización por CK se iniciaría en el lumen del retículo endoplasmático (RE) (ver arriba) (Lomin et al., 2017).

### 3.2. Purinas y citoquininas

Es de destacar que tres de los transportadores mencionados como posibles transportadores de CK, son miembros de una familia de transportadores de purinas. Como se expresó anteriormente, Bürkle et al. (2003) demostraron que purinas y CK comparten un mecanismo de transporte al competir entre ellas. Esto se debe a la similitud molecular que presentan las purinas con la CK (Figura 6). De hecho la síntesis de CK tiene su paso limitante en la actividad de las enzimas Adenosina Fosfato Isopentenil Transferasas (IPT), que catalizan la unión entre un difosfato de dimetilalilo (DMAPP) y una adenosina mono fosfato (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Como resultado de esta reacción se sintetizan las CK naturales, que son todas derivados de adenina. Las distintas CK se diferencian en las modificaciones en la cadena lateral unida a la posición  $N^6$  de la purina (Figura 6). Las dos variantes más importantes en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* son isopentenil adenina (IP) y trans-zeatin (tZ), aunque cis-zeatina (cZ) también es importantes en otras plantas modelo como maíz. Las CK también se pueden clasificar según su cadena lateral en isoprenoides o aromáticas (Mok y Mok, 2001). Las mencionadas previamente pertenecen al primer grupo, mientras que bencil adenina (BA) y thidiazuron (sintética) son aromáticas. BA se produjo en primera instancia sintéticamente, aunque posteriormente se describió como una hormona endógena de algunas plantas (Nandi et al., 1989).

Otra distinción que existe entre las distintas CKs es su lugar de biosíntesis y por lo tanto dirección de transporte. Las CK del tipo IP son mayormente sintetizadas en la zona aérea de la planta y transportadas vía floema hacia la raíz, mientras que las del tipo tZ son mayormente producidas en la raíz y transportadas a la zona aérea



**Figura 6.** Estructura química de CK naturales derivadas de adenina y CK sintéticas derivadas de fenilurea. Tomado de Mok, 2001.

vía xilema (Hirose et al., 2008; Kudo et al., 2010). Si bien no es clara la relevancia fisiológica de esta desviación en las concentraciones de cada hormona, se especula que la relación de cada clase de CK con los receptores puede estar relacionada con la sintonía fina de la regulación. Por ejemplo el receptor de CK AHK3 tiene menor afinidad que AHK4 por el tipo IP, mientras que a su vez presenta afinidad mayor para dihidrozeatina. Además, también existen diferencias en la expresión, ya que AHK3 se expresa principalmente en parte aérea mientras que AHK4 lo hace en la raíz (Romanov et al., 2006). Otras variables como el pH hacen que las afinidades cambien y por lo tanto la señalización se torne aún más compleja. Si bien se trata de un campo en expansión, todavía se debe avanzar para poder arribar a una idea global consensuada sobre los primeros pasos en la señalización de CK.

### 3.3. Transportadores AZG

El primer registro que existe de un miembro de esta familia en la bibliografía se trata de AZGA, un transportador de purinas (adenina, guanina e hipoxantina) de *Emmericella nidullns* (sinónimo de *Aspergillus nidullans*) por el cual recibe el nombre la familia (Darlington y Scazzocchio, 1967; Diallinas et al., 1995; Cecchetto et al., 2004). La cepa KO *azgA* es resistente a la presencia del análogo tóxico de bases nitrogenadas aza-guanina. De este fenotipo deriva el nombre Aza-Guanine Resistant Aspergillus (AZGA). Posteriormente, los únicos dos miembros de la familia en *Arabidopsis thaliana*, AtAZG1 y AtAZG2, fueron caracterizados y descritos como

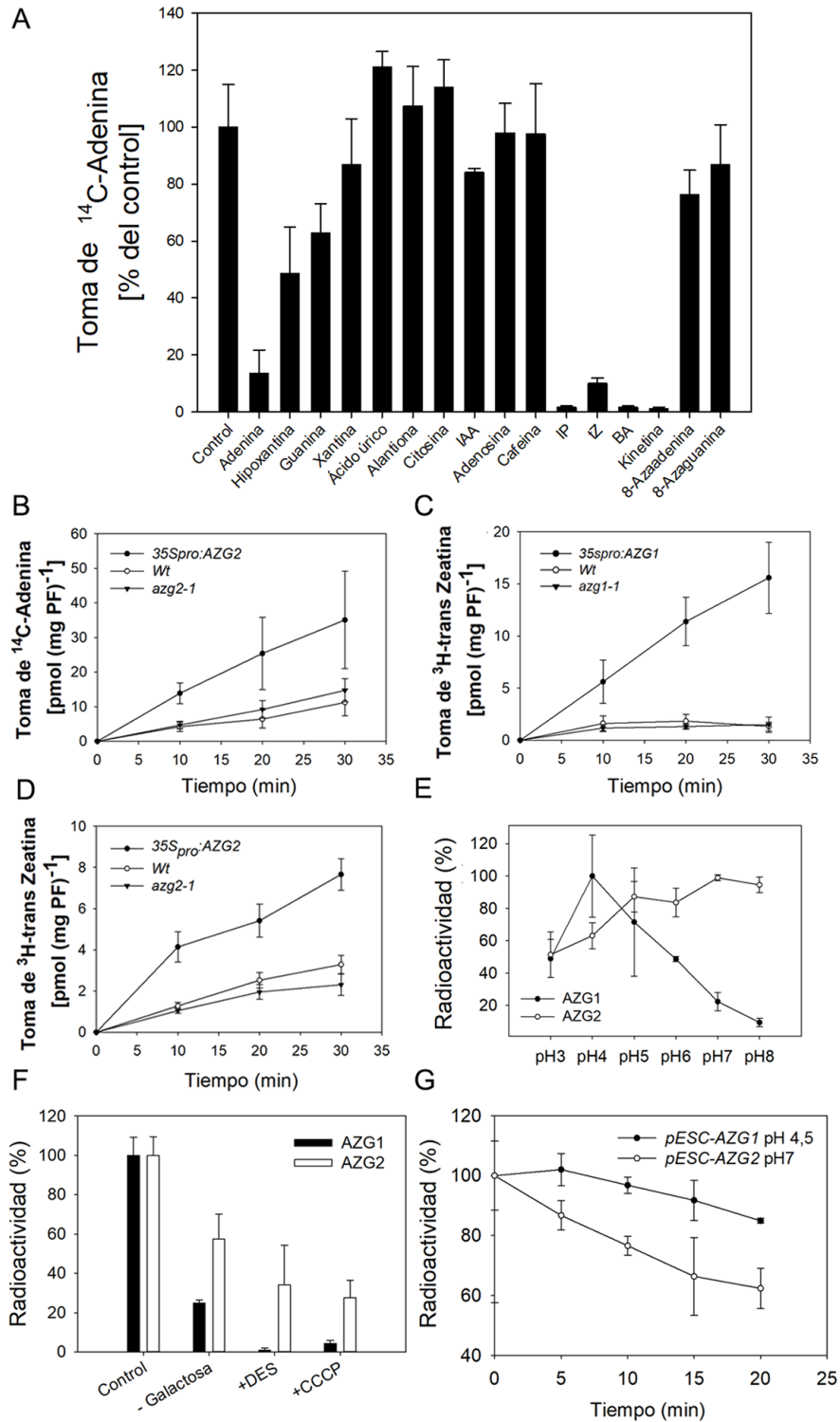
transportadores de purinas (adenina, guanina, hipoxantina) también en plantas. Coincidentemente, los KO presentan resistencias equivalentes a la resistencia de AZGA para aza-guanina (Mansfield et al., 2009).

### 3.4. Caracterización previa de *AtAzg1* y *AtAzg2*

En trabajos previos de nuestro grupo se continuó con la caracterización de *AtAZG1* y *AtAZG2* (datos no publicados). Estudios en el sistema heterólogo de levaduras permitieron calcular las constantes de afinidad para purinas, destacándose la alta afinidad que ambos transportadores presentaron por adenina (AZG1:  $K_m = 1,62 \pm 0,21 \mu\text{M}$ ;  $V_{\text{max}} = 16,21 \pm 0,28 \text{ pmol } (10^6 \text{ Celulas})^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; Benjamin Schumacher, Tesis de Master, Universidad de Tübinguen, Alemania y AZG2:  $K_m = 4,75 \pm 0,62 \mu\text{M}$ ;  $V_{\text{max}} = 25,59 \pm 2,05 \text{ pmol } (10^6 \text{ Células})^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; Eva Winklbauer, Tesis de Master, Universidad de Tübinguen, Alemania). Con el fin de conocer el espectro de sustratos que fueran capaces de ser transportados por AZG1 y AZG2 se realizaron ensayos de competición con diferentes sustancias candidato (Figura 7A), determinando que distintas CK compiten por el transporte, incluso para AZG2 más fuertemente que la propia adenina.

Para comprobar si efectivamente las CK son sustrato de AZG1 y AZG2 se realizaron ensayos con distintas líneas mutantes de ambos transportadores. Líneas KO, silvestres (*Wt*) y sobreexpresantes (SE) fueron sumergidas en adenina o tZ marcadas radiactivamente. En ambos casos y para los dos transportadores las líneas SE mostraron la capacidad no sólo de acumular adenina, sino también tZ, sugiriendo fuertemente que los transportadores AZGs pueden tener implicancias en la homeostasis de CK en planta (Figuras 7B-7D).

Seguidamente, una caracterización más profunda de ambos transportadores, sirvió para establecer diferencias entre ellos. Las curvas de toma de sustrato en levadura a distintos pH, permitieron determinar que AZG1 alcanza su pico de actividad a pH 4, mientras que AZG2 presenta actividad máxima en un rango más amplio, entre pH 5 y 8 (Figura 7E). Además, se estudió el transporte en ausencia de fuentes de energía, o en presencias de sustancias desacoplantes de la cadena de transporte de electrones (CCCP y DES). Si bien en todos los casos el transporte se vio afectado, AZG1 demostró una mayor dependencia a fuentes de energía (Figura 7F). Junto con la preferencia por pH bajos, los resultados sugieren que AZG1 se trataría de un co-transportador de purinas/CK con  $\text{H}^+$ , mientras que AZG2 podría ser un facilitador de la difusión independiente del cotransporte de protones. Finalmente, para conocer la dirección de transporte, levaduras expresando AZG1 o AZG2 y cargadas previamente con hipoxantina (otra purina que ambos son capaces de transportar) fueron utilizadas para evaluar si la hipoxantina podía también ser exportada, midiendo la pérdida de la marcación (Figura 7G). Gracias a esto se demostró que AZG2 pierde la marcación más rápidamente, reforzando la hipótesis



**Figura 7.** Continúa en la próxima página

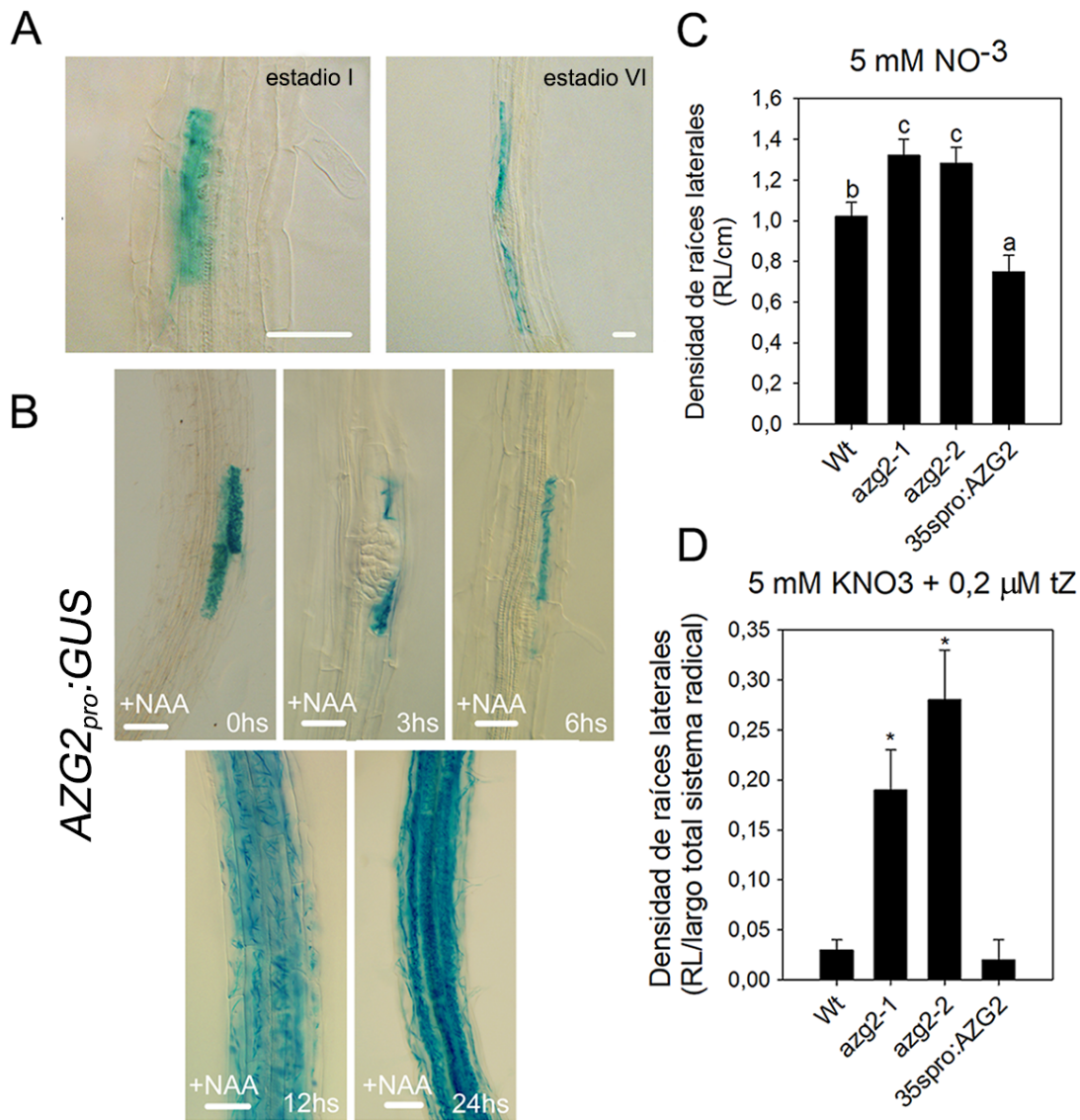
**Figura 7. Caracterización del transporte por AZG1 y AZG2.** (A) Ensayo de competición en el transporte de AZG2 en levaduras. Se midió la toma de adenina marcada radiactivamente ( $20 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -adenina) en presencia de una molécula competidora no marcada en una concentración 10 veces mayor ( $200 \mu\text{M}$ ). Los valores son relativos a la toma de adenina en ausencia de competidores (100%). (B-D) Toma de (B)  $^{14}\text{C}$ -adenina y (C y D)  $^3\text{H}$ -tZ en plántulas *A. thaliana* de 14 ddg en líneas mutantes de (B y C) AZG1 y (D) AZG2. *Wt* ( $\circ$ ), *KO* ( $\blacktriangledown$ ) y *SE* ( $\bullet$ ). (E) Toma de  $^{14}\text{C}$ -adenina en levaduras (*fcy2*) expresando ( $\bullet$ ) *pESC:AZG1* y ( $\circ$ ) *pESC:AZG2* sometidas a distintos pHs. Los resultados se expresan como porcentaje del máximo valor de transporte. (F) Transporte de  $^{14}\text{C}$ -adenina mediada por AZG1 (negro) y AZG2 (gris) bajo condiciones estándar, excluyendo galactosa como fuente de energía en la incubación previa (-Gal), o en presencia de  $100 \mu\text{M}$  CCCP y DES. Los resultados se expresan como porcentaje del control (100%). (G) Levaduras expresando AZG1 o AZG2 incubadas por 10 min con  $^3\text{H}$ -hipoxantina marcada radiactivamente. Posteriormente las células se enjuagaron con buffer frío por 5, 10, 15 y 20 min para medir el escape de  $^3\text{H}$ -hipoxantina de las células a pH 4,5 ( $\bullet$  AZG1) y pH 7 ( $\circ$  AZG2). Los resultados se expresan como porcentaje del  $t_0$ . Los valores de los gráficos muestran la media  $\pm$  DS de al menos tres experimentos independientes. Schumacher y Winklbauer, datos no publicados.

de que se trataría de un canal selectivo, mientras que AZG1 sería un importador.

### 3.5. Antecedentes de AZG2 en plantas

El paso siguiente a la caracterización bioquímica del transporte fue describir aspectos fundamentales de los transportadores en plantas. El primer abordaje se llevó a cabo para AZG2 al estudiar su perfil de expresión. Los primeros estudios utilizando un reportero de GUS, mostraron que AZG2 tiene una expresión muy restringida a nivel tisular (no publicado, Tessi, tesina de grado, 2013, Universidad Nacional de Córdoba). AZG2 se expresa en un grupo de células rodeando los primordios de RL, estando presente desde el primer estadio hasta la emergencia de la nueva RL (Figura 8A). A continuación, los estudios de inducción de la expresión demostraron que AZG2 se induce fuertemente por auxinas (Figura 8B), lo que junto con su capacidad de transportar CK sugiere algún tipo de regulación cruzada entre estas dos hormonas. Esto, junto con la localización tan particular y acotada permitió hipotetizar sobre una potencial función durante la regulación del desarrollo radical. Por ello se estudiaron las líneas mutantes de AZG2 para comparar la determinación de la arquitectura radical. Las líneas *KO* presentaron mayor densidad de RL que el *Wt* mientras que en ciertas condiciones nutricionales los *SE* presentan menos que el *Wt* (Figura 8C). Es interesante notar también que la diferencia entre los fenotipos se exagera cuando las plántulas crecen en presencia de CK en el medio (Figura 8D). Estos datos representan la primera evidencia de la importancia de los transportadores AZG en el desarrollo de plantas. Una profundización de esta caracterización junto con nuevos abordajes serán presentados





**Figura 8. Expresión de AZG2 y caracterización fenotípica** (A) Expresión del reportero AZG2<sub>pro</sub>:GUS en distintos estadios del desarrollo de primordios de RL. (B) Inducción de la expresión de AZG2<sub>pro</sub>:GUS tras la incubación de plántulas en auxinas (+NAA) por 0, 3, 6, 12 y 24 horas. (C) Densidad de RL en líneas mutantes de AZG2 en MS 0,5x sin nitrógeno + 5 mM de KNO<sub>3</sub>. (D) Densidad de RL en líneas mutantes de AZG2 en presencia de CK (0,2 μM tZ). Los gráficos muestran la media ± E.E.. Las barras de escala representan 100 mm. Tessi, datos no publicados.

en este trabajo.

## 4. Hipótesis y objetivos

Partiendo del conocimiento con el que contábamos de los transportadores AZG, propusimos que tanto AZG1 como AZG2 tienen un rol en la regulación del desarrollo radical al intervenir en la distribución de CK en la planta. En el presente trabajo se estudió la evolución molecular de esta familia así como la importancia de los transportadores AZG en plantas.

Para poder abordar la propuesta, el primer objetivo fue estudiar la evolución molecular de la familia de transportadores. Si bien se conocían proteínas relacionadas en bacterias, hongos y plantas superiores, el interés de este trabajo fue poner el foco en cómo se diversificó la familia AZG en este último grupo. Para ello se tomaron como referencia otras familias génicas de moléculas implicadas en la señalización hormonal, como receptores, factores de transcripción u otros transportadores. Más aún, un análisis en profundidad de las secuencias permitió avanzar en la descripción de esta familia de transportadores, ya que hasta el momento no se contaba con motivos específicos o secuencias conservadas descritas que nos permitieran establecer homologías entre proteínas y determinar las regiones clave para su funcionalidad.

En segundo lugar, se apuntó a estudiar la posible interacción de los transportadores con otras proteínas del mecanismo de señalización de dos componentes, así como con sí mismas. La posibilidad de que los transportadores interactúen con los receptores o con las fosfotransferasas podría agregar un nuevo nivel de complejidad a la vía de señalización. Por otro lado, el estudio de la homo- y heterooligomerización permitió no sólo aportar información acerca de cómo actúan los transportadores sino también de la topología de la proteína, pudiendo establecer la orientación de los extremos amino y carboxilo terminales.

En trabajos anteriores, conocer la expresión de AZG2 ha permitido enfocar los esfuerzos de la caracterización de las líneas mutantes en procesos específicos como la emergencia de RL. Este punto era una faltante en la caracterización de AZG1, por lo que la meta fue describir de forma precisa su expresión así como la influencia de otros factores sobre esta. Contando con esta información se indagó en qué procesos del desarrollo AZG1 podía estar involucrado. Por otro lado, se complementó la descripción de la expresión de AZG2 y se continuó con el estudio de su importancia en la determinación de la arquitectura radical. Si bien se conocen diversos mecanismos regulatorios, poco se sabía acerca de la participación de CK en los OLT, el principal dominio de expresión de AZG2.

A continuación se buscó posicionar ambos transportadores en el contexto de las correspondientes vías de señalización. En primer lugar sería fundamental conocer a qué nivel actúan y bajo la influencia de qué factores. Para ello decidió estudiar qué miembros aguas arriba y abajo de las cascadas de señalización estaban invo-

lucrados. Conocer el lugar que ocupan los transportadores dentro de cada vía nos ayudó a comprender mejor su función y en consecuencia poder hipotetizar sobre los mecanismos aguas abajo y su importancia fisiológica.

Por último, para poder determinar qué lugar ocupan los transportadores AZG en un modelo molecular de señalización es fundamental conocer su localización subcelular. Como ya se mencionó se debe tener en cuenta la actual discusión que existe acerca del lugar de inicio de la señalización de CK, que concierne especialmente a la localización de los receptores AHK. Los resultados obtenidos, junto con la caracterización precedente, puestos en contexto con el conocimiento actual en el área, lograron asignar un rol a cada uno de los transportadores en la señalización por CK durante el desarrollo de la planta y sumar nuevas evidencias al área de estudio que permitan esclarecer los puntos todavía oscuros.

---

Parte II  
**Resultados**



# Capítulo 1

## 5. Evolución Molecular

La familia de transportadores AZG se encuentra representada en diversos clados. Se han encontrado proteínas relacionadas en bacterias, hongos y plantas. Sin embargo, debido al poco conocimiento que existe hasta el momento sobre esta familia, en muchos casos resulta difícil establecer homología entre proteínas. En este trabajo nos enfocaremos en el estudio de la evolución de la familia AZG en plantas. Para ello, en primer lugar se realizó un árbol filogenético en busca de secuencias relacionadas dentro del clado Viridiplantae. Este clado contempla las algas verdes Clorofitas y Carofitas y las plantas terrestres o Embriofitas (Ruhfel et al., 2014). La razón por la cual se eligió este grupo reside en que contempla la aparición de los sistemas hormonales de plantas (Wang et al., 2015), lo que nos permitirá contrastar la evolución de los mecanismos de señalización de CK con la de la familia AZG.

### 5.1. Filogenia

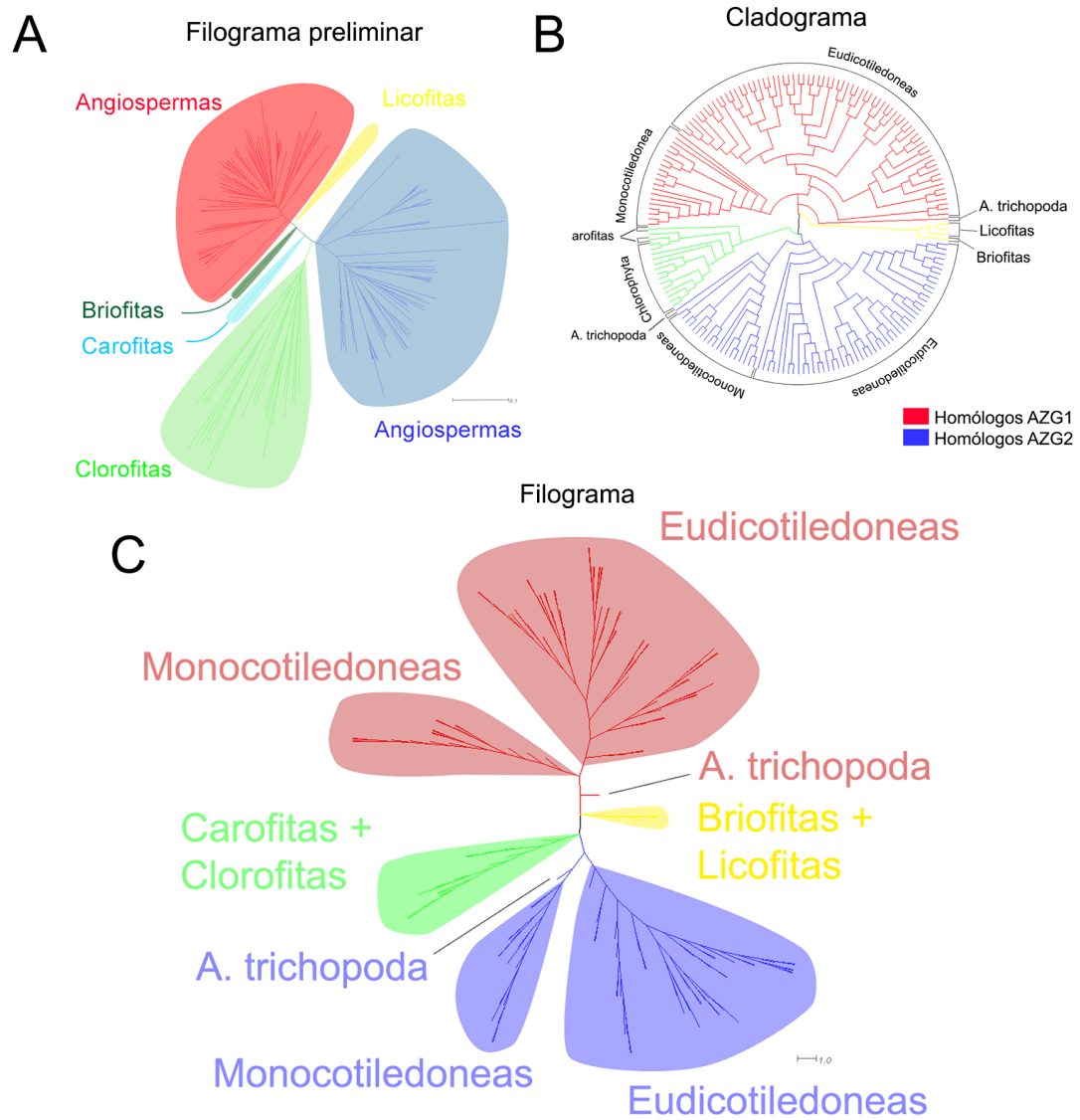
El uso de herramientas bioinformáticas permite realizar acercamientos a nivel molecular más precisos y nos ayuda a contrastar nuestra hipótesis en un contexto evolutivo. En este sentido, se estudió la evolución de la familia de transportadores AZG, usando como punto de referencia la evolución de los miembros moleculares del mecanismo de señalización hormonal de CK del que hipotetizamos, forman parte. La posibilidad de contar con las secuencias genómicas de un gran número de organismos, especialmente de aquellos de mayor relevancia evolutiva hace posible la comparación de secuencias y la búsqueda de genes homólogos en cada uno de estos organismos (Rensing, 2017). Esto nos permite rastrear los orígenes de las familias génicas, su diversificación, la conservación o la aparición de dominios específicos, etcétera.

El primer paso para reconstruir la historia evolutiva de una familia génica

es la obtención de las secuencias génicas que la integran. Para ello se hizo un primer acercamiento mediante BLASTp utilizando la secuencia de AZG1 como señuelo en el clado Viridiplantae (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias aminoacídicas obtenidas fueron alineadas con MAFFT y depuradas manualmente (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>; Katoh et al., 2017). Para maximizar la precisión de la búsqueda y evitar la inclusión de secuencias no relacionadas, las secuencias fueron preliminarmente agrupadas en tres grupos usando ClustalW2 (Figura 9A; Larkin et al., 2007). Estos grupos denominados AZG1 (ortólogos de *AtAzg1*), AZG2 (ortólogos de *AtAzg2*) y AZGA (AZGs ancestrales; incluye los ortólogos Carófitas, Clorófitas, Briófitas y Licófitas) fueron utilizados como juego de entrenamiento para HMMER (<http://hmmer.org/>; Eddy, 1998), un software que permite calcular matrices de sustitución de aminoácidos, específicas para cada uno de los grupos. Con estas matrices se realizó nuevamente la búsqueda de secuencias en la misma base de datos y se repitió el proceso hasta que se estabilizó la aparición de nuevas secuencias. Las secuencias resultantes de la búsqueda se alinearon nuevamente y se corrigieron los alineamientos manualmente. Este último alineamiento se utilizó para la construcción de un árbol filogenético definitivo en MEGA7 (Figuras 9B y 9C; Kumar et al., 2015). Un análisis general de este árbol nos permite observar que los miembros de la familia se agrupan en cuatro clados definidos; 1) algas Clorófitas y Carófitas (verde); 2) plantas inferiores (Briófitas y Licófitas - amarillo); 3) homólogos de AZG1 en Angiospermas (rojo); 4) homólogos de AZG2 en Angiospermas (azul). Este árbol se utilizará como base para la interpretación de la historia evolutiva de esta familia de transportadores.

## 5.2. Sitios informativos de grupos

Como se mencionó antes, AZG es una familia con representantes en bacterias, hongos y plantas, por lo que es de esperar que la familia tenga también ortólogos en Carófitas, ancestros de plantas superiores. Sin embargo, a lo largo de la evolución las familias génicas pueden diversificarse y adquirir funciones diferentes a aquellas llevadas a cabo por el gen ancestral. Para poder profundizar en el análisis de cómo las secuencias de la familia AZG han evolucionado y cómo esto puede estar ligado a cambios en su actividad, es necesario contar con sitios dentro de las secuencias que sean informativos para cada uno de los grupos establecidos. Es decir, sitios que están conservados dentro de cada grupo pero que varían entre ellos. Debido al reducido número de grupos que se detectaron dentro de la familia, no se han podido utilizar los algoritmos de SDPFox o Mystic, que nos permite encontrar sitios o columnas del alineamiento que aporten información específica de cada grupo. Más allá de ello, en el alineamiento múltiple de secuencias se pueden advertir claramente dos regiones variables comparando los miembros pertenecientes al grupo AZG1 con los de AZG2. Las regiones se denominaron **Región A** (aa80-aa120; aa: Número



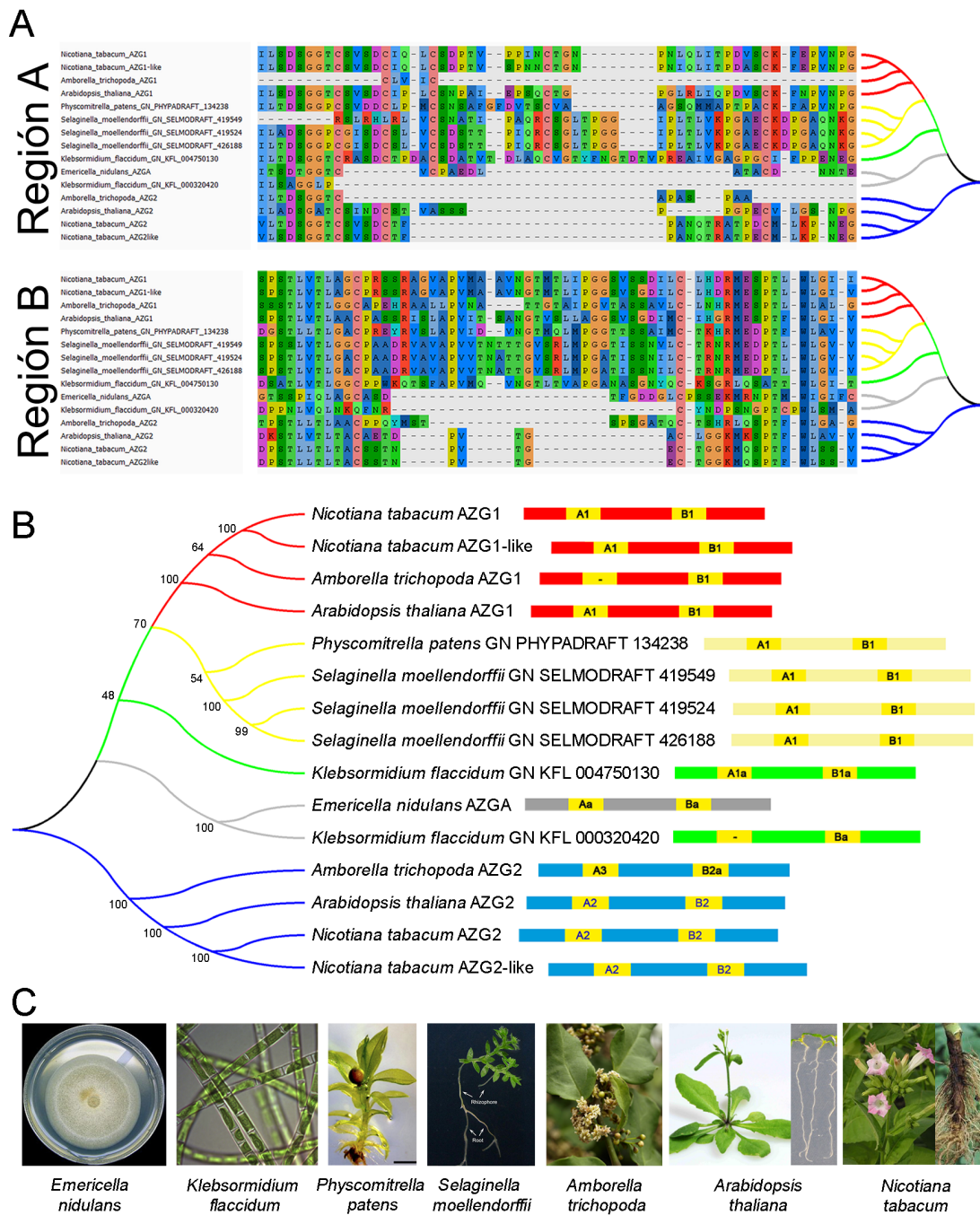
**Figura 9.** Agrupamiento de secuencias proteicas de la familia AZG en el clado *Viridiplantae*. (A) Árbol preliminar generado con *ClustalW2* utilizado como juego de entrenamiento para el algoritmo de *HMMER*. (B y C) Cladograma y Filograma definitivos generado mediante el búsqueda de secuencias con *HMMER* (*Neighbour Joining*; 1000bs). Los grupos en nubes y colores indican los clados detectados y utilizados para cada estudio.



de aminoácido en referencia a la secuencia de *AtAzg1*) y **Región B** (aa250-aa287; Figura 10A). Por el contrario, fuera de estas dos regiones, las secuencias poseen un alto grado de similitud en todos los grupos, sugiriendo que no estarían vinculadas con las diferencias funcionales, sino más bien relacionadas a cuestiones estructurales. Inferir la diversificación de estas regiones nos aporta valiosa información acerca de cómo se evolucionó la familia hasta llegar a su estado más derivado en plantas superiores. Como punto de partida en este análisis se incluyó una versión ancestral, AZGA de *Emericella nidulans*, la cual posee su capacidad de transportar purinas. Las regiones A y B se clasificaron según su similitud a *AtAZG1* (1), *AtAZG2* (2), *EnAZGA* (a) y versiones novedosas (3). Por lo tanto *E. nidulans* presenta dos versiones ancestrales, Aa y Ba (Figura 10B). Una versión también ancestral de la región B (Ba) está presente en uno de los genes de Carófitas rescatados por el análisis (*Klebsormidium flaccidum*\_GN\_KFL\_000320420 - de aquí en adelante *KfAzgA*). Sin embargo este gen presenta una delección completa de la región A. Por otro lado, el segundo gen de Carófitas, (*Klebsormidium flaccidum*\_GN\_KFL\_004750130 - de aquí en adelante *KfAzg1*) resulta especialmente interesante, ya que cuenta con una posible inserción en la región A de características similares a las versiones derivadas de AZG1. Esto nos permite especular que se trataría de su ancestro directo y por su carácter intermedio se lo denominó esta región A1a. La misma observación es válida para la región B, por lo que también se la denominó B1a. Las variaciones en esta secuencia se estabilizan en los dos próximos escalones evolutivos, Briofitas y Licofitas. En estos dos clados, los genes presentan regiones de alta similitud con AZG1 de Angiospermas, por lo que las regiones se denominaron A1 y B1. A continuación, se observa el primer paso en la polarización dentro de la familia, que corresponde a Angiospermas primitivas, específicamente a *Amborella trichopoda*. En esta especie si bien se observa por primera vez un ortólogo del gen AZG2 de *Arabidopsis thaliana* las regiones A y B son particulares. El ortólogo de AZG1 carece de la región A, aunque presenta una región B similar a las de Angiospermas derivadas (B1). Por otro lado, el ortólogo de AZG2 presenta una versión particular de la región A, denominada por lo tanto A3. Sin embargo, la región B sí representaría el primer ancestro de la región B de AZG2, y por lo tanto denominada B2a. Finalmente ambas regiones de los ortólogos llegan al estado más derivado en Angiospermas como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, estableciendo las regiones denominadas A2 y B2.

### 5.3. Identificación de nuevas variantes de AZG

La posibilidad de contar con un alineamiento de los ortólogos disponibles de AZGs nos permite observar la aparición de delecciones o inserciones con claridad. Enfocándonos nuevamente en la región A, podemos observar que existen dos grupos de secuencias con delecciones similares (Figura 11A). En detalle se puede notar



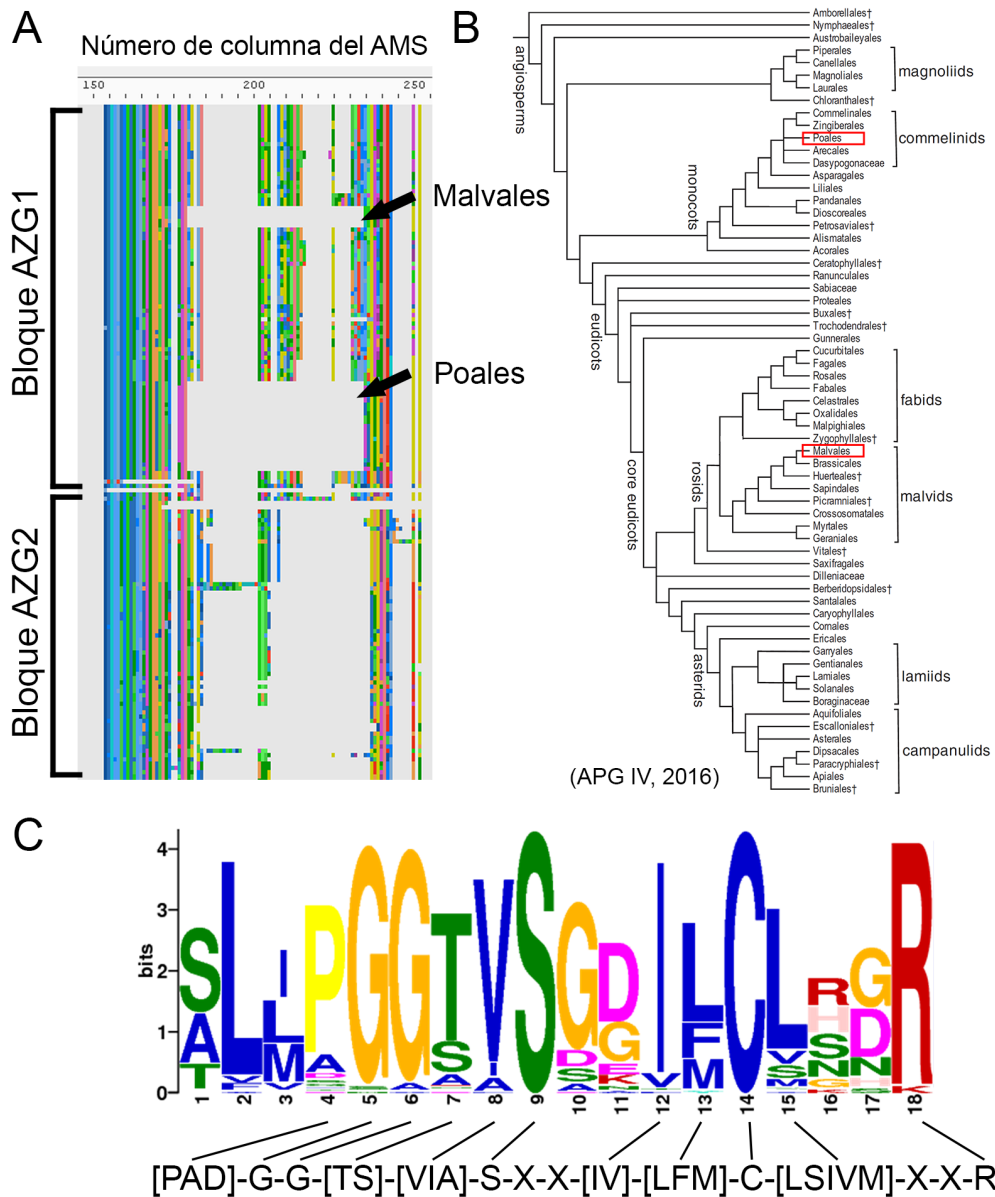
**Figura 10. Análisis de regiones específicas en proteínas de la familia AZG. (A)** Alineamiento de secuencias de relevancia evolutiva. La región A corresponde a las posiciones 62 a 138 del alineamiento y la región B 290 a 352. **(B)** Filograma de las secuencias de relevancia evolutiva mostrando la clasificación de regiones A y B según su similitud a AZG1 (1), AZG2 (2), AZGs ancestrales (a) o novedosas (3). (Maximum Likelihood method; 100bs). **(C)** Imágenes representativas de las especies de relevancia evolutiva utilizadas en el análisis.

que son proteínas que si bien tienen una región B homóloga a la de AZG1 y se ordenan dentro de este grupo en el MSA, presentan una delección completa de la región A, mostrando alguna similitud con la región A de AZG2. Curiosamente los dos grupos mencionados corresponden a los órdenes de Angiospermas Malvales y Poales. Esto resulta especialmente interesante, ya que son grupos evolutivamente distantes dentro de Angiospermas (Figura 11B; Sennikov et al., 2016) y en el alineamiento se observan secuencias de grupos intermedios que no presentan dicha delección. Esto permite especular que se trataría de una delección convergente, que podría influir determinadamente en la actividad de la proteína.

#### 5.4. Búsqueda de motivos específicos

La evolución puede llevar a que dos genes con origen común diverjan significativamente en su secuencia, aunque mantengan la misma función biológica. El justificativo de este fenómeno se encuentra en que a nivel de secuencia proteica, las regiones o aminoácidos puntuales importantes para cumplir determinada función se conservan a lo largo de la evolución (tanto en secuencia como en estructura), fenómeno conocido como restricción funcional o “*functional constraint*” (Andreeva and Murzin, 2006; Worth et al., 2009). Por ello, la obtención de patrones o motivos de secuencia conservados es una herramienta útil. Se trata de secuencias de alrededor de 20 aminoácidos que funcionan como una huella digital de cierta función. Estos motivos nos brindan poder predictivo para relacionar una proteína a determinada función o característica (ATP-binding cassette, CHASE domain, etcétera), la posibilidad de establecer relaciones entre genes o proteínas que han divergido en el resto de la secuencia así como encontrar análogos funcionales (e.g. leghemoglobina y hemoglobina). Normalmente estas secuencias corresponden a sitios catalíticos, sitios de unión a grupos prostéticos, de unión a un ion metálico, cisteínas involucradas en uniones disulfuro o regiones de interacción con otras moléculas (Sigrist, 2002).

PROSITE es un recurso en el que se encuentran los motivos proteicos ya descritos en la bibliografía, y nos permite indagar sobre si nuestras proteínas de interés presentan alguno de ellos (Sigrist et al., 2013). En primer lugar, se realizó esta búsqueda para AtAZG1 y AtAZG2 pero sólo se encontraron motivos de alta probabilidad de ocurrencia como sitios de fosforilación o miristoilación. Para poder establecer motivos propios de la familia, y posiblemente motivos específicos de cada grupo, se estudió la ocurrencia de motivos mediante MEME (Bailey et al., 2009). Si bien los primeros sitios obtenidos se tratan de sitios comunes a todos los grupos y poco informativos, ampliando la búsqueda se pudo encontrar un motivo específico del grupo AZG1 (Figura 11C). El motivo pertenece a la región B de la proteína y tiene un largo de 15 aminoácidos. Presenta sitios de aminoácidos únicos, así como sitios que pueden ser ocupados por un pequeño subgrupo



**Figura 11.** Análisis del alineamiento múltiple de secuencias (AMS) del clado Viridiplantae y reconocimiento de motivos específicos. (A) Región A del AMS. Se puede advertir las diferencias entre el los bloques que comprenden las secuencias AZG1 y AZG2 y dentro del primero dos deleciones correspondientes a especies de los órdenes Malvales y Poales. (B) Cladograma de órdenes y familias de Angiospermas (APGIV 2016; Sennikov et al., 2016), resaltando en rojo las lejanía de los órdenes Malvales y Poales. (C) Logo de secuencia aminoacídica correspondiente a la región A del bloque AZG1 generado mediante MEME suite (Bailey et al., 2009).

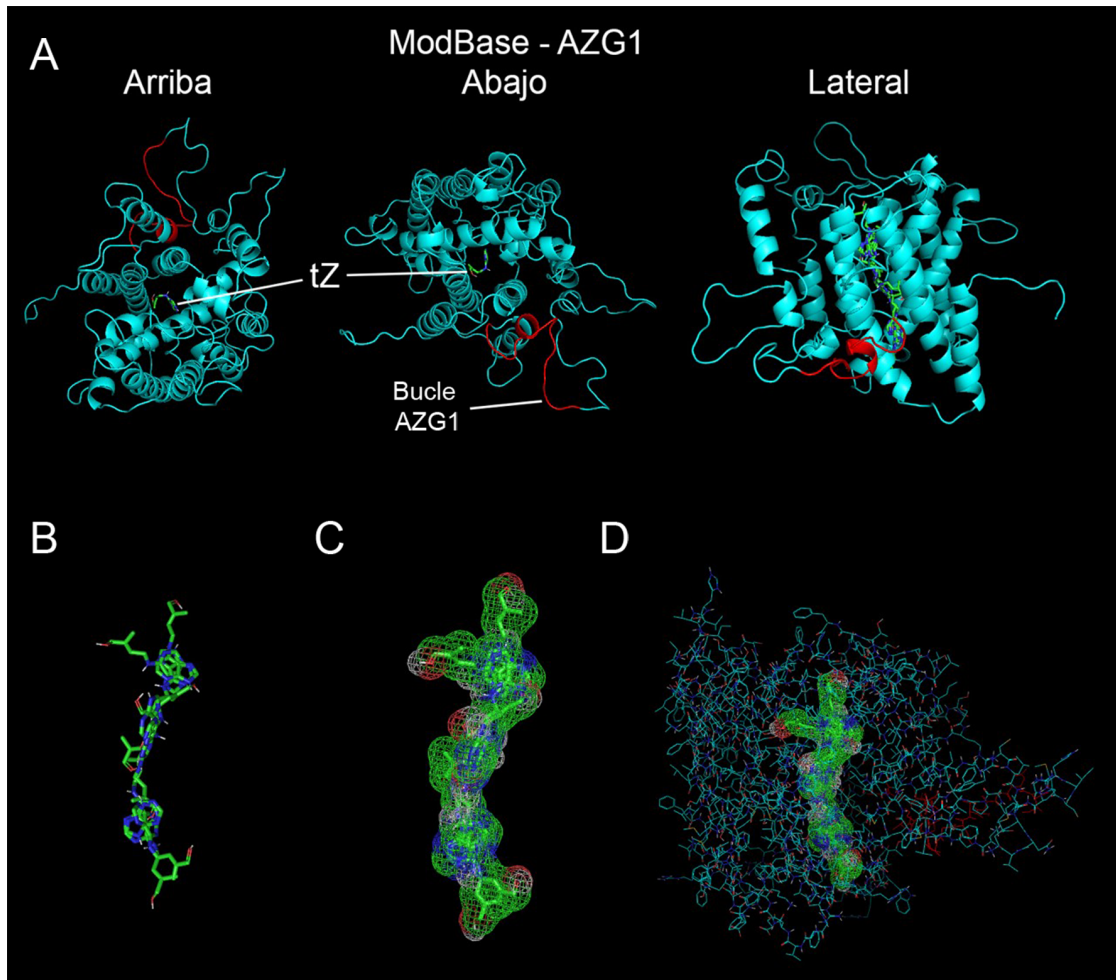
de aminoácidos (de características similares, e.g. apolares) y fue establecido como [PAD]-G-G-[TS]-[VIA]-S-X-X-[IV]-[LFM]-C-[LSIVM]-X-X-R.

Para corroborar que el motivo es útil para discriminar dentro de la familia AZG a los miembros de AZG1, se realizó una búsqueda con BLAST. Se utilizó la secuencia aminoacídica de AtAZG1 como referencia y el algoritmo de “Pattern Hit Initiated BLAST” cargando el motivo obtenido (PHI-BLAST). Como control se realizó una búsqueda con los mismos parámetros, pero con el algoritmo de BLASTp (es decir sin discriminar por un motivo específico). Mientras que en el control se recuperaron 491 secuencias, de las cuales 191 corresponderían a homólogos de *AtAzg1* y 131 a homólogos de *AtAzg2*, mediante el uso del motivo específico de grupo se recuperaron 130 homólogos de AZG1 y ningún miembro del grupo AZG2 u otro grupo. Si bien la búsqueda, puede resultar en una pérdida de sensibilidad, la especificidad demostró ser mucho mayor. Una vez generado un grupo específico de miembros de la familia AZG1, se puede continuar con otros métodos bioinformáticos que mantendrán la especificidad y mejorarán la sensibilidad. Un ejemplo de esto es el uso de HMMER, tal como se implementó en este trabajo en la minería de datos descrita anteriormente (Sección 5.1).

## 5.5. Modelado computacional de la estructura tridimensional

Durante los últimos años la disponibilidad de estructuras proteicas determinadas experimentalmente ha incrementado significativamente. La existencia de repositorios de acceso abierto permite contar con estas estructuras para realizar análisis comparativos. Ya que la determinación experimental se trata de un proceso complejo, de gran consumo de tiempo y recursos, los análisis comparativos surgen como una opción prometedora para poder estimar estructuras de proteínas relacionadas. De esta forma ModBase, busca las estructuras más cercanas a nuestra proteína de interés, alinea sus secuencias en base a los cuales crea una nueva estructura proteica estimada, la cual también se encarga de evaluar (Pieper et al., 2014). Esto resulta especialmente interesante al intentar estudiar proteínas integrales de membrana como los transportadores AZG, aunque también como contracara, resulta difícil encontrar estructuras cercanas a nuestra proteína de interés.

En ModBase, podemos encontrar disponible la estimación de la estructura de AtAZG1. Se trata de una reconstrucción parcial que abarca desde el aminoácido 131 al 534 (largo total: 579aa). La estimación está creada en base a la estructura del transportador de uracilo de *Escherichia coli* UraA (Figura 12A). Para determinar si la estructura estimada por ModBase es compatible con la función biológica de AtAZG1, se estudió mediante programas de docking (Autodock y Vina) la compatibilidad con su sustrato (Morris et al., 2009; Trott and Olson, 2010). Para



**Figura 12.** Modelado tridimensional de AZG1. (A) Vista superior inferior y lateral de la reconstrucción tridimensional de AZG1 mediante ModBase. Se incluye en la estructura una de las posibles configuraciones válidas para la CK trans Zeatina (tZ) en el canal de la proteína. En rojo se resalta el bucle específico de AZG1 correspondiente a la región A de la proteína. (B-D) Disposición de todas las configuraciones posibles para tZ dentro del canal de la proteína mostrando su (B) estructura simplificada (C) su volumen molecular y (D) este último dispuesto dentro de la estructura simplificada de la proteína.

ello se obtuvo la estructura tridimensional de trans-Zeatina (tZ) de PubChem y posteriormente se creó en Autodock un espacio de búsqueda, donde se ajustan los posibles lugares en los que el sustrato encaja dentro de la proteína. A continuación, con Vina se rescataron nueve posiciones espaciales en las que tZ puede ubicarse dentro de la proteína. Superponiendo en el espacio las nueve posiciones posibles, se puede advertir que forman un canal a lo largo de la proteína que permitiría al sustrato atravesar el transportador y por lo tanto las membranas en la que se

encuentre. Este punto sugiere que la estructura respetaría la función de AtAZG1 en plantas como transportador de tZ (Figura 12B).

El próximo paso fue determinar dónde se encontraría el dominio conservado descrito anteriormente como motivo específico de AZG1 dentro de la estructura tridimensional. Como se observa en la figura 12A, resaltado en rojo, este dominio se encontraría en la periferia de la proteína y no en el canal, sugiriendo que no estaría relacionado con la interacción con el sustrato, sino que podría tratarse de un sitio regulatorio o de asociación con otras moléculas o proteínas. Sin embargo, como se mencionó antes, la estimación de esta estructura no es completa y fue hecha en relación a una proteína de baja identidad (21 % de identidad). Debido a esto, las conclusiones sobre este punto deben ser interpretadas como un primer acercamiento para posteriores estudios en los que se pueda usar esta información como referencia (estudios de mutagénesis dirigida, fusión intramolecular de reporteros o epítope, etc.).

## 6. Discusión - Capítulo I

Contar con un árbol filogenético de la familia AZG nos ayuda a reconstruir su historia evolutiva y a responder preguntas sobre el origen y la diversificación de la familia cómo ¿Dónde aparecen los primeros homólogos a los AZG de *A. thaliana*? ¿Cuándo comienza la diversificación de la familia génica? ¿Tiene sentido la diversificación de la familia comparándola con el establecimiento de los sistemas hormonales? ¿Tiene algún significado evolutivo la aparición de nuevas variantes?

En primer lugar, de la minería de datos rescatamos dos miembros de AZG de Carofitas, las algas de las cuales derivan las plantas superiores. El estudio de regiones específicas nos permitió inferir que uno de estos dos genes, denominado en este trabajo *KfAzg1* sería el ancestro común de los *Azgs* presentes en Angiospermas. Tomando como referencia las familias pertenecientes a las señalización de CK basados en el análisis de Wang et al. 2015, resulta de especial importancia ya que la aparición del sistema de señalización por CK se consolida a partir de este punto, tanto en percepción, transmisión de la señal, regulación de la expresión génica y posiblemente transporte.

La aparición de las regiones A y B que se observa en *KfAzg1*, al menos en comparación con el gen de *E. nidulans*, *EnAzgA*, permite especular que esta versión haya sido seleccionada al conferir alguna diferenciación funcional en la actividad de la proteína. Estos fragmentos de secuencia probablemente hayan sido el sustrato sobre el cual se seleccionaron las diferentes variantes a lo largo de la evolución, tanto en plantas inferiores como superiores.

Un paso más adelante en la evolución, durante el proceso de colonización terrestre, encontramos a los musgos o Briofitas. En el genoma de *Physcomitrella patens*, se rescató un único miembro de AZGs, cuya secuencia muestra características intermedias entre las versiones de algas y plantas superiores. En Licofitas se observa un aumento en la diversidad de AZGs con un total de tres genes rescatados por el análisis. Estos genes no presentan gran diferenciación en sus secuencias por lo que se agrupan en un mismo clado, junto al representante de Briofitas sugiriendo que se trata de una diversificación reciente. Particularmente en Licófitas, punto en el cual las plantas conquistaron definitivamente la tierra, el desarrollo de la raíz resultó evolutivamente relevante, ya que es el órgano destinado a proporcionar anclaje, obtención de agua y nutrientes. Considerando que se ha demostrado



previamente que AZG2 tiene un rol en el desarrollo radical, la diversificación de los genes de la familia AZG podría estar relacionada con la emergente necesidad de regular la arquitectura de este órgano. Aunque la aparición del órgano radical en *S. moellendorfi* se cree que se trataría de un evento independiente al que generará posteriormente las raíces de Angiospermas, se determinó que ambas comparten las bases genéticas del desarrollo (Huang, 2015). Específicamente, *S. moellendorfi* presenta tres variantes de AZG, todas de características similares. Tomando como referencia los miembros de la vía de señalización de CK esto resulta excepcional ya que considerando un ancestro (*P. patens*) y un derivado (*A. thaliana*), *S. moellendorfi* en todos los casos presenta un menor número de representantes por familia génica en comparación con Angiospermas excepto para AZGs (Tabla 1).

Posteriormente a Licófitas, se observa una clara polarización de la familia génica en dos grupos. Se trata por un lado de los homólogos de AZG1 y por el otro los de AZG2. Observando las variantes de *A. trichopoda*, el ancestro más primitivo de Angiospermas estudiado, notamos que sus genes ya se encuentran segregados en los clados de AZG1 y AZG2. Estas dos evidencias sugieren que la diversificación en AZG1 y AZG2 ocurre en un estadio previo, pero cercano al establecimiento de las plantas con flor y sostiene la hipótesis de que AZG2 surge como un regulador de la arquitectura radical desde sus orígenes.

De todas las Angiospermas estudiadas se observó que los genes se polarizan en dos grupos, discriminando dentro de cada uno subclados. Estos se corresponden a monocotiledóneas y eudicotiledoneas. Algunas especies cuentan con más de dos representantes, lo que coincide con eventos de duplicación genómica. Un ejemplo de este fenómeno es lo que ocurre en *Nicotiana tabacum*, una especie tetraploide, que presenta cuatro ortólogos AZGs (Wu and Tanksley, 2010). Sin embargo al tratarse

<i>Familia génica</i>	<i>Briofitas (P. patens)</i>	<i>Lycofitas (S. moellendorffii)</i>	<i>Angiospermas (A. thaliana)</i>
<i>ABCG</i>	4 (?)	2 (?)	7 (1)
<i>AHK</i>	9	2	4
<i>AHP</i>	4	2	6
<i>RR-A</i>	7	2	10
<i>RR-B</i>	5	5	7
<i>AZG</i>	1	3	2

**Tabla 1.** Componentes de la vía de señalización por CK en distintos organismos. Recuento de la cantidad de representantes de cada uno de las familias génicas más importantes de la cascada de señalización por CK. Se enumeran la cantidad de transportadores de la familia ABCG, y entre paréntesis los homólogos de ABCG14, receptores AHK, fosfo-transferasas AHP, factores de transcripción RR tipo A y B y homólogos de AZGs. Rojo: mayor número, azul: menor número.

de una duplicación de genoma completo, *N. tabacum* presenta un mayor número de representantes para todos los miembros de la vía de señalización. Además, al tratarse de una duplicación del genoma relativamente reciente (entre 0,2 millones de años; Clarkson et al., 2005; y  $\leq 1$  millón de años atrás; Wu et al., 2010) las variantes se dividen en parálogos AZG1 y AZG2, sin formar nuevos subgrupos (Schranz et al., 2012).

Por otro lado, en algunos géneros vegetales se encontraron secuencias que si bien estaban mayormente emparentadas con AZG1, presentaban un delección completa de la denominada región A de los homólogos AZG1. Esta delección se observó en Malvales y Poales, surgiendo como eventos independientes, que convergen hacia una delección de características casi idénticas. Sin embargo, existe otra diferencia entre los dos grupos. En el caso de Poales, las versiones que presentan la delección son el único ortólogo de AZG1, mientras que Malvales cuentan con una versión de AZG1, la versión delecionada y una versión homóloga a AZG2. Esto sugiere que esta nueva variante podría tener diferencias funcionales representando una novedad dentro de la familia, que podríamos denominar AZG3.

Los datos recolectados gracias al estudio de la secuencia de los transportadores AZG son una herramienta útil para futuros abordajes experimentales. Hasta el momento no se encuentran descritos motivos funcionales dentro de las secuencias, ya sean modificaciones postraduccionales, casetes con funciones específicas o sitios activos. Gracias al presente análisis, sabemos que a nivel de secuencias, la identidad de los genes estaría dada por dos regiones específicas, denominadas aquí como A y B. Así, es posible utilizar esta información para intervenir en dichas regiones mediante mutagénesis o la generación de proteínas quiméricas con el fin de estudiar su funcionalidad.

En este sentido, la descripción de los motivos específicos obtenidos mediante MEME nos permite profundizar el análisis. Este patrón, nos brinda información no sólo de un gen sino de los aminoácidos conservados en cualquier gen perteneciente al grupo, en este caso a todos los homólogos de AZG1. Ahora no sólo contamos con la información acerca de cuál sería la ubicación en la secuencia importante para la función de la proteína sino que también contamos con la preferencia de cada sitio dentro del motivo. Por ejemplo, aminoácidos con cadenas laterales apolares (13- [LFM]) o polares no cargadas (7- [TS]). Por último, estos resultados pueden ser reinterpretados según la estructura tridimensional de la proteína. Para ello, el primer paso en este sentido fue estimar la estructura de AZG1 mediante ModBase. Si bien debemos ser cautos al obtener conclusiones sobre la estimación, esta nos muestra que el motivo descrito para AZG1 estaría localizado en la periferia de la proteína, pudiendo estar relacionado con la interacción con otras proteínas, regulación por modificaciones postraduccionales, etcétera.



# Capítulo 2

## 7. Interacción Proteína-Proteína

Los antecedentes de AZGs sugieren que los transportadores podrían jugar un rol importante dentro de la vía de señalización por CK en plantas. Sin embargo, poco se sabe acerca de su importancia fisiológica. Para poder interpretar la función de AZG1 y AZG2 se estudió su relación con los miembros de dicha vía. El primer paso de la vía está a cargo de los receptores AHK, con los cuales se gatilla la señal. Se trata de proteínas integrales de membrana, por lo que podrían compartir el mismo destino subcelular con los transportadores AZG (esta discusión se retomará más adelante). La interacción de los transportadores con miembros claves de la vía de señalización podría comprender un nuevo ejemplo de una respuesta no transcripcional a fitohormonas, como ya se ha descrito por ejemplo para auxinas o ácido abscísico (Weiner et al., 2010; Chen et al., 2015). Por ello se hipotetizó sobre la posibilidad de que estos receptores o su paso siguiente en la cascada de señalización, las fosfotransferasas (AHP) interactúen directamente con los transportadores. Esta interacción podría sumar un nivel de complejidad a la vía de señalización.

Para poder responder a esta inquietud se estudió la interacción proteína-proteína mediante la metodología de Split Ubiquitin System (SUS; Grefen et al., 2009; Asseck and Grefen, 2018). Esta técnica permitió estudiar la posible interacción de AZG1 y AZG2 en levaduras con miembros de la vía de señalización de CKs cedidos gentilmente por el Dr. Harter y el Dr. Grefen (ZMBP; i.e. AHK2, AHK3, AHK4, AHP3, AHP4, AHP5 y AHP6). El método se basa en la fusión de la porción N-terminal de ubiquitina a una proteína “presa”, y la fusión de la porción C-terminal a otra proteína de interés, en este caso denominada “señuelo”. La porción N-terminal ha sido mutada para evitar la reconstitución espontánea de la ubiquitina completa, por lo que esta reconstitución sólo ocurrirá si las proteínas presa y señuelo interactúan entre sí, de manera tal que las dos subunidades de la ubiquitina se acercan suficientemente (Figura 13A; Grefen, 2014). En caso de

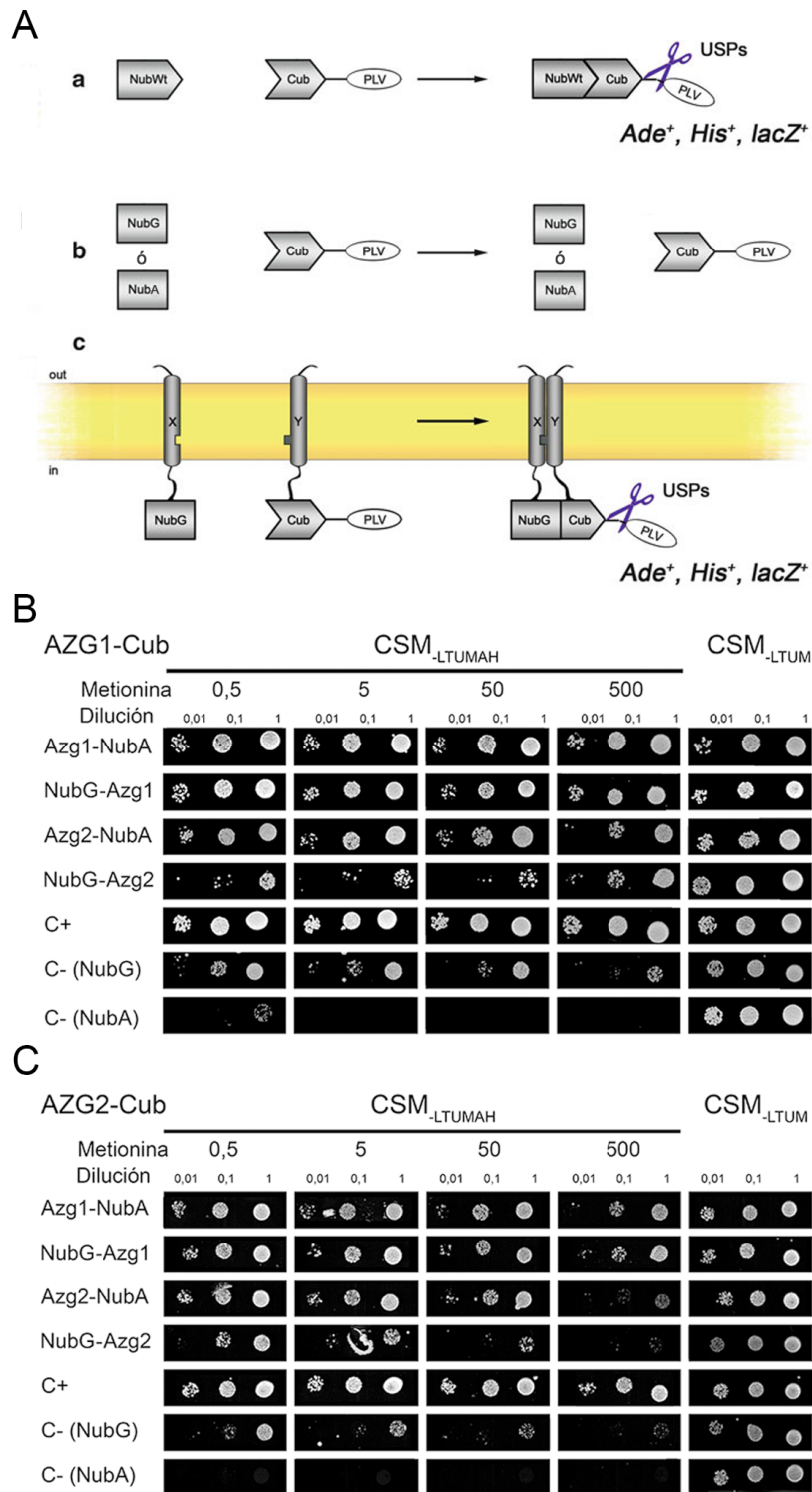
interacción y consecuente reconstitución de la ubiquitina, se produce la escisión del factor de transcripción (PLV). Este factor de transcripción activa la expresión de genes que le permitirán superar las auxotrofias a histidina y adenina de las líneas parentales resultando en crecimiento de las levaduras en condiciones restrictivas (CMS<sub>LTUMAH</sub>). Como controles del método se utiliza la versión nativa de la ubiquitina, NubWt como presa (control positivo; C+), un vector vacío con la porción N-terminal de la ubiquitina en sus dos tipos de fusión utilizadas (control negativo; C- NubA y C- NubG) y se evalúa crecimiento en condiciones no restrictivas (control de viabilidad celular; CMS<sub>LTUM</sub>). Por último, cabe mencionar que la expresión de las fusiones con el señuelo (Cub) es dirigida por un promotor reprimible por metionina. Esto permite minimizar la ocurrencia de falsos positivos en caso de que los controles negativos muestren crecimiento en condiciones restrictivas así como mejorar la relación señal/ruido. Por ello también se evaluaron concentraciones crecientes de metionina en las placas de crecimiento.

Por otro lado, la versatilidad de esta metodología permite también conocer si los transportadores son capaces de homo- y/o hetero-oligomerizar. Otro punto interesante de la técnica es que se puede inferir si los extremos N- y C-terminales de la proteína se orientan hacia el interior o el exterior celular, ya que si alguno de los componentes del sistema estuviese orientado hacia el exterior celular la interacción no ocurriría. Contar con esta información es trascendente para el diseño de fusiones con reporteros fluorescentes y la interpretación de sus resultados.

## 7.1. Homo- y hetero- oligomerización

El primer paso para el estudio de interacción fue la construcción de los vectores donde se fusionó la secuencia codificante completa de *AtAZG1* y *AtAZG2* tanto como señuelo o como presa. Se construyeron las fusiones AZG1-Cub, AZG2-Cub (señuelos) y AZG1-NubA, NubG-AZG1, AZG2-NubA y NubG-AZG2 (presas). NubA hace referencia a la fusión C-terminal de nuestra proteína de interés con la N-terminal de la ubiquitina, mientras que NubG hace referencia a la fusión C-terminal (Figura Suplementaria 1).

Usando a AZG1 como señuelo (AZG1-Cub), se pudo observar que hubo crecimiento tanto con la fusión AZG1-NubA como NubG-AZG1 (Figura 13B). Esto indica que AZG1 sería capaz de homo-oligomerizar, y que ambos extremos proteicos estarían orientados hacia el citosol. En cuanto a los cruzamientos con AZG2-NubA y NubG-AZG2 se observó una tendencia similar. Sin embargo se debe destacar que la fusión AZG2-NubA presentó un crecimiento mayor en comparación con la fusión NubG-AZG2. Esta última mostró crecimiento apenas superior al de su control negativo. Este resultado indica que AZG1 y AZG2 tendrían la capacidad de hetero-oligomerizar. No obstante, en comparación con los resultados obtenidos para AZG1, los datos no nos permiten ser concluyentes en cuanto a la orientación



*Figura 13. Continua en la próxima página*

**Figura 13. Ensayo de SUS con las secuencias completas de AZG1 y AZG2.** (A) La detección de la interacción se basa en la capacidad de reconstrucción de la ubiquitina, seguido por la separación del reportero PLV (Protein A-lexA-VP16). (a) La reconstrucción espontánea es posible cuando se utiliza la versión silvestre de la N-ubiquitina (NubWt), mientras que (b) una mutación en esta porción, (NubG o NubA) la previene. (c) Por lo tanto la unión de una NubG/A con una Cub, resultará en el reensamblamiento y la consecuente activación del reportero (USPs: proteasas específicas de ubiquitina; Tomado de Grefen, 2014). (B y C) Se evaluó la capacidad de las proteínas AZG1 y AZG2 para homodimerizar o hetero-oligomerizar. Para ello se utilizó la secuencia completa de AZG1 y AZG2. Tanto la secuencia de (B) AZG1 como la de (C) AZG2 fueron utilizados como presa y contrastados con los señuelos de ambos transportadores. La interacción se evaluó en distintas concentraciones de metionina (0,5, 5, 50, 500 mM) para evitar artefactos por los niveles de expresión y en distintas diluciones de los cultivos (1, 0,1 y 0,01) para evitar la saturación de la lectura. Como controles se evaluó la interacción de los constructos con una presa vacía (NubG y NubA), una ubiquitina silvestre (C+, NubWt) y un medio de evaluación de crecimiento de levaduras (CSM<sub>LTUM</sub>). Los círculos que denotan interacción corresponden a gotas de 4 µl sembradas en placa (Grefen, 2009; Grefen, 2012).

de los extremos N- y C- terminales de AZG2.

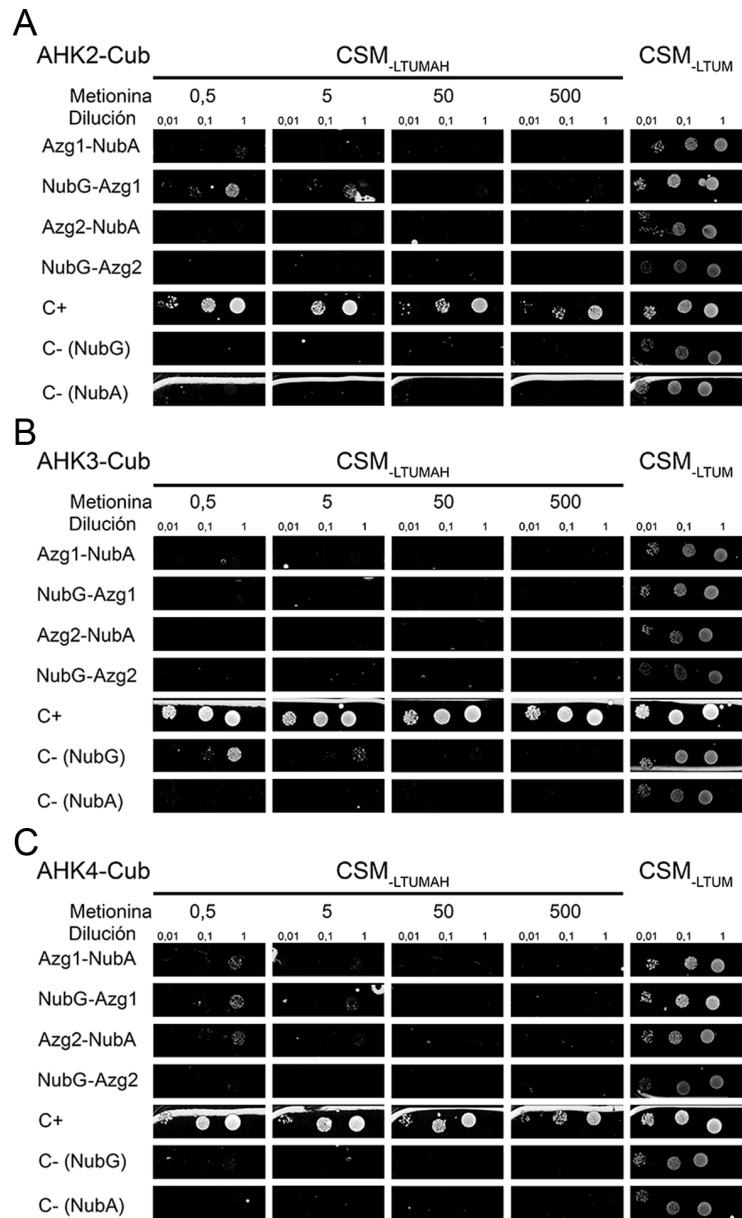
En la situación complementaria se utilizó AZG2-Cub como señuelo. En este caso los resultados fueron equivalentes. Es decir, AZG2 es capaz de interactuar con AZG1 en ambas versiones de presa ensayadas (Figura 13C). Por otro lado, en cuanto a la interacción con AZG2-NubA y NubG-AZG2, se repite lo observado en el párrafo anterior. La cruza entre AZG2-Cub y AZG2-Nub-A muestra mayor crecimiento que la interacción con NubG-AZG2. También se puede observar que el crecimiento de la combinación AZG2-Cub con NubG-AZG2 es apenas superior al del control negativo, por lo cual ambos resultados sugieren que la versión NubG-AZG2, no sería efectiva para probar interacción. Estos resultados sugieren que la porción N-terminal de AZG2 podría estar expuesta al apoplasto y no al citosol, como si los estaría el extremo C-terminal. En ambos experimentos se puede notar que los controles negativos no presentan crecimiento o este es menor al registrado en los casos de interacción. Por otro lado, tanto el control positivo con NubWt como el control de viabilidad (CMS<sub>LTUM</sub>) crecieron satisfactoriamente.

## 7.2. Interacción de AZGs con receptores de citoquininas

Gracias a la colaboración con los grupos dirigidos por el Prof. Dr. Harter y el Dr. Grefen, pudimos contar con las construcciones para SUS de distintos miembros de la cascada de señalización de CK. En primer lugar se evaluó la capacidad de AZGs de interactuar con los receptores AHK2, AHK3 y AHK4. Expresando estos receptores como señuelos en levaduras, se combinaron con las versiones de presas antes mencionadas de AZG1 y AZG2. En todos los caso el resultado de las interacciones fue negativo. Sin embargo, tanto los controles de crecimiento como

los controles positivos y negativos se comportaron según lo esperado (Figuras 14A-14C). En resumen, este resultado sugiere que los transportadores AZG1 y AZG2 no interactuarían directamente con los receptores de CK AHK2, AHK3 y AHK4.

**Figura 14.** Interacción de AZG1 y AZG2 con receptores de CK. (A-C) Estudio de la interacción de AZG1 y AZG2 (presas) con receptores de CK (A) AHK2, (B) AHK3 y (C) AHK4 (señuelos). La interacción se evaluó en distintas concentraciones de metionina (0,5, 5, 50, 500mM) y en distintas diluciones de cultivo (1, 0,1 y 0,01). Como controles se evaluó la interacción de los constructos con una presa vacía (NubG y NubA), una ubiquitina silvestre (C+, NubWt) y un medio de evaluación de crecimiento de levaduras (CSM<sub>LTUM</sub>). Los círculos que denotan interacción corresponden a gotas de 4 µl sembradas en placa.

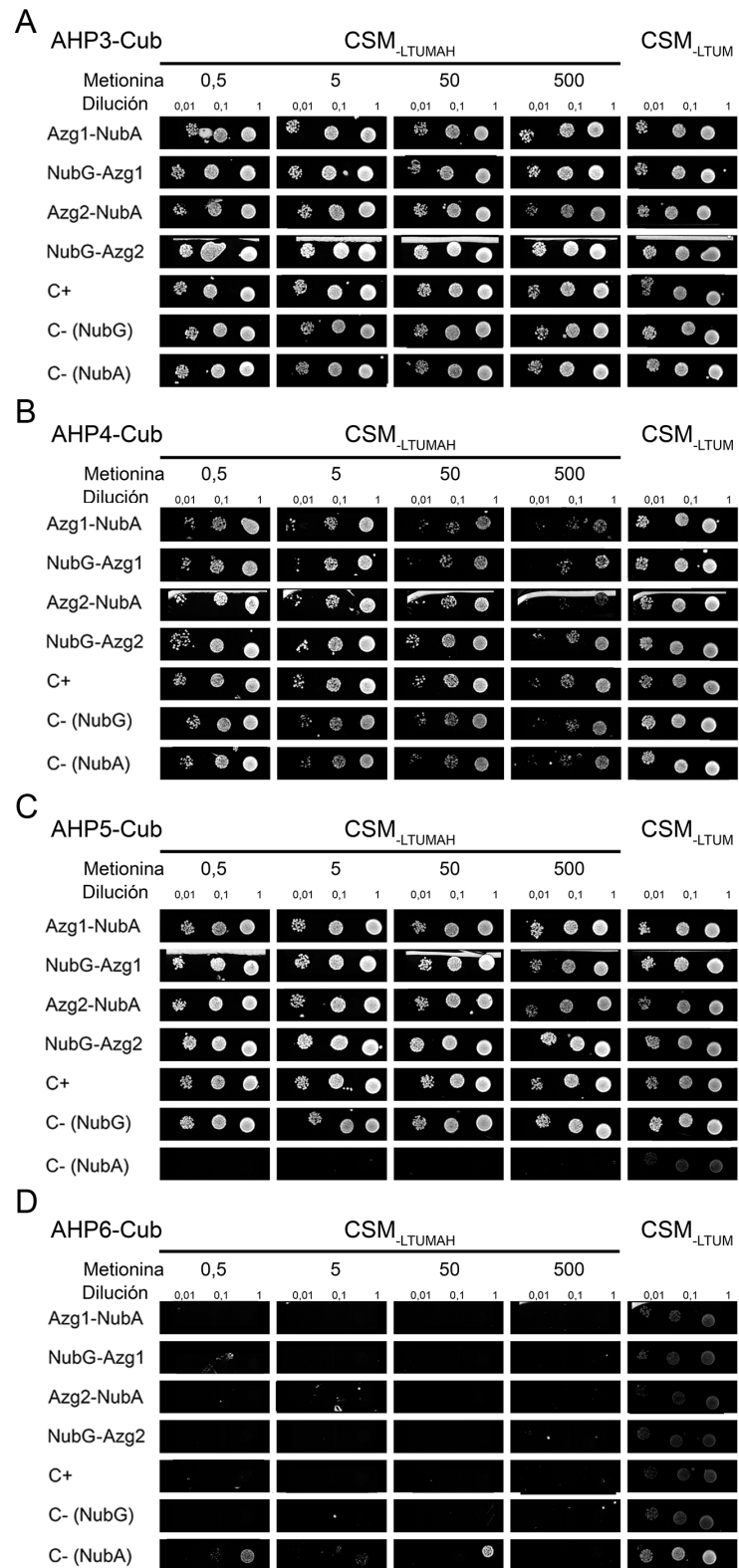




### 7.3. Interacción de AZGs con fosfotransferasas AHP

Las fosfotransferasas forman parte del sistema de dos componentes a cargo de percibir las CK en plantas. Por ello fue de interés también evaluar la posibilidad de que estas proteínas interactúen con los transportadores AZG. Como se estudió en el análisis de motivos dentro de la secuencia de los transportadores en la Sección 5.4, tanto AZG1 como AZG2 presentarían sitios de unión a fosfatos, por lo que podrían regular su actividad mediante fosforilación/desfosforilación. Las fosfotransferasas AHP3, AHP4, AHP5 y AHP6 fueron incluidas en este ensayo, ya que actúan a continuación de los receptores AHK en la transducción de señales dependiente de CK. Las cuatro proteínas fueron utilizadas como señuelos y se cruzaron con las versiones de presas de AZG1 y AZG2. Para AHP3, AHP4 y AHP5 se obtuvieron resultados similares (Figura 15). En todas las combinaciones se observó crecimiento, aunque también fueron positivos los controles negativos. Este fenómeno puede deberse a que, gracias al pequeño tamaño de las proteínas AHP, la fusión completa puede ingresar al núcleo sin la necesidad de que se libere el factor de transcripción PLV. Por otro lado la situación opuesta se observó para AHP6. En este caso no hubo crecimiento en ninguna de las cruzas, pero tampoco creció el control positivo. Por lo tanto, los resultados de este punto no son concluyentes para evaluar la interacción de las proteínas AHP con los transportadores AZG.

**Figura 15. Ensayo de interacción entre AZG1 y AZG2 con fosfotransferasas de la familia AHP. (A-D)** Estudio de la interacción de AZG1 y AZG2 (presas) con fosfotransferasas (A) AHP3, (B) AHP4, (C) AHP5, (D) AHP6 (señuelos). La interacción se evaluó en distintas concentraciones de metionina (0,5, 5, 50 y 500 mM) para evitar artefactos por los niveles de expresión y en distintas diluciones (1, 0,1 y 0,01) para evitar la saturación de la lectura. Como controles se evaluó la interacción de los constructos con una presa vacía (NubG y NubA), una ubiquitina silvestre (C+, NubWt) y un medio de evaluación de crecimiento de levaduras (CSM<sub>LTUM</sub>).



## 8. Discusión - Capítulo II

La interacción entre proteínas es vital para la vida celular. Numerosos procesos como el tráfico celular, replicación de ADN, regulación de enzimas multiméricas y distintas vías de señalización implican eventos de interacción. En el caso de los transportadores AZG, los estudios previos sugieren que pueden estar involucrados en la señalización por CK. Esto motivó al estudio de la posible interacción con distintos miembros de la cascada de señalización.

Previo al estudio de la interacción con proteínas AHK y AHP, se estudió la posibilidad de interacción entre AZG1 y AZG2 así como con sí mismos. Los resultados mostraron que ambas proteínas son capaces de homo- o hetero-oligomerizar. Más allá de la implicancia funcional que esto pueda tener nos permite sacar conclusiones sobre la estructura de las proteínas. Para que haya interacción en el sistema utilizado (SUS), es necesario que los componentes encargados de la respuesta se encuentren en el citosol. Al contar con fusiones N- y C- terminal de estos componentes, podemos especular acerca de la orientación de la proteína en la membrana. Para AZG1, todas las versiones del transportador fueron chequeadas con éxito por lo que se espera que los extremos N- y C- terminales de AZG1 se encuentren orientados hacia el citosol. Por otro lado, para AZG2 la fusión con NubG mostró un menor potencial de interacción comparado con la fusión con NubA, sugiriendo que el extremo N-terminal de AZG2 podría estar orientado hacia el apoplasto, mientras que el C-terminal estaría orientado al citosol. Esta información resulta útil para reforzar lo que conocemos acerca de su topología. Las predicciones acerca del número de pasos transmembrana para ambas proteínas están alrededor de los 9 a 13 dominios. Teniendo en cuenta este resultado, y con el supuesto de que la fusión mantiene el plegamiento nativo, mientras que para AZG2 no se puede ser concluyente, para AZG1 el universo de formaciones posibles se reduce a 10 o 12 pasos transmembrana.

Retomando la capacidad de interactuar entre AZG1 y AZG2, los resultados nos permiten proponer nuevos mecanismos de regulación de su actividad. Si bien el patrón de expresión de los transportadores no es comparable, se solapa en los tejidos circundantes a los primordios de RL, donde ya conocemos que AZG2 ejerce su actividad en raíces. Como experimento complementario a esta observación se propone repetir la caracterización del transporte de ambas proteínas en un sistema

de co-expresión.

Por otro lado, la posibilidad de interactuar tanto entre sí como consigo mismos, permite contemplar distintas estrategias. La posibilidad de agruparse le podría permitir a los transportadores evitar su degradación, brindándoles mayor estabilidad. También, al formar grupos facilitarían el reciclado de proteínas de membrana lo que permitiría cambiar rápidamente las propiedades de la bicapa en la que se localicen, aportando una mayor velocidad a los cambios en la señalización hormonal.

Por otra parte, la ausencia de interacción entre los transportadores y los receptores permite relegar la posibilidad de un mecanismo de acción rápida por activación/represión de los transportadores. Cabe destacar que la metodología permite detectar interacciones directas proteína-proteína pero en la configuración utilizada no se puede descartar la ocurrencia de interacciones puente con otra/s proteínas que medien una unión indirecta o secuencial.

Finalmente, el estudio de interacción de los transportadores con las fosfotransferasas (AHP) no fue exitosa. El bajo peso molecular de estas proteínas probablemente permitió que todo el complejo pueda ingresar al núcleo celular junto con el factor de transcripción, desencadenando la pérdida de las auxotrofias sin necesidad de dividir el péptido post-interacción. En este punto se sugiere para próximos estudios invertir la configuración de los constructos, utilizando las fosfotransferasas como presa y los transportadores como señuelo. Con el fin de robustecer las conclusiones acerca de la interacción entre AZGs, durante el proyecto se generaron construcciones para evaluar interacción mediante FRET, que si bien no pudieron ser incluidos en este trabajo, se encuentran disponibles para la continuidad del proyecto (Tabla 6).



## Capítulo 3

### 9. Rol del transportador AZG1 en la señalización hormonal

Los antecedentes indican que los transportadores AZG son capaces de transportar CK en plantas, y que estarían involucrados en la regulación de la arquitectura radical. Sin embargo, fue necesario investigar en profundidad la actividad de estos transportadores en las plantas para poder entender mejor su rol fisiológico. En este capítulo abordamos la señalización hormonal a distintos niveles. En primer lugar se intentó diseccionar el dominio de expresión de AZG1 así como los mecanismos de inducción de su expresión. Conocer estos puntos con precisión nos permitió enfocar la búsqueda de procesos en los que el transportador pueda estar involucrado. Además, los mecanismos de inducción nos pueden brindar información acerca de las complejas redes regulatorias que comprenden usualmente las hormonas. Mediante dichas aproximaciones, se estudiaron los posibles procesos fisiológicos en los que los transportadores estarían involucrados. Finalmente, se estudió la localización subcelular de AZG1, lo que nos permitió interpretar de manera más verosímil la importancia fisiológica de su actividad.

#### 9.1. AZG1 se expresa en distintos órganos y es inducido por citoquininas

De la base de datos eFP browser (Figura Suplementaria 6; Winter et al., 2007) y antecedentes basados en la detección de transcritos en distintos órganos, se conocía que AZG1 tiene una expresión generalizada, expresándose tanto en parte aérea como en la raíz. Sin embargo, los detalles de la localización tisular no se conocían hasta el momento. Para estudiar el patrón de expresión de AZG1 a nivel tisular, se construyó un vector que expresa el reportero GUS bajo el control del promotor, *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* (1,5 kb aguas arriba del inicio de la secuencia codi-

ficante). Coincidentemente con lo observado mediante RT-PCR, AZG1 se expresa ampliamente distribuido tanto en parte aérea como en la raíz (Figuras 16A-16P). Según la base de datos eFP browser, AZG1 se induciría rápidamente tras la aplicación de CK. Para su corroboración experimental, se procedió a incubar las plantas de *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* por 4 h con 0,2  $\mu$ M tZ. La incubación llevó a un claro incremento en la tinción por lo que se pudo comprobar que las CK efectivamente inducen la expresión de AZG1 (Figuras 16A-16L).

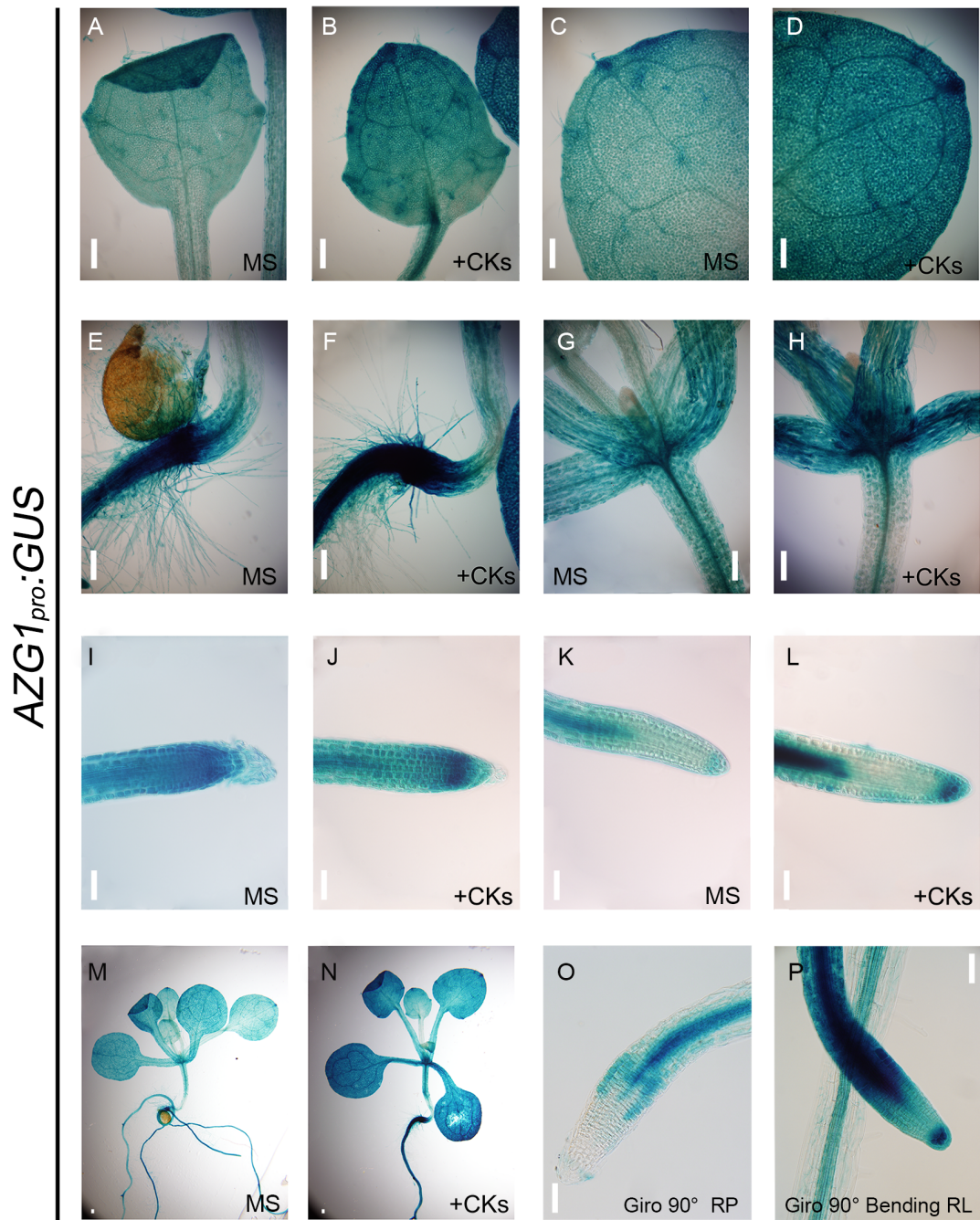
Analizando el patrón de tinción tisular de plantas transformadas con *AZG1<sub>pro</sub>:GUS*, se observaron ciertas particularidades. En primer lugar la tinción de las puntas de las raíces principales (RP), presentó un patrón diferente al que mostraron los mismos tejidos de las RL. Mientras que en las RP la tinción se extendía de manera uniforme desde la zona de elongación a la zona meristemática (Figuras 16I y 16J), en las RL la señal cae en la región meristemática y presenta un pico de mayor intensidad rodeando al centro quiescente (Figuras 16K y 16L).

En segundo lugar, ya que la percepción de la gravedad es un proceso relacionado con los balances de auxinas/CK, se evaluó la respuesta de *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* a cambios gravitrópicos. Como resultado de un cambio de 90° en la dirección del vector gravitatorio, se observó una tinción particular, diferente a la observada en la condición control (Figuras 16O y 16P). En detalle, se puede ver en ambos costados de la zona de elongación del ápice radical un aumento en la señal del reportero GUS. El patrón observado es más notable en la RP que en el ápice de RL. Las observaciones realizadas sobre la localización tisular, especialmente las particularidades recién mencionadas, fueron el punto de partida para el estudio del fenotipo de plantas mutantes en el gen *AtAzg1*.

## 9.2. Descripción del fenotipo de las líneas mutantes de AZG1

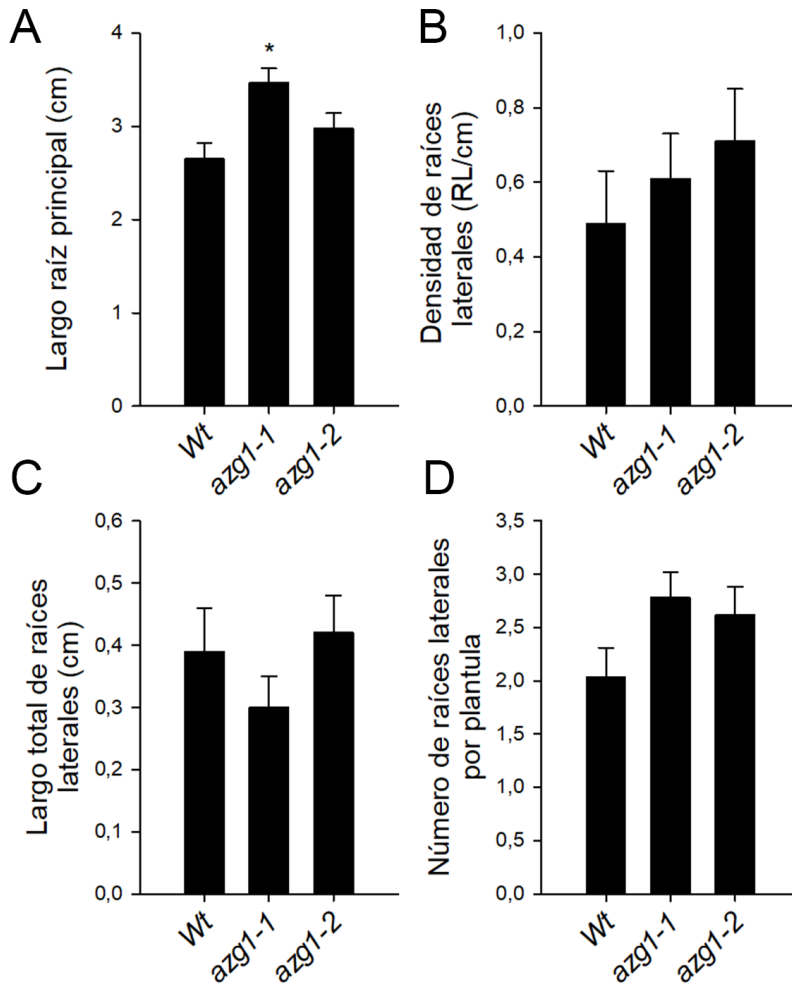
### 9.2.1. Las líneas mutantes de AZG1 no presentan diferencias morfológicas respecto a la condición silvestre

Con el fin de investigar la importancia de la actividad de AZG1 durante el desarrollo de *A. thaliana*, se estudió el fenotipo de dos líneas *KO* (*azg1-1* y *azg1-2*; ambas líneas fueron caracterizadas durante la tesis de doctorado de J. Schumacher, Universidad de Tübingen) en comparación con el ecotipo silvestre Col-0 (*Wt*). Como primera aproximación se analizaron diversos parámetros morfométricos del sistema radical tales como el largo de la raíz principal, la densidad de RL, el número neto de RL y el largo total de las RL. Si bien en el largo de la raíz principal una de las líneas *KO* mostró raíces más largas, la segunda línea analizada no mostró el mismo fenotipo, por lo que no es atribuible a la ausencia del transportador (Figura 17A). El resto de los parámetros estudiados no mostraron



**Figura 16.** Expresión de la construcción  $AZG1_{pro}:GUS$ . (A-P) Expresión del reportero  $GUS$  bajo el control del promotor de  $AZG1$  en (A-B) hoja joven, (C-D) hojas adultas, (E-F) zona de transición raíz tallo, (G-H) hipocotilo y meristema apical caulinar, (I-J) meristema apical radical (MAR), (K-L) meristema apical de la raíz lateral (MARL), (M-N) parte aérea completa y raíz, (O) MAR y (P) MARL tras giro de  $90^\circ$  en medio MS  $0,5x$  (MS) o MS  $0,5x + 0,2 \mu M tZ$  (+CKs). Barras de escala corresponden a  $100 \mu m$ .





**Figura 17.** Análisis del fenotipo de líneas KO del gen *Azg1*. (A-C) Caracterización de variables relativas a la morfología radical como (A) largo de la raíz principal, (B) densidad de RL, (C) largo total de RL y (D) número neto de RL por plántula comparando las líneas *azg1-1* y *azg1-2* en comparación con la línea silvestre (Wt). Los asteriscos corresponden a diferencias significativas según el test de análisis de la varianza. Las barra de error representan el E.E. (ANAVA;  $p < 0,05$ )

diferencias entre las líneas analizadas (Figuras 17B-17D). El fenotipo aéreo de las plantas tampoco presentó diferencias evidentes por lo que la ausencia del transportador no repercute en la morfología de las plantas tanto creciendo en maceta como en placa en condiciones standard (MS 0,5X, agar 1% , pH 5,8). Debido a esto, se estudió la participación de AZG1 en procesos puntuales, partiendo de los resultados observados sobre su expresión tisular.

### 9.2.2. AZG1 contribuiría a la identidad de las raíces laterales

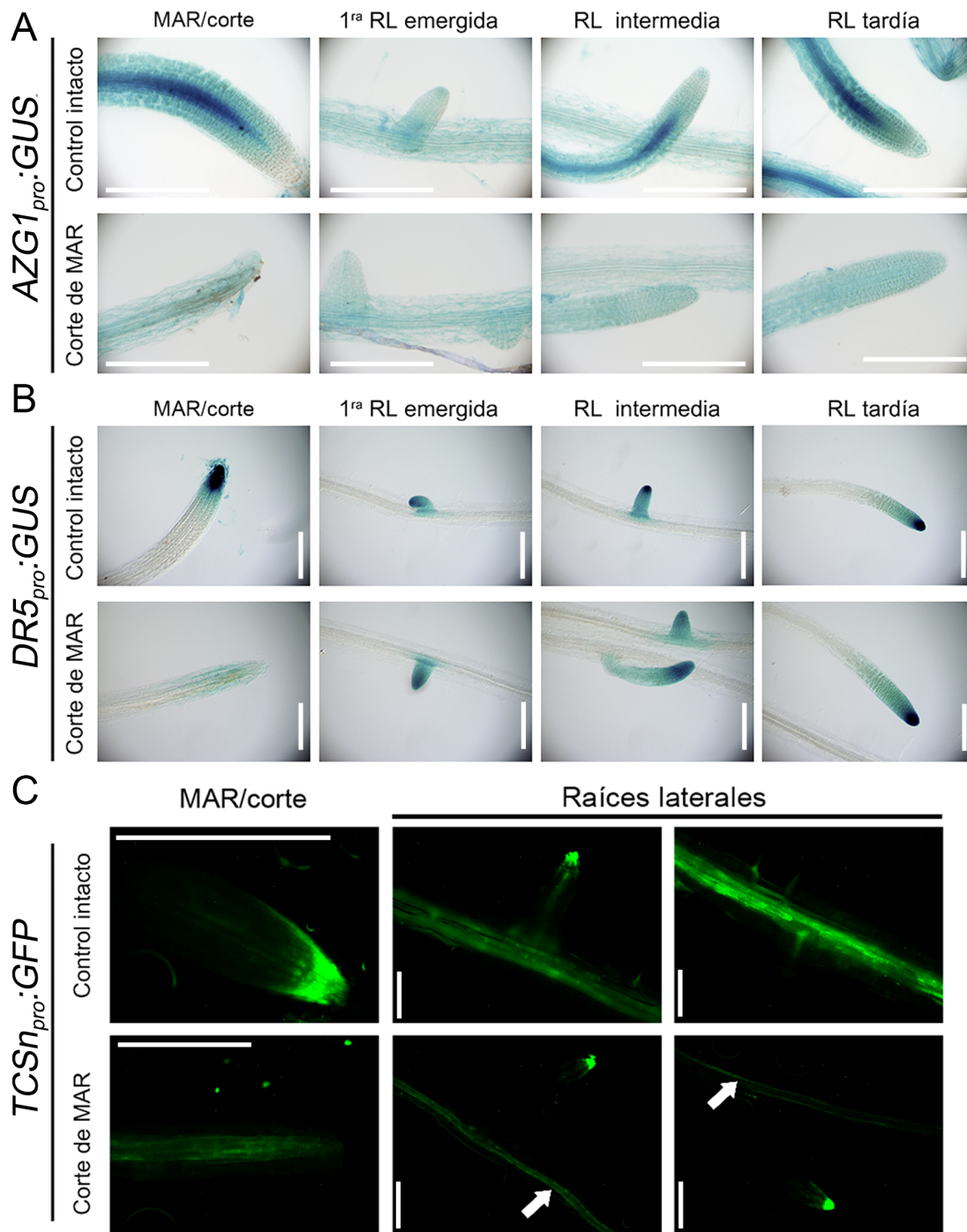
Motivados por la tinción diferencial que presentaron las puntas de las RP y RL, se estudió relación de AZG1 con la determinación de la identidad de las RL y con la regulación de la arquitectura radical en general. Este punto se apoya en las diferencias fisiológicas que existen entre la RP y las RL, por lo que se postuló que AZG1 podría estar involucrado en algún proceso que otorgue la identidad a

las raíces. Partiendo del hecho de que ante la escisión del ápice de la RP, una o más RL lideran el crecimiento (Aloni, 2006), se observó este comportamiento en distintas líneas de plantas, utilizando el mismo modelo experimental según se describe a continuación. Se cultivaron plántulas en placa a las cuales a los cinco días después de germinadas (ddg) se les seccionó el ápice de la raíz ( $\sim 5\text{mm}$ ), eliminando por completo el meristema apical radical (MAR). Cinco días después del corte las plantas fueron analizadas. En primer lugar se estudió el impacto del corte en la expresión de AZG1 recurriendo nuevamente la línea *AZG1<sub>pro</sub>:GUS*. Como se puede observar en la figura 18A, las plántulas *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* presentaron una tinción más débil y homogénea cuando se seccionó el ápice de las RP.

Por otro lado, las RL tras el corte del ápice de la RP no mostraron el pico de expresión observado previamente en la zona quiescente. Teniendo en cuenta que AZG1 es capaz de transportar CKs, este cambio en la expresión podría repercutir en los balances locales de la hormona. Para estudiar este fenómeno se evaluó la señal de los reporteros hormonales, tanto de auxinas como de CK, *DR5<sub>pro</sub>:GUS* y *TCSn<sub>pro</sub>:GFP* respectivamente. Ambos reporteros se basan en promotores artificiales, que contienen sitios de unión para factores de transcripción que regulan la expresión génica según la presencia de determinada hormona (Ulmasov et al. 1997; Zürcher et al., 2013). En las plántulas *DR5<sub>pro</sub>:GUS* con el ápice de la RP seccionado, no se observaron cambios en la intensidad ni en la localización de la señal con respecto a las plántulas control (Figura 18B). Contrariamente, en plantas *TCSn<sub>pro</sub>:GFP* se observó un claro cambio tanto en la intensidad como en el patrón de la señal de GFP (Figura 18C). Mientras que en las plantas con el ápice de la RP intacto, se observó señal tanto en la estela vascular como en los tejidos circundantes, en las plantas con escisión del ápice de la RP la señal se tornó débil y restringida solamente a la región vascular (Figura 18C; flechas blancas).

Para evaluar la posibilidad de que AZG1 esté involucrado en la relocalización y el cambio en la actividad de las CK, se estudiaron los *KO azg1-1* y *azg1-2*. Se analizaron distintos parámetros morfológicos de la arquitectura radical y se pudo determinar que las líneas *KO* respondían también de manera diferencial. De los parámetros estudiados se destacó la longitud promedio de la RL. En esta variable, las líneas *KO* mostraron tener RL en promedio más cortas que el *Wt* después de nueve días de crecimiento posterior al corte de MAR (Figuras 19A y 19G). Esto sugiere que AZG1 podría tener un rol importante en la redistribución de CK para la determinación de la dominancia apical radical.

Resaltamos en el estudio de la expresión tisular que la señal de AZG1 modifica su patrón ante un cambio en la dirección de la gravedad. Este fenómeno es similar a lo que ocurre con la señal de auxinas cuya actividad asimétrica en el cilindro de la raíz genera un crecimiento diferencial, curvando el órgano y en consecuencia, siguiendo la dirección de la gravedad (Mullen et al., 1998; Friml et al., 2002). El



**Figura 18.** Estudio de la expresión de *AZG1*, actividad de auxinas y CK en respuesta a la escisión del MAR. (A-C) Expresión de los reporteros (A) *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* (B) *DR5<sub>pro</sub>:GUS* (reportero de actividad de auxinas) y (C) *TCSn<sub>pro</sub>:GFP* (reportero de actividad de CK) en raíces con MAR intacto o MAR escindido, mostrando el MAR, y distintos estadios de RL. Las barras de escala representan 200  $\mu$ m.

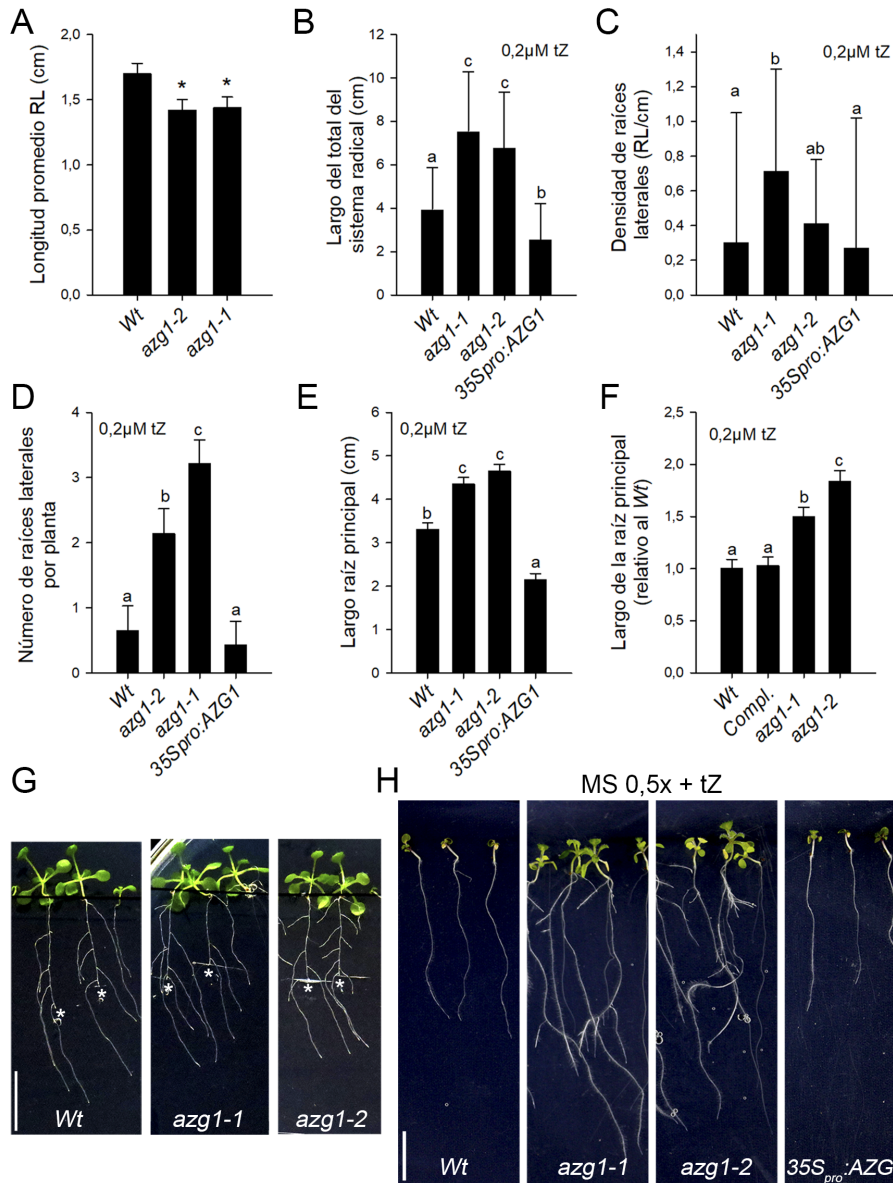
cambio en la actividad de auxinas lo pudimos corroborar en la línea *DR5<sub>pro</sub>:GUS*, tras un cambio en el estímulo gravitrópico (Figura Suplementaria 4A). Utilizando la misma metodología se fotografiaron plántulas de las líneas *azg1-1*, *azg1-2* y *Wt* tras cinco días de un cambio de 90° en el estímulo gravitrópico y se midió el ángulo generado en la raíz por la rotación de la placa. Se observaron diferencias significativas para una de las líneas (*azg1-2*) mientras que la segunda línea presentó una situación intermedia en comparación con el *Wt* (Figura Suplementaria 4B).

### 9.2.3. AZG1 forma parte de un mecanismo de señalización por citoquininas en raíces

A continuación, con el fin de estudiar la actividad local de las CKs en líneas *KO* de AZG1, se estudió en mayor detalle la actividad del reportero de CK *TCS<sub>n<sub>pro</sub></sub>:GFP*. Este reportero consta de un promotor artificial de respuesta a CK que dirige la expresión de una GFP residente de retículo endoplasmático. La construcción fue introducida en el genotipo *azg1-2* (se estudiaron dos líneas de inserción para evitar efectos dados por la región de inserción) y se lo comparó con la línea de *Col-0* caracterizada y cedida por el laboratorio del Dr. Müller (Zürcher et al., 2013). Se cuantificó la intensidad media de la señal de GFP en la raíz como indicador de la actividad de CK. La cuantificación no mostró diferencias significativas entre las líneas *KO* y la línea *Wt* en la región estudiada (Figura Suplementaria 4C).

Por otro lado, la capacidad de AZG1 de transportar CK, sumado a la inducción de la expresión por la misma hormona, sugieren que las líneas mutantes de este transportador podrían responder de manera diferencial a la aplicación de CK exógenas. Esto nos podría brindar información acerca de la potencial función que AZG1 cumple en raíces. Para ello, se cultivaron plántulas *Wt*, *KO* y una línea sobreexpresante (SE; *35S<sub>pro</sub>:AZG1*) en placas con MS 0,5x con el agregado de tZ 200 nM. En el caso de la línea *Wt* se observó la respuesta ya caracterizada (Riefler et al., 2006), presentando una RP de dominancia marcada, casi sin RL. En el caso de las líneas *KO*, las plántulas fueron capaces de desarrollar un sistema radical más complejo, destacándose mayor longitud de raíces principales y un mayor número neto de RL (Figuras 19B-19E y 19H). Este fenotipo coincide con un déficit en la percepción de la hormona (Riefler et al., 2006), sugiriendo que el transporte de la hormona vía AZG1 sería importante para la detección de CK en la raíz. Por otro lado, la línea SE mostró el fenotipo opuesto a los *KO*, con una respuesta similar a la de la línea *Wt* pero exacerbada.

Para atribuir la causalidad del fenotipo observado exclusivamente a la actividad de AZG1, se generó una línea de complementación, transformando la línea *azg1-2* con la construcción *AZG<sub>pro</sub>:AZG1-GFP*. Una vez seleccionada la inserción en homocigosis se estudió la respuesta del sistema radical de esta línea a tZ. La



**Figura 19. Caracterización fenotípica de líneas mutantes del gen *Azg1* en respuesta a escisión del MAR o de la aplicación de CK. (A) Largo promedio de las RL tras 10 días del corte del MAR en líneas *azg1-1* y *azg1-2* en comparación con la línea silvestre (*Wt*). (B-E) Caracterización fenotípica de variables relacionadas con la arquitectura radical como (B) largo total del sistema radical, (C) densidad de RL, (D) número neto de RL, (E) largo de la raíz principal de líneas KO, SE en comparación con la línea *Wt*. (F) Estudio de complementación del fenotipo de largo de raíz principal en presencia de CK de la línea *AZG1<sub>pro</sub>:AZG1-GFP* (*Compl.*). (G) Plántulas representativas del tratamiento de corte de MAR. (H) Plántulas representativas del tratamiento de exposición a CK exógenas. Las barras de escala representan 1 cm. Los asteriscos y las letras corresponden a diferencias estadísticamente significativas. Las barra de error representan el E.E. (ANAVA seguido por test de comparaciones múltiples de Duncan;  $p < 0,05$ ).**

comparación entre las línea *Wt*, *KO* y complementada, muestra que esta última recobra el fenotipo radical de la versión silvestre (Figura 19F). Estos resultados sugieren que AZG1 efectivamente es capaz de transportar CK en las células vegetales y que su ausencia puede alterar la homeostasis de la hormona.

### 9.3. Localización subcelular

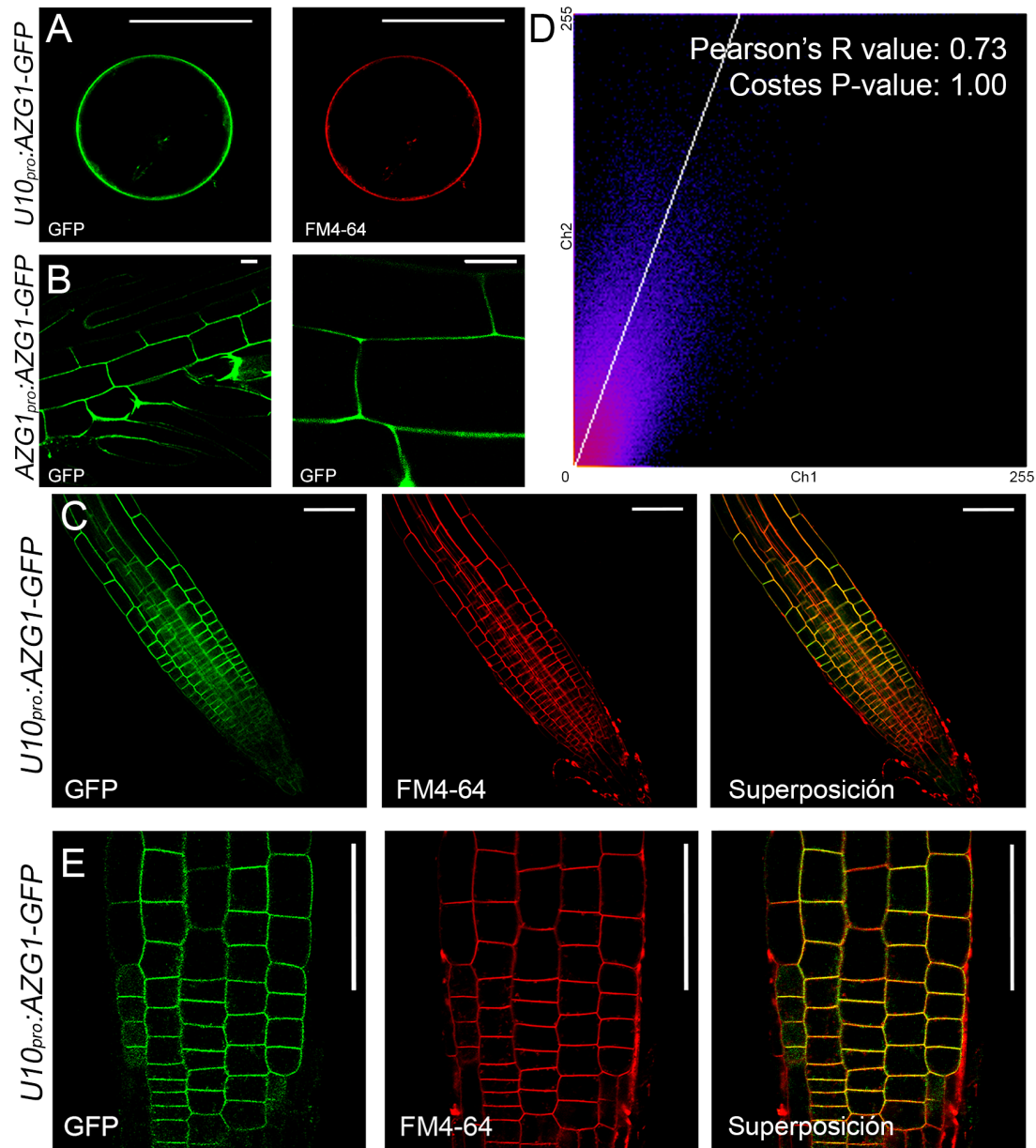
#### 9.3.1. AZG1 se localiza en la membrana plasmática

Como primer acercamiento al estudio de la localización subcelular de AZG1, se indagó si su secuencia contiene un péptido señal de tráfico. La búsqueda se realizó mediante el algoritmo de SignalP-5.0 y el resultado fue negativo, por lo que se determinó que AZG1 no presentaría ningún péptido señal (Figura Suplementaria 5A; Petersen et al., 2011). Con el fin de conocer experimentalmente con precisión la localización de AZG1, se generaron construcciones plasmídicas con el reportero GFP. Debido a la ausencia de péptidos de tráfico, así como la evidencia de que los dos extremos de AZG1 se encontrarían de cara al citosol (Capítulo II, sección 7.1) solo se ensayó una fusión C-terminal del transportador con el reportero. De este modo, la primera construcción estudiada fue AZG1-GFP dirigida bajo el control del promotor ubiquitina 10 (U10). Este se trata de un promotor de expresión constitutiva, que permite una expresión homogénea en todos los tejidos, especialmente en la zona meristemática de la raíz. Esta región es de particular interés ya que es donde se evalúa con mayor facilidad la localización subcelular debido a sus características. Por otro lado la expresión no es tan intensa como la del promotor 35S, minimizando la ocurrencia de artefactos derivados de los niveles de expresión.

La actividad del constructo fue primero ensayada mediante microscopía confocal en protoplastos de raíz de *A. thaliana*. En estas células se observó nítida señal del reportero, colocalizando con el marcador de membrana plasmática FM4-64 (Figura 20A).

A continuación se estudió la señal de la construcción  $U10_{pro}:AZG2-GFP$  en plantas transformadas de manera estable. Las plantas seleccionadas en homocigosis de la inserción, fueron analizadas bajo el microscopio confocal. Estudiando las células del ápice radical, correspondientes a la zona meristemática, se obtuvo un resultado equivalente al descrito en protoplastos. En comparación con la sonda de membrana plasmática FM4-64 el patrón de la señal mostró una clara colocalización (Figuras 20C-20E). Para cuantificar esta superposición, se realizó un análisis de colocalización de las señales de GFP y FM4-64 (Coloc2-FIJI). El resultado arrojó un valor de correlación de Pearson de  $R=0,73$ , y una significancia de 1 (Costes), por lo que se puede concluir que las señales colocalizan. Los coeficientes de Manders recalculados según con el umbral de Costes muestran que el 88,1 % de los píxeles de la señal GFP colocalizan con los de la sonda (tM1) y que 86,1 % de los píxeles





**Figura 20.** Estudio de la localización subcelular de *AZG1*. (A) Expresión transitoria de la fusión *AZG1-GFP* bajo el control del promotor de expresión constitutiva *Ubiquitina10* (*U10*) en protoplastos de raíz de *A. thaliana*. La señal en rojo corresponde al marcador de membrana plasmática *FM4-64*. (B) Señal de la fusión *AZG1-GFP* bajo el control de promotor nativo de *Azg1* en la región proximal de la raíz. (C) Señal de la fusión *AZG1-GFP* bajo el control del promotor *U10* en la zona meristemática de la RP en líneas transformadas de manera estable. En rojo se observa el marcador *FM4-64* con el cual se generó la imagen de superposición. (D) Análisis de la localización realizado mediante *Coloc2* en *FIJI* en base a las imágenes de la figura (C). (E) Detalle de la señal de *U10<sub>pro</sub>:AZG1-GFP* en la zona meristemática de la raíz. Las barras de escala representan (A, C-D) 50  $\mu\text{m}$  y (B) 10  $\mu\text{m}$ .

correspondientes a la sonda colocan con los de la señal GFP (tM2).

Por otro lado, se estudio la línea que porta la construcción  $AZG1_{pro}:AZG1-GFP$  cuya funcionalidad fue corroborada en los ensayos de complementación del fenotipo de los *KO* de AZG1 (Sección 9.2.3). Se trata de la misma fusión transcripcional utilizada hasta el momento, pero en este caso bajo el control del promotor nativo de AZG1. Si bien la ausencia de un nivel aceptable de expresión del promotor de AZG1 en la zona meristemática de la raíz hace que la línea no sea óptima para establecer claramente la localización subcelular, resulta relevante estudiar la señal del reportero en el dominio y los niveles normales de expresión del gen. Al observar células de la raíz cercanas a la zona de transición con el hipocótilo, se determinó nuevamente que la señal de AZG1-GFP está limitada a la periferia celular, con total ausencia de señal intracelular, indicando nuevamente que su destino celular es la membrana plasmática.



## 10. Discusión - Capítulo III

La caracterización de la localización tisular de AZG1 permitió enfocar el estudio de los procesos en los que AZG1 podría estar involucrado. Hasta el momento se sabía que era capaz de transportar purinas con alta afinidad así como CK en plantas y que existía una caracterización del transporte en sistemas heterólogos y en plántulas mutantes (Tesis de posgrado B. Schumacher, Universidad de Tübingen). Sin embargo, no se conocía su rol funcional en plantas.

La primera caracterización de AZG1 a nivel de fenotipo de la raíz y fenotipo aéreo no mostró diferencias entre las líneas mutantes y la condición silvestre. Esto puede deberse a que más allá de su localización generalizada, AZG1 participe de procesos locales que escapan al nivel de análisis abarcado en la caracterización general. Por otro lado, puede que la falta de AZG1 no repercuta en un fenotipo morfológico debido a la existencia de otros transportadores que cumplan una función similar. De hecho, Zürcher 2018 describe a PUP14 como un transportador de CK que presenta una localización homogénea en la raíz, pudiendo ser esta una fuente de redundancia funcional que enmascare la actividad de AZG1.

En busca de diferencias entre las líneas mutantes de *Azg1*, con el fin de comprender la importancia fisiológica del transportador, se decidió establecer un modelo de estudio que apunte a mecanismos puntuales basándonos en las observaciones previas de nuestro laboratorio. Tras el corte del ápice de la RP, fue notable el cambio que se observó tanto en la tinción del reportero *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* como en el reportero *TCS<sub>npro</sub>:GFP*. Este resultado, de acuerdo con lo esperado, sugirió que podía existir un cambio en la concentración o distribución de CK. Esto mismo no se observó para auxinas (*DR5<sub>pro</sub>:GUS*). Una de las posibles causas en el cambio de la expresión de los promotores *Azg1* y *TCS<sub>n</sub>* puede deberse a que junto con el meristema radical, se seccionaron parte de los tejidos que tienen mayor actividad biosintética de CK (Sakakibara, 2006). Una hipótesis alternativa o complementaria, que contempla el cambio en el patrón observado para AZG1, es que se produzca una disminución/relocalización de CK que incline el balance auxinas/CK hacia las auxinas, favoreciendo el desarrollo de RL al romper la dominancia apical radical.

Para poder responder la inquietud acerca del rol de *Azg1* durante el desarrollo del sistema radical, debemos retomar las observaciones hechas para su expresión tisular. La localización diferencial de AZG1 según se exprese en RL o en RP,

fue un punto de gran interés. Recientemente distintos trabajos han remarcado la importancia de diferenciar el desarrollo de estos dos tipos de raíces. Se conocen procesos en los que las RL responden de manera diferente, como la respuesta gravitrópica atenuada, para la cual incluso se han descrito mecanismos diferenciales de señalización (Rosquete et al., 2013; Roychoudhry et al., 2013; Tian et al., 2014). Si bien en el presente trabajo no se encontraron diferencias contundentes en cuanto a la respuesta a la gravedad de la raíz RP en líneas mutantes en *Azg1*, el hecho de que un transportador de CK presente una localización particular en RL, permite especular acerca de que su actividad pueda estar ligada a algún proceso que otorgue identidad a este tipo de raíces. Especialmente teniendo en cuenta que las CK, junto con las auxinas, son los principales morfógenos de la raíz (Taiz and Zeiger, 2010). En este sentido, cuando se seccionó el ápice de la RP forzando a las plántulas a reorganizar su arquitectura radical, si se encontró una diferencia en la respuesta de los *KO* de *Azg1*. Esta evidencia, puede ser el primer paso para una caracterización más profunda sobre la identidad de cada tipo de raíz y el rol que pueda tener *Azg1* en esta determinación, así como la actividad de los transportadores PIN resultan fundamentales para comprender la respuesta diferencial a auxinas en RL (Rosquete et al., 2013).

Para poder asociar las diferencias fenotípicas observadas a la actividad de *Azg1*, se estudiaron los niveles de señalización de CK en la raíz mediante *TCSn<sub>pro</sub>:GFP*. Sin embargo, no fue posible encontrar diferencias locales en la señalización en plantas intactas. Para continuar con este análisis y poder enfocar mejor el estudio de los niveles de CK en raíces, se evaluó la repercusión del agregado exógeno de CK en distintas líneas mutantes. Las líneas *KO* mostraron cierta insensibilidad a la presencia de la hormona externa en comparación con la condición silvestre, desarrollando un sistema radical que difería fundamentalmente en el largo de las RP. La probada capacidad de *AZG1* para acumular CK surge como potencial causa del fenotipo observado, explicando además la mayor sensibilidad de la línea SE estudiada. En esta línea se destaca un menor largo de la RP así como un menor largo total del sistema radical, sugiriendo que la sobreexpresión repercute especialmente sobre la región meristemática de la raíz.

Al contar con un fenotipo de las líneas *KO* directamente relacionado con CK, se pudo evaluar el fenotipo de la línea de complementación *AZG1<sub>pro</sub>:AZG1-GFP/azg1-2*. La capacidad de la inserción de revertir el fenotipo observado previamente en esta línea, atribuye la responsabilidad de este únicamente a la ausencia de *AZG1*. Además, esto refuerza la hipótesis de que el transportador puede ser un eslabón importante en la vía de transducción de señales dependiente de la hormona CK, durante el desarrollo del sistema radical. Por último, la capacidad de *AZG1<sub>pro</sub>:AZG1-GFP* de complementar el fenotipo *KO*, demuestra que la construcción es funcional y apropiada para los posteriores estudios de localización

subcelular del AZG1.

Finalmente, se estudió la localización subcelular de AZG1 con distintas construcciones y en distintos modelos. La construcción de expresión constitutiva *AZG1<sub>pro</sub>:AZG1-GFP*, testeada primero en protoplastos y posteriormente en plantas transformadas de manera estable, mostró clara localización de membrana plasmática, colocalizando con la sonda de membrana plasmática FM4-64. Para reforzar las conclusiones obtenidas con esta línea se estudió la expresión de la línea de complementación *AZG1<sub>pro</sub>:AZG1-GFP*. Nuevamente la localización fue claramente en membrana plasmática, apoyando el patrón observado en la línea de expresión constitutiva. Los resultados de la expresión de AZG1, marcan una similitud con el transportador de CK PUP14 (Zürcher et al., 2016). También la caracterización bioquímica del transportador por Schumacher en su tesis doctoral, muestra similitudes (Univesidad de Tübingen, datos no publicados). En dicho trabajo se determinó que AZG1 es un transportador activo que requiere de energía para llevar a cabo su actividad, y que funcionaría principalmente como un importador, con alta afinidad por el sustrato. Al presentar características similares y compartir en gran parte la expresión tisular así como la localización subcelular, es esperable que exista cierta redundancia en la actividad de los transportadores. Sin embargo, evidentemente, la presencia de AZG1 no es suficiente como para rescatar el fenotipo letal que presentan las líneas *KO* de PUP14 (Zürcher et al., 2016). Una posible explicación para esto es que este último transportador es fundamental durante el desarrollo embrionario, fase en la que AZG1 no tendría mayor impacto.

## Capítulo 4

### 11. Rol del transportador AZG2 en la señalización hormonal

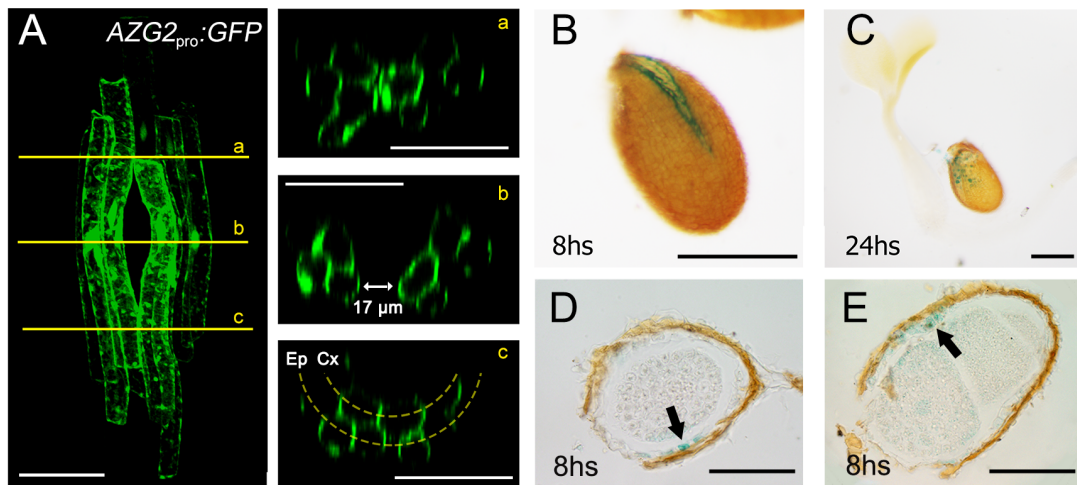
En trabajos previos de este grupo se ha abordado tanto el estudio de la expresión de AZG2, así como su rol regulatorio durante el desarrollo de RL. En este capítulo se profundizó el estudio de su expresión, ya que como se describe a continuación resulta uno de los puntos más peculiares de AZG2 y por lo tanto de gran interés. Se estudió con resolución celular el dominio de expresión en raíz, así como su presencia en tejidos no radicales. Se presentará también la continuidad del trabajo previo realizado por el grupo, profundizando lo que ya se conocía en cuanto al fenotipado de la arquitectura radical, al enfocarnos ahora en lo que acontece durante los estadios previos a la emergencia de los primordios de RL.

A continuación y de manera complementaria al conocimiento sobre el rol regulatorio del transportador, se estudió la relevancia de su actividad en la señalización hormonal de CK, permitiéndonos por primera vez aproximarnos a los eventos cascada abajo de la vía. Por otro lado, se realizó un acercamiento a los mecanismos aguas arriba de la inducción de la expresión de AZG2, especialmente teniendo en cuenta su estrecha relación con las hormonas auxinas.

Finalmente, también se estudió la localización subcelular de AZG2, ya que su entendimiento resulta crucial para construir un modelo que resuma e interprete lo que conocemos hasta ahora sobre su rol fisiológico.

#### 11.1. AZG2 se expresa en corteza y epidermis radical, rodeando a primordios de raíz lateral

La caracterización previa de AZG2 convierte al transportador en una proteína de gran interés para su estudio debido a ciertas particularidades. Se destaca dentro de sus principales características la localización tisular. Su expresión se restringe a



**Figura 21. Estudio de la expresión de AZG2 a nivel tisular.** (A) Reconstrucción tridimensional de la señal de  $AZG2_{pro}:GFP$  obtenida mediante microscopía confocal. Las líneas amarillas corresponden a planos transversales de la raíz a distintas alturas de un primordio de RL en proceso de emergencia. Cada plano se corresponde con la figura a, b y c en amarillo. (B-D) Expresión de  $AZG2_{pro}:GUS$  en semillas embebidas tras 8 o 24 horas de exposición a la luz. (D y E) Cortes de semillas muestran tinción en el endosperma de la semilla (flechas). Las barras de escala representan (A) 100  $\mu m$  y (B-D) 500  $\mu m$ .

un reducido número de células de la raíz, rodeando los primordios de RL (Figura 8A y Figura Suplementaria 7A). Sin embargo, hasta el momento no se conocían con precisión los tejidos en los que se expresa. Para conocer en detalle la expresión de AZG2, se estudiaron plántulas que llevan la construcción de  $AZG2_{pro}:GFP$ . Mediante escaneo confocal, se realizó una reconstrucción tridimensional de la señal del reportero en una RL en proceso de emergencia. La figura 21A corresponde a un ejemplo de esta situación donde se pueden discriminar nueve células del cilindro radical en las cuales se expresa el reportero. Estas células se distribuyen en sólo dos capas celulares, correspondientes a los tejidos de corteza y epidermis (Figura 21Ac). Por lo general se trata de células contiguas y son aquellas que acompañarán al primordio de RL durante su proceso de emergencia a través de los tejidos mencionados. Más aún, en la reconstrucción se puede notar que dos de las células que presentan señal muestran una separación de 17  $\mu m$  en la zona de emergencia de la futura RL (Figura 21Ab). Este resultado reafirma la existencia de una fina regulación de la expresión de AZG2 en raíces.

Por otro lado, los estudios preliminares señalaron que existirían transcritos de AZG2 en tejidos reproductivos, aunque no se pudo observar expresión de transportador en flores, frutos ni semillas en formación mediante el uso de reporteros GUS y GFP. En este trabajo se continuó la búsqueda de expresión de AZG2 en otros tejidos y se pudo observar una expresión efímera de  $AZG2_{pro}:GUS$  en semillas en

proceso de germinación. Nuevamente la tinción de AZG2 resulta muy localizada, restringiéndose a un grupo de células en la zona de apertura del tegumento seminal (Figuras 21B-21E). La tinción puede observarse a partir de las 8 h de la exposición a la luz (después de un paso de 48 h a 4 °C), posteriormente a la ruptura del tegumento seminal. Estas células se encuentran en activa remodelación de la pared celular, como puede observarse tras 24 h de exposición a la luz (Figura 21C), cuando las células teñidas se disgregan, presentando una morfología redondeada evidenciando relajación y/o degradación de la pared celular.

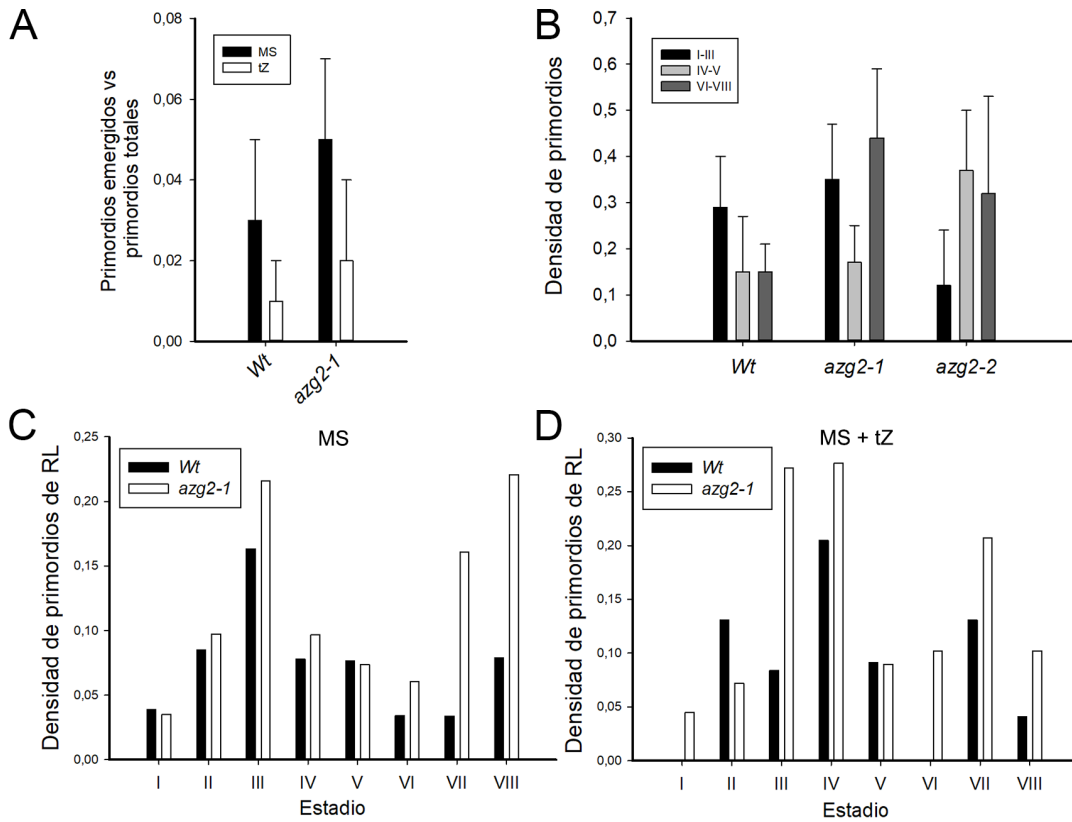
## 11.2. Azg2 actúa durante el desarrollo de los primordios de raíz lateral regulando su emergencia

En estudios previos se describió la importancia del transportador AZG2 durante el desarrollo de los primordios de RL, y se ligó su actividad al rol represivo de las hormonas CK ante la ramificación de la RP (Tessi, tesina de grado, Universidad Nacional de Córdoba). Sin embargo, al observar la densidad de RL, nos hemos enfocado hasta el momento en la consecuencia de su actividad pero no en los estadios de desarrollo en los que el transportador ejercería su función. Para poder estudiar directamente las consecuencias morfofisiológicas de su actividad se contaron los primordios en proceso de emergencia, clasificándolos según su etapa de desarrollo (Malamy and Benfey, 1997). Se estudiaron plantas *KO* en comparación con las *Wt*, así como se la aplicación de CK en el medio.

En primer lugar, se comprobó que la proporción de primordios que alcanzan a completar el desarrollo en la línea *KO* es mayor que en la línea silvestre (Figura 22A). Por otro lado la aplicación de CK exógenas, produce en ambos genotipos una caída en la proporción de primordio emergidos, aunque en la línea *KO*, un considerable número de primordios es capaz saltar esta inhibición, corroborando también lo que se observó en trabajos previos del grupo, donde la línea *KO* demostró cierta insensibilidad a la hormona (datos no publicados).

A continuación, se estudió el perfil de estadios de desarrollo de los primordios que presentaron las distintas líneas. Agrupando los primordios según estadios tempranos (I, II y III), medios (IV y V) y tardíos (VII, VII y VIII), se puede observar que la línea *Wt*, presenta mayor número de primordios tempranos, denotando que existe algún tipo de regulación negativa sobre la progresión de su desarrollo (Figura 22B). En contraposición ambas líneas *KO* estudiadas mostraron un mayor número de primordios tardíos que tempranos, señalando que esta inhibición podría ser defectuosa en los *KO*.

Aumentando el grado de detalle se estudió la frecuencia de cada estadio tanto en condiciones control como con el agregado de tZ. En el caso de la línea *Wt*, se observó una acumulación de primordios en estadio III en condiciones control



**Figura 22. Emergencia de primordios de RL en KO de AZG2.** (A) Proporción de primordios que alcanzaron el último estadio de desarrollo (VIII) en relación al total de primordios presentes en las plántulas creciendo en medio MS (negro) o MS + tZ (blanco). (B) Primordios agrupados en estadios tempranos, medios y tardíos de plántulas Wt, azg2-1 y azg2-2. (C-D) Primordios según estadio de desarrollo en plántulas Wt y azg2-1 creciendo en (C) MS y (D) MS + tZ. Barras de error representan el E.E. MS: n=32; tZ n=31

(Figura 22C). Esto es de esperar, ya que este estadio es la frontera entre uno de los pasos regulatorios más importantes, como es atravesar la endodermis. Un fenómeno similar se puede observar en la línea KO, tanto en condiciones control como con tZ, sin embargo una mayor parte de los primordios son capaces de saltar esta fase regulatoria al presentar mayor número de primordios en estadios avanzados. El genotipo Wt, como es de esperarse, mostró una menor progresión del desarrollo tras la aplicación de tZ, lo que no se observó en la línea azg2-1 (Figura 22D). La respuesta diferenciada tanto debida al genotipo, como a la aplicación de la hormona, refuerza la hipótesis de que AZG2 forma parte de un mecanismo regulatorio de la emergencia de primordios de RL. Para poder establecer una relación directa entre la actividad de AZG2 y la señalización de CK se estudiaron los pasos cascada abajo de la actividad del transportador en dicha vía de transducción de señales.

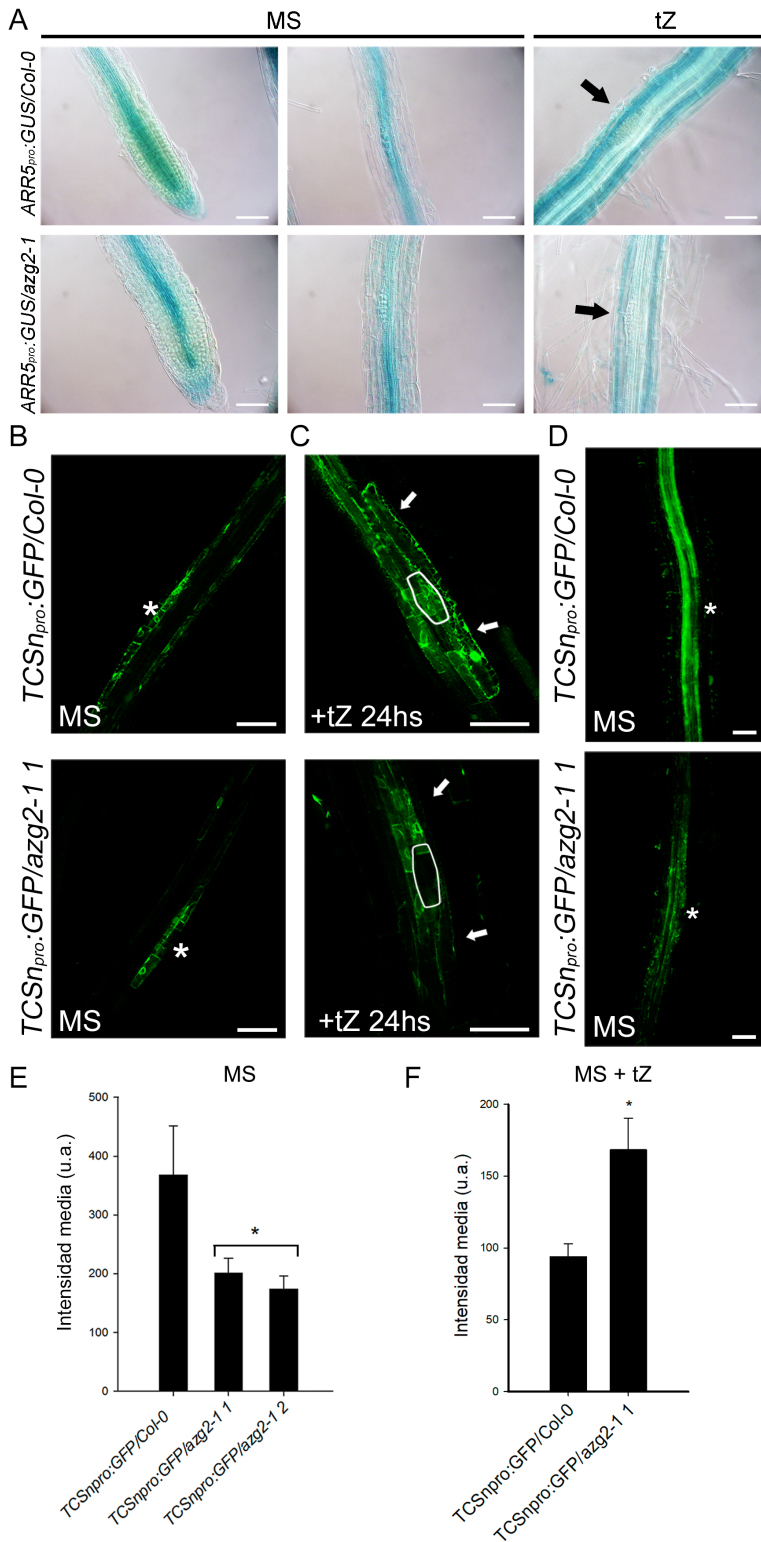
### 11.3. AZG2 es fundamental para la correcta percepción de citoquininas en raíces

En trabajos previos de este grupo se ha caracterizado el comportamiento de distintas líneas mutantes del gen *Azg2*, especialmente en relación con la señalización hormonal (Winklbauer, Tessi, tesinas de grado). Para conocer la repercusión de la ausencia de AZG2 en la homeostasis de la hormona CK en la región de emergencia de los primordios de RL, se estudió la expresión del factor de transcripción de respuesta a CK ARR5. Para ello se clonó el promotor del factor de transcripción ARR5 junto con el gen de la enzima beta-glucoronidasa para generar la construcción *ARR5<sub>pro</sub>:GUS*. Esta fue introducida en los genotipos Col-0 y en *azg2-1*. Plántulas de once días fueron sometidas a dos tratamientos, 20 h en MS líquido o MS con CK (tZ 0,2 mM). La señal del reportero no mostró mayores diferencias entre las líneas en medio MS (Figura 23A). Sin embargo cuando se indujo la actividad del promotor mediante la aplicación exógena de CK, la línea *KO* mostró una menor inducción, especialmente en las células que cubren el primordio (Figura 23A, flechas).

Para aumentar la sensibilidad en la determinación de los niveles de señalización dependiente de CK, se utilizó una construcción que permite observar la actividad local de la hormona *in vivo*. La herramienta molecular utilizada fue *TCSn<sub>pro</sub>:GFP*. La construcción fue introducida en la línea *KO azg2-1* y se seleccionaron dos inserciones independientes. La funcionalidad de la inserción en todas las líneas se observó por microscopía confocal y se indujo la expresión mediante la exposición de CK para confirmar la respuesta a la hormona (Figura 23B). De estos ensayos se pudo notar una menor inducción en la línea *KO*, especialmente en los tejidos que cubren al primordio de RL, justamente el dominio de expresión de AZG2. Para poder cuantificar las diferencias observadas, se fotografió la señal de la proteína GFP en la zona de desarrollo del primordio de RL, dividiendo la totalidad del cilindro de la raíz en doce planos focales que fueron proyectados en una única imagen según su intensidad media en el eje z (Figura 23C). La intensidad de la señal de GFP resultante, fue cuantificada y se pudo determinar que las dos líneas de inserción independiente en el *KO azg2-1* que se estudiaron mostraron menor señal de fluorescencia que el genotipo *Col-0* (Figura 23D y 23E). Esta menor señal de la proteína GFP está directamente relacionada con la actividad del promotor *TCSn* y esto a su vez con los niveles de señalización por CK en esos tejidos. Por lo tanto, este resultado concuerda con la hipótesis de que AZG2 forma parte de un mecanismo que modula la emergencia de RL a nivel local y vincula directamente su actividad al nivel de señal de CK.

De la caracterización previa se conoce que plántulas de las líneas *KO* de AZG2, son capaces de desarrollar RL en presencia de CK, fenómeno que está fuertemente impedido en las plántulas silvestres. Para comprender qué ocurre con





**Figura 23. Estudio de la actividad de CK en la línea KO de AZG2 y Col-0.** (A) Actividad del promotor del factor de transcripción de respuesta a CK, ARR5 en el genotipo silvestre (Col-0) y azg2-1 en medio MS 0,5x (MS) o en MS 0,5x + 0,2  $\mu$ M trans Zeatina (tZ) usando el reportero de GUS. (B-D) Actividad del promotor sintético de respuesta a CK TCSn dirigiendo la proteína fluorescente GFP en medio MS 0,5x y en medio MS 0,5x + 0,2  $\mu$ M tZ por 24 h en genotipos silvestre y azg2-1. (C) Imágenes obtenidas mediante proyección en el eje z de 12 cortes confocales abarcando el cilindro radical. (D) Las imágenes proyectadas fueron utilizadas para cuantificar la intensidad de señal en las distintas líneas estudiadas. (E-F) Cuantificación de la señal de TCSn<sub>pro</sub>:GFP en plantas creciendo en (E) MS y (F) MS + 0,2  $\mu$ M tZ. Las barras de escala representan 100  $\mu$ m. Los asteriscos corresponden a diferencias estadísticamente significativas. Las barras de error representan el E.E. (ANOVA seguido por test de comparaciones múltiples de Duncan;  $p < 0,05$ ).

la señalización de CK en estos casos, se repitió el experimento con las líneas *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/Col-0* y *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/azg2-1*. Las plantas fueron escaneadas en microscopio confocal siguiendo la misma metodología mencionada en el párrafo anterior. Sorprendentemente, la señal en la línea *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/Col-0* fue muy baja, sugiriendo que existiría un mecanismo de silenciamiento de la señal o un efecto tóxico por parte de la hormona en la concentración utilizada. Por otro lado, la línea *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/azg2-1* si bien disminuyó en comparación con la plantas no expuestas a CK, mostró una señal mayor a la de *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/Col-0* (Figura 23F). Más allá de que la exposición crónica a CK tiene un efecto muy diferente al de tratamientos agudos, se puede reconocer como patrón general que las líneas *KO* tienen una menor sensibilidad a CK.

#### 11.4. Las auxinas regulan la expresión de AZG2, estableciendo un ciclo de regulación cruzada con citoquininas

Más allá de la relación directa de AZG2 con CK, es conocido que las respuestas de las plantas están coordinadas por múltiples hormonas. Las CK actúan en muchos procesos de desarrollo en conjunto con auxinas. Teniendo en cuenta que ya conocemos que las auxinas inducen la expresión de AZG2, decidimos estudiar en mayor profundidad la relación del transportador con esta hormona.

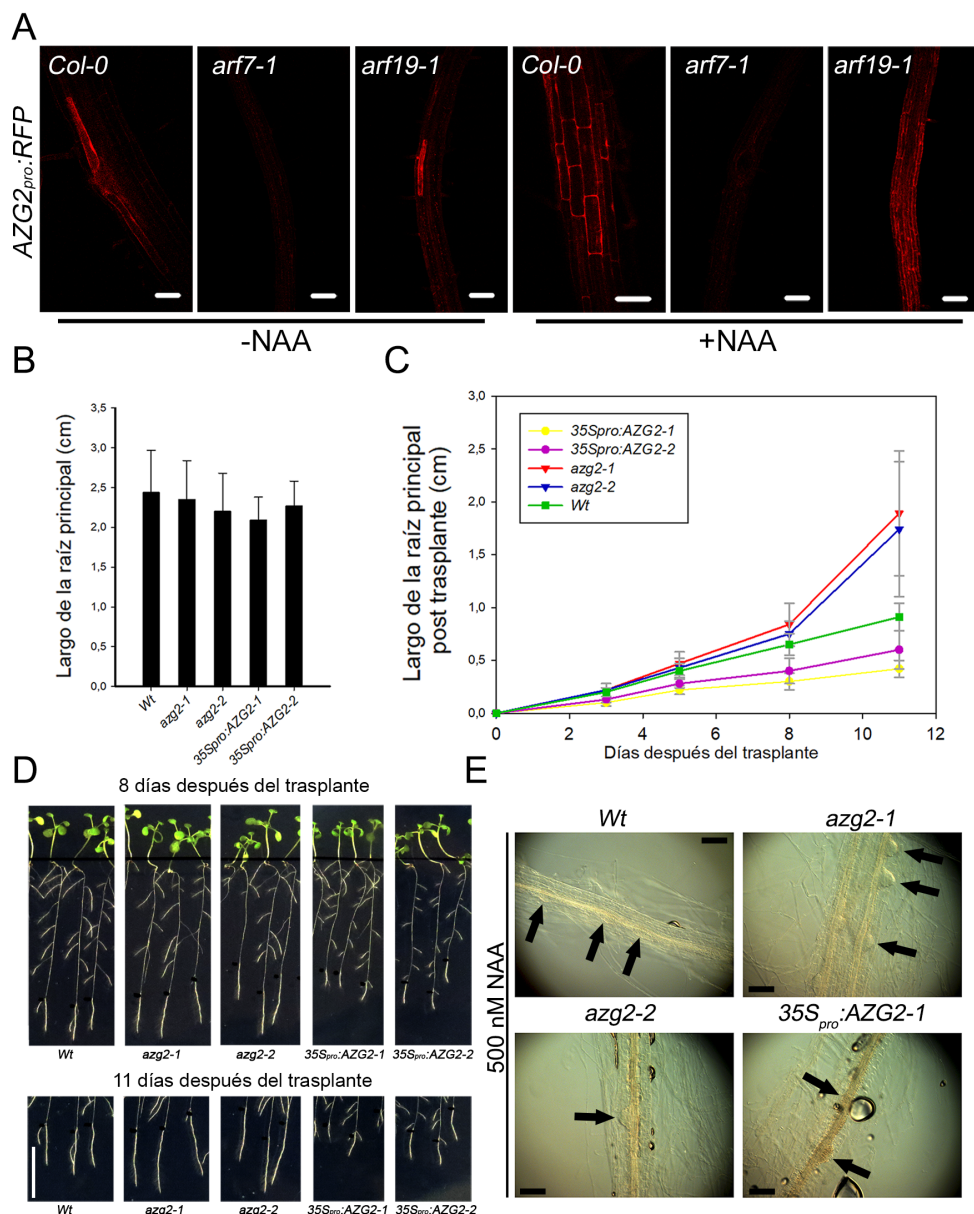
Como se mencionó, la expresión de AZG2 es dependiente de auxinas (Figura 8B y Figura Suplementaria 7B), aunque hasta este momento se desconocían los mecanismos encargados de llevar a cabo esta inducción o la respuesta fisiológica de las distintas líneas al aporte exógeno de la hormona. Para estudiar los mecanismos aguas arriba de AZG2, se investigó en bases de datos (EFpBrowser- Winter, 2007; Genevestigator - Hruz, 2008) que factores de transcripción podían estar involucrados en la inducción dependiente de auxinas. Del análisis de datos de expresión de ARN resalta la dependencia de AZG2 del factor de transcripción ARF7 (Figuras Suplementarias 7C y 7D). Este factor de transcripción actúa frecuentemente de manera redundante con el factor de transcripción ARF19. Por ello, estos dos factores de transcripción fueron los elegidos para el abordaje experimental y se estudiaron las líneas *KO arf7-1* y *arf19-1*. Dichas líneas fueron transformadas de manera estable con la construcción *AZG2<sub>pro</sub>:RFP*. Se analizó la expresión del constructo en ambas líneas junto con el genotipo silvestre (*Col-0*) en condiciones control y con la aplicación de 1  $\mu$ M de la auxina NAA exógena. En condiciones control (MS 0,5x) las líneas *Col-0* y *arf19-1* mostraron la misma señal observada en la descripción general de la expresión de AZG2, mientras que en la línea *arf7-1* no se observó señal (Figura 24A). Para conocer si los cambios en la expresión dependientes de la inducción con auxinas están influenciados por la falta de alguno de los factores de transcripción se realizó una inducción de 12 h con NAA. Las líneas *Col-0* y

*arf19-1* nuevamente respondieron de manera similar, mostrando señal deslocalizada de AZG2, que puede verse más allá de las inmediaciones del primordio de RL. En la línea *arf7-1* nuevamente no se observó señal. En concordancia con lo que puede observarse en los perfiles de expresión de las líneas *KO* de los factores de transcripción ARF7 y ARF19, publicados por Okushima et al. (2005), los resultados muestran que la expresión de AZG2, es dependiente del factor de transcripción ARF7 pero no de ARF19.

Debido al efecto que tienen las auxinas en la regulación de la expresión de AZG2, resulta importante estudiar la respuesta de las distintas líneas mutantes del transportador a la aplicación de esta hormona. Para ello se realizó un experimento que contempló el trasplante de plántulas de placas con MS 0,5x a placas con MS 0,5x + 0,5  $\mu$ M NAA a los 5 ddg. El largo de la raíz principal se midió previo al trasplante sin obtener diferencias significativas entre las líneas (Figura 24B). Posteriormente, las plantas fueron fotografiadas a los 3, 5, 8 y 11 días después de iniciado el tratamiento y se monitoreó el crecimiento de la raíz principal después del trasplante. Ambas líneas *KO* mostraron una tasa de crecimiento de la raíz principal más alta que la línea *Wt* (Figuras 24C y 24D). Por otro lado el fenotipo opuesto fue observado en las líneas SE, que fueron las que menor tasa de crecimiento presentaron.

La aplicación de auxinas tiene efectos pleiotrópicos, por lo que resulta complejo atribuir la diferencia observada en los mutantes de AZG2 a una única causa. Por ello, para poder entender las diferencias morfo-fisiológicas detrás de este fenotipo, se observó el desarrollo de los primordios en las distintas líneas bajo el microscopio. Focalizándonos nuevamente en el desarrollo de primordios de RL, pero en este caso solamente de la raíz que creció en presencia de NAA, se encontraron diferencias morfológicas entre las líneas. En las líneas *azg2-1* y *azg2-2*, a los 10 días de la exposición a auxinas se observaron primordios desarrollados, de morfología normal a punto de emerger así como otros ya emergidos (Figura 24E). En la línea *Wt*, se observaron algunos primordios de morfología normal, aunque predominantemente primordios amorfos y de desarrollo retrasado, sugiriendo que estarían siendo sometidos a algún tipo de inhibición de la emergencia (Laplaze et al., 2007). Esta última situación se observó más notablemente en la línea SE, en la cual los primordios observados mostraron estadios retrasados, primordios quiescentes o amorfos. Como se evidencia en estos resultados, las auxinas inducen un transportador de CK, su hormona antagonista durante el desarrollo radical, conformando un nuevo ejemplo de un ciclo de retroalimentación negativa.

11.4 Las auxinas regulan la expresión de AZG2, estableciendo un ciclo de regulación cruzada con citoquininas

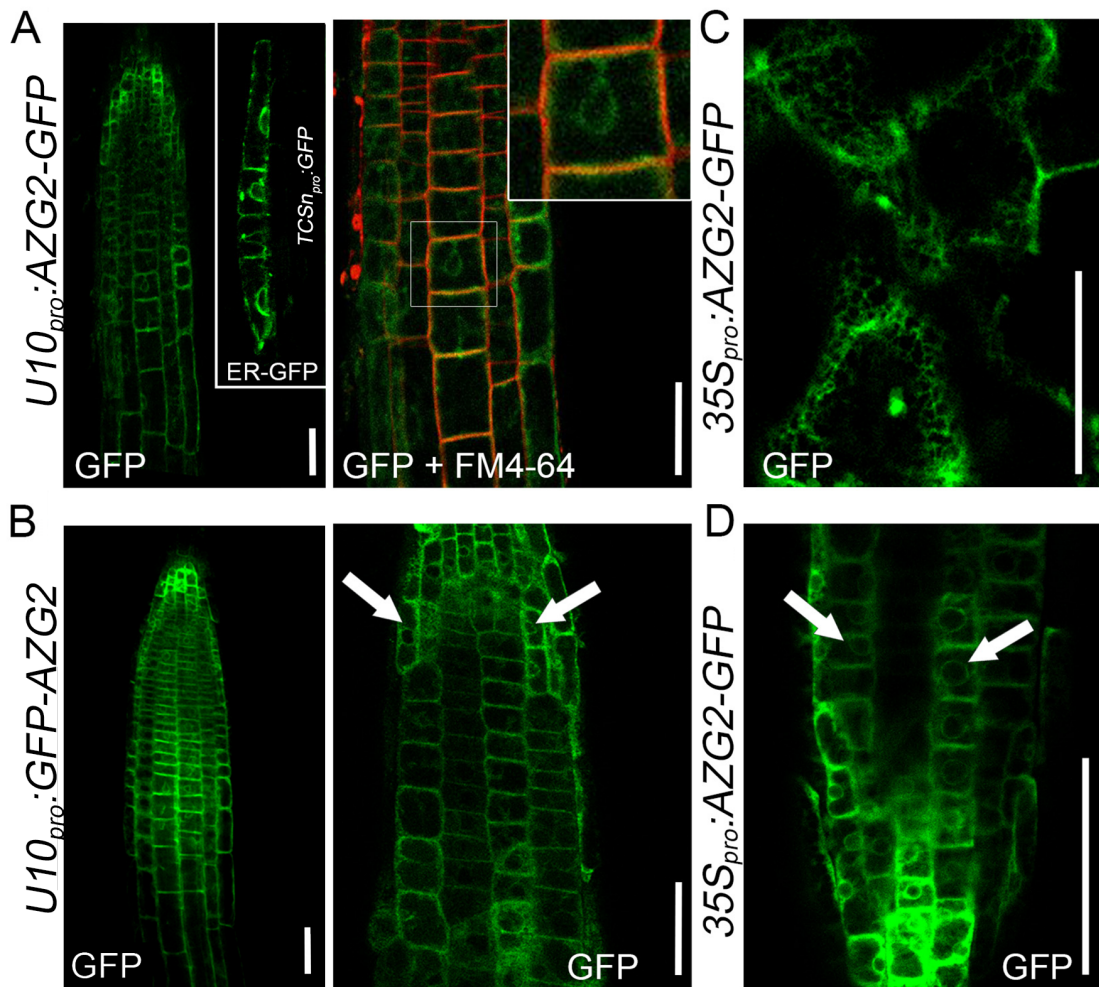


**Figura 24. Relación entre de la señalización por auxinas y el gen Azg2. (A)** Actividad del promotor de *Azg2* en genotipos silvestre (*Col-0*) y KO de los factores de transcripción *ARF7* (*arf7-1*) y *ARF19* (*arf19-1*) utilizando el reportero *RFP*. Las plántulas fueron sometidas a un tratamiento de 12 horas con MS 0,5x o MS 0,5x + 1  $\mu$ M ácido naftalen acético (NAA) **(B-E)** Estudio del sistema radical de líneas mutantes del gen *Azg2* en presencia de auxinas. **(B)** Largo promedio de la RP en las distintas líneas previo al inicio del tratamiento con NAA. Las barras de error representan el D.E. **(C)** Crecimiento de la raíz principal a los 3, 5, 8 y 11 días posteriores al traspaso de las plántulas a placas con 0,5  $\mu$ M NAA. **(D)** Plántulas representativas de la respuesta de los distintos genotipos al tratamiento con NAA tras 8 y 11 días. **(E)** Morfología de los primordios de RL (flechas negras) en los distintos genotipos. Las barras de escala representan **(A y E)** 100  $\mu$ m y **(D)** 1 cm.

## 11.5. AZG2 se localizaría en membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplasmático

Hasta el momento conocemos diversos aspectos de AZG2 que nos han permitido realizar una importante caracterización del transportador. Sin embargo, para poder establecer un modelo de señalización que lo contemple es fundamental conocer su destino subcelular. Al igual que para AZG1 se utilizó el algoritmo de predicción de péptidos señal SignalP-5.0 (Petersen et al., 2011). Este determinó que AZG2 no presentaría un péptido de tráfico subcelular (Figura Suplementaria 5B). En el caso de AZG2, como los datos de SUS sugirieron que su extremo N-terminal, podría estar orientado hacia el apoplasto, se realizaron fusiones N- y C- terminales. Ambas fusiones fueron expresadas bajo el control del promotor ubiquitina10 (U10) que como ya se mencionó tiene la ventaja de brindar un nivel de expresión parejo, ubicuo y moderado. Tanto las líneas N- como C- terminales mostraron el mismo patrón de expresión, sin grandes diferencias en la intensidad de la señal (Figura 25A y 25B). Se pudo determinar que existe colocalización con la sonda de membrana FM4-64, aunque también se observó señal en el citosol. Esta señal presenta en muchos casos la forma de anillo con prolongaciones que se extienden en un patrón reticulado. Este patrón correspondería con la presencia de AZG2 en el RE rodeando al núcleo (Figura 25B; flechas; Lomin, 2017), aunque al tratarse de células radicales no se puede ser totalmente concluyente. Como respaldo de este patrón, se puede comparar con lo observado para la construcción *TCSn<sub>pro</sub>:GFP*, cuya proteína fluorescente presenta un péptido de retención en RE (HDEL). Esta señal presenta las mismas estructuras descritas para AZG2 (Figura 25A; ER-GFP). Finalmente, para poder recolectar más evidencia acerca de la posible localización de AZG2 en RE, se utilizó una construcción *35S<sub>pro</sub>:AZG2-GFP*. Esta línea presentó el mismo patrón de expresión en raíz aunque como era esperable, mayor nivel de la señal (Figura 25D). Esta mayor intensidad nos permitió observar la localización de AZG2 en epidermis foliar. En estas células la señal mostró el patrón característico del RE, en forma de red y rodeando los núcleos celulares (Figura 25C).

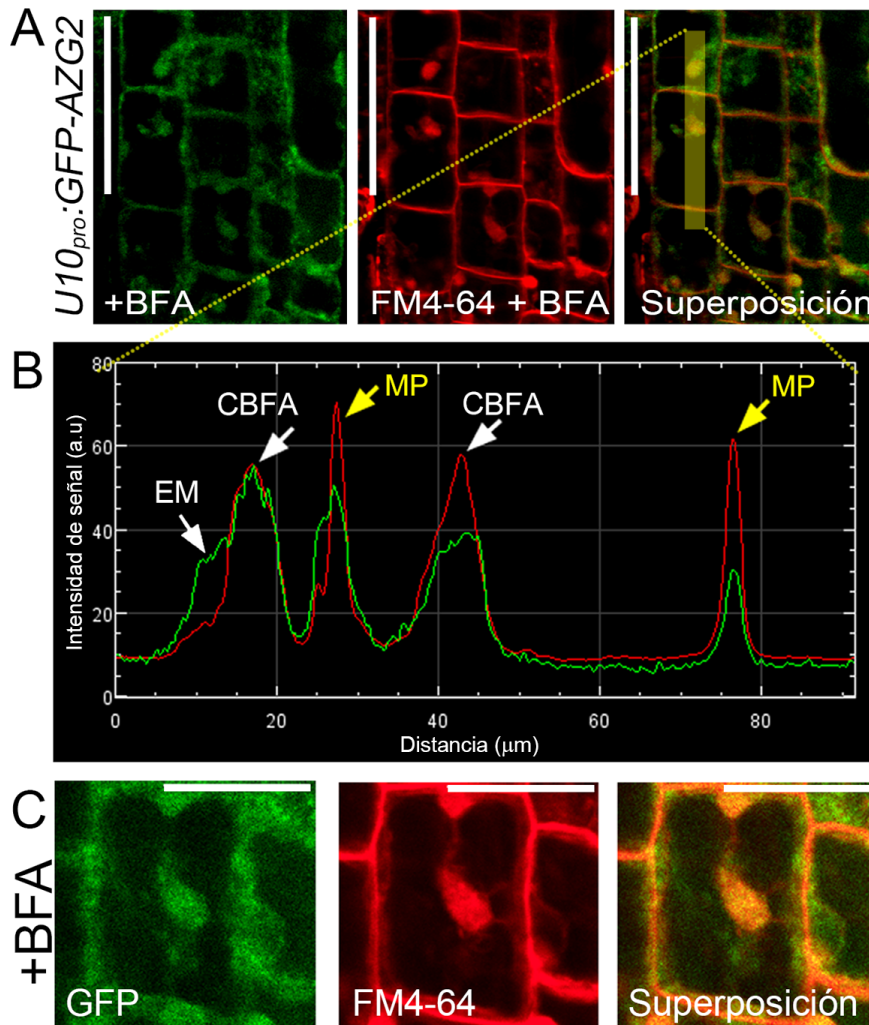
Para estudiar el tráfico de la proteína a nivel subcelular se estudió el efecto de la toxina fúngica Brefeldina A (BFA). Esta toxina interrumpe el reciclado de proteínas de la membrana plasmática, ya que estas una vez que se endocitan no pueden volver a fusionarse y se acumulan en vesículas conocidas como cuerpos de BFA. Tras una incubación de 1 h, se pudo observar señal de GFP-AZG2 en los cuerpos de BFA, sugiriendo que AZG2 llega a la MP, y una vez que se recicla se acumula en estos cuerpos, junto con la sonda de membrana plasmática FM4-64 (Figura 26A). La colocalización de ambas señales puede notarse en el perfil de intensidades a lo largo de un trazado representado en la figura 26A. Allí se observan picos coincidentes para la señal verde y roja correspondiente a MP y a



**Figura 25.** Estudio de la localización subcelular de AZG2. (A-B) Señal de la fusión (A) N-terminal y (B) C-terminal de AZG2 con la proteína fluorescente GFP. Se observa la señal de GFP y la señal de superposición con el marcador de membrana plasmática FM4-64. El recuadro ER-GFP corresponde a la expresión de la construcción  $TCS1_{pro}:GFP$  cuyo reportero presenta un péptido de retención en RE. (C y D) Señal de la fusión AZG2-GFP dirigida por el promotor de sobre expresión 35S en (C) células del pavimento de la hoja y (D) zona meristemática de la raíz. Las flechas blancas señalan la señal perinuclear del reportero. Las barras de escala representan 50  $\mu m$ .

los cuerpos de BFA (Figura 26B). Sin embargo se puede ver que hay señal del canal verde que no co-localiza con picos del canal rojo. Estos corresponderían a la localización de AZG2 en endomembranas, que según lo que se argumentó anteriormente correspondería a RE.





**Figura 26. Sensibilidad de AZG2 a Brefeldina A.** (A) Señal de la línea pU10:GFP-Azg2 después de 1 h de tratamiento con Brefeldina A 1 mM (BFA) seguido por 10 minutos de incubación con la sonda FM4-64. (B) Cuantificación del perfil de intensidad de fluorescencia del reportero GFP (verde) y la sonda FM4-64 (rojo) en la región limitada por el rectángulo amarillo en la figura A (MP: membrana plasmática; CBFA: compartimento de Brefeldina A; EM: endomembrana). (C) Detalle de una célula de la raíz en la zona de elongación tras ser tratada por 1 h con BFA 1 mM. Las barras de escala representan (A y B) 50 μm y (C) 25 μm.

## 12. Discusión - Capítulo IV

Estudios previos han mostrado que la localización de AZG2 es restringida y en raíces se localiza rodeando primordios de RL. En este estudio se profundizó la caracterización de la expresión en raíz, de manera que se pudo establecer que AZG2 se expresa solamente en células de la corteza y epidermis radical. Además, dentro de estos tejidos, AZG2 se expresa en un número reducido de células (normalmente <10) rodeando los primordios, correspondiente a los antes mencionados OLT. Estas células deben llevar a cabo una reorganización ordenada para permitir el paso del primordio, la que ha sido relacionada a la actividad de un transportador de auxinas (LAX3; Swarup et al., 2008). Resulta de gran interés que en estas células se exprese AZG2, un transportador de la hormona antagónica a las auxinas, sugiriendo que podría tener un rol en el remodelado de la pared celular.

Curiosamente el único lugar en el que se detectó expresión de AZG2 fuera de raíces fue en las semillas en proceso de germinación. Gracias a cortes histológicos en semillas que expresan *AZG2<sub>pro</sub>:GUS* se pudo inferir que el transportador se expresaría en el endosperma micropilar. Esta capa celular, también se encuentra en proceso de reordenamiento de la pared celular para permitir la emergencia de la radícula (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Nuevamente, resalta la localización restringida y delimitada de AZG2, en un tejido en activa remodelación de pared.

Por otro lado, gracias a la caracterización previa de AZG2, se conocía que el transportador es parte de un mecanismo de regulación de la emergencia de RL. Sin embargo, hasta el momento se desconocían los mecanismos aguas abajo de la actividad de AZG2 que repercuten en la emergencia de los primordios. Gracias a estas observaciones, junto con el actual análisis de primordios no emergidos, actualmente se encuentra en desarrollo un proyecto en el cual se establecieron con éxito los primeros vínculos de AZG2 con el remodelado de pared celular (Pettinari, tesina de grado, 2019).

La restringida expresión de AZG2 hace que sean necesarios métodos de gran resolución espacial para poder comprender las implicancias de su actividad. La posibilidad de contar con el sensor de CK *TSCn<sub>pro</sub>:GFP* ayudó a encontrar un vínculo directo entre el transportador y los niveles de señalización por CK. Esto nos permitió establecer la razón causal del fenotipo de las líneas *KO* de AZG2 al



mostrar que la ausencia del transportador repercute en los niveles de señalización. Tanto utilizando los promotores *TCSn* o *ARR5*, o estudiando el fenotipo de los *KO*, se observó que estos últimos son menos sensibles a CK (endógenas o exógenas). Asimismo, este fenotipo estaría ligado directamente a ese fenómeno, pudiendo tratarse de un déficit en el transporte de la hormona hacia un grupo de células con un particular rol regulatorio. En relación a esto último, la importancia de las células que comprenden el dominio de expresión de *AZG2* en la regulación de la formación de RL ya ha sido descrita por Lucas et al. (2013) y será retomado en la conclusión.

Si bien ya se demostró que no existía una interacción directa entre los transportadores y los receptores, la actividad de estos últimos es dependiente de la presencia de *AZG2*, por lo menos en los OLT. Para poder completar el rompecabezas de la señalización resulta fundamental conocer tanto la localización de los receptores y de *AZG2*. Actualmente los primeros pasos dentro de la señalización de CK están siendo discutidos, con la localización subcelular de los receptores AHK como principal incógnita (Romanov et al., 2018). Este tópico será retomado más adelante con el fin de poder establecer un modelo de actividad para *AZG2*.

En cuanto a la relación de *AZG2* con auxinas se pudo avanzar considerablemente en el entendimiento de los mecanismos aguas arriba de la inducción del transportador. *AZG2* es parte de los genes inducidos por el factor de transcripción ARF7. Este factor de transcripción está involucrado en múltiples procesos de desarrollo de la raíz y junto con ARF19 son vitales para la ramificación del sistema radical (Wilmoth et al., 2005). Este es un nuevo indicio que refuerza el rol de *AZG2* en un mecanismo de regulación de la emergencia radical finamente ajustado.

En su tesis de grado Brumm (2013; Univesidad de Tübingen) muestra que 170pb del promotor de *AZG2* son suficientes para que se induzca su expresión, y que esta inducción puede ser potenciada por la aplicación de auxinas exógenas. Para que la inducción de *AZG2* sea directamente dependiente de ARF7, es de esperar que en estas 170pb se encuentre algún sitio AuxRE (TGTCTC o TGTCCG, sitios de unión a factores de transcripción ARF; Ulmasov et al., 1997). Un simple análisis de secuencia del promotor demostró que no se encuentran sitios AuxRE dentro de las primeras 2000 pb del promotor. Si bien, la existencia de un sitio AuxRE no es concluyente, ya que cerca de la mitad de los genes de *A. thaliana* tienen uno de estos sitios (Mironova et al., 2014), se abre la posibilidad de que exista algún mediador entre ARF7 y la inducción de *AZG2*. Para poder explicar la inducción se contemplaron distintos factores de transcripción, dentro de los cuales se destacaron los miembros de la familia LBD (Lateral Organ Boundaries Domain) que actúan cascada debajo de ARF7 y están implicados en la regulación de emergencia de RL (Lee et al., 2009). Se trata de los factores de transcripción LBD16,

LBD18 y LBD29 . Directa o indirectamente, todos ellos están involucrados además en la remodelación de la pared celular mediante la inducción de expansinas u otras enzimas. Los LBD, para llevar a cabo su función reconocen patrones específicos en el ADN. Particularmente LBD29 se une a una secuencia G-Box (CACGTG; Xu et al., 2017) que está presente en el promotor de AZG2. Esta secuencia se encuentra a 165pb aguas arriba del codón iniciador. LBD29 a su vez, es el responsable de la inducción del transportador LAX3 que comparte su dominio de expresión con AZG2 (Porco et al., 2016). Por su parte, LBD16 y LBD18 actúan aguas abajo de LAX3 y AUX1 regulando el desarrollo de RL (Lee et al., 2015). Comprender en detalle este mecanismo de regulación resulta fundamental para poder cerrar el círculo de regulación cruzada entre auxinas y CK, siendo necesarios más experimentos para poder ser concluyentes sobre qué factores se encuentran induciendo directamente AZG2, así como aquellos que actúan en respuesta a la actividad del transportador.

La importancia de la interacción con auxinas se evidencia en las diferencias fenotípicas encontradas en las líneas mutantes de AZG2 cuando se las expuso a NAA. Se observó que mientras en condiciones normales los mutantes de AZG2 no presentaron diferencias en el crecimiento de la raíz principal, posteriormente a la exposición a auxinas, las líneas respondieron de manera diferencial. Mientras que los *KO*, desarrollaron su raíz principal a mayor tasa que la línea *Wt*, los SE mostraron la respuesta opuesta. La observación de la morfología de los primordios ayuda a comprender los fenotipos observados. Mientras que la ausencia de AZG2 facilitaría la emergencia de los primordios de RL, la presencia del transportador así como en mayor medida la sobreexpresión del transportador generaría una tensión entre la formación y la emergencia de primordios. Esto bloquearía procesos como la remodelación de pared celular antes mencionada, que repercutirá finalmente en primordios abortivos o quiescentes, con un consecuente retraso en el crecimiento de la RP.

Por último, se estudió la localización subcelular de AZG2 con el objetivo de conocer cómo se mueven las CK a nivel celular. Esto resulta de gran interés ya que el campo de estudio de las CK se encuentra en activa discusión acerca de dónde se desencadena la cascada de señalización. Desde nuestro grupo de trabajo, intentamos aportar información a estos modelos de señalización, mediante la descripción de la localización subcelular de los transportadores AZG, que formarían parte del mecanismo de transducción de la señal. El principal punto de controversia se trata de donde se localizan los receptores de CK a nivel subcelular (Kang et al., 2017; Lomin et al., 2017; Romanov et al., 2018). Actualmente coexisten dos posturas, una indica que la señalización se inicia en la membrana plasmática, mientras que la otra sostiene que los receptores se encuentran en el RE y por lo tanto las CK contactarían sus receptores en el lumen de esta organela. Contemplando las hipótesis

en pugna, la interpretación de la localización de AZG2 resulta compleja. Por un lado, AZG2 muestra claramente señal que colocaliza con las sondas de membrana plasmática. Por otro lado, se observa señal en el citosol con proyecciones y anillos. Cabe destacar que estos patrones aparecieron en todas las fusiones evaluadas, así como también ante los distintos niveles de expresión. En primera instancia y de manera simplemente comparativa, el patrón recuerda a la morfología del RE, aunque en raíces no tenga una huella tan característica. Las estructuras anulares observadas corresponderían a la envoltura perinuclear del RE. Finalmente, estudiando el patrón de AZG2 en epidermis foliar, se pudo observar el típico patrón de red y confirmando que AZG2 se localiza también en retículo endoplasmático. En este punto, aparece la pregunta de si la localización en el citosol se trata de un artefacto por mal plegamiento o por la sobreexpresión de la proteína. Si bien, es difícil descartar este fenómeno, como se mencionó antes todas las fusiones y los distintos niveles de expresión mostraron el mismo patrón, sugiriendo que la localización de AZG2 no estaría afectada por un artefacto de la técnica.

Por otro lado la susceptibilidad de la fusión GFP-AZG2 a la toxina Brefeldina A, más allá de la complejidad que requiere su análisis definitivo permite obtener algunas conclusiones parciales. Particularmente nos enfocamos en confirmar que AZG2 es capaz de dejar el retículo endoplasmático para llegar a la membrana plasmática. La acumulación de señal en cuerpos de BFA permite deducir que la fusión con el reportero sale del retículo para entrar en la vía secretoria, a través de la red de trans-Golgi.

Las evidencias recabadas en los resultados muestran que AZG2 permitiría la comunicación del citosol tanto con el apoplasto como con el lumen de RE. Sin embargo cabe destacar que esto solo ocurriría en un pequeño grupo de células donde es activo el promotor de AZG2. Esta localización es de particular interés, en función del estudio de la localización de los receptores de CK. Existen trabajos que los localizan en la membrana de RE, así como otros que fundamentan que pueden detectar su actividad en membrana plasmática. En el primer caso, el dominio sensitivo de los AHK estaría orientado hacia el lumen del RE, por lo que AZG2, permitiría a las CK ingresar al lumen e interactuar con ellos. Por otro lado, la localización en membrana plasmática, podría permitir que las CK entren al citosol, para posteriormente ingresar al RE o bien, permitir la exportación de CK sintetizadas en estas células. Estas afirmaciones son coherentes con la caracterización de la dinámica de transporte estudiada por Eva Winklebaur en su tesis de grado. La caracterización mostró que AZG2 actuaría como canal selectivo que no utiliza fuentes de energía, es funcional en un amplio rango de pH y que tampoco tendría preferencia por importar o exportar el sustrato.

Las conclusiones obtenidas en este capítulo son fundamentales para poder integrar lo que se conoce hasta aquí acerca de los dos transportadores AZG de *A.*

*thaliana*. Contrastar todos los puntos nos permitirá generar un modelo de señalización que contemple la actividad de ambos en el marco del conocimiento del área.



---

## Parte III

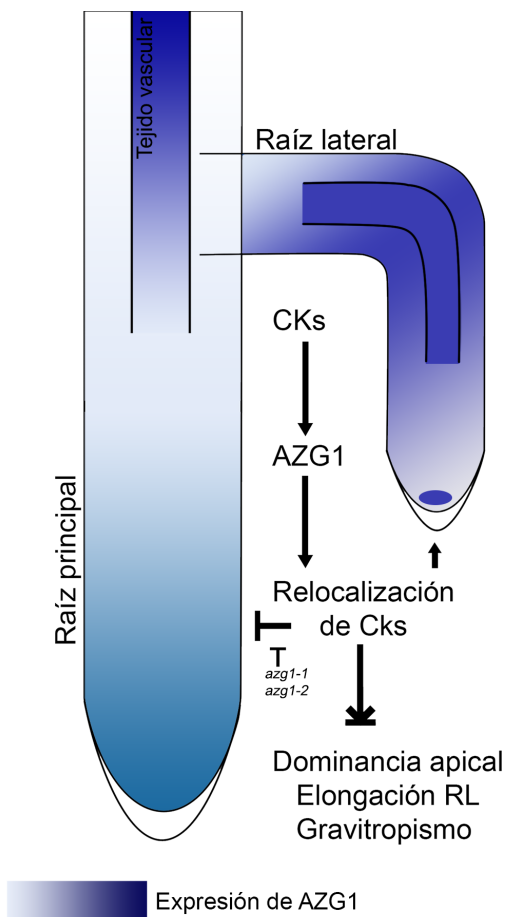
# Conclusión y perspectivas

El presente trabajo apuntó a estudiar la función de los transportadores de la familia AZG en plantas. Particularmente, nos enfocamos en el estudio de la regulación del desarrollo de la raíz, debido a que los antecedentes sugerían que los transportadores podrían tener un rol en este proceso, mediante la relocalización de CK. La arquitectura radical, resultado de los distintos procesos regulatorios de la raíz, está principalmente determinado por el crecimiento de la raíz principal y la formación de nuevas raíces laterales. Este último proceso resulta un buen modelo de estudio para la genética del desarrollo vegetal, ya que implica la formación de un nuevo órgano a partir de un pequeño grupo de células indiferenciadas. Durante este proceso, se conoce en gran nivel de detalle cómo actúan las auxinas, pero poco se conoce acerca del aporte de otras fitohormonas (Muraro et al., 2011). Incluso lo que se conoce de estas es cómo alteran la homeostasis de auxinas (Marhavy et al., 2011). Nuestros resultados, apoyan la existencia de un mecanismo regulatorio de la arquitectura radical, basado en el transporte local de CK, las cuales ejercerían su propio papel regulatorio y que en uno de los casos coordinarían la respuesta con auxinas mediante un bucle regulatorio.

## AZG1

De los dos miembros de la familia en *A. thaliana*, AtAZG1 es el que más características comparte con las versiones ancestrales de la familia. De hecho, la caracterización previa de este transportador muestra grandes similitudes con el miembro de *Emmericella nidulans*, EnAZGA. Esta caracterización de AtAZG1 nos sugiere que se trata de un importador de purinas o derivados como las CK mediante transporte activo y que es activo a pH ácido. Además presenta una expresión tisular generalizada y al expresarse en toda la planta, se pudo determinar que podría estar involucrado en la identidad de RP y RL, así como en la regulación de la dominancia apical. En principio la expresión del transportador sería inducida por CK y este permitiría la relocalización de la propia hormona. En condiciones normales AZG1 regularía el potencial de crecimiento de la RP, aportando al balan-

ce entre desarrollo de RL/RP. En el escenario de remoción del ápice de la RP, las plantas responden rompiendo la dominancia apical y promoviendo el crecimiento de las RL. En el caso de los *KO* de *Azg1*, este cambio de dinámica estaría limitado por la ausencia del transportador, repercutiendo en RL en promedio más cortas (Figura 27). Por otro lado, la aplicación de CK exógena normalmente genera plantas sin o con pocas RL y con una marcada dominancia apical. Para los *KO* de *Azg1*, esta aplicación podría simplemente hacer más notoria la ausencia del transportador, siendo ahora la falta de inhibición del meristema más evidente. Si bien en los estudios del transportador de los distintos mutantes en MS no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia en este sentido. Este modelo representa la primera aproximación a un entendimiento integral de la función de AZG1 en raíces. Para reforzar este modelo se debe continuar el estudio del fenotipo de las líneas mutantes de *Azg1*, la actividad de CK en estas líneas y otros factores (i.e. nutrición, redundancia génica, regulación cruzada con otras hormonas) que puedan ayudar a comprender la función del transportador.



**Figura 27. Modelo propuesto de la actividad de AZG1 en el sistema radical.** Las CK inducen la expresión del transportador AZG1, que se encargaría de la relocalización de las CK sintetizadas en la raíz. De esta forma, el transportador estaría ligado a procesos regulatorios como la dominancia apical radical, la elongación de las RL y el gravitropismo.

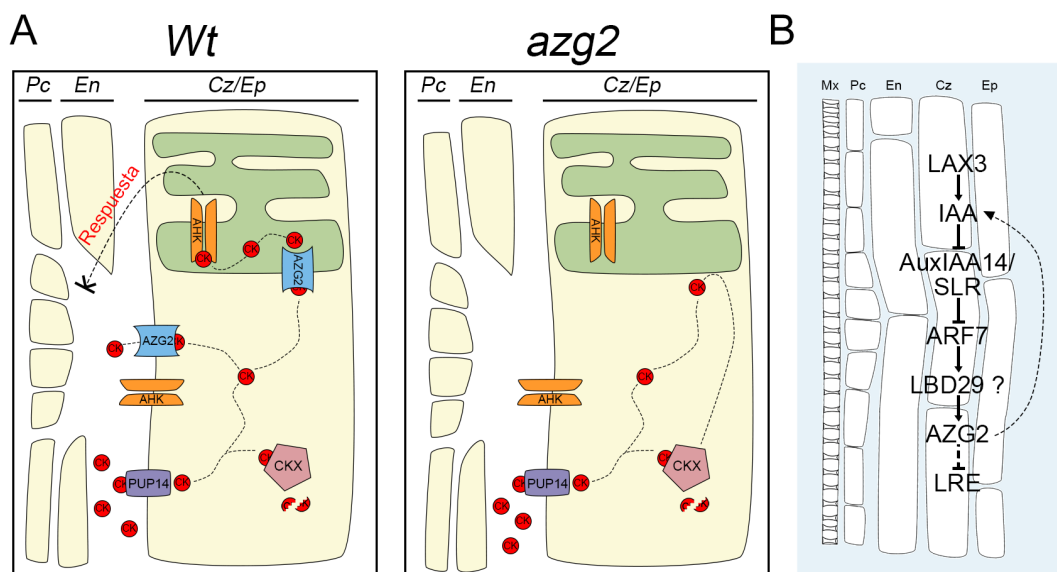
---

Un posible mecanismo regulatorio a estudiar puede estar dado por la interacción que mostró el transportador con AZG2, ya que comparten su dominio de expresión rodeando los primordios de RL. Por otro lado, si bien se han descrito mecanismos por los que se regula la concentración de CK activas, se desconocen cuáles de ellos están relacionados con la actividad de AZG1. Algunos candidatos para futuros estudios en el área son las enzimas de degradación de CK (CKX) especialmente a nivel citosólico, enzimas encargadas de la conjugación para la inactivación de la hormona, o de relocalización a otros tejidos con la ayuda de transportadores como ABCG14 (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014).

## AZG2

En contraposición con *AtAzg1*, *AtAzg2* puede tomarse como una novedad evolutiva que aparece posteriormente a que las plantas se hayan establecido definitivamente en la tierra y se estabiliza en Angiospermas. Las características de su expresión y lo que ya se conoce acerca de su función justifican esta afirmación, ya que sus funciones están dedicadas al desarrollo radical y potencialmente a la germinación de la semilla. Estos dos eventos son puntos de inflexión en la evolución de las plantas y coinciden con el momento en que se diferencia este gen de sus ancestros. Si bien AZG2 comparte con AZG1 muchas de sus características de transporte, se ha diferenciado en cuestiones claves como la dependencia de energía y el pH al que es activo. Esta especificidad también puede notarse en su expresión, ya que está sometido a una muy fina regulación, localizándose en un pequeño grupo de células sobre el primordio de RL y bajo la testa en semillas en proceso de germinación. Además AZG2 estaría presente no solo en membrana plasmática, sino también en endomembranas, más precisamente en el retículo endoplasmático. Estas características, permitirían a las células de los OLTs llevar a cabo su importante rol regulatorio sobre la emergencia de los primordios de RL (Figura 28A). La presencia del transportador, ayudaría a las CK a entrar al citosol en primera instancia y luego, en caso de no ser víctimas de degradación en el citosol (por enzimas CKX), al lumen del retículo endoplasmático, para encontrarse allí con los receptores de la hormona. Si bien Zürcher et al. (2016), defiende la presencia de receptores en la membrana plasmática, la actividad de PUP14 en estas células, y especialmente su alta afinidad por la hormona no permitiría que señalicen allí. Este modelo explica la insensibilidad que presentan las líneas *KO* de *Azg2*, así como lo menores niveles de señalización observados mediante el reportero *TCS<sub>npro</sub>:GFP*. La señal de estos receptores, integrada con el resto de la información que procesan estos tejidos, repercutiría en la regulación de la emergencia de nuevas RL. Si bien para este modelo se desconocen los mecanismos aguas debajo de esta regulación, se está estudiando actualmente el rol del transportador en las regulaciones de la activi-





**Figura 28. Modelo teórico de señalización dependiente de AZG2.** (A) En el genotipo Silvestre (*Wt*), el transportador PUP14 es capaz de tomar CK con gran afinidad, previniendo que se unan en sus receptores AHK en la membrana plasmática. Un rol equivalente podría estar a cargo de AZG2 en membrana plasmática. Una vez que las CK ingresan a citosol, pueden tomar dos vías alternativas. Pueden ser degradadas por enzimas CKX, o transportadas dentro del lumen del RE por AZG2. En este compartimento podrían interactuar con sus receptores, gatillando la cascada de señalización, que finalmente ayudara a regular la emergencia de RL. Por otro lado en el genotipo KO, la ausencia de AZG2 provocaría una acumulación de CKs a nivel citosólico por la actividad de PUP14, quedando fuera del alcance de los receptores, impidiendo que se genere la respuesta regulatoria a cargo de CK en los OLTs. (B) AZG2 es parte de una red de señalización que involucra auxinas y CK. Este bucle de señalización comienza con la toma de auxinas por el transportador LAX3 en células de los OLTs, liberando a ARF7 de su inhibición. Este factor de transcripción induce a su vez a LBD29 (u otro LBD), que sería el encargado de inducir directamente la expresión de AZG2. La actividad de este transportador a través de mecanismos todavía no dilucidados, actúa como un inhibidor de la emergencia de RL. Además, el cambio local en los niveles de CK tendrían impacto en la homeostasis de auxinas. (Mx: Metaxylema; Pc: Periciclo; En: Endodermis; Cz: Corteza; Ep: Epidermis).

dad de remodelado de pared celular con resultados prometedores. Nuevamente, se trata de un campo donde se conoce la dependencia de las enzimas de remodelado de pared celular a auxinas (Lee and Kim, 2013), pero se desconoce su relación con CK. Nuestros resultados indican que la actividad de AZG2, sería fundamental para limitar la actividad de dichas enzimas en los OLTs, regulando así la emergencia de nuevas RL. La remodelación de tejidos es un evento fundamental para permitir el progreso de los primordios a lo largo de las sucesivas capas de celulares que deben atravesar.

---

Un punto que apoya la hipótesis de AZG2 como regulador del remodelado de pared celular es la vía de señalización de la que forma parte. Sabemos que la expresión de AZG2 es dependiente del factor de transcripción ARF7, aunque también especulamos con que ARF7 no interactuaría directamente con el promotor de AZG2, sino que probablemente sea un miembro de la familia LBD quien se una para controlar la expresión del transportador. Ambas familias de factores de transcripción están ligados a la regulación de la arquitectura radical, más precisamente a la emergencia de RL (Okushima et al., 2007; Feng et al., 2012). Por el lado de la señalización por auxinas, LBD29 está a cargo de la inducción del transportador LAX3 (Figura 28B; Porco et al., 2016). Este transportador de auxinas, sería el encargado de ingresar la hormona a las células donde se expresa AZG2 y por lo tanto fundamental para su expresión (Swarup et al., 2008). Este evento comprende un nuevo ejemplo de la comunicación cruzada entre auxinas/CK observado en múltiples procesos del desarrollo vegetal. El transporte a cargo de LAX3 también está involucrado en la regulación de remodelado de pared celular al influir sobre la expresión de enzimas como expansinas (EXP), poligalacturonasas (PG/ADPG) o xyloglucano:xyloglicosil transferasas (XTR). Aquí nuevamente son importantes los factores de transcripción LBD, ya que son los encargados de regular la inducción EXP17 y EXPA4 (Lee and Kim, 2013; Lee et al., 2013).



---

Parte IV  
Materiales y métodos



## 13. Materiales

### 13.1. Organismos

#### 13.1.1. Plantas

Se utilizó *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Col-0* como *Wt.* Las líneas con distintas inserciones de T-DNA en *azg1-1* (SAIL 114E03), *azg1-2* (GK 681A06), *azg2-1* (SALK 000904), *azg2-2* (Sail 658 G02), *arf7* (SALK 040394) y *arf19* (*arf19-1*) fueron obtenidas en del Nottingham Arabidopsis Stock Center (<http://arabidopsis.info/>). Las líneas fueron caracterizadas genéticamente por el grupo de investigación del Dr. Desimone (director de esta tesis) en el instituto ZMBP de la universidad de Tuebingen y cedidas generosamente para este estudio. Se confirmó su homocigosis para la inserción de T-DNA por PCR así como la ausencia de transcriptos del gen de interés.

#### 13.1.2. Bacterias

##### *Escherichia coli*

- DH5 $\alpha$  (proporcionada por Dra. Marianela Rodriguez, CIAP-INTA, Córdoba, Argentina)
- Top10 (provista por ZMBP, Tübingen, Alemania).

##### *Agrobacterium tumefaciens*

- C58, resistente a rifampicina y ampicilina (proporcionada por el laboratorio de la Dra. María Elena Álvarez, CIQUIBIC, Córdoba, Argentina).

#### 13.1.3. Levaduras

Se utilizaron las cepas THY.AP4 y THY.AP5 obtenidas del centro de biología molecular de plantas de Tübingen (ZMBP).

### 13.2. Reactivos generales

Las sustancias fueron proporcionadas por Anedra (Argentina), Bayer (Leverkusen, Alemania), Biopack (Buenos Aires, Argentina), Britania (Buenos Aires, Argentina), CONDA S.A. (Madrid, España), Dorwill Química Analítica (Buenos Aires, Argentina), Laboratorios Cicarelli (Santa Fe, Argentina), Mallinckrodt (Gran

Breña), Merck (Buenos Aires, Argentina), MP Biomedicals (Santa Ana, CA, Estados Unidos), Oxoid (Hampshire, Inglaterra), PhytoTechnology Laboratories (Lenexa, KS, Estados Unidos), Sigma Aldrich (San Luis, MO, Estados Unidos), SintOrgan (Buenos Aires, Argentina), Taurus (Argentina), Tetrahedron (Mendoza, Argentina), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos). Los reactivos se listan en orden alfabético:

<b>Sustancia</b>	<b>Proveedor</b>
Ac(OH) (Ácido acético glacial)	Laboratorios Cicarelli
Acetato de Litio	Laboratorios Cicarelli
Acetato de Sodio	Laboratorios Cicarelli
AcK (Acetato de Potasio)	Anedra
Agar bacteriológico	Oxoid
Agarosa D1 Low EEOO	CONDA S.A.
Alcohol isoamílico	SintOrgan
Alcohol isopropílico	Laboratorios Cicarelli
Auxinas (Ácido Naftalen-acético - NAA)	PhytoTechnology
BASTA (glufosinato de amonio)	Bayer
BFA (Brefeldina A)	Thermo Fisher Scientific
Bromuro de etidio	MP Biomedicals
CaCl <sub>2</sub> (Cloruro de Calcio)	Laboratorios Cicarelli
Citoquininas (trans Zeatina)	Duchefa
Cloroformo	Laboratorios Cicarelli
CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)	Laboratorios Cicarelli
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Dorwill Química Analítica
EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético)	Sigma-Aldrich
Etanol (Alcohol Etilico)	Laboratorios Cicarelli
Extracto de levadura	Britania
FM4-64	Thermo Fisher Scientific
Glicerol	Laboratorios Cicarelli
HCl (Ácido clorhídrico)	Biopack
K(OH) Hidróxido de Potasio	Anedra
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fosfato dipotásico)	Laboratorios Cicarelli
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (Ferricianuro potásico)	Anedra
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (Ferrocianuro potásico)	Anedra
KCl (Cloruro de Potasio)	Anedra
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato monopotásico)	Laboratorios Cicarelli
KNO <sub>3</sub> (Nitrato de Potasio)	Laboratorios Cicarelli
Metilviológeno	Sigma-Aldrich
MgCl <sub>2</sub> (Cloruro de Magnesio)	Laboratorios Cicarelli

MnCl <sub>2</sub> (Cloruro de Manganeso)	Laboratorios Cicarelli
Na(OH) (Hidróxido de Sodio)	Laboratorios Cicarelli
NaCl (Cloruro de Sodio)	Anedra, Laboratorios Cicarelli
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> (Nitrato de Amonio)	Mallinckrodt, Taurus
Sacarosa	Laboratorios Cicarelli
Sales MS Completo	Sigma-Aldrich
Sales MS-N (MS sin Nitrógeno)	PhytoTechnology Laboratories
SDS (Dodecilsulfato sódico)	Sigma-Aldrich
Silwet L-77	Sigma-Aldrich
Triptona	Britania
Tris (Trisma Base)	Sigma-Aldrich
Tritón X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
X-Gluc	PhytoTechnology Laboratories

**Tabla 2.** Sustancias químicas utilizadas en este estudio y sus fabricantes

### 13.3. Medios de crecimiento y antibióticos

#### 13.3.1. Medio MS

**Medio MS completo (Murashige and Skoog, 1962) 0,5X:** Se disolvieron 2,15 g/l de sales MS completo y se llevó a pH 5,8 con K(OH).

**Medio MS sin Nitrógeno 0,5X + KNO<sub>3</sub> :** Se disolvieron 0,39 g/l de sales MS sin Nitrógeno. Se agregó 5 mM o 20 mM de KNO<sub>3</sub> según cada tratamiento particular y se llevó a pH 5,8 con K(OH).

#### 13.3.2. Medio LB (Luria Broth)

5 g/l extracto de levadura, 10 g/, triptona ,10 g/l NaCl ) (Sambrook et al., 1989).



### 13.3.3. Antibióticos

Nombre	Concentración final
Ampicilina (Amp)	100 $\mu\text{g/ml}$
Cloranfenicol (Cf)	50 $\mu\text{g/ml}$
Espectinomicina (Spe)	50 $\mu\text{g/ml}$
Higromicina (Hyg)	50 $\mu\text{g/ml}$
Kanamicina (Kan)	50 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicina (Rf)	50 $\mu\text{g/ml}$
Tetraciclina (Tc)	50 $\mu\text{g/ml}$

**Tabla 3.** Antibióticos

### 13.4. Materiales de Biología molecular

Los materiales de biología molecular fueron proporcionados por EURx (Gdansk, Poland), Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos), Kapa biosystems (Wilmington, MA, Estados Unidos), Macherey Nagel GmbH (Düren, Alemania), Molecular research center Inc. (Cincinnati, OH, Estados Unidos), Qiagen (Hilden, Alemania), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos) y Zymo research (Irvine, CA, Estados Unidos).

#### 13.4.1. Enzimas

Enzima	Fabricante
DNAsa I	Qiagen
DNA Polimerasa I	Thermo Fisher Scientific
DNA Polimerasa Phusion High-Fidelity	Thermo Fisher Scientific
BamHI, BglII, EcoRI, EcoRV, Sall, SmaI, SpeI, XbaI, XmaI, XhoI	Thermo Fisher Scientific
Eco31I FastDigest High Fidelity	Thermo Fisher Scientific
RevertAid Premium M-MuLV	Thermo Fisher Scientific
RNAasa A	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA ligasa	Thermo Fisher Scientific
LR clonasa	Invitrogen
BP clonasa	Invitrogen

**Tabla 4.** Enzimas utilizadas

### 13.4.2. Kits

Kit	Fabricante
CloneJET PCR Cloning Kit™	Thermo Fisher Scientific
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific
NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel GmbH
Tri Reagent	Molecular research center, Inc.
peqGOLD Gel Extraction Kit™	PEQLAB Biotechnologie GmbH
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo research

**Tabla 5.** *Kits utilizados*

### 13.4.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron suministrados por GenBiotech (Buenos Aires, Argentina), Biomers.net (Ulm, Alemania), Sigma-Aldrich (Munich, Alemania) e Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Los oligodT utilizados como *primers* para sintetizar cDNA fueron provistos por Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos)

## 13.5. Plásmidos

### 13.6. Vectores

Los vectores generados durante este trabajo se listan en la Tabla 6. Los mapas de los vectores se presentan en las figuras suplementarias 1 a 3.

### 13.7. Construcciones desarrolladas por otros autores

En la Tabla 7 se listan las construcciones realizadas por otros autores que fueron utilizadas en este trabajo o que presentan secuencias que sirvieron como molde para amplificar DNA por PCR.

Construccion	Resistencia en Bacteria	Resistencia en planta	Vector donante	Vector de destino
<b>AZG1<sub>pro</sub>:GUS</b>	Kan	Hyg	pDONR207-pAzg1-GW	pMDC163 (Curtis and Grossniklaus, 2003)
<b>ARR5<sub>pro</sub>:GUS</b>	Kan	Hyg	pDONR207-pARR5	pMDC163 (Curtis and Grossniklaus, 2003)
<b>pNX35-NubG-Azg1</b>	Amp	-	pDONR207-Azg1CDS-ST	pNX35-Dest (Grefen and Blatt, 2012)
<b>pXNubA22-Azg1-NubA</b>	Amp	-	pDONR207-Azg1CDS-wo	pXNubA22-Dest(Grefen and Blatt, 2012)
<b>pNX35-NubG-Azg2</b>	Amp	-	pDONR207-Azg2CDS-wo	pNX35-Dest (Grefen and Blatt, 2012)
<b>pXNubA22-Azg2-NubA</b>	Amp	-	pDONR207-Azg2CDS-wo	pXNubA22-Dest (Grefen and Blatt, 2012)
<b>pMetYC-Azg1-CubPLV</b>	Amp	-	pDONR207-Azg2CDS-wo	pMetYC-Dest (Grefen et al., 2009)
<b>pMetYC-Azg2-CubPLV</b>	Amp	-	pDONR207-Azg2CDS-wo	pMetYC-Dest (Grefen et al., 2009)
<b>U10<sub>pro</sub>:AZG1-GFP</b>	Spec	Basta	pDONR207-Azg1CDS-wo	pUBC-GW-GFP-DEST (Grefen et al., 2010)
<b>AZG1<sub>pro</sub>:AZG1-GFP</b>	Kan	Hyg	pDONR207-pA1::A1CDS-wo	pMDC107(Curtis and Grossniklaus, 2003)
<b>U10<sub>pro</sub>:AZG2-GFP</b>	Spec	Basta	pDONR207-Azg2CDS-wo	pUBC-GW-GFP-DEST (Grefen et al., 2010)
<b>U10<sub>pro</sub>:GFP-AZG2</b>	Spec	Basta	pDONR207-Azg2CDS-wo	pUBN-GFP-GW (Grefen et al., 2010)
<b>35S<sub>pro</sub>:AZG2-GFP</b>	Spec	Basta	pDONR221-attB3-Azg2attB2 (V007); pDONR221attB1Azg1attB4	pFRETcg-2in1-CC (Hecker et al., 2015)

**Tabla 6.** Construcciones plasmídicas generadas durante el presente proyecto

Constructo	Creador
$pGPTV-AZG2_{pro}:GUS$	Eva Winklbauer
$pPGG-AZG2_{pro}:GFP$	Sabine Brumm
$pPGR-AZG2_{pro}:RFP$	Sabine Brumm
$pTSCn1_{pro}:GFP$	Dr. Bruno Müller

**Tabla 7.** Construcciones plasmídicas generadas por otros autores

## 13.8. Equipos

Equipo	Fabricante
Autoclave	Lutz Ferrando y Cia. S.A. (Buenos Aires, Argentina)
Agitador magnético Inox con temperatura	Decalab S.R.L. (Buenos Aires, Argentina)
Balanza analítica de 2 decimales Traveler	Ohaus (Buenos Aires, Argentina)
Balanza analítica de de 4 decimales	Metler-Toledo (Columbus, OH, Estados Unidos)
Baño termostático de bloque seco	Eppendorf (Hamburgo, Alemania)
Baño termostático de bloque seco	Bioblock Scientific (Illkirch-Graffenstaden, Francia)
Cámara de flujo laminar vertical HL-900	Sabella (Buenos Aires, Argentina)
Cámara fotográfica Nikon Coolpix L16	Nikon (Tokio, Japón)
Cámara Olympus DP71	Olympus (Shinjuku, Tokyo, Japan)
Centrífuga Sorval Biofuge Primo R	Thermo Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos)
Centrífugas 5417R, 5804R, 5810R	Eppendorf (Hamburgo, Alemania)
Electrodo HI 1332B	Hanna Instruments (Eibar, España)
Espectrofotómetro Biophotometer	Eppendorf (Hamburgo, Alemania)

Espectrofotómetro SP 2000 UV	Bioamerican Science (Buenos Aires, Argentina)
Estufa de cultivo Hessico	Cassa Otto Hess S.A. (Buenos Aires, Argentina)
Estufa de cultivo ME	Dalvo Instrumentos (Santa Fe, Argentina)
Estufa para secado BHR	Dalvo Instrumentos (Santa Fe, Argentina)
Fuente de poder MP 320	Major Science (Saratoga, CA, Estados Unidos)
Macroscopio óptico estereoscópico SZX16	Olympus (Shinjuku, Tokyo, Japan)
Microscopio óptico BX61	Olympus (Shinjuku, Tokyo, Japan)
Minicentrífuga compacta	Biozym (Hamburgo, Alemania)
pHmetro	Parsec Biotechnik (Curitiba, Brasil)
Shaker Titramax 101	Heidolph (Schwabach, Alemania)
SP8 LIGHTNING	Leica (Wetzlar, Alemania)
TCS SP2	Leica (Wetzlar, Alemania)
Termociclador GenePro Block B 48 D	Bioer Technology (Hangzhou, China)
Termociclador PCR Palm CG1-96	Corbett Research (Australia)
Transiluminador UV M-20	UVP Inc (Upland, CA, Estados Unidos)
Ultrafreezer	Ultrafreezer Righi (Buenos Aires, Argentina)
Vortex	Decalab (Buenos Aires, Argentina)

**Tabla 8.** Equipos utilizados durante el presente estudio y sus fabricantes

## 13.9. Software

Programa	Desarrollador
Adobe Photoshop CC 14.0 x64	Adobe Systems Inc. (San José, CA, Estados Unidos)
AmplifX 1.5.4	Jullien (2008)
Autodock 1.5.6	Molecular Graphics Laboratory
Clustal W2	EMBL-EBI
Dendroscope 3.5.8	Huson, 2017
DNASStar Lasergene 7.0.0	DNASStar (Madison, WI, Estados Unidos)
Double Digest Calculator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos)
FIJI-ImageJ	Schindelin et al. (2012)
HMMR	(Eddy, 1998)
Infostat 2013	Di Rienzo et al. (2013)
Mega 7	Kumar, 2015
MEME	Bailey, 2009
Microsoft Excel 2013 (15.0) x64	Microsoft (Redmond, WA, Estados Unidos)
PyMOL 2.0.7	Schorodinger LLC.
SigmaPlot 12.3	Systat Software Inc. (San José, CA, Estados Unidos)
Texmaker 5.0.3	Free Software Foundation, Inc.
T-DNA Primer Design	SALK Institute Genomic Analysis Laboratory ( <a href="http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html">http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html</a> )
UCSF Chimera 1. 11.2	University of California
Vector NTI 10.3	Invitrogen
Vina	The Scripps Research Institute

**Tabla 9.** Programas utilizados durante el presente trabajo



## 14. Métodos

### 14.1. Experimentos con plantas

#### 14.1.1. Condiciones generales de crecimiento

Para el crecimiento de las plantas, las semillas fueron estratificadas a 4 °C por 2-3 días. Luego de la imbibición, fueron colocadas en una cámara de crecimiento (día 0 para tratamientos experimentales) bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 22 °C y a una intensidad lumínica de 100-150  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  en placas con medio MS 0.5x (Agar 1 % p/v) o en bandejas con una mezcla de tierra:vermiculita (1:2). En éste último caso las plantas fueron regadas periódicamente con agua.

La siembra de semillas en placas con medio MS 0.5x (Agar 1 % p/v) se realizó en condiciones estériles. Para esterilizar las semillas, éstas fueron colocadas en tubos Eppendorf con 1 ml de solución de lavado (Tritón X-100 0,05 % v/v, etanol 70 % v/v), mezcladas con vortex y se dejaron reposar por 10 minutos. Se descartó la solución y se agregó 1 ml de etanol 96 % a los tubos. El contenido de los tubos fue mezclado con vortex, y los tubos se dejaron reposar por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el lavado de las semillas con etanol 96 % fue repetido nuevamente. Alternativamente, las semillas fueron mezcladas con la solución de lavado por inversión lenta de los tubos durante 20 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y se agregó 1 ml de etanol al 96 %. Las semillas fueron mezcladas por inversión lenta de los tubos durante 10 minutos y luego fueron colocadas en un papel estéril en una cámara de flujo laminar. Una vez que se secaron, las semillas fueron sembradas en placas con el medio apropiado.

#### 14.1.2. Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* de entre 6 y 8 semanas fueron transformadas utilizando el método de *floral dip* (Clough and Bent, 1998). Antes de sumergir las plantas, las silículas y flores abiertas fueron removidas. El método consistió en colocar colonias de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* C58) previamente transformadas con el vector binario de interés, en 100 ml de medio LB líquido con los antibióticos apropiados. Los cultivos crecieron toda la noche a 28 °C. Previo a la saturación de los cultivos ( $\text{DO} \approx 0,6$ ) se retiraron del incubador y se colocaron a 4 °C por una hora. Los cultivos fueron centrifugados por 10 minutos a 4.000 RPM a 4 °C. Se descartaron los sobrenadantes y los precipitados fueron resuspendidos en 100



ml de medio para transformación de plantas (MS 0,5x- K(OH) pH 5,7, sacarosa 50 g/l, Tween-20 0,05 % v/v o , 0.005 % Silwet v/v, N<sup>6</sup>-Benciladenina 44 nM). Cada maceta con 5 a 10 plantas fue sumergida en el medio por 30 segundos. Las plantas fueron embolsadas y colocadas a 4 °C en oscuridad toda la noche. Luego fueron descubiertas y colocadas bajo las condiciones de crecimiento generales hasta obtener semillas.

## 14.2. Recuperación de líneas transgénicas

Para obtener líneas transgénicas fueron utilizados dos sistemas de crecimiento alternativos dependiendo del marcador de resistencia. Para seleccionar plantas resistentes a higromicina las semillas T1 fueron sembradas en medio MS 0,5x (Agar 1 % p/v) con el antibiótico a 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , fueron estratificadas y luego germinaron y crecieron en condiciones generales. Para la selección de plantas resistentes a BASTA las semillas T1 fueron sembradas en bandejas con tierra:vermiculita (1:2), estratificadas y luego crecidas de acuerdo a las condiciones generales descritas. Luego de 1 y 2 semanas de crecimiento las plantas fueron asperjadas con una solución de BASTA a una concentración de 15 mg/l. En ambos casos, después de 7 a 14 días de crecimiento las plantas resistentes fueron transferidas a macetas con tierra:vermiculita (1:2). Para confirmar las inserciones de T-DNA se realizaron PCRs a partir de DNA extraído de hojas de las plantas resistentes. Las plantas que se confirmaron como positivas para la inserción de T-DNA crecieron en condiciones generales hasta obtener semillas T2 que fueron sembradas en medio selectivo. Para verificar plantas transformadas con reporteros fluorescentes las semillas T2 fueron sembradas en placas verticales con medio MS 0.5x (Agar 1 % p/v), fueron vernalizadas y luego transferidas a la cámara de crecimiento, donde crecieron durante 7 a 10 días en condiciones generales. Se observó la zona de elongación de la raíz principal o los tejidos correspondientes de expresión de cada línea bajo microscopía de epifluorescencia.

Se consideró que las líneas presentaron una única inserción en el genoma de *A. thaliana* cuando las plantas producto de la autopolinización de la T1 respetaron la proporción mendeliana 3:1 en cuanto a resistencia al antibiótico selectivo. Entre 5 y 10 líneas T2 independientes de inserción única de T-DNA fueron recuperadas para cada construcción. Las semillas obtenidas a partir de diferentes plantas T2 resistentes fueron sembradas nuevamente en medio selectivo y luego o fueron confirmadas como cigotas cuando el 100 % de las plantas resistieron el antibiótico.

### 14.2.1. Aplicación de hormonas

La aplicación de hormonas se realizó en placas junto con el medio de cultivo habitual. En el caso de auxinas se agregó al medio 1 mM de ácido Naftalen-acético

(NAA; stock disuelto en Etanol + Na(OH)). Para CK se utilizó trans Zeatina 0,2  $\mu\text{M}$  agregada al medio MS convencional. En todos los casos las hormonas se agregaron cuando el medio no superó los 60° C y se mantuvieron alejados de la exposición a la luz.

#### 14.2.2. Detección de actividad GUS

La actividad glucoronidasa fue analizada a partir de plantas u órganos vegetales cosechados posteriormente a la aplicación de los respectivos tratamientos según el protocolo de Martin et al. (1992) con modificaciones menores. El material vegetal fue colocado en tubos Eppendorf o Falcon de 50 ml con 1 ml de solución GUS (Buffer  $\text{K}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM pH 7,2, EDTA 10 mM,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.5 mM,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  3 mM, Triton X 100 0,2 % (v/v), X-Gluc 1 mM). Las muestras fueron incubadas a 37 °C toda la noche (para *AZG2<sub>pro</sub>:GUS*) o hasta percibir la tinción a simple vista (entre 3 y 6 horas para resto de las construcciones) y luego la solución fue reemplazada por etanol 80 % v/v para terminar la reacción. Los tejidos o plantas fueron incubados por 10 minutos y se renovó el etanol 80 % v/v. Este paso se repitió hasta eliminar los pigmentos vegetales definitivamente. Las muestras fueron observadas en un estereoscopio. Los muestras fueron rehidratadas progresivamente por incubación durante diez minutos con soluciones de etanol 60 %, 40 %, 20 % y 10 % v/v. Las raíces teñidas fueron montadas en portaobjetos con glicerol 50 % v/v , etanol 5 % v/v para observación por microscopía óptica y adquisición de imágenes.

#### 14.2.3. Descripción de la expresión de *Azg1*

Plántulas transformadas de manera estable y homocigotas para la construcción *AZG1<sub>pro</sub>:GUS* fueron cultivadas en placas con MS 0,5x durante 15 ddg para estudios en plántulas y se trasplantaron a tierra para crecer por 15 días más con el fin de obtener plantas adultas. En el caso de los tratamientos con CK se realizó una exposición corta de 4 h con tZ 0,2  $\mu\text{M}$  previo a la tinción. Las plántulas fueron fotografiadas en microscopio y las plantas adultas en lupa.

#### 14.2.4. Estudio de la arquitectura radical

Para el estudio del sistema radical de los mutantes de *Azg1* se cultivaron en cámara de cultivo con un fotoperiodo 16 h luz 8 h de oscuridad plántulas durante 9 ddg en placas verticales con medio MS 0,5x sin nitrógeno + 20 mM  $\text{KNO}_3$ . Las plantas fueron fotografiadas y los parámetros morfológicos fueron estudiados mediante ImageJ-FIJI. En el caso de la caracterización con el agregado de 0,2  $\mu\text{M}$  tZ, las plantas fueron cultivadas por 12 ddg.

#### 14.2.5. Estudio de ruptura de dominancia apical por corte de MAR

Se cultivaron plántulas en placas con MS 0,5x sin nitrógeno + 5 mM KNO<sub>3</sub>. A los 7 ddg se seccionó la raíz removiendo 5 mm del ápice. Las plantas continuaron su crecimiento en las mismas condiciones de cultivo y fueron fotografiadas a los 10 días después del corte. Los parámetros de crecimiento de las raíces fueron determinados mediante ImageJ-FIJI.

Las mismas condiciones fueron utilizadas para el estudio de los reporteros *AZG1<sub>pro</sub>:GUS*, *DR5<sub>pro</sub>:GUS* y *TCSn<sub>pro</sub>:GFP*.

#### 14.2.6. Cuantificación de actividad de CK mediante *TCSn<sub>pro</sub>:GFP*

Se cultivaron plantas de *A. thaliana* de las líneas *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/Col-0*, *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/azg1-2*, *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/azg2-1 1* y *TCSn<sub>pro</sub>:GFP/azg2-1 2* en placa durante 7 ddg en el caso del tratamiento con MS o 9 ddg en el tratamiento con MS + tZ. Además como control de inducción de la expresión del promotor plántulas crecidas en MS se incubaron 24 h con tZ. Se fotografiaron raíces mediante microscopía confocal centrando la imagen en un primordio de RL de estadios jóvenes (I a IV). En el microscopio Nikon Eclipse Ti se tomaron 12 planos confocales con un objetivo x20 (1024\*1024) por cada imagen con el fin de reconstruir el cilindro radical. Esta reconstrucción fue realizada posteriormente mediante ImageJ-FIJI. Se generó para cada imagen una proyección en Z tomando los valores promedios. De esta forma se tomaron un mínimo de siete raíces para cada línea y se calculó para cada una la intensidad media de fluorescencia en el cilindro radical.

#### 14.2.7. Reconstrucción tridimensional del dominio de expresión de *AZG2*

Se obtuvieron imágenes mediante microscopio confocal de los tejidos en los que se observó expresión de *AZG2<sub>pro</sub>:GFP*. Para ello se tomaron 29 planos confocales (2 μm por cada paso) correspondientes a la región de expresión de *AZG2*. Las imágenes fueron procesadas en ImageJ-FIJI. Se sustrajo el ruido de fondo, se aplicó un filtro de mediana 3D y con el stack se reconstruyó la imagen tridimensional. Con la reconstrucción 3D se generaron las imágenes transversales a través del cilindro mediante el comando “Orthogonal views” .

#### 14.2.8. Tinción GUS de semillas

Semillas de *A. thaliana* llevando la construcción *AZG2<sub>pro</sub>:GUS* fueron colocadas por 48 horas en heladera a 4 °C para luego ser transferidas a cámara de cultivo donde permanecieron por 8 y 24 h con luz continua previo a comenzar la tinción de GUS según se detalla más arriba. Las semillas y plántulas teñidas fueron observadas y fotografiadas bajo la lupa.

#### 14.2.9. Estudio del reportero $ARR5_{pro}:GUS$ en *azg2-1*

Plantas de *A. thaliana* Col-0 y *azg2-1* homocigotas para la construcción  $ARR5_{pro}:GUS$  fueron cultivadas en placa con MS 0,5x durante 10 ddg. Previo a la tinción de GUS las plántulas fueron tratadas alternativamente con MS 0,5x líquido o MS 0,5x líquido + tZ 0,2  $\mu$ M durante 20 h. Las plántulas teñidas fueron observadas y fotografiadas bajo microscopio óptico.

#### 14.2.10. Estudio de inducción de AZG2 por auxinas

Plántulas de genotipo *arf7-1* y *arf19-1* fueron transformadas de manera estable y seleccionadas en homocigosis para el constructo  $AZG2_{pro}:RFP$ . Las plántulas crecieron en cámara de cultivo en placas verticales con MS 0,5x durante 10 ddg para ser analizadas en el microscopio confocal. En el caso de los tratamientos con auxinas se incubó las plántulas durante 12 h en 1 mM NAA previo a la observación. Las plántulas fueron observadas y fotografiadas bajo el microscopio confocal Nikon Eclipse Ti.

#### 14.2.11. Estudio del fenotipo de líneas mutantes de AZG2 en presencia de NAA

Plantas mutantes de *Azg2* fueron cultivadas en MS 0,5x sin nitrógeno + 20 mM KNO<sub>3</sub> durante ocho días en un régimen de 16 h de luz / 8 de oscuridad. Se fotografiaron las plantas y se midió el largo de la raíz principal mediante ImageJ-FIJI. Al término de ese periodo las plantas fueron trasplantadas a placas con el mismo medio al que se le adicione 0,5  $\mu$ M NAA. Se marcó en las placas la longitud inicial de cada plántula. Las plántulas fueron fotografiadas a los 3, 5, 8 y 11 días después de iniciado el tratamiento. El crecimiento de la raíz principal tomado desde el punto de largo inicial, se midió en cada uno de los días usando ImageJ-FIJI. A los 5 días de tratamiento plántulas de todos los genotipos evaluados fueron cosechadas para ser analizados bajo el microscopio en modo DIC.

### 14.3. Experimentos con ácidos nucleicos

#### 14.3.1. Electroforesis en gel y cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos fueron mezcladas con colorante de carga (azul de bromofenol 40 % p/v, Glicerol 5 % v/v) y corridas en geles de agarosa 1 % (TAE 0.5X, Bromuro de etidio 0.0001 mg/ml) en una cuba electroforética con buffer TAE 0.5X (Tris 20 mM pH 7.6, Ac(OH) 10 mM, EDTA 0.5 mM) utilizando una fuente de poder a 100-120 mV. Se utilizaron como marcadores de peso molecular

y tamaño el fago  $\lambda$  0.2  $\mu\text{g}$  digerido con PstI u otros provistos por Thermo Fisher Scientific.

Para determinar la concentración de ácidos nucleicos se realizó electroforesis en gel de entre 1 y 5  $\mu\text{l}$  de muestra. La concentración de ácidos nucleicos fue determinada por comparación con un marcador de peso molecular utilizando la herramienta Gel Analyzer de FIJI-ImageJ. Alternativamente la concentración fue determinada mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop.

### 14.3.2. Extracción de DNA de plantas

Para extraer DNA de tejidos vegetales, las hojas de plantas *Wt* y plantas transgénicas fueron homogeneizadas con N líquido y transferidas a tubos Eppendorf. Se utilizaron alternativamente 2 protocolos de purificación de DNA.

En el primero, se agregaron 0,5 ml de buffer de aislamiento (CTAB 2 % p/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 % v/v) a las muestras y éstas fueron incubadas durante 30 minutos a 60 °C. Luego de agregar 1  $\mu\text{l}$  de RNAasa A, las muestras fueron incubadas por 15 minutos a 30 °C. Posteriormente, se agregaron 0,5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). El contenido de los tubos fueron mezclados varias veces por inversión y luego centrifugados por 20 minutos. Se rescataron 0,5 ml de sobrenadante en tubos nuevos y se agregaron 2/3 de isopropanol (1 ml aproximadamente). Las muestras fueron agitadas lentamente y luego incubadas durante 10 minutos en hielo. Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Se agregó lentamente etanol 75 % v/v frío a las muestras, y luego éstas fueron centrifugadas por 10 minutos. Tras descartar los sobrenadantes, se dejaron secar los precipitados y fueron resuspendidos en 20  $\mu\text{l}$  de agua milliQ estéril. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 14.000 RPM a 4 °C.

Alternativamente, a los tubos con material vegetal homogeneizado se agregaron 440  $\mu\text{l}$  de Buffer SENT (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 75 mM, SDS 0.5 % p/v). Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego centrifugadas por 5 minutos. Luego, 350  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos con 350  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Las muestras fueron incubadas por 20 minutos a -20 °C, y luego fueron centrifugadas por 15 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de etanol 70 % v/v a los tubos. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos, y luego se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados fueron secados por 15 minutos a 37 °C y luego fueron resuspendidos en 50  $\mu\text{l}$  de agua milliQ estéril. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 13.000 RPM a temperatura ambiente.

### 14.3.3. PCR

El DNA fue amplificado por PCR utilizando DNA Polimerasa I o KAPA3G Plant PCR Kit. Para amplificar DNA o cDNA utilizado para clonado se utilizó DNA Polimerasa Phusion High-Fidelity o High Fidelity Enzyme Mix. Las condiciones de PCR fueron establecidas según las recomendaciones del fabricante en cada caso. Para el diseño de *primers* y estimación de temperaturas de annealing se utilizó el programa AmplifX 1.5.4. Para el diseño de *primers* utilizados para verificar la presencia de inserciones de T-DNA en líneas mutantes se utilizó la herramienta T-DNA *Primer* Design de SALK Institute Genomic Analysis Laboratory.

### 14.3.4. Detección de inserciones de T-DNA

Para verificar la homocigosis de las líneas con inserciones de T-DNA se realizaron dos PCR por cada línea independiente a partir de DNA genómico. La primera reacción de PCR fue llevada a cabo con *primers* específicos del gen en su versión silvestre, y la segunda reacción de PCR fue realizada con un *primer* específico del T-DNA y otro de la secuencia codificante *Wt* correspondiente Tabla 10. Las plantas se consideraron homocigotas de las inserciones si ningún producto de PCR fue obtenido en la primer PCR, pero sí en las líneas *Wt*, y si los productos de la segunda PCR amplificaron y presentaron el tamaño esperado.

Línea	ID	Cebador sentido - antisentido
<b>T-DNA</b> <i>azg1-1</i>	SAIL_114E03	5'-ATTGGGGAGAAGAAGGTTTGGTCAAAT-3' 3' - 5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC-3'
<b>T-DNA</b> <i>azg1-2</i>	GK_681A06	5'-ATTGGGGAGAAGAAGGTTTGGTCAAAT-3' 3' - 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'
<b><i>Azg1</i></b> <b><i>Wt</i></b>	-	5'-CACCATGGAGCAACAGCAACAAACA-3' - 5'-ATTGGGGAGAAGAAGGTTTGGTCAAAT
<b>T-DNA</b> <i>azg2-1</i>	SALK_000904	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3' - 5'- TCAAACGATCTCGACGGTAGCG-3'
<b>T-DNA</b> <i>azg2-2</i>	SAIL_658_G02	5'-ATGACATCCTCCTCCTGCATTTG-3' - 5'- GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGC TTCC
<b><i>Azg2-</i></b> <b><i>Wt</i></b>	-	5'-ATGACATCCTCCTCCTGCATTTG-3' - 5'- TCAAACGATCTCGACGGTAGCG-3'

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados para el chequeo de línea KO utilizadas durante el estudio. Los pares de oligonucleótidos fueron dirigidos a las inserciones (T-DNA) y a los genotipos silvestres (*Wt*)

### 14.3.5. Clonado Gateway

Las purificaciones de productos de PCR e insertos fueron realizadas con peqGOLD Gel Extraction Kit<sup>TM</sup> o PureLink<sup>TM</sup> Quick Gel Extraction Kit, a partir geles de agarosa. Los productos de PCR o insertos purificados fueron introducidos en los vectores de entrada mediante la clonasa BP Gateway según las indicaciones del fabricante (reacción BP; <http://www.img.bio.uni-goettingen.de/ms-www/internal/methods/Vector%20Systems/gatewayman.pdf>).

Los vectores resultantes fueron introducidos en bacterias y se seleccionaron las recombinaciones exitosas cultivándolas junto con los antibióticos específicos para cada vector de entrada. De las colonias positivas se extrajeron los vectores con Bacterial DNA Mini Kit<sup>TM</sup> peqGOLD y chequeadas mediante digestión y secuenciamiento. Los vectores de entrada se combinaron con los vectores de destino mediante recombinación LR (reacción LR). Nuevamente el producto de la reacción fue usado para transformar bacterias que fueron seleccionadas según los antibióticos de cada vector de destino. Colonias positivas fueron seleccionadas y tras la extracción plasmídica se chequeo la recombinación mediante patrón de digestión.

### 14.3.6. Amplificación de plásmidos

Para recuperar o amplificar DNA plasmídico rutinariamente se utilizó la técnica de Miniprep. Los plásmidos utilizados para reacciones de secuenciación fueron amplificados con la técnica de Bacterial DNA Mini Kit<sup>TM</sup> peqGOLD.

### 14.3.7. Minipreparación (*Miniprep*)

Colonias de *E. coli* transformadas fueron repicadas en 3-5 ml de medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y crecieron toda la noche. Se transfirieron 1,5 ml de cultivo líquido a tubos Eppendorf que fueron centrifugados a 14.500 RPM por 20 segundos a temperatura ambiente. Este paso fue repetido 2 veces más para concentrar el cultivo bacteriano. Alternativamente los cultivos fueron centrifugados a 6.800 g por 2 minutos.

Los precipitados fueron resuspendidos en 100 (o 200)  $\mu$ l de Buffer de resuspensión frío (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10mM, Glucosa 50 mM, RNAsa A 10  $\mu$ g/ml). Se agregaron 200  $\mu$ l de solución de lisis (SDS 1 % p/v, Na(OH) 0.2M) y el contenido de los tubos fue mezclado por inversión. Opcionalmente los tubos reposaron por 5-10 minutos. Se agregaron 150 (o 200)  $\mu$ l de solución de neutralización helada (AcNa/AcH 3M pH 5.5) y los tubos fueron mezclados por inversión. Opcionalmente los tubos reposaron por 5-10 minutos. Los tubos fueron centrifugados por 5 minutos y luego los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos. Se agregaron 0.5-0.6 ml de isopropanol helado y los tubos fueron mezclados vigorosamente mediante vortex. Opcionalmente los tubos reposaron en hielo por 2

minutos. Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos y luego los sobrenadantes fueron descartados. Se agregaron 0.5 o 1 ml de Etanol al 70 % v/v helado y los tubos fueron centrifugados por 1-5 minutos. Luego de descartar los sobrenadantes, se dejaron secar los precipitados. Para secar rápidamente los precipitados, los tubos fueron colocados a 60-70 °C. Luego, los precipitados fueron resuspendidos en 20-50  $\mu$ l de agua milliQ y los tubos fueron almacenados a -20 °C. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 14.000-14.500 RPM a 4 °C.

#### 14.3.8. Análisis de secuencias

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el método de Sanger et al. (1977), empleando reacciones químicas de Big Dye Terminator, resueltas en un secuenciador automático de 4 capilares. Las muestras fueron secuenciadas por Magrogen Inc. (Corea del Sur), CERELA (Tucumán, Argentina) o GATC Biotech (Konstanz, Alemania). Las muestras enviadas a secuenciar fueron preparadas según las indicaciones de cada empresa. Se utilizó el paquete DNASTar Lasergene 7.0.0 para la visualización y alineamiento de secuencias.

### 14.4. Experimentos con microorganismos

Las bacterias utilizadas en este trabajo crecieron en medio Luria Broth (LB). Para la preparación de medio sólido se agregó agar bacteriológico al 1 % p/v.

#### 14.4.1. *Escherichia coli*

Para amplificar plásmidos se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  o Top10. Para obtener colonias en medio sólido o cultivos líquidos saturados las bacterias crecieron a 37 °C toda la noche. Se agregó el/los antibiótico/s apropiado/s al medio LB para el crecimiento selectivo de cultivos bacterianos.

#### Preparación de células competentes de *E. coli*

100 ml de medio LB fueron inoculados con 100  $\mu$ l de un cultivo líquido de *E. coli* que creció toda la noche a 37 °C en medio LB. El cultivo creció en agitación a 180 RPM a 18-20 °C hasta obtener una DO<sub>595</sub> de 0,6. Luego de reposar el cultivo en hielo por 10 minutos, el mismo fue centrifugado durante 15 minutos. El precipitado fue resuspendido suavemente en 50 ml de Buffer TB (HEPES 10 mM-K(OH) pH 6.7, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM. MnCl<sub>2</sub>, 55 mM) previamente enfriado, y luego fue incubado en hielo por 10 minutos. Luego de centrifugar la suspensión por 15 minutos, el precipitado fue resuspendido suavemente en 20 ml de Buffer TB previamente enfriado. Se agregó DMSO a una concentración final de 7 % v/v en agitación suave. Luego de incubar en hielo por 10 minutos, la suspensión



de células fue dividida en alícuotas de 0,2 ml en tubos previamente enfriados. Las células congeladas fueron almacenadas a -80 °C. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 1.600 g a 4 °C.

### **Transformación química de *E. coli***

Las células competentes fueron descongeladas en hielo. Luego de agregarles entre 0,5-10  $\mu$ l de DNA plasmídico, fueron incubadas en hielo por 30 minutos. Los tubos fueron colocados a 42° C por 45 segundos y luego fueron transferidos rápidamente a un baño de hielo durante 1 a 5 minutos. A las células transformadas con productos de ligación se agregaron 0.5 ml de LB+ (LB, Glucosa 0.4 % p/v, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, preparado antes de utilizar), y fueron incubadas durante 1 h con agitación suave a 37° C. posteriormente, las células fueron cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado para la selección incubándolas a 37 °C toda la noche.

#### **14.4.2. *Agrobacterium tumefaciens***

Para obtener colonias en medio sólido o cultivos líquidos saturados las bacterias crecieron a 28 °C por 2-3 días o toda la noche, respectivamente.

### **Preparación de células competentes**

100 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes fueron inoculados con 100  $\mu$ l de un cultivo líquido de *A. tumefaciens* que creció previamente toda la noche a 28 °C en medio LB. Las bacterias crecieron a 28 °C en agitación a 180 RPM hasta obtener una OD<sub>595</sub> de aproximadamente 0,6. Luego el cultivo fue centrifugado por 3 minutos y el sobrenadante fue descartado. El precipitado fue resuspendido en 50 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío, y la suspensión fue incubada por 30 minutos en hielo. La suspensión fue centrifugada por 3 minutos y el sobrenadante fue descartado. El precipitado fue resuspendido en 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío, y luego fue incubado por 30 minutos en hielo. La suspensión fue centrifugada por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. El precipitado fue resuspendido en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío, y luego incubado durante 30 minutos en hielo. A la suspensión de células se agregó glicerol a una concentración final de 20 % v/v, y fue dividida en alícuotas de 50 o 100  $\mu$ l en tubos de 1,5 ml previamente enfriados. Las células congeladas fueron almacenadas a -80 °C. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 3.500 RPM a 4 °C.

### **Transformación de células competentes**

Las células competentes fueron descongeladas en hielo. Luego de agregarles entre 5 y 10  $\mu$ l de plásmido, fueron incubadas en hielo por 10-30 minutos. Los

tubos fueron congelados en N líquido por 5 minutos y luego fueron incubados a 37 °C durante 5 minutos. Se agregó a las células entre 0,5 y 0.8 ml de medio LB y fueron agitadas a 28 °C durante 1-2 horas. Las células fueron plaqueadas en medio LB sólido con los antibióticos adecuados y luego incubadas a 28 °C por 2 o 3 días.

### 14.4.3. Conservación de bacterias

Las bacterias transformadas crecidas en medio sólido LB selectivo fueron almacenadas durante 2 meses a 4 °C. Para almacenar bacterias transformadas a largo plazo, 5 ml de LB selectivo fueron inoculados con colonias transformadas. Luego de que las bacterias crecieran toda la noche a 180 RPM a la temperatura adecuada, 500  $\mu$ l de cultivo fueron transferidos a tubos Eppendorf con 125  $\mu$ l de Glicerol estéril 100 %. El contenido fue mezclado por inversión de los tubos, que luego fueron congelados en N líquido y almacenados a -80 °C. Para obtener nuevos cultivos, las bacterias congeladas fueron repicadas de forma estéril con un ansa en medio LB selectivo sólido o líquido que fue incubado según las condiciones de crecimiento requeridas para cada caso.

### 14.4.4. Experimentos Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

Para los ensayos de interacción molecular mediante la técnica de Split Ubiquitin System (SUS) se utilizaron levadura de la cepa THY.AP4 y THY.AP5.

Nombre de la cepa	Especie	Características	Usos
THY.AP4	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; ade2 <sup>-</sup> , his3 <sup>-</sup> , leu2 <sup>-</sup> , trp1 <sup>-</sup> , ura3 <sup>-</sup> ; lexA::ADE2, lexA:: HIS3, lexA::lacZ	Cepa utilizada para transformar clones Cub; apropiada para "Bridge-Assay"
THY.AP5	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; ade2 <sup>-</sup> , his3 <sup>-</sup> , leu2 <sup>-</sup> , trp1 <sup>-</sup>	Cepa utilizada para transformar clones Nub.

**Tabla 11.** Cepas de levaduras utilizadas para el ensayo de Split Ubiquitin System

### 14.4.5. Preparación de células competentes

Se inocularon 5 ml de medio YPD (2 % p/v peptona, 2 % p/v glucosa, 1 % p/v extracto de levadura, 2 % p/v Agar, pH = 6.0) con levaduras de cepas AP4 y AP5. Las células fueron cultivadas bajo agitación toda la noche a 28-30° C. Este

precultivo fue utilizado para inocular 95 ml de medio YPD fresco, y se dejó crecer el cultivo en las mismas condiciones por 3 a 5 horas hasta alcanzar una DO de 0,6-0,8. Las células se colectaron mediante centrifugación (2000g) y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado con agua estéril y se sedimentaron nuevamente en centrífuga. El precipitado se resuspendió en 1 ml de 0,1 M acetato de litio (LiAc) y se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml. Se precipitaron las células y se descartó el sobrenadante (5 min, 1000 g). Se agregó 20 ml de 0,1 M LiAc por cada reacción de transformación y se las dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente para lograr células competentes.

#### 14.4.6. Transformación de células competentes

Se prepararon tubos por cada transformación con 9  $\mu$ l de ssDNA y 6  $\mu$ l de plásmido ( $\approx$  200 ng/ $\mu$ l). Se preparó por separado una mezcla con 70  $\mu$ l de PEG 50 % p/v, 10  $\mu$ l de 1 M LiAc, y 20  $\mu$ l de células competentes. Se mezcló 100  $\mu$ l de esta mezcla en los tubos con el ssDNA y el plásmido y se los incubó por 30 min a 30 °C. A los 20 min de la incubación se mezclaron las células con pipeta. Posteriormente se realizó un golpe de calor a 45° C por 15 min tras el cual se precipitaron las células (5 min a 2000 g) y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 100  $\mu$ l de agua estéril y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100  $\mu$ l de agua estéril. Se sembraron 50  $\mu$ l de células en placas SC (Medio mínimo SC (1 l): 1,7 g base de nitrógeno para levaduras (sin aminoácidos), 5 g Sulfato de amonio, 20 g glucosa, 1,5 g de SC-dropout mix (pH 6.0-6.3 ajustado con KOH), 20 g agar (solo para medios sólidos); (SC-ADE<sup>+</sup>, HIS<sup>+</sup>, TRP<sup>+</sup>, URA<sup>+</sup> para THY.AP4 y SC-ADE<sup>+</sup>, HIS<sup>+</sup>, LEU<sup>+</sup> para THY. AP5)). Se incubaron por 48-72 horas a 28-30 °C.

#### 14.4.7. Cruzamiento de levaduras

Se seleccionó una colonia de cada señuelo (Cub) y se lo incubó en 3ml de medio SC-ADE<sup>+</sup>, HIS<sup>+</sup>, TRP<sup>+</sup>, URA<sup>+</sup>. Por otro lado se seleccionó una colonia por cada presa (Nub) y se la cultivaron en medio SC-ADE<sup>+</sup>, HIS<sup>+</sup>, LEU<sup>+</sup>. A las construcciones de interés se le sumó las construcciones con la Nub- *Wt* como control positivo de interacción espontánea y como controles negativos los vectores vacíos de Nub para las fusiones N- y C- terminales. Ambos cultivos se incubaron toda la noche a 28-30° C. Se precipitaron las células y se resuspendieron en medio YPD (20 ml por cada cruzamiento). Se mezclaron 20ml de cada señuelo y presa según las combinaciones deseadas. 4 ml de cada combinación fueron inoculadas en placas cuadradas con medio YPD sólido y se incubaron toda la noche a 28-30° C. Con los cultivos ya crecidos, se repicó la siembra en placas con medio SC-ADE<sup>+</sup>, HIS<sup>+</sup> y se dejó crecer las colonias por 48hs-72 horas a 28-30° C. El crecimiento de las

células en este medio demostró que el cruzamiento de las levaduras fue exitoso al superar las auxotrofias.

#### **14.4.8. Detección de interacción proteica por crecimiento**

Células de 5 a 10 colonias de cada combinación fueron inoculadas en 2 ml de CSM Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup> y se incubaron toda la noche a 30 °C en agitación. Se tomaron 100 ml del cultivo, se precipitaron las células y se resuspendieron en agua estéril de forma que se obtuvo una DO<sub>600</sub>= 1. Se realizaron dos diluciones extra de cada combinación (1:10 y 1:100) y se sembró en gotas de 7 ml de cada uno en medio selectivo mínimo CSM (Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>, Ade<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>) con 0,5, 5, 50 y 500 mM de metionina, así como en placas de control de crecimiento CSM (Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>). Las placas de control de crecimiento fueron incubadas a 28-30 °C por 24 h mientras que las células creciendo en medio selectivo fueron incubadas durante 3-4 días. El resultado de estas placas fue escaneado para la interpretación cualitativa del crecimiento.

### **14.5. Microscopía, procesamiento y análisis de Imágenes**

#### **14.5.1. Microscopía óptica**

Las muestras fueron observadas con un estereoscopio Olympus SZX16 o con un microscopio Olympus BX61 en modo DIC. Para la adquisición de imágenes se utilizó una cámara Olympus DP71. Las imágenes fueron procesadas mediante Adobe Photoshop CS6.

#### **14.5.2. Microscopía de epifluorescencia**

Se utilizó el módulo de epifluorescencia del microscopio Olympus BX61 para observar expresión de las construcciones con reporteros fluorescentes en líneas T1 o T2.

#### **14.5.3. Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)**

Se trabajó con imágenes multidimensionales (dimensiones X, Y, Z) adquiridas mediante un microscopio confocal láser de barrido Leica TCS SP2 o Nikon Eclipse Ti. Las imágenes CLSM fueron obtenidas utilizando el software Leica Confocal Software para Windows NT (Workstation 4.0) o EZ-C1 respectivamente.

Para los experimentos de localización subcelular y colocalización, las imágenes fueron obtenidas con objetivos x20 y x60 (inmersión en aceite) a una resolución de 1024x1024 píxeles. Las plantas expresando GFP fueron excitadas con un láser a 488 nm y la emisión fue obtenida con un filtro de banda de 515/30 nm; RFP y

FM4-64 se excitaron a 543 nm y la emisión de fluorescencia fue detectada entre 605/75.

#### 14.5.4. Colocalización

Las imágenes obtenidas mediante CLSM fueron analizadas utilizando el software FIJI-ImageJ. Las imágenes se transformaron a 8-bits. A todas las imágenes se les realizó el mismo proceso de sustracción de ruido de fondo. Se utilizó el plugin *Coloc2* para obtener los parámetros con los que se evaluó la significancia de la colocalización (Manders et al., 1993; Costes et al., 2004). Se analizaron raíces principales de plántulas de 10 ddg crecidas en placas.

Por otro lado para realizar un perfil de intensidades se trazó una zona de interés a lo largo de la cual ImageJ-FIJI generó un gráfico con las intensidades de cada canal (GFP y FM4-64). Comparando el perfil emitido con la región de la imagen se vincularon los picos con estructuras celulares.

### 14.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada experimento fueron tabulados en el programa Microsoft Excel. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa estadístico Infostat. Las medias y errores estándar o desvío estándar obtenidos fueron graficadas utilizando SigmaPlot. La normalidad de los datos fue probada con el Test Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas fue analizada con la prueba de Levene según Balzarini et al. (2008). En los casos en que la variable no respetaba los supuestos se transformaron mediante operaciones matemáticas y se repitió el análisis estadístico.

### 14.7. Bioinformática y evolución molecular

#### 14.7.1. Minería de datos y entrenamiento de los algoritmos de búsqueda

Se llevó a cabo una búsqueda de secuencias proteicas en BlastP con *AtAzg1* (Uniprot: Q9SRK7). La búsqueda fue realizada sobre “Non-redundant protein sequences (nr)” dentro del taxón Viridiplantae. Los parámetros utilizados fueron: Expected threshold=1e-5, wordsize= 3 y Máximo 5000 secuencias. Se obtuvieron 274 secuencias de las cuales las secuencias repetidas fueron depuradas con CD-HIT. Las secuencias fueron alineadas con MAFFT online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) en sus parámetros preestablecidos. La visualización y edición del alineamiento fue realizada con Aliview. Se depuraron las secuencias incompleta o conflictivas y se realinearon zonas específicas manualmente. Se realizó con este

alineamiento una agrupación preliminar con ClustalW2. El árbol resultante se observó en Dendroscope donde se establecieron los tres grupos para el entrenamiento. Con HMMER se generaron matrices de sustitución aminoacídica para cada grupo y se repitió la búsqueda de secuencias con las nuevas matrices en la base de datos de secuencias de Viridiplantae para maximizar la especificidad y la sensibilidad.

### 14.7.2. Creación de filogramas y cladogramas

Las secuencias resultantes de la búsqueda definitiva fueron alineadas mediante MAFFT. Para generar el árbol definitivo se podaron ambas puntas del alineamiento manualmente y se utilizó MEGA7 para construir los árboles evolutivos. El árbol que contempla la totalidad de las secuencias obtenidas fue creado mediante el método de Neighbour Joining con 1000 Bootstraps. Por otro lado, el árbol con las secuencias de relevancia evolutiva fue creado mediante el método de Maximum likelihood con 100 bootstraps. Todos los árboles fueron analizados en Dendroscope.

### 14.7.3. Búsqueda de motivos de secuencia

Tras una búsqueda preliminar en Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) en búsqueda de motivos para *AtAzg1* y *AtAzg2*, se procedió a la determinación de motivos en los dos transportadores mediante MEME suite (<http://meme-suite.org/tools/meme>). En esta herramienta se utilizó el modo discriminativo. Para ello se comparó las secuencias del grupo de interés (homólogos de *Azg1* y *Azg2*) con el total de secuencias obtenidas para la familia. Como salida del análisis se solicitaron 7 potenciales motivos. Del resultado de ambos grupos analizados se rescató un motivo para *Azg1*.

### 14.7.4. Modelado computacional

Para estudiar la estructura tridimensional de la proteína se obtuvo del repositorio de ModeBase una estimación de la estructura de *AtAzg1* en base a la estructura del transportador UraA de *Escherichia coli*. Por otro lado, la estructura de la CK trans Zeatina (tZ) se obtuvo de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para generar el espacio de búsqueda donde tZ se podría alojar en AZG1, se utilizó Autodock con los siguientes parámetros (center\_x=29.04; center\_y=2.733; center\_z=23.965; size\_x=40; size\_y=40; size\_z=40). Con el espacio de búsqueda se utilizó Vina para encontrar las potenciales configuraciones que tomaría la molécula, obteniendo nueve posibles configuraciones. Para manipular las estructuras y visualizar las configuraciones de tZ se utilizó UCSF Chimera 1.11.2 y PyMOL 2.0.7.



---

## Referencias

- [1] Adamowski, M., and Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell* 27, 20-32.
- [2] Akiyoshi, D., Klee, H., Amasino, R., Nester, E., and Gordon, M. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 5994-5998.
- [3] Akiyoshi, D., Morris, R., Hinz, R., Mischke, B.S., Kosuge, T., Garfinkel, D., Gordon, M., and Nester, E. (1983). Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 407-411.
- [4] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2007). *Molecular biology of the cell: Reference edition*.
- [5] Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., and Ullrich, C.I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.* 97, 883-893.
- [6] Andreeva, A., and Murzin, A.G. (2006). Evolution of protein fold in the presence of functional constraints. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 399-408.
- [7] Asseck, L.Y., and Grefen, C. (2018). Detecting Interactions of Membrane Proteins: The Split-Ubiquitin System. *Methods in molecular biology* 1794, 49-60.
- [8] Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., and Noble, W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, W202-208.
- [9] Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., and Robledo, C.W. (2008). *Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. 1ra Ed., Editorial Brujas. Argentina.*
- [10] Barry, G., Rogers, S., Fraley, R., and Brand, L. (1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 4776-4780.
- [11] Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.



- [12] Bishopp, A., Benkova, E., and Helariutta, Y. (2011). Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 10-16.
- [13] Burkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C., and Frommer, W.B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* 34, 13-26.
- [14] Caesar, K., Thamm, A.M., Witthoft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., and Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* 62, 5571-5580.
- [15] Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G.,
- [16] Casero, P.J., and Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13, 843-852.
- [17] Cassab, G.I., Eapen, D., and Campos, M.E. (2013). Root hydrotropism: an update. *Am. J. Bot.* 100, 14-24.
- [18] Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004). The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* 279, 3132-3141.
- [19] Chen, J., Wang, F., Zheng, S., Xu, T., and Yang, Z. (2015). Pavement cells: a model system for non-transcriptional auxin signalling and crosstalks. *J. Exp. Bot.* 66, 4957-4970.
- [20] Clarkson, J.J., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Knapp, S., and Leitch, A.R. (2005). Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytol.* 168, 241-252.
- [21] Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal* 16, 735-743.
- [22] Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., and Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal* 86, 3993-4003.

- 
- [23] Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133, 462-469.
- [24] Darlington, A., and Scazzocchio, C. (1967). Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 93, 937-940.
- [25] De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N.F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inze, D., Bennett, M.J., and Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134, 681-690.
- [26] De Smet, I., Lau, S., Voss, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E.H., Schlereth, A., De Rybel, B., Vassileva, V., Grunewald, W., Naudts, M., Levesque, M.P., Ehrismann, J.S., Inze, D., Luschnig, C., Benfey, P.N., Weijers, D., Van Montagu, M.C., Bennett, M.J., Jurgens, G., and Beeckman, T. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2705-2710.
- [27] Delwiche, C.F., and Cooper, E.D. (2015). The Evolutionary Origin of a Terrestrial Flora. *Curr. Biol.* 25, R899-910.
- [28] Depuydt, S., and Hardtke, C.S. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21, R365-373.
- [29] Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445.
- [30] Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C. (2013). *InfoStat Versión 2013*. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- [31] Diallinas, D., Gorfinkiel, G., Arst, H.N., Cecchetto, C., and Scazzocchio, S. (1995). Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 270, 8610-8622.
- [32] Eddy, S.R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics (Oxford, England)* 14, 755-763.
- [33] El-Showk, S., Ruonala, R., and Helariutta, Y. (2013). Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* 140, 1373-1383.

- [34] Feng, Z., Sun, X., Wang, G., Liu, H., and Zhu, J. (2012). LBD29 regulates the cell cycle progression in response to auxin during lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 110, 1-10.
- [35] Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171, 501-523.
- [36] Frebort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frebortova, J., and Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* 62, 2431-2452.
- [37] Friedman, W.E., Moore, R.C., and Purugganan, M.D. (2004). The evolution of plant development. *Am. J. Bot.* 91, 1726-1741.
- [38] Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806-809.
- [39] Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., and Tasaka, M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44, 382-395.
- [40] Fukaki, H., and Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* 69, 437-449.
- [41] Goh, T., Toyokura, K., Wells, D.M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., Weijers, D., Fukaki, H., Laplaze, L., Bennett, M.J., and Guyomarc'h, S. (2016). Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development* 143, 3363-3371.
- [42] Grefen, C., Obrdlik, P., and Harter, K. (2009). The determination of protein-protein interactions by the mating-based split-ubiquitin system (mbSUS). *Methods in molecular biology* 479, 217-233.
- [43] Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M.R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* 64, 355-365.
- [44] Grefen, C. (2014). The split-ubiquitin system for the analysis of three-component interactions. *Methods in molecular biology* 1062, 659-678.
- [45] Grones, P., and Friml, J. (2015). Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J. Cell Sci.* 128, 1-7.

- 
- [46] Grube, E. (2007). Molekulare Charakterisierung zweier neuer Purintransporter-Familien aus *Arabidopsis thaliana*. In Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät (Univesität zu Köln), pp. 155
- [47] Hecker, A., Wallmeroth, N., Peter, S., Blatt, M.R., Harter, K., and Grefen, C. (2015). Binary 2in1 Vectors Improve in Planta (Co)localization and Dynamic Protein Interaction Studies. *Plant Physiol.* 168, 776-787.
- [48] Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2005). Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* 138, 196-206.
- [49] Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., and Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* 59, 75-83.
- [50] Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics 2008*, 420747.
- [51] Huang, L., and Schiefelbein, J. (2015). Conserved Gene Expression Programs in Developing Roots from Diverse Plants. *Plant Cell* 27, 2119-2132.
- [52] Ioio, R.D., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17, 678-682.
- [53] Jan, S., Abbas, N., Ashraf, M., and Ahmad, P. (2018). Roles of potential plant hormones and transcription factors in controlling leaf senescence and drought tolerance. *Protoplasma*.
- [54] Kakimoto, T. (1996). CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 982-985.
- [55] Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., and Martinoia, E. (2017). Cytokinin Transporters: GO and STOP in Signaling. *Trends Plant Sci*.
- [56] Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K.D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*.
- [57] Kenrick, P., and Strullu-Derrien, C. (2014). The origin and early evolution of roots. *Plant Physiol.* 166, 570-580.

- [58] Kiba, T., Takei, K., Kojima, M., and Sakakibara, H. (2013). Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 27, 452-461.
- [59] Kleczkowski, K., Schell, J., and Bandur, R. (1995). Phytohormone Conjugates: Nature and Function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 283-298.
- [60] Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K.Y., Kwon, M., Endler, A., and Song, W.-Y. (2014). *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201321519.
- [61] Kudo, T., Kiba, T., and Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of integrative plant biology* 52, 53-60.
- [62] Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- [63] Kutz, A., Müller, A., Hennig, P., Kaiser, W.M., Piotrowski, M., and Weiler, E.W. (2002). A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30, 95-106.
- [64] Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M.B., Offringa, R., Graham, N., Dumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beekman, T., and Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* 19, 3889-3900.
- [65] Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- [66] Lee, H.W., Kim, N.Y., Lee, D.J., and Kim, J. (2009). LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 1377-1389.
- [67] a. Lee, H.W., and Kim, J. (2013). EXPANSINA17 up-regulated by LBD18/ASL20 promotes lateral root formation during the auxin response. *Plant Cell Physiol.* 54, 1600-1611.
- [68] b. Lee, H.W., Kim, M.J., Kim, N.Y., Lee, S.H., and Kim, J. (2013). LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the EXPANSIN14

- promoter in promoting lateral root emergence of Arabidopsis. *Plant J.* 73, 212-224.
- [69] Lee, H.W., Cho, C., and Kim, J. (2015). LBD16 and LBD18 Act Downstream of the AUX1 and LAX3 Auxin Influx Carriers to Control Lateral Root Development in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.*
- [70] Leyser, O., and Fitter, A. (1998). Roots are branching out in patches. *Trends Plant Sci.* 3, 203-204.
- [71] Liu, J., Rowe, J., and Lindsey, K. (2014). Hormonal crosstalk for root development: a combined experimental and modeling perspective. *Frontiers in plant science* 5, 116.
- [72] Lomin, S.N., Myakushina, Y.A., Arkhipov, D.V., Leonova, O.G., Popenko, V.I., Schmülling, T., and Romanov, G.A. (2017). Studies of cytokinin receptor-phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Funct. Plant Biol.* 45, 192.
- [73] López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol.* 129, 244-256.
- [74] Lucas, M., Kenobi, K., von Wangenheim, D., Vobeta, U., Swarup, K., De Smet, I., Van Damme, D., Lawrence, T., Peret, B., Moscardi, E., Barbeau, D., Godin, C., Salt, D., Guyomarc'h, S., Stelzer, E.H., Maizel, A., Laplaze, L., and Bennett, M.J. (2013). Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 5229-5234.
- [75] Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* 14, 2938-2943.
- [76] Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., and Helariutta, Y. (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* 311, 94-98.
- [77] Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* 124, 33-44.

- [78] Manders, E., Verbeek, F., and Aten, J. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy* 169, 375-382.
- [79] Mansfield, T.A., Schultes, N.P., and Mourad, G.S. (2009). AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 583, 481-486.
- [80] Marhavy, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Parezova, M., Petrasek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., and Benkova, E. (2011). Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev. Cell* 21, 796-804.
- [81] Martin, T., Wöhner, R., Hummel, S., Willmitzer, L., Frommer, W.B., and Gallagher, S. (1992). The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression. *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression.*, 23-43.
- [82] Mironova, V.V., Omelyanchuk, N.A., Wiebe, D.S., and Levitsky, V.G. (2014). Computational analysis of auxin responsive elements in the Arabidopsis thaliana L. genome. *BMC Genomics* 15 Suppl 12, S4.
- [83] Mok, D.W., and Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 89-118.
- [84] Morales-Tapia, A., and Cruz-Ramirez, A. (2016). Computational Modeling of Auxin: A Foundation for Plant Engineering. *Frontiers in plant science* 7, 1881.
- [85] Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* 30, 2785-2791.
- [86] Mullen, J.L., Ishikawa, H., and Evans, M.L. (1998). Analysis of changes in relative elemental growth rate patterns in the elongation zone of Arabidopsis roots upon gravistimulation. *Planta* 206, 598-603.
- [87] Muraro, D., Wilson, M., and Bennett, M.J. (2011). Root development: cytokinin transport matters, too! *Curr. Biol.* 21, R423-425.
- [88] Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473-497.
- [89] Nandi, S., Palni, L., Letham, D., and Wong, O. (1989). Identification of cytokinins in primary crown gall tumours of tomato. *Plant, Cell Environ.* 12, 273-283.

- 
- [90] Napier, R.M., David, K.M., and Perrot-Rechenmann, C. (2002). A short history of auxin-binding proteins. In *Auxin Molecular Biology* (Springer), pp. 339-348.
- [91] Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 118-130.
- [92] Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17, 444-463.
- [93] Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., and Palme, K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2987-2991.
- [94] Peret, B., Larrieu, A., and Bennett, M.J. (2009). Lateral root emergence: a difficult birth. *J. Exp. Bot.* 60, 3637-3643.
- [95] Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785.
- [96] Pieper, U., Webb, B.M., Dong, G.Q., Schneidman-Duhovny, D., Fan, H., Kim, S.J., Khuri, N., Spill, Y.G., Weinkam, P., Hammel, M., Tainer, J.A., Nilges, M., and Sali, A. (2014). ModBase, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 42, D336-D346.
- [97] Porco, S., Larrieu, A., Du, Y., Gaudinier, A., Goh, T., Swarup, K., Swarup, R., Kuempers, B., Bishopp, A., Lavenus, J., Casimiro, I., Hill, K., Benkova, E., Fukaki, H., Brady, S.M., Scheres, B., Peret, B., and Bennett, M.J. (2016). Lateral root emergence in *Arabidopsis* is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development* 143, 3340-3349.
- [98] Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., and Schmulling, T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18, 40-54.
- [99] Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmulling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3



- compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* 57, 4051-4058.
- [100] Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmulling, T. (2018). Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytol.*
- [101] Rosquete, M.R., von Wangenheim, D., Marhavy, P., Barbez, E., Stelzer, E.H., Benkova, E., Maizel, A., and Kleine-Vehn, J. (2013). An auxin transport mechanism restricts positive orthogravitropism in lateral roots. *Curr. Biol.* 23, 817-822.
- [102] Roychoudhry, S., Del Bianco, M., Kieffer, M., and Kepinski, S. (2013). Auxin controls gravitropic setpoint angle in higher plant lateral branches. *Curr. Biol.* 23, 1497-1504.
- [103] Ruhfel, B.R., Gitzendanner, M.A., Soltis, P.S., Soltis, D.E., and Burleigh, J.G. (2014). From algae to angiosperms - inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evol. Biol.* 14, 23.
- [104] Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431-449.
- [105] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. (Cold spring harbor laboratory press New York).
- [106] Samuelson, M.E., Eliasson, L., and Larsson, C.-M. (1992). Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiol.* 98, 309-315.
- [107] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463-5467.
- [108] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., and Schmid, B. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676-682.
- [109] Schranz, M.E., Mohammadin, S., and Edger, P.P. (2012). Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: the WGD Radiation Lag-Time Model. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 147-153.
- [110] Schumacher, B. (2006). Identifizierung und Charakterisierung eines Transporters für Purine und Purinderivate in *Arabidopsis thaliana*. In *Zentrum für Molecular Biologie (Universität Tübingen)*

- 
- [111] Seago, J.L., Jr., and Fernando, D.D. (2013). Anatomical aspects of angiosperm root evolution. *Ann. Bot.* 112, 223-238.
- [112] Sennikov, A.N., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Byng, J.W., Fay, M.F., Christenhusz, M.J.M., Chase, M.W., Stevens, P.F., Soltis, P.S., Judd, W.S., and Group, T.A.P. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1-20.
- [113] Shimizu-Sato, S., Tanaka, M., and Mori, H. (2009). Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* 69, 429-435.
- [114] Sigrist, C.J., de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., and Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41, D344-347.
- [115] Skalicky, V., Kubes, M., Napier, R., and Novak, O. (2018). Auxins and Cytokinins-The Role of Subcellular Organization on Homeostasis. *International journal of molecular sciences* 19.
- [116] Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11, 118-130.
- [117] Stoeckle, D., Thellmann, M., and Vermeer, J.E.M. (2018). Breakout - lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 41, 67-72.
- [118] Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H., and Zuo, J. (2005). *Arabidopsis* SOI33/AtENT8 gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *Journal of integrative plant biology* 47, 588-603.
- [119] 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., Beeckman, T., Laplace, L., and Bennett, M.J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10, 946-954.
- [120] Taiz, L., and Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* 5th Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- [121] Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2004). AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 45, 1053-1062.
- [122] Tessi, T.M., and Desimone, M. (2013). Rol del transportador AtAZG2 en la señalización por citocininas durante el desarrollo del sistema radical de Arabidopsis thaliana. In *Catedra de Fisiología Vegetal (Hemeroteca FCEFyN: Universidad Nacional de Córdoba )*, pp. 53.
- [123] Tian, H., De Smet, I., and Ding, Z. (2014). Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends Plant Sci.* 19, 426-431.
- [124] Trott, O., and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry* 31, 455-461.
- [125] Ulmasov T., M.J., Hagen G., Guilfoyle T. . (1997). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell*.
- [126] Va, T. (2015). Genetic Control and Phytohormonal Regulation of Plant Embryogenesis. *International Journal of Medical Biotechnology and Genetics*, 9-20.
- [127] Vanstraelen, M., and Benkova, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 28, 463-487.
- [128] Vermeer, J.E.M., and Geldner, N. (2015). Lateral root initiation in Arabidopsis thaliana: a force awakens. *F1000Prime Reports* 7.
- [129] Vermeer, J.E.M., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E.H.K., Maizel, A., and Geldner, N. (2014). A Spatial Accommodation by Neighboring Cells Is Required for Organ Initiation in Arabidopsis. *Science* 343, 178-183.
- [130] Wang, C., Liu, Y., Li, S.S., and Han, G.Z. (2015). Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant Physiol.* 167, 872-886.
- [131] Weiner, J.J., Peterson, F.C., Volkman, B.F., and Cutler, S.R. (2010). Structural and functional insights into core ABA signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 495-502.

- 
- [132] West, A.H., and Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26, 369-376.
- [133] Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Reed, J.W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.* 43, 118-130.
- [134] Winklbauer, E.M. (2008). Funktionelle Charakterisierung des Purintransporters AtAzg2 in *Arabidopsis thaliana*. In *Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (Universität Tübingen)*, pp. 98.
- [135] Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* 2, e718. bibitem Worth, C.L., Gong, S., and Blundell, T.L. (2009). Structural and functional constraints in the evolution of protein families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 709-720.
- [136] Wu, F., and Tanksley, S.D. (2010). Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics* 11, 182.
- [137] Wu, F., Eannetta, N.T., Xu, Y., Plieske, J., Ganal, M., Pozzi, C., Bakaher, N., and Tanksley, S.D. (2010). COSII genetic maps of two diploid *Nicotiana* species provide a detailed picture of synteny with tomato and insights into chromosome evolution in tetraploid *N. tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 120, 809-827.
- [138] Wulfetange, K., Lomin, S.N., Romanov, G.A., Stolz, A., Heyl, A., and Schmulling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 156, 1808-1818.
- [139] Xu, C., Cao, H., Xu, E., Zhang, S., and Hu, Y. (2017). Genome-wide Identification of *Arabidopsis* LBD29 Target Genes Reveals the Molecular Events behind Auxin-Induced Cell Reprogramming during Callus Formation. *Plant Cell Physiol.*
- [140] Zhang, H., and Forde, B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.*, 51-59.
- [141] Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., and Liu, C.J. (2014). *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature communications* 5, 3274.

- [142] Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P.T., and Müller, B. (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant Physiol.* 161, 1066-1075.
- [143] Zürcher, E., and Müller, B. (2016). Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function - *Advances and New Insights* 324, 1-38.
- [144] Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., and Müller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* 353, 1027-1030.



Parte V  
**Apéndice**

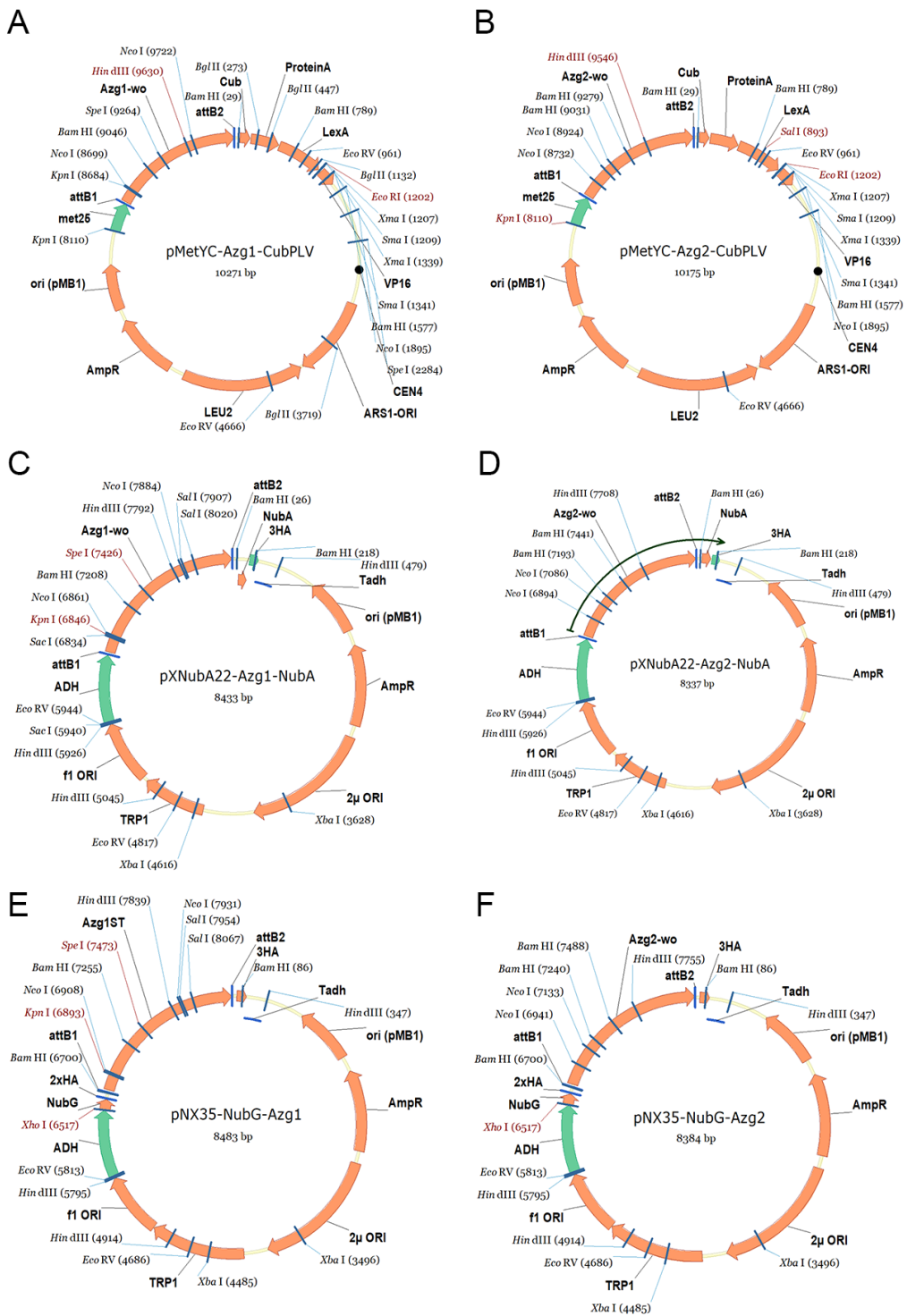
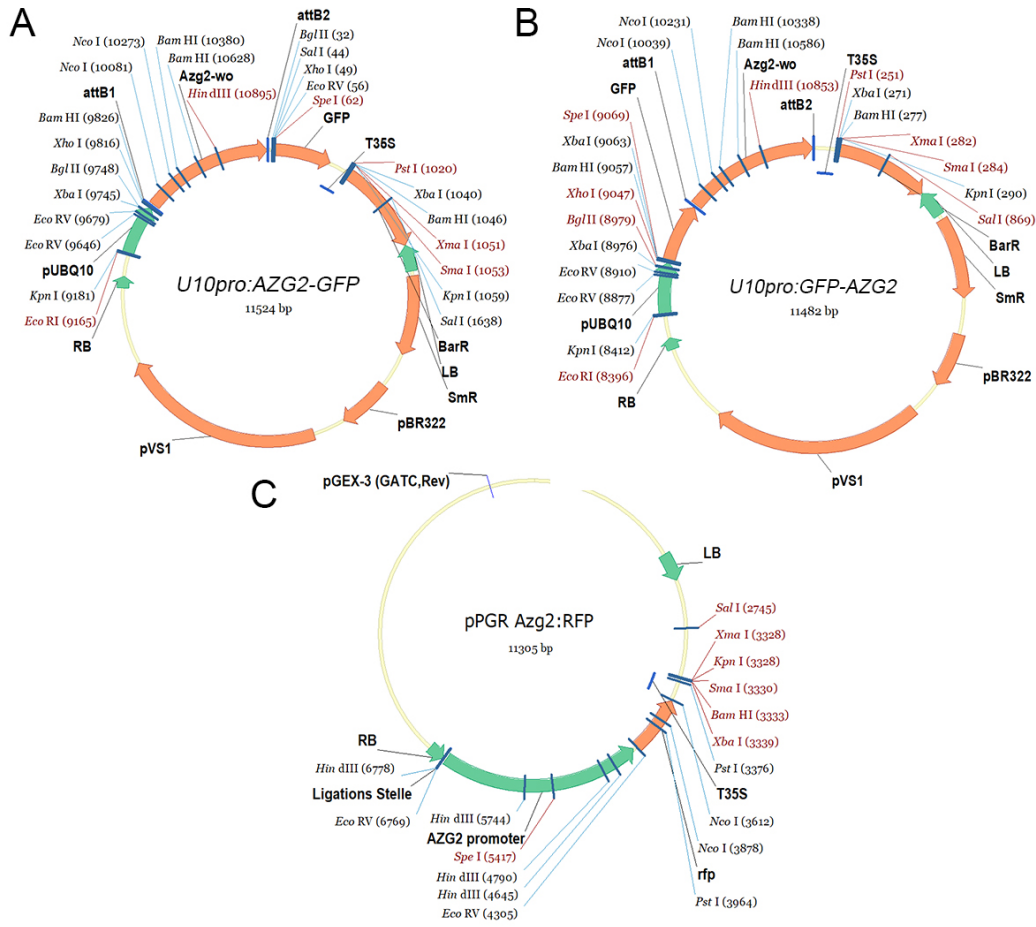
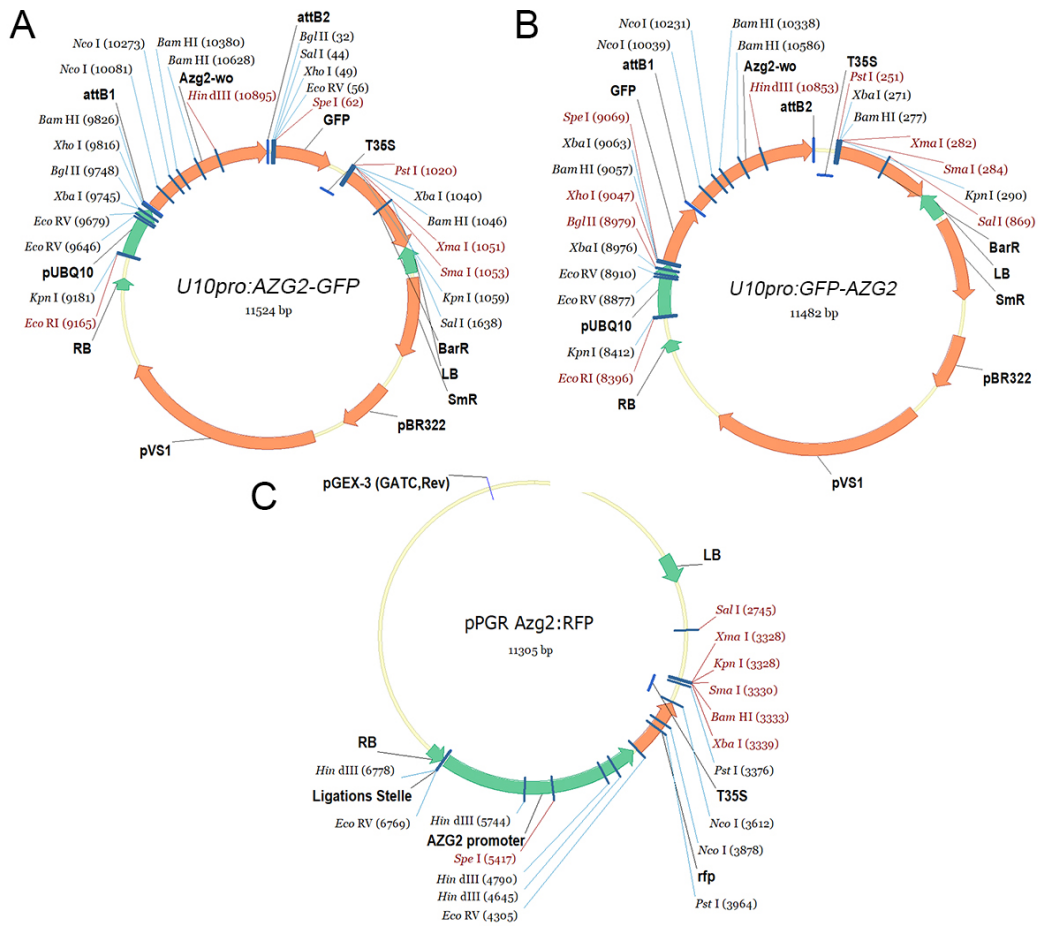


Figura Suplementaria 1. Construcciones plasmídicas I

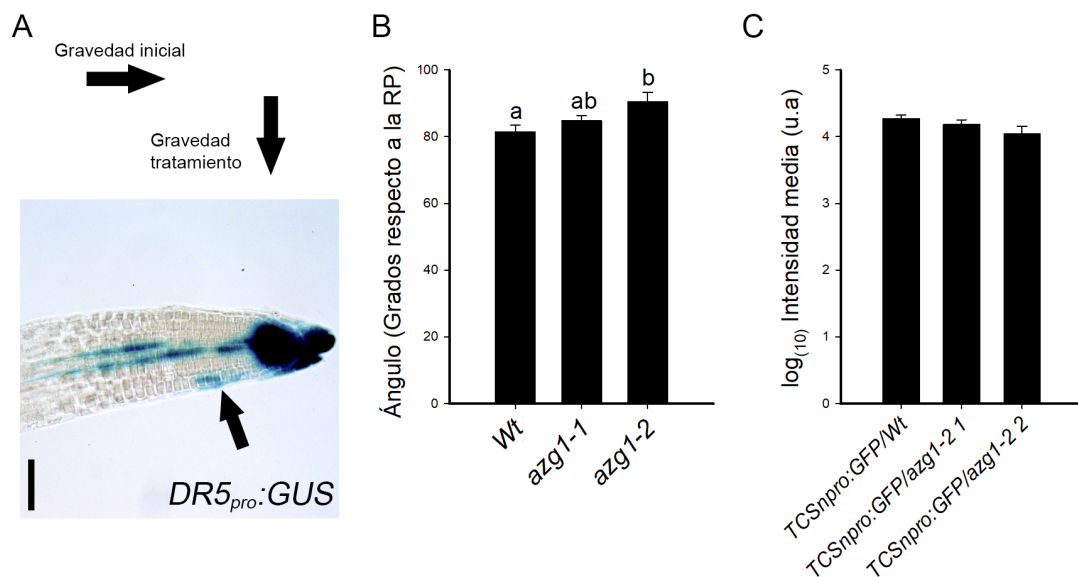




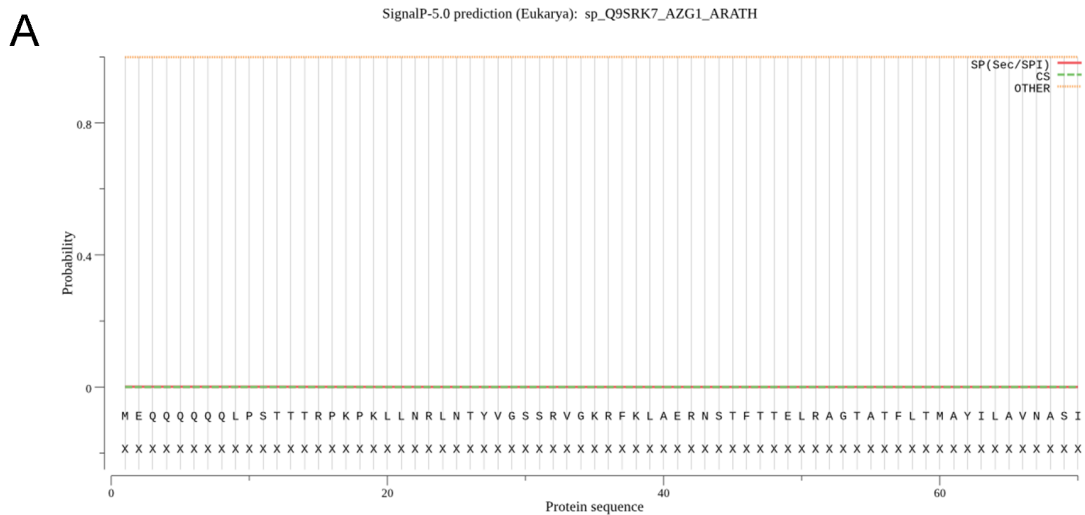
*Figura Suplementaria 2. Construcciones plasmídicas II*



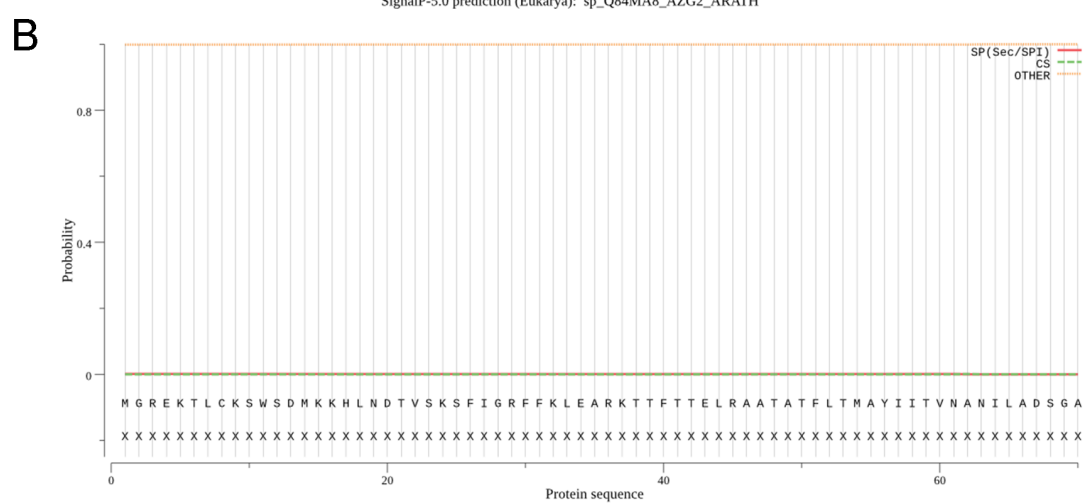
*Figura Suplementaria 3. Construcciones plasmídicas III*



**Figura Suplementaria 4.** (A) Respuesta del reportero DR5<sub>pro</sub>:GUS al cambio en la dirección de la fuerza de la gravedad. (B) Respuesta al cambio en la dirección de la fuerza de la gravedad en líneas KO de Azg1 en comparación con el Wt. (C) Actividad de CK determinada por la intensidad de señal del reportero TCSn<sub>pro</sub>:GFP en líneas KO de Azg1 en comparación con el Wt. Las letras corresponden al test de separación de medias de Duncan, posterior al test estadístico de ANAVA. Las barra de error representan el E.E. (ANAVA;  $p < 0,05$ )

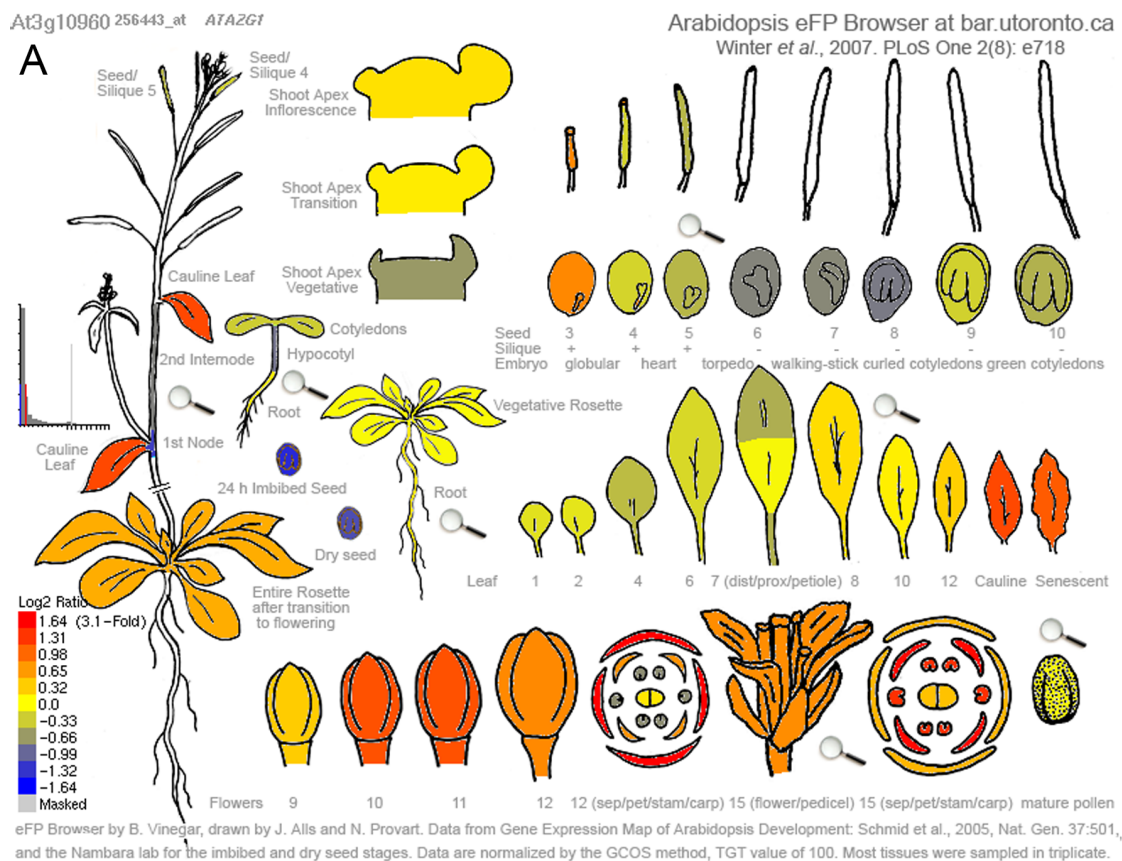


AtAZG1 - Probabilidad que tener peptido señal: 0,0008

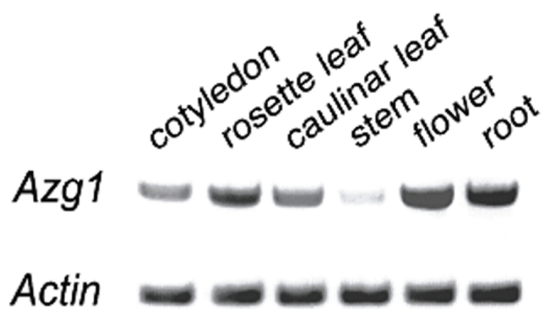


AtAZG2 - Probabilidad que tener peptido señal: 0,0012

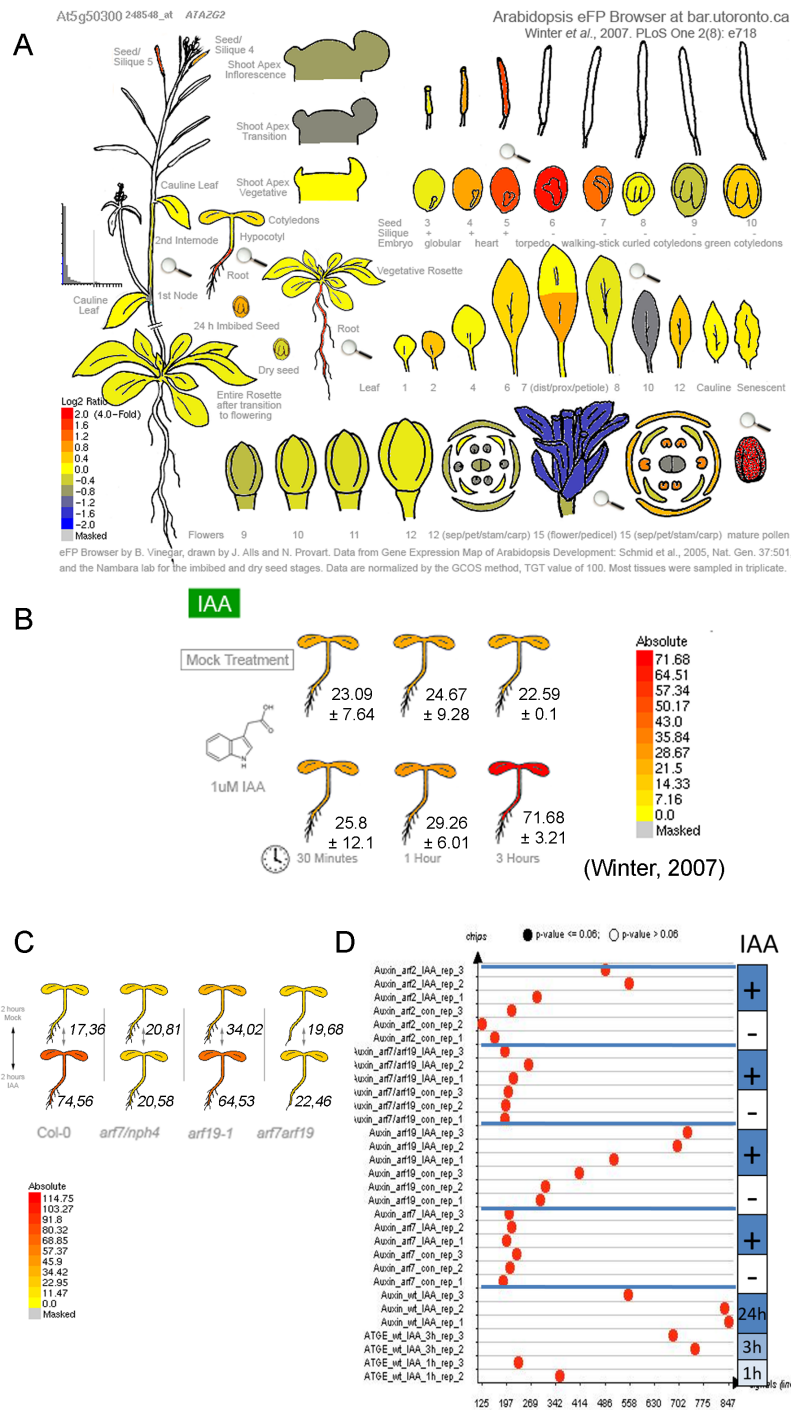
**Figura Suplementaria 5.** Análisis de presencia de péptido señal en la secuencia codificante de (A) *Azg1* y (B) *Azg2*. (SignalP 5.0; Petersen et al., 2011)



**B**



**Figura Suplementaria 6. Expresión de *Azg1*** (A) Expresión de *Azg1* en los distintos órganos vegetales según eFP browser (Winter et al., 2007). (B) RT-PCR mostrando la presencia de transcritos de *AZG1* en los distintos tejidos vegetales (Grube, Tesis doctoral, 2007).



**Figura Suplementaria 7. Expresión de Azg2 (A) Expresión de Azg2 en los distintos órganos vegetales según eFP browser (Winter et al., 2007). (B) Inducción de la expresión de Azg2 tras un tratamiento con auxinas (0,5, 1 y 3 horas). (C) Niveles de expresión de Azg2 en distintos mutantes de factores de transcripción ARF tras la aplicación de auxinas según (C) eFP Browser y (D) Genevestigator (Hruz et al., 2008)**