

# **Rol del transportador *AtUPS4* en semillas de *Arabidopsis thaliana* L.**

**Tesinista:** Joaquín Suárez.

**Firma:** .....

**Director:** Marcelo Desimone.

**Firma:** .....

**Codirector:** Carlos Ignacio Lescano López.

**Firma:** .....

**Cátedra de Fisiología Vegetal**

**Escuela de Biología**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

**Universidad Nacional de Córdoba**

# **Rol del transportador *AtUPS4* en semillas de *Arabidopsis thaliana* L.**

**Tribunal Examinador**

**Nombre y Apellido:** Marcelo Desimone. **Firma:** .....

**Nombre y Apellido:** Germán Robert. **Firma:** .....

**Nombre y Apellido:** Carolina Martini. **Firma:** .....

**Calificación:**

**Fecha:**

# **Rol del transportador *AtUPS4* en semillas de *Arabidopsis thaliana* L.**

## **1. Resumen**

Las semillas ortodoxas se caracterizan por su capacidad de secarse y tolerar períodos de latencia. Esto se logra al final de la maduración de la semilla, cuando ésta ingresa en la etapa de dormición, y es coordinado en gran parte por la señalización mediada por ácido abscísico (ABA). Investigaciones previas en nuestro laboratorio han señalado la presencia del transportador de ureidos *AtUPS4* (*Arabidopsis thaliana* Ureide Permease 4) durante estas etapas, se estudió su patrón de expresión y regulación a partir de análisis *in silico*. En este trabajo se observó que la expresión de *AtUPS4* ocurre específicamente en los últimos momentos de la maduración de la semilla, se mantiene elevada en la semilla seca y disminuye paulatinamente luego de las primeras 24 horas de imbibición. Por otro lado, el análisis del promotor de *AtUPS4* reveló sitios putativos de unión a los factores de transcripción *AtABI3*, *AtFUS3* y *AtABI5*, relacionados a la maduración de la semilla. El análisis de mutantes *aba1*, *fus3* y *abi3* sugiere que la expresión de *AtUPS4* estaría regulada por estos factores de transcripción y modulada por los niveles de ABA.

Además se conoce que los transportadores de ureidos de la familia de *AtUPS4* (*AtUPS1-5*) tienen la capacidad de transportar alantoína *in vivo*, lo que se ha relacionado con la tolerancia al estrés salino. Es por esto que se decidió probar si la alantoína tiene algún efecto en la germinación en condiciones control o de salinidad. Se observó que el agregado de alantoína en medio salino mejoró la germinación de semillas de tipo salvaje. La menor germinación de mutantes *ups4* en medio salino sugiere que *AtUPS4* podría estar involucrado en el transporte de alantoína en estas condiciones. En base a estos resultados, se discute un modelo de la regulación de *AtUPS4* y su rol en el transporte de alantoína en semillas de *Arabidopsis*.

**Palabras clave:** *semilla, germinación, alantoína, ácido abscísico, estrés salino, transporte, regulación.*

## **2.Abreviaturas**

ABA: Ácido abscísico

AtUPS: *Arabidopsis thaliana Ureide permease* (permeasa de ureidos)

ABI: *ABA insensitive factor* (factor de transcripción ABI, mutantes insensibles a ABA)

ALN: *allantoinase* (alantoinasa)

UBI10: *Ubiquitin10* (Ubiquitina10)

GFP: *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

TSS: *transcription start site* (sitio del comienzo de la transcripción)

ATP: adenosina tri-fosfato

## **3.Introducción**

La semilla representa una etapa clave en el ciclo de vida de las plantas. Debido a este carácter derivado, las *Espermatophytas* conforman actualmente el grupo más diversificado de plantas. Esta etapa del desarrollo puede dividirse en tres eventos de vital importancia para la reproducción: (1) el desarrollo de la semilla luego de la fecundación, (2) la latencia durante condiciones desfavorables para la germinación y (3) la germinación.

En el caso de las plantas con flor (*Angiospermas*) el desarrollo de la semilla comienza inmediatamente después de la fecundación. Los procesos que se producen luego están enmarcados dentro de lo que se conoce como embriogénesis, la cual incluye la formación y maduración del embrión propiamente dicho, el almacenamiento de reservas, y la adquisición de tolerancia a la desecación (Goldberg et al, 1994). La embriogénesis puede ser dividida de forma breve en dos fases, en primer lugar ocurre la morfogénesis, seguida por la fase de maduración (Bewley, 1997; Locascio et al, 2014). Durante la morfogénesis ocurren los procesos de división y diferenciación celular, los cuales terminan cuando el plan corporal del embrión (eje y cotiledones) es concretado. En la fase de maduración, el embrión crece por aumento del volumen de las células y sucede el almacenamiento de nutrientes (West & Harada, 1993). Durante los últimos estadios de la maduración de la semilla ocurre el “*degreening*” del embrión, donde las clorofilas son degradadas, acoplado con la pérdida de agua (desecación) y, en algunas especies vegetales, el inicio de la dormición (Delmas et al, 2013). Estos últimos pasos de la maduración

son altamente coordinados, ya que de ellos depende que el producto final sea una semilla tolerante a la sequía con la capacidad de germinar luego de un período de quiescencia metabólica. Dicha capacidad otorga a la semilla la posibilidad de ser almacenada por un tiempo prolongado y mantener su viabilidad, lo que es entendido como longevidad (Ooms et al, 1993).

El último evento que protagoniza la semilla es la germinación, la cual comienza con la toma de agua o imbibición. Debido a que la rehidratación es el principal desencadenante de la germinación, la toma de agua en el tiempo por parte de la semilla es el parámetro utilizado para subdividir el evento en diferentes fases (Bewley, 1997). La primera fase se caracteriza por un aumento en la toma de agua en el tiempo, seguida de una fase donde el ingreso de agua se estanca; durante estas dos primeras fases se repara el ADN, las mitocondrias y la síntesis proteica se activa. Según diversos autores, el proceso de germinación termina con la emergencia de la radícula (Baskin & Baskin, 2004; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Dos hormonas vegetales, el ácido abscísico y las giberelinas, juegan un papel central en el desarrollo de la semilla. El ácido abscísico (ABA) participa en la señalización durante estos eventos: es necesario para el correcto almacenamiento de nutrientes, la adquisición de la tolerancia a la desecación, el inicio y mantenimiento de la dormición primaria, y la detención de la germinación en situaciones desfavorables (Finkelstein et al, 2008). En la señalización por ABA participan como proteínas clave factores de transcripción. Dentro de estos factores podemos encontrar a *AtABI3* y *AtABI5* (*ABA insensitive factor*), que fueron descubiertos en mutantes de *Arabidopsis* que eran insensibles a la señalización por ABA. Los mutantes *abi3* presentan diversos fenotipos: semillas intolerantes a la desecación, embriones verdes inmaduros, dormición reducida o nula, germinación precoz, entre otros (Nambara et al, 1995). Es por esto que se piensa que *AtABI3* es un factor maestro de la regulación de la maduración de la semilla y el inicio de la dormición. *AtABI5* fue descubierto en semillas mutantes que eran insensibles al agregado de ABA durante la germinación y se lo relaciona, en general, con la detención de la germinación durante situaciones de estrés (Skubacz et al, 2016).

Las concentraciones de ABA están reguladas tanto por su síntesis como por su degradación. Durante la germinación, la degradación del ABA está coordinada con la síntesis de Giberelinas. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se identificaron

enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450 CYP707A (*AtCYP707A1-4*) como enzimas clave en esta vía de degradación. Recientemente se ha observado que la transcripción de uno de estos genes, necesario para la degradación de ABA durante la germinación, es activada por una molécula intermediaria en la degradación de purinas, denominada alantoína. Por ello se ha puesto particular atención en esta sustancia, ya que podría jugar un rol importante en la señalización durante la germinación.

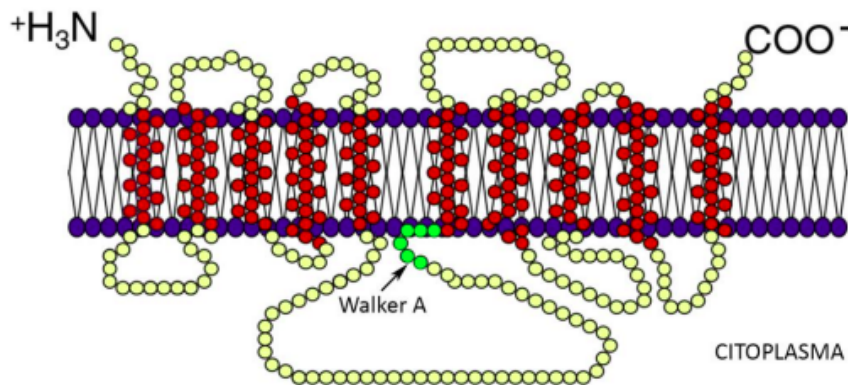
Las células tienen la capacidad de reutilizar el nitrógeno contenido en las bases púricas mediante la síntesis de xantina y su posterior conversión en ácido úrico y sus derivados, conocidos como ureidos. El primer compuesto estable de la degradación del ácido úrico es la alantoína, esta se sintetiza en los peroxisomas y es degradada en el retículo endoplásmico por la enzima alantoinasa (*AtALN*, *allantoinase*) (Werner et al, 2008). La alantoína tiene una relación 1:1 de C:N, su degradación a ácido alantoico y posteriormente a glioxilato, da como resultado cuatro moléculas de amonio que puede ser utilizado como fuente de nitrógeno. El transporte de alantoína está altamente estudiado en especies de plantas leguminosas, particularmente *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* (alubia verde y soja, respectivamente). En estas especies la alantoína y el ácido alantoico representan el mayor porcentaje de nitrógeno orgánico transportado a larga distancia desde los nódulos radicales al resto de la planta (Pélissier et al, 2004). A diferencia de estas especies, *Arabidopsis thaliana*, utiliza los aminoácidos glutamina y asparagina para efectuar el transporte del nitrógeno asimilado en las raíces hacia la parte aérea de la planta. De esta forma, la importancia del metabolismo de los ureidos en esta especie no ha sido completamente dilucidada. Algunos trabajos han descrito que distintas condiciones de estrés abiótico promueven la acumulación de alantoína, y a su vez que dicha acumulación confiere tolerancia al estrés (Irani & Todd, 2016; Brychkova et al, 2008; Nourimand & Todd, 2016). En nuestro laboratorio se observó que la acumulación de alantoína por represión transcripcional de *AtALN*, es requerida para la tolerancia al estrés salino. De qué forma la alantoína mejora la tolerancia al estrés, permanece desconocida. Algunos autores señalan la posibilidad de que esta molécula actúa como un antioxidante clásico disminuyendo los niveles de especies reactivas del oxígeno durante el estrés (Brychkova et al, 2008) o bien que active la síntesis de genes relacionados con la respuesta antioxidante (Irani & Todd, 2018; Nourimand & Todd, 2016). Por otro lado, se ha propuesto que la

molécula podría funcionar como un componente de la señalización y el sensado de la respuesta al estrés. Sobre esto último, tanto el agregado externo de alantoína, como su acumulación, promueven la transcripción de genes que responden a estrés, y en particular, genes relacionados con la síntesis de ABA (Watanabe et al, 2014). En este trabajo se observó por primera vez, que la acumulación de alantoína también activa la transcripción de *AtCYP707A1*, que codifica una enzima que degrada ABA. Además, se observó que la alantoína interacciona físicamente con la enzima *AtBG18*, provocando la deconjugación de ABA-GE (un glucosil éster de ABA, inactivo) a su forma activa. De esta forma, la alantoína parece estar relacionada con la regulación fina del metabolismo del ABA durante situaciones de estrés abiótico.

Mientras que las respuestas al estrés salino han sido estudiadas principalmente durante la germinación, en la plántula y en plantas adultas, pocas investigaciones se han enfocado en los efectos que tiene la salinidad durante el desarrollo de la semilla en *Arabidopsis*. Experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que semillas desarrolladas durante la exposición a pulsos de estrés salino, acumulan alantoína y presentan una mejor germinación en medio salino que aquellas que se desarrollaron en condiciones sin estrés. Otros estudios mostraron que la acumulación de alantoína en semillas de líneas *knockout* en el gen *AtALN* (*aln*: con una capacidad reducida para degradar alantoína y que por lo tanto acumulan alantoína), también mejora la germinación en medio salino. Si bien la cantidad de alantoína que se acumula en los tejidos parece estar altamente regulada por la expresión de *AtALN*, también la distribución diferencial entre los distintos tipos de células y/o compartimientos subcelulares podría ser importante para los mecanismos de regulación. Así se ha observado que existe una familia de transportadores de ureidos que podría estar involucrada (Desimone et al, 2002; Schmidt et al, 2006; Lescano et al, 2016)

Las permeasas de ureidos (*Arabidopsis thaliana* *Ureide Permeases*) constituyen una familia de transportadores con cinco miembros en *Arabidopsis* (*AtUPS1-5*) y diversos genes homólogos en diferentes especies vegetales (Desimone et al, 2002). Estos transportadores constan de 10 dominios transmembrana putativos, un bucle central y sus extremos C y N terminales se orientan hacia el espacio extracelular (figura 1). Además, se ha observado que poseen un motivo conservado denominado “*walker A*”, que es un sitio de unión para el ATP, con lo que se supone que requieren

energía para realizar el transporte (Desimone et al, 2002) (figura 1). Esta familia fue identificada luego del descubrimiento de *AtUPS1*, que parecía ser el primer transportador de alantoína encontrado en el reino vegetal. Sin embargo, luego fue caracterizado, junto con *AtUPS2*, por poseer mayor afinidad al uracilo (Schmidt et al, 2004). Es por esto que se ha hipotetizado que *AtUPS1* y *AtUPS2* podrían estar relacionados con el transporte de pirimidinas para su reutilización.



**Figura 1. Esquema del transportador *AtUPS1*.** Representación de los aminoácidos de la proteína, a través de la membrana. En rojo se muestran los dominios transmembrana, en verde el motivo conservado de unión a ATP "walker A". Tomado de Schmidt et al, 2006.

Estudios posteriores se enfocaron en las funciones de *AtUPS5*, que fue caracterizado por ser un transportador de alantoína pero no de uracilo, en *Arabidopsis* (Schmidt et al, 2006; Lescano et al, 2016). Además en nuestro laboratorio se descubrió que en plántulas sometidas a estrés salino, se induce la traslocación de alantoína de la raíz a la parte aérea dependiendo del transporte realizado por *AtUPS5* (Lescano et al, 2016). Existe poca información publicada sobre *AtUPS4*, sin embargo, se ha observado que su expresión parece estar restringida a los últimos estadios de la formación de la semilla y/o durante la germinación en *Arabidopsis thaliana* (Schmidt et al, 2006). En nuestro laboratorio se ha encontrado que transcritos maduros (sin intrones) de *AtUPS4* se acumulan durante las primeras horas de la germinación y, en contraste a la información publicada, que los transcritos del gen recuperados de semillas en formación no están maduros (contienen intrones). Es por esto que no solo es desconocido el rol de *AtUPS4* en la semilla, sino también en qué etapa podría tener una función biológica.



En este trabajo se propuso obtener evidencias experimentales que permitan conocer algunos aspectos del rol funcional de *AtUPS4* en la semilla. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- (1) Analizar el patrón de expresión de *AtUPS4* en tejidos de la semilla bajo diferentes condiciones.
- (2) Identificar posibles factores que regulan dicha expresión.
- (3) Determinar la función de *AtUPS4* en la germinación, en condiciones control y de estrés salino.

## **4. Materiales y métodos**

### *Análisis in silico*

Para analizar el patrón de expresión se utilizaron datos obtenidos de la base de datos eFP Browser (Winter et al, 2007). Los valores de expresión de *AtUPS4* fueron relativizados a la media geométrica de la expresión absoluta de dos genes de referencia o “housekeeping”: *AtElf1a* (At5g60390) y *AtPP2A2-3* (At1g13320) según Dekkers et al, 2012.

Para el análisis del promotor de *AtUPS4* e identificación de elementos reguladores ubicados en *cis* se utilizaron los programas bioinformáticos *PLACE* (Higo et al, 1999), *AthaMap* (Bülow & Hehl, 2010) y *AGRIS* (Yilmaz et al, 2010).

### Material vegetal

Se utilizaron semillas, plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* L. (ecotipo Col-0) de diferentes genotipos:

- Plantas WT o tipo silvestre.
- Mutantes de inserción de T-DNA en *AtUPS4* (*ups4*, Salk\_093921).
- Líneas de expresión constitutiva pUBI10:UPS4-eGFP4 (Tesis Doctoral Ignacio Lescano).
- Línea UPS1\_RNAi (Tesis Doctoral Ignacio Lescano).

### Crecimiento de plantas y obtención de semillas

Para el crecimiento de las plantas, las semillas fueron imbibidas en agua y estratificadas a 4°C por 2-3 días. Luego, las semillas se sembraron en bandejas con

una mezcla de tierra: vermiculita (1:2) en una cámara de crecimiento bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 22 °C y a una intensidad lumínica de 100–150  $\mu\text{E}/\text{m}_2\text{s}$ , y se regaron periódicamente con agua.

## Experimentos de germinación

La siembra de semillas se realizó en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar. Para esterilizar las semillas, éstas fueron colocadas en tubos Eppendorf con 1 ml de solución de lavado (Tritón X-100 0,05%, etanol 70%), 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. Luego, las semillas fueron colocadas en un papel estéril en la cámara de flujo laminar.

Las semillas estériles de los diferentes genotipos fueron sembradas con palillo en placas con medio MS 0,5X (Murashige & Skoog, 1962) Agar 1%, suplementado o no con NaCl 100mM y/o alantoína 1mM. A partir de la cuantificación de semillas con radículas emergentes se obtuvieron los porcentajes de germinación de cada genotipo cada 24 horas, durante los primeros cuatro días a partir de la exposición de las placas a la luz.

## Microscopía confocal láser de barrido

Para los experimentos de localización subcelular se trataron plantas UPS4::eGFP4 de 7-10 días con el marcador de tráfico endocítico FM4-64 durante 20 minutos. Se observó la zona de elongación de la raíz principal de estas plantas con un microscopio confocal láser de barrido Leica TCS SP5II equipado con un objetivo UV de inmersión en agua Leica HCX PL APO lambda blue 63.0x1.20. Para los experimentos de localización subcelular y colocalización, eGFP4 se excitó a 488 nm con un láser de argón VIS; FM4-64 se excitó a 561 nm con un diodo láser VIS-DPSS. La emisión de fluorescencia fue detectada entre 500 y 555 nm para eGFP4, y las emisiones de FM4-64 se detectaron entre 615 y 676 nm. Se obtuvieron imágenes multidimensionales (dimensiones X, Y, Z) utilizando el software LAS AF.

## Colocalización

Para el análisis de imágenes se utilizó el software FIJI-ImageJ (Schindelin et al, 2012). Luego de sustraer el fondo (*background*) de las imágenes, se les aplicó un filtro gaussiano. Las regiones particulares de las imágenes fueron examinadas utilizando máscaras creadas a partir del análisis con la herramienta *Colocalization Finder*.

## Análisis de datos

Los datos obtenidos en cada experimento fueron tabulados en el programa Microsoft Excel. Para la creación de gráficos y el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa informático GraphPad. Para los análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó el programa InfoStat (Balzarini, 2008). Se graficaron las medias y desvíos estándares. 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).

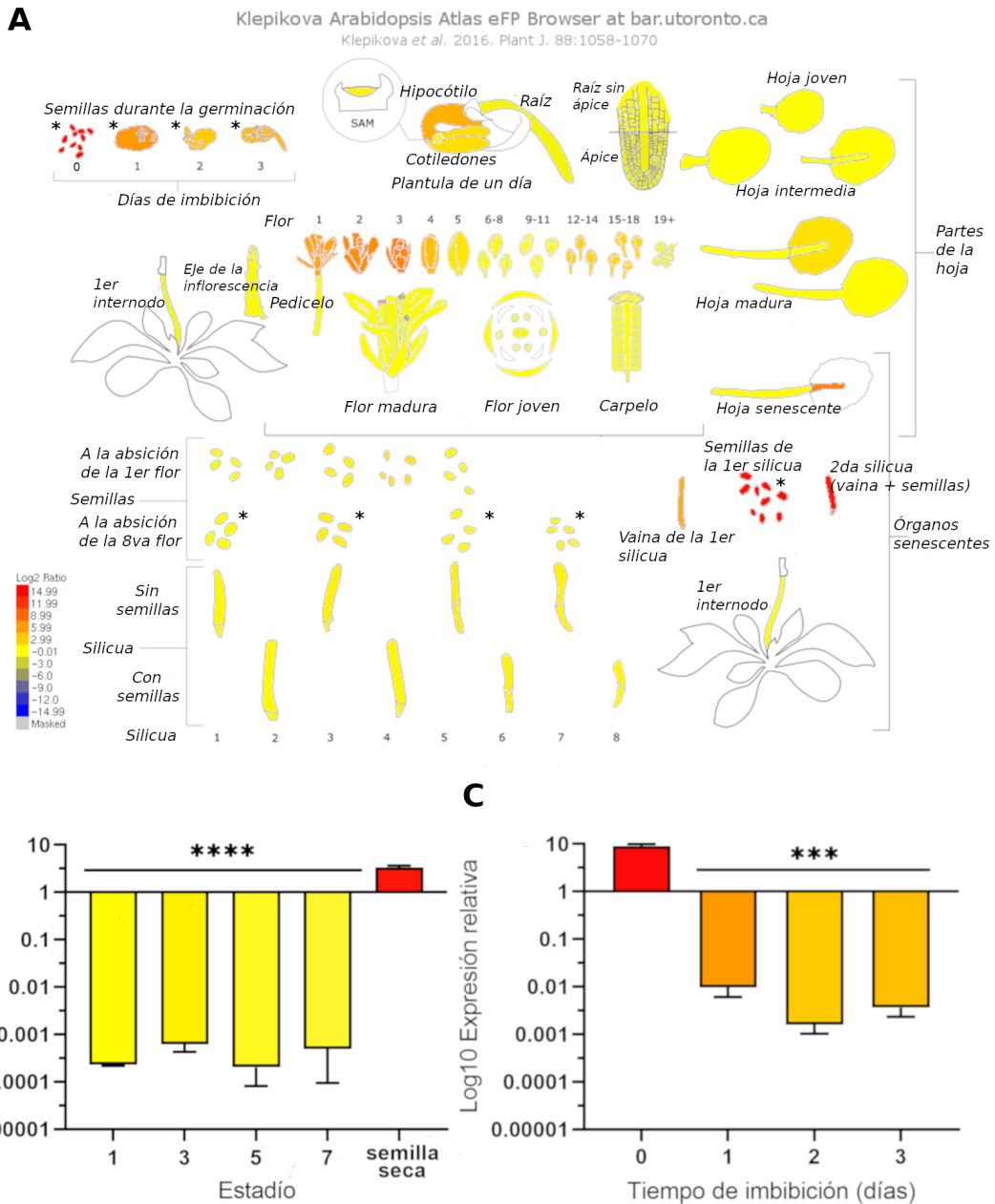
Para el análisis estadístico de los experimentos de germinación se utilizó ANAVA a dos factores con medidas repetidas en el tiempo. Para la comparación de medias de los datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de Bonferroni.

## **5.Resultados**

### ***AtUPS4* se expresa en los últimos estadios de la formación de la semilla, en la semilla seca y durante la germinación**

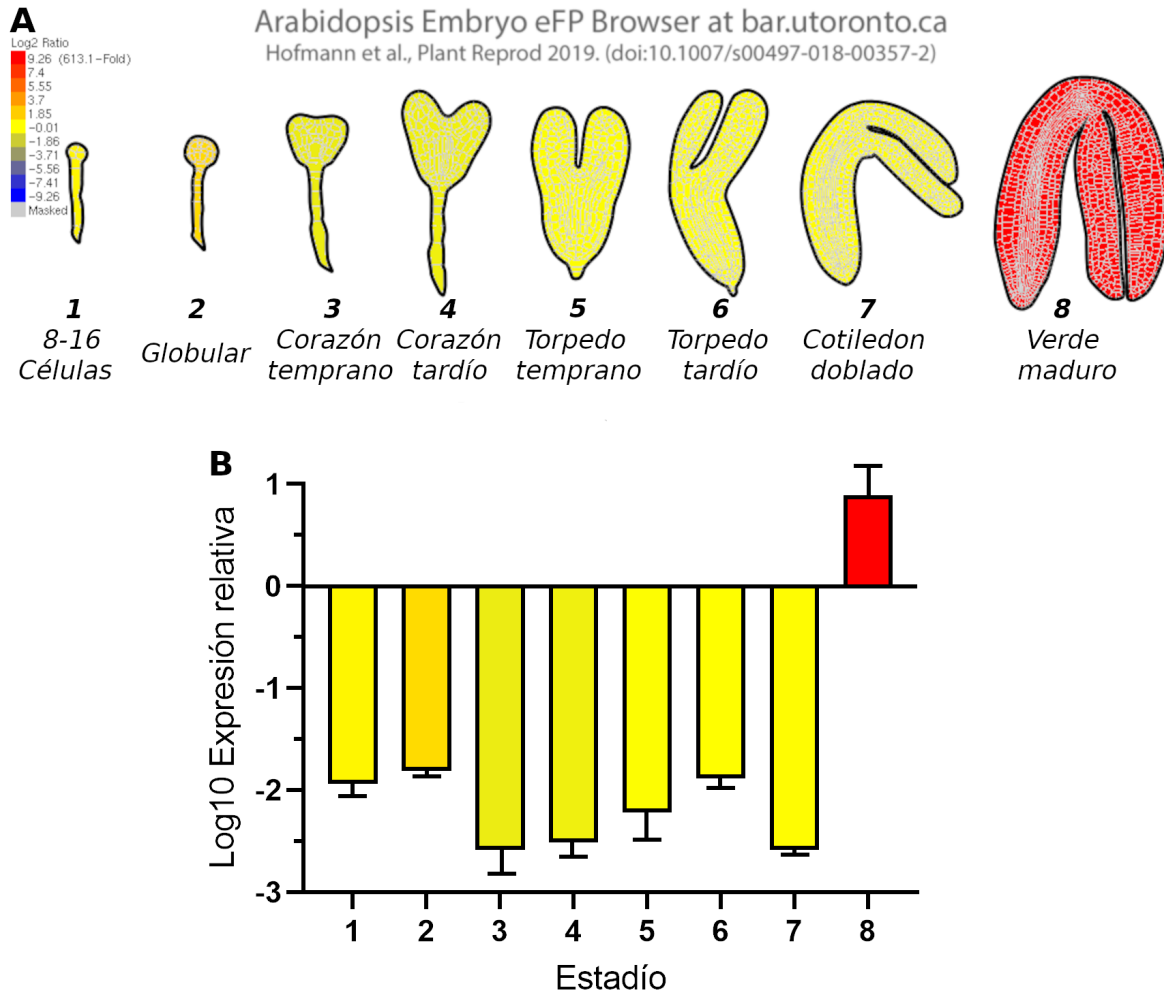
El estudio de la expresión génica puede ser utilizado para realizar una aproximación sobre los procesos fisiológicos donde participa el gen de interés. Para analizar el patrón de expresión de *AtUPS4* se utilizaron datos extraídos de diferentes experimentos de microarreglos y RNA-seq (Secuenciación del Transcriptoma Entero para Clonación al Azar) de la base de datos eFP Browser (Winter et al, 2007). Los niveles de expresión de *AtUPS4* fueron relativizados a la media geométrica de los valores absolutos de expresión de dos genes de referencia (*housekeeping*): *AtELF1A* (At5g60390) y *AtPP2A2-3* (At1g13320) según Dekkers et al, 2012. En primer lugar se utilizaron datos de RNA-seq obtenidos por Klepikova et al, 2016;

donde se estudió el transcriptoma de diferentes tejidos y órganos de *Arabidopsis*. Se observó que la expresión de *AtUPS4* es baja o nula en casi todos los tejidos analizados (figura 1A). La expresión fue máxima en la semilla seca luego de su formación, y baja de forma abrupta luego de 24 horas de imbibición. Cabe destacar que la expresión en semilla seca fue 6750 veces superior a la de la última etapa de formación estudiada. Además, se observan valores intermedios de expresión en algunas piezas florales, particularmente en las anteras de la flor madura. Para visualizar cuantitativamente los niveles de expresión de la semilla se graficaron los valores correspondientes a las muestras señaladas con asteriscos (figura 1B-C).



**Figura 2. Análisis in silico de la expresión de *AtUPS4* en *Arabidopsis thaliana*.** (A) Expresión relativa del gen *AtUPS4* en diferentes tejidos y órganos de *A. thaliana*. El nivel de expresión se muestra cualitativamente con una escala de colores que va del amarillo (expresión nula) al rojo (expresión elevada). Datos de ARN-seq obtenidos por Klepikova et al, 2016, tomado y modificado de eFP Browser (Winter et al, 2007). (B) Expresión de *AtUPS4* durante la maduración y (C) la imbibición de la semilla. Se representa el Log10 de los niveles de expresión de las muestras marcadas con asteriscos en (A). Se muestran las diferencias estadísticamente significativas de distintos estadios de maduración o imbibición, con respecto a la semilla seca o el tiempo 0, respectivamente: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

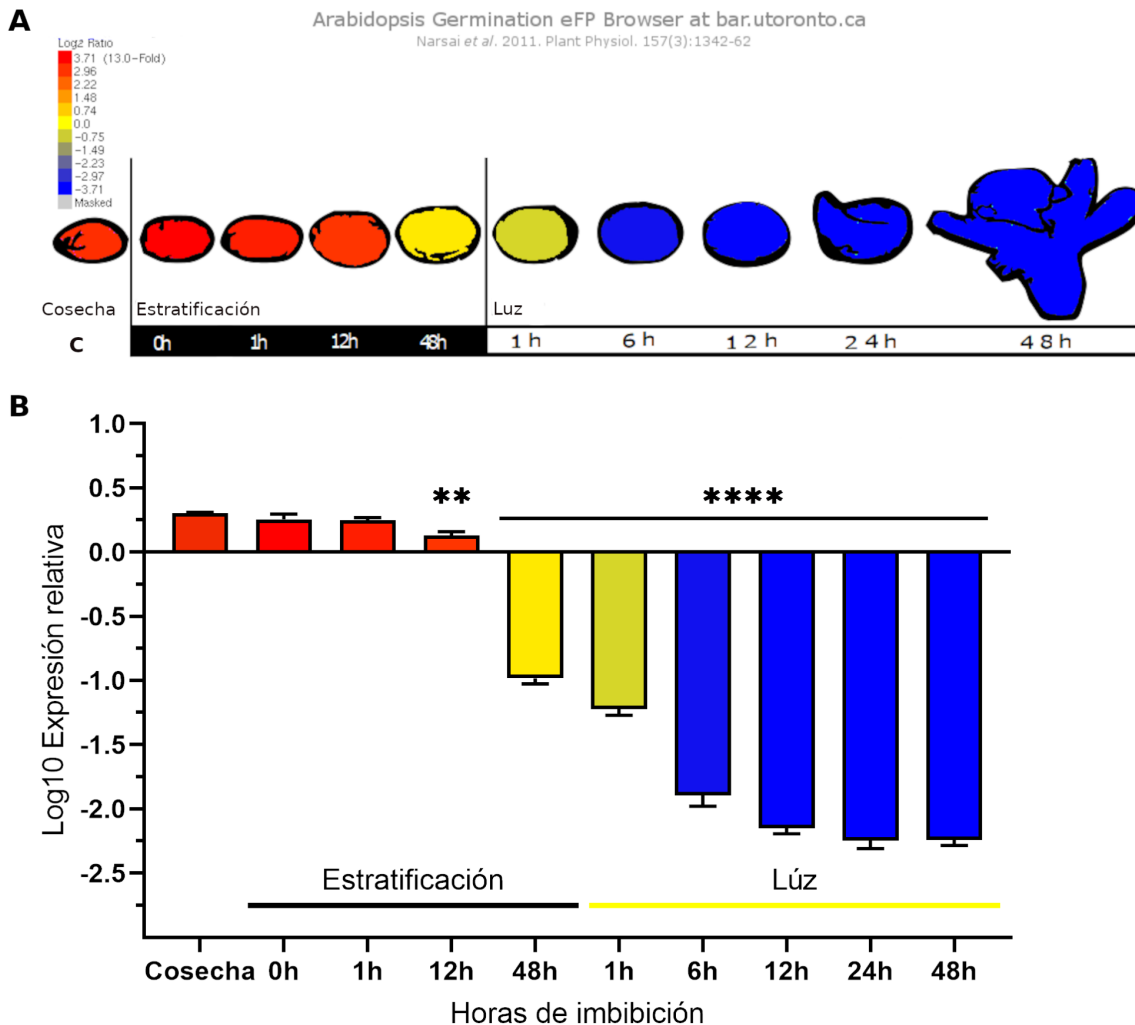
La semilla consta del embrión y de tejidos circundantes, los cuáles suelen estar relacionados con la protección y la nutrición del mismo. Para analizar con mayor definición la expresión de *AtUPS4* en los tejidos embrionarios durante su formación, se utilizaron valores medidos por Hofmann et al, 2019. Se observó que la expresión media de *AtUPS4* en las primeras siete etapas de formación del embrión es baja o casi nula, sin embargo presenta un pico de acumulación de ARNm en el último estadio del embrión (embrión verde maduro) (figura 2). Curiosamente, la expresión de *AtUPS4* fue 2974 veces mayor en el embrión verde maduro respecto al estadio inmediatamente previo de cotiledón doblado. Esto se corresponde con los estudios de Klepikova, donde el pico de máxima expresión se presenta en el último estadio de la formación de la semilla (figura 1). Si bien los datos no muestran diferencias significativas, la tendencia se mantiene en ambos experimentos analizados. Estos resultados en conjunto indican que la transcripción de *AtUPS4* sucedería en los últimos momentos de la maduración donde la semilla comienza a secarse y entra en la dormición primaria. Sin embargo, no queda claro la situación en tejidos extraembrionarios, ya que los datos disponibles no son conclusivos.



**Figura 3. Expresión de *AtUPS4* durante la formación y desarrollo del embrión.** (A) Esquema de la expresión relativa del gen *AtUPS4* en el embrión. Se muestra cualitativamente con una escala de colores que va del amarillo (expresión nula) al rojo (expresión elevada). Elaborado a partir de datos obtenidos por Hofmann et al, 2019, tomado y modificado de eFP Browser (Winter et al, 2007). (B) Expresión relativa de *AtUPS4* durante la maduración de la semilla. Se representa el Log10 de los valores indicados por colores en (A) multiplicados por cien:  $\text{Log}_{10}(100 * \text{expresión relativa})$ .

Para cuantificar la expresión de *AtUPS4* durante la germinación se analizaron datos de transcriptoma de semillas secas e imbibidas a intervalos de tiempo relativamente cortos (Narsai et al, 2011). A partir de estos datos se observó un patrón de expresión similar al obtenido con los datos del atlas de Klepikova: la expresión de *AtUPS4* fue elevada en la semilla seca recién cosechada (cosecha) y luego de 15 días de almacenamiento (0h de estratificación) (figura 3). Adicionalmente, puede observarse que el nivel de ARNs de *AtUPS4* se mantuvo entre 1.80 y 1.77 en el tiempo 0 y hasta la primera hora de imbibición. La expresión de *AtUPS4* decayó 1.34 veces luego de 12 horas de estratificación, y disminuyó 17.26 veces luego de

48 horas de estratificación. Con estos resultados se concluye que existe una drástica disminución en los niveles de ARNm de *AtUPS4* durante las primeras 24 horas de imbibición.



**Figura 4. Expresión relativa de *AtUPS4* durante la germinación.** (A) Esquema de la expresión relativa del gen *AtUPS4* durante la imbibición. Se muestra cualitativamente con una escala de colores que va del azul (represión génica) al rojo (expresión elevada). Elaborado a partir de datos obtenidos por Narsai et al, 2019; tomado y modificado de eFP Browser (Winter et al, 2007). (B) Log10 de los valores indicados por colores en (A). Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ .

### El ácido abscísico regula la transcripción de *AtUPS4*

Para conocer en detalle la regulación transcripcional de *AtUPS4* se buscaron motivos conservados ubicados en *cis* en la región promotora del gen. Estos motivos conservados son secuencias del ADN que componen sitios de unión para factores

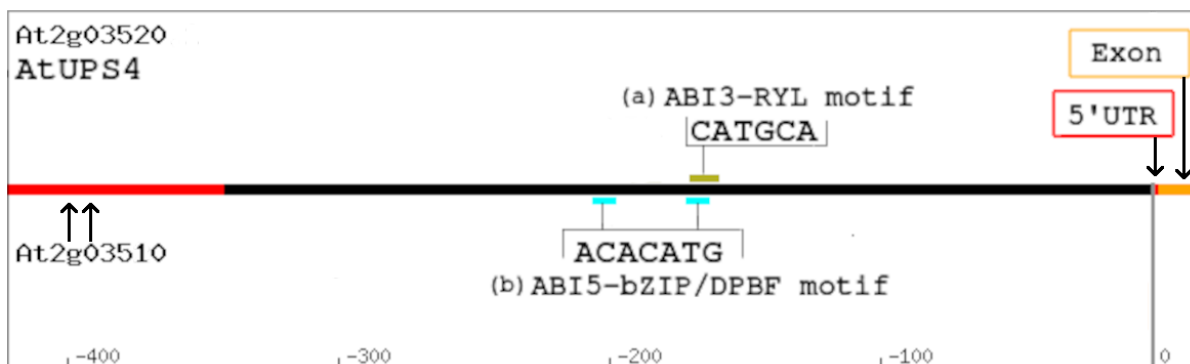


de transcripción cuya función es regular la transcripción génica (Priest et al, 2009). Las regiones promotoras de los genes de *Arabidopsis thaliana* presentan una longitud que varía entre 500 y 2000 pb (pares de bases) (Riechmann, 2002; Molina y Grotewold, 2005). Se decidió analizar únicamente las primeras 500 pb previas al TSS (*transcription start site*), ya que el gen que se encuentra aguas arriba de *AtUPS4* se posiciona aproximadamente a unas 350 pb de distancia, lo que podría estar indicando que el promotor de *AtUPS4* es más corto que el promedio. Se utilizaron las bases de datos *PLACE*, *AthaMap* y *AGRIS* (Higo et al, 1999; Bülow & Hehl, 2010; Yilmaz et al, 2010) para realizar la búsqueda de motivos conservados en la región promotora. La base de datos en la que se reconoció una mayor cantidad de motivos conservados en el promotor de *AtUPS4* fue *PLACE*, esto se debe a que en esta se incluyen algunos motivos que son propios de otras especies vegetales modelo, como el tomate o el maíz. Sin embargo, solo se tomaron en consideración aquellos motivos propios de la planta de interés para este trabajo, *Arabidopsis thaliana* L. Los motivos putativos identificados en el promotor de *AtUPS4* responden a factores de transcripción dependientes de ABA, que están relacionados con la respuesta al estrés por deshidratación y tienen funciones específicas en la semilla (tabla 1). Las secuencias que son reconocidas por los factores *AtMYB2* y *Atrd22BP1*, presentes en el promotor de *AtUPS4*, se han descubierto previamente en el promotor del gen *Atrd22BP1* (Abe et al, 1997). Se conoce que *Atrd22BP1* se activa en situaciones de estrés por sequía, dependiente de la señalización por ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993). También se encontraron en el promotor de *AtUPS4* dos repeticiones de la secuencia ACACATG, que es reconocida por el factor de transcripción *AtABI5*. Este factor está relacionado con la detención de la germinación durante situaciones de estrés, se expresa en los últimos momentos de la maduración de la semilla y se activa con ABA (Finkelstein y Lynch, 2000). Además, se reconoció en la región promotora una repetición del motivo tipo RY. Esta secuencia es reconocida por varios factores de transcripción, entre ellos: *AtABI3*, *AtFUS3* y *AtLEC2* (Mönke et al, 2012). Estos factores de transcripción actúan durante la formación de la semilla, están relacionados con el inicio de la dormición y también responden a ABA (Carrera et al, 2008).

Factor de transcripción	Motivo	Posición	Base de datos		
			PLACE	AGRIS	AthaMap
MYB2	TAACCA	-430pb	WAACCA	No reconocido	(C/T)AAC
ABI5 (bZIP)*	ACACATG	-205pb, -170pb	ACACNNG	ACACATG	No reconocido
rd22BP1*	CACATG	-204pb, -171pb			
ABI3, FUS3, LEC2	CATGCA	-167pb		No reconocido	LEC2

**Tabla 1. Motivos conservados seleccionados de las bases de datos consultadas.** Listado de los motivos encontrados en el promotor de *AtUPS4*, ordenados de los más lejanos a los más cercanos al sitio de inicio de la transcripción. Se muestra qué factor reconoce las secuencias registradas, sus repeticiones, sus posiciones con respecto al TSS y en qué base de datos son reconocidos. Los asteriscos indican motivos con 2 repeticiones.

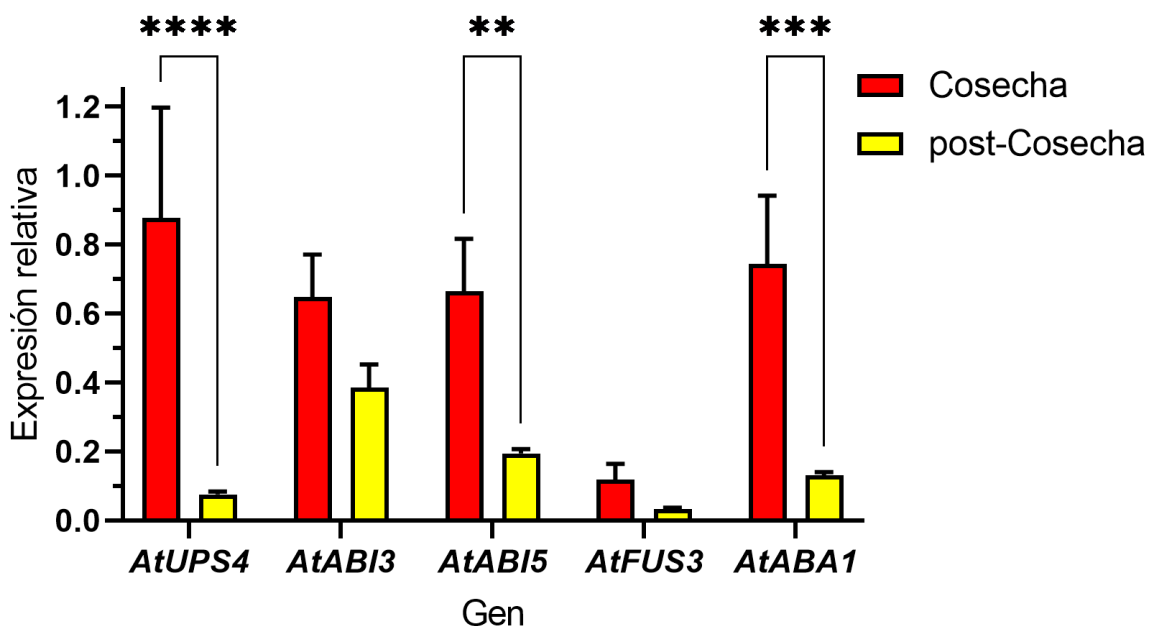
Se utilizó la base de datos AthaMap (Bülow & Hehl, 2010) para generar una vista espacial de los motivos reconocidos por *AtABI3* y *AtABI5*, registrados en el promotor de *AtUPS4* (figura 4). Puede observarse que la región intergénica (línea negra) que separa el gen aguas arriba de *AtUPS4* (línea roja) consta de unas 350pb aproximadamente. Las secuencias conservadas se concentran en los primeros 400 nucleótidos desde la región 5'UTR, específicamente entre las 167 y 205pb (tabla 1).



**Figura 5. Representación gráfica de la secuencia promotora de *AtUPS4*.** Esquema del promotor de *AtUPS4*. Se muestran las primeras 400 pb previas al TSS (5'UTR): en color rojo se muestra el final del gen aguas arriba de *AtUPS4* (*At2g03510*), en color negro la región intergénica donde se muestra la ubicación del motivo "tipo RY" por encima y las repeticiones del motivo bZIP por debajo. Imagen tomada y modificada de AthaMap (Steffens et al, 2004).

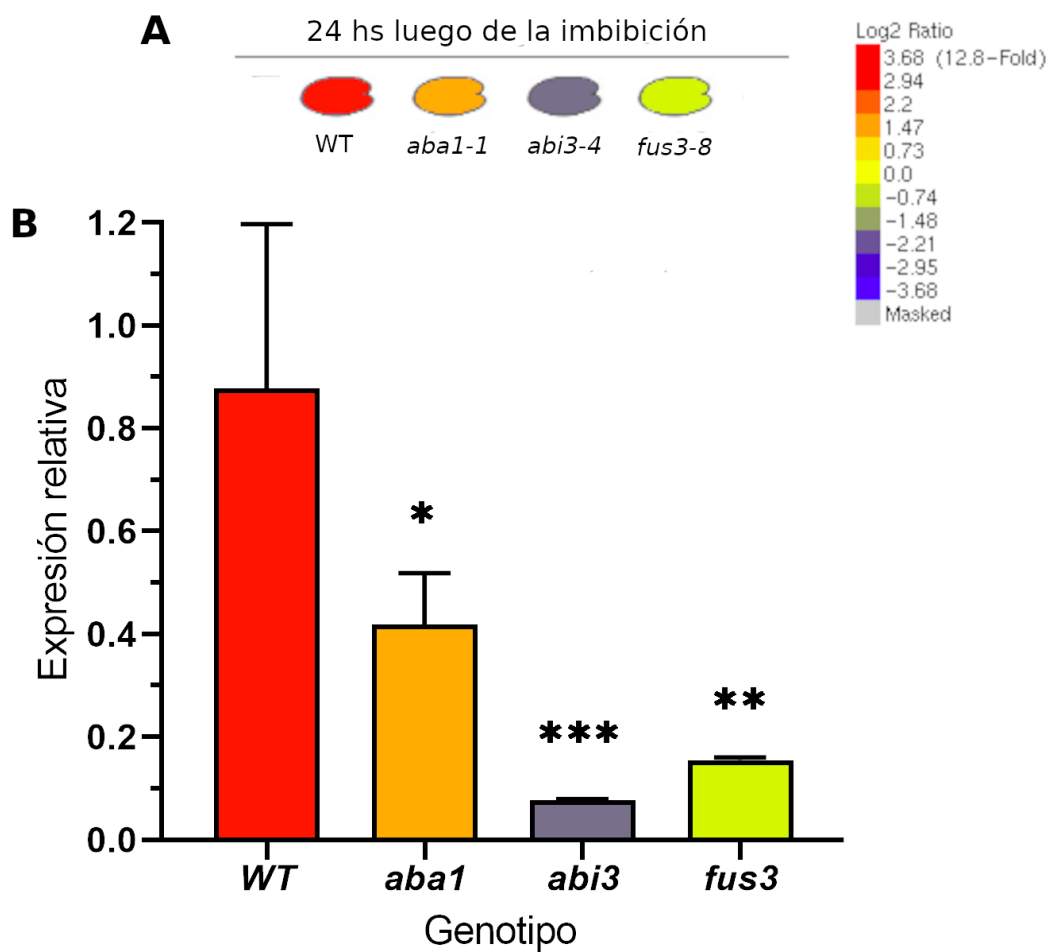
Si bien este análisis del promotor sugiere posibles vías regulatorias que modulan la expresión génica de *AtUPS4*, estos estudios no son suficientes para confirmar si estos motivos conservados son funcionales *in planta*. Por esta razón se utilizaron datos de expresión medidos por Carrera et al, 2008, donde se investigó el

transcriptoma relacionado a la dormición. En este trabajo se midieron los transcritos de semillas WT luego de 24hs de imbibición, utilizando semillas de dos condiciones diferentes: recién cosechadas o luego de 60 días de almacenamiento (60 días post-cosecha). Se decidió estudiar la variación de los niveles de expresión de *AtUPS4* entre semillas recién cosechadas y luego del almacenamiento, con respecto a la variación de los genes *AtABI3*, *AtABI5*, *AtFUS3* y *AtABA1*. El gen *AtABA1* codifica la enzima *Zeaxantina epoxidasa* (ZEP), que se encarga del primer paso de la síntesis de ABA. En principio se observó una disminución del 91.5% de la expresión relativa de *AtUPS4* en la semilla post-cosecha comparada a la semilla recién cosechada (figura 5). Esta tendencia puede observarse en diferentes grados en todos los genes analizados, sin embargo sólo muestra diferencias estadísticamente significativas para los genes *AtABI5* y *AtABA1*. En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que estos factores de transcripción y el ABA podrían estar relacionados con la regulación de *AtUPS4*.



**Figura 6. Expresión de *AtUPS4*, *AtABA1* y de factores de transcripción relacionados a ABA en semillas recién cosechadas y almacenadas.** Expresión relativa de los genes *AtUPS4*, *AtABI3*, *AtABI5*, *AtFUS3* y *AtABA1*, en semillas WT luego de 24hs de imbibición. Se muestra la expresión de semillas puestas a imbibir recién cosechadas o luego de 60 días de almacenamiento (60 días post-cosecha). Datos obtenidos a partir del transcriptoma de Carrera et al, 2008. Los asteriscos representan diferencias significativas según el test de Bonferroni: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

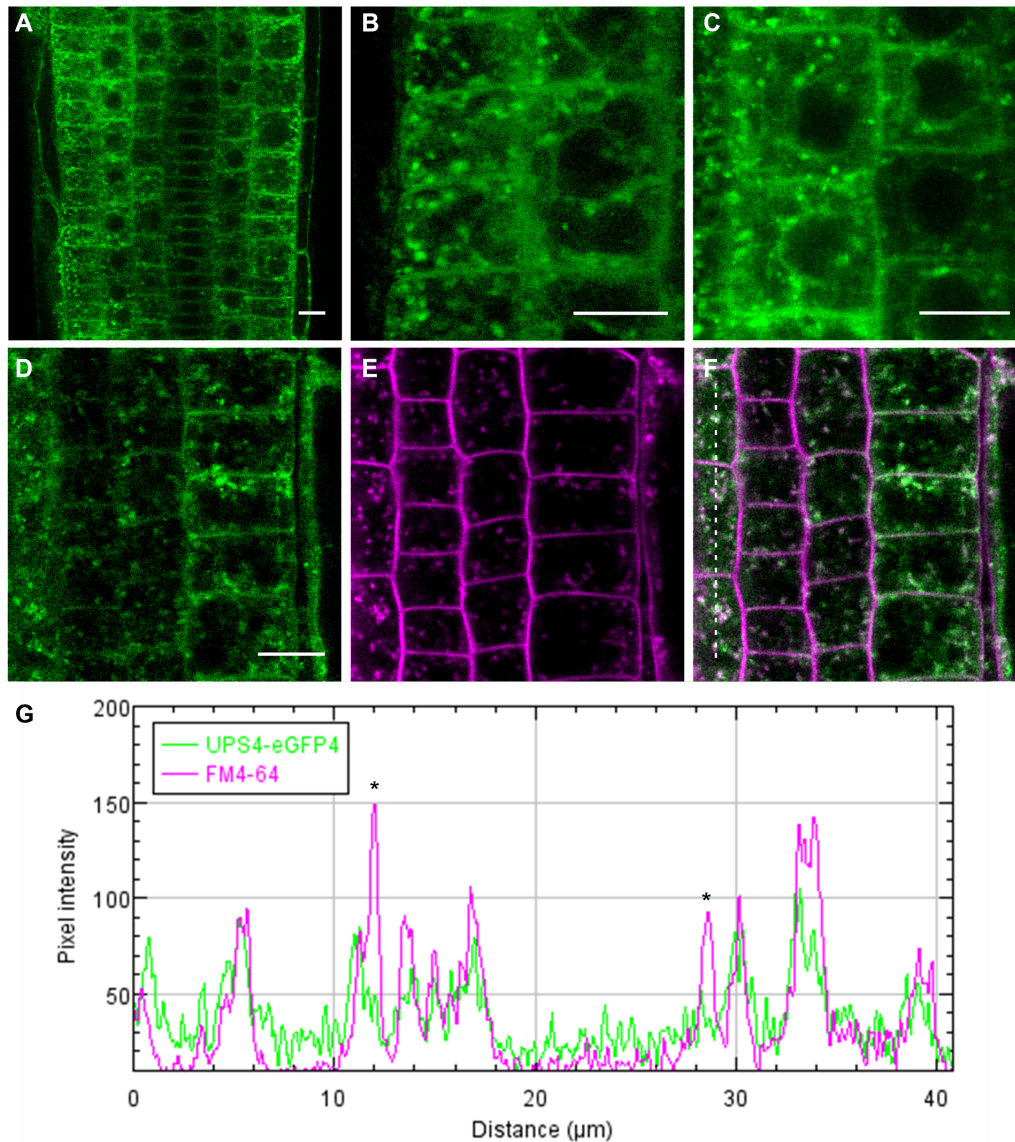
Para conocer si el ABA y los factores de transcripción relacionados modulan la expresión de *AtUPS4*, se analizaron los valores de expresión relativa de *AtUPS4* en los mutantes *aba1-1*, *abi3-4* y *fus3-8* a partir de datos obtenidos por Carrera et al, 2008. Se observó que la expresión de *AtUPS4* fue la mitad en el mutante *aba1* (deficiente en la producción de ABA) que en el WT y disminuyó 5.7 veces y 11.3 veces en los mutantes *fus3* y *abi3*, respectivamente (figura 6). Estos resultados, en conjunto con los estudios del promotor descritos anteriormente, sugieren que los factores de transcripción *AtABI3* y *AtFUS3* activan la transcripción de *AtUPS4*, y que esta es dependiente del ABA.



**Figura 7. Transcritos acumulados de *AtUPS4* en diferentes semillas mutantes y de tipo salvaje.** Expresión relativa de *AtUPS4* en semillas de diferentes genotipos (mutantes y salvajes), luego de 24hs de imbibición de semillas recién cosechadas. Elaborado a partir de datos obtenidos por Carrera et al, 2008. Se muestran las diferencias estadísticas con respecto al control (WT) según el test de Bonferroni: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

## **El transportador *AtUPS4* se encuentra en el retículo endoplásmico y la membrana plasmática**

Los estudios de expresión presentados en este trabajo sugieren que el transportador *AtUPS4* podría tener un rol funcional durante las etapas finales del desarrollo y las primeras horas de imbibición de la semilla. Otro aspecto clave para determinar la función de un transportador es conocer su localización subcelular. Esta información permitiría adicionalmente aproximarse al conocimiento del movimiento de sus sustratos entre los distintos compartimentos subcelulares. Para conocer el destino subcelular de *AtUPS4* se utilizaron plantas transformadas con un constructo genético *pUBI10:UPS4-eGFP4* (Tesis Doctoral Ignacio Lescano). Esta construcción consiste en la secuencia de ADN complementario (ADNc) de *AtUPS4* fusionada la secuencia de la proteína verde fluorescente (eGFP4), bajo el control del promotor de expresión constitutiva de Ubiquitina10 (*AtUBI10*). Debido a que las fusiones de *tags* en el extremo C o N terminal de los AtUPS producen proteínas inactivas que se acumulan en el retículo endoplásmico (Schmidt et al, 2006), la secuencia de GFP fue fusionada al *loop* central de *AtUPS4*. Esta aproximación metodológica se ha utilizado para estudiar la localización subcelular de *AtUPS1* y *AtUPS5*, y su funcionalidad ha sido demostrada mediante experimentos de complementación genética (Froissard et al, 2006; Lescano et al, 2020). Se observaron raíces de plántulas mediante un microscopio confocal de fluorescencia. Se observó que *AtUPS4* presentó una localización reticulada alrededor del núcleo, que es típica de proteínas que se encuentran en el retículo endoplásmico (figura 7a-c). Adicionalmente se observó un patrón puntuado y móvil característico asociado a vesículas (figura 7b-d). Para estudiar si *AtUPS4* se localiza en la vía endocítica, algunas muestras se tiñeron con FM4-64, el cuál es un marcador del sistema endocítico y de la membrana plasmática (Geldner et al, 2003; Grebe et al, 2003) (figura 7d-f). Para colocalizar *AtUPS4*-GFP y FM4-64 se midió la intensidad de los píxeles de ambos canales utilizando el programa FIJI-ImageJ. Se observó que los perfiles de *AtUPS4*-GFP y FM4-64 presentaron patrones coincidentes en vesículas y en la membrana plasmática (figura 7f-g). Con estos resultados se concluye que *AtUPS4* se localiza en el retículo endoplásmico, el sistema endocítico y la membrana plasmática.

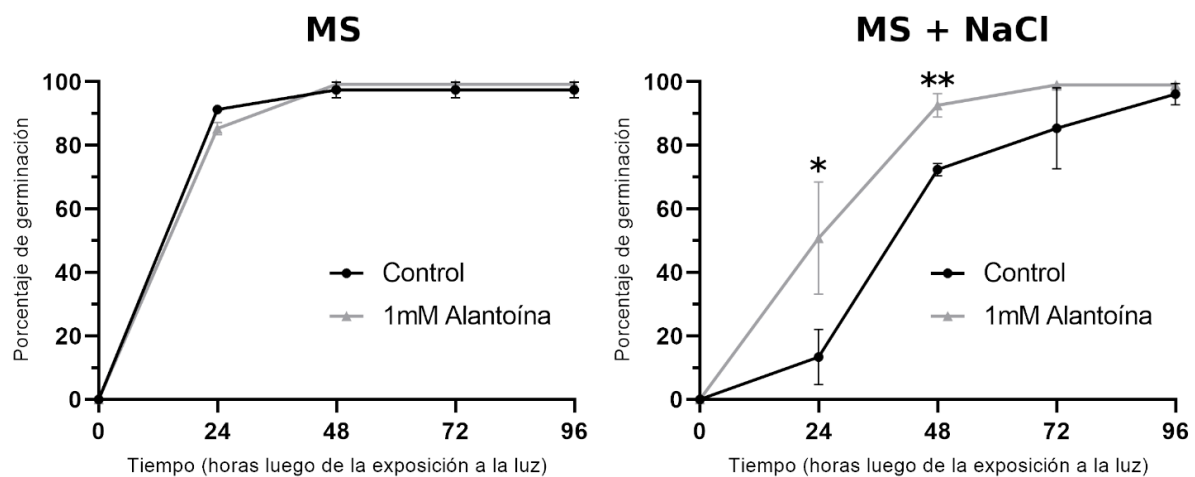


**Figura 8. Localización subcelular de AtUPS4 en raíces de Arabidopsis.** (A-C) Imágenes representativas de microscopía láser confocal de raíces de plantas de Arabidopsis transformadas con la construcción pUBI10:UPS4-eGFP4. Se muestran detalles de la señal GFP en el RE y vesículas (B) y (C). Escala = 10 μm. (D-F) Co-localización con el marcador endocítico FM4-64. Se muestran los canales GFP (D), FM4-64 (E) y ambos combinados (F). Escala = 10 μm. (G) Perfiles de intensidad para cada canal, obtenido de los píxeles marcados con una línea punteada en (F). Los asteriscos indican la señal de FM4-64 en la membrana plasmática.

### El agregado de alantoína mejora la germinación en medio salino

Como se ha mencionado previamente, se ha observado que plantas de Arabidopsis acumulan alantoína cuando crecen en un medio salino. Este mecanismo ha sido relacionado a la tolerancia a distintos estreses (Irani & Todd, 2016; Brychkova et al, 2008; Nourimand & Todd, 2016). Para conocer si la alantoína exógena tiene un

efecto protector en semillas durante la germinación en condiciones de estrés salino, se sembraron semillas WT en medio control (MS 0,5X), con agregado de alantoína (MS 0,5X + 1mM de alantoína), con agregado de sal (MS 0,5X + 100mM de NaCl) o con ambos compuestos agregados al medio (MS 0,5X + 100mM de NaCl + 1mM de alantoína). Se observó que el agregado de alantoína no modificó significativamente el porcentaje de germinación en el tiempo, en el sustrato sin salinidad (figura 9). El agregado de NaCl 100mM al medio de cultivo redujo la tasa de germinación en un 90% a las 24hs de la exposición a la luz, 30% a las 48hs y un 20% a las 72hs, con respecto al medio sin salinidad. Sin embargo, la adición de 1mM de alantoína al medio salino mostró un aumento significativo del porcentaje de germinación en el tiempo, en comparación al control (sin alantoína) (figura 9). Estos resultados indican que el agregado exógeno de alantoína al medio mejora la tasa de germinación en situaciones de estrés por salinidad.



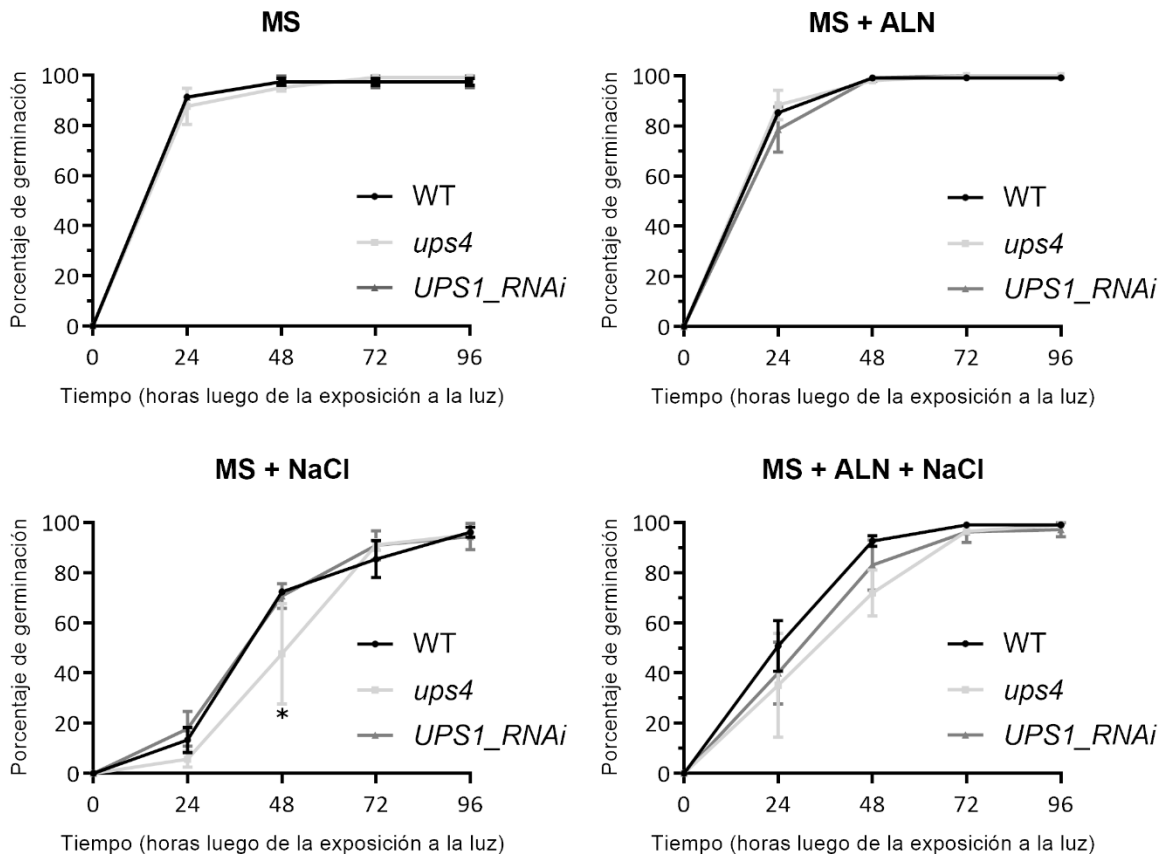
**Figura 9. Germinación en medio salino, con o sin alantoína agregada.** Porcentajes de germinación de semillas WT en medio MS 0,5X (MS) o MS 0,5X + 100mM NaCl (MS + NaCl); con (1mM Alantoína) o sin alantoína agregada (Control). Se muestran las diferencias significativas con respecto al control: \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

### AtUPS4 es requerido para la germinación en condiciones de estrés salino

Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el transportador *AtUPS5* juega un rol importante en el transporte de alantoína requerido para la tolerancia al estrés salino (Lescano et al, 2016). Ya que *AtUPS4* presenta características similares a *AtUPS5* como son su estructura proteica, su localización subcelular y su capacidad de transporte de alantoína cuando se expresa de forma heteróloga en

levaduras (Anexo 1), se podría pensar que *AtUPS4* tenga una función equivalente durante la germinación. Para estudiar este aspecto se comparó el porcentaje de germinación de semillas mutantes *ups4* (Salk\_093921), *UPS1-RNAi* (Desimone et al, 2002) y de WT en medio control y salino (NaCl 100 mM), suplementados con 0 o 1 mM de alantoína. En condiciones control (MS 0,5x) y con alantoína agregada (MS 0,5x + Aln 1mM) ambos líneas transgénicas (*ups4*, *UPS1-RNAi*) no presentaron diferencias significativas en la velocidad de germinación comparado con las semillas de tipo salvaje (figura 10). En el tratamiento con sal (MS 0,5x + NaCl 100mM) el mutante *ups4* presentó una germinación significativamente retrasada en comparación al WT luego de 24 y 48 horas de colocar las placas en la luz. Se observó una tendencia similar entre los distintos genotipos germinados con sal y alantoína, sin embargo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Para el caso de las semillas *UPS1-RNAi* los porcentajes de germinación fueron similares al WT en el medio con NaCl 100mM, pero presentaron una menor germinación al agregar alantoína exógena (figura 10). Estos resultados sugieren que el transportador *AtUPS4* es necesario para facilitar el transporte de alantoína requerido para la germinación en condiciones de estrés salino.





**Figura 10. Experimentos de germinación en salinidad.** Representación gráfica de los porcentajes de germinación de semillas WT, *ups4* y *UPS1\_RNAi*, imbibidas en cuatro medios diferentes: MS 0,5X (MS), MS 0,5X + 1mM alantoína (MS + ALN), MS 0,5X + 100mM NaCl (MS + NaCl) o MS 0,5X + 1mM alantoína + 100mM NaCl (MS + ALN + NaCl). Medidas cada 24hs a partir de la exposición de las semillas a la luz, durante cuatro días. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto al WT: \* $p < 0.05$ .

## 6. Discusión

### Regulación de la transcripción de *AtUPS4*

El descubrimiento de los genes *AtUPS* en *Arabidopsis* llevó a la caracterización de sus homólogos en leguminosas nodulantes, donde tienen la función de transportar los ureidos sintetizados en los nódulos. En las plantas nodulantes la alantoína es uno de los principales compuestos utilizados para el transporte de nitrógeno desde los nódulos a la parte aérea (Pélissier et al, 2004; Collier & Tegeder et al, 2012). Debido a que en *Arabidopsis* el transporte de nitrógeno orgánico asimilado del suelo se realiza principalmente a través de glutamina y asparagina, se desconocía qué función podrían tener los transportadores de la familia *AtUPS*. La localización

diferencial de los miembros de la familia de transportadores *AtUPS* sugiere que participan en distintos procesos fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Schmidt et al, 2006). Estudios preliminares de expresión de *AtUPS4* de nuestro laboratorio, encontraron transcritos inmaduros en la semilla seca y transcritos maduros luego de una hora de imbibición. En el análisis de expresión realizado en este trabajo se observó que la expresión de *AtUPS4* es casi nula en los distintos tejidos de *Arabidopsis*, pero es elevada en la semilla seca (figuras 2 y 4). Específicamente, los transcritos de *AtUPS4* se originan de forma puntual durante el período de desecación que ocurre en los últimos momentos de la maduración de la semilla, se mantienen elevados en la semilla seca y decaen de forma paulatina durante las primeras 24 horas de imbibición (figuras 2 y 4). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los ARNm de *AtUPS4* se generan rápidamente al final de la maduración y se almacenan para luego ser traducidos durante las primeras horas de la germinación. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que la función de *AtUPS4* esté relacionada con los procesos propios del final de la etapa de maduración, los que incluyen la tolerancia a la desecación y la adquisición de la dormición primaria. Por ello, determinar los niveles de transcritos maduros y de proteínas nativas de *AtUPS4* ayudaría a lograr una mejor comprensión de los mecanismos post-transcripcionales de regulación de *AtUPS4*, y en qué etapas del desarrollo dichos mecanismos regulatorios serían relevantes

Los análisis *in silico* del promotor de *AtUPS4* refuerzan la idea de que es un transportador propio de la semilla. Los motivos tipo RY y bZIP encontrados en el promotor son reconocidos por factores de transcripción que están íntimamente relacionados con los procesos propios de la semilla, como la maduración (incluida la dormición) y la germinación. El motivo tipo RY (CATGCA) presente en el promotor (figura 5) es reconocido por los factores *AtABI3*, *AtFUS3* y *AtLEC2*, lo que indica que es posible que regulen la transcripción de *AtUPS4*. Para conocer el rol de estos factores de transcripción en la regulación de la expresión de *AtUPS4*, en este trabajo se analizaron datos de transcriptomas de mutantes *aba1*, *abi3* y *fus3* (Carrera et al, 2008). Se observó que la expresión de *AtUPS4* fue significativamente menor en todos los mutantes, comparados con el genotipo salvaje (figura 7). La expresión de *AtUPS4* se vió disminuida al 50% en el mutante *aba1*, deficiente en la primera enzima de la vía de síntesis de ABA (Carrera et al, 2008). En los mutantes

*fus3* y *abi3* la expresión se redujo en un 75 y 80%, respectivamente, en comparación al WT (figura 7). Mönke et al (2012) ya habían propuesto que *AtUPS4* es uno de los genes regulados positivamente por el factor de transcripción *AtABI3*. En conjunto, estos datos indican que la transcripción de *AtUPS4* es activada por ABA a través del factor de transcripción *AtABI3*, y posiblemente a través de *AtFUS3*, *AtLEC2* y *AtABI5*. Sería importante realizar análisis que permitan dilucidar si efectivamente estos factores de transcripción interaccionan físicamente con el promotor de *AtUPS4*. Estos estudios, en conjunto con los resultados de este trabajo, ayudarían a determinar cuál o cuáles de estos factores son clave en la regulación de la expresión de *AtUPS4*.

### **Función de *AtUPS4***

Recientemente se ha relacionado a la acumulación de alantoína con la tolerancia al estrés en *Arabidopsis* (Watanabe et al, 2014). Además, se encontró que en plántulas sometidas a estrés salino, se induce la translocación de alantoína de la raíz a la parte aérea dependiente del transporte realizado por *AtUPS5* (Lescano et al, 2016). La ubicación subcelular idéntica y la alta similitud en la estructura proteica de *AtUPS4* y *AtUPS5* sustenta la idea de que ambos transportadores cumplen funciones celulares similares. Además, trabajos realizados en nuestro laboratorio indican que *AtUPS4* tiene la capacidad de transportar alantoína *in vivo*. La expresión heteróloga de *AtUPS4* en levaduras mutantes (*dal4*) -incapaces de tomar de alantoína del medio- logró revertir esta incapacidad y les permitió crecer en un medio de cultivo con alantoína como única fuente de nitrógeno (Anexo 1). Se observó también que *AtUPS4* expresado en levaduras no fue capaz de transportar 5-FU, una pirimidina tóxica, sugiriendo que tiene un espectro de sustratos similar a *AtUPS5* y no a *AtUPS1/AtUPS2*. Sin embargo, otros estudios serían requeridos para conocer si la alantoína es un sustrato fisiológico de *AtUPS4* en el contexto metabólico de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En un trabajo reciente, donde se investigó los efectos de los mutantes *ups1*, *ups2*, *ups4* y *ups5* sobre la acumulación de algunos metabolitos de la vía de degradación de las purinas, se encontró que el mutante *ups4* acumula alantoína en la semilla seca en cantidades significativamente mayores en comparación al genotipo salvaje (Ewert, 2020). Este resultado refuerza la idea de que *AtUPS4* transporta alantoína *in planta*. La

ubicación subcelular de *AtALN*, la enzima degradadora de alantoína, en el lumen del RE (Werner et al, 2008) sugiere que la alantoína debe ser transportada hacia esta organela para ser degradada. La acumulación de alantoína en mutantes *ups4* (Ewert, 2020) y la localización de *AtUPS4* en la membrana del RE (figura 7) son indicios de que este transportador podría estar involucrado en el transporte de alantoína hacia esta organela, requerido para su degradación por *AtALN*. Por otro lado, Ewert 2020 no detectó diferencias en el contenido de alantoína en hojas senescentes de plantas salvajes y *ups4*, reforzando la idea de que *AtUPS4* es un transportador propio de la semilla.

Si bien es posible que *AtUPS4* transporte alantoína en la planta, se desconoce qué función tendría este transporte en el metabolismo. Como se mencionó previamente, se ha propuesto que la alantoína podría funcionar como un antioxidante, disminuyendo las cantidades de especies reactivas del oxígeno durante la situación de estrés (Brychkova et al, 2008). También se ha hipotetizado que la alantoína podría actuar activando genes relacionados al sistema antioxidante (Irani & Todd, 2016; Nourimand & Todd, 2016), o aquellos que están relacionados con el metabolismo del ABA (Watanabe et al, 2014). Además, se ha observado que la alantoína interacciona directamente con la enzima *AtBG18*, que se encarga de la deconjugación de ABA-GE (inactivo) a ABA (activo). La señalización de la síntesis y deconjugación de ABA por la alantoína han sido vinculadas con la tolerancia al estrés (Watanabe et al, 2014). Si bien es pensable que esta señalización puede ser importante durante la maduración y la germinación, hasta el momento no se habían realizado estudios sobre el rol de la alantoína en las semillas. Recientemente se ha propuesto que el gen *AtALN* actúa como un regulador negativo de la dormición: en semillas desarrolladas en plantas madres sometidas a estrés por frío se observó que la represión de *AtALN* está directamente relacionada con los niveles de dormición (Iwasaki et al, 2019). De esta forma es posible que los niveles de alantoína tengan un efecto en la mantención de la dormición. Sin embargo, en este trabajo no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación al agregar alantoína exógena al medio de crecimiento (figura 9). De hecho, otros estudios realizados en el laboratorio utilizando mutantes de *AtALN* con niveles de alantoína constitutivamente elevados respecto al genotipo salvaje, indican que

tampoco existe un efecto de la acumulación de alantoína endógena en la germinación en condiciones control.

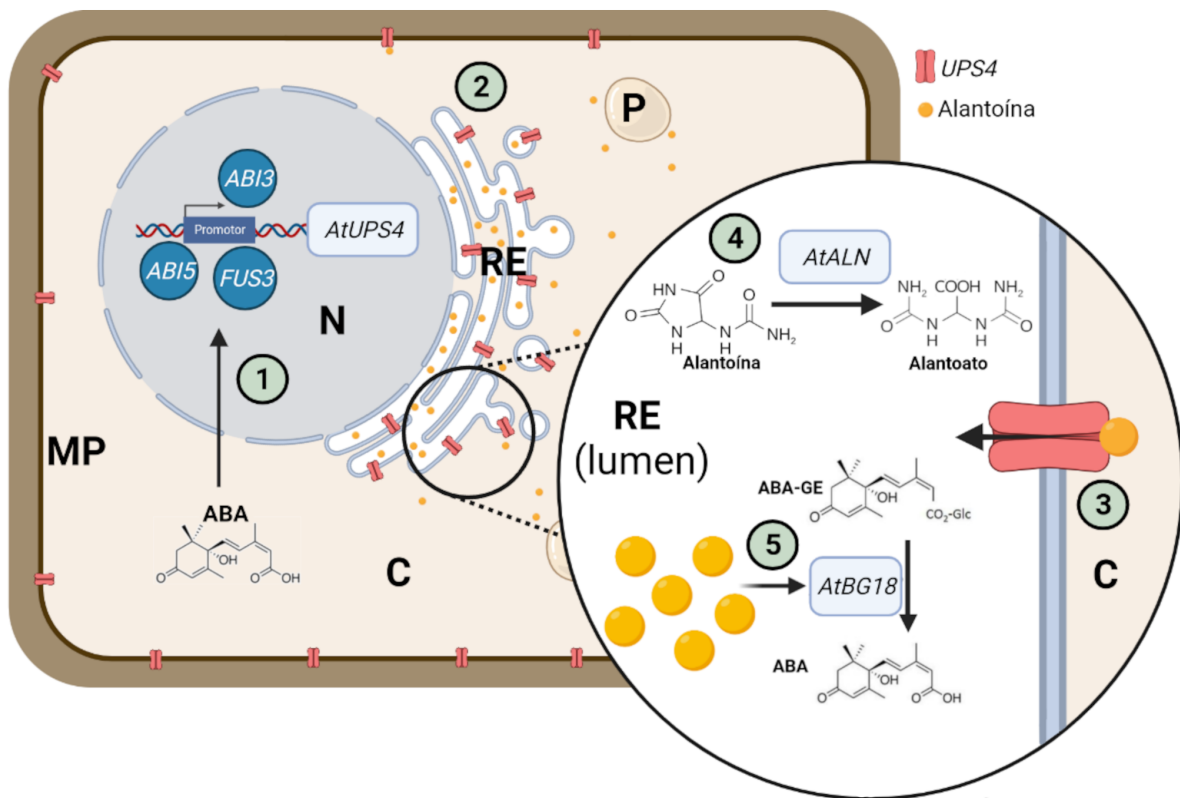
Por otro lado, en este trabajo se observó que la adición de alantoína al medio salino mejoró la velocidad de germinación (figura 9). Esto refuerza la hipótesis de que la alantoína participa en la señalización de la situación de estrés. Sumado a esto, las mutantes *ups4* presentaron una germinación significativamente retrasada respecto a las semillas salvajes en medio con agregado de NaCl (figura 10). Estos resultados sugieren que el transporte de alantoína, mediado por *AtUPS4*, podría promover la tolerancia al estrés salino durante la germinación. Sin embargo, los mecanismos por los cuales esto sucede aún no han sido completamente dilucidados. El patrón de expresión único y regulación fina de *AtUPS4* indican que podría tener un rol fisiológico en la respuesta al estrés de semillas, posiblemente en las primeras horas de la imbibición. En ese sentido, si bien las semillas *ups4* germinaron tardíamente respecto a las WT en condiciones de salinidad, alcanzaron valores similares en el porcentaje de germinación luego de 96hs de exposición a la luz. Esto indica que es posible que a partir de las 48hs de imbibición *AtUPS5* u otros transportadores de ureidos participen en el transporte de alantoína y la señalización de la respuesta al estrés.

## **Modelo y conclusiones**

En vista de los resultados obtenidos, los transcriptomas estudiados y la bibliografía analizada, se propone un modelo de funcionamiento de *AtUPS4* con las siguientes características (figura 11):

- (1) La expresión de *AtUPS4* depende de ABA, a través del factor de transcripción *AtABI3* y posiblemente *AtFUS3* y *AtABI5*. Esto sucede en la semilla, en la ventana temporal entre el inicio de la dormición y las primeras 24 horas de la germinación.
- (2) El transportador *AtUPS4* se encuentra en el retículo endoplásmico, el sistema endocítico y la membrana plasmática.
- (3) *AtUPS4* tiene la capacidad de transportar alantoína *in vivo*, y se hipotetiza que su función está relacionada con el importe de alantoína al RE.

- (4) En el RE se encuentra *AtALN* (Werner et al, 2008) que tiene la función de catalizar la degradación de alantoína en alantoato. Entonces, la acumulación de alantoína en retículo dependerá del balance entre su importe por *AtUPS4* y su degradación por *AtALN*.
- (5) Se conoce que en el RE se encuentra *AtBG18* (Lee et al, 2006), esta enzima cataliza la deconjugación de ABA-GE. La alantoína interacciona directamente con *AtBG18* activando la deconjugación de ABA-GE a su forma activa (Watanabe et al, 2014).
- (6) La acumulación de alantoína en *Arabidopsis* activa genes de síntesis y de degradación de ABA (Watanabe et al, 2014). Los procesos que ocurren en (5) y (6) señalan la respuesta al estrés.



**Figura 11. Modelo de funcionamiento de *AtUPS4*.** Esquema de una célula vegetal donde se muestra el núcleo (N), el retículo endoplásmico (RE), el peroxisoma (P), el citosol (C) y la membrana plasmática (MP). (1) Regulación de *AtUPS4* por factores de transcripción dependientes de ABA. (2) Ubicación subcelular de *AtUPS4* en RE y MP. (3) Transporte de alantoína hacia el lumen del RE mediado por *AtUPS4*. (4) Degradación de alantoína a alantoato mediada por *AtALN*. (5) Deconjugación de ABA-GE por *AtBG18* dependiente de la interacción con alantoína.

## **7.Bibliografía**

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., & Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 9(10), 1859-1868.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, 14(1), 1-16.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R., & Sagi, M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* Arabidopsis mutant. *The Plant Journal*, 54(3), 496-509.
- Bülow, L., Brill, Y., & Hehl, R. (2010). AthaMap-assisted transcription factor target gene identification in Arabidopsis thaliana. *Database*, 2010.
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F. L., & Holdsworth, M. J. (2008). Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 53(2), 214-224.
- Collier, R., & Tegeder, M. (2012). Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *The Plant Journal*, 72(3), 355-367.
- Dekkers, B. J., Willems, L., Bassel, G. W., van Bolderen-Veldkamp, R. P., Ligterink, W., Hilhorst, H. W., & Bentsink, L. (2012). Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in Arabidopsis and tomato seeds. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 28-37.
- Delmas, F., Sankaranarayanan, S., Deb, S., Widdup, E., Bournonville, C., Bollier, N., ... & Samuel, M. A. (2013). ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), E3888-E3894.
- Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., ... & Schumacher, K. (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(4), 847-856.
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist*, 171(3), 501-523.

- Finkelstein, R. R., & Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The plant cell*, 12(4), 599-609.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 387-415.
- Froissard, M., Belgareh-Touzé, N., Buisson, N., Desimone, M., Frommer, W. B., & Haguenaer-Tsapis, R. (2006). Heterologous expression of a plant uracil transporter in yeast: improvement of plasma membrane targeting in mutants of the Rsp5p ubiquitin protein ligase. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(3), 308-320.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., ... & Jürgens, G. (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112(2), 219-230.
- Goldberg, R. B., De Paiva, G., & Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266(5185), 605-614.
- Grebe, M., Xu, J., Möbius, W., Ueda, T., Nakano, A., Geuze, H. J., ... & Scheres, B. (2003). Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Current Biology*, 13(16), 1378-1387.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), 297-300.
- Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J., & Varotto, S. (2014). Current perspectives on the hormonal control of seed development in Arabidopsis and maize: a focus on auxin. *Frontiers in Plant Science*, 5, 412.
- Hofmann, F., Schon, M. A., & Nodine, M. D. (2019). The embryonic transcriptome of Arabidopsis thaliana. *Plant reproduction*, 32(1), 77-91.
- Irani, S., & Todd, C. D. (2016). Ureide metabolism under abiotic stress in Arabidopsis thaliana. *Journal of plant physiology*, 199, 87-95.
- Irani, S., & Todd, C. D. (2018). Exogenous allantoin increases Arabidopsis seedlings tolerance to NaCl stress and regulates expression of oxidative stress response genes. *Journal of plant physiology*, 221, 43-50.
- Iwasaki, M., Hyvärinen, L., Piskurewicz, U., & Lopez-Molina, L. (2019). Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *Elife*, 8, e37434.



- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, *88*(6), 1058-1070.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., ... & Hwang, I. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, *126*(6), 1109-1120.
- Lescano, C. I., Martini, C., González, C. A., & Desimone, M. (2016). Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to *Arabidopsis* plants. *Plant molecular biology*, *91*(4-5), 581-595.
- Lescano, I., Devegili, A. M., Martini, C., Tessi, T. M., González, C. A., & Desimone, M. (2020). Ureide metabolism in *Arabidopsis thaliana* is modulated by C: N balance. *Journal of plant research*, *133*(5), 739-749.
- Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J., & Varotto, S. (2014). Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 412.
- Molina, C., & Grotewold, E. (2005). Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters. *BMC genomics*, *6*(1), 1-12.
- Mönke, G., Seifert, M., Keilwagen, J., Mohr, M., Grosse, I., Hähnel, U., ... & Altschmied, L. (2012). Toward the identification and regulation of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 regulon. *Nucleic acids research*, *40*(17), 8240-8254.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.
- Nambara, E., Nambara, E., McCourt, P., & Naito, S. (1995). A regulatory role for the ABI3 gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, *121*(3), 629-636.
- Narsai, R., Law, S. R., Carrie, C., Xu, L., & Whelan, J. (2011). In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *157*(3), 1342-1362.
- Nourimand, M., & Todd, C. D. (2016). Allantoin increases cadmium tolerance in *Arabidopsis* via activation of antioxidant mechanisms. *Plant and Cell Physiology*, *57*(12), 2485-2496.

- Ooms, J. J., Leon-Kloosterziel, K. M., Bartels, D., Koornneef, M., & Karssen, C. M. (1993). Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant physiology*, *102*(4), 1185-1191.
- Pélissier, H. C., Frerich, A., Desimone, M., Schumacher, K., & Tegeder, M. (2004). PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean. *Plant Physiology*, *134*(2), 664-675.
- Priest, H. D., Filichkin, S. A., & Mockler, T. C. (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current opinion in plant biology*, *12*(5), 643-649.
- Riechmann, J. L. (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *1*.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 676-682.
- Schmidt, A., Su, Y. H., Kunze, R., Warner, S., Hewitt, M., Slocum, R. D., ... & Desimone, M. (2004). UPS1 and UPS2 from *Arabidopsis* mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 44817-44824.
- Schmidt, A., Baumann, N., Schwarzkopf, A., Frommer, W. B., & Desimone, M. (2006). Comparative studies on Ureide Permeases in *Arabidopsis thaliana* and analysis of two alternative splice variants of AtUPS5. *Planta*, *224*(6), 1329-1340.
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2016). The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Frontiers in plant science*, *7*, 1884.
- Watanabe, S., Matsumoto, M., Hakomori, Y., Takagi, H., Shimada, H., & Sakamoto, A. (2014). The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, cell & environment*, *37*(4), 1022-1036.
- Werner, A. K., Sparkes, I. A., Romeis, T., & Witte, C. P. (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoin amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology*, *146*(2), 418-430.
- West, M., & Harada, J. J. (1993). Embryogenesis in higher plants: an overview. *The Plant Cell*, *5*(10), 1361.

- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, 2(8), e718.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1993). Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. *Plant physiology*, 101(3), 1119.
- Yilmaz, A., Mejia-Guerra, M. K., Kurz, K., Liang, X., Welch, L., & Grotewold, E. (2010). AGRIS: the Arabidopsis gene regulatory information server, an update. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_1), D1118-D1122.

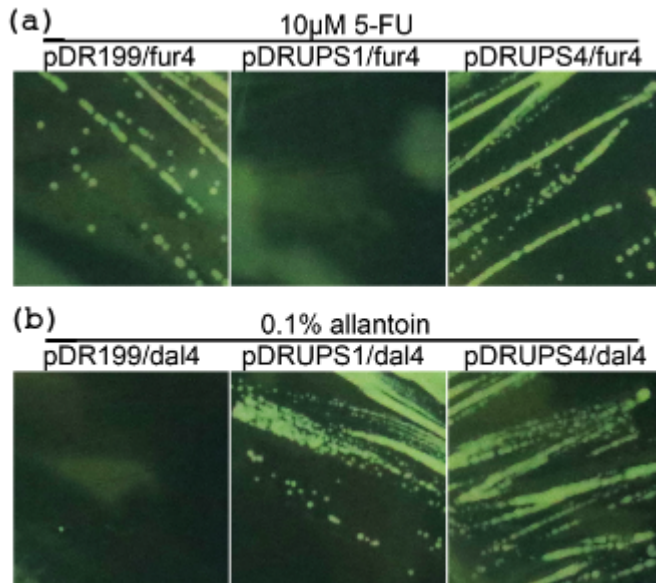
## **Anexo**

### **AtUPS4 transporta alantoína *in vivo***

Se analizó si *AtUPS4* es capaz de transportar uracilo y/o alantoína, ya que estos son sustratos conocidos de otros transportadores de la familia de los *AtUPS* (*AtUPS1*, 2 y 5). Para ello se utilizaron levaduras incapaces de tomar uracilo del medio (*fur4*, mutantes en el transportador FUR4) transformadas con constructos para expresar *AtUPS4* o *AtUPS1*, o el vector vacío. Se verificó la capacidad de crecimiento de las mismas en un medio con 5-fluorouracilo (5-FU), un análogo tóxico del uracilo. En este sistema, la incapacidad de crecimiento indica que las levaduras pueden tomar 5-FU del medio, pero que no logran desarrollarse a causa de intoxicación con el mismo. Las levaduras *fur4* transformadas con *AtUPS1* no crecieron en un medio con 5-FU, lo que indica la capacidad de *AtUPS1* para transportar uracilo, como ha sido reportado por [Bauman, 2004](#). Sin embargo, las levaduras *fur4* transformadas con el vector vacío o pDRUPS4 crecieron en un medio con 5-FU, sugiriendo que el uracilo no sería sustrato de *AtUPS4*.

Para conocer si *AtUPS4* transporta alantoína se utilizaron levaduras mutantes en el transportador de alantoína DAL4 (*dal4*) que fueron transformadas con las construcciones mencionadas anteriormente, y luego inoculadas en un medio con alantoína como única fuente de nitrógeno. Se observó que ambas levaduras *dal4* transformadas con *AtUPS1* o *AtUPS4* presentaron la capacidad de crecer en un medio con alantoína como única fuente de nitrógeno, no así el control con el vector vacío pDR199. Esto sugiere que ambos transportadores pueden utilizar alantoína

como sustrato. En conjunto, estos resultados indicarían que *AtUPS4* tiene la capacidad de transportar alantoína, pero no uracilo.



**Figura 8. Crecimiento de levaduras mutantes, transformadas, en medio con 5-FU o 0.1% alantoína.** (a) Crecimiento de levaduras mutantes incapaces de tomar uracilo del medio (*fur4*), en cultivo con 5-FU. (b) Crecimiento de levaduras incapaces de tomar alantoína del medio (*dal4*), con alantoína como única fuente de nitrógeno. Las levaduras fueron transformadas con un vector vacío (*pDR199*, panel izquierdo), *AtUPS1* (*pDRUPS1*, panel central) o *AtUPS4* (*pDRUPS4*, panel derecho).