

Tesis Doctoral

Moduladores del remodelamiento de la red de Extensinas durante el crecimiento polarizado en el pelo radical: Peroxidasas Apoplásticas y Cisteina-EndoPeptidasas

Marzol, Eliana

2018-03-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marzol, Eliana. (2018-03-27). Moduladores del remodelamiento de la red de Extensinas durante el crecimiento polarizado en el pelo radical: Peroxidasas Apoplásticas y Cisteina-EndoPeptidasas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Marzol, Eliana. "Moduladores del remodelamiento de la red de Extensinas durante el crecimiento polarizado en el pelo radical: Peroxidasas Apoplásticas y Cisteina-EndoPeptidasas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-03-27.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología y Biología Molecular

**Moduladores del remodelamiento de la red de Extensinas
durante el crecimiento polarizado en el pelo radical:
Peroxidasas Apoplásticas y Cisteina-EndoPeptidasas.**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área: Ciencias Biológicas.

Lic. Eliana Marzol.

Director de tesis: Dr. José M. Estévez.

Consejero de estudios: Dr. Norberto Iusem.

Lugares de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires
(IIBBA-CONICET), Fundación Instituto Leloir.

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIByNE-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UBA.

Buenos Aires, 27/03/2018

Moduladores del remodelamiento de la red de Extensinas durante el crecimiento polarizado en el pelo radical: Peroxidasas Apoplásticas y Cisteína-EndoPeptidasas.

Los pelos radicales son importantes para la absorción de nutrientes y agua del suelo y sirven de anclaje a la planta. Estos poseen un crecimiento polarizado, es decir que crecen en un solo sentido. Este tipo de crecimiento se caracteriza por tener un comportamiento oscilatorio, acompañado por un gradiente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de iones Ca^{2+} . Las paredes celulares en las plantas imponen límites al crecimiento. Por lo cual, debe sufrir modificaciones constantes para lograr la expansión. Las paredes celulares están compuestas por polisacáridos y proteínas ricas en hidroxiprolina (hydroxyproline-rich glycoproteins; HRPGs) que incluyen a las extensinas (EXTs). Estas últimas, están unidas covalentemente a través de sus residuos de tirosinas, formando una red. Las Peroxidasas apoplásticas (PER_{III}) son enzimas que llevan a cabo tres diferentes ciclos enzimáticos, llamados ciclo peroxidativo, ciclo hidroxílico y ciclo oxidativo. Durante su ciclo peroxidativo, las PER_{III} usan H_2O_2 como agente oxidante para producir radicales libres en componentes fenólicos y glicoproteínas estructurales que pueden, en forma subsecuente forman enlaces covalentes estables. Esta actividad contribuye a la rigidización de la pared celular y por lo tanto limita el crecimiento. Las PER_{III} pueden también causar la relajación de la pared celular mediante su ciclo hidroxílico, en el cual producen ROS, lo que provoca el clivaje de polisacáridos en forma no enzimática y un relajamiento general de la pared celular. Por lo tanto, las PER_{III} pueden cumplir roles opuestos en la expansión celular, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Finalmente, en el ciclo oxidativo las PER_{III} generan radicales super-óxido (O_2^{\bullet}) a partir de la reducción de $^1\text{O}_2$, que puede ser dismutado a H_2O_2 , ya sea espontáneamente o enzimáticamente mediante la superóxido dismutasa (SOD) modulando así, los niveles de ROS. En esta tesis, se identificaron a las PER_{III} involucradas en el crecimiento del pelo radical. Se determinó su función en la producción de ROS necesario para la expansión y los efectos que estas enzimas producen en la pared celular. También, se demostró que las PER_{III} están reguladas por el FT RSL4, el cual es activado por auxinas a través de ciertos factores de respuesta a auxinas (ARFs). Los ARFs implicados en este proceso también fueron identificados en este trabajo. Otras enzimas que podrían modificar la estructura de la pared celular son las Cisteína-Endo Peptidasas (CEPs). Éstas son capaces de clivar EXTs a nivel de prolina e hidroxiprolina glicosilada, razón por la cuál, se hipotetiza que podrían regular ya sea el desensamblado de la red de EXTs en el apoplasto y/o ejercer un control de calidad en aquellas EXTs mal procesadas (sub-glicosiladas o sobre-glicosiladas) en el sistema secretorio en el RE-Golgi. En esta tesis se determinaron cuáles son las CEPs que se expresan en pelos radicales, se exploró el rol biológico de estas enzimas y su regulación transcripcional durante la expansión polarizada del pelo radical.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, Auxinas, Crecimiento Polarizado, Especies Reactivas de Oxígeno, Extensinas, Factores de Transcripción de Respuesta a Auxinas, Pared celular, Pelos Radicales, Regulación transcripcional de PER_{III} , NAC1, RSL4, SHAM.

Extensin's modulators during root hair growth: Apoplastic Peroxidases and Cysteine-EndoPeptidases.

Root hairs are important for the absorption of water and nutrients from the soil and serve as an anchorage to the plant. These have a polarized growth, that is mean that, they grow only in one direction. This type of growth have an oscillatory behavior accompanied by Reactive Oxygen Species (ROS) and Ca^{2+} ions gradients. However, the walls in cell plants, impose limits on growth. Therefore, it must be modified to achieve expansion. Cell walls are composed by polysaccharides and glycoproteins rich in hydroxyproline (HRPGs) that include the Extensins (EXTs). EXTs are covalently linkages through their tyrosine residues, forming a red in cell wall. Apoplastic peroxidases (PER_{III}) are heme-containing enzymes secreted in the extracellular space where they perform three different enzymatic cycles, namely the peroxidative, hydroxylic and oxidative cycles. During the peroxidative cycle, the enzyme converts different substrates, including cell wall phenolic compounds and structural proteins, into free radicals that can subsequently combine together to form covalent linkages. This activity contributes to cell wall stiffening and therefore limits growth. PER_{III} can also cause cell wall loosening through the hydroxylic cycle, in which H_2O_2 and O_2^- are used to generate hydroxyl radicals, including $\cdot\text{OH}$, that lead to nonenzymatic cleavage of polysaccharides. Finally, PER_{III} can also generate O_2^- , which is then dismutated into H_2O_2 , during the oxidative cycle. Therefore PER_{III} can play opposite roles in cell expansion, being able to cause both wall stiffening and loosening, depending on the growth conditions. In this work we explored the role of PER_{III} in the production of ROS, root hair polar growth and in the cell wall. It was also shown that PER_{III} are regulated by the transcription factor RSL4, which is activated by Auxins (AUX) through certain auxin response factors (ARFs). In this way, the implication of the PER_{III} in the production of ROS necessary for the cellular elongation mediated by AUX was demonstrated. Other enzymes that can modify the cellular structure of the cells wall are the Cysteine-Endo Peptidases (CEPs) wich are capable of digesting the EXT. It is believed that they can disassemble the red of EXTs in the apoplast and / or do a quality control in those poorly processed EXTs (sub-glycosylated or over-glycosylated) in the secretory system in the RE-Golgi. In this work, the biological role of these enzymes in root hair is explored and it is demonstrated which are root hairs specific and how is its transcriptional regulation.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, Auxins, Polarized Growth, Reactive Oxygen Species, Auxin Response, Root Hairs, Cell wall Transcriptional Regulation of PER_{III} , NAC1, RSL4, SHAM.

Agradecimientos

A José por aceptarme en su laboratorio y confiar en mí. No solamente me brindó el lugar y las herramientas para llevar a cabo mi tesis si no que permitió que pueda desarrollarme como profesional.

Quisiera agradecer a Melina Laguía por ser mi amiga, enseñarme a trabajar en la mesada, ayudarme a abrir los ojos y darme el impulso que necesito para tomar las decisiones correctas.

A Silvina, por ser mi maestra de la ciencia. A mis compañeros, Juan, Pao, Sil y Ceci, por su ayuda incondicional en este camino, por aguantarme en los momentos más difíciles y por impulsarme a seguir en cada obstáculo. Además, me brindaron su amistad de corazón y me regalaron momentos de felicidad enorme que nunca voy a olvidar.

A todos mis compañeros que, entre idas y vueltas, nos cruzamos menos pero estuvieron siempre dispuestos a ayudarme y acompañarme: Luciana, Melina, Martín, Ana, Ceci B., Rodri, Martinino y Javi.

A todos los integrantes de la FIL que me dieron lugar y ayuda constante para llevar a cabo el trabajo de investigación de esta tesis. Además de las charlas en los pasillos, de ciencia y de la vida, fútbol y salidas que hicieron mucho más agradable y enriquecedor el día a día.

Al comité de seguimiento de tesis doctoral, Dr. Gustavo Gudesblast, Dr. Pablo Cerdan y Dr. Gastón Paris, por su tiempo y dedicación brindada para seguir mi trabajo. Sus ideas y recomendaciones aportaron muchísimo a mi desarrollo como profesional.

A los que, a través de estos años fueron mis profesores colaborando con mi crecimiento profesional.

A los colaboradores: Al Dr. Alejandro Nadra, Ariel Artekmann, Dr. Hyung-Taeg Cho, Hee-Seung Choi, Dra. Margaret Brigham Fleming, Dra. Christine Gietl, Dra. Lin Xu y Dr. Jorge Muschietti por sus contribuciones claves en este trabajo.

A Norberto Iusem por ser mi consejero de estudios, por darnos un lugar de trabajo en el IFIBYNE y siempre estar predispuesto a ayudarnos.

A mi familia por ser mi pilar emocional. A mi mamá y a mi papá por darme el apoyo en cada decisión, por hacer todo lo posible (y lo imposible también) con tal de verme feliz. A mis hermanitos Jose y Vale que siempre, siempre, están a mi lado e hicieron mil cosas por mí dándome el tiempo necesario para que pueda cumplir mis objetivos.

A mis amigos y amigas que, fuera del laboratorio, supieron comprender lo que era importante para mí apoyándome en los momentos más difíciles, y me ayudaron a sacar fuerzas para seguir adelante.

A mi papá...

Publicaciones

Esta tesis dió lugar a las siguientes publicaciones:

- Marzol, Eliana*; Borassi, Cecilia*; Denita-Juárez, Silvina P.*; Mangano, Silvina* & Estevez, José M. (2017). **RSL4 Takes Control: Multiple Signals, One Transcription Factor**. *Trends in Plant Science*, vol 22(7), p. 553-555.
- Mangano, Silvina*; Denita-Juarez, Silvina P.*; Choi, Hee-Seung*; Marzol, Eliana*; Hwang, Youra; Ranocha, Philippe; Velasquez, Silvia M.; Borassi, Cecilia; Barberini, María Laura; Artekmann, Ariel A.; Mschiatti, Jorge P.; Nadra, Alejandro D.; Dunand, Christophe; Cho, Hyung-Taeg & Estevez, José M. (2017). **Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201701536.
- Borassi. C., A.R., Mecchia, M.A., Salgado Salter, J.D., Marzol, E., Muschiatti, J.P & Estevez, J.M. (2016). **An update on cell surface proteins containing extensin-motifs**. *J.Exp. Bot*, 67(2):477-87.
- Velasquez S.M., Ricardi, M.M., Poulsen, C.P., Oikawa, A., Dilokpimoladil, A., Halim, A., Mangano, S., Denita Juarez, S.P., Marzol, E., Salgado Salter, J.D., Gloazzo Dorosz, J., Borassi, C., Möller, S.V., Buono, R., Ohsawa, Y., Matsuoka, K., Otegui, M.S., Scheller, H.V., Geshi, N., Petersen, B.L., Iusem, N.D. & Estevez, J.M. **Complex regulation of Prolyl-4-hydroxylases impacts root hair expansion**. *Molecular Plant* 2015. Volume 8, Issue 5, 4, Pages 734–746.
- Velasquez, S.M., Marzol, E., Borassi, C., Pol-Fachin, L., Ricardi, M.M., Mangano, S., Denita Juarez, S.P., Salgado Salter, J.D., Gloazzo Dorosz, J., Marcus, S.E., Knox, J.P., Dinneny, J.R., Iusem, N.D., Verli, H. & Estevez, J.M. (2015) **Low sugar is not always good: Impact of O-glycan defects on tip growth in Arabidopsis**. *Plant Physiology*. Vol. 168 no. 3 808-813.

*Estos autores contribuyeron igualmente al trabajo.

Otras publicaciones logradas en el período de tesis:

- María Laura Barberini, Lorena Sigaut, Weijie Huang, Silvina Mangano, Silvina Paola Denita Juarez, Eliana Marzol, José Estevez, Mariana Obertello, Lía Pietrasanta, Weihua Tang and Jorge Muschiatti (2017). **Calcium dynamics in tomato pollen tubes using the Yellow Cameleon 3.6 sensor**. *Plant Reprod*, doi: 10.1007/s00497-017-0317-y.

Abreviaturas

Abreviaturas más utilizadas en esta tesis:

35S: Promotor de origen viral extraído del Virus del Mosaico del Coliflor.

ARF: Factor de respuesta a auxinas.

Aux-RE: Elementos de respuesta a auxinas.

cADN: ADN copia.

CEPs: Cisteina Endopeptidasas.

EXT: Extensina.

FT: Factor de transcripción.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

IAA: ácido 3-indol-acético.

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.

MS: sales *Murashige and Skoog*.

Mutante de T-ADN: Mutante generado por la inserción al azar de una secuencia de transposón.

NOXs: NADPH oxidasas.

p7: promotor de *EXPANSINA7*.

PER_{III}: Peroxidasas clase III.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PIP: proteínas intrínsecas de membrana, acuaporinas.

qPCR: PCR en tiempo real.

RE: Retículo endoplásmico.

RHE: elementos específicos de pelos radicales.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RT-PCR: Retro-transcripción asociada a PCR.

TM: Transmembrana.

Wt Col-0: planta de genotipo salvaje ecotipo Columbia 0.

Índice de contenido.

Introducción	12
1.1 Crecimiento polarizado en células vegetales. Pelos radicales como modelo celular y molecular.	12
1.2 Mecanismo molecular que regula el destino celular tricoblasto/atricoblasto en la epidermis de la raíz.....	16
1.3 El FT RSL4 es el regulador maestro de la diferenciación y desarrollo de los pelos radicales... ..	18
1.4 Regulación molecular mediada por auxinas.	21
1.5 Paredes celulares y expansión celular.	24
1.6 Extensinas (EXTs)	25
1.6 A Rol de las EXTs en el desarrollo de las plantas.	28
1.7 Peroxidasas clase III (PER _{III}).....	32
1.8 Cisteína Endopeptidasas (CEPs).....	36
Hipótesis	39
Objetivo general	41
Objetivos específicos	41
PER _{III}	41
CEPs	41
Materiales y métodos	42
1. Material vegetal.....	42
2. Análisis de mutantes de T-DNA.	42
3. Extracción de ADN.	43
4. Obtención de dobles mutantes mediante cruzamientos.	44
5. Análisis fenotípicos de pelo radical.....	44
6. Análisis fenotípicos de longitud de raíz total.....	44
7. Medición de ROS mediante H ₂ DCFDA.	45
8. Determinación de los niveles de H ₂ O ₂ citoplasmáticos (citH ₂ O ₂) mediante el uso del biosensor HyPer.....	46
9. Tratamientos farmacológicos.	47
9.A) Inhibición de PER _{III} con Ácido salicilhidroxilamínico (SHAM).	47
9.B) Tratamientos farmacológicos prolongados.	48
9.C) Tratamientos farmacológicos de tiempo corto.....	48
9.D) Tratamientos farmacológicos in vivo con el biosensor HyPer.....	49

10. Extracción de ARNm.....	49
10.A) Síntesis del ADN copia (cADN).	50
10.B) Análisis de los niveles de transcripto por PCR semi-cuantitativa (RT-PCR).	50
10.C) Análisis de los niveles de transcripto por PCR en tiempo real (qPCR).	50
11. Red de Co-expresión RSL4-PER.	51
12. Determinación de la actividad peroxidasa.	51
13. Estrategias de clonado.	52
13.A) Generación de líneas transgénicas de PER _{III}	52
13.B) Generación de líneas transgénicas de ARFs y RSL4.	52
13.C) <i>Floral dip</i> – Transformación con <i>Agrobacterium</i>	53
13.D) Identificación de las plantas transgénicas por resistencia y expresión de la fluorescencia.....	54
14. Western blot.	54
15. Búsqueda bioinformática de motivos de pegado de RSL4 y sitios Aux-RE.....	55
16. Inmunoprecipitación de la Cromatina y análisis por PCR (ChIP).	55
17. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión a lo largo del desarrollo del pelo radical utilizando el reportero del promotor.....	56
18. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio.	56
19. Visualización de la expresión de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19.	57
20. Análisis de proteínas con dominios tipo Extensinas en la pared celular de pelo radical.	57
21. Ensayo de GUS.	58
22. <i>Dockings</i> de un péptido tipo EXT en sitios putativos de unión a PER44	58
23. Modelado por homología de CEP1 e interacción con péptidos de EXTs.....	59
Tabla 1M: Líneas de mutantes insercionales utilizadas.	59
Tabla 2M: <i>Primers</i> utilizados para genotipar las líneas mutantes.....	61
Tabla 3M: Líneas de plantas transgénicas utilizadas.	62
Tabla 4M: <i>Primers</i> utilizados para los experimentos de clonado, CHIP-PCR, RT-PCR y qPCR	63
Capítulo 1: Caracterización de las Peroxidasas clase III (PER_{III}) involucradas la homeóstasis de ROS y su interrelación con Extensinas (EXTs).	68
Resultados.....	68
1. Homeostasis de ROS en pelos radicales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
1.1 Inhibición farmacológica de las PER _{III} mediante el uso de SHAM.	68
1.2 Producción de H ₂ O ₂ por parte de las PER _{III}	70

1.3 Las PER _{III} contribuyen la generación ROS producido por las NADPH oxidasas necesarias para la elongación celular.....	73
2. Identificación de las PER ^{III} involucradas en la elongación del pelo radical.....	77
3. Expresión de PER _{III} en pelo radical.....	79
4. Análisis de líneas mutantes insercionales de T-ADN de los genes que codifican para PER _{III}	80
5. Análisis de homología de secuencias.....	84
6. Análisis mediante modelado por homología de AtPER44.	87
7. Caracterización de proteínas con dominios tipo extensinas como sustratos del <i>crosslinking</i> mediado por PER _{III}	91
8. Regulación transcripcional de las PER _{III}	98
8.1 Regulación mediada por el FT RSL4.....	98
8.2 Regulación del crecimiento polarizado mediado por auxinas.	101
9. Transporte de ROS mediado por acuaporinas a través de la membrana plasmática.	117
Discusión	120
1. Las PER _{III} en el crecimiento polarizado y su implicancia en los niveles de ^{cit} ROS.	120
2. Evidencias de la formación de la red de EXTs en la pared celular.....	123
3. Regulación transcripcional de las PER _{III}	124
Capítulo 2: Identificación AtCEPs involucradas en el clivaje de EXTs durante el crecimiento polarizado del pelo radical.....	131
Resultados.....	131
1. Análisis de homología de secuencias.....	131
2. Expresión de CEPs en pelo radical.	134
3. Análisis de los mutantes de T-ADN de CEPs	136
4. Localización subcelular CEP2	138
5. Interacción de AtCEP1 con péptidos de tipo EXTs mediante modelado molecular.	140
6. NAC1 promueve la expresión de los genes <i>CEP1</i> y <i>CEP2</i> durante la organogénesis.....	142
6.1 Expresión del FT NAC1 en pelos radicales.....	143
Discusión	144
Referencias	150

Índice de Figuras y Tablas

Introducción

Figura 1I.....	13
Figura 2I.....	14
Figura 3I.....	15
Figura 4I.....	18
Figura 5I.....	20
Figura 6I.....	22
Figura 7I.....	25
Figura 8I.....	26
Figura 9I.....	28
Figura 10I.....	35
Tabla 1I.....	31

Hipótesis

Figura 1H.....	39
Figura 2H.....	40

Materiales y Métodos

Figura 1M.....	43
Figura 2M.....	45
Figura 3M.....	46
Figura 4M.....	47
Figura 5M.....	58
Tabla 1M.....	59
Tabla 2M.....	61
Tabla 3M.....	62
Tabla 4M.....	63

Capítulo 1: Caracterización de las Peroxidasas clase III (PER_{III}) involucradas la homeóstasis de ROS y su interrelación con Extensinas (EXTs).

Figura 1R.....	70
Figura 2R.....	72
Figura 3R.....	76
Figura 4R.....	78
Figura 5R.....	80
Figura 6R.....	83
Figura 7R.....	86
Figura 8R.....	88
Figura 9R.....	90
Figura 10R.....	93
Figura 11R.....	96

Figura 12R.....	98
Figura 13R.....	101
Figura 14R.....	103
Figura 15R.....	105
Figura 16R.....	109
Figura 17R.....	111
Figura 18R.....	113
Figura 19R.....	117
Figura 20R.....	119
Figura 1C.....	129
Tabla 1R.....	79
Tabla 2R.....	100
Tabla 3R.....	113
Tabla 4R.....	115

Capítulo 2: Identificación AtCEPs involucradas en el clivaje de EXTs durante el crecimiento polarizado del pelo radical.

Figura 21R.....	133
Figura 22R.....	135
Figura 23R.....	137
Figura 24R.....	139
Figura 25R.....	142
Figura 26R.....	144
Figura 2C.....	149
Tabla 5R.....	141

Introducción

1.1 Crecimiento polarizado en células vegetales. Pelos radicales como modelo celular y molecular.

Uno de los desafíos más grandes para la biología vegetal moderna es entender a las plantas a nivel de una célula individual. Algunas células como los pelos radiculares y los tubos polínicos han sido incorporados como modelos excelentes para estudiar la expansión celular polarizada y la biosíntesis de la pared celular. El crecimiento polarizado, donde las células crecen en un sentido único (Fig. 11.A), se logra gracias a una rápida secreción de componentes de pared celular y membrana plasmática en una región específica de la célula y a un aumento en la rigidez de la pared, para soportar las fuerzas laterales de turgencia. A pesar de la importancia de este proceso, poco se sabe de los mecanismos celulares y moleculares que controlan el crecimiento espacial y temporal de los pelos radicales (Ishida et al., 2008). Desde un punto de vista biológico, los pelos radicales contribuyen a incrementar el área superficial de la raíz facilitando la absorción de nutrientes y agua (H₂O) del suelo y también ayudan en el anclaje de la raíz durante el desarrollo de la plántula. Además, participan en la asociación de la raíz con microorganismos (Grierson, Nielsen et al. 2014).

Las células que se desarrollan del meristema apical de la raíz pasan a la zona de elongación y una vez que se han expandido totalmente según su eje longitudinal, comienzan a diferenciarse de acuerdo a su destino celular. En el caso de la epidermis, el destino celular puede ser de tricoblasto, si la célula se diferencia en pelo radical, o de atricoblasto si la célula no desarrolla pelo (Dolan et al., 1993). El destino de las células epidérmicas es regulado de por un mecanismo dependiente de la posición: si una célula epidérmica se encuentra sobre la unión de dos células corticales (posición "H" por *hair*) al diferenciarse, desarrollará un pelo radical, mientras que si la célula epidérmica está en contacto con una sola célula cortical (posición "N" por *non hair*) no desarrollará el pelo (Fig. 11. B).

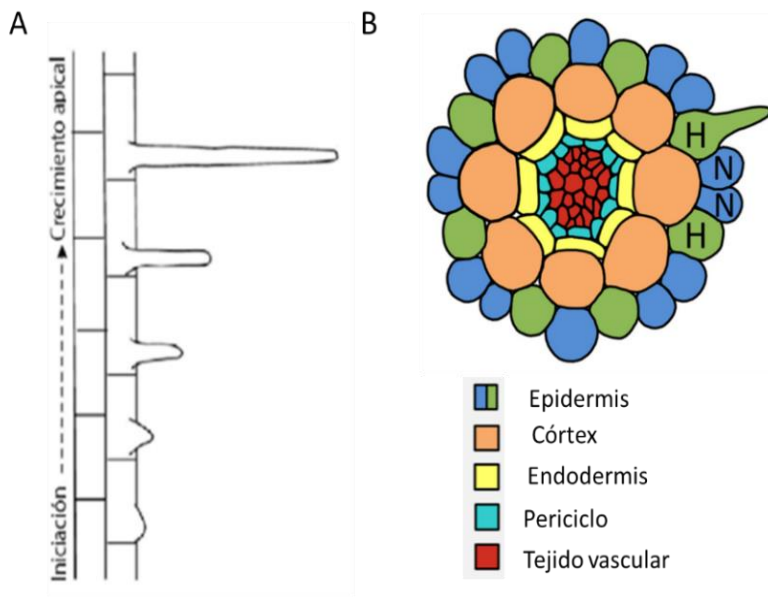


Figura 1: Esquema de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. **A)** Desarrollo de un pelo radical creciendo por el ápice del mismo (crecimiento polarizado). La formación del pelo radical comienza por la formación de un bulto (iniciación) y crece por el ápice del mismo (crecimiento apical). **B)** Representación esquemática de un corte transversal de la raíz. Células epidérmicas que se encuentran en contacto con dos células del córtex (posición H) dan lugar a la formación de pelos radicales. Células en contacto con una única célula cortical (posición N) no desarrollará pelo radical. Esquema extraído y modificado de (Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez et al. 2016).

La forma celular, la longitud y la densidad de los pelos radicales en la raíz están moduladas por diferentes señales ambientales. Entre ellas se puede mencionar el gradiente de nutrientes que se encuentra en el suelo como minerales de baja movilidad (ejemplo: fosfato inorgánico, hierro y manganeso) o elementos escasos (ejemplo: vanadio y boro) (Yi, Menand et al. 2010, Martín-Rejano, Camacho-Cristobal et al. 2011, Niu, Chai et al. 2014, Lin, Huang et al. 2015). Otras señales como la disponibilidad de H₂O, monóxido de carbono y niveles de dióxido de carbono también pueden afectar el desarrollo de los pelos radicales (Guo, Kong et al. 2009, Niu, Jin et al. 2011, Mirosław, Daszkowska-Golec et al. 2015). El crecimiento polarizado de los pelos radicales también responde a señales endógenas como son las fitohormonas tales como etileno y auxinas (Marzol, Borassi et al. 2017).

Durante la expansión celular polarizada, la zona apical de los pelos radicales se caracteriza por la formación un gradiente de Ca²⁺ citoplasmático ($_{cit}Ca^{2+}$) y de Especies Reactivas de Oxígeno citoplasmáticas ($_{cit}ROS$). Ambos, se encuentran más concentrados en el ápice de la célula y su concentración va disminuyendo hacia la base del pelo radical. Además, el $_{cit}Ca^{2+}$ y las $_{cit}ROS$ tienen comportamiento oscilatorio, es decir que se alternan momentos de altas concentraciones con momentos en que los niveles disminuyen (Fig. 3I). Las ROS son producidas mayoritariamente en el apoplasto celular por la NADPH oxidasa C o NOXC (también conocida como RHD2 por *root hair defective 2* o como RBOHC por *Respiratory Burst Oxidase Homolog protein C*). El gradiente de Ca²⁺ es necesario para la exocitosis de vesículas que contribuyen a la generación de nueva membrana y pared celular del ápice del pelo. Además, el Ca²⁺ se encuentra involucrado en la regulación del citoesqueleto de actina que se extiende desde la base del pelo hasta la zona sub-apical y es crítico para el movimiento de las organelas y de las vesículas hacia el ápice del pelo radical (Fig. 2I). Se postula que existe una retroalimentación positiva entre $_{cit}ROS$ y $_{cit}Ca^{2+}$ necesaria para sostener el crecimiento polarizado (Cardenas 2009). Por otro lado, es crítico el pH citoplasmático y apoplástico. El pH citoplasmático se caracteriza por ser oscilatorio al igual que los niveles de $_{cit}ROS$ y $_{cit}Ca^{2+}$. Los cambios en el pH son regulados mayormente por ATPasas de H⁺ tipo P de membrana (AHA) (Falhof, Pedersen et al. 2016). Otras enzimas, como las ROP GTPasas (Roh GTPasas de

plantas) son cruciales en para la regulación del crecimiento polarizado de los pelos radicales, principalmente en la regulación de la polarización y en el mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} (Molendijk, Bischoff et al. 2001, Hwang, Lee et al. 2005). Finalmente, el crecimiento polarizado no podría ser posible sin la presión de turgencia de la vacuola que genera la fuerza suficiente para permitir la extensión celular (Fig. 2I).

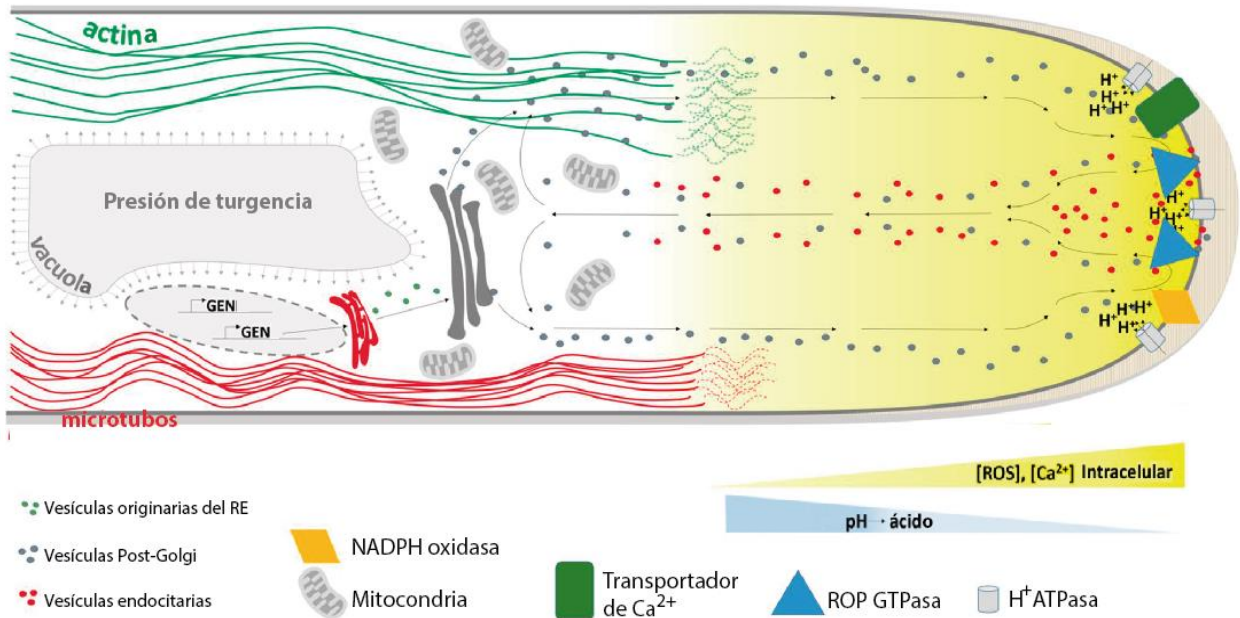


Figura 2I: Componentes moleculares y celulares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. Se puede observar gráficamente los diferentes componentes moleculares (ROP GTPasa, H^+ ATPasa, Transportadores de Ca^{2+} , NADPHoxidasa) y celulares (vesículas originarias del retículo endoplásmico (RE), vesículas post-golgi, vesículas endocitarias, filamentos de actina, microtúbulos, mitocondrias) que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. Además, en este proceso intervienen numerosos genes cuya transcripción y expresión están finamente regulada. Figura extraída y modificada de Balcerowicz et al. (2015) (Balcerowicz, Schoenaers et al. 2015).

Bajo el nombre de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) se agrupan las formas reactivas del oxígeno molecular. Se pueden clasificar las ROS de la siguiente manera:

- Radicales libres inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por lo tanto, distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta. Estos son el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el óxido nítrico (NO).
- Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno. Aquí se incluye un grupo de especies químicas que, sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos (Diplock 1991).

Es importante aclarar que en esta tesis se limitara la discusión de ROS a HO^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $^1\text{O}_2$.

Niveles elevados de ${}_{\text{cit}}\text{Ca}^{2+}$ en el ápice del pelo radical activa la producción de ROS apoplásticas (${}_{\text{apo}}\text{ROS}$) en una reacción catalizada por las NOXs. El balance de los niveles de ${}_{\text{cit}}\text{ROS}$ y ${}_{\text{apo}}\text{ROS}$ están regulados por la síntesis y los sistemas de depuración a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Apel and Hirt 2004). Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se pueden incluir al ascorbato, al glutatión, al tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides (Creissen, Firmin et al. 1999). Dentro de los mecanismos de depuración de ROS enzimáticos se pueden incluir a la superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y a la catalasa. El exceso de ROS es tóxico para las proteínas, ADN y lípidos (Apel and Hirt 2004) por lo que, el balance de estas moléculas se encuentra estrictamente regulado.

El crecimiento polarizado de los pelos radicales es un tipo de crecimiento muy rápido pudiendo alcanzar velocidades de hasta $1 \mu\text{m}/\text{min}$ (Cheng, Willmann et al. 2002, Hwang, Lee et al. 2005) y se caracteriza por tener comportamiento oscilatorio. Se encuentran intercalados momentos de flexibilización de la pared con consecuente crecimiento y momentos de rigidización de la pared celular con el detenimiento del crecimiento. Esto se ve acompañado por las oscilaciones en las concentraciones de ${}_{\text{cit}}\text{Ca}^{2+}$, ${}_{\text{cit}}\text{ROS}$ y pH (Monshausen, Messerli et al. 2008) (Fig. 3I). En pelos radicales, estas fluctuaciones en las concentraciones de ${}_{\text{apo}}\text{ROS}$ y los cambios en pH apoplástico/ citoplasmático precede los picos de crecimiento por 7-8 segundos, mientras que las oscilaciones en ${}_{\text{cit}}\text{Ca}^{2+}$ están adelantadas solamente 5-6 segundos (Monshausen, Bibikova et al. 2007, Monshausen, Messerli et al. 2008) (Fig. 3I). Estos antecedentes indican que el crecimiento polarizado en los pelos radicales es precedido y quizás transientemente reprimido por niveles elevados de ${}_{\text{cit}}\text{Ca}^{2+}$ y consecuentemente, concentraciones elevadas de ${}_{\text{apo}}\text{ROS}$ y alcalinización del pH apoplástico.

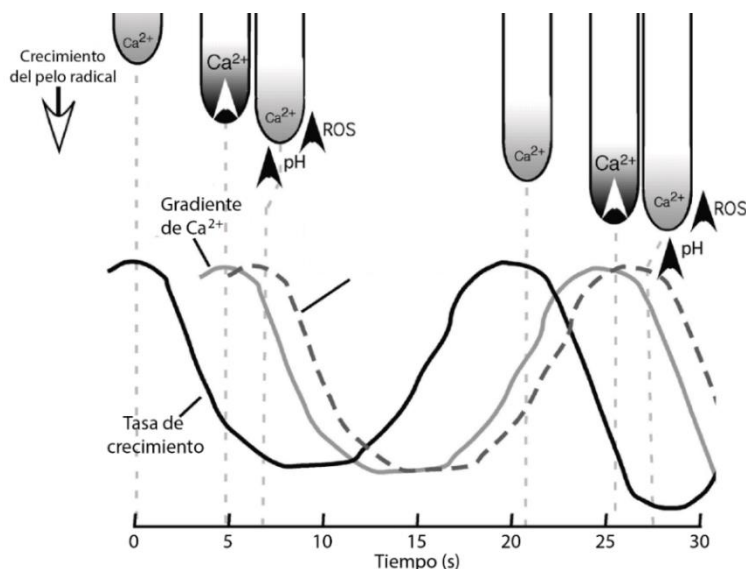


Figura 3I: Comportamiento oscilatorio en pelos radicales. Relación temporal y espacial entre el crecimiento, el gradiente de Ca^{2+} en el ápice del pelo radical, pH de la pared celular y ROS. Esquema extraído y modificado de Monshausen et al. (2008) (Monshausen, Messerli et al. 2008).

Las células vegetales y específicamente los pelos radicales utilizan las especies ROS extracelulares y al Ca^{2+} citosólico como moléculas señales en muy diversos eventos de crecimiento y desarrollo. Además, se sabe que la generación de ROS promueve el influjo de Ca^{2+} al citoplasma

y que, a su vez, el aumento de Ca^{2+} citoplasmático libre estimula la producción de ROS. De esta forma se ha descrito el mecanismo molecular de regulación positiva mediante el cuál NOXC es activada por Ca^{2+} para producir ROS, y que a su vez, NOXC activa la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma de los pelos radicales (Takeda, Gapper et al. 2008). Recientemente, se ha identificado por primera vez a uno de los canales de Ca^{2+} denominado annexina 1 (ANN1) que es responsable en los pelos radicales del transporte de Ca^{2+} del apoplasto al citoplasma (Laohavisit, Shang et al. 2012). De esta forma, las NOXs y las especies ROS junto con los canales transportadores de Ca^{2+} son reguladores de la expansión celular polarizada en pelos radicales. No está claro como estos reguladores afectan a los componentes de la pared celular de forma de promover el crecimiento polarizado en forma rápida y oscilante. Existen evidencias que indican que las Peroxidasas apoplásticas (PER_{III}) también producen ROS necesario para el crecimiento y la determinación del tamaño final de la célula (Bolwell, Blee et al. 1999, Cosio and Dunand 2008). Incluso recientemente se determinó que la actividad de las mismas está promovida por Ca^{2+} aunque no se sabe si esta es una regulación directa o indirecta (Plieth and Vollbehr 2012). Finalmente, existen indicios que sugieren que la presencia de ROS en el espacio apoplástico acoplado a la actividad de ciertas PER_{III} podrían regular el entrecruzado covalente de ciertos componentes de la pared celular, como las extensinas (EXTs) durante el crecimiento. No se ha determinado el rol específico que cumplen las PER_{III} las en el crecimiento polarizado del pelo radical.

1.2 Mecanismo molecular que regula el destino celular tricoblasto/atricoblasto en la epidermis de la raíz.

Como se mencionó con anterioridad, en *Arabidopsis thaliana*, el destino celular de las células de la epidermis de la raíz es dependiente de la posición celular (Fig. 1. A) (Dolan, Janmaat et al. 1993, Dolan and Costa 2001). Morfológicamente los tricoblastos y los atricoblastos pueden ser reconocidos desde la zona meristemática. Los tricoblastos son más cortos (Dolan, Janmaat et al. 1993), están menos vacuolados (Galway, Masucci et al. 1994) y presentan una mayor tasa de división celular (Berger, Haseloff et al. 1998). Algunos estudios sugieren que para todas las células de la epidermis existe un destino general de tricoblasto que debe ser inhibido en ciertos linajes de células, lo que da por resultado la formación de los pelos radicales en algunas filas de las células epidérmicas en las plantas WT (Wada, Tachibana et al. 1997, Lee and Schiefelbein 1999).

La definición del destino celular tricoblasto/atricoblasto incluye una regulación conjunta por los dos tipos celulares. Uno de los componentes de la regulación es TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG1), que codifica una pequeña proteína con repeticiones WD40 implicadas en interacciones proteína-proteína (Walker, Davison et al. 1999). TTG1 forma un complejo con los factores de transcripción (FTs) Helix-Loop-Helix (bHLH) GLABRA3 (GL3) y ENHANCER DE GLABRA3 (EGL3) (Payne et al., 2000; Zhang et al., 2003).

La actividad del complejo GL3/EGL3/TTG1 depende de la abundancia relativa del FT WEREWOLF (WER). WER activa la expresión del factor CAPRICE (CPC) el cual es un regulador negativo de WER (Wada, Tachibana et al. 1997, Lee and Schiefelbein 1999). Ha sido propuesto que WER se concentra en las células activando y promoviendo a CPC para que migre a la célula

epidérmica adyacente, mientras que en la célula en que WER está concentrado se une y activa el complejo GL3/EGL3/TTG1 generando el destino atricoblasto (Figura 8I). El complejo WER/GL3/EGL3/TTG1 activa el FT GL2 (Lee and Schiefelbein 1999) y luego, GL2 inhibe la transcripción del FT de la familia bHLH específico de tricoblastos ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (RHD6) (Masucci and Schiefelbein 1994, Menand, Yi et al. 2007, Lin, Ohashi et al. 2015) y de los FTs tipo RHD6 (RSL) como RSL4 y RSL2 resultando en la inhibición de la morfogénesis de los pelos radicales.

En la célula adyacente al atricoblasto en las que CPC ha migrado, es inhibida la transcripción de WER en forma creciente y se promueve el destino tricoblasto (Schiefelbein, 2000). A medida que CPC inhibe a WER, la expresión de GL2 disminuye permitiendo la expresión de sus genes blanco reprimidos entre los que se encuentra el FT RHD6 (Lee & Schiefelbein, 2002, Wada et al., 2002). RHD6 se expresa activando la transcripción de los genes requeridos para la diferenciación celular a tricoblastos. RHD6 regula directamente la expresión de los genes *RSL4* y *RSL2* (Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez et al. 2016). RSL4 regula la expresión de un conjunto de genes requeridos para la morfogénesis de los pelos radicales. Estos genes están involucrados en la homeostasis de ROS, en la síntesis y remodelación de la pared celular, la secreción de vesículas, el metabolismo y la señalización (Grierson and Schiefelbein 2009, Marzol, Borassi et al. 2017). Además, se caracterizan por presentar en sus zonas promotoras elementos específicos de pelos radicales (RHE, *Root Hair Element*) de aproximadamente 16-17bp (Kim, Lee et al. 2006, Won, Lee et al. 2009). Recientemente, un estudio demostró experimentalmente que RSL4 se une a esta secuencia RHE *in vitro* e *in vivo* regulando positivamente la expresión de genes específicos de pelo y estimulando el crecimiento del pelo radical de *Arabidopsis thaliana* (Hwang, Choi et al. 2017).

El receptor receptor tipo quinasa rico en repeticiones de leucina SCRAMBLED (SCM) (Chevalier, Batoux et al. 2005) recibe señales externas de los tejidos internos de la raíz (Kwak, Shen et al. 2005) y regula negativamente la transcripción de WER (Kwak & Schiefelbein, 2008). SCM es activado por el factor migratorio TRIPTYCHON (TRY), dando por resultado la acumulación de SCM preferencial en tricoblastos.

En los atricoblastos, el complejo WER/GL3/EGL3/TTG1 regula positivamente los FTs específicos de tricoblastos TRY y ENHANCER OF TRY (ETC1). Así como ocurre con CPC, es estimulada la migración tanto de TRY como de ETC1 a las células adyacentes que serán diferenciadas como tricoblastos (Lee and Schiefelbein 2002, Bernhardt, Lee et al. 2003, Kirik, Simon et al. 2004, Koshino-Kimura, Wada et al. 2005, Ryu, Kang et al. 2005, Simon, Lee et al. 2007). Los factores TRY y ETC1 inhiben la interacción de WER con GL3/EGL3 (Lee and Schiefelbein 2002, Kang, Song et al. 2013, Tanaka, Kato et al. 2014) De esta manera, las células adyacentes con destinos celulares opuestos se regulan mutuamente por migración cruzada de los FTs. Este proceso fue descrito como un mecanismo de inhibición lateral (Schiefelbein, Zheng et al. 2014). La regulación cruzada genera finalmente la expresión específica de los FTs RHD6 y RSL4 en las células con destino tricoblasto en la epidermis de la raíz (Yi, Menand et al. 2010). El mecanismo

molecular descrito que define el destino celular con todos sus componentes están graficados en la Fig.4.

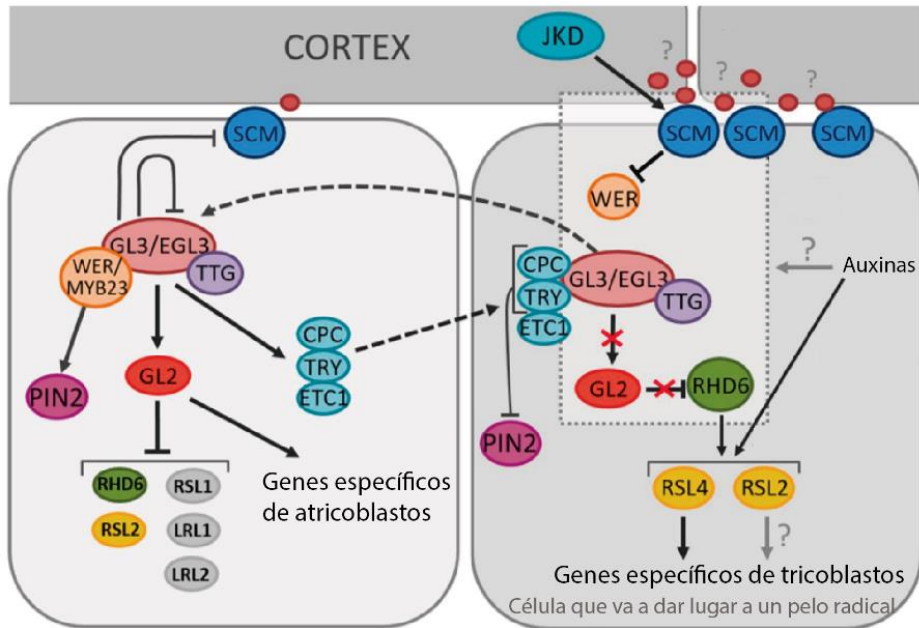


Figura 4i: Mecanismo molecular de diferenciación de las células epidérmicas de la raíz. Se encuentran graficados los FTs y complejos que definen el destino celular de tricoblastos/ atricoblastos. Gráfico extraído y modificado de Balcerowicz et al. (2015) (Balcerowicz, Schoenaers et al. 2015).

1.3 El FT RSL4 es el regulador maestro de la diferenciación y desarrollo de los pelos radicales.

RSL4 es un FT de la familia bHLH y su expresión está regulada directamente por RHD6. RSL4 promueve las primeras etapas del desarrollo del pelo radical y es considerado un regulador maestro de este proceso ya que integra señales internas (hormonales y del programa del desarrollo) y externas (señales ambientales como la disponibilidad de nutrientes en el suelo). RSL4 define de esta manera el largo final del pelo radical (Salazar-Henao, Vélez-Bermúdez et al. 2016, Marzol, Borassi et al. 2017).

RSL4 regula la expresión de aproximadamente 124 genes (Won, Lee et al. 2009, Yi, Menand et al. 2010, Vijayakumar, Datta et al. 2016) que contienen RHE en sus regiones promotoras. RSL4 es capaz de regular la transcripción de su propio gen (Hwang, Choi et al. 2017) y de numerosos genes que codifican proteínas involucradas en la señalización celular, homeostasis de ROS, modificación de la pared celular y la secreción de componentes celulares que son requeridos para el crecimiento de los pelos radicales (Fig. 5i). Dentro de éstos se pueden mencionar el supresor de Actina (*SAC1*), *EXO70A1* (Subunidad de exocitosis 70A1), *PRX7* (Peroxidasa7) y *CPK11* (Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} 11) (Vijayakumar, Datta et al. 2016). Además, RSL4 regula

positivamente genes como EXPA7 (Expansina7), EXP18 (Expansina18) entre otros genes requeridos para la elongación celular (Yi, Menand et al. 2010) (Fig. 5I).

RSL4 se acumula en células epidérmicas de la zona de elongación de la raíz justo antes de que comiencen a diferenciarse en pelos radicales. La expresión se mantiene durante el crecimiento de los mismos hasta que el pelo termina de desarrollarse, momento en el cual, los niveles de RSL4 caen drásticamente. Plantas mutantes de *rs/4* mostraron un fenotipo de pelo radical corto. Por otro lado, plantas que sobre-expresan RSL4 (plantas transgénicas transformadas con la construcción promotor35S::RSL4; la secuencia codificante del gen *RSL4* bajo el control del promotor fuerte 35S del virus del mosaico del tabaco) muestran pelos radicales de mayor longitud. Esto se debe a que RSL4 estimula el crecimiento por un período más prolongado sin modificar las velocidades de crecimiento (Yi, Menand et al. 2010).

Además de RSL4, dentro de la familia de bHLH se encuentra el FT RSL2. Las líneas mutantes de *rs/2* presentaron pelos radicales más cortos que el WT. Esto indica que es necesario para el desarrollo de los mismos. Sin embargo, la sobre-expresión de RSL2 no exacerbó el crecimiento de los pelos radicales. Esto resaltó la mayor implicancia en el desarrollo del pelo radical de RSL4 con respecto a RSL2 ya que solamente la expresión constitutiva de RSL4 resultó en un crecimiento constitutivamente activado (Yi, Menand et al. 2010).

La auxina es una fitohormona que actúa de señal endógena promoviendo el crecimiento del pelo radical (Pitts, Cernac et al. 1998, Knox, Grierson et al. 2003, Jones, Kramer et al. 2009). Se demostró que RSL4 es activado por auxinas, aunque el mecanismo por el cual se activa es aún desconocido (Yi, Menand et al. 2010, Datta, Prescott et al. 2015). El tratamiento de los mutantes *rh6* y *rh6 rs/1* con auxina exógena restaura el crecimiento del pelo radical, lo que indica que la auxina actúa aguas abajo de RHD6 y RSL1 durante el desarrollo del pelo radical. En Wt Col-0, el tratamiento con auxina incrementó los niveles del transcrita de *RSL4*. En contraste, los niveles de transcrita de *RSL2* disminuyeron cuando se trataron plantas Wt Col-0 con auxinas (Yi, Menand et al. 2010). Aunque, esto último, difiere de lo demostrado en esta tesis (Fig.15R.D).

La expresión de RSL4 y RSL2 puede ser modificada por otras hormonas de plantas como etileno, ácido abscísico y citoquininas (Fig. 5I). Tratamientos de las raíces de *Arabidopsis thaliana* con el precursor de etileno (ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) resulta en una activación del crecimiento de los pelos radicales y en la regulación positiva de numerosos FTs como RHD6, RSL2 y RSL4 (Zhang, Huang et al. 2016). Por otro lado, RSL4 contiene posibles secuencias regulatorias de unión a factores tipo B que responden a citoquininas (ARR por *Arabidopsis response regulator*) generando una posible conexión entre RSL4 con citoquininas (Zhang, Huang et al. 2016) (Fig. 5I). Estudios posteriores son necesarios para confirmar dicha conexión. Finalmente, el ácido abscísico demostró ser un represor del crecimiento polarizado inhibiendo la expresión de RSL2 mediante la regulación de la actividad de la proteína de unión a OBF4 (OBP4, *OBF Binding Protein 4*). En este experimento la expresión de RSL4 no se vio afectada (Rymen, Kawamura et al. 2017).

Con respecto a las señales ambientales externas, se demostró que niveles bajos de fosfato (Pi) en el medio de crecimiento de las plantas estimulan el desarrollo de los pelos radicales. La respuesta de la raíz a esta condición está regulada mediante la modificación de la actividad de

RSL4 (Yi, Menand et al. 2010). (Fig. 5I). Se observó que la longitud del pelo radical está determinada por la cantidad de RSL4 acumulado en un pulso de expresión del mismo 4hs antes del inicio de la elongación del pelo radical y su posterior degradación mediado por proteasoma 26S. La cantidad de RSL4 acumulada durante este pulso es modulada, en parte, por la baja disponibilidad de Pi en el medio de crecimiento. La síntesis de RSL4 se incrementa en condiciones de bajo Pi y este incremento prolonga la fase de crecimiento del pelo radical (Datta, Prescott et al. 2015). Por otro lado, plantas que expresan una versión modificada de RSL4 que no es capaz de ser degradada por proteasoma muestran pelos radicales más largos de lo habitual (Datta, Prescott et al. 2015). Es posible que FTs que median la respuesta de privación de Pi como *PHR1* (*phosphate starvation response Regulator 1*) y *PHR1-like* (PHL1) sean capaces de activar la transcripción de *RSL4* (Fig. 5I) (Marzol, Borassi et al. 2017). De esta manera, RSL4 es capaz de coordinar señales hormonales, ambientales y factores del desarrollando para promover la diferenciación y crecimiento celular de los pelos radicales. (Velasquez, Ricardi et al. 2015, Zhang, Huang et al. 2016) (Fig. 5I).

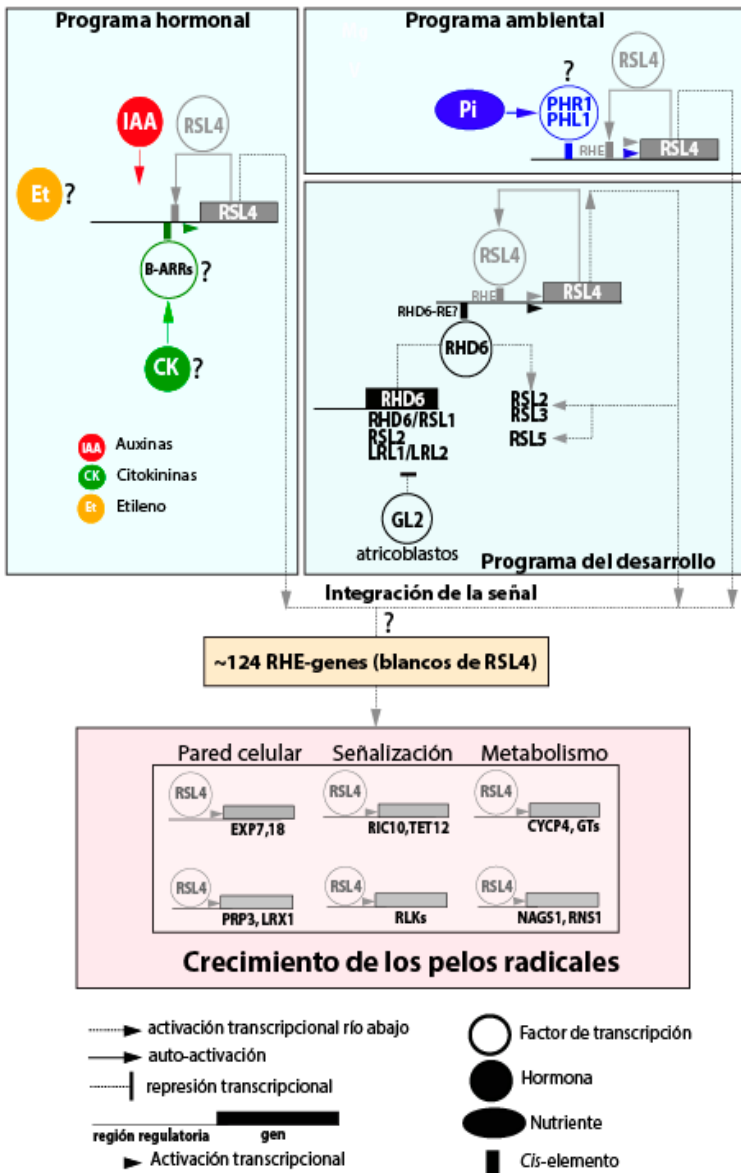


Figura 5I. Regulación del crecimiento de los pelos radicales mediado por RSL4. Durante el desarrollo del pelo radical RSL4 (y RSL2) es regulado por RHD6-RSL1. GL2 es el principal inhibidor del desarrollo de los pelos radicales en células atricoblásticas que actúa inhibiendo FTs como RHD6 y RSL4. La respuesta de los pelos a hormonas, como auxinas (IAA) es mediada por la activación de la transcripción de RSL4. Otras hormonas como citoquininas (CK) y Etileno (Et) pueden influenciar en el tamaño de los pelos radicales posiblemente actuando directamente sobre RSL4 u otros FTs por mecanismos desconocidos. Señales ambientales como bajo Pi también influyen en el desarrollo de los pelos radicales mediado por RSL4. RSL4 integra las señales internas y externas activando la expresión de 124 genes específicos de pelos radicales (RHE-genes) que son suficientes para controlar el desarrollo de los mismos. Aux-RE: Elementos de respuesta a auxinas, CYCP: ciclina tipo P, EXP: Expansinas, GTs: glicosiltransferasas, LRL: *Lotus japonicus Roothairless Like*, LRX: extensina rica en leucinas, NAGS: acetiltransferasa de aminoácidos, PRP: proteínas ricas en prolinas, RHE: elementos específicos de pelos radicales, RIC: *Rop-Interactive Crib motif-containing*, RLKs: Receptor tipo quinasa, RNS: ribonucleasa, TET: TETraspanina. Figura extraída y modificada de (Marzol, Borassi et al. 2017).

1.4 Regulación molecular mediada por auxinas.

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas en ser descubiertas y se conoce su rol regulatorio en numerosos procesos del desarrollo como el crecimiento y diferenciación celular, organogénesis, respuesta celular a luz, privación de fosfato y respuesta a patógenos (Woodward and Bartel 2005). La versatilidad de la respuesta a la hormona auxina surge de la compleja regulación de esta a nivel del transporte, metabolismo y señalización celular. En la raíz, las auxinas estimulan el desarrollo de raíces laterales (Casimiro, Marchant et al. 2001) así como la diferenciación y el crecimiento de los pelos radicales (Lee and Cho 2013, Velasquez, Barbez et al. 2016, Zhang, Huang et al. 2016).

Se propone que las auxinas presentan roles tan diversos, debido a las diferentes concentraciones de esta hormona presentes en los distintos tejidos de la planta (Wang and Estelle 2014). La concentración de auxinas depende tanto del metabolismo local de las auxinas, del modo de acción (*signaling*) así como del transporte de la hormona entre las células. Entre los transportadores de auxina más caracterizados se encuentran los PIN (*PIN-FORMED*) y ABCB (*ATP-BINDING CASSETTE B*) que favorecen la salida de auxinas de la célula y AUX1 (*AUXIN RESISTANT1*) y LAX (*AUXIN RESISTANT1-LIKE*) que permiten el influjo de la hormona en la célula (Velasquez, Barbez et al. 2016).

El compuesto más abundante y fisiológicamente más importante, es el ácido 3-indolacético (IAA) que se encuentra en grandes cantidades en tejidos jóvenes tanto de la parte aérea como de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Zhao 2010, Sauer, Robert et al. 2013). En la naturaleza existen diferentes tipos de auxinas. No sólo la forma IAA es activa, ya que se ha podido comprobar que otros compuestos con un anillo indólico son también funcionales. Algunas de ellas son formas naturales como el ácido-4-cloroindol-3-acético o el ácido fenoxiacético (AFA) y otras muchas son formas sintéticas desarrolladas con fines comerciales que también presentan actividad auxínica como el ácido 2-benzofuranacético, el ácido α -naftalenacético (α NAA), el ácido 3-indolpirúvico, el ácido indol butírico (IBA) o el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (Paque and Weijers 2016).

Las auxinas pueden actuar de manera rápida no transcripcional, como en el caso de la activación de la bomba de protones en la membrana plasmática y los canales iónicos, así como también en el caso de la reorientación de los microtúbulos. Sin embargo, el mecanismo molecular es desconocido. A su vez, las auxinas también pueden actuar a nivel transcripcional (o genómico) modulando los niveles de expresión de miles de genes dando lugar a una respuesta fisiológica característica (Perrot-Rechenmann 2010, Weijers and Wagner 2016). El mecanismo de acción a nivel genómico de esa hormona se basa en estimular la actividad de los FTs de respuesta a auxinas (ARFs, *Auxin Response Factors*). Estos ARFs se encargan de activar/reprimir numerosos genes responsables de los efectos fisiológicos (Fig. 6I). Las auxinas son percibidas por dos tipos de familias de proteínas que funcionan como receptores: unas se localizan tanto en la membrana plasmática como en el retículo endoplásmico (ABP1; *Auxin Binding Protein 1*) y otras que se localizan en el núcleo (TIR1/AFBs, *Auxin-Signaling F box proteins*) (Kepinski and Leyser 2005, Sauer, Robert et al. 2013). Sin embargo, aún no existe un consenso sobre los procesos fisiológicos exactos controlados por ABP1 (Sauer, Robert et al. 2013).

TIR1, es una proteína tipo *F-BOX* que forma parte del complejo ligasa de ubiquitinas SCF^{TIR1/AFB}. A bajos niveles de auxinas, las proteínas Aux/IAA se encuentran formando dímeros con los ARFs e inhibiendo su actividad mediante el reclutamiento del co-represor TOPLESS (TPL). Esto resulta en la represión de los genes inducidos por auxinas. A niveles elevados de auxinas, Aux/IAA aumentan su afinidad por el complejo SCF^{TIR1/AFB/IAA}, como consecuencia de esta unión las proteínas Aux/IAA se ubiquitinan y se degradan vía proteosoma 26S. De esta manera, los ARFs son liberados y pueden cumplir su función como activadores o represores transcripcionales (Guilfoyle, Hagen et al. 1998, Guilfoyle and Hagen 2007) (Fig. 6I).

En la estructura de las Aux/IAA se pueden identificar 4 dominios (I-IV) (Guilfoyle and Hagen 2012). Mediante análisis de secuencia, como por ensayos de doble-híbrido, se determinó que tanto en los factores Aux/IAA como en los ARFs, los dominios III y IV están altamente conservados. Estos dominios son responsables de la formación de los homodímeros ARF-ARF o Aux/IAA-Aux/IAA, y de los heterodímeros ARF-Aux/IAA. La formación del heterodímero es más estable y puede incluso llegar a deshacer los homodímeros (Chapman and Estelle 2009). El dominio I puede inactivar la función de los ARFs reprimiendo la transcripción de respuesta a auxina (Tiwari, Hagen et al. 2003). El dominio II es importante para controlar la estabilidad de la proteína y su interacción con el complejo SCF^{TIR1/AFB} (Colón-Carmona, Chen et al. 2000, Worley, Zenser et al. 2000, Ouellet, Overvoorde et al. 2001, Tiwari, Hagen et al. 2003). Mutaciones en el dominio II bloquean la interacción entre proteínas Aux/IAA y el complejo SCF^{TIR1/AFB} incrementando la estabilidad de las proteínas Aux/IAA, y por lo tanto la permanente represión de genes regulados por auxina (Tiwari, Hagen et al. 2003).

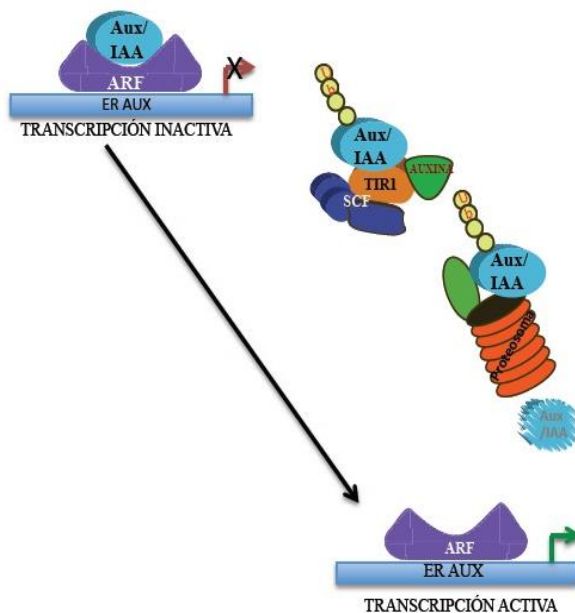


Figura 6I: Regulación molecular mediada por auxinas. Cuando los niveles de auxinas (IAA) son bajos los ARFs se encuentran inhibidos por el complejo Aux/IAA. En presencia de auxina este complejo es degradado vía proteosoma y los ARFs quedan disponibles para activar/inhibir la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Esquema extraído y modificado de Garay-Arroyo et al. (2014) (Garay-Arroyo, de la Paz Sánchez et al. 2014).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificados 23 genes *ARFs* y estos interactúan con los promotores de genes que contienen elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE por *Auxin Response Elements*) que típicamente poseen la configuración TGTCNC (en donde N

puede ser T, C, G, A) (Guilfoyle and Hagen 2007). Existe un interés creciente en determinar cuándo y dónde los genes de respuesta a auxinas se expresan y cómo está regulada su expresión (Guilfoyle and Hagen 2007).

La mayoría de las proteínas ARFs consisten en un dominio N-terminal de unión a ADN tipo-B3, una región media variable que funciona como un dominio de activación o de represión y un dominio carboxilo terminal de dimerización (dominio III/IV). Este último está involucrado en la interacción proteína-proteína con la familia Aux/IAA así como con otros ARFs (Kim, Harter et al. 1997, Guilfoyle and Hagen 2007, Piya, Shrestha et al. 2014). Mediante ensayos de transformación de protoplastos se determinó que la composición aminoacídica de la región media es crítica en la determinación de la función de los ARF: si esta está enriquecida en serina actúa generalmente como un represor y si es rica en glutamina actúa como un activador de la transcripción (Tiwari, Hagen et al. 2003, Guilfoyle and Hagen 2007). Por lo tanto, ARF5/ARF6/ARF7/ARF8/ARF19 fueron definidos como activadores de la transcripción y el resto de los ARFs como represores (Ulmasov, Murfett et al. 1997, Tiwari, Hagen et al. 2003).

Además de poder interactuar con ellos mismos, se ha reportado que los ARFs pueden regular y ser regulados por otros FTs (Wang and Estelle 2014). Un estudio reciente muestra que el FT MYB77 es capaz de interactuar con la proteína ARF7 y que esta interacción resulta en una reducción en el número de raíces laterales en *Arabidopsis* (Shin, Burch et al. 2007). Por otra parte, el FT bHLH BIGPETALp (BPEp) interactúa con ARF8 y como consecuencia se desencadena el crecimiento del pétalo (Varaud, Brioudes et al. 2011). Ensayos de doble híbrido y de co-inmuno precipitación de proteínas demostraron que el co-regulador transcripcional BREVIS RADIX (BRX) interactúa con ARF5, y que esta interacción mejora el potencial de activación de la transcripción de ARF (Guilfoyle and Hagen 2012).

Mediante el estudio de mutantes insercionales de los ARFs se ha podido determinar el rol fisiológico de alguno de ellos en *Arabidopsis thaliana*. A pesar de que algunos ARFs parecen tener funciones únicas en algunos contextos fisiológicos y de desarrollo, otros tienen redundancia de funciones. Por ejemplo, tanto ARF1 como ARF2 controlan la senescencia de las hojas y la abscisión del órgano floral (Ellis, Nagpal et al. 2005). ARF3 interactúa con la proteína KANADI formando un complejo que es esencial para el desarrollo del integumento y la determinación de la polaridad durante la organogénesis (Kelley, Arreola et al. 2012). También ARF3 integra la función de diferentes proteínas en la determinación meristemática floral (Liu, Dinh et al. 2014). ARF4 ha sido estudiado principalmente por su rol en la polarización de los órganos (Hunter, Willmann et al. 2006). El doble mutante *arf3 arf4* muestra reducida la identidad abacial de todos los órganos laterales incluyendo las hojas (Pekker, Alvarez et al. 2005, Finet, Fourquin et al. 2010). ARF5 es requerido para la formación embrionaria de la raíz y de la flor. Los patrones embrionarios y los defectos vasculares observados en el mutante de *arf5* son más drásticos en el doble mutante *arf5 arf7* (Hardtke and Berleth 1998). ARF8 está reportado como un regulador de la fertilización y el desarrollo de frutos (Goetz, Vivian-Smith et al. 2006) y tanto ARF6 como ARF8 están involucrados en la maduración de las flores (Finet, Fourquin et al. 2010). Ensayos con microARN y utilización de mutantes demostraron que ARF10 y ARF16 están involucrados en el control de la formación de la cápsula de la raíz (Wang, Wang et al. 2005). ARF19 y ARF7 tienen funciones redundantes dirigiendo

la expansión de las hojas y el desarrollo de las raíces laterales (Wilmoth, Wang et al. 2005). Los simples mutantes de *arf7* y *arf19* no mostraron fenotipo aparente, sin embargo la doble mutante *arf7 arf19* mostró ausencia total de la formación de raíces laterales, un fenotipo similar al de la mutante *srl1*. El gen *SLR1* codifica para el represor transcripcional IAA14, un miembro de la familia de proteínas Aux/IAA. La mutación en *srl1* genera una mutante de ganancia de función, es decir que el represor IAA14 se encuentra constitutivamente activo. Por lo tanto, *srl1* no genera la respuesta a auxinas impidiendo la formación de raíces laterales y pelos radicales (Fukaki, Tameda et al. 2002). Finalmente, es importante resaltar que si bien *ARF7* y *ARF19* se encuentran altamente expresados en pelos radicales, la doble mutante *arf7 arf19* no muestra anomalías en el desarrollo de los mismos (Okushima, Overvoorde et al. 2005, Okushima, Fukaki et al. 2007).

1.5 Paredes celulares y expansión celular.

Las paredes celulares de las células vegetales son de fundamental importancia en la expansión celular. Las mismas deben ser lo suficientemente laxa para permitir la expansión celular y lo suficientemente rígida para soportar grandes presiones de turgencia, lo cual les sirve para focalizar el crecimiento en ciertas direcciones. Por lo tanto, para facilitar el crecimiento polarizado, la pared celular tiene que absorber cambios estructurales muy grandes. La misma está compuesta por polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa y pectinas junto con glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (Fig.71). En las plantas vasculares, la estructura predominante son las microfibrillas de celulosa, de aproximadamente 3 nm, que aparentemente envolverían a las células y estarían entrecruzadas por los polisacáridos de simple cadena, como los xiloglucanos (XG) y las pectinas (Dick-Perez, Zhang et al. 2011). La celulosa se encuentra en forma de fibrillas largas no ramificadas, compuestas aproximadamente por 30-36 cadenas de β -1,4-glucosa unidas por puentes de hidrógeno. El largo de las fibrillas no es conocido, pero se han observado unidades de glicanos con hasta 14000 unidades de glucosa, lo que correspondería a una fibrilla de alrededor de 7 μ m de largo. Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados con esqueletos de azúcares neutros que pueden formar puentes de hidrógeno con la superficie de las fibrillas de celulosa. Las pectinas están definidas por la presencia de ácidos urónicos como su principal componente. La pectina más simple es el homogalacturonano (HG), un polímero no ramificado de (1 \rightarrow 4) α -D-ácido galacturónico. El rhamnagalacturonano I (RGI) tiene un esqueleto compuesto por unidades alternadas de (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnosa y (1 \rightarrow 4) α -D-ácido galacturónico con decoraciones de cadenas laterales de arabinanos y galactanos. Ha sido sugerido que RGI funcionaría como andamiaje para las otras pectinas, como el rhamnagalacturonano II y HG se unirían covalentemente como cadenas laterales (Vincken, Schols et al. 2003). Las pectinas están entrecruzadas entre sí por puentes de Ca^{2+} (entre los grupos carboxilo de las cadenas HG) y ésteres de apiosil-borato (en las moléculas RGII). Estos dos tipos de modificaciones son ejemplos de modificaciones *in muro*, que refuerzan a la pared celular. Las microfibrillas de celulosa, que son sintetizadas en la membrana plasmática por grandes complejos, tipo roseta, de celulosas sintetasas (CESA), son insolubles debido a que las cadenas de glicanos se agregan lateralmente mediante uniones puente de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, lo que produce estructuras cristalinas de cadenas paralelas. Los demás polímeros

son secretados como polímeros solubles que deben desplegarse y difundir en el medio acuoso de la pared celular hasta llegar a su destino final. Se ha propuesto que algunos polímeros se ensamblarían en estructuras de polisacáridos más grandes (y menos solubles) luego de su secreción en la pared (Kerr and Fry 2003). Se piensa que la unión de la hemicelulosa a la superficie de las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno sería una de las causas para el ensamblado de la estructura de la pared celular (Somerville, Bauer et al. 2004).

En la familia de las HRGPs, se pueden encontrar a las proteínas arabinogalactanos (AGPs), las proteínas ricas en Prolinas (PRPs) y las extensinas (EXTs). Finalmente, las HRGPs de tipo EXTs formarían una red ordenada interconectada por uniones covalentes entre residuos de tirosinas (Cannon, Terneus et al. 2008). Esta arquitectura de la pared celular se va modificando en respuesta a la presión de turgencia y a cambios en el pH, el cual contribuye a la expansión celular. Ejemplos de acelerada expansión celular en cortos períodos de tiempo ocurren en las fibras del algodón, pelos radicales e hipocótilos crecidos en oscuridad como respuesta al sombreado.

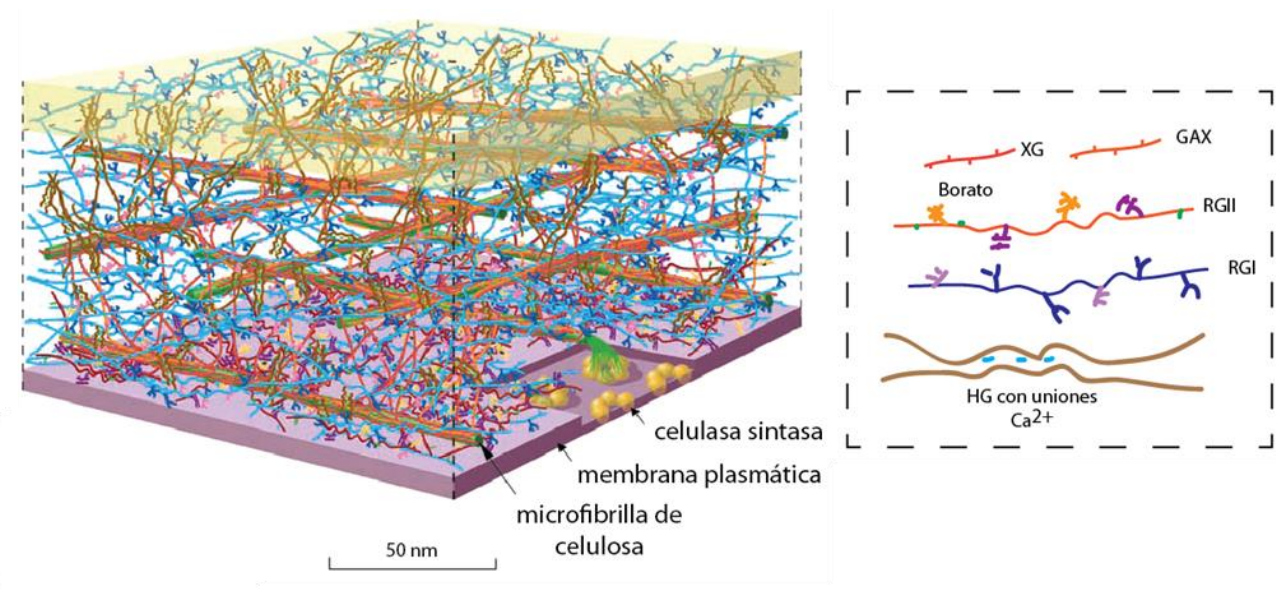


Figura 71: Pared celular. Modelo a escala de los polisacáridos en una célula de hoja de *A. thaliana*. XG: xiloglucano; GAX: glucuronoabinosilano; RG: Ramnagalacturonano; HG: homogalacturonanos. Hemicelulosa: XG y GAX; Pectinas: RGI, RGII y HG. Adaptado de (Somerville, Bauer et al. 2004)

1.6 Extensinas (EXTs)

Las EXTs son glicoproteínas altamente repetitivas con motivos hidrofílicos rígidos de Ser-Hyp₄ O-glicosilados (Fig. 81. A) y motivos hidrofóbicos potencialmente *crosslinkables* Tyr-X-Tyr (X usualmente = Lys, Tyr, Leu, o Val) (Kieliszewski and Lamport 1994) y Val-Tyr-Lys (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996) (Fig.81. A). Fue demostrado *in vitro* que estos motivos con Tyr pueden formar dímeros de Tyr llamados *iso*-ditirosinas (IDT), trímeros y tetrámeros de Tyr denominados pulquerosina y di-IDT respectivamente. (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996, Held, Tan et al. 2004, Cannon, Terneus et al. 2008).

Las modificaciones post-traduccionales más importantes en las EXTs (Fig.8I. B) son: 1) La conversión de algunas unidades de prolina a 4-hidroxiprolina por acción de 4-prolil hidroxilasas (P4Hs) localizadas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Velasquez, Ricardi et al. 2011); La conversión de Pro en Hyp modifica la conformación proteica y provee de grupos hidroxilos reactivos hacia modificaciones posteriores. 2) O-glicosilación de las unidades de 4-hidroxiprolina con arabinosas, y con una galactosa, el único residuo Ser (Egelund, Obel et al. 2007, Gille, Hansel et al. 2009, Velasquez, Ricardi et al. 2011, Velasquez, Salter et al. 2012). 3) Entrecruzamiento de las unidades de Tyr o Lys mediado posiblemente por PER_{III} en la pared celular. Es importante resaltar que Hyp-O-glicosilación no ha sido detectada en animales, lo que convierte a las EXTs (y al resto de las HRGPs) únicas en su estructura y función para las células vegetales.

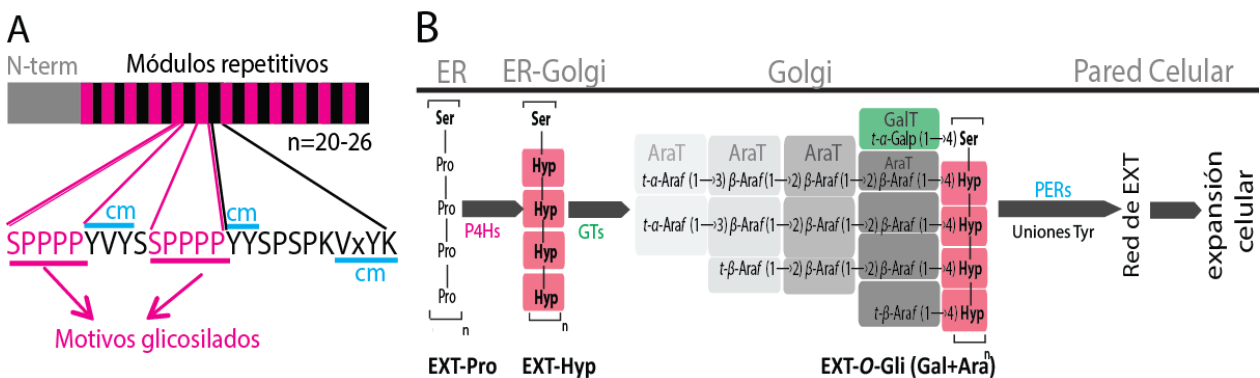


Figura 8I: Modificaciones postraduccionales de EXTs. A) Estructura de las EXTs. Las EXTs son proteínas altamente repetitivas con dominios de O-glicosilación y dominios con Tyr con potencial para su entrecruzamiento. **B)** Modificaciones post-traduccionales de las EXTs a lo largo de su paso por el sistema secretorio hasta su secreción en la pared celular.

Según la hipótesis de contigüidad de las unidades de hidroxiprolina (*the Hyp contiguity hypothesis*) (Kieliszewski and Lamport 1994, Shpak, Barbar et al. 2001), cuando la secuencia peptídica presenta secuencias de tipo X-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp como en el caso de las EXTs, se glicosilan con cadenas cortas de arabinósidos (hasta 4 residuos lineales de Ara unidos en cada Hyp). La estructura típica de arabinósidos unidos al residuo Hyp consiste en β -L-Araf-(1,2)- β -L-Araf-(1,2)- β -L-Araf-(1,3)- α -L-tAraf. (Fig. 9I. A). Las EXT O-glicosiladas que son secretadas en la pared celular podrían formar una red covalente ordenada (Fig. 8I. B) (Brady, Sadler et al. 1998, Held, Tan et al. 2004, Cannon, Terneus et al. 2008).

La polimerización de las EXTs glicosiladas estaría mediada por PER_{III} (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996, Jackson, Galinha et al. 2001, Price, Pinheiro et al. 2003). en sus residuos Tyr o Lys (Schnabelrauch et al., 1996; Jackson et al., 2001; Price et al., 2003) formando uniones intra e inter catenarias entre ellas (Cannon et al., 2008; Lamport et al., 2011). De esta forma, las EXTs serían capaces de formar una red glicoproteica tridimensional que posiblemente interactúe con otros componentes de la pared celular como las pectinas (Nuñez et al., 2009; Dick-Perez et al., 2011). Aunque el mecanismo molecular *in vivo* por el cual se dan éstas uniones covalentes es desconocido, existen evidencias *in vitro* de uniones oxidativas catalizadas por PER_{III} que llevarían a la insolubilización de las proteínas (Schnabelrauch et al., 1996; Jackson et al., 2001; Price et al.,

2003). El tipo de uniones que se darían entre los residuos Tyr serían: 1) isoditirosinas (IDT) que es un enlace intramolecular muy corto dentro del motivo hidrofóbico altamente conservado Tyr-X-Tyr (Epstein and Lamport, 1984), 2) di-isoditirosinas (di-IDT) que es el derivado tetramérico de Tyr formado por la unión de dos residuos IDT de moléculas cercanas. 3) Pulquerosina que es el derivado trimérico formado por la unión de un residuo IDT y una Tyr (Fry, 1982; Brady et al., 1996; Brady and Fry, 1997; Brady et al., 1998) (Fig. 9I. C). La estructura dendrítica de la AtEXT3 observada mediante microscopía de fuerza atómica (AFM por *Atomic Force Microscopy*) apoya la hipótesis de una red auto ensamblada de EXTs en la pared celular (Cannon et al., 2008) (Fig. 9I. B). El autoensamblado estaría dado por la alternancia de los motivos hidrofílicos (Ser-Hyp4) y los motivos hidrofóbicos, típicamente IDT (Epstein and Lamport, 1984). Ha sido postulado que esta alternancia alinea los monómeros en segmentos de largos predeterminados lo que resultaría en una red dendrítica donde las secuencia N- y C-terminal regularían el largo del segmento y el ensamblado de la red (Van Esch, 2010). Este autoensamblado sería una característica común de las EXTs, ya que se observaron, mediante AFM, redes similares para la EXT de tomate P1 y la THRGP de maíz (Smith et al., 1984; Smith et al., 1986; Kieliszewski et al., 1990; Cannon et al., 2008). A su vez, la presencia de motivos del tipo pulquerosina favorecería que ocurra un alineamiento escalonado de los monómeros de EXTs. Un alineamiento escalonado permitiría que el andamio de polímeros que se forma se desarrolle en dos dimensiones, por el agregado lineal (uniones de extremo con extremo) y lateral de los monómeros (Cannon et al., 2008) (Fig. 9I. C). Esto es lo que se observó en la AFM de AtEXT3, donde las mediciones de alto y ancho darían como que habrían 6 monómeros de EXTs alineados de manera escalonada (Cannon et al., 2008). Otras proteínas estructurales con secuencias poliprolina, como el colágeno, pueden ser también unidas a través de sus residuos Tyr por la acción de PER_{III} no sólo *in vitro* sino también *in vivo* (Edens et al., 2001), lo que indicaría que las EXTs y el colágeno compartirían características estructurales y funcionales. Esto fue demostrado mediante modelado de la dinámica molecular de EXTs O-glicosiladas, donde se determinó que sería posible su autoensamblado en una triple hélice, como ocurriría con el colágeno (Velasquez, Marzol et al. 2015). Por otro lado, también se propuso que la red de EXTs cargadas positivamente reaccionaría con pectinas ácidas para formar agregados EXT-pectinas, que funcionarían como moldes para la síntesis de nueva pared celular (Cannon, Terneus et al. 2008, Valentin, Cerclier et al. 2010).

La O-glicosilación de las EXTs es indispensable para su estructura y función. Defectos en Hyp-O-arabinosilación de ciertas EXTs produjo un efecto inhibitorio al crecimiento del pelo radical (Velasquez, Marzol et al. 2015). Además, se demostró que el grado de Hyp-O-arabinosilación de un monómero EXT influye en el grado de Tyr-*crosslinking* realizado por la peroxidasa pI 4.6 (pI: punto isoeléctrico) de tomate *in vitro* (Chen, Dong et al. 2015). Incluso pequeños cambios en el estado de O-glicosilación de EXTs interfieren con el proceso de autoensamblaje propuesto de la red EXTs (Cannon, Terneus et al. 2008, Velasquez, Ricardi et al. 2015).

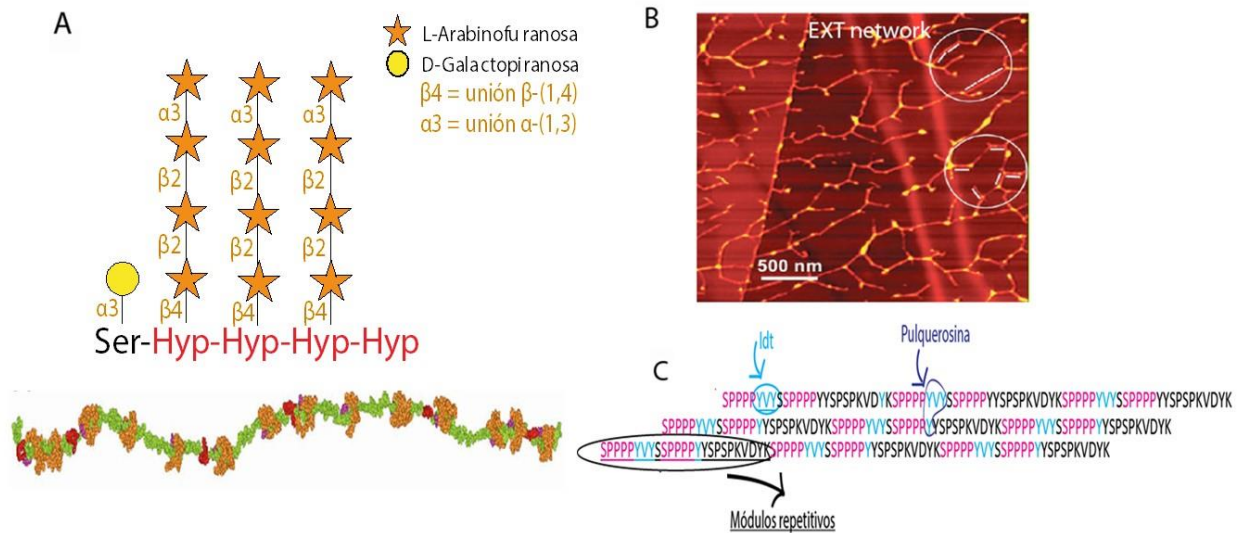


Figura 9I: Extensinas. **A)** Esquema de la estructura típica de arabinosidos unidos los residuos Hyp contiguos de las EXTs y la unidad de galactosa unida a Ser. Abajo: Representación tridimensional de un monómero de EXT con forma de vara helicoidal estabilizado por segmentos *O*-glicosilados con Galactosa/Arabinosa en las secuencias de Ser-(Hyp)₄ (en naranja). **B)** Entramado covalente formado por monómeros (varas blancas) de EXTs sintetizado y *crosslinkado in vitro* utilizando la peroxidasa p14.6 aislada de tomate y visualizado por microscopía de fuerza atómica (Cannon, Terneus et al. 2008). **C)** Potencial alineamiento escalonado de los glicomódulos repetitivos de la EXT6, como ejemplo. El que ocurriese un alineamiento escalonado permitiría que las moléculas de EXTs pudieran unirse tanto linealmente (extremo con extremo) como lateralmente, formando así una glico-red en dos dimensiones. También permitiría que se dieran no sólo uniones IDT intramoleculares sino también uniones intramoleculares tipo pulqueosina y/o di-IDT.

1.6 A Rol de las EXTs en el desarrollo de las plantas.

El genoma de *A. thaliana* codifica para 63 posibles EXTs, de las cuales sólo 20 se definirían como EXTs clásicas (Tabla 1I), que compartirían motivos de *O*-glicosilación y *crosslinking* de Tyr; 12 son EXTs cortas y 31 son quimeras tipo EXT e híbridos de EXTs, que podrían contener otros dominios proteicos (Cannon, Terneus et al. 2008, Showalter, Keppler et al. 2010, Lamport, Kieliszewski et al. 2011). El hecho de que existan tantas EXTs apuntaría a múltiples funciones o funciones similares pero con una expresión diferencial (Lamport, Kieliszewski et al. 2011), destacando la complejidad detrás de los roles de EXT en el desarrollo de la planta debido a una alta redundancia o enmascaramiento de funciones.

Se identificaron EXTs en varias especies vegetales: angiospermas, gimnospermas. Cabe destacar los tres tipos de monómeros precursores de EXT P1, P2 y P3 aislados e identificados a partir de células de tomate crecidas en cultivo (Smith, Muldoon et al. 1984, Smith, Muldoon et al. 1986). Estos precursores fueron eluidos mediante soluciones salinas y ambos presentaban secuencias repetitivas. P1 presentó módulos repetitivos de Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Thr-Hyp-Val-Tyr-Lys, y Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Val-Lys-Pro-Tyr-His-Pro-Thr-Hyp-Val-Tyr-Lys; P2 consistió casi enteramente de dipéptidos Tyr-Lys; octapéptidos Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Val-Tyr-Lys, y pequeñas cantidades de un decapeptido muy relacionado que contenía uniones intramoleculares

isoditrosina Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Val-¹/₂IDT-Lys-¹/₂IDT-Lys; y P3 presentaba un motivo repetitivo de 16 residuos Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Ser-Hyp-Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp-Tyr-Tyr-Tyr-Lys con motivos di-IDT (Smith, Muldoon et al. 1984, Smith, Muldoon et al. 1986).

Los precursores de EXTs P1, P2 y P3, fueron utilizados para evaluar especificidad de sustrato de la peroxidasa pl 4.6 purificada de tomate (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996). Esta peroxidasa no fue capaz de *crosslinkear* moléculas que no poseyeran el motivo Val-Tyr-Lys. Existen EXTs que no son unidas covalentemente. Por ejemplo, las EXTs de *C. reinhardtii* forman un enrejado débil no covalente en la pared celular. Esto apuntaría a que las uniones covalentes entre las EXTs sería un desarrollo secundario que habría llevado a que existieran paredes celulares más fuertes que resistieran la presión de turgencia y entonces fuese posible la colonización terrestre por parte de las plantas. EXTs no unidas covalentemente todavía existen en las plantas terrestres, por ejemplo en THRGP de maíz, que no pudo ser *crosslinkada* por la peroxidasa pl 4.6 (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996). Este tipo de EXTs son moléculas anfipáticas y básicas por lo que podrían auto-ensamblarse en redes no covalentes. Hipotéticamente estas EXTs podrían auto-ensamblarse en la placa celular mientras que las EXTs que sí se *crosslinkan* proveerían de fuerza tensil a la pared primaria (Lampert, Kieliszewski et al. 2011).

Desde un punto de vista evolutivo, redes tipo EXTs organizadas en la pared celular, aunque no covalentes, serían bastante primitivas ya que se encuentran en varias algas unicelulares y multicelulares (Ferris, Woessner et al. 2001, Bollig, Lamshöft et al. 2007, Sorensen, Pettolino et al. 2011, Lee, Rubio et al. 2013). En concordancia, los genes de PER_{III} estarían ausentes en los genomas de las algas verdes (Passardi, Longet et al. 2004). Consecuentemente, una red de EXT unidas covalentemente parecería ser un evento posterior en la evolución que habría permitido paredes celulares fuertes que permitiesen la colonización terrestre y el desarrollo impulsado por presión de turgencia en las plantas terrestres.

Existen varias evidencias que apoyan también un rol de las EXTs en defensa frente al daño, infecciones por patógenos y compuestos que activan el sistema de defensa de las plantas (Ludevid, Ruiz-Avila et al. 1990, Tagu, Walker et al. 1992, Shirsat, Bell et al. 1996, Hirsinger, Parmentier et al. 1997, Merkouropoulos, Barnett et al. 1999, Merkouropoulos and Shirsat 2003). Se ha propuesto que una deposición aumentada de EXTs y su correspondiente *crosslinkado* ayudaría en la curación de la herida y a la formación de una barrera física frente al patógeno, bloqueando su entrada al sistema vascular y así evitar una infección sistémica (Showalter 1993).

Las EXTs también fueron vinculadas con el desarrollo de hipocótilo, tallo y pelos radicales (Roberts and Shirsat 2006, Gille, Hansel et al. 2009, Velasquez, Ricardi et al. 2011). Sólo un mutante de EXT, *ext3* (*root-*, *shoot-*, *hypocotyl-defective*; *rsh*), fue descrita con un fenotipo casi letal (Hall and Cannon 2002, Cannon, Terneus et al. 2008). Por otro lado, dos mutantes *ext*, *leucine-rich repeat extensin 1 y 2* (*lrx1 y lrx2*) presentaron un fenotipo de pelos aberrantes (Baumberger, Ringli et al. 2001, Baumberger, Steiner et al. 2003, Ringli 2010), lo que indica conexión entre las EXTs y el desarrollo de los pelos radicales/expansión celular. Además, varios mutantes EXTs (*ext7*, *ext11*, *ext14*, *ext16 y ext18*) también mostraron pelos radicales cortos (Velasquez, Iusem et al. 2011, Velasquez, Ricardi et al. 2011, Velasquez, Salter et al. 2012). Inclusive, algunos de estos genes que codifican para EXTs contienen varios sitios de unión RSL4 (RHE) sus regiones reguladoras (Hwang,

Choi et al. 2017). De acuerdo con esto, RSL4 se une al promotor de los genes de EXTs: *LRX1* y *PRP3*, también relacionados con el pelo radical y controla positivamente su expresión (Hwang et al., 2017). Estas evidencias resaltan el rol esencial de proteínas con dominios tipo EXTs en la expansión celular de los pelos radicales bajo el control del FT RSL4 (Marzol, Borassi et al. 2017).

Tabla 11. Clasificación de las EXTs de *A. thaliana* (Cannon, Terneus et al. 2008).

Grupo y Característica	Nro. AtEXT (1)	Nro. de acceso AGI	Tamaño de la proteína madura	Motivos repetitivos predominantes, cada uno con un IDT (excepto el grupo 1)	Nro. de motivos (YXY)/SPSP	de IDT IDT	Periodicidad	12 residuos C-terminal (residuos Y en fucsia)
I Pobre en IDT	1/4	At1g76930	354	SPPPPVKHYSPPPVYK	3/0	-		P Y LYKSPPPPHY
	19	At5g19810	226	SPPPPPVNISSPPPPVNL	1/0	-		PPGKSWLWFLKL
IIa Rico en IDT Simple	3/5	At1g21310	404	SPPPPKHH YVY KSPPPPVKHYSPPPVYH	16/0		19 nm	Y LYKSPPPPHY
	21	At1g26250	418	SPPPP YVY S	43/1		3 nm	PP Y YSSPSPPLY
	20	At1g26240	452	SPPPP YVY S	43/1		3 nm	S Y SYSSPPPIY
	22	At4g08370	324	SVPRIPFIYSSPPPP YVY N	18/0		6 nm	FHHLQLSTTPSI
	8	At2g43150	185	SPPPPVKSPPP YVY H	12/0		5 nm	Y IYASPPPTHY
17	At4g08380	411	SPPP YAY & SPPSP YVY K	49/0		2 & 3 nm	S Y SYSSPPPIY	
IIb Rico en IDT +motivos SPSP	7	At2g24980	537	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVYK	21/19			PPPP YVY KTPY
	11	At4g08400	482	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVDYK	18/15			VTYKSPPP YVY
	12	At4g08410	658	SPPPP YVY GSPPPPY SPSP KVDYK	26/23			VTYKSPPP YVY
	13	At5g06630	412	SPPPP YVY SSPPPLY SPSP KVYK	17/14		Todas 8 nm	PPPP YVY KTPY
	14	At5g06640	654	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVDYK	25/24			PPPP YVY KAPY
	16	At5g49080	587	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVDYK	24/18			LPPP YVY KAPY
	18	At4g13390	410	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVXYK	13/11			PPPP YIY KTPY
15	At5g35190	306	SPPPP YVY NSPPPPY SPSP KVDYK	8/8			PPAP YV SKTPNY	
IIc Rico en IDT +motivos SPSP +un motivo Cys*	2	At3g54590	721	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVDYK	24/28			PPSY SPSP KTEY
	6	At1g23720	891	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KXXYK	34/30			EYKSPPPSLY
	9	At3g28550	996	SPPPP YVY SSPPPPY SPSP KVYK	35/35		Todas 8 nm	PPSY SPSP KTEY
	10	At3g54580	929	SPPPP YVY SSPPPTY SPSP KVXYK	33/35			PPSY SPSP KTEY

(1) (Showalter, Keppler et al. 2010) IDT: isoditrosina (YXY). *Los miembros de este grupo también poseen un único motivo Cys (V~~C~~V~~C~~PPPPPC~~Y~~)

1.7 Peroxidasas clase III (PER_{III})

Las modificaciones en la pared celular son clave para permitir la elongación celular, y su estructura influencia tanto en el largo como en la dirección de la expansión (Mirabet, Das et al. 2011). Se han propuesto dos clases principales de proteínas para promover la expansión de la pared celular: xiloglucano-endotransglucosilasas, que rompen las cadenas de XG y unen el extremo reducido recientemente generado con una nueva cadena de XG (Fry, Smith et al. 1992) y expansinas, que promueven la relajación de la pared celular al disrumpir los enlaces no covalentes entre celulosa y hemicelulosa (Cosgrove 2000). Durante la expansión celular, la pared celular se relaja mientras que las fuerzas internas de turgencia inducen su deformación; subsecuente, las expansinas son inhibidas y se produce la formación de enlaces covalentes entre proteínas estructurales (tales como EXTs), polisacáridos y / o monolignoles causando la rigidización de la pared celular y en consecuencia, se ralentiza la expansión (Wolf, Rausch et al. 2009).

La regulación de los niveles de ROS es un pilar importante para determinar la tasa de expansión celular y el tamaño del final de la célula (Gapper and Dolan 2006). La producción de ROS en la pared celular es controlada tanto por las condiciones fisiológicas y en respuesta a estímulos ambientales y es llevada a cabo principalmente por las NOXs (Torres and Dangl 2005) y las PER_{III} (Bolwell, Blee et al. 1999, Cosio and Dunand 2008).

Las peroxidasas de plantas de clase de clase III (PER_{III}) pertenecen a una superfamilia que contiene tres clases (I-III) diferentes de peroxidasas (Welinder, 1992). Las tres clases tienen en común un hemo común formado por protoporfirina IX y Fe (III), y comparten una estructura tridimensional muy similar (Welinder 1992, Edwards, Raag et al. 1993, Smulevich, Jakopitsch et al. 2006) (Fig. 10I. B). Sin embargo, las tres clases de peroxidasas muestran baja identidad en sus secuencias de aminoácidos primarios y tienen funciones y mecanismos de acción diferentes. Las peroxidasas de clase I (PER_I) son intracelulares, se encuentran en la mayoría de los organismos vivos, excepto animales. Su función principal en la célula es la desintoxicación del exceso de H₂O₂ (Skulachev 1998, Erman and Vitello 2002, Shigeoka, Ishikawa et al. 2002). Las PER_I se dividen en tres grupos distintos: ascorbato peroxidasas, peroxidasas citocromo c y catalasas-peroxidasas. Las peroxidasas de Clase II (PER_{II}), codificadas exclusivamente por hongos, se dividen en peroxidasas de manganeso, peroxidasas de lignina y peroxidasas versátiles (Ruiz-Duenas, Camarero et al. 2001). Las PER_{II} tienen un papel principal en la degradación de los desechos del suelo (Piontek, Smith et al. 2001, Martinez and Speranza 2005).

Las PER_{III}, en las cuales está centrada tesis, están presentes como familias multigénicas grandes en todas las plantas terrestres (Tognolli et al., 2002; Duroux y Welinder, 2003; Passardiet al., 2004a). Por ejemplo, hay 73 miembros en *A. thaliana*,

181 en *Eucalyptus grandis*, 138 en *Oryza sativa* y 143 en *Brachypodium distachyon* (Fawal, Li et al. 2012). Las PER_{III} son principalmente secretadas en la pared celular y algunas se localizan en la vacuola (Neuhaus 1996, Welinder, Justesen et al. 2002, Passardi, Penel et al. 2004).

La estructura proteica de las PER_{III} (Fig.10I. A-B-C), así como los residuos clave de aminoácidos y el tamaño de proteína, están altamente conservadas entre ortólogos y parálogos incluso en familias de plantas evolutivamente distantes (Ostergaard et al., 2000; Nielsen et al., 2001; Welinder et al., 2002). Presentan varias características clave, especialmente los sitios de unión al Ca²⁺ proximal (Thr171, Asp222, Thr225, Ile228) y distal (Asp43, Gly48, Asp50, Ser52), los residuos del sitio activo central Arg38, Phe41, His42, Asn70 e His170 (donde se une el grupo hemo), y el carbonilo de Pro139 que acepta un enlace de hidrógeno de sustratos reductores y determina la especificidad del sustrato [la numeración corresponde a HRP (Veitch 2004)].

Las PER_{III} realizan tres diferentes ciclos enzimáticos, llamados ciclo peroxidativo, ciclo hidroxílico y ciclo oxidativo. (Welinder, Justesen et al. 2002, Passardi, Penel et al. 2004). Durante su ciclo peroxidativo, las PER_{III} usan H₂O₂ como agente oxidante para producir radicales libres en componentes fenólicos y glicoproteínas estructurales que pueden, en forma subsecuente forman enlaces covalentes estables. Esta actividad contribuye a la rigidización de la pared celular y por lo tanto limita el crecimiento. Las PER_{III} pueden también causar la relajación de la pared celular mediante su ciclo hidroxílico, en el cual el H₂O₂ y el O₂ apoplástico es convertido por las PER_{III} en radicales hidroxilo •OH, que producen clivajes de polisacáridos en una forma no enzimática y un relajamiento general de la pared celular (Fig. 9I. D). Por lo tanto, las PER_{III} pueden cumplir roles opuestos en la expansión celular, siendo capaces de causar tanto la relajación como la rigidización de la pared celular dependiendo de las condiciones de crecimiento. (Chen and Schopfer 1999, Dunand, De Meyer et al. 2003, Passardi, Cosio et al. 2005). Finalmente, en el ciclo oxidativo las PER_{III} generan radicales super-óxido (O₂^{•-}) a partir de la reducción de ¹O₂ que puede ser dismutado a H₂O₂, ya sea espontáneamente o enzimáticamente mediante la Superóxido dismutasa (SOD) modulando así los niveles de apoROS (Fig. 9I. D).

Estas características de PER_{III} les permite participar en un amplio rango de procesos fisiológicos que incluyen: la germinación de semillas, el crecimiento y elongación celular, la producción de especies reactivas de oxígeno, defensa contra patógenos, cicatrización de heridas, respuesta al estrés y el catabolismo de auxinas. (Cosio and Dunand 2008). También, las PER_{III} están involucradas en la lignificación, mediante la unión de monolignoles para formar polímeros de lignina (Marjamaa, Kukkola et al. 2009). Los monómeros de lignina pueden también, entrecruzarse con polisacáridos de la pared celular incluido las pectinas, gracias a la acción de las PER_{III} en presencia de H₂O₂ (Iiyama, Lam et al. 1994). Por último, las PER_{III} son capaces de *crosslink* EXTs mediante sus residuos de Tyr y Lys contribuyendo a la formación de

una densa red en la pared celular. Esto fue demostrado *in vitro* para las PER_{III} pl 4.6 purificada de *Lycopersicon esculentum* (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996), para GvP1 de *Vitis vinifera* (Jackson, Galinha et al. 2001) y para LEP1 de *Lupinus albus* (Price, Pinheiro et al. 2003).

Es probable que las PER_{III} hayan desempeñado un papel crítico durante la colonización de tierra por las plantas, ya sea al permitir la formación de estructuras rígidas en las plantas o adaptando el organismo a un medio ambiente oxigenado (Duroux and Welinder 2003, Passardi, Longet et al. 2004). Luego, experimentaron un alto grado de duplicación genética con la consecuente especialización en la función (Passardi, Cosio et al. 2005). *Arabidopsis thaliana* codifica para 73 genes correspondientes a PER_{III} con diferentes perfiles de expresión espacio-temporales. Esto sugiere que diferentes isoformas juegan roles específicos en el crecimiento, desarrollo y adaptación al medio ambiente (Tognolli, Penel et al. 2002, Welinder, Justesen et al. 2002).

Asignar un papel preciso para un gen de las PER_{III} individual es difícil debido a que, en general, la generación de plantas transgénicas mutantes resulta en un fenotipo no visible. Esto se debe a la redundancia génica y a una amplia especificidad de sustrato detectada *in vitro* (Cosio and Dunand 2008). A pesar de estas dificultades, se han podido determinar las funciones específicas de algunas PER_{III}. En el caso de la raíz, se determinó que AtPER64 está involucrada en la polimerización de lignina en la endodermis (Lee et al. 2013) y que AtPER39, AtPER40 y AtPER57 están involucradas en la diferenciación del meristema (Tsukagoshi, Busch et al. 2010). Por otro lado, AtPER1 y AtPER73 (Lan, Li et al. 2013) así como AtPER44 y AtPER57 (Kwon, Sparks et al. 2015) han sido asociadas al crecimiento del pelo radical, ya que los mutantes correspondientes, presentaron pelos de longitudes menores al Wt Col-0.

Recientemente se han identificado reguladores transcripcionales de los genes que codifican para las PER_{III}. Tal es el caso de KUODA1 (KUA1) un FT de tipo MYB, que controla específicamente expansión celular durante el desarrollo foliar. KUA1 reprime directamente la expresión de un conjunto PER_{III} (AtPER7, PER8, PER10, AtPER30, AtPER35, AtPER44 y AtPER57) que regulan la homeostasis de ROS en el apoplasto, lo que determina el tamaño final de los órganos (Lu, Wang et al. 2014). El FT UPBEAT1 (UPB1) regula el equilibrio entre la proliferación celular y la diferenciación en el meristema de raíz. Mediante perfiles de expresión genómica junto con el análisis ChIP-seq (por *chromatin immunoprecipitation sequencing*; Inmunoprecipitación de la cromatina y análisis por secuenciación) se reveló que UPB1 regula directamente la expresión de un conjunto de PER_{III} (AtPER39, AtPER40 y AtPER57) las cuales modulan el equilibrio de ROS entre las zonas de proliferación celular y la zona de elongación celular donde comienza la diferenciación. La interrupción de la actividad UPB1 altera este equilibrio de ROS, lo que lleva a un retraso en el inicio de la diferenciación (Tsukagoshi, Busch et al. 2010). Además, recientemente se determinó que el mediador transcripcional PFT1 (MED25) regula la transcripción de un grupo de PER_{III} afectando los

niveles de ROS y el desarrollo del pelo radical (Sundaravelpandian, Chandrika et al. 2013).

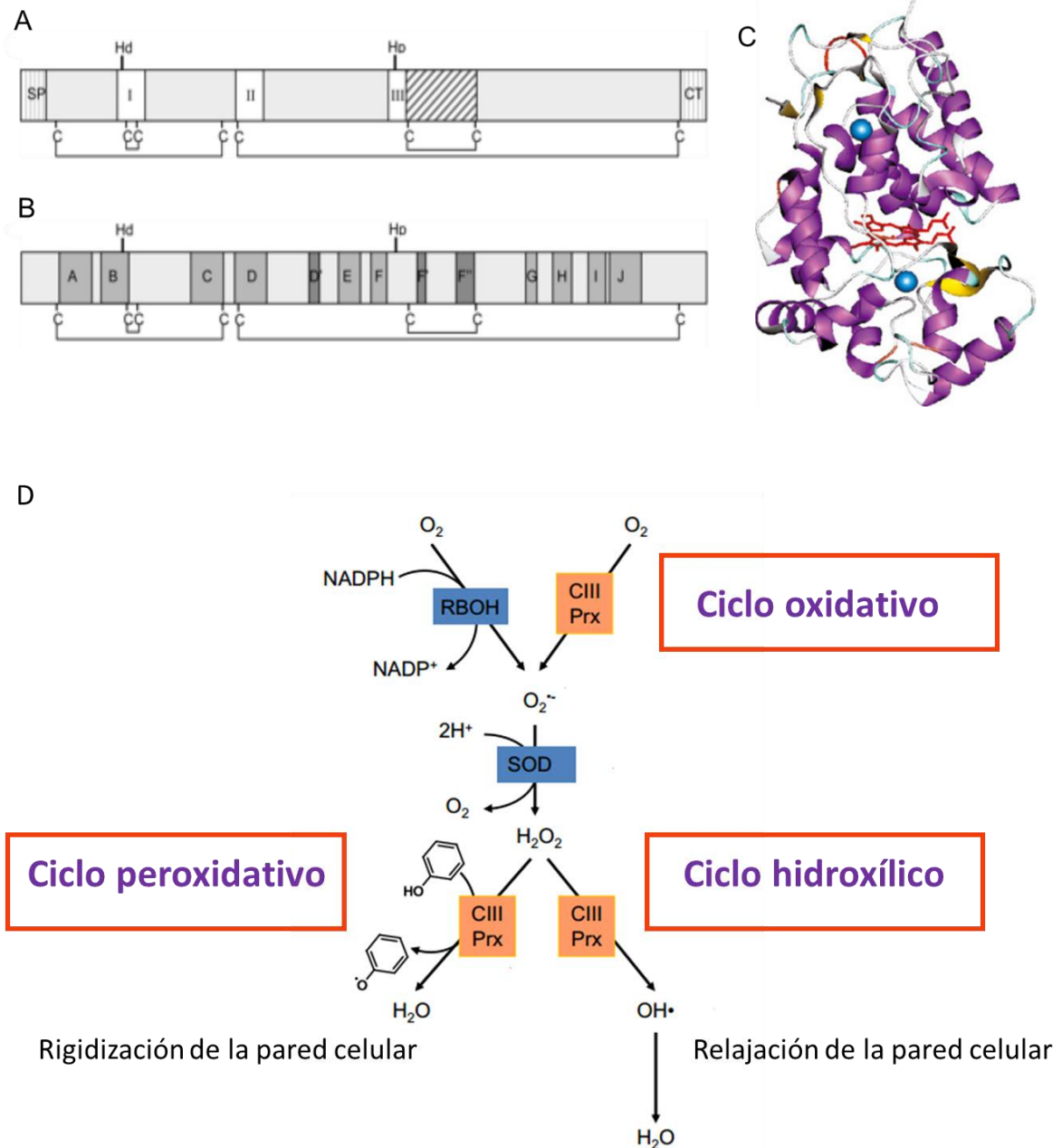


Figura 10I: Estructura y función de PER_{III}. **A)** Esquema de la estructura primaria de PER_{III}. Los dominios altamente conservados I, II y III corresponden al dominio distal de unión al grupo hemo, un dominio desconocido y el dominio de unión a hemo proximal. La región rayada corresponde a un dominio variable putativo responsable de la especificidad catalítica. El péptido señal (SP) y la extensión C-terminal (CT) son muy variables en longitud y composición de aminoácidos. **B)** Esquema de la estructura secundaria: en gris se oscuro se representan los α -helices (A-J), su posición relativa se especifica utilizando residuos conservados de cisteína (C) e histidina distal y proximal (Hd y Hp) como referencia. **C)** Representación tridimensional de la estructura cristalina de rayos X de isoenzima C de peroxidasa de rábano picante. El grupo hemo (coloreado en rojo) se encuentra entre los dominios distal y proximal que contienen cada uno un átomo de calcio (se muestra como esferas azules). Regiones de α -helices y láminas β se muestran en morado y amarillo, respectivamente (Veitch 2004). **D)** Reacciones que catalizan las PER_{III} presentes en

el espacio apoplástico: Las PER_{III} a través de su ciclo peroxidativo, en presencia de ROS rigidizan la pared celular inhibiendo la expansión celular. Mediante su ciclo hidroxílico producen un relajamiento de la pared que promueve la expansión celular. Además, en su ciclo oxidativo, las PER_{III} junto con las NOXs generan radicales super-óxido O₂[•] a partir de la reducción de O₂ (oxígeno singlete) que puede ser dismutado a H₂O₂, modulando los niveles de apoROS. RBOH: NOXs CIII Prx: PER_{II} SOD: Superóxido dismutasa. Esquema extraído y modificado de (Francoz, Ranocha et al. 2015).

1.8 Cisteína Endopeptidasas (CEPs)

Un tipo de proteínas que estarían involucradas en el desensamblado de la red de EXTs en la pared celular durante el crecimiento polarizado del pelo radical serían las cisteína-endopeptidasas de tipo papaína (CysEP o CEPs). Se trata de proteasas involucradas en el proceso de muerte celular programada (MCP). Estas peptidasas son sintetizadas y almacenadas como pro-enzimas inactivas, y durante los últimos estadios de la MCP que se caracteriza por el colapso vacuolar y acidificación de citoplasma se libera la enzima madura, digiriendo componentes celulares que van a ser reciclados para los tejidos sobrevivientes de la planta (Schmid, Simpson et al. 1999, Hierl, Höwing et al. 2014, Höwing, Huesmann et al. 2014).

Las CEPs fueron originalmente identificadas en ricinosomas, vesículas especializadas de *Ricinus communis* (ricino) (Schmid et al., 1999). A este orgánulo esférico de 1 µm de diámetro, rodeado por una membrana única impregnada de ribosomas, se lo denominó "cisterna dilatada" ya que parecía desarrollarse a partir del RE (Vigil 1970) o "ricinosoma", ya que sólo se encontraba en el poroto de ricino en ese momento (Mollenhauer and Totten 1970). Las CEPs se caracterizan por presentar una señal de retención en el RE, KDEL en el extremo C-terminal que les permite localizarse en vesículas derivadas de RE. Las CEPs son sintetizadas como pre-pro-enzima, y son co-traduccionalmente transportadas al RE donde la pre-secuencia es removida y almacenada en compartimientos como enzima inactiva (pro-enzima). En los últimos estadios de la MCP se libera la pro-enzima de los ricinosomas debido al colapso vacuolar y la consecuente acidificación del citosol, desencadenando la maduración de la enzima. La enzima activa es capaz de clivar proteínas.

Si bien no se encontraron genes homólogos en mamíferos o levaduras, las CEPs son ubicuas en plantas (Hierl, Vothknecht et al. 2012). La CEP de ricino (RcCysEP) ha sido la más estudiada (Schmid, Simpson et al. 1998). RcCysEP muestra una amplia e inusual especificidad de sustrato. El sitio de corte dentro de un sustrato (representado con una flacha ↓) se denota como P2-P1- ↓ -P1 -P2. RcCysEP (como es típico para las CEPs) tiene una clara preferencia por aminoácidos neutros con cadenas laterales alifáticas y no polares (Leu, Val, Met) o aromáticas (Phe, Tyr, Trp) en la posición P2 y no presenta una clara preferencia en la posición P1. Inusualmente, aceptan prolina en las posiciones P1 y P1 (Than, Helm et al. 2004, Hierl, Höwing et al. 2014). La cristalización de RcCysEP

purificada como miembro fundador de las CEPs (Schmid, Simpson et al. 1998) reveló que RcCysEP se pliega en dos dominios distintos de aproximadamente el mismo tamaño, como es habitual para las CEPs. El plegamiento de RcCysEP también es muy similar a la cisteína peptidasa específica de prolina del jengibre (*Zingiber officinale*). La hendidura del sitio activo de RcCysEP, sin embargo, es más amplia en comparación con la proteasa de jengibre y de la papaína (Than et al., 2004). RcCysEP presenta la capacidad de aceptar hidroxiprolinas glicosiladas cerca del sitio de clivaje, brindándole la habilidad de digerir a las EXTs. Esta capacidad fue demostrada mediante ensayos *in vitro* donde RcCysEP fue capaz de degradar la EXT P1 de tabaco madura, la cual presenta el módulo repetitivo Ser-(Hyp)₄-Thr-Hyp-Hyp-Val-Tyr-Lys, dando lugar a 17 péptidos que contenían al módulo Ser-(Hyp)₄ (Helm, Schmid et al. 2008).

Arabidopsis thaliana codifica para tres CEPs (AtCEPs) en su genoma: AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 (Helm, Schmid et al. 2008). Mediante construcciones reporteras con sus promotores endógenos y el gen de la β-galactosidasa se pudo determinar la marcada especificidad de tejido y órganos de estas peptidasas tanto en tejidos reproductivos como vegetativos. En raíz, AtCEP1 se expresa durante la formación de raíces laterales, AtCEP2 en el principio de la caliptra y en la zona de elongación y AtCEP3 en la zona de transición hipocótilo-raíz (Helm, Schmid et al. 2008).

Mediante el análisis de mutantes fue posible determinar la función de AtCEP1, la cual está involucrada en la MCP del *tapetum* durante el desarrollo del grano de polen. En la mutante *cep1*, la MCP del *tapetum* es retrasada resultando en un grano de polen con morfología anómala, causada principalmente por deformaciones en la exina (Zhang, Sheng et al. 2014). Por otro lado, AtCEP1 también está involucrada en la defensa contra patógenos ya que la mutante *cep1* fue más susceptible al ataque por *E. cruciferarum* que la línea control Wt Col-0 (Höwing, Huesmann et al. 2014).

Un estudio reciente siguiere la presencia de AtCEP2 en la base de las hojas jóvenes, en el hipocótilo y en la zona de elongación de la raíz, que son tejidos que no están llevando a cabo MPC, por el contrario, están en activo crecimiento. Esto podría indicar una función de AtCEP2 en la relajación de la pared celular necesaria para la extensión mediante el desensamblado de la red de EXTs.

Teniendo en cuenta la importancia de la O-glicosilación de las EXTs en el proceso de expansión celular de pelos radicales (Velasquez, Ricardi et al. 2011, Velasquez, Ricardi et al. 2015) es posible que las CEPs estén a cargo de la proteólisis EXT en el RE (y posiblemente en el Golgi) cuando están sobreglicosiladas o sin glicosilar, ejerciendo un control de calidad de las mismas durante su tránsito a lo largo de la vía secretora.

El mecanismo de control de calidad para las N-glicoproteínas en plantas y animales se encuentra altamente regulado y conservado (Caramelo and Parodi 2015). Cuando las N-glicoproteínas no se pueden plegar de manera adecuada, se degradan mediante un proceso conocido como degradación de proteínas asociadas al retículo endoplasmático (ERAD) el cual, está ligado a la ubiquitinación de proteínas y la subsecuente degradación

por proteasoma (Vembar and Brodsky 2008). Existe un segundo mecanismo, recientemente descrito basado en *O*-manosilación de proteínas (UPOM) (Xu, Wang et al. 2013). Ambos procesos son fundamentales para mantener la homeostasis glicoproteica global (Kim, Hipp et al. 2013). Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo se detecta y controla el plegamiento de las *O*-glicoproteínas durante su procesamiento a lo largo de la vía secretora de las plantas. Las CEPs serían las candidatas ideales en este proceso ya que presentan una señal de localización en RE (KDEL) y son las únicas enzimas capaces de degradar EXTs identificadas hasta ahora. Además, no fue confirmado si las CEPs pueden ser segregados y alcanzar el apoplasto donde, teóricamente también podrían regular el desmontaje de la red de EXT en condiciones específicas.

Poca información se encontró en referencia a regulación transcripcional de las CEPs. Recientemente se determinó que FT NAC1 (petunia NAM and Arabidopsis ATAF1, ATAF2, y CUC2) (Aida, Ishida et al. 1997) se expresa en respuesta al daño celular y promueve la formación de raíces adventicias en explantos de hojas durante la organogénesis *de novo* (Chen, Cheng et al. 2016). Se determinó que, durante este proceso, NAC1 regula positivamente la expresión de los genes que codifican para las proteínas CEP1 y CEP2 en *Arabidopsis thaliana* (Chen, Cheng et al. 2016). Es posible que el FT NAC1 también se exprese durante la formación y el crecimiento de pelos radicales induciendo la expresión de genes CEPs.

Hipótesis

Durante el crecimiento polarizado del pelo radical de *Arabidopsis thaliana*, las PER_{III} mediante ciclo peroxidativo, podrían regular el entrecruzado covalente de la red de EXTs en la pared celular (Fig. 1H, Hipótesis 1A), formando enlaces covalente estables a través de sus residuos Tyr lo que provocaría la rigidización de la pared celular. Por otro lado, las PER_{III} generan radicales super-óxido O₂^{•-} a partir de la reducción de ¹O₂ que puede ser dismutado (por las SODs o espontáneamente) a H₂O₂. Debido a esta capacidad, se hipotetiza que las PER_{III} (junto con las NOXs) contribuyen a la regulación de la homeostasis de ROS que, en coordinación con Ca²⁺ y pH, regulan la elongación polarizada del pelo radical (Fig. 1H, Hipótesis 1B).

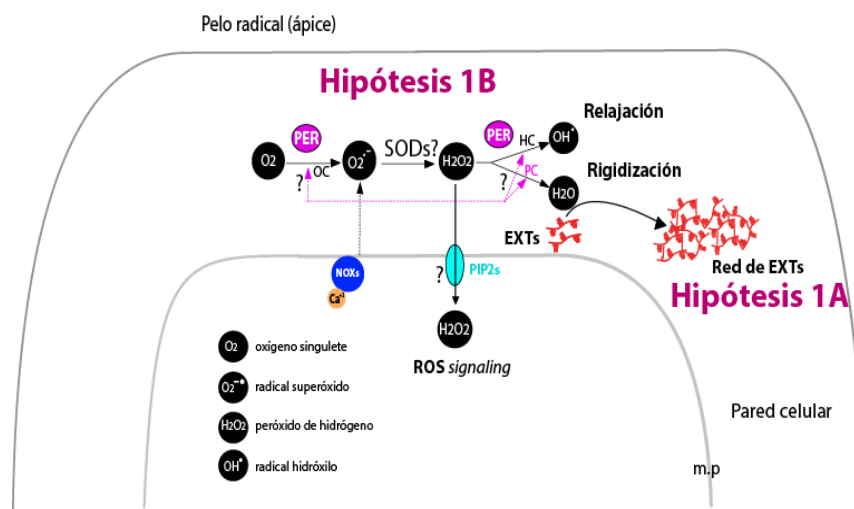


Figura 1H: Planteo de hipótesis de las funciones de las PER_{III} en pelo radical. Hipótesis 1A: Las PER_{III} (en presencia de ROS) entrecruzarían monómeros EXTs en la pared celular formando una red de EXTs ordenada y unidas covalentemente. **Hipótesis 1B:** PER_{III} (junto con las NOXs) regularían los niveles de ROS necesarios para elongación polarizada del pelo radical. m.p: membrana plasmática.

Dada la capacidad que presentan las CEPs de digerir EXTs (Hruz, Laule et al. 2008) se hipotetiza que estas enzimas podrían regular el desensamblado de la red de EXTs en el apoplasto, lo que permitiría la relajación de la pared celular durante la expansión polarizada del pelo radical en *Arabidopsis thaliana* (Fig. 2H, Hipótesis 2A). También, debido a que las CEPs presentan una señal de localización en RE (KDEL) es factible suponer que las CEPs serían las encargadas de ejercer un control de calidad en aquellas EXTs mal procesadas (subglicosiladas o sobreglicosiladas) en el sistema secretorio en el RE-Golgi (Fig. 2H, Hipótesis 2B).

Pelo radical

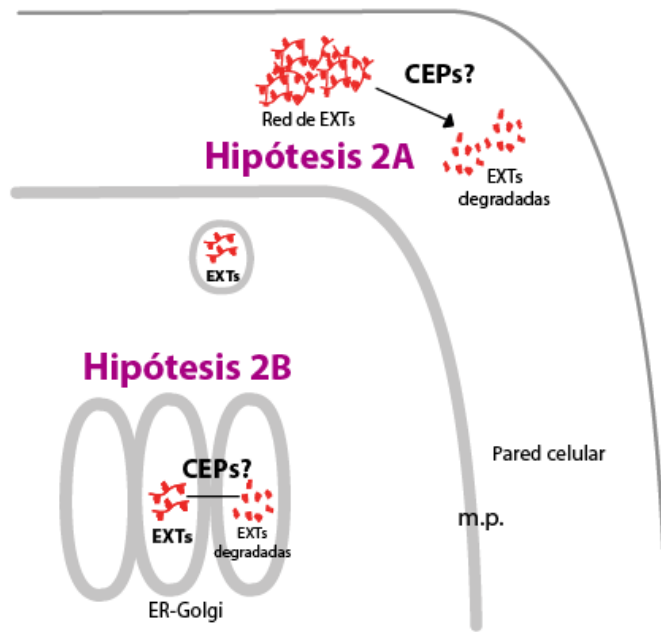


Figura 2H: Planteo de hipótesis de las funciones de CEPs en pelo radical: **Hipótesis 2A:** las CEPs regularían el desensamblado de la red de EXTs en el apoplasto y/o **Hipótesis 2B:** las CEPs ejercerían un control de calidad durante la biosíntesis de EXTs *O*-glicosiladas en el sistema secretorio en el RE-Golgi. m.p: membrana plasmática.

Objetivo general

Dilucidar los mecanismos moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales. Analizar a las PER_{III} y a las CEPs involucradas en ensamblado-desensamblado de la red de EXTs que modulan el crecimiento.

Objetivos específicos

PER_{III}

- Identificar y caracterizar a las PER_{III} específicas involucradas en la producción de ROS necesario para el crecimiento polarizado del pelo radical.
- Determinar la función de las PER_{III} en el entrecruzamiento de EXTs en la pared celular de los pelos radicales *in vivo*.
- Definir su regulación transcripcional. Establecer si las actividades de las PER_{III} presentan respuesta a auxinas y describir el mecanismo molecular por el cual las PER_{III} son controladas para la regulación de la homeostasis de ROS indispensable para el desarrollo del pelo radical.

CEPs

- Definir la función de las CEPs en el pelo radical ya sea, ejerciendo un control de calidad en las EXTs mal glicosiladas o subglicosiladas en el sistema secretorio (RE-Golgi) y/o involucradas en el desensamblado de la red de EXTs en la apoplasto durante la expansión celular del pelo radical.
- Caracterizar a las CEPs específicas involucradas en estos procesos en pelos radicales.
- Determinar su regulación transcripcional.

Materiales y métodos

1. Material vegetal.

Las semillas fueron esterilizadas usando una solución de lavandina 30% v-v durante 10 minutos y luego se realizaron 3 lavados con agua grado MiliQ estéril. Para la estratificación, las semillas se mantuvieron en agua grado MiliQ durante 72 horas a 4°C en oscuridad para asegurar la sincronización de la germinación. Luego, fueron puestas en placas cuadradas de 120x120 mm transparentes con medio de cultivo Murashige & Skoog al 50% de lo indicado (MS 0,5) y agar de plantas Duchefa 0,8% m-v, pH 5,8. Las placas fueron selladas con cinta microporosa (que permite el intercambio gaseoso), y colocadas verticalmente en una cámara de cultivo (*Biocontrol*; con alternancia de dos temperaturas entre un rango de 10 a 45°C, refrigeración por unidad condensadora, iluminación aprox. 80-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$, con control de fotoperíodo mediante *timer* programable, superficie interna de 1650 x 630 x 520) a 22°C con un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad (intensidad de la luz: 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$), o bajo un ciclo de luz continua (dependiendo del experimento a realizarse posteriormente), por un lapso de entre 7-10 días, después del cual se realizaron las observaciones correspondientes. Para su amplificación, las plántulas fueron transferidas al sustrato (una mezcla de 3 partes tierra, 1 parte vermiculita, 1 parte perlita y 1 parte turba) y puestas a crecer nuevamente bajo un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad (Weigel and Glazebrook 2002).

Se usó a *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) como el genotipo salvaje (Wt, *Wild Type*). Las líneas de mutantes insercionales de T-ADN se adquirieron de *Arabidopsis Resource Center* (Alonso, Stepanova et al. 2003) (Tabla 1M) (ABRC; <https://www.abrc.osu.edu/>).

2. Análisis de mutantes de T-DNA.

Se usó a *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) como el genotipo salvaje (Wild Type: WT) Las líneas mutantes insercionales de Transposon-ADN (T-ADN) fueron adquiridas de *Arabidopsis Resource Center* (Alonso, Stepanova et al. 2003) (Tabla 1M) (ABRC; <https://www.abrc.osu.edu/>). Estas líneas contienen un fragmento de ADN de transposón insertado en un gen particular. Se trata de una inserción única que puede ocurrir en las regiones 5' o 3' no traducibles (5'UTR, 3'UTR), en el promotor, intron o en la región codificante del gen. De esta forma el gen comprometido por la presencia del transposón suele presentar un menor nivel de expresión que lo normal, en las respectiva mutante de T-ADN, aunque en casos excepcionales puede resultar en la sobreexpresión del gen comprometido. Para la identificación de líneas homocigotas de T-ADN, se extrajo ADN genómico (como se explicará a continuación) y se realizó una reacción de PCR para

comprobar la presencia de la inserción y que esta estuviese en estado de homocigosis. Para esto se realizaron 2 reacciones de amplificación por planta mutante a genotipar: una para detectar la presencia de la inserción y otra para detectar la presencia de la banda correspondiente al alelo WT. Para amplificar la banda de la inserción, se utilizó una pareja de *primers* donde el *forward* se une en la secuencia del transposón y el primer *reverse* a la secuencia del gen. Para la banda WT, se utilizó una pareja de *primers* donde tanto el *forward* como el *reverse* se anclan en la secuencia del gen (Fig. 1M) El ciclo de PCR utilizado fue: 94° por 5 min, (94°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundos, 72° por 1 min 30 segundos) x 35 ciclos, 72° por 10 min. Como control se realizaron las mismas 2 reacciones de PCR descritas utilizando ADN WT como templado. Los *primers* utilizados para cada genotipo fueron diseñados con el software *T-DNA Primer Design* (<http://signal.salk.edu/tADNprimers.2.html>) (Tabla 2M.)

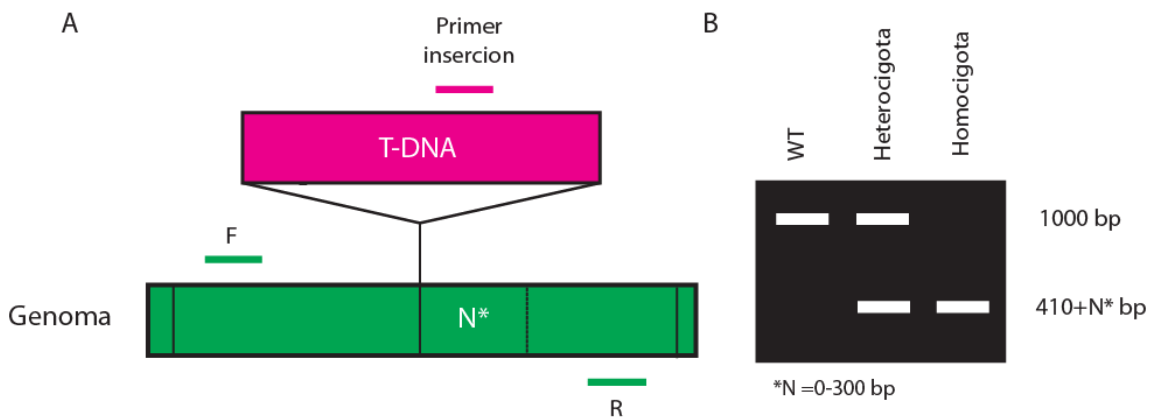


Figura 1M. Esquema de los *primers* utilizados en la PCR para determinar las líneas T-ADN homocigotas mutantes. **A)** Los 3 *primers* utilizados: el F (forward), y el R (reverse) que se unen a la secuencia del gen, y el primer específico para la inserción que se une en la secuencia del transposón. **B)** Bandas esperadas en una corrida electroforética en gel de agarosa, dependiendo si la planta analizada resulta ser WT, heterocigota u homocigota para la inserción del transposón se obtendrán bandas de distinto tamaño.

3. Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de tejido vegetal de hojas de roseta de plantas crecidas en tierra al cabo de 3 semanas. Se tomó 1 hojas grande por muestra y se congelaron en nitrógeno líquido en tubos *ependorf* de 1,5 ml. Luego se procedió a moler el tejido dentro del tubo con émbolos de plástico. Una vez que el tejido fue reducido a un fino polvo, se le agregó 500 µl de buffer de extracción 2X CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA) y se colocaron los tubos en un baño térmico a 65°C por término de 30 minutos. Una vez pasado este tiempo, se dejó que el tubo vuelva a temperatura ambiente y se le agregó bajo campana 500 µl de cloroformo. Luego se centrifugó por 10 minutos a 18000 G y tranvaso la fase acuosa (que es la que contiene

el ADN). Se agregó 1 volumen de alcohol *isopropílico* frío para lograr la precipitación del ADN y se centrifugó nuevamente por 10 min a 18000G, se descartó el sobrenadante conservando el pellet. Al pellet se le agregó 1000 ml de alcohol etílico 70% v-v para limpiarlo de sales. Se volvió a centrifugar 10 min a 18000G y se descartó el sobrenadante obtenido. Se dejó secar el pellet en estufa a 37°C por 10 min. Una vez bien seco el pellet, se lo resuspendió en 50 µl de agua MiliQ (Weigel and Glazebrook 2002).

4. Obtención de dobles mutantes mediante cruzamientos.

Los dobles mutantes y triples mutantes fueron generados mediante cruzamiento colocando las anteras con polen de uno de los mutantes simples en los pistilos florales del otro mutante. Luego se realizó una PCR en la generación F2 para confirmar la presencia de los T-ADN correspondientes en estado homocigotas.

5. Análisis fenotípicos de pelo radical.

Para los análisis fenotípicos de largo de pelo, las semillas fueron colocadas en medio MS 0,5X (*Sigma*) 0.8% de agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en placas cuadradas colocadas verticalmente, y puestas bajo un ciclo de luz continua de 7 días. Se tomaron fotos de las plántulas sin quitarlas de la placa, con una lupa estereoscópica OLYMPUS SZX7 usando un aumento de 2.5X. Luego mediante el uso del programa *ImageJ* (Abramoff, Magalhaes et al. 2004) se procedió a medir los 5 pelos radicales más largos de cada raíz. Se realizó un promedio de la longitud de estos 5 pelos y cada promedio constituyó un n. Por experimento se midieron pelos radicales correspondientes a 20-40 raíces (n=20-40) que corresponden a la medición de 100-200 pelos radicales. Se graficó la media \pm error estándar (media \pm SEM). Todos los resultados se graficaron y procesaron con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0 (<https://www.graphpad.com/>).

6. Análisis fenotípicos de longitud de raíz total.

Para las mediciones de largo total de raíz fueron fotografiadas plántulas crecidas durante 7 días en las mismas condiciones descritas en el punto anterior. A partir de las fotografías, se trazó una recta con el *software ImageJ* desde la base hasta el ápice radical y se determinó la distancia en milímetros (mm) según escala. Se midió el largo total de n=12 raíces por tratamiento evaluado. Se graficó la media \pm error estándar (media \pm SEM).

7. Medición de ROS mediante H₂DCFDA.

Para la medición de ROS total citoplasmático se utilizó la molécula 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). Esta molécula es permeable a la pared celular y membrana plasmática. Se trata de una forma de fluoresceína reducida químicamente que se utiliza como indicador de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células. Una vez que entra en la célula se disocian los grupos acetato por parte de las esterasas intracelulares imposibilitando su salida de la célula y al entrar en contacto con ROS la sonda se oxida y en consecuencia la molécula H₂DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente, siendo excitada a 488nm y emitiendo en el rango de 517–527.(Fig.2M) Se colocaron semillas de *Arabidopsis* (Wt Col-0 y mutantes) en placas cuadradas con MS 0.5X (Sigma) 0.8% de agar planta (Duchefa) pH 5.8 en una cámara a 19-23°C con luz continua durante 10 días. En oscuridad, se retiró una plántula del medio y se la colocó en un porta objetos conteniendo una gota de 50µM H₂DCFDA y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por genotipo se analizaron los pelos radicales correspondientes a 6 raíces. Las imágenes fueron obtenidas mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia Zeiss Imager A2. El objetivo utilizado fue 10X, 0.3 de apertura numérica tiempo de exposición 80-500ms. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa *ImageJ 1.50b software*. Para medir los niveles de ROS, se seleccionó una región circular de interés dentro del ápice del pelo radical (ROI). Los valores reportados son la media ± desvío estándar (media±SD).

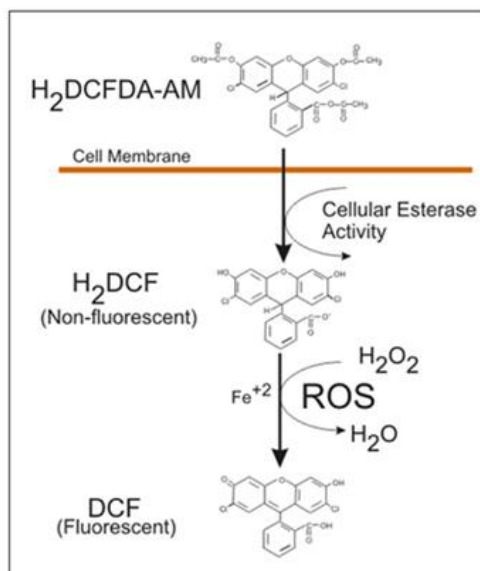


Figura 2M: Pasaje de la 2',7'-diclorofluoresceína diacetato a través de la membrana y formación de DCF por acción de los ROS.

8. Determinación de los niveles de H₂O₂ citoplasmáticos (citH₂O₂) mediante el uso del biosensor *HyPer*.

Recientemente han surgido estudios utilizando biosensores moleculares detectan en tiempo real pequeños cambios en las concentraciones de numerosas moléculas pequeñas permitiendo comprender los mecanismos moleculares que permiten el crecimiento del ápice del pelo radical (Uslu and Grossmann 2016). Algunos ejemplos de estos biosensores son aquellos que detectan con una resolución espacio temporal muy alta en diferentes compartimientos subcelulares muy bajas concentraciones de ROS (Belousov, Fradkov et al. 2006, Costa, Drago et al. 2010), Ca²⁺ (Horikawa, Yamada et al. 2010, Bardgett, Mommer et al. 2014, Keinath, Waadt et al. 2015) y H⁺ (Monshausen, Bibikova et al. 2007, Monshausen, Miller et al. 2011, Gjetting, Ytting et al. 2012). Específicamente, una mirada dinámica de las oscilaciones de ROS es obtenida gracias al biosensor codificado genéticamente “*HyPer*” sensible a H₂O₂ (Mishina, Markvicheva et al. 2013). *HyPer* consiste en una proteína fluorescente amarilla circularizada y permutada (cpYFP) acoplada al dominio regulatorio y sensible a H₂O₂ de *Escherichia coli* OxyR (Fig.3M). En presencia de H₂O₂ el pico de excitación del espectro de cpYFP sufre un corrimiento de 420 a 500nm, mientras que el pico de emisión se mantiene igual a 516 nm (Belousov, Fradkov et al. 2006). Esto, permite realizar mediciones radiométrica (Costa, Drago et al. 2010, Hernández-Barrera, Velarde-Buendía et al. 2015). Es importante recalcar que *HyPer* es sensible al pH celular.

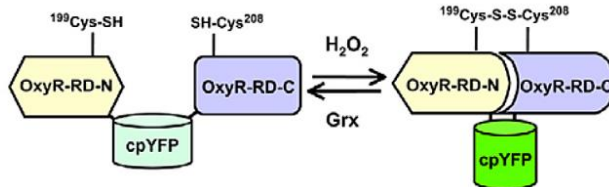


Figura 3M: Biosensor *HyPer*. Se observan los dos posibles estados de oxidación del dominio OxyR-RD del biosensor. A la izquierda se observa el estado reducido del mismo con una longitud de onda de excitación de 405nm, a la derecha se observa el estado oxidado y la excitación es a 488nm. Esquema extraído de Belousov et al. (2006). (Belousov, Fradkov et al. 2006)

Para la determinación de los niveles de citH₂O₂ se utilizaron plantas que sobreexpresan este biosensor, crecidas durante 7-8 días en los tratamientos correspondientes según cada experimento. Se tomaron imágenes con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss) utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite (1.2 de apertura numérica). El biosensor fue excitado con dos láseres de manera secuencial: láser diodo de 405nm de longitud de onda y laser de argón con una longitud de onda de 488nm. La

emisión (516nm) fue colectada utilizando un espejo dicróico primario y el meta-detector del microscopio. Para los análisis a través del tiempo, se colectaron imágenes cada 6.25 segundos.

Los niveles de H_2O_2 se midieron utilizando el programa *ImageJ*. Se seleccionó un ROI circular en el ápice del pelo radical analizado y se cuantificó la media de la intensidad de los pixeles incluidos en el ROI a través del tiempo. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de la relación entre la señal obtenida cuando se ilumina la muestra con el láser 488nm sobre la obtenida cuando se la ilumina con el láser 405 (H_2O_2 488/405 UA). Para la obtención del *kymograph* se utilizó la extensión específica de *ImageJ*: *Multiple kymograph*. Para esto se trazó una línea por el centro del pelo radical desde el ápice hacia la base del mismo y se generó el *kymograph* que representa los niveles de H_2O_2 en esta zona a través del tiempo. Además, debido a la propiedad de reversibilidad del biosensor podemos medir la señal del mismo por periodos prolongados y analizar las oscilaciones de H_2O_2 , lamentablemente en nuestro sistema esto no es posible ya que debido a que el microscopio confocal institucional no posee la opción de *auto focus*, obteniendo demasiado ruido en la obtención de imágenes que enmascara las oscilaciones reales de H_2O_2 .

9. Tratamientos farmacológicos.

9.A) Inhibición de PER_{III} con Ácido salicilhidroxilamínico (SHAM).

Para evaluar en efecto de la inhibición de las PER_{III} se utilizó el inhibidor químico *N*,2-Dihydroxybenzamide o Ácido salicilhidroxilamínico (SHAM) (Sigma Buchs, Switzerland) (Brouwer K.S, Van Valen T., Day D.A., Lambers H.) El ácido salicilhidroxilamínico se une en la cavidad hemo distal de las PERs e interactúan con el sitio de unión del sustrato al grupo hemo. Por lo tanto, actúa como un inhibidor competitivo (Ikeda-Saito, Shelley et al. 1991, Davey and Fenna 1996).

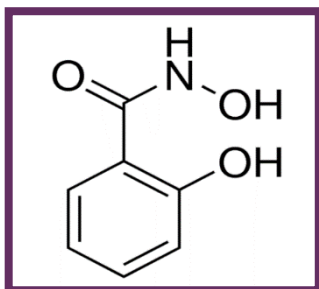


Figura 4M: Estructura química del Ácido salicilhidroxilamínico (SHAM).

Para ello las plántulas fueron crecidas en MS 0.5 X, luz continua durante 3 días y transcurridos los mismos se pasaron las plántulas utilizando un tip estéril a placas del mismo medio suplementado con SHAM en concentraciones crecientes (desde a 25 μ M hasta 250 μ M) μ M hasta lograr determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que es cuando los pelos de la línea Wt vieron reducido su largo total en un 50%. Se dejaron en este medio suplementado durante 4 días más en luz continua.

Para la determinación de IC_{50} se definió el 0% de inhibición con los valores de fenotipo del control WT sin tratamiento, mientras que el 100% de inhibición se definió con los valores de fenotipo del WT en la máxima concentración utilizada. Del gráfico de los valores normalizados respecto al logaritmo en base 10 de la concentración molar de cada reactivo se obtuvo la regresión lineal y por interpolación al 50% de inhibición se determinó la concentración IC_{50} . Todos los valores fueron procesados y graficados con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0. Luego se procedió a hacer un análisis fenotípico similar al descrito anteriormente. Se analizaron entre 150-200 pelos por concentración testada. Posteriores análisis utilizando este inhibidor fueron hechos con las IC_{50} correspondiente: 65 μ M.

9.B) Tratamientos farmacológicos prolongados.

Para tratamientos farmacológicos prolongados los con SHAM, VAS2870 y/o IAA y se crecieron plantas de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0 durante 4 días en placas cuadradas previamente descriptas en posición vertical con medio MS 0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C). Luego, las plántulas se transfirieron a placas conteniendo medio MS 0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 con las diferentes concentraciones de los compuestos farmacológicos y se las dejo crecer en luz continua en placa vertical durante 4 días más.

9.C) Tratamientos farmacológicos de tiempo corto.

Para los tratamientos de tiempo corto con IAA, plantas Wt Col-0 crecidas durante 7 días en medio MS 0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 y luz continua (18-23°C) se pre-incubaron durante 3 minutos con una solución de 100nM de IAA y luego 7 minutos con una solución de 100nM de IAA y 50 μ M de H₂DCF-DA. Se lavaron las plantas y se procedió con la toma de imágenes y análisis de las mismas como lo explicado en la sección 7 de materiales y métodos. Para los controles se reemplazó el volumen de IAA por H₂O.

Para los tratamientos con 20 μ M de HgCl₂ y con 10mM de NaN₃, plantas Wt Col-0 crecidas durante 7 días en placas en posición vertical con MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar

planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C), fueron colocadas en un porta objetos conteniendo una solución de 20µM de HgCl₂ o de 10mM de NaN₃ y 50 µM H₂DCF-DA. Se dejó incubando durante 10 minutos. Se lavó la planta y se procedió con la toma de imágenes y el análisis de las mismas según lo explicado en la sección 7 de materiales y métodos. Para los controles se reemplazó el volumen de HgCl₂ o de NaN₃ por H₂O.

9.D) Tratamientos farmacológicos in vivo con el biosensor HyPer.

Plantas que sobre-expresan el biosensor HyPer fueron crecidas durante 7 días en placas con MS 0.5X (Sigma) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C). Luego se retiró la planta y se la colocó en un porta objetos con medio MS 0.5X líquido, se tomaron imágenes del pelo seleccionado según lo explicado en la sección 8 de materiales y métodos y durante la adquisición de imágenes se agregó tratamiento correspondiente: 1 µM de H₂O₂, 20µM de HgCl₂ y/o 10mM NaN₃ y se continuó con la toma de imágenes. El análisis se realizó de la misma manera que la explicada en la sección 8 de materiales y métodos.

10.Extracción de ARNm.

La extracción de ARNm de plántula entera se realizó mediante el método de RNAzol®. Para esto, las líneas mutantes insercionales de T-ADN analizadas y Wt Col-0 fueron crecidas durante 15 días en placas con medio MS 0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8. y luz continua. Luego se tomaron 100 mg de material biológico de cada genotipo y se lo trituró con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. Se agregó 1ml de RNAzol®RT, se homogeneizó con 0.4ml de agua *milli Q*. para que precipiten en ADN y las proteínas, se agito vigorosamente. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12000 G durante 15 minutos. Se retiró 1ml del sobrenadante y se incubó con 0.4ml de etanol al 75% durante 10 minutos. Posteriormente se procedió a centrifugar nuevamente a 12000g durante 8 minutos. Con el fin de limpiar el ARNm precipitado, se realizó dos lavados con 0.4ml de etanol 75% v-v y se centrifugó durante 3 minutos a 8000G. se descartó el sobrenadante. El pellet de ARN total se resuspendió en 30µl de agua *Milli-Q* libre de RNAsas. Mediante electroforesis se corroboró la integridad del ARN obtenido (Agarosa 2%). Y se cuantificó mediante el uso del espectrofotómetro *Nanodrop* de Thermofisher, Invitrogen.

10.A) Síntesis del ADN copia (cADN).

Para la síntesis de cADN se incubaron, 2µg del ARN, junto con 1µl de oligodT (Thermofisher, Invitrogen) en un volumen final de 15µl durante 5 minutos a 72°. Se enfrió en hielo durante 5 minutos. Luego se agregaron: buffer de reacción 5X (Thermofisher, Invitrogen), 0.6mM dNTPs, 0,5 µl de la Retrotranscriptasa (Promega), 0.5 µl RNAasa out, en un volumen final de 25 µl completado con H₂O *Milli-Q* libre de RNAsas. Se dejó incubando a 42°C durante 1h.

10.B) Análisis de los niveles de transcripto por PCR semi-cuantitativa (RT-PCR).

A partir del cADN proveniente, se realizó la amplificación por PCR de las secuencias correspondientes a los transcriptos de cada línea mutante de T-ADN analizada y de la fosfatasa PP2A (AT1G69960) como control de los niveles de transcriptos. Los cebadores utilizados para cada transcripto fueron diseñados con el software *Beacon Designer, PREMIER Biosoft International* (www.premierbiosoft.com/molecular_beacons) (Tabla 4M). La especificidad de dichos cebadores fue comprobada mediante *el software on-line primer blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). La PCR consistió en: 94°C por 5 min, (94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) x 35 ciclos, 72°C por 5 min.

10.C) Análisis de los niveles de transcripto por PCR en tiempo real (qPCR).

A partir del cADN se realizó la amplificación por PCR en tiempo real de las secuencias correspondientes a los transcriptos analizados y de la fosfatasa PP2A (AT1G69960) como control de los niveles de transcriptos. Se utilizó el kit comercial *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Promega). Los *primers* utilizados para cada ARN mensajero fueron diseñados con el software Quantprime (<http://quantprime.mpimgolm.mpg.de/>) (Tabla 4M) Luego se comprobó que fueran específicos para dichos transcriptos utilizando el software *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La PCR consistió en: 95°C por 5 min, (95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) x 35 ciclos, 72°C por 5 min.

11. Red de Co-expresión RSL4-PER.

Se obtuvo una red de co-expresión para PER_{III} utilizando el software *AraGenNet* (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/aranet>). Se utilizaron como carnada, genes de pared celular conocidos, importantes para el desarrollo del pelo radical. Entre ellos, genes de expansinas *EXP7* y *EXP18* (Cho and Cosgrove 2002), proteínas ricas en prolinas (PRP por *Prolin-rich repeat protein*) *PRP1* y *PRP3* (Fowler, Bernhardt et al. 1999, Bernhardt and Tierney 2000) y *Leucine-Rich Repeat/Extensin LRX1* y *LRX2* (Baumberger, Ringli et al. 2001, Baumberger, Steiner et al. 2003). Estas redes fueron recortadas para facilitar su entendimiento. Cada red obtenida fue verificada independientemente utilizando la herramienta de expresión *angler* del *Botany Array Source* (BAR; http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi). Sólo se incluyeron genes que estuviesen conectados a los genes de interés. Los valores de co-expresión están basados en el coeficiente de correlación de Pearson donde los valores de r^2 van desde -1 para una correlación absolutamente negativa, 0 cuando no hay correlación y +1 para correlación absoluta. Solo aquellos genes con alto coeficiente de co-expresión (coeficiente de Pearson $r^2 = 0,7$ a $1,0$) fueron considerados.

12. Determinación de la actividad peroxidasa.

Para la determinación de la actividad peroxidasa se extrajeron proteínas solubles de raíces de plantas crecidas durante 10 días en medio MS 0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 y luz continua (18-23°C) Se molió el tejido en 20mM HEPES, pH 7.0, con 1 mM EGTA, 10mM de ácido ascórbico y PVP PolyclarAT (100mg g⁻¹ de peso fresco; Sigma, Buchs, Switzerland). El extracto fue centrifugado dos veces durante 10 minutos a 10000 G. Se midió la concentración de proteínas en cada extracto con Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) Para determinar la actividad peroxidasa total se usó el método basado la oxidación de guaiacol en presencia de H₂O₂. (Kiefer, Penel et al. 1985, Penel and Greppin 1994) Para ello se siguió la oxidación de 8 mM guaiacol (Fluka) midiendo la absorbancia a 470 nm en presencia de 2 mM H₂O₂ (Carlo Erba) en buffer fosfato (200 mM, pH6.0) a 25°C. La actividad enzimática se expresó en nkat/mg proteína. Los valores representan la media de tres replicas \pm desvío estándar (media \pm SD). P-valor de la prueba *one-way ANOVA*, (**) P<0.001.

13. Estrategias de clonado.

13.A) Generación de líneas transgénicas de PER_{III}.

Para el clonado tanto de los genes de PER_{III} como para el de sus regiones promotoras se usaron vectores basados en la tecnología de clonado Gateway (Life Technologies). Esta tecnología consiste en la generación de un vector de entrada (pENTRY, pDONOR) que contiene el inserto de interés. La recombinación y ligado del inserto con el vector de entrada ocurre en los sitios AttB que se le agregan al inserto y los sitios AttP que posee el vector de entrada vacío, la reacción es catalizada por un mix de enzimas llamado Clonasa BP[®] que contiene la integrasa y excisionasa del fago λ y el factor de integración del huésped (Integration Host Factor; IHF) de *E.coli*. Luego se procede a generar el vector de destino que se utilizará para transformar plantas. Para ello se realiza una segunda reacción de recombinación y ligación con un vector de destino (pDEST) en los sitios de recombinación AttL del vector de entrada con inserto y los sitios AttR del vector de destino vacío, la reacción es catalizada por un mix de enzimas llamado Clonasa LR[®] que contiene la integrasa y excisionasa del fago λ , y el IHF de *E.coli*. Una descripción de los vectores binarios de destino está disponible en (Curtis and Grossniklaus 2003, Nelson, Cai et al. 2007). En los vectores generados se comprobó la presencia del inserto mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación (Macrogen; <http://www.macrogen.com>). La secuencia codificante de los genes de PER_{III}: PER1 (*At1g05240*) PER44 (*At4g26010*) y PER73 (*At5g67400*) fue clonado en el vector de destino pMDC83 que incluye río arriba del sitio de recombinación dos copias del promotor constitutivo 35S del virus de mosaico del tabaco y la proteína fluorescente GFP, resultando en la construcción para sobre-expresar la proteína de interés fusionada a GFP (Tabla 3M). La región promotora de los genes de PER_{III} (recién mencionados) de aproximadamente 2 Kilo bases (Kb) fue clonada en el vector de destino pMDC111 que incluye río abajo del sitio de recombinación la proteína fluorescente GFP, resultando la construcción fluorescente reportera para el promotor endógeno del gen en cuestión (Tabla 3M). Los primers utilizados se encuentran listados en la Tabla 4M.

13.B) Generación de líneas transgénicas de ARFs y RSL4.

El vector binario modificado de pCAMBIA1300-NOS conteniendo la secuencia del promotor *EXPANSINA7* fusionado con GFP ($p_{E7}::GFP$) fue utilizada como vector de clonado para que las secuencias insertadas se expresen específicamente en pelo radical. Para generar las construcciones de ARF5, ARF7 y ARF8, se amplificó mediante PCR utilizando los *primers* listados en la Tabla 4M. Como templado se utilizó cADN extraído de plantas Wt Col-0. Los fragmentos resultantes fueron insertados en la construcción $p_{E7}::GFP$ reemplazando el fragmento de *GFP*.

Para las construcciones *pRSL4::RSL4-GFP*, se amplificó mediante PCR el promotor de *RSL4* (*pRSL4*) (-928~+63 bp relativas al inicio de transcripción predictivo, usando ADN genómico como templado) y la región codificante sin el codón de detenimiento (utilizando cADN como templado) mediante el uso de los *primer* listados en la Tabla 4M. El *pRSL4* y el fragmento de *RSL4* fueron secuencialmente insertados antes de la secuencia codificante de *GFP* de la construcción *pE7::GFP*. Para las líneas inducibles por estradiol (construcción *pMDC7::ARF5-GFP*), se amplificó mediante PCR la región codificante de *ARF5* sin su codón de detenimiento utilizando los *primers* listados en la Tabla 4M. El fragmento amplificado fue insertado antes del gen de *GFP* de la construcción *pE7::GFP* de manera de lograr la fusión de *ARF5* con *GFP*. Para transferir *ARF5-GFP* a un vector pDONOR207, este fue amplificado mediante PCR utilizando los *primers* listados en la Tabla 4M. El fragmento fue transferido al pDONOR207 utilizando la integrasa estándar Lambda (*Elpisbio*, Corea). Luego de la confirmación de la inserción por secuenciación, se realizó una reacción para integrar *ARF5-GFP* en el vector binario pMDC7 con la enzima integrasa/excisionasa Lambda (Curtis and Grossniklaus 2003). Para generar el reportero *pARF5::GUS*, se amplificó el fragmento que codifica para *GUS* usando los *primers* listados en la Tabla 4M y se lo insertó en el vector pCAMBIA 1300-NOS. La región promotora de *ARF5* (-2071 a -1 del codón de inicio de la transcripción) fue amplificada utilizando los *primers* listados en la Tabla 4M. Se utilizó ADN genómico de plantas Wt Col-0 como templado y luego se insertó al vector pCAMBIA 1300-GUS/GFP-NOS.

13.C) Floral dip – Transformación con *Agrobacterium*.

Los distintos vectores obtenidos fueron clonados en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) mediante la técnica de electroporación, que permite mediante un pequeña descarga eléctrica que se formen poros momentáneos en la membrana bacteriana permitiendo el ingreso de los vectores. La selección fue hecha con los antibióticos gentamicina (50 mg/ml) y rifampicina (50 mg/ml) correspondientes a la cepa de *A. tumefaciens*, y un tercer agente selectivo correspondiente al plásmido clonado. Una vez obtenidas las colonias positivas, se procedió a realizar la técnica de *Floral Dip* (Weigel & Glazebrook, 2006), para generar las líneas transgénicas. La técnica consiste en remojar las flores de *A. thaliana* en una solución de *A. tumefaciens* (cepa que contiene el vector deseado ya clonado) con una densidad óptica de 0,1 más el agregado del detergente iónico suave Silwet®. Se dejan las plantas cubiertas con una bolsa plástica por 24hs para mantener la humedad y favorecer el ingreso de la bacteria a través de las flores. Todas las transformaciones fueron realizadas en plantas de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0.

13.D) Identificación de las plantas transgénicas por resistencia y expresión de la fluorescencia.

Las plantas que fueron transformadas por *Floral Dip* se dejaron crecer en cámara de cultivo hasta que produjeron semillas y estas, se recolectaron para la selección de las plantas transgénicas. Las semillas fueron esterilizadas y colocadas en placas con medio MS 0,5X, agar 0.8% suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. Las plántulas resistentes a la selección por antibiótico fueron observadas en lupa de epi-fluorescencia (Olympus SZX7) para chequear la fluorescencia. Luego, fueron llevadas a homocigosis.

14. Western blot.

Este ensayo se realizó en colaboración con la Dra. Margaret Brigham Fleming (Departamento de Biología – Universidad del estado de Colorado) Para llevar a cabo el Western blot, se realizó un extracto crudo de proteínas de hojas jóvenes de plantas Wt Col-0 de cada línea transgénica: p35S::SS-TOM-cortaEXT, p35S::SS-TOM-largaEXT, p35S::SS-TOM y p35S::TOM (se utilizaron dos líneas transgénicas por cada construcción numeradas #1 y #2) Para el extracto, se molió cada hoja durante 15 segundos en 2x SDS buffer (4% SDS, 125mM Tris pH 6.8, 20% glicerol, 0.01% bromofenol blue, 50 mM ditiotreitól [DTT]), usando 10 µl de buffer por mg de tejido. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en un baño de agua y se centrifugaron durante 5 minutos a 21130 G. El sobrenadante fue utilizado para realizar el Western blot. Para el Western blot, 10 µl de cada extracto de proteínas de cada muestra, se cargaron en un gel de poli-acrilamida al 12% y se sometió a electroforesis durante 1 hora a 200 V, luego se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana de PVDF fue bloqueada en 5% leche en polvo disuelta en TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%) durante 1 hora a 4°C y se lavó cuatro veces durante 15 minutos en TBST. Se trató con anticuerpo primario anti-RFP (A00682, GenScript) durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron cuatro lavados de 15 minutos en TBST a temperatura ambiente y luego se trató durante dos horas a temperatura ambiente con una dilución 1: 2500 con anticuerpo secundario anti-conejo (de cabra) conjugado a fosfatasa alcalina (A3687, Sigma), diluido en TBST. Se realizaron cuatro lavados durante 15 minutos en TBST a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizaron 10 ml de buffer de fosfatasa alcalina (100mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂) que contiene 80 µl NBT (Sigma) (35mg/ml en 70% DMSO y 30 µl de BCIP (Sigma) (50 mg / ml en 100% de DMSO).

15. Búsqueda bioinformática de motivos de pegado de RSL4 y sitios Aux-RE.

Primero se buscaron motivos consensos en los promotores de los genes regulados por RSL4 descritos anteriormente (Yi, Menand et al. 2010). Estos motivos consenso fueron encontrados mediante la aplicación del algoritmo *Meme* de *MEME suite* (Michard, Lima et al. 2011). Aquellos motivos que mostraban un valor significativo (e-value $<1 \times 10^{-10}$) y estaban presentes en más del 70% de las secuencias promotoras, alimentaron la base de datos del programa TOMTOM de manera de descartar motivos ya conocidos y validar la búsqueda. Como resultado, un solo motivo fue encontrado $TN_{5-6}CA[CT]G[TA]$ (donde N puede ser T, A, C, G). Este motivo putativo se utilizó para encontrar presencias simples en las regiones promotoras de los genes del genoma de *Arabidopsis thaliana* (TAIR10, se buscó en 3000pb río debajo del sitio de inicio de la transcripción de cada gen, con $p < 1 \times 10^{-5}$). El motivo se encontró en 400 promotores de genes de la planta. Finalmente, se buscó el motivo $TN_{5-6}CA[CT]G[TA]$ en los promotores de los genes *PER_{III}* y *RSL4* (2000 pb antes del inicio de la transcripción de cada gen) De una manera similar a la explicada, también se detectaron los sitios Aux-RE (TGTCN[CG] y [GC]NGACA) reportados previamente en los promotores (2500pb antes del sitio de inicio de la transcripción) de *PER_{III}* y *RSL4* (Cho 2007).

16. Inmunoprecipitación de la Cromatina y análisis por PCR (ChIP).

El ensayo de inmuno-precipitación de la cromatina y el análisis por PCR se realizó según lo descrito previamente (Gendrel, Lippman et al. 2002, Noh, Lee et al. 2004, Kang, Jin et al. 2015). Plántulas Wt Col-0 y *p_{RSL4}RSL4::RSL4-GFP* fueron crecidas durante 10 días en un medio MS 0,5X. Las líneas transgénicas transformadas con la construcción inducible por estradiol *p_{MDC7}::ARF5-GFP* y *p_{MDC7}::GFP*, fueron crecidas en un medio MS 0,5X suplementado con 1 μ M de estradiol.

Las plántulas crecidas durante 10 días fueron infiltradas al vacío con 1% de formaldehído para favorecer el entrecruzamiento de del ADN a las proteínas unidas a éste. El entrecruzamiento se detuvo mediante el agregado de glicina, luego las plántulas fueron molidas mediante el uso de nitrógeno líquido. La cromatina fue aislada como se describió previamente (Moehs, McElwain et al. 1988), resuspendida en el buffer de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) y sonicada para obtener fragmentos de 0,5-1 Kb. La solución que contenía la cromatina se purificó mediante el uso proteína-A adosada a perlas de agarosa, suplementadas con esperma de salmón para evitar uniones de ADN inespecíficas (*Millipore*, Alemania) a 4°C durante 1 hora. La inmuno-precipitación se realizó durante toda la noche con un anticuerpo anti-GFP (MBL, Japón). El complejo inmuno-precipitado fue lavado y eluído de las perlas. El

entrecruzamiento fue revertido agregando 5M de NaCl (Concentración final = 200mM de NaCl) durante 7 horas a 65°C. Con la finalidad de remover todas las proteínas, la muestra se trató con proteinasaK (concentración final = 40ng/μl). Muestras sin tratar con los anticuerpos también pasaron por el mismo procedimiento y se utilizaron para estimar el *input* de ADN. La purificación del ADN obtenido de la reversión del entrecruzamiento se realizó usando el *Kit QIAquick PCR purification* (Qiagen, Alemania). El análisis cuantitativo mediante PCR fue hecho con los *primers* de la Tabla 4M. El enriquecimiento de cada fragmento de ChIP-PCR se calculó normalizando la cantidad del fragmento a la cantidad de ADN del *input* y luego normalizando el valor de las plantas transgénicas al control correspondiente.

17. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión a lo largo del desarrollo del pelo radical utilizando el reportero del promotor.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo de los niveles de expresión de PER44, se utilizó la línea pPER44::GFP y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP en todos estadios de crecimiento. Mientras que para CEP2 se midió la intensidad de mCherry utilizando la línea reportera pCEP2::3xHA-mCherry-KDEL

Plantas Wt Col-0, pPER44::GFP y pCEP2::3xHA-mCherry-KDEL fueron crecidas en placas cuadradas con MS 0.5X (Sigma) 0.8% de agar planta (Duchefa) pH 5.8 en una cámara a 19-23°C con luz continua durante 10 días. En oscuridad, se retiró una plántula del medio y se la colocó en un porta objetos conteniendo una gota de MS 0.5X líquido (Sigma) MS0.5X (Sigma) y se obtuvieron imágenes mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia Zeiss Imager A2. El objetivo utilizado fue 10X, 0.3 de apertura numérica tiempo de exposición 2 segundos. Los láseres utilizados fueron los adecuados para cada fluoróforo: GFP (GFP λ máx. ex.= 488 nm, λ máx. em.= 507 nm) y mCherry (λ máx. ex.= 536 nm, λ máx. em.= 632 nm) La línea Wt Col-0 fue utilizada como control de las condiciones saeteadas para descartar ruido de autofluorescencia. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa *ImageJ 1.50b software*. Para medir los niveles de intensidad de fluorescencia de GFP (representadas en unidades arbitrarias UA), se seleccionó tanto una región circular de interés dentro del ápice del pelo radical (ROI) como el área total del pelo radical. Se analizaron todos los pelos radicales de un total de aproximadamente 6 plántulas. Los valores reportados son la media ± error estándar (media±SEM).

18. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio.

Las plántulas Wt Col-0 crecidas tratadas con 75 μm de SHAM y sin tratar fueron retiradas de las placas y montadas en presencia de yoduro de propidio (IP, 20 μg/ml)

para observar los pelos radicales con las paredes celulares teñidas de rojo mediante microscopía confocal (λ máx. ex.= 536 nm, λ máx. em.= 617 nm). A partir de las fotografías obtenidas se trazó una recta en la zona subapical con el software ImageJ (<http://www.imagej.nih.gov/ij/>) las intensidades de fluorescencia por pixel fueron obtenidas con el comando *plot profile* del programa ImageJ (<http://www.imagej.nih.gov/ij/>) y la correspondencia de cada pixel con la distancia en micrómetros la realizó el ImageJ al procesar los metadatos de las imágenes en forma automática. Se midieron 15 pelos para cada cuantificación. Los resultados se graficaron con el software de análisis estadístico *GraphPad Prism*® 6.0 (<https://www.graphpad.com/>).

19. Visualización de la expresión de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19.

La señal de GFP de las líneas transgénicas reporteras *pARF5::SV40-3xGFP*, *pARF5::GUS-GFP*, *pARF7::SV40-3xGFP*, *pARF8::SV40-3xGFP* y *pARF19::SV40-3xGFP* fue adquirida mediante la utilización del microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal equipado con un láser de Argón (longitud de onda 488nm) y una láser HeNe (longitud de onda 543nm). Se utilizó un objetivo 40X con NA=1.2. Antes de la adquisición de las imágenes las plantas fueron incubadas con 20µg/ml de yoduro de propidio con la finalidad de marcar las paredes celulares.

20. Análisis de proteínas con dominios tipo EXTs en la pared celular de pelo radical.

Líneas transgénicas transformadas con las diferentes construcciones fusionada con la proteína roja fluorescente tdTomato: *p35S::SS-TOM-cortaEXT*, *p35S::SS-TOM-largaEXT*, *p35S::SS-TOM*, y *p35S::TOM* fueron crecidas en un medio MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C) durante 10 días. Estas líneas fueron generadas y cedidas por la Dra. Margaret Brigham Fleming (Departamento de Biología – Universidad del estado de Colorado). Se procedió con la obtención de imágenes en un microscopio confocal ZEISS LSM5 Pascal. Se utilizó la siguiente configuración: longitud de onda del láser utilizado: 543nm, objetivo 40X (inmersión en agua), NA= 1.2. Para distinguir la fluorescencia proveniente del apoplasto y de la pared celular con respecto a la señal de la membrana plasmática y del citoplasma se realizó plasmólisis de las células con una solución de manitol al 8%.

Para la cuantificación de la fluorescencia de las líneas *p35S::SS-TOM-largaEXT* y *p35S::SS-TOM*, luego del tratamiento correspondiente con 75 µM de SHAM, se procedió a la obtención de imágenes en un microscopio confocal ZEISS LSM5 Pascal. Se utilizó la siguiente configuración: longitud de onda del láser utilizado: 543nm, objetivo 40X

(inmersión en agua), $NA= 1.2$. La intensidad del láser, el PMT, la apertura del *pinhole* y la ganancia se mantuvieron constantes durante todo el experimento. Para distinguir la fluorescencia proveniente del apoplasto y de la pared celular con respecto a la señal de la membrana plasmática y del citoplasma se realizó plasmólisis de las células con una solución de manitol al 8%. El análisis cuantitativo de la señal de fluorescencia se realizó mediante el programa *ImageJ*. Se trazó una línea siguiendo la línea de la pared celular (Fig. 4M) en el ápice del pelo radical y se realizó una media de las intensidades de fluorescencia de todos los píxeles incluidos en la línea.

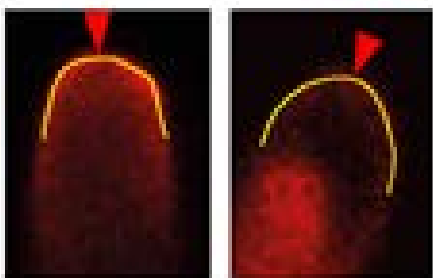


Figura 5M: Medición de la señal de TOMATO en la pared celular. En la imagen se ejemplifica mediante una línea amarilla el lugar donde se realizó la media de la intensidad de fluorescencia. La flecha roja indica la pared celular en el ápice del pelo radical.

21. Ensayo de GUS.

Plantas transgénicas Wt/pARF5::GUS, Wt/pNAC1::NAC1-GUS y plantas Wt Col-0 crecidas durante 5 días MS 0,5X (*Sigma*) 0.8% de agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 y luz continua, fueron incubadas con una solución de GUS (100 mM NaPO₄ pH7.0, EDTA 10 mM, Triton X-100 0.1%, K₃Fe(CN)₆ 1 mM, X-Gluc 2 mM) durante 16 hs a 37°C y luego fueron lavadas con una solución de 70% de etanol. Las imágenes se obtuvieron de raíces enteras utilizando un microscopio Zeiss Imager A2 con un objetivo de 10X.

22. Dockings de un péptido tipo EXT en sitios putativos de unión a PER44.

El *docking* se realizó por medio de Autodock Vina 1.1.2 (Trott y Olson, Hess et al., 2008) y se llevó a cabo en dos etapas: primero, una etapa exploratoria en toda la superficie y luego una segunda etapa de *docking* localizado y más exhaustivo, que se hizo sobre una pequeña región de la proteína que resultaron ser los mejores *docking* de la primera etapa. Todos los enlaces giratorios se ajustaron como giratorios y el paso de energía se estableció en 4. Como control positivo, se realizó el mismo conjunto de simulaciones para una peroxidasa de *Vitis vinifera* (GvEP1) (donde se determinó que entrecruza EXTs) aunque sin detalles sobre su estado de glicosilación (Jackson, Galinha et al. 2001). Todos los sustratos se acoplaron con un modelo por homología de AtPER44 realizado mediante Modeller. Con el objetivo de evaluar la capacidad que presenta AtPER44 de discriminar el sustrato de acuerdo con el estado de modificaciones postraduccionales que presente el mismo, se realizaron varias ejecuciones de *docking*

con sustratos alternativos: hidroxilado pero no glicosilado (N Gly-SOOOO) siendo O=hidroxiprolina, solamente arabinosilado (Gly-S(Δ Gal)OOOO) y completamente glicosilado (arabinosilado y galactosilado) (Gly-SOOOO).

23. Modelado por homología de CEP1 e interacción con péptidos de EXTs.

Se realizó un modelo por homología, mediante el programa Modeller, de CEP1 usando la secuencia de la misma depositada en TAIR10. Se utilizaron como molde las estructuras cristalográficas de una cisteína endopeptidasa de *Ricino communis* y una cisteína proteasa de *Ambrosia artemisiifolia* (pDBs 1S4V y 5EF4 respectivamente). Una vez obtenido el modelo estructural, se realizaron las corridas de *docking* en dos etapas. Una primera exploratoria sobre toda la superficie y, luego, una segunda etapa de *docking* localizado que se realizó sobre una región de la proteína donde se obtuvieron los mejores *dockings* de la primera etapa (por energía y densidad de resultados sobre la zona). Todos los enlaces giratorios se ajustaron como giratorios, la exhaustividad con valor de 8 y el paso de energía se estableció en 4. Los resultados obtenidos muestran una energía de interacción más fuerte (más negativa) para los péptidos no glicosilados que para los glicosilados.

Tabla 1M: Líneas de mutantes insercionales utilizadas.

Gen	AGI	Nombre	Código	Referencias
RSL2	<i>At3g33880</i>	<i>rsl2-1</i>	SAIL_514_C04	(Yi, Menand et al. 2010)
RSL4	<i>At1g27740</i>	<i>rsl4-1</i>	GT_5_105706	(Yi, Menand et al. 2010)
PER1	<i>At1g05240</i>	<i>per1-1</i>	SALK_108152	Esta tesis
		<i>per1-2</i>	SALK_103597	Esta tesis
PER2	<i>At1g05250</i>	<i>per2</i>	SAIL_732_A07	Esta tesis
PER8	<i>At1g34510</i>	<i>per8-1</i>	SALK_130310C	Esta tesis
PER35	<i>At3g49960</i>	<i>per35-1</i>	SALK_129866C	Esta tesis

PER44	At4g26010	<i>per44-1</i>	SALK_148663C	Esta tesis
		<i>per44-2</i>	SALK_057222C	Esta tesis
		<i>per44-3</i>	SAIL_153_609	Esta tesis
PER60	At5g22410	<i>per60-1</i>	WISCDSLOX324H06	Esta tesis
PER73	At5g67400	<i>per73-3</i>	SALK_009296	Esta tesis
		<i>per73-6</i>	SALK_010873	Esta tesis
NOXC	At5g51060	<i>noxc-1</i>	SALK_071801	(Lee, Rubio et al. 2013)
NOXH	At5g60010	<i>noxh-3</i>	SALK_136917	(Boisson-Dernier, Lituiev et al. 2013, Foley, Gleason et al. 2013)
NOXJ	At3g45810	<i>noxj-3</i>	SALK_050665	(Boisson-Dernier, Lituiev et al. 2013, Foley, Gleason et al. 2013)
CEP1	At5g50260	<i>cep1-2</i>	SALK_137016	Esta tesis
		<i>cep1-3</i>	SAIL_158_B06	(Höwing, Huesmann et al. 2014)
CEP2	At3g48340	<i>cep2-1</i>	SALK_079519	Esta tesis
		<i>cep2-2</i>	CSHET_6591	(Hierl, Höwing et al. 2014)
CEP3	At3g48350	<i>cep3-1</i>	SALK_024692	Esta tesis
		<i>cep3-2</i>	SALK_016791	Esta tesis

Tabla 2M: Primers utilizados para genotipar las líneas mutantes.

Gen	AGI	Nombre	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
RSL2	At3g33880	<i>rsl2-1</i>	AGCATTTGTTTTTCGCATCAC	TCCTCAAAGCCTCTATGCAAG
RSL4	At1g27740	<i>rsl4-1</i>	GGGTGTTTCCACAAACACTTG	CAGATGATGAGAAAGCTTCGG
NOXC	At5g51060	<i>noxc-1</i>	TCTAAGACCACGGTACCATCG	CGAGCTTAAGCGTTTGACATC
NOXH	At5g60010	<i>noxh-3</i>	AGGTCTTGCAAAATGTGTTTCG	GCCGCTAAACCTAAACCAAAC
NOXJ	At3g45810	<i>noxj-3</i>	TTCTTCCACCTTTGGTCAATG	CCAAAAGGTCAGTTGTTTCGAC
PER1	At1g05240	<i>per1-1</i>	CAAAGAATGATGCGGAAAGAG	ACGGATGAATTGAAACAAAC
		<i>per1-2</i>	AAGGCCGAAAGTCTCATTCTC	AATGCATCGTTCSSTTTCGAG
PER2	At1g05250	<i>per2</i>	GGAATTGAAGAGAAAGTGCCC	TTACCGGGCCTAAGGTGTAAG
PER8	At1g34510	<i>per8-1</i>	TTAAAAATCATCGCTTGCCAG	TGCTCGTTGCTGTATCATCTG
PER35	At3g49960	<i>per35-1</i>	TGGTTGTATCGGGAAAGACAG	AAAAAGGGCAATGCTTTTCTC
PER44	At4g26010	<i>per44-1</i>	ACTTACCCGGACCAACAATCC	AATCGACAGGTCGAGACATTG
		<i>per44-2</i>	CATTGCAGTCTCTTCCAGGAC	GCAAACCACATCTCCACTTTC
		<i>per44-3</i>	GGGGGCTTAGAATTTTCATCAC	ACACAATCCCATGGTTGATC
PER60	At5g22410	<i>per60-1</i>	TTAGATGAATTCGGTTGCCAC	TGAATCCTTGATGAATGCCTC
PER73	At5g67400	<i>per73-3</i>	TCCAAGTTGCAAAAACAAAG	CGAAAACAAAACCCAAAAAGG
		<i>per73-6</i>	AGGCGTTGATTGAATCATGAC	TAAGGGAATCGATCGCCTATC
CEP1	At5g50260	<i>cep1-2</i>	CAAAATCTTAGTTCGACGATGG	GGCTCCATTCTTTCTCCAATC
CEP2	At3g48340	<i>cep2-1</i>	TCGCCAAAAGTGCTTATTGC	TGGAGAAAGAAAGGTGCTGTC
CEP3	At3g48350	<i>cep3-1</i>	CATGCATACATGCATACATGC	TTCTTCTTGTTGGTTGGTTGG
		<i>cep3-2</i>	TTAATGAAGAGGACCCAACCC	CTTCTCTCGCCAATCAACAG

Tabla 3M: Líneas de plantas transgénicas utilizadas.

Nombre de la línea	Construcción	Background genético	Referencias
<i>HyPer</i>	35S::HyPer	Wt Col-0	(Hernandez-Barrera, Quinto et al. 2013)
pARF5::SV40-3xGFP	promotorARF5::SV40-3xGFP	Wt Col-0	(Rademacher, Möller et al. 2011)
pARF7::SV40-3xGFP	promotorARF7::SV40-3xGFP	Wt Col-0	(Rademacher, Möller et al. 2011)
pARF8::SV40-3xGFP	promotorARF8::SV40-3xGFP	Wt Col-0	(Rademacher, Möller et al. 2011)
pARF5::GUS-GFP	promotorARF5::GUS-GFP	Wt Col-0	Esta tesis
p7:ARF5^{OE}	promotorEXPANSINA7::ARF5	Wt Col-0	Esta tesis
p7:ARF7^{OE}	promotorEXPANSINA7::ARF7	Wt Col-0	Esta tesis
p7:ARF8^{OE}	promotorEXPANSINA7::ARF8	Wt Col-0	Esta tesis
PMDC7::ARF5_GFP	PMDC7::ARF5_GFP	Wt Col-0	Esta tesis
p35S::SS-TOM-cortaEXT	promotor35S::SS-TOM-cortaEXT	Wt Col-0	Dra. Margaret Fleming.
p35S::SS-TOM-largaEXT	promotor35S::SS-TOM-largaEXT	Wt Col-0	Dra. Margaret Fleming.
p35S::SS-TOM	promotor35S::SS-TOM	Wt Col-0	Dra. Margaret Fleming.
p35S::TOM	promotor35S::TOM	Wt Col-0	Dra. Margaret Fleming.
pRSL4::RSL4-GFP	promotorRSL4::RSL4-GFP	Wt Col-0	Esta tesis
p35S::PER1-GFP^{OE}	promotor35S::PER1-GFP	Wt Col-0	Esta tesis

p35S::PER44-GFP ^{OE}	promotor35S::PER44-GFP	Wt Col-0	Esta tesis
p35S::PER73-GFP ^{OE}	promotor35S::PER73-GFP	Wt Col-0	Esta tesis
pPER44::GFP	promotorPER44::GFP	Wt Col-0	Esta tesis
pCEP1::3xHA-EGFP-CEP1-KDEL	promotorCEP1:: PRE-PRO-3xHA-EGFP-CEP1-KDEL	<i>cep1-3</i>	(Höwing, Huesmann et al. 2014)
pCEP1::3xHA-EGFP-KDEL	promotorCEP1:: PRE-PRO-3xHA-EGFP-KDEL	<i>cep1-3</i>	(Höwing, Huesmann et al. 2014)
pCEP2:: 3xHA-mCherry-KDEL	promotorCEP2::PRE-PRO-3xHA-mCherry-KDEL	<i>cep2-2</i>	(Hierl, Höwing et al. 2014)
pCEP2::3xHA-mCherry -CEP2-KDEL	promotorCEP2::PRE-PRO-3xHA-mCherry-CEP2KDEL	Wt Col-0	(Hierl, Höwing et al. 2014)
pNAC1::NAC1-GUS	promotorNAC1::NAC1-GUS	Wt Col-0	(Chen, Cheng et al. 2016)

Tabla 4M: Primers utilizados para los experimentos de clonado, ChIP-PCR, RT-PCR y qPCR

Propósito	Nombre	Secuencia (5' to 3')
p35S::PER1-GFP ^{OE}	attB1 PER1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGATCAA GAACATTCTCGC
	attB2 PER1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTTAGGGAAGGC GCATCTCTTCC
p35S::PER44-GFP ^{OE}	attB1 PER44-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGGTCAATC ACAGCTTTGTT
	attB2 PER73-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTTGTTGAAGACT CTGCAGTTTC
p35S::PER73-GFP ^{OE}	attB1 PER73-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGCGGTTCC AGTCTGGTTGT
	attB2 PER44-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTTAAAGGCACC ACAGTCACGACGA
pPER44::GFP	attB1promPER44-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAAAGCAAGTCAT CTCTGCATACTATTTTCG
	attB2promPER44-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTCGTATGATGAGCTCTCCCTTCCCTCTCC
ARF5	A5Pacl-F	AACATTAATTAATCTCTCTGTATGATGGCTTC

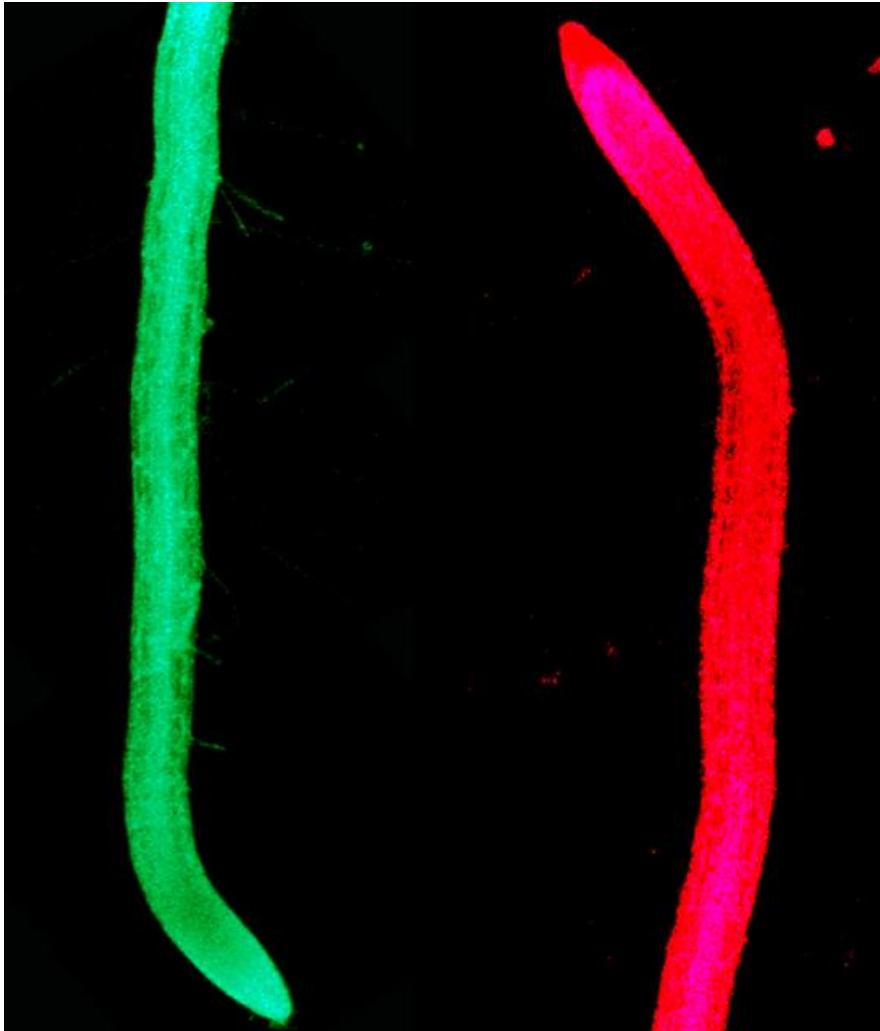
	A5SgsI-R	TACAGGCGCGCCGTTTCTCCTCTACCAGTTGG
	A5SgsI-R(sin stop)	TTTGCGCGCCATGAAACAGAAGTCTTAAG
ARF7	A7KpnI-F	TTATGGTACCGAGAAAGTAAAGTTGAGTGATCATG
	A7AvrII-R	TTATCCTAGGTGTGAGAGAACTCTTCTGC
	A7MluI-R(sin stop)	TATAACGCGTGACCGTTAAACGAAGTGGCTGAG
ARF8	A8PacI-F	AAGTTTAATTAACATGAAGCTGTCAACATCT
	A8SgsI-R	GAATGGCGCGCCAAGATGAGTGGAAACGA
pRSL4 & RSL4	ProR4HindIII-F	GGAAGCTTCAAGTATATAACAAAAGAATG
	ProR4BamHI-R	ACGTGGATCCCTCTAACTGATCAAC
	R4XmaI-F	TCAGCCCGGGCGATGGACGTTTTTGTGAT
	R4AvrII-R	TAACTTGTAAGTCTCCTAGGCATAAGCCGA
pMDC7-ARFs-GFP	attB1-ARF5-1F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTATGATGGCTTCA TTGTCT
	attB1-ARF7-1F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAAGCTCCT TCATCA
	attB2-GFP-720R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACTTGTACAGC TCGTCC
ChIP-pRSL4	Frag-1F	CTTTTCACATGCCATAACTAG
	Frag-1R	GGTATTGTAGTTGTATACTTGTATGTA
	Frag-2F	TCTTCCCTTCTAGTGTTGTATGG
	Frag-2R	AGCTCATTTTAAACACAAAATGTTAC
	Frag-3F	ACAGCTGTATGTTTTTGGTATC
	Frag-3R	ACTCATTCGTAAGAGAGTGATC
	Frag-4F	TATATCATGCTGCCTCCAAA
	Frag-4R	CCATGCCGCTTTTTACCTTA
	Frag-5F	TTGCGATAATGATTCCACAA
	Frag-5R	TTTACATTGGCCACACAAGAG
	Frag-6F	GAGATGAATGGATAGTTATAAATAAGAAT
	Frag-6R	GATGAACACGATCAGTCAAC
	Frag-7F	TGGCTTCGTTTCACTTATTT
	Frag-7R	AGAGATCAAGAGATTCTTAAACTG
	Frag-8F	AAATCTTCTTGAGAAATATTCTCT
	Frag-8R	TTCTTGAAGTGTGCAACTATAT
	Frag-9F	ATTCTTGGGATCAAAGTCATCACC
	Frag-9R	GTAAACATTATATATTGGATCTTCCAC
	RBOHC ChIP4-F	AAGTTCATTAGTAAAACCGAC
	RBOHC ChIP4-R	CTACAATACCAAATTTTCATTCAAT
ChIP-pPER3	PER3 ChIP1-F	AAGTCAATGAAATATCACTTTTTTCA
	PER3 ChIP1-R	ATTTCTCTATATATTTCGCGTGATA
	PER3 ChIP2-F	TTCGTACTCTCCTACTAAAAAAA
	PER3 ChIP2-R	TAAATATTTGAGACTTACGAGGAT
	PER3 ChIP3-F	TTTCAACAAGAACTAGCCGTA
	PER3 ChIP3-R	CTATTGACTTTGGAGAAGATGTA
	PER3 ChIP4-F	ATATGAAAAAAGTACTAGTCCTAA
	PER3 ChIP4-R	AAGAAATGAGATTAGGACTTTC

ChIP- pPER44	PER44 ChIP1-F	AGCTTTTTCTTAATTGAATAAGTTTAAG
	PER44 ChIP1-R	ATGTAAAACTACAAATATGGAATGATT
	PER44 ChIP2-F	GACATAGACGTGGTATCCTTT
	PER44 ChIP2-R	ATTGACATTTGACGGGTTAGAG
	PER44 ChIP3-F	AATCTATCGTGGCTAGTGTTG
	PER44 ChIP3-R	CTACACAACCATTCAAAACATTG
ChIP- pPER60	PER60 ChIP1-F	ATTGTTGATTCAAACCCTAATTAGA
	PER60 ChIP1-R	AATCAGTAGTATTCTCTTTTTTTTTGT
	PER60 ChIP2-F	TAATGTTTACAAGTCCTTATCACTT
	PER60 ChIP2-R	ACTGGCTCAACATAGGGATTAT
	PER60 ChIP3-F	TTTTATTATAAAATAGAACCAGCCC
	PER60 ChIP3-R	TAGAAAAATTGTTAACAACCTTTATAGTGT
	PER60 ChIP4-F	AAAACATCGTATCTAAAGTTGTTGG
	PER60 ChIP4-R	ATACAACAAATTAAGATCAATATTTATTTTC
ChIP- pPER73	PER73 ChIP1-F	TCACGGCCTTCTGAAATTCT
	PER73 ChIP1-R	AAAAAAGTTAAGGGACGTTTGATAAAAT
	PER73 ChIP2-F	AAAATAAAATGATTCAAAAACCTACATCAA
	PER73 ChIP2-R	TAAAAGGGTCTTTATGAGCAAC
	PER73 ChIP3-F	AACGCTTAAATATGTCATATTCTTTTA
	PER73 ChIP3-R	AAATGGAAGTTATCAATAAAATGATAG
	PER73 ChIP4-F	AATGTTGAACAAATCGTGAAAAAAGT
	PER73 ChIP4-R	TATTTATACATACCAACCAAAATTTTTAA
qRT-PCR	RSL4-qF842	GTGCCAAACGGGACAAAAGT
	RSL4-qR1097	TTGTGATGGAACCCCATGTC
	ARF5-qRT-F	TGAACAGCGCAGGCATTAAC
	ARF5-qRT-R	TACAGGCGCGCCGTTTCTCCTCTACCAGTTGG
	ARF7-qRT-F	CGGAGTTCTTGACAGCTGCAG
	ARF7-qRT-R	CACCAGCAGCTGACTCATCC
	ARF8-qRT-F	GATCATGGAGAAGGCAGTGG
	ARF8-qRT-R	GAATGGCGCGCCAAGATGAGTGGAAACGA
	ACT7-qRT-F	TCCCTCAGCACCTTCCAACAG
	ACT7-qRT-R	CAATTCCTCTCAACTAGGG
	PER44 qRT-F	AGGCGAAGTTCTTGTCGAATG
	PER44 qRT-R	TGTGCTTACTCCCTTCTTAACCT
	PP2A qRT-F	TCCGAGATCATATGTTCCAAACTC
	PP2A qRT-R	CCGTATCATGTTCTCCACAACCG
RT-PCR	PER1 RT-F	GAAAGAGACGCTGTCCCCAA
	PER1 RT-R	CTGAGCCACGACCTTGAAGT
	PER44 RT-F	CTTGCTCCTTCTGCTTTGGC
	PER44 RT-R	CTCACGCTTGCATTTGGTCC
	PER73 RT-F	AGAGGACATGATCGCTCTTTCAGC
	PER73 RT-R	CGTCTAGTCTTAACGCCAACGC,
	PP2A RT-F	GTCGACCAAGCGGTTGTGGAGA
	PP2A RT-R	ACGCCCAACGAACAAATCACAGA
	CEP1 RT-F	AAACCAAGGCCAATGCGGGAGTTG

	CEP1 RT-R	TTCCGCATCTCCCGGTAAACACTC
	CEP2 RT-F	CCGGTTCCAACATCAAGCATCAC
	CEP2 RT-R	AGATCCGTAAACACTCCCTCTG
Promotor ARF5	ProARF5-SIF	TTAAGTCGACATATATCTTAGTGACAAACGCG
	ProARF5-KpR	TTAAGGTACCACAGAGAGATTTTTCAATG
GUS	GUS-PcF	ATATTTAATTAATGTTACGTCCTGTAGA
	GUS-AvR	ATATCCTAGGACGGTGGCGATGGATCTTTGTTTGCCTCCCTGCTG CG
GFP	GFP-AvF	ATATCCTAGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	GFP-AcR	AAGGCGCGCCATTACTTGTACAGCTCGTCC

Capítulo 1

Caracterización de las Peroxidasas clase III (PER_{III}) involucradas la homeóstasis de ROS y su interrelación con Extensinas (EXTs).



Capítulo 1: Caracterización de las Peroxidasas clase III (PER_{III}) involucradas la homeóstasis de ROS y su interrelación con Extensinas (EXTs).

Resultados

1. Homeostasis de ROS en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*.

1.1 Inhibición farmacológica de las PER_{III} mediante el uso de SHAM.

Las PER_{III} son enzimas que se caracterizan por presentar un grupo hemo y ser secretadas al espacio extracelular donde llevan a cabo tres ciclos enzimáticos diferentes, llamados ciclo peroxidativo, ciclo hidroxílico y ciclo oxidativo. Durante el ciclo peroxidativo, las PER_{III} usan H₂O₂ como agente oxidante para producir radicales libres en componentes fenólicos y glicoproteínas estructurales que pueden, en forma subsecuente forman enlaces covalente estables rigidizando la pared celular y limitando el crecimiento. Contrariamente, las PER_{III} pueden causar la relajación de la pared celular mediante su ciclo hidroxílico, en el cual el H₂O₂ y el O₂ apoplástico es convertido por las PER_{III} en radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$, que producen clivajes de polisacáridos en una forma no enzimática (Dunand et al., 2007) y un relajamiento general de la pared celular. Además, en su ciclo oxidativo, las PER_{III} generan radicales super-óxido (O₂⁻) a partir de la reducción de oxígeno singlete $^1\text{O}_2$ que puede ser dismutado a H₂O₂, ya sea espontaneamente o enzimaticamente mediante la actividad de las SODs (Fig. 9I.D). Por lo tanto, las PER_{III} pueden cumplir roles contrapuestos en la expansión celular, siendo capaces de causar tanto el relajamiento como la rigidización de la pared celular dependiendo de las condiciones de crecimiento. Además, modulan los niveles de ROS tanto positiva como negativamente.

Para determinar el rol de las de PER_{III} en el crecimiento del pelo radical, se utilizó el inhibidor farmacológico SHAM (*N*,2-Dihydroxybenzamide o ácido salicilhidroxilamínico) en el medio de crecimiento de las plántulas. SHAM se une en la cavidad hemo distal de las peroxidasas e interactúa con el sitio de unión del sustrato al grupo hemo, actuando como un inhibidor competitivo (Ikeda-Saito, Shelley et al. 1991, Davey and Fenna 1996). Por otra parte, SHAM ha sido utilizado en numeroso estudios para inhibir a las PER_{III} tanto en raíces como en pelos radicales (Kwasniewski and Szarejko 2006, Dunand, Crèvecoeur et al. 2007, Benfey, Bennett et al. 2010, Kwon,

Sparks et al. 2015). Se utilizaron concentraciones crecientes del inhibidor SHAM en el medio de crecimiento de las plántulas y se observó un efecto dosis dependiente: a medida que se aumenta la concentración del SHAM se inhibe en mayor proporción el crecimiento del pelo radical (Fig. 1R. A,D). Se calculó la concentración inhibitoria 50 para SHAM ($IC_{50 \text{ crecimiento}}=65 \mu\text{M}$) la cual indica la concentración del inhibidor a la cual la longitud de los pelos radicales se reduce al 50 %.

También se evaluó el efecto de la inhibición de PER_{III} en la homeostasis de $_{cit}ROS$ en el pelo radical (Fig. 1R.B,D). Se observó una drástica disminución de ROS también de forma dosis dependiente. En este caso el $IC_{50 ROS}$: $68 \mu\text{M}$. Para la medición de $_{cit}ROS$ se utilizó la sonda 2',7'-Dichlorofluoresceína-diacetato ($H_2DCF\text{-DA}$) permeable a las membranas celulares. Una vez en el interior celular, los grupos acetatos son disociados por parte de las esterasas intracelulares, imposibilitando su salida de la célula. En contacto con ROS intracelular la sonda se oxida y en consecuencia, la molécula H_2DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente (Winterbourn 2014). Esta última puede ser excitada con la longitud de onda de 488nm y emite en el rango de 517–527nm (ver detalles en la sección 7 de materiales y métodos). Es importante remarcar que la oxidación de la sonda es irreversible, por lo que sólo se puede medir la cantidad oxidada a tiempo final. La sonda no es radiométrica y no es posible determinar la cantidad de sonda que ingresa a la célula, por lo que se deben realizar muchas repeticiones del ensayo para obtener resultados consistentes y reproducibles.

Por otra parte, con el uso de SHAM también se vió comprometido el crecimiento de la raíz principal (Fig 1R. C,D). Esto es así, porque SHAM estaría inhibiendo las PER_{III} involucradas en la elongación de la raíz (Passardi, Tognolli et al. 2006, Benfey, Bennett et al. 2010). Por lo tanto, al inhibir las PER_{III} se observó una disminución en la longitud del pelo radical y en los niveles de $_{cit}ROS$. Los valores obtenidos para de $IC_{50 \text{ crecimiento}}$ e $IC_{50 ROS}$ fueron muy similares (Fig 1R. A,B), indicando que existiría una correlación lineal entre ambos proceso ($ROS \longleftrightarrow \text{crecimiento polarizado del pelo radical}$). Estos resultados indicaron que las PER_{III} contribuyen en gran medida al “pool” de $_{cit}ROS$ necesario para mantener el crecimiento polarizado de los pelos radicales. La manera en la cual PER_{III} pueden contribuir a este “pool” de ROS es mediante la producción de anión O_2^- que es convertido H_2O_2 (ya sea espontáneamente o mediante la actividad de las SODs) y luego transportado al citoplasma. De esta manera, al inhibir la actividad de las PER_{III} se detendría el mecanismo de retroalimentación positiva entre Ca^{2+} -ROS indispensable para crecimiento polarizado del pelo radical (Cardenas 2009).

Las PER_{III} también producen ROS es a través de su ciclo hidroxílico, entonces al no producirse el ROS necesario para la relajación de la pared celular, se detiene el crecimiento. Las PER_{III} también son capaces de consumir ROS (específicamente H_2O_2), a través de su ciclo peroxidativo, para producir *crosslinking* en componentes fenólicos y glicoproteínas estructurales de la pared celular. Es posible que el conjunto de funciones

que las PER_{III} llevan a cabo estén finamente coordinadas y esta coordinación sea necesarias para la correcta elongación celular del pelo radical. Por lo tanto, al inhibir su actividad, se interrumpe esa coordinación y el efecto global que se produce es una marcada reducción de ROS y el consecuente cese de la elongación celular. Futuros experimentos son necesarios para dilucidar estos mecanismos.

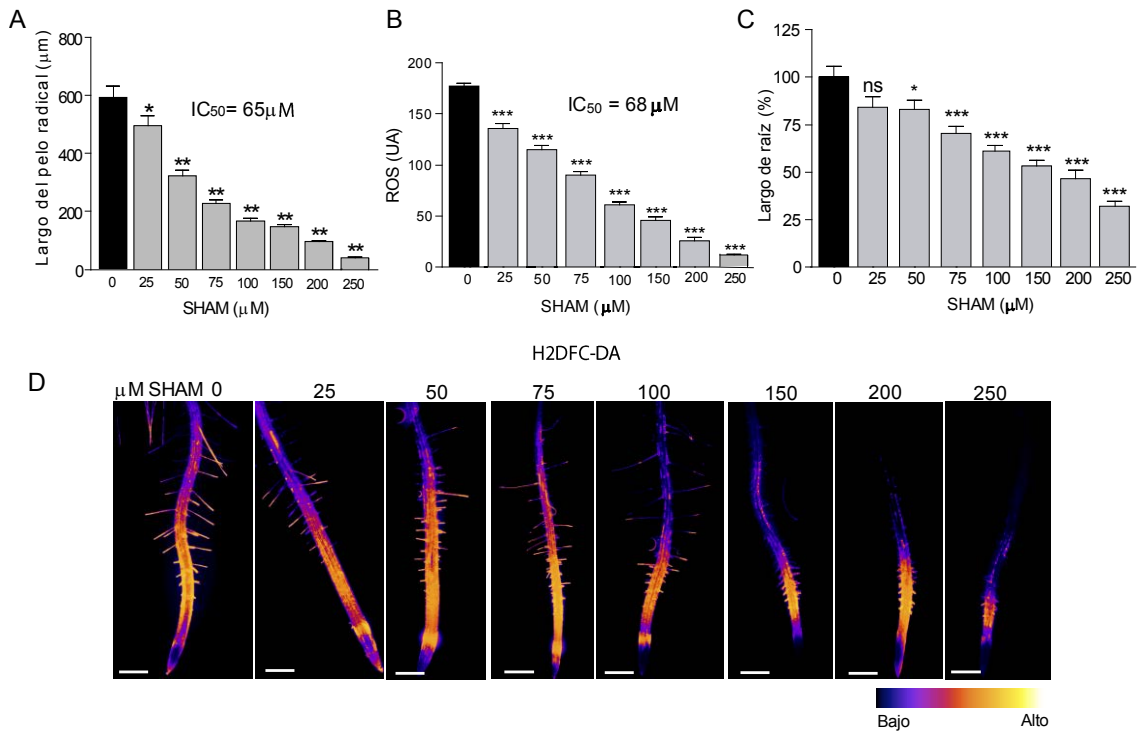


Figura 1R. Efecto de la inhibición farmacológica de PER_{III} en el pelo radical **A)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical (media ± SEM, n= 30) y **B)** Niveles promedio de *cit*ROS, (media ± SD, n= 200) generados por la oxidación de H₂DCF-DA, expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) en pelos radicales de raíces Wt Col-0 expuestas a concentraciones crecientes de SHAM (0-250 µM). **C)** Efecto de SHAM en la raíz: Promedio del largo de raíces Wt Col-0 expuestas a concentraciones crecientes de SHAM (media ± SEM n= 12). P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001 ns: diferencias no significativas. **D)** Fotos de raíces Wt Col-0 tratadas con concentraciones crecientes de SHAM. Los niveles de *cit*ROS están representados en escala de colores *Fire*. Barra de escala: 700 µm

1.2 Producción de H₂O₂ por parte de las PER_{III}.

Si bien la sonda H₂DCF-DA es ampliamente utilizada para detectar ROS intracelular, es sensible a múltiples tipos de ROS así como a especies reactivas de nitrógeno (Crow 1997). Para sortear este inconveniente y determinar cómo SHAM afecta específicamente a los niveles de H₂O₂ citoplasmáticos (*cit*H₂O₂) se utilizaron plantas que expresan de manera constitutiva el biosensor *HyPer* (por *hydrogen peroxide*) en el citoplasma celular (Tabla 3M). Este sensor está conformado por una proteína fluorescente permutada circularmente (cpYFP) insertada en el dominio OxyR-RD de

E. coli. Este último se oxida en presencia de H_2O_2 y convierte en la forma oxidada, como consecuencia se produce un cambio conformacional en la cpYFP cambiando su máximo de absorción (ver detalles en la sección 9D de materiales y métodos). Es importante destacar que este biosensor es reversible y permite realizar mediciones radiométricas, por lo que su lectura es independiente de la cantidad de proteína expresada.

Para realizar las mediciones en pelos radicales se utilizó un microscopio confocal. Se adquirió la señal emitida (máximo de excitación de *HyPer*: 516 nm) excitando al biosensor secuencialmente con los láseres de longitud de onda de 405nm y 488nm cada 6,25 segundos. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de la relación entre la señal obtenida cuando se ilumina la muestra con el láser 488nm sobre la obtenida cuando se la ilumina con el láser 405 (H_2O_2 488/405 UA). También, se representaron mediante la herramienta colorimétrica *kymograph* (ver sección 8 de materiales y métodos) que demuestra las variaciones de los niveles de $_{cit}H_2O_2$ en la zona del ápice del pelo radical a través del tiempo.

Como primera medida, se corroboró la funcionalidad del biosensor en pelos radicales, agregando H_2O_2 extracelular ($1\mu M$). Como se muestra en la Fig. 2R.A, el agregado H_2O_2 afectó drásticamente los niveles de $_{cit}H_2O_2$ *in vivo*. Esto se ve reflejado mediante el aumento de la relación H_2O_2 488/405 UA del biosensor *HyPer* (Fig.2R.A) (Ver sección 9D de materiales y métodos).

Para determinar si las PER_{III} estarían involucradas en la producción de H_2O_2 necesario para el crecimiento del pelo radical se midieron los niveles de $_{cit}H_2O_2$ en plántulas Wt Col-0 transformadas con *HyPer*. Las plántulas fueron crecidas durante siete días en medio suplementado con $75\mu M$ de SHAM y en medio sin suplementar (control). El resultado indicó que los niveles de $_{cit}H_2O_2$ fueron menores en pelos radicales de plantas crecidas en medio suplementado con $75\mu M$ de SHAM con respecto al control (Fig. 2R.B). En este análisis, también se observó drástica disminución en los niveles de $_{cit}H_2O_2$ a lo largo toda la raíz en las plántulas crecidas en medio suplementado con $75\mu M$ de SHAM con respecto al control (Fig.2R.C).

En base a los resultados obtenidos, es posible afirmar que al inhibir la actividad enzimática de las PER_{III} , los niveles de $_{cit}H_2O_2$ se vieron rotundamente disminuidos. Esto confirma los resultados previos que sugieren que los niveles de $_{cit}ROS$ son mantenidos en gran medida por la producción de anión O_2^- producido por parte de las PER_{III} (sumado al aporte de las NOXs) en el apoplasto celular, su posterior transformación a H_2O_2 (ya sea enzimáticamente o medida por las SOD) y el transporte de este último hacia el citoplasma. De esta manera, se confirma que las PER_{III} tienen un rol fundamental en la homeostasis de ROS indispensable para mantener activo el crecimiento polarizado de los pelos radicales, contribuyendo al “pool” de $_{cit}ROS$ principalmente mediante la generación de H_2O_2 .

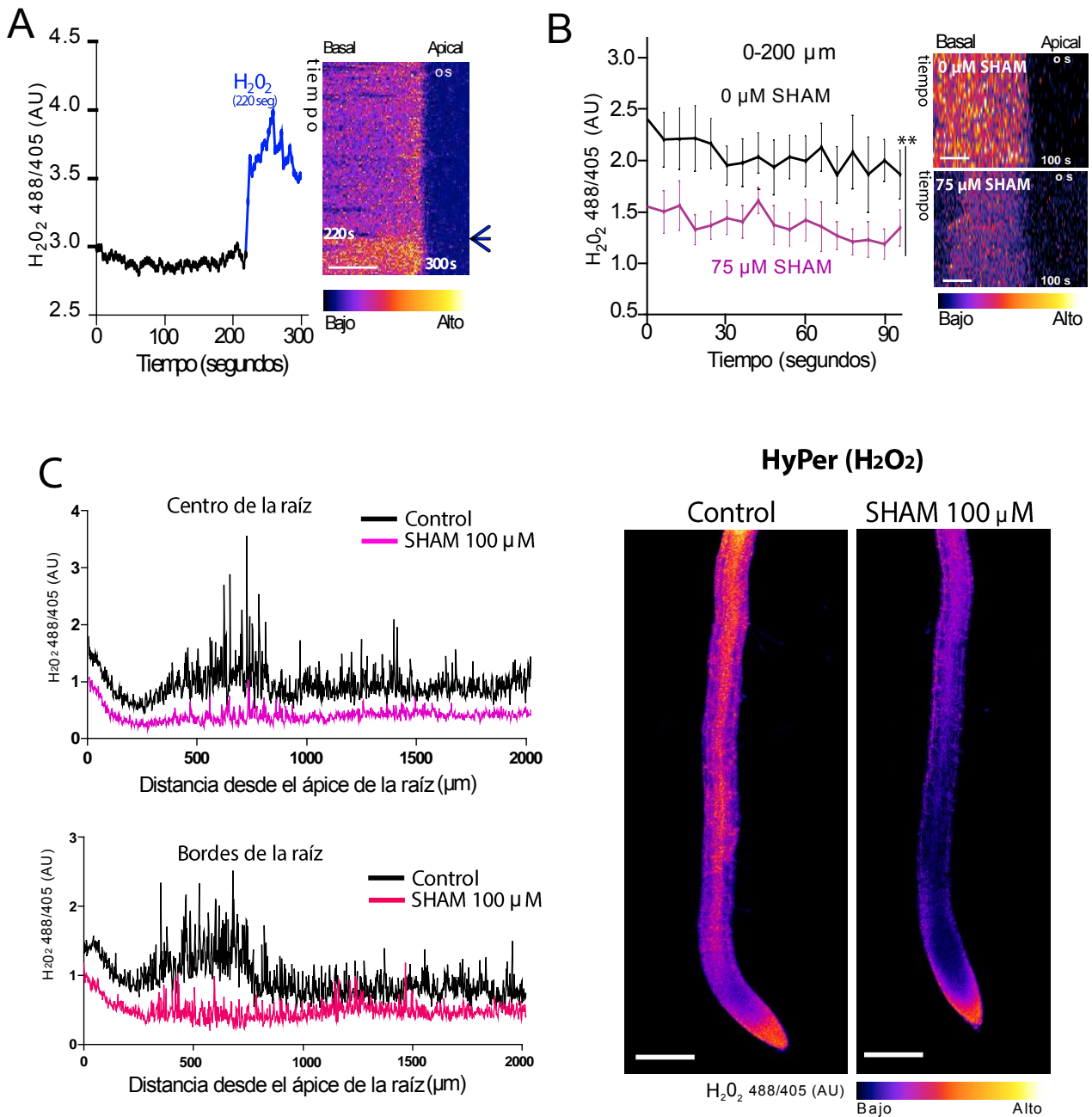


Figura 2R: Efecto de SHAM en los niveles de $_{cit}H_2O_2$ medidos con el biosensor *HyPer*: A) Niveles de $_{cit}H_2O_2$ en un pelo radical Wt Col-0 que expresa el biosensor *HyPer* tratado con H_2O_2 extracelular (1 μ M). A la derecha el *kymograph* correspondiente, la flecha indica el momento en el que se agregó H_2O_2 . Barra de escala: 5 μ m. B) Niveles promedio de $_{cit}H_2O_2$ de pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biosensor *HyPer* medidos en condiciones control y tratadas con 75 μ M de SHAM. (n=10) durante 100 segundos. P-valor de la prueba de ANOVA () $P < 0.01$. A la derecha se muestran los *kymographs* correspondientes. Barra de escala: 5 μ m. C) Niveles promedio de $_{cit}H_2O_2$ a lo largo de la raíz medido tanto en el centro (arriba) y en los bordes (abajo) de la misma en condiciones control y tratadas con 75 μ M de SHAM. (n=10). A la derecha la imagen correspondiente. Barra de escala =400 μ m. Los niveles de $_{cit}H_2O_2$, expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia= UA, están basados en la relación de la emisión del biosensor cuando se lo excita a 488/405nm. Fire, la escala de color utilizada.**

1.3 Las PER_{III} contribuyen la generación ROS producido por las NADPH oxidasas necesarias para la elongación celular.

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que las PER_{III} producen ROS, necesario para la elongación del pelo radical. Sin embargo, está reportado que las principales enzimas que contribuyen a la homeostasis de ROS en el apoplasto celular son las Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas (NADPH oxidasas, NOXs) también conocidas como RBOHs (por *Respiratory Burst Oxidase Homolog*). Estas enzimas están localizadas en la membrana plasmáticas y catalizan la producción de anión superóxido (O_2^-), transfiriendo electrones desde el dador citoplasmático NADPH a una molécula de Oxígeno (O_2). El O_2^- es convertido mayoritariamente en H_2O_2 ya sea química o enzimáticamente.

Las NOXs están involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, en la respuesta al estrés y en la traducción de señales (Marino, Dunand et al. 2012). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas 10 NOXs (NOXA-NOXJ) las cuales han sido involucradas en la producción de ROS asociado a numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo. Algunos ejemplos son las NOXD y NOXF, ambas involucradas en el cierre de los estomas inducido por el ácido absísico (Kwak, Mori et al. 2003) y en la defensa de la planta a patógenos (Torres, Dangl et al. 2002). La NOXF está implicada en la formación de las bandas de Caspari en la endodermis de la raíz (Lee, Rubio et al. 2013). Las NOXH y NOXJ son requeridas para el apropiado crecimiento del tubo polínico (Kaya, Nakajima et al. 2014, Lassig, Gutermuth et al. 2014) mientras que la NOXC (también conocida como RHD2 por *Root Hair Defective 2*) es fundamental para el desarrollo y crecimiento polarizado del pelo radical (Takeda, Gapper et al. 2008). En este caso, la NOXC se encarga de mantener de los niveles de ROS necesarios para la expansión celular del pelo radical por lo que la mutante *nox*c presenta pelos radicales muy cortos debido a la deficiencia en la producción de ROS (Takeda, Gapper et al. 2008). En nuestro laboratorio se demostró que además de la NOXC, las NOXH y NOXJ serían las tres NOXs más relevantes en la regulación del crecimiento polarizado de los pelos radicales (Mangano, Juárez et al. 2016).

Para determinar si, además de las NOXs, las PER_{III} contribuyen a la generación del ROS necesario para el normal desarrollo del pelo radical, se realizó un ensayo de inhibición farmacológica de ambos grupos de proteínas. Se utilizaron SHAM como inhibidor específico de PER_{III} y VAS2870 (3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl) thio-1,2,3-triazolo [4,5-d]) para inhibir a las NOXs. Estudios previos muestran que este compuesto interfiere con la asociación de las NOXs a sus proteínas complementarias, las cuales son requeridas para su función (Altenhöfer, Kleikers et al. 2012). Se utilizó la concentración del inhibidor a la cual la longitud de los pelos radicales se redujo al 50 %: $IC_{50\text{ vas}}=7,5\mu\text{M}$ (Mangano, Juárez et al. 2016). En este ensayo, plántulas crecidas durante 3 días fueron sometidas a los siguientes tratamientos: $7,5\mu\text{M}$ VAS2870; $75\mu\text{M}$ SHAM; $7,5\mu\text{M}$ VAS2870

más 75µM SHAM. Las plántulas crecieron durante 4 días en el medio suplementado con los inhibidores correspondientes a cada tratamiento. Se realizaron las mediciones de largo de pelo radical y de niveles de $_{cit}ROS$ utilizando la sonda H₂DCF-DA.

Cuando las plantas fueron crecidas en medio suplementado con 7,5µM VAS2870 se ve una marcada disminución, aunque no total, tanto en el largo del pelo como en los niveles de $_{cit}ROS$. Esto es así porque existirían otras proteínas además de las NOXs encargadas de producción ROS necesario para la elongación celular. En el tratamiento con 75µM SHAM se observa también una marcada disminución de largo del pelo radical y de la cantidad de $_{cit}ROS$ (Fig. 3R.A,B). Cuando las plantas fueron tratadas con 7,5µM VAS2870 más 75µM SHAM el efecto en la disminución de $_{cit}ROS$ y en el largo del pelo radical fué aún mayor que en aquellas plantas tratadas con cada uno de los inhibidores por separado (Fig. 3R.A,B) Esto se debe a que, tanto las NOXs como las PER_{III} son las encargadas de producir el ROS necesario para el correcto desarrollo del pelo radical. Cabe destacar que estos resultados también demostraron, que ambos tipos de enzimas no estarían involucradas en la iniciación del pelo radical, ya que, al estar ambos grupos de proteínas inhibidas (con SHAM más VAS2870), la etapa de iniciación del pelo radical se produjo normalmente. Sólo se vió comprometida la etapa de elongación celular.

Para corroborar estos resultados se utilizaron líneas mutantes insercionales de T-ADN *nox-1* y doble mutante *noxh-1 noxj-2* (ver tabla 1M) en medio suplementado con 75µM SHAM y sin suplementar como control. En este caso, también se detectó una drástica disminución tanto la longitud del pelo y como en los niveles de $_{cit}ROS$ con respecto al control (Fig.3R.C,D). Todos estos resultados estarían indicando nuevamente que tanto las PER_{III} como las NOXs (específicamente las NOXC, NOXH y NOXJ) son las enzimas responsables de mantener la homeostasis de ROS necesaria para mantener activa la expansión celular del pelo radical. Las NOXs catalizan la producción de anión O₂⁻, transfiriendo electrones a través de la membrana plasmática desde el dador citoplasmático NADPH a una molécula de Oxígeno (O₂) vía Adenina Flavin Dinucleótido (FAD) (Canton and Grinstein 2014). Las PER_{III} también son capaces de producir O₂⁻, siempre que se encuentre presente un agente reductor fuerte apropiado como el NADPH (Dunand, Crèvecoeur et al. 2007).

Como el anión O₂⁻, es una molécula poco estable e incapaz de difundir a través de las membranas celulares, es rápidamente convertida en H₂O₂ de manera espontánea o mediante la intervención de las enzimas SODs. El H₂O₂ es considerado un segundo mensajero ya que es una molécula estable (vida media aproximada: 1ms) y puede moverse a través de las membranas vía acuaporinas. El H₂O₂ reacciona selectivamente con residuos de Cisteína de proteínas de señalización como por ejemplo peroxirredoxinas y tiorredoxinas (Paulsen and Carroll 2009). También, con receptores del tipo quinasas ricos en Cisteínas (CRKs, *Cys-rich receptor-like kinases*, (Chen 2001). Debido a la reactividad de la molécula, los niveles de H₂O₂ están regulados con gran precisión mediante sistemas antioxidantes.

En base a los conceptos discutidos anteriormente se concluye que existe una conexión bien establecida entre la formación de ROS en el espacio apoplástico y el desarrollo del pelo radical, así como en muchos otros procesos fisiológicos y del desarrollo vegetal (Joo, Bae et al. 2001, Foreman, Demidchik et al. 2003, Liskay, van der Zalm et al. 2004, Shin and Schachtman 2004, Gapper and Dolan 2006). En la mayoría de los casos, las NOXs parecen tener un rol protagónico en la formación de ROS (Mittler, Vanderauwera et al. 2004). Sin embargo, con los resultados obtenidos en esta tesis, es posible afirmar que las PER_{III} también cumplen un rol fundamental en la formación de ROS necesario para el normal desarrollo del pelo radical.

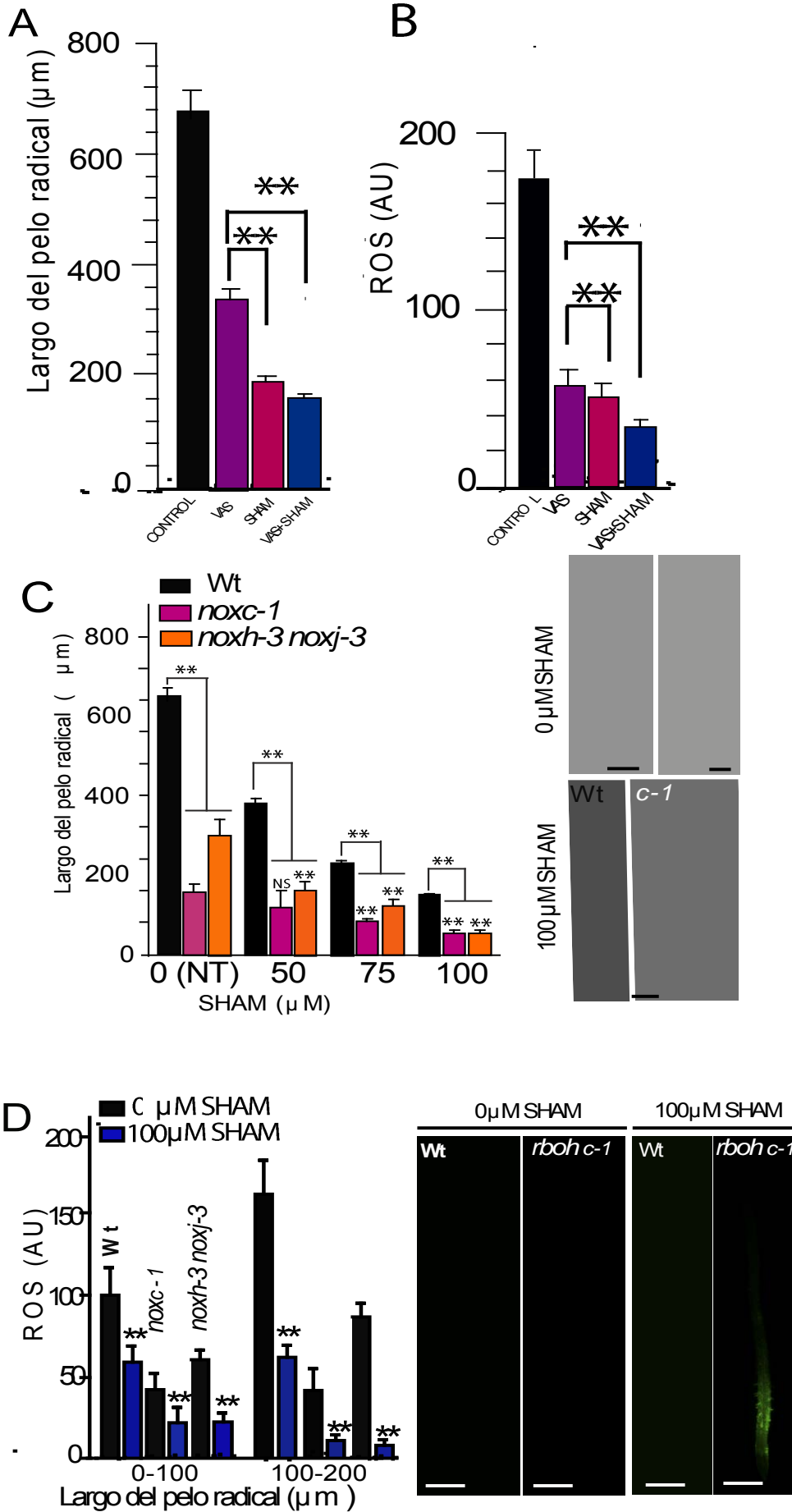


Figura 3R. Efecto de la inhibición farmacológica de PER_{III} y NOXs en el pelo radical **A)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical (media \pm SEM, n= 30) y **B)** Niveles promedio de *cit*ROS, (media \pm SD, n= 200) generados por la oxidación de H₂DCF-DA, expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) en pelos radicales de raíces Wt Col-0 expuestos a los tratamientos: 7,5 μ M VAS; 75 μ M SHAM; 7,5 μ M VAS + 75 μ M SHAM y sin tratar como control. **C)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de raíces Wt Col-0 y de líneas mutantes de T-ADN *nox-1* y *nox-3 noxj-3* (media \pm SEM, n= 30) expuestos a concentraciones crecientes de SHAM (0-100 μ M). y **D)** Niveles promedio de *cit*ROS, (media \pm SD, n= 200) generados por la oxidación de H₂DCF-DA, expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) en pelos radicales de raíces Wt Col-0 y de líneas mutantes de T-ADN *nox-1* y *nox-3 noxj-3* tratados con 100 μ M de SHAM (media \pm SEM n= 12) P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001 NS: diferencias no significativas. Barra de escala: 700 μ m

2. Identificación de las PER_{III} involucradas en la elongación del pelo radical.

Para determinar cuáles son específicamente las PER_{III} involucradas en la homeostasis de ROS que es esencial para crecimiento del pelo radicular se realizó un análisis de co-expresión *in-silico* (ver sección 11 de materiales y métodos). Para ello se utilizaron genes de pared celular conocidos, importantes para el desarrollo del pelo radical como carnada. Entre ellos, genes de expansinas *EXP7* y *EXP18* (Cho and Cosgrove 2002), proteínas ricas en prolina (PRP por *Prolin-rich repeat protein*) *PRP1* y *PRP3* (Fowler, Bernhardt et al. 1999, Bernhardt and Tierney 2000) y *Leucine-Rich Repeat/Extensin LRX1* y *LRX2* (Baumberger, Ringli et al. 2001, Baumberger, Steiner et al. 2003). En la red identificadora de genes, se pudieron detectar varias PER_{III} altamente co-expresadas con los genes carnada (Fig. 4R.A) y que no habían sido asociadas previamente con el desarrollo del pelo radical. También, se detectaron varios genes de EXTs que presentaban el motivo de entrecruzamiento Tyr-X-Tyr (Tabla 1R). Este motivo, les permitiría a las EXTs formar uniones intermoleculares entre ellas mediante la acción de PER_{III} (Held et al., 2004; Cannon et al., 2008) formando así, una red en la pared celular de los pelos radicales (Cannon et al., 2008; Ringli, 2010; Lampion et al., 2011). Además, varias de ellas (EXT7, EXT11, EXT14, EXT16 y EXT18) demostraron ser cruciales para el correcto crecimiento del pelo radical (Velasquez, Ricardi et al. 2011). También se identificó al FT RSL4 (At1g27740), que es un regulador maestro del crecimiento del pelo radical (Yi, Menand et al. 2010, Datta, Prescott et al. 2015), ya que controla la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas requeridas para la morfogénesis del pelo radical (Marzol, Borassi et al. 2017). Consistentemente, estas mismas PER_{III} fueron identificadas a través genómica funcional en células tricoblásticas (Birnbaum, Shasha et al. 2003, Brady, Orlando et al. 2007, Deal and Henikoff 2010). Por lo tanto, gracias a estos dos enfoques, fue posible identificar a las PER_{III} que parecieran ser importantes para el desarrollo radical: PER1, PER2, PER8, PER44, PER60 y PER73.

Por otro lado, mediante el análisis de bases de datos como *EFP Browser Toronto* se observó que las PER_{III} detectadas en la red, se expresaban en abundancia en las raíces

y en protoplastos de pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó la herramienta de visualización “absoluta” (*Absolute mode*) en donde el nivel de expresión del gen en cada tejido es directamente comparable con la señal más alta obtenida del propio gen. Bajos niveles de expresión se denotan en amarillo y altos niveles de expresión, en rojo (Winter, Vinegar et al. 2007) (Fig.4R. B).

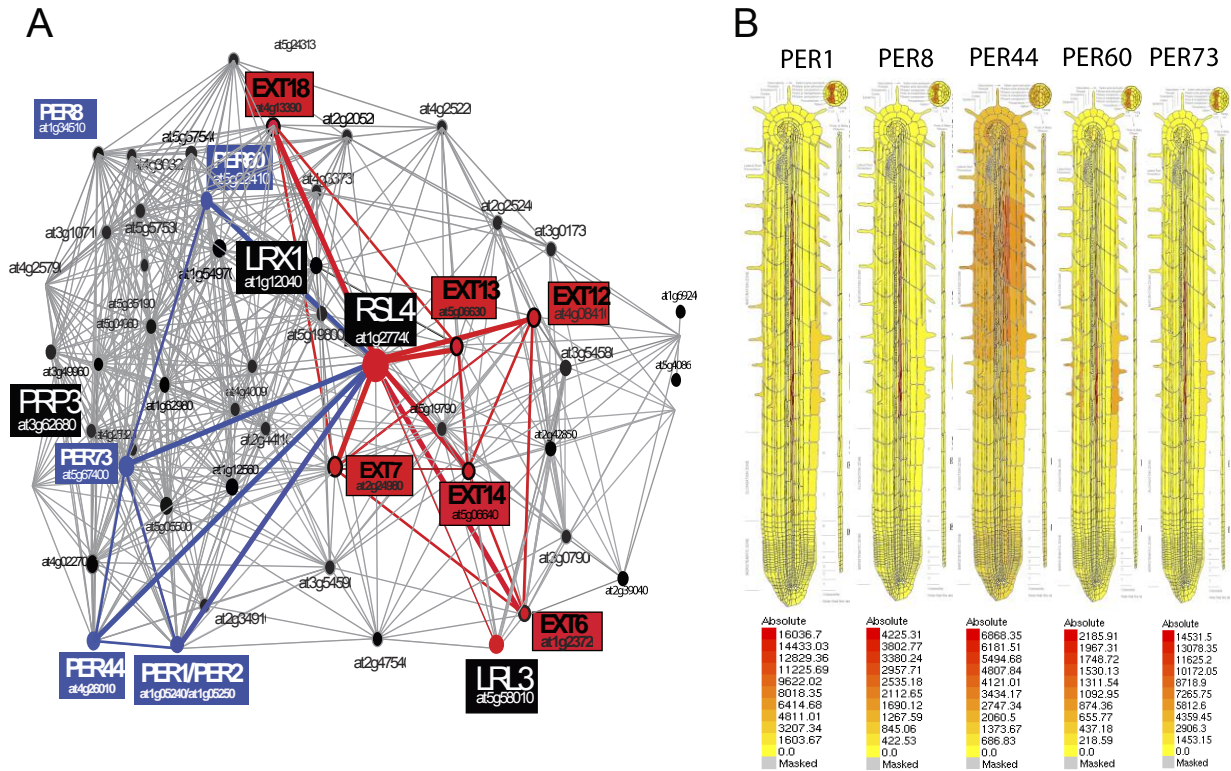


Figura 4R: Identificación de PER_{III} específicas de pelo radical. A) Red de co-expresión transcripcional de PER_{III} y otros genes relacionados a la pared celular, importantes para el desarrollo del pelo radical como las EXTs. El FT RSL4 es un regulador central del crecimiento del pelo radical (Yi, Menand et al. 2010) (círculo rojo no delineado). Los valores de co-expresión están basados en el coeficiente de Pearson, en el grafico se muestran los valores con una correlación positiva cuyo $r^2 = 0,7$ a $1,0$. **B)** Patrón de expresión de PER1, PER8, PER35, PER60, PER73 en la raíz de *Arabidopsis thaliana* basado en la herramienta *Arabidopsis EFP Browser*. Representado en valores absolutos. Bajos niveles se colorean en amarillo y altos niveles en rojo. Estas PER_{III} son abundantes en protoplastos de pelo radical.

Número AGI, EXT	Repetición predominante
Tipo IIa	
At4g13390 EXT18	SPPPPYVVS
Tipo IIb	
At1g23720 EXT6	SPPPPYVYSSPPPPYYSPPKVVYK
At2g24980 EXT7	SPPPPYVYSSPPPPYYSPPKVVYK
At3g54580 EXT10	SPPPPYVYSSPPPPYYSPPKVVYK
At4g08400 EXT11	SPPPPYVYSSPPPPYYSPPKVVYK
At4g08410 EXT12	SPPPPYVYSSPPPPYYSPPKVVYK
At5g06630 EXT13	SPPPPYVYSSPPPPYYSPPKVVYK
Tipo Extensina	
At5g05500 MOP10	YTPPPPPPTTAYPA
At4g26750 EXT-like	VPPPPSSY
LRR-Extensina	
At4g13340 LRX3	SPPPPPPPPPPPVYSSPPPPPPPPPVYS
At1g12040 LRX1	SPPPPYVVS
At1g62440 LRX2	SPPPPYVVS

Tabla 1R: EXTs identificadas en la red de co-expresión. Se resaltan los dominios con Tyr con potencial para su entrecruzamiento (Menand, Yi et al. 2007).

3. Expresión de PER_{III} en pelo radical.

Para corroborar que PER44 se expresa en el pelo radical, se fusionó la región promotora, 2000pb río arriba de sitio de inicio de la transcripción, del gen *PER44* al reportero GFP (proteína fluorescente verde). La línea reportera resultante pPER44::GFP (ver tabla 2M) fue observada con un microscopio confocal (ver sección 17 de materiales y métodos). Como se muestra en la Fig. 5R.A, PER44 se expresa en las células epidérmicas tricoblásticas y no se expresa en células epidérmicas atricoblásticas ni en otras regiones de la raíz. También se observó su expresión en pelos radicales durante todos los estadios del desarrollo del mismo. Mediante un análisis cuantitativo de los niveles de expresión de GFP, utilizando esta línea reportera (ver detalles en la sección 17 de materiales y métodos) se pudo discriminar la existencia de una expresión diferencial durante el desarrollo del pelo radical, siendo menor en los últimos estadios de crecimiento (Fig. 5R.B,C). Estos resultados indican que PER44 se expresa específicamente en células tricoblásticas, que luego van a dar lugar a pelos radicales y

que además es esencial para el desarrollo de los mismos ya que su expresión decae cuando cesa el crecimiento máximo alcanzado.

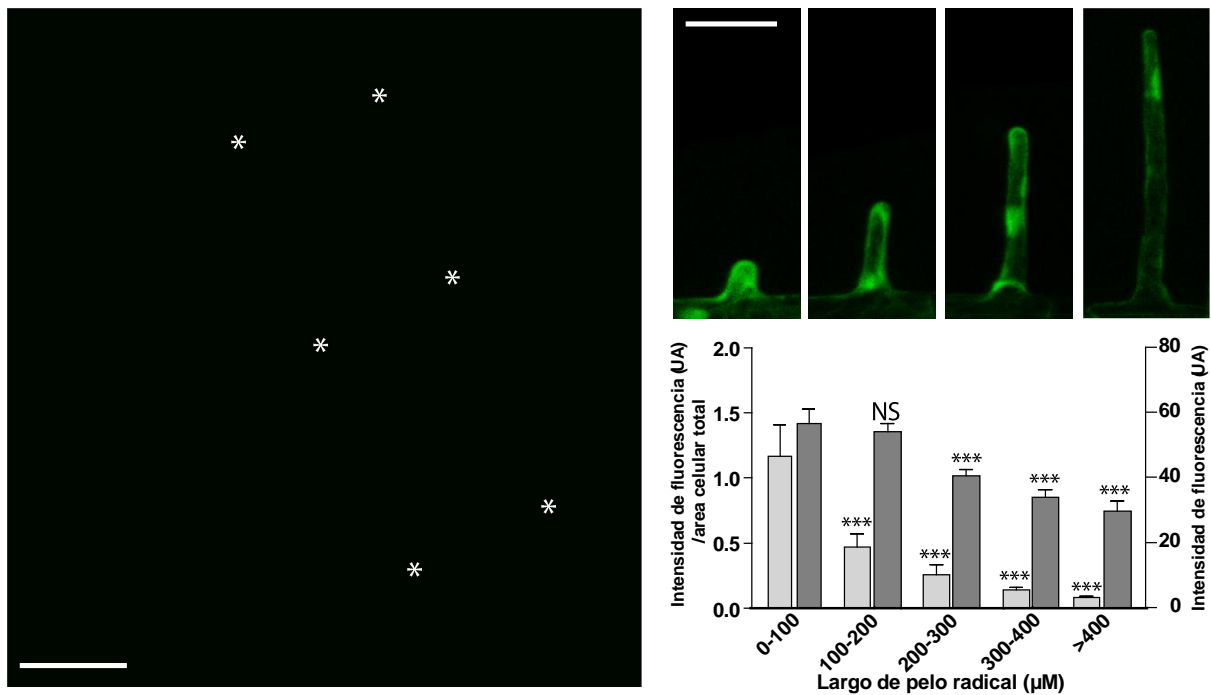


Figura 5R: Expresión del reportero de promotor de *PER44* A) en células epidérmicas tricoblásticas, no se expresa *PER44* en atricoblastos, denotados con asteriscos (*) **B)** Expresión del reportero de promotor de *PER44* en distintos estadios de crecimiento del pelo radical. Barra de escala: 200 μm **C)** Cuantificación de la fluorescencia de GFP expresadas en unidades arbitrarias (UA) en distintos estadios de crecimiento del pelo radical. Los asteriscos representan el P-valor de la prueba One-way ANOVA, (***) $P < 0.001$, NS: diferencias no significativas.

4. Análisis de líneas mutantes insercionales de T-ADN de los genes que codifican para *PER_{III}*.

Basándose en los resultados anteriores, se decidió estudiar a las *PER_{III}* específicas de pelo radical. Para este propósito se analizaron mutantes insercionales de T-ADN de los genes *PER1*, *PER2*, *PER8*, *PER44*, *PER60* y *PER73*. Fueron analizadas más de una mutante insercional para cada gen (ver tabla 1M) con la finalidad de determinar el rol de cada una de ellas en el crecimiento polarizado. Estos mutantes se generaron mediante la inserción al azar en alguna región del gen, de una secuencia de transposón (T-ADN), lo que genera una interrupción del gen en cuestión. Se comprobó la presencia de la inserción y que esta estuviese en estado de homocigosis (ver sección 2 de materiales y métodos).

Como primera medida, se procedió a medir la longitud de pelo radical (Fig. 6R.A). Los mutantes *per1-2*; *per44-2*; *per44-3* y *per73-3* y *per73-6* presentaron una reducción en la longitud del pelo radical con respecto al control Wt Col-0. Luego, se llevó a cabo una PCR semi-cuantitativa (RT-PCR) de todas las mutantes insercionales correspondiente a los genes *PER1*, *PER44* y *PER73*, para determinar los niveles de transcritos correspondiente a cada *PER_{III}* del gen afectado, en cada línea mutante insercional (ver sección 10 de materiales y métodos). Los *primers* utilizados se encuentran listados en la tabla 4M. Para *per44-2* y *per73-3* y *per73-6* no se detectaron niveles de transcritos, por lo que se consideran mutantes nulos. Para el caso de *per1-2*, *per44-1* y *per44-3*, en cambio, sí se observó la presencia de transcritos, aunque los niveles fueron mucho menores que los niveles WT. Esto indicó que la inserción del T-ADN logró un efecto *knock-down* en los niveles de transcripción del gen. La línea *per1-2* no presentó diferencias en los niveles de transcritos con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 6R. B). De tal manera, la falta o reducción de los niveles de transcritos (lo que provocaría una deficiencia de la proteína en cuestión) se asigna como la causa del fenotipo observado.

Luego, se seleccionaron las líneas mutantes que presentaron una reducción más drástica en el largo del pelo radical: *per1-2*; *per44-2* y *per73-3* y se procedió a evaluar la cantidad de *cit*ROS usando la sonda fluorescente H₂DCF-DA. En este caso, todas las líneas mutantes de T-ADN de *PER_{III}* analizadas, presentaron una disminución de hasta el 30% en la cantidad de *cit*ROS en el pelo radical con respecto al control Wt Col-0 (Fig.6R. C).

Con la finalidad de determinar si *PER44*, *PER1* y *PER73* son las *PER_{III}* más importantes para el desarrollo del pelo radical, se generaron múltiples mutantes mediante cruzamientos (ver sección 4 de los materiales y métodos) y se obtuvieron las líneas dobles mutantes *per1-2 per44-2*; *per1-2 per73-3*; *per44-2 per73-3* y la línea triple mutante *per1-2 per44-2 per73-3* (Tabla 1M). Se llevaron a cabo las mediciones de longitud de pelo radical y de los niveles de *cit*ROS. Las líneas dobles mutantes *per1-2 per44-2*; *per1-2 per73-3*; *per44-2 per73-3* y la línea triple mutante *per1-2 per44-2 per73-3* presentaron pelos radicales más cortos y menores niveles de *cit*ROS (hasta el 30%) con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 6R.D). Sin embargo, ninguna de las líneas múltiples mutantes presentó diferencias, tanto en el largo de pelo (Fig. 6R.C), como en la cantidad de ROS (Fig. 6R.E), superiores a las que presentaron las mutantes simples con respecto al control Wt Col-0. Esta ausencia de fenotipos aditivos en las cruces con respecto a las mutantes simples demostró la existencia de algún mecanismo compensatorio en la producción de ROS necesario para la elongación celular. Es posible que se aumente la actividad del resto de las *PER_{III}* presentes en el pelo radical. Esto también explica porque el uso del inhibidor farmacológico SHAM (que bloquea la actividad de todas las *PER_{III}*) produjo efectos más drásticos tanto en el fenotipo como en la producción de ROS (Fig. 1R).

Como estrategia alternativa, se evaluó la sobre-expresión de PER1; PER44 y PER73 generando las líneas transgénicas PER1^{OE}, PER44^{OE} y PER73^{OE} (Tabla 4 M). Estas líneas consisten en la proteína PER correspondiente, fusionada al reportero GFP bajo el control del promotor fuerte 35S del virus del mosaico del tabaco. Ninguna de estas líneas sobre-expresantes presentó diferencias significativas en la longitud de pelo radical con respecto al control Wt Col-0 (dato no mostrado). De todas formas, es necesario una caracterización más detallada de las mismas para poder sacar conclusiones precisas.

Por otro lado, se midió actividad peroxidasa a extractos proteicos de raíces de las líneas mutantes *per1-2*; *per44-2* y *per73-3* y línea PER44^{OE} y de plantas Wt Col-0 tratadas con concentraciones crecientes de SHAM. Se usó guayacol/H₂O₂ como sustrato (ver detalles en sección 12 de materiales y métodos). Se observó una reducción significativa de la actividad peroxidasa en las líneas mutantes *per1-2*; *per44-2* y *per73-3* con respecto al control Wt Col-0 mientras que la línea PER44^{OE} presentó una mayor actividad (aunque leve) con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 6R.H). Las raíces Wt Col-0 tratadas con 75 µM de SHAM y 100 µM de SHAM también presentaron una leve disminución en la actividad peroxidasa con respecto al control sin tratar, mientras que, las plantas tratadas con 1mM de SHAM presentaron una disminución drástica en la actividad peroxidasa con respecto al control sin tratar (Fig.6R.H). Estos resultados muestran la existencia de una asociación directa entre la actividad peroxidasa, la homeostasis de ROS y el crecimiento de los pelos radicales.

El análisis de los resultados en su conjunto, demostró que la reducción del largo del pelo radical en las líneas mutantes *per1-2*; *per44-2* y *per73-3* se debe a una deficiencia en la actividad peroxidasa y en la producción de ^{cit}ROS debida a la ausencia de las proteínas PER1, PER44 y PER73 respectivamente. Si bien se observó un aumento en la actividad peroxidasa en la línea PER44^{OE} con respecto al control, aunque no presentó diferencias en el fenotipo, podría deberse a que el aumento en la actividad peroxidasa no es suficiente para generar cambios en la longitud del pelo radical. De esta manera, se concluye que la actividad de las PER1, PER44 y PER73 en el pelo radical está relacionada a la expansión celular medida por ROS. Consistentemente con estos resultados, existe un estudio previos que demostraron que mutantes de los genes *PER1*, *PER73*, *PER44* y *PER57* están involucradas en el crecimiento del pelo radical, ya que presentan pelos de longitud menor al Wt Col-0 (Lan, Li et al. 2013, Kwon, Sparks et al. 2015) apoyando la hipótesis de esta tesis.

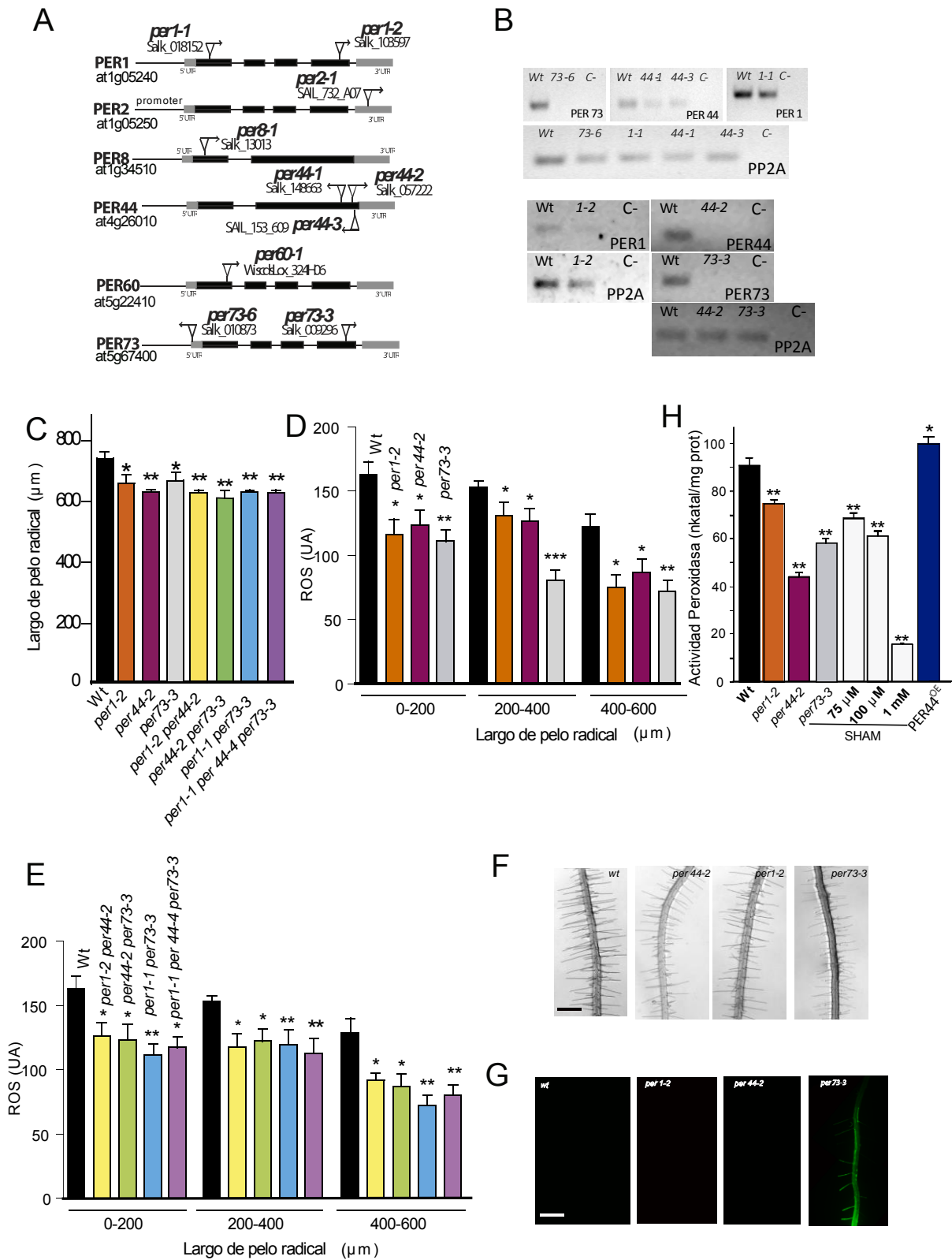


Figura 6R: Análisis de mutantes insercionales de T-ADN de PER_{III} A) Estructura de los genes que codifican para las PER_{III} identificadas mediante la red de co-expresión. Las cajas negras representan los exones y las líneas conectoras, los intrones. Se denota con un triángulo vacío el lugar de inserción del T-DNA de los

mutantes analizados. Las flechas verdes indican el sitio de unión de los *primers* utilizados para el análisis por RT-PCR. Los sitios de inserción del T-ADN son estimativos. **B)** RT-PCR de las mutantes insercionales de T-ADN de PER_{III}. Como control de carga se utilizó el gen correspondiente a la fosfatasa alcalina (PP2A). **C)** Largo promedio de pelos radicales de mutantes insercionales simples y múltiples de T-DNA de las PER_{III} comparados con Wt Col-0 (media \pm s.e.m., n=20-40). P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001. **D y E)** Niveles ROS expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) en pelos radicales medidos con H₂DCF-DA en las mutantes insercionales simples de T-ADN y **E)** en múltiples mutantes (media \pm s.e.m., n=20). P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001. Barra de escala= 600 μ m. **F y G)** Fotos de mutantes insercionales de T-ADN de PER_{III} y Wt Col-0 donde se muestra el fenotipo de pelo radical y **G)** los niveles de *cit*ROS al ser teñidas con H₂DCF-DA. Barra de escala: 600 μ m. **H)** Actividad Peroxidasa (nkatal/mg proteína) en extractos proteicos de raíces determinado con guayacol/H₂O₂ como sustrato n=3, P valor de la prueba de ANOVA, (**) P<0.01, (*) P<0.05

5. Análisis de homología de secuencias

Se llevó a cabo un alineamiento *in-silico* utilizando el *software* Mega.6 (<http://www.megasoftware.net/>) de las secuencias proteicas que de las PER_{III} involucradas en el crecimiento del pelo radical AtPER1, AtPER44, AtPER73 con y la PER_{III} pl 4.6 de *Lycopersicon esculentum* que fue demostrado que es capaz de *crosslink* EXTs *in vitro* (Chen, Dong et al. 2015). También con otras dos PER_{III} de *Arabidopsis thaliana* AtPER17 y AtPER72 las cuales están involucradas en la biosíntesis de lignina (Herrero, Fernández-Pérez et al. 2013, Cosio, Ranocha et al. 2017). El resultado mostró que las AtPER1, AtPER44, AtPER73 se encuentran más cerca filogenéticamente con pl 4.6 que AtPER17 y AtPER72 (Fig. 7R.A). Esto apoya la hipótesis de que AtPER1, AtPER44, AtPER73 *crosslink* EXTs en la pared celular como fue demostrado para pl 4.6. AtPER17 y AtPER72 estarían más lejos filogenéticamente debido a que su función es diferente. En el alineamiento también se pudo determinar que tanto los aminoácidos correspondientes al sitio activo y a los sitios de unión a Ca²⁺ proximal y distal, así como las cisteínas que forman los cuatro puentes disulfuro típicos de las PER_{III} se mantienen conservados. Solo la treonina 208 [la numeración corresponde a HRP (Veitch 2004)] perteneciente al sitio de unión a Ca²⁺ proximal varía a serina en el caso de AtPER44 y AtPER17 (Fig. 7R. B). Sin embargo, ambos aminoácidos presentan cadenas polares no cargadas, por lo tanto, esta variación no cambiaría su función. De todos modos, estos sitios clave analizados se mantienen altamente conservados entre la mayoría ortólogos y parálogos, aún en familias de plantas evolutivamente distantes (Nielsen, Indiani et al. 2001, Welinder, Justesen et al. 2002, Veitch 2004, Cosio and Dunand 2008) . Por lo tanto, debido a que la estructura y el tamaño de las PER_{III} se mantiene conservados, no existe una correlación entre la secuencia de aminoácidos y la función específica de las mismas. Diferencias en los patrones de glicosilación y de cargas en la superficie de estas proteínas podrían estar involucradas en la determinación de la especificidad de sustrato. Las características estructurales podrían indicar mecanismos de acción similares (Cosio and Dunand 2008). Se ha postulado que los glucanos pueden afectar el sitio de acceso al

sustrato debido a su gran tamaño (Douroupi, Papassideri et al. 2005, Gabaldon, Gomez-Ros et al. 2007) y afectar la dinámica de reacción debido a la amortiguación del movimiento (Nielsen, Indiani et al. 2001). Además, fue demostrado que AtPER62, y AtPER71 involucradas en la respuesta al estrés en diferentes tejidos presentan secuencias de aminoácidos similares (Tognolli, Penel et al. 2002, Welinder, Justesen et al. 2002) con los residuos importantes y característicos conservados y sin estructuras estructurales particulares. Sin embargo presentaron una distribución desigual de cargas en la superficie de AtPER62 y AtPER71 en comparación con otras PER_{III} (Douroupi, Papassideri et al. 2005). Cargas positivas se agruparon en un área, lejos del canal para la entrada de sustrato. La distribución de cargas podría desempeñar un papel esencial en la unión de las enzimas a los sitios de su actividad biológica a través de interacciones electrostáticas (Douroupi, Papassideri et al. 2005, Cosio and Dunand 2008).

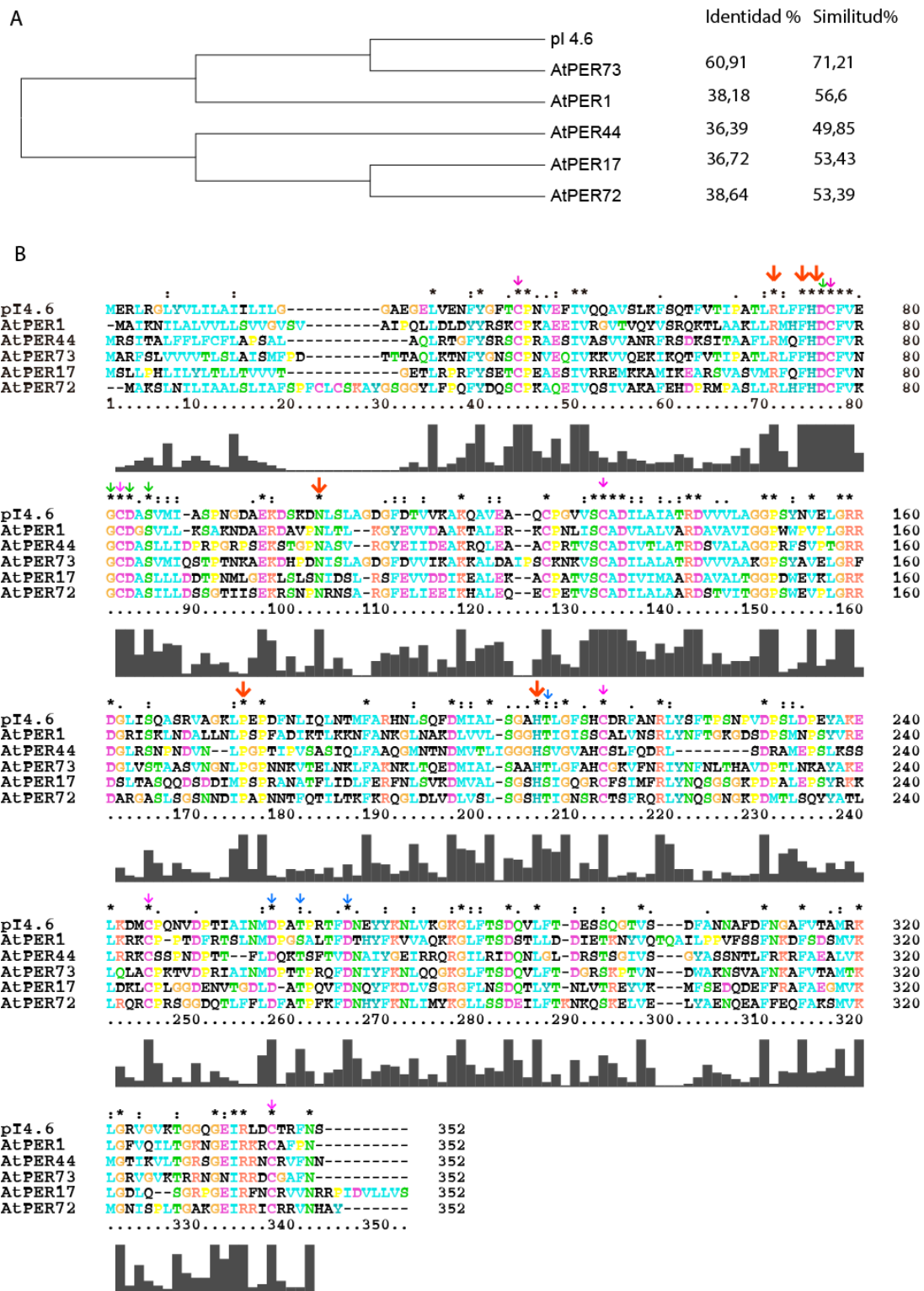


Figura 7R: Análisis de la secuencia proteica de PER_{III}. A) Árbol filogenético realizado con las secuencias proteicas de las AtPER1, AtPER44, AtPER73, AtPER17, AtPER72 con respecto pI 4.6 de *Lycopersicon esculentum*. B) Alineamiento de las secuencias proteicas de AtPER1, AtPER44, AtPER73, AtPER17, AtPER72 con respecto a pI 4.6 de *Lycopersicon esculentum*. Los aminoácidos conservados se indican con una flecha. Los correspondientes al sitio activo (roja), al sitio de unión a Ca^{2+} proximal (azul) y distal (verde). Las cisteínas que forman puentes desulfuro típicos de PER_{III} se indican con una flecha rosa.

6. Análisis mediante modelado por homología de AtPER44.

Como se demostró en resultados previos generados en nuestro grupo de investigación la red glicoproteica de EXTs es relevante en la expansión polarizada de los pelos radicales (Velásquez et al. 2011a,b; Velásquez et al. 2012). Las modificaciones post-traduccionales de las HRGPs de tipo EXTs incluyen la hidroxilación de los residuos de prolina en 4-hidroxiprolina (4Hyp), la conversión de Pro en Hyp en la vía secretoria que modifica la conformación proteica y provee de grupos hidroxilos reactivos hacia modificaciones posteriores como la *O*-glicosilación. Los azúcares incorporados por la acción de glicosiltransferasas que están involucrados en esta glicosilación incluyen a oligosacáridos de tipo arabinósidos y unidades de galactosa (Egelund et al., 2007; Gille et al., 2009; Velasquez et al., 2011a; Velasquez et al., 2011b; Velasquez et al., 2012) (Fig. 9I.A). Las EXT *O*-glicosiladas que son secretadas en la pared celular podrían formar una red covalente ordenada (Fig. 9I.B) (Brady et al., 1998; Held et al., 2004; Cannon et al., 2008). La polimerización de las EXTs estaría mediada por PER_{III} específicas de pelo radical (Schnabelrauch et al., 1996; Jackson et al., 2001; Price et al., 2003) que promoverían las uniones di-IDT y pulquerosina (trímeros de tirosinas) como fue demostrado *in vitro* e *in muro* (Fry, 1982; Brady et al., 1998; Held et al., 2004). Esta unión se da gracias a la presencia motivos Tyr-X-Tyr presentes en la secuencia de EXTs. Se demostró que *in vitro* pueden formar dímeros de Tyr llamados isoditirosinas (IDT) y que se han propuesto que estarían involucrados en uniones intermoleculares vía la formación de tetrámeros de Tyr denominados di-IDT (Schnabelrauch et al., 1996; Held et al., 2004; Cannon et al., 2008).

Para poder explicar cómo son las uniones inter- e intra-catenarias entre EXTs, con residuos Tyr físicamente cercanos unos a otros, se llevó a cabo un alineamiento lateral escalonado, como ya había sido sugerido para la EXT3 (Cannon et al., 2008) en colaboración con el Dr. Alejandro Nadra y Lic. Ariel Aptekman (FCEyN-UBA). Para el alineamiento lateral escalonado se utilizaron los primeros 25 aminoácidos de 3 péptidos de tipo EXT con un *shift* de +8/+9 que aproxima motivos pulquerosina y motivos di-isoditirosinas (di IDT). También se determinó que se re-alinean parcialmente alguno de los glicomódulos Ser-(Hyp)₄ de una cadena de EXT junto con otra (Fig. 8R). Se pudo corroborar de esta manera, que los residuos Tyr del motivo Tyr-X-Tyr son factibles de producir *crosslinking* formando enlaces IDT, pulquerosina y di-IDT. Los enlaces IDT son intra-cadena, mientras que los enlaces pulquerosina y di-IDT son inter-catenarios. Como las EXTs de pelo radical poseen prácticamente el mismo motivo (SPPPPYVYSSPPPPYSPSPKVxYK)₂ repetido unas 18 a 25 veces a lo largo de su secuencia, la estructura supramolecular propuesta podría ser compuesta por varias EXTs diferentes.

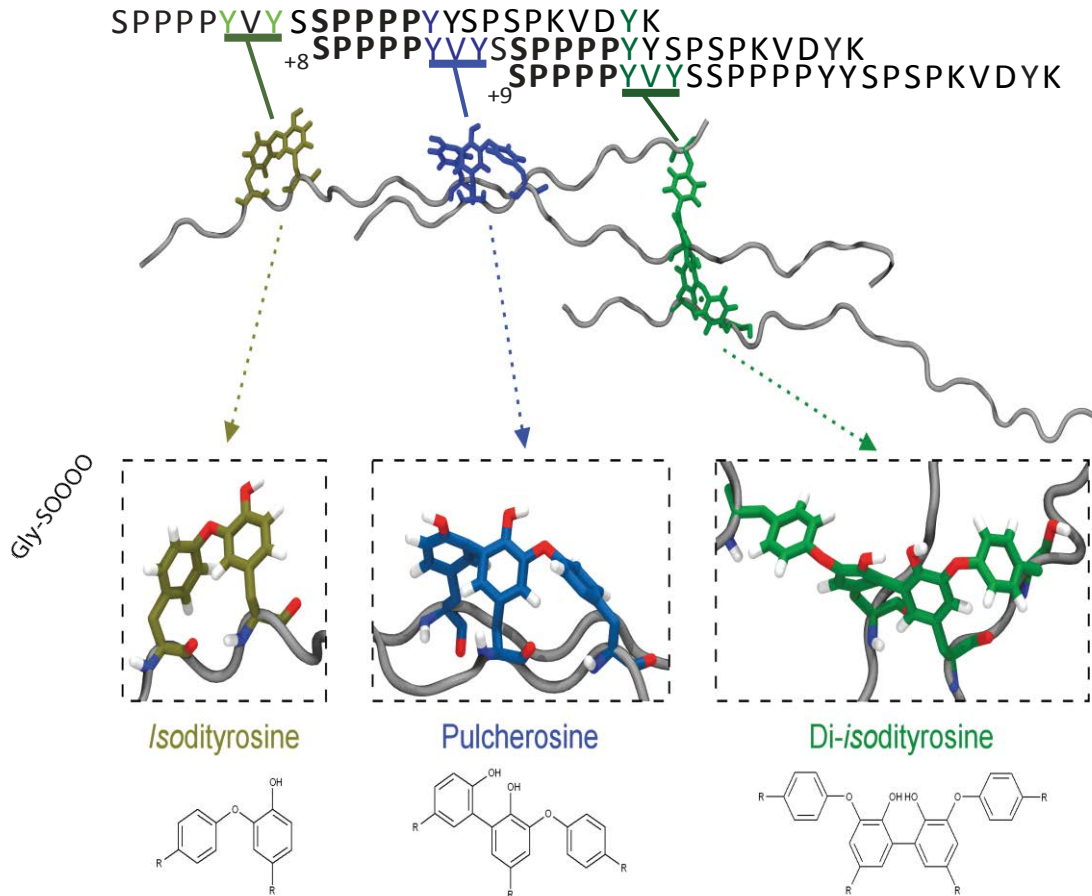


Figura 8R: Alineamiento lateral escalonado de EXTs: Alineamiento lateral escalonado en una estructura supramolecular del motivo repetitivo de EXT10. Un alineamiento lateral escalonado de los primeros 25 aminoácidos de 3 péptidos de EXT cortos con un *shift* de +8/+9 aproxima motivos pulquerosina (en azul), y motivos di-*isoditirosinas* (verde), y re-alinea parcialmente alguno de los glicomódulos Ser-(Hyp)₄ de una cadena de EXT junto con otra (en negro). Todas las secuencias mostradas se encuentran en dirección N-terminal a C-terminal. Se puede observar las unidades de *crosslinking* de Tyr como IDT: *isoditirosina* (marrón); pulquerosina (azul) y Di-IDT: Di-*Isoditirosina* (verde). Como las EXTs de pelo (EXT6, 7, 10, 12, ect.) poseen prácticamente el mismo motivo (SPPPPYVYSSPPPPYVYSSPPPKVxYK)₂ repetido unas 18 a 25 veces a lo largo de su secuencia; la estructura supramolecular propuesta podría ser compuesta por varias EXTs diferentes.

Como se planteó con anterioridad las PER_{III} serían las encargadas de realizar el *crosslinking* de las EXTs en la pared celular de los pelos radicales, promoviendo enlaces IDT, pulquerosina y di-IDT. Se demostró que no todas las PER_{III} son capaces de *crosslinkear* EXTs. En tomate, sólo dos PER_{III} han demostrado ser capaces de entrecruzar EXTs (Cooper and Varner 1984) mientras que otras PER_{III} de tomate y de otras especies no lo fueron (Brownleader, Ahmed et al. 1995). Por lo tanto, solo algunas PER_{III} *crosslinkean* EXTs y son referidas como Extensinas Peroxidasas (EP) (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996). Una de las EP que se demostró que entrecruzan EXTs *in vitro* e *in situ* fue la GvP1 de *Vitis vinifera* (Jackson, Galinha et al. 2001). Por otro lado, se demostró en esta tesis que AtPER44 (así como AtPER1, AtPER60 y AtPER73) tiene un rol fundamental en la homeostasis de ROS en pelo radical. También se determinó que

AtPER44 se expresa específicamente en células tricoblásticas, que luego van a dar lugar a pelos radicales y que es esencial para el desarrollo de los mismos ya que su expresión decae cuando cesa el crecimiento máximo alcanzado (Fig. 5R).

Por este motivo, se decidió utilizar herramientas de modelado molecular por homología y *docking* para testear la factibilidad de una posible interacción entre péptidos de tipo EXTs y AtPER44. Estos resultados se hicieron en colaboración con el Dr. Alejandro Nadra y Lic. Ariel Aptekman (FCEyN-UBA). Para ello, se realizó un modelado por homología de PER44 de *Arabidopsis thaliana* (AtPER44), utilizando como molde a GvP1 de *Vitis vinifera* (ver sección 22 de materiales y métodos). En la Fig. 9R. A se muestra el modelo de cinta de PER44. Por otro lado, mediante una representación de superficie (Fig. 9R.B) se muestra una posible interacción de AtPER44 con una EXT completamente O-glicosilada. Además, el grupo hemo está localizado en un canal abierto dentro de la estructura de la enzima lo que permite el acercamiento con los residuos Tyr del sustrato EXT (Fig. 9R.C). Por otro lado, mediante *docking* se compararon las energías de interacción de cada una de estas PER_{III} (AtPER44 y GvP1) con péptidos cortos de EXTs con distintos grados de modificaciones postraduccionales: sin modificaciones postraduccionales (SPPPP), hidroxilado pero no glicosilado (N Gly-SOOOO) siendo O=hidroxyprolina, solamente arabinosilado (Gly-S(Δ Gal)OOOO) y completamente glicosilado (arabinosilado y galactosilado) (Gly-SOOOO). En todos los casos, las energías de interacción obtenidos por *docking* fueron similares para ambas PER_{III}, lo que podría sugerir que AtPER44 sería capaz de *crosslinkear* a EXTs en la pared celular. Las interacciones fueron más favorables para péptidos no glicosilados (sin hidroxilar e hidroxilados) que para los peptidos completamente glicosilados (Fig. 9R.D). Futuros experimentos son necesarios para corroborar si AtPER44 es capaz de *crosslinkear* EXTs *in vivo*. Se plantea expresar y purificar a AtPER44 en un sistema heterólogo y realizar ensayos de entrecruzamiento *in vitro* utilizando péptidos sintéticos de tipo EXTs para corroborar fehacientemente si AtPER44 es apta para *crosslinkear* EXTs. A su vez, se plantea la posibilidad de visualizar a las EXTs en la punta de los pelos radicales por microscopia de super-resolución específicamente utilizando el método STED (por *Stimulated emission depletion microscopy*) y ver si están localizadas de una manera diferente cuando se expresan en mutantes de *per44* que en el caso de células Wt Col-0.

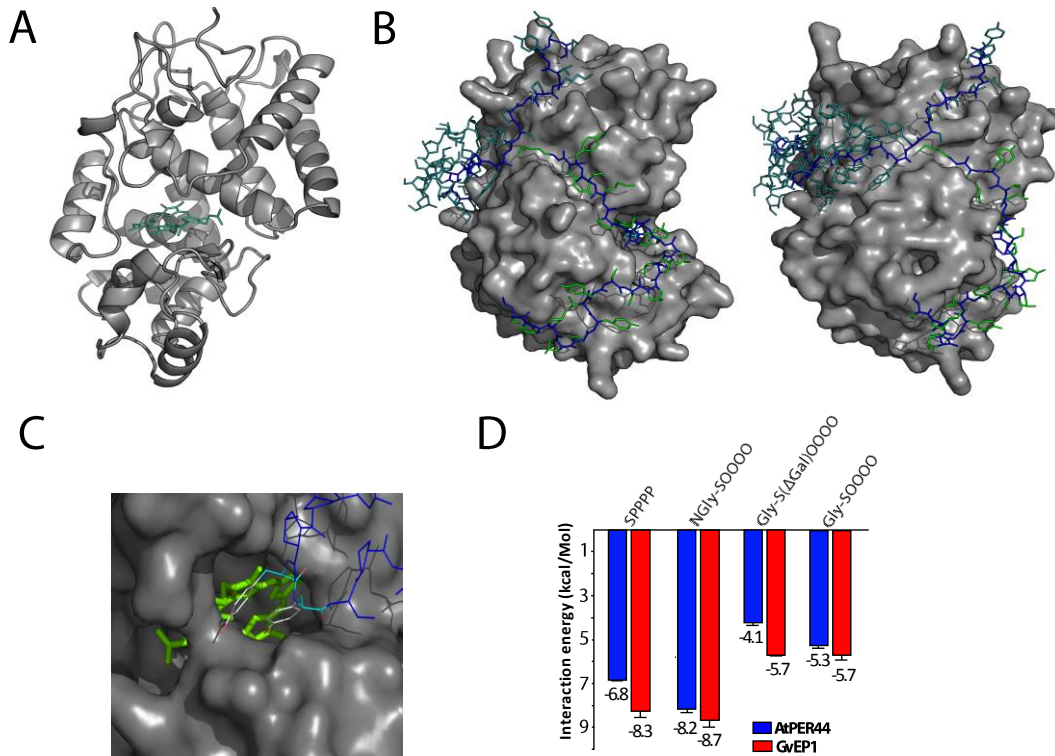


Figura 9R: Identificación y análisis de modelado de AtPER44. **A)** Modelado por homología de PER44 de *Arabidopsis thaliana* (AtPER44). Modelo de cinta de PER44 donde se resaltan el grupo hemo (en verde). **B)** Representación de superficie de PER44 y su unión al sustrato EXT completamente O-glicosilado (representado como bastones). El esqueleto peptídico se encuentra coloreado en azul y las cadenas laterales incluidos los carbohidratos en verde. **C)** Vista detallada de un péptido de EXT corto y no glicosilado unido a AtPER44. El cofactor Hemo está representado en verde y puede ser visto a través de un canal abierto. SPPPP está representado en bastones y coloreado en azul, las dos tirosinas en gris están apuntando al grupo Hemo. **D)** Valores de interacción de AtPER44 y de *Vitis vinifera* GvEP1 (utilizada como control positivo) unido a péptidos cortos de EXT: sin modificar (SPPPP), hidroxilado pero no glicosilado (NGly-SOOOO) O=hidroxyprolina, solo arabinosilado (Gly-S(ΔGal)OOOO) o completamente glicosilado arabinosilado y galactosilado (Gly-SOOOO).

7. Caracterización de proteínas con dominios tipo EXTs como sustratos del *crosslinking* mediado por PER_{III}.

Las EXTs se caracterizan por una abundancia de motivos de serina-prolina (SP_n), donde n es generalmente entre 3 y 7. Estos motivos SP_n están separados por motivos hidrofóbicos cortos de longitud variable, a menudo incluyendo los aminoácidos Tyr, Lys, His y Val (Lamport, Kieliszewski et al. 2011) (Fig. 8R.A). Las modificaciones postraduccionales estabilizan a la proteína y consisten en la hidroxilación de los residuos de prolina en 4-hidroxiprolina (4Hyp) por la acción de las prolil 4-hidroxilasas (P4Hs) en el RE (Fig. 8R.B). Esta conversión de Pro en Hyp provee de grupos hidroxilos reactivos hacia modificaciones posteriores como la O-glicosilación. Los azúcares incorporados por la acción de glicosiltransferasas en el Golgi incluyen a oligosacáridos de tipo arabinósidos y unidades de galactosa (Fig. 8R.B). (Egelund, Obel et al. 2007, Gille, Hansel et al. 2009, Velasquez, Iusem et al. 2011, Velasquez, Ricardi et al. 2011, Velasquez, Salter et al. 2012). Finalmente, las EXTs completamente modificadas son secretadas a la pared celular e insolubilizadas mediante la formación de enlaces cruzados por PER_{III} (Fig. 8R.B).

Varias hipótesis sobre cómo se produce la insolubilización de EXTs por entrecruzamiento han sido propuestas, pero la evidencia directa *in vivo* ha resultado difícil de obtener. Uniones inter o intramoleculares entre EXTs a través de sus residuos tirosinas por acción de las PER_{III}, han sido claramente demostradas *in vitro* formando uniones di-IDT y pulcherosina (trímeros de tirosinas) (Fry 1982, Brady, Sadler et al. 1996, Held, Tan et al. 2004, Cannon, Terneus et al. 2008). Las EXTs O-glicosiladas que son secretadas en la pared celular podrían formar una red covalente ordenada (Fig. 9I. B) Se ha propuesto que la red de EXTs cargadas positivamente reaccionaría con pectinas ácidas para formar agregados EXT-pectinas, que funcionarían como moldes para la síntesis de nueva pared celular (Cannon, Terneus et al. 2008, Valentin, Cerclier et al. 2010). La red glicoproteica de EXTs es relevante en la expansión polarizada de los pelos radicales (Velásquez et al. 2011a,b; Velásquez et al. 2012).

Con el fin de determinar los efectos de la deficiencia de ROS, causada por la falta o disminución de actividad peroxidasa, en la pared celular del pelo radical *in muro*, se utilizaron líneas reporteras de EXTs que permiten visualizar la disposición espacial de las mismas en la pared celular. Las líneas transgénicas utilizadas fueron generadas y cedidas por la Dra. Margaret Brigham Fleming (Departamento de Biología – Universidad del estado de Colorado). Para generar la línea nombrada SS-cortaEXT_TOM, plantas Wt Col-0 fueron transformadas con la construcción promotor35S::SS-cortaEXT_TOM que codifica para una proteína con un único dominio EXT (cortaEXT) fusionada con la proteína roja fluorescente tdTomato (TOM) bajo el promotor fuerte del virus del mosaico del tabaco 35S. SS codifica para un péptido señal de envío a la vía secretora. También, se utilizó la construcción promotor35S::SS-largaEXT_TOM que codifica para una proteína con 37 dominios tipo EXT (largaEXT) también fusionada con la proteína roja

fluorescente TOM y bajo en control de promotor 35S para generar la línea transgénica SS-largaEXT_TOM. Como control, se utilizaron líneas denominadas TOM y SS-TOM. Para la primera, se utilizó la construcción promotor35S::TOM que contiene la secuencia que codifica para tdTomato bajo el control del promotor 35S y sin SS. Para la segunda, se usó la construcción promotor35S::SS_TOM, con la secuencia que codifica para tdTomato bajo el control del promotor 35S y la secuencia SS (Tabla 3M). Dos líneas transgénicas generadas con cada construcción fueron analizadas (#1 y #2). En la Fig. 10R.A se representa con un esquema cada construcción. En la Fig. 10R.B un esquema de la construcción proteica reportera madura SS-TOM-largaEXT. La EXT elegida forma parte de la EXT quimera S1LRX1 (Stratford, Barnes et al. 2001). Este gen es expresado en tubos polínicos de tomate y codifica para dos dominios funcionales: un dominio rico en repeticiones leucinas (LRR) y un dominio EXT separados por un *linker* flexible rico en cisteínas y glicinas. El dominio LRR fue sustituido por el reportero fluorescente TOM. Los 2 residuos Tyr que contiene el dominio EXT de la proteína S1LRX1 en su secuencia, son suficientes para las uniones covalentes entre estos residuos a la pared celular. Un análisis previo de los homólogos de SLRX1 de maíz (mPEX1 y mPEX2) sugirió que estas proteínas pueden unirse covalentemente en la pared celular ya que el tratamiento con reactivos que rompen uniones no covalentes (como LiCl y SDS), no redujeron el contenido de estas proteínas en la pared celular de los tubos polínicos (Rubinstein, Marquez et al. 1995) indicando que las tirosinas de estas proteínas permiten el *crosslinking* estableciendo una fuerte unión a la pared celular. El fluoróforo TOM fue elegido por ser capaz de mantener la fluorescencia en una variedad de condiciones desnaturizantes a diferencia de la proteína fluorescente verde (GFP), que es sensible a pH ácidos. De esta manera, TOM es capaz de fluorescer de forma fiable en condiciones ácidas como la presente en la pared celular.

Las líneas transgénicas fueron chequeadas mediante *Western blot* anti-RFP que reconoce a TOM como se explica en la sección 14 de materiales y métodos. El tamaño de las bandas detectadas en el *western blot* para TOM y SS-TOM fueron de igual tamaño, como era esperado. Sin embargo, el tamaño predicho para TOM es de 54 kDa (suponiendo un peso molecular de 110 Da por aminoácido), pero el tamaño aparente en el Western es superior a 75 kDa. El tamaño predicho para la proteína largaEXT_TOM es de 94 kDa, o 40 kDa más que TOM. En los carriles sembrados con las muestras largaEXT_TOM #1 y #2, se detectaron proteínas de varios tamaños, todas más grandes que TOM (con asterisco se marca la banda esperada). La banda más fuerte, fue mucho más que 40 kDa superior a TOM (aproximadamente≈200kDa), sugiriendo la existencia de modificaciones postraduccionales de la EXT (Velasquez, Iusem et al. 2011) o podría tratarse de un dímero que se encuentre parcialmente *crosslinkado* (Fig. 10R.C).

Para investigar si la sobreexpresión de dominios tipo EXTs produce alguna consecuencia sobre el crecimiento y desarrollo del pelo radical. Las líneas transgénicas junto con Wt Col-0 fueron crecidas en medio MS 0.5X 0.8% agar planta pH 5.8 en luz

continua (18-23°C) durante 7 días y se midió la longitud de los pelos radicales. No se observaron diferencias significativas en el fenotipo con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 10R.D). Esto indica que las EXTs sobre-expresadas no afectan el normal desarrollo del pelo radical, por lo tanto, no están interfiriendo con el normal ensamblado de la red de EXTs endógenas y se estarían incorporando a la misma. Por otro lado, también se demostró, que estas líneas transgénicas no tienen ningún efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta (Fleming 2015). Para ello se midió un conjunto de características del desarrollo en las cuales la sobreexpresión de EXTs podría producir algún impacto en el fenotipo, basado en las etapas de crecimiento de *Arabidopsis* descritas por Boyes y colaboradores (Boyes, Zayed et al. 2001) y ninguna línea transgénica analizada demostró algún fenotipo de crecimiento importante con respecto al Wt Col-0, lo que implica que cualquier efecto de la sobreexpresión de EXTs sería sutil.

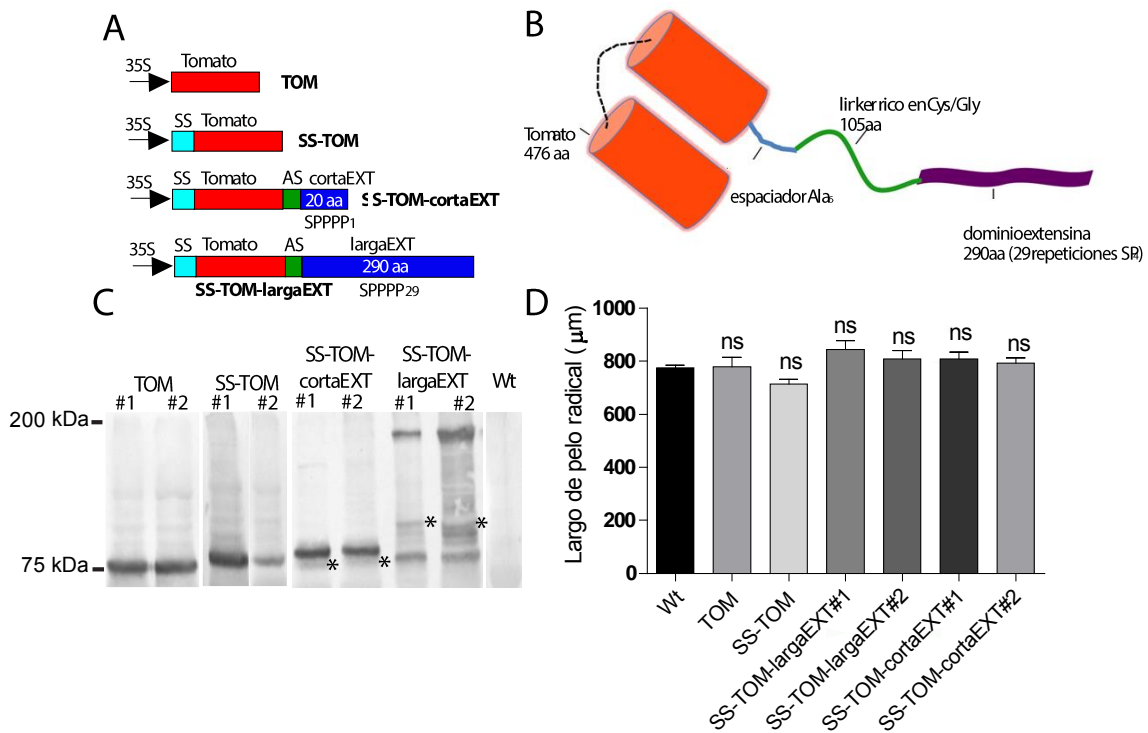


Figura 10R: Análisis de líneas reporteras de EXTs. **A)** Esquema (sin escala) de cada una de las construcciones utilizadas: TOM, SS-TOM, SS-TOMcortaEXT, SS-TOMlargaEXT para transformar plantas Wt Col-0 de *Arabidopsis thaliana*. **B)** Dibujo de la proteína reportera madura que codifica la construcción SS-TOMlargaEX.T **C)** Western Blot: 10 μ l de extracto de proteínas de cada construcción y del control Wt Col-0 fueron sembrados en un gel de poli-acrilamida 12% y se electroporó a 200V durante 1 hora. Después de transferirlo a una membrana de PVDF, las bandas correspondientes a TOM fueron visualizadas utilizando un anticuerpo anti-RFP y reveladas con fosfatasa alcalina. **D)** Largo promedio de pelos radicales de las líneas transgénicas TOM, SS-TOM SS-TOM-CotaEXT y SS-TOM-largaEXT comparadas con Wt Col-0 (media \pm s.e.m., n=20-40). 35S promotor fuerte del virus del mosaico del tabaco, SS: secuencia señal de envío a apoplasto de la poligalacturonasa del tomate, TOM: proteína reportera *TOMATO*, cortaEXT: últimos 20 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína SIPEX1 que incluye un único dominio tipo EXT (SP₄),

largaEXT: 290 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína SIPEX1, que incluye 37 dominios tipo EXTs (SP₄). Espaciador Ala₆: 6 alaninas que separan al reportero TOMATO del dominio EXT. *Linker*: secuencia rica en Cys/Gly de SIPEX1 que enlaza el dominio nativo LRR con el dominio EXT.

Para confirmar la localización sub-celular de las líneas reporteras de EXTs, pelos radicales de líneas representativas de cada construcción (TOM#2, SS-TOM #1, SS-TOM-Corta-EXT#2 y SS-TOM-Larga-EXT#2) fueron visualizadas en el microscopio confocal antes y después de realizar plasmólisis con una solución de manitol 8%. La plasmólisis permite distinguir si la fluorescencia en el borde de la célula proviene del apoplasto, la pared celular o del citoplasma. Como era esperado, la fluorescencia de la línea TOM#2 fue observada en el citoplasma de pelos plasmolisados (Fig. 11R.A), mientras que en las líneas SS-TOM#1, SS-TOM-Corta-EXT#2 y SS-TOM-Larga-EXT#2 la fluorescencia se localizó tanto en el citoplasma como en la pared celular (Fig. 11R.B,C,D). Estos resultados confirman que la secuencia de envío a la vía secretora (SS) es necesaria y suficiente para dirigir a SS-TOM, SS-TOM-corta-EXT y SS-TOM-Long-EXT hacia la pared celular.

Habiendo confirmado que la sobreexpresión de los reporteros de EXTs se comportan como las EXTs endógenas, se procedió a estudiar la estructura de la red de EXT *in vivo* utilizando la línea reportera SS-TOM-Larga-EXT#2. El objetivo es visualizar la disposición de las EXTs en la pared celular del pelo radical cuando la actividad de las PER_{III} se encuentra disminuida (utilizando el inhibidor SHAM). Esta disminución en la actividad peroxidasa, afectaría al entrecruzamiento de las EXTs en la pared celular, por lo tanto, cambiaría su disposición espacial posiblemente afectando toda la estructura de la pared celular del pelo radical. La línea reportera SS-TOM-Larga-EXT#2 fue elegida porque al tener varias repeticiones SP₄ es más similar a las EXTs endógenas que la construcción con un único dominio SP₄. Además, presentó mayor señal de fluorescencia y mayor señal en el *Western blot* con respecto a la línea transgénica SS-TOM-Larga-EXT#1.

Para confirmar la hipótesis planteada, plantas transgénicas de la línea SS-TOM-Long-EXT#2 fueron crecidas en medio MS 0.5X 0.8% agar planta pH 5.8 en luz continua (18-23°C) durante 4 días, luego fueron transferidas a un medio conteniendo 75µM SHAM y a un medio control (MS 0.5X, agar 0,8% pH 5.8). Después de 5 días, se procedió con la obtención de imágenes de pelos plasmolisados, lo que permite distinguir la fluorescencia proveniente del apoplasto y de la pared celular. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal (ver sección 20 de materiales y métodos). El análisis cuantitativo de la señal de fluorescencia se realizó mediante el programa *ImageJ*. Se trazó una línea sobre la pared celular (Fig. 4M) en el ápice del pelo radical y se realizó una media de las intensidades de fluorescencia de todos los pixeles incluidos en la línea. No se observaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia en la pared celular del ápice del pelo radical de plantas tratadas con SHAM con respecto al control (Fig. 11R. E). Si bien este resultado no fue lo esperado, es importante destacar que, aunque no fue posible detectar cambios en la fluorescencia, no significa que la

estructura de las las EXTs en la pared celular no se encuentre afectada por la disminución de la actividad peroxidasa. Futuros experimentos son necesarios para confirmar la hipótesis planteada.

En un futuro próximo y en colaboración con el grupo del Dr. Stefani en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION-CABA) se plantea visualizar la disposición de la red de EXTs en la pared celular utilizando microscopia de súper-resolución, específicamente utilizando el método STED (por Stimulated emission depletion microscopy). Ésta es una técnica que genera imágenes de súper resolución mediante la depleción selectiva del fluoróforo (en este caso TOM) minimizando el área de iluminación en el punto focal y mejorando así la resolución. Mientras que la microscopía confocal alcanza una resolución lateral de 200nm, mediante STED la resolución alcanzada puede llegar hasta los 40nm. Por lo tanto, sería posible distinguir la conformación en el espacio de las EXTs en la pared celular. De esta manera, se podrá evaluar cuales son los efectos de la deficiencia de actividad peroxidasa con mayor precisión.

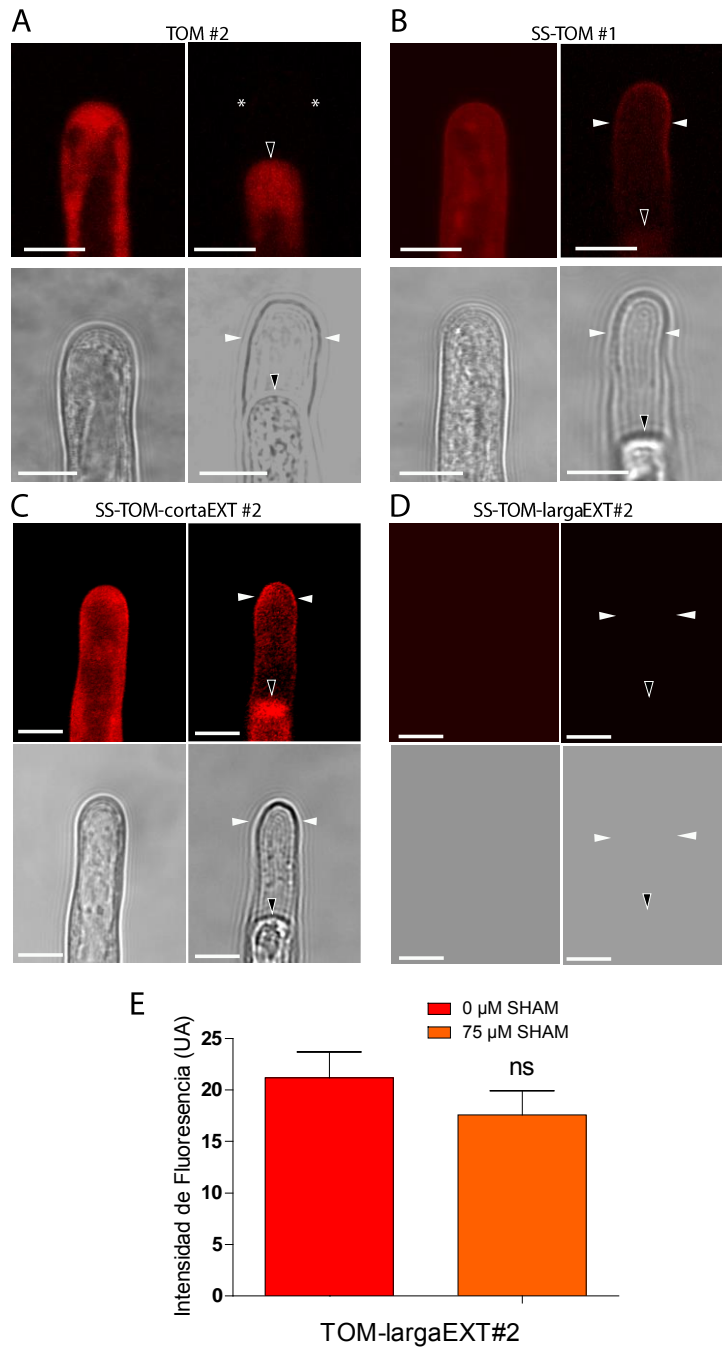


Figura 11R: Visualización y cuantificación de la señal fluorescente de proteínas tipo EXTs utilizadas como reporteras del crosslinking mediado por PER_{III} A-D) Señal fluorescente de TOM en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0 transformadas con las construcciones A) TOM#2, B) SS-TOM#1 C) SS-TOM-CotaEXT#2 y D) SS-TOM-largaEXT#2. Se obtuvieron imágenes antes (derecha) después (Izquierda) de realizar plasmólisis con manitol 8% en un microscopio confocal. La señal de TOM se localiza tanto en la pared celular (indicado con flechas blancas) como el citoplasma (indicado con flechas negras) de las líneas transgénicas plasmiliosadas de SS-TOM, SS-TOM-Corta-EXT#2 y SS-TOM-Larga-EXT#2. Mientras que en la línea transgénica plasmiliosada TOM#2 la fluorescencia fue observada únicamente en el citoplasma (los asteriscos indican la ausencia de señal en la pared celular) Barra de escala: 100 μ m. E) Intensidad de fluorescencia de la señal de TOM medida en la pared celular de pelos radicales plasmiliosados (media \pm SEM n= 12) de la línea SS-TOM-Larga-EXT#2 tratada con SHAM y sin tratar UA: unidades arbitrarias. NS: diferencias no significativas.

Se realizó otro ensayo para poder detectar cambios estructurales en la pared celular, cuando la actividad peroxidasa se encuentra disminuida: plántulas Wt Col-0 tratadas con 75 μm de SHAM y sin tratar fueron teñidas con ioduro de propidio (IP, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para observar las paredes celulares de los pelos radicales mediante microscopía confocal y se determinó el ancho de la misma (ver sección 18 de materiales y métodos). De esta manera, la señal obtenida, es independiente de la cantidad de proteína expresada, como ocurre cuando se utiliza una línea transgénica. El IP es un compuesto fluorescente rojo que tiñe la pared celular de las células vegetales mediante su unión a las pectinas (específicamente a HG) presentes en la misma. El IP es incapaz de atravesar la membrana plasmática mientras su integridad sea adecuada, en caso contrario penetra y es capaz de teñir también el núcleo (Rounds, Lubeck et al. 2011).

A partir de las fotografías obtenidas, con el software ImageJ, se trazó una recta en la zona subapical y se determinó la intensidad de fluorescencia en función del ancho del pelo radical. Este ensayo demostró que no existen diferencias en el ancho de la pared celular en plantas tratadas con SHAM con respecto al control sin tratar, al menos en las condiciones experimentales testeadas (Fig. 12R). Sin embargo, el límite de resolución del microscopio utilizado es de 193nm, existen evidencias que indican que la pared celular del pelo radical mide alrededor de 70-100nm de ancho utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Ketelaar, Galway et al. 2008). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que existan diferencias en la disposición espacial de las EXTs afectado por la inhibición de la actividad de las PER_{III}.

Para sortear este inconveniente, en colaboración con el grupo de la Dra. Marisa Otegui (University of Wisconsin-Madison) se planea establecer correctamente el ancho de la pared celular y observar en detalle cambios en la arquitectura de la pared celular debido a la deficiencia de la actividad peroxidasa. Para ello, se utilizará microscopía electrónica de transmisión (TEM por *transmission electron microscopy*) acoplada a criofijación, lo que permite preservar la estructura original de las proteínas. Van a ser fotografiadas y analizadas plantas Wt Col-0 tratadas con SHAM y sin tratar, así como la línea triple mutante insercional *per1-2 per44-2 per73-3*.

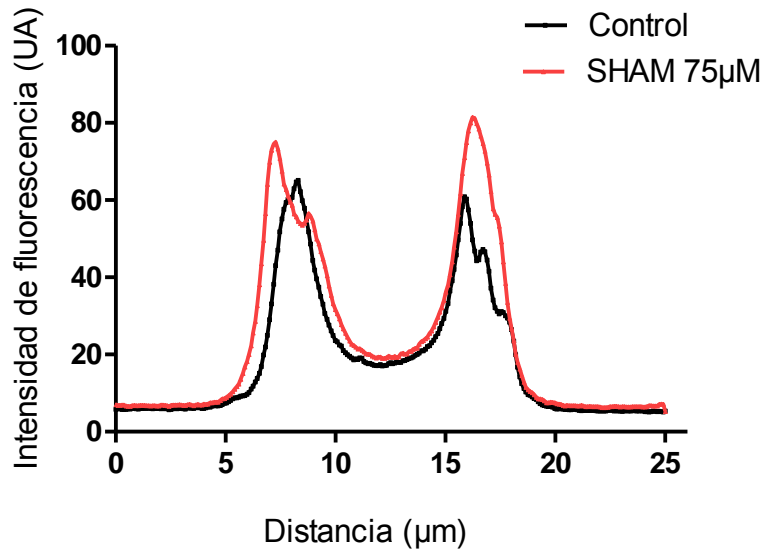


Figura 12R: Ancho de la pared celular del pelo radical: Análisis del ancho de la pared celular del pelo radical en plántulas Wt Col-0 tratadas con 75 µm de SHAM y sin tratar teñidas con ioduro de propidio (IP, 20 µg/ml) y observadas en un microscopio confocal. No se observaron diferencias significativas en el ancho de la pared celular en plantas tratadas con SHAM con respecto al control sin tratar, al menos en las condiciones experimentales testeadas.

8. Regulación transcripcional de las PER_{III}.

8.1 Regulación mediada por el FT RSL4

El FT RSL4 por (ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4) es necesario y suficiente para el alargamiento del pelo en la raíz. Pocos pelos radicales y muy cortos son los que se desarrollan en la mutante *rs/4*. Además, la expresión constitutiva de RSL4 resulta en el crecimiento constitutivo de los pelos radicales resultando en la formación de pelos muy largos (Yi, Menand et al. 2010). De esta manera, la longitud del pelo radical está directamente relacionada con la intensidad del pulso transcripcional del RSL4 (YL et al., 2010; Datta et al., 2015). Son varios los factores que influyen en los niveles de expresión de este FT, tales como, el programa de desarrollo, los niveles de ciertas hormonas y las señales ambientales externas (Marzol, Borassi et al. 2017). RSL4 regula entonces los genes específicos para la morfogénesis de los pelos radicales que incluyen aquellos que regulan la organización de la pared celular, la secreción vesicular y otros procesos fundamentales para la diferenciación celular (Grierson and Schiefelbein 2009, Marzol, Borassi et al. 2017). Estos genes se caracterizan por contener en sus zonas promotoras elementos específicos de pelos radicales (RHE, *Root Hair Element*) de aproximadamente 16-17bp (Kim, Lee et al. 2006, Won, Lee et al. 2009).

Por lo tanto, con esta información y en base a los resultados obtenidos en este trabajo se planteó determinar si el FT RSL4 está regulando la transcripción de los genes que codifican para PER1, PER44, PER60 y PER73 que son necesarias en el proceso de

elongación celular del pelo radical. Incluso, se demostró con anterioridad que los niveles de transcritos de *PER1* y *PER73* se encuentran disminuidos en la línea mutante *rs/4* y aumentados en la sobre-expresante de RSL4 (Yi, Menand et al. 2010). Para comprobar esta hipótesis, primero se realizó un estudio bioinformático basado en la identificación y análisis de los genes que son regulados por RSL4 (Yi, Menand et al. 2010). Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Nadra (IQUIBICEN-UBA-CONICET). Primero se identificaron posibles blancos de RSL4. Para ello se seleccionaron aquellos genes en los cuales su transcripción se encontraba reprimida en la línea mutante de *rs/4* y genes que se encontraban altamente expresados en la línea transgénica que sobre-expresa al FT RSL4 (Yi, Menand et al. 2010). Una vez seleccionados los genes se buscaron en sus promotores secuencias *cis* enriquecidas en forma no aleatoria, determinando así una secuencia putativa de respuesta a RSL4. La secuencia encontrada en este estudio bioinformático fue TN₆CA[CT]G[TA], en donde N puede ser A/T/C/G y ésta es similar a la secuencia descrita como elemento específico de pelo radical RHE TN₅₋₆CACG[TA] en donde N puede ser A/T/C/G (Kim, Lee et al. 2006). Recientemente, un estudio demostró experimentalmente que RSL4 se une a esta secuencia RHE *in vitro* e *in vivo* regulando positivamente la expresión de genes específicos de pelo y estimulando el crecimiento del pelo radical de *Arabidopsis thaliana* (Hwang, Choi et al. 2017).

Una vez determinado el sitio de unión a RSL4, se analizaron las regiones regulatorias de los genes que codifican para *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73* y se identificaron varios de estos sitios RHE. Las regiones promotoras de los genes que codifican para *PER1* y *PER73* poseen dos sitios putativos de unión a RSL4, mientras que en *PER60* se hallaron cuatro y en *PER44* sólo uno (Tabla 2R) sugiriendo que estas *PER_{III}* podrían ser blancos directos de RSL4, como también lo sugirió el análisis de co-expresión (Fig.4R. A).

Con el fin de confirmar los datos extraídos del estudio bioinformático y en colaboración con el grupo del Dr. Hyung-Taeg Cho (Universidad Nacional de Seúl - Corea) se realizó un análisis de Inmuno-precipitación de la cromatina acoplado a un análisis de PCR (ChIP-PCR) utilizando una línea transgénica *pRSL4::RSL4-GFP* (Wt Col-0/*promotorRSL4::RSL4-GFP*) (Tabla 2M) y Wt Col-0 como control (ver sección 16 de materiales y métodos). El estudio demostró que los sitios RHE -461 (posición relativa al codón de inicio de la transcripción) de la región promotora de *PER1*, -267 de *PER44*, -518 de *PER60* y -521 de *PER73* que se encuentran significativamente enriquecidos en la línea *pRSL4::RSL4-GFP* con respecto al control (Fig.13R. B). Por lo tanto, es posible afirmar que RSL4 se une a las regiones promotoras de los promotores de *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73* en al menos uno de los posibles sitios de pegado, encontrados previamente por análisis bioinformático.

Como RSL4 regula la expansión celular del pelo radical y las *PER_{III}* son necesarias para la homeostasis de ROS ligada al crecimiento, se hipotetizó que RSL4 regularía

positivamente a estas PER_{III}, es decir, que RSL4 estaría activando la expresión de las PER_{III}. Además, la actividad peroxidasa se encuentra reducida en la mutante *rs/4* (Fig. 13R.C) indicando que RSL4 no sólo regula la expresión transcripcional de las PER_{III} sino que también impacta en su actividad.

Por lo tanto, es posible concluir hasta el momento que el FT RSL4 se une al RHE en los promotores de *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73* activando su expresión, de esta manera aumenta la actividad peroxidasa manteniendo la homeostasis de ROS indispensable para la elongación celular polarizada del pelo radical (Fig. 13R. D).

Gen	Posición desde el codón de inicio de la transcripción.	Secuencia	Dirección
PER1 <i>At1g05240</i>	-461	TTTGTGGAATCCACGTT	<i>Reverse</i>
	-1501	TAGCTTAATTGCACGTT	<i>Reverse</i>
PER44 <i>At4g26010</i>	-267	AGAATGAT-TCCACGCG	<i>Reverse</i>
PER60 <i>At5g22410</i>	-113	TCCATGAA-CGCACGTT	<i>Forward</i>
	-468	TTAGTAGTATCCACGTT	<i>Forward</i>
	-518	ATGATTTT-TGCACGTT	<i>Forward</i>
PER73 <i>At5g67400</i>	-199	AACTGGA-GCCACGTT	<i>Reverse</i>
	-521	TTTTGCTCTGCACGAA	<i>Forward</i>

Tabla 2R: Elementos de unión a RSL4 en el promotor de las PER_{III}. Elementos en *cis* específicos de pelos radicales (RHE) en las regiones regulatorias río arriba del inicio de la transcripción de los genes *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73*. En rojo, nucleótidos estrictamente conservados.

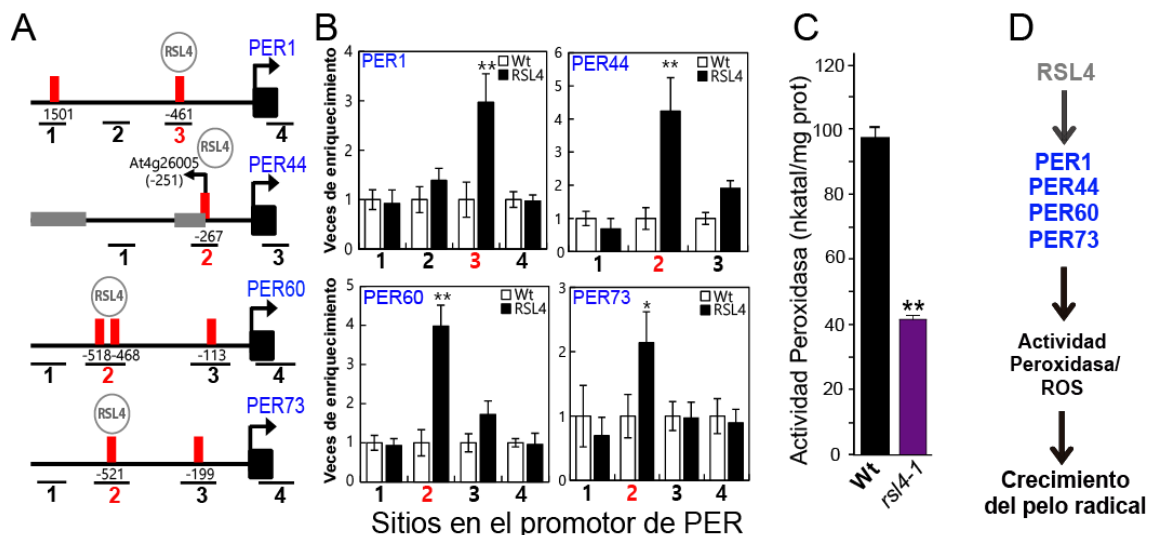


Figura 13R: Regulación transcripcional de PER_{III} mediada por RSL4. **A)** Regiones promotoras de los genes que codifican para las PER_{III}: PER1, 44, 60, 73 que muestran los elementos de unión a RSL4 (barras rojas) y las regiones amplificadas en ChIP-PCR (líneas numeradas de 1 a 4). Las posiciones son relativas al codón de inicio de la transcripción. Los exones correspondientes a los genes vecinos están representados como rectángulos grises **B)** Se muestran las veces de enriquecimiento ChIP-PCR de la línea transgénica pRSL4:RSL4-GFP con respecto al Wt Col-0 en cada región. Las barras de error indican el desvío estándar de las réplicas biológicas (n=2). Los valores son relativos a cada valor de la línea Wt y significativamente diferentes. T-test (**) P<0.01 (*) P<0.05. **C)** Actividad Peroxidasa (nkatal/mg proteína) en extractos proteicos de raíces Wt y rsl4-1 determinado con guayacol/H₂O₂ como sustrato n=3, P valor de la prueba de ANOVA, (**) P<0.01, (*) P<0.05. **D)** Eventos propuestos desde la activación de la transcripción de los genes de PER1, PER44, PER60 y PER73 mediada por RSL4 hasta el crecimiento del pelo radical mediado por la homeostasis de ROS.

8.2 Regulación del crecimiento polarizado mediado por auxinas.

Las auxinas son fitohormonas importantes en múltiples procesos del desarrollo vegetal como en la embriogénesis, el desarrollo vascular, la organogénesis, los tropismos, la dominancia apical, la respuesta al estrés y la senescencia (Barbez and Kleine-Vehn 2013). El compuesto más abundante es el ácido indol 3-acético (IAA) aunque hay otros como el ácido indol-3-butírico (IBA), Ácido 4-cloro indol-3-acético (4-Cl-IAA) y ácido fenilacético (PAA) (Paque and Weijers 2016).

Esta hormona tiene una función ubicua y dependiente del contexto por lo que no es posible asignarle una única función (Paque and Weijers 2016). Una de las preguntas más intrigantes es como una sola molécula puede tener roles tan diversos. Estudios extensivos que enfocan distintos aspectos de la biología de auxinas han sugerido que la concentración local de auxinas, que es determinada por su metabolismo y transporte, así como su mecanismo de acción (*signaling*) contribuyen a la diversidad y especificidad de la respuesta mediada por auxinas (Wang and Estelle 2014).

En la raíz se demostró que IAA estimula el desarrollo de raíces laterales (Casimiro, Marchant et al. 2001) y el crecimiento de los pelos radicales (Lee and Cho 2013,

Velasquez, Barbez et al. 2016, Zhang, Huang et al. 2016). Las auxinas pueden actuar de manera rápida no transcripcional, como en el caso de la activación de la bomba de protones en la membrana plasmática y los canales iónicos. Así como también, en el caso de la reorientación de los microtúbulos, sin embargo, el mecanismo molecular es desconocido (Perrot-Rechenmann 2010, Paque and Weijers 2016). Las auxinas también pueden actuar a nivel transcripcional cambiando los niveles de expresión de miles de genes dando lugar a una respuesta fisiológica característica (Perrot-Rechenmann 2010, Weijers and Wagner 2016).

El mecanismo de acción de la respuesta transcripcional, se basa en activar los FTs de respuesta a auxinas (ARFs, *Auxin Response Factors*) que son los encargados de activar/reprimir numerosos genes de respuesta a auxinas. Cuando los niveles de auxinas son bajos en el núcleo, el represor AUX/IAA inhibe la actividad de los ARFs mediante la formación de heterodímeros bloqueando así la expresión de genes dependientes de auxinas. Niveles altos de auxinas en el núcleo, liberan los ARFs de su represor Aux/IAA promoviendo la unión de estos últimos a las proteínas TIR (TIR1/AFBs, *Auxin-Signaling F box proteins*) que forma parte del complejo ligasa de ubiquitinas SCF^{TIR1/AFB} (Kepinski and Leyser 2005, Sauer, Robert et al. 2013). Como consecuencia de esta unión, el represor Aux/IAA se ubiquitina y es degradado vía proteasoma. Los ARFs liberados se unen a elementos en *cis* de respuesta a auxinas (Aux-REs) en los promotores de genes de respuesta a auxinas (Guilfoyle, Hagen et al. 1998) (Fig. 6I). Se demostró la importancia de algunos de estos componentes moleculares pertenecientes a la señalización por auxinas. Mutantes de ganancia de función de ciertos Aux/IAA presentan una marcada inhibición del crecimiento del pelo radical (Schieffelbein, Galway et al. 1993, Leyser, Pickett et al. 1996, Rogg, Lasswell et al. 2001, Fukaki, Tameda et al. 2002). Por el contrario, el rol de los ARFs, uno de los principales componentes del *signaling* de auxinas ha sido escasamente caracterizado en pelo radical.

La expansión celular del pelo radical mediada por auxinas es llevada a cabo mediante el aumento en los niveles de expresión del FT RSL4 (Yi, Menand et al. 2010) y este pulso de expresión de RSL4 determinará el largo final del pelo radical (Datta, Prescott et al. 2015). Basado en los antecedentes presentados se propone demostrar si la homeostasis de ROS está ligada al crecimiento inducido por auxinas y determinar el mecanismo molecular por el cual se llevaría a cabo.

8.2 A) Efecto de auxinas en la homeostasis de ROS en el pelo radical.

Como primera medida se evaluó el efecto del agregado de auxinas tanto en el largo del pelo como en la producción de $_{\text{cit}}\text{ROS}$ en plantas Wt Col-0. Cuando se agregó 100 nM de IAA en el medio de crecimiento, se observó un aumento en la longitud máxima de los pelos radicales y los niveles de $_{\text{cit}}\text{ROS}$ aumentaron, sobre todo en los

últimos estadios del desarrollo, con respecto al control sin el agregado de IAA (Fig. 14R.A,B). Estos resultados muestran que la maquinaria de producción de ROS se mantiene encendida permitiendo que el pelo continúe creciendo, razón por la cual, son más largos en presencia de auxina exógena. Este es el primer indicio que demuestra la hipótesis de que el crecimiento del pelo impulsado por auxina está ligado al crecimiento mediado por la homeostasis de ROS.

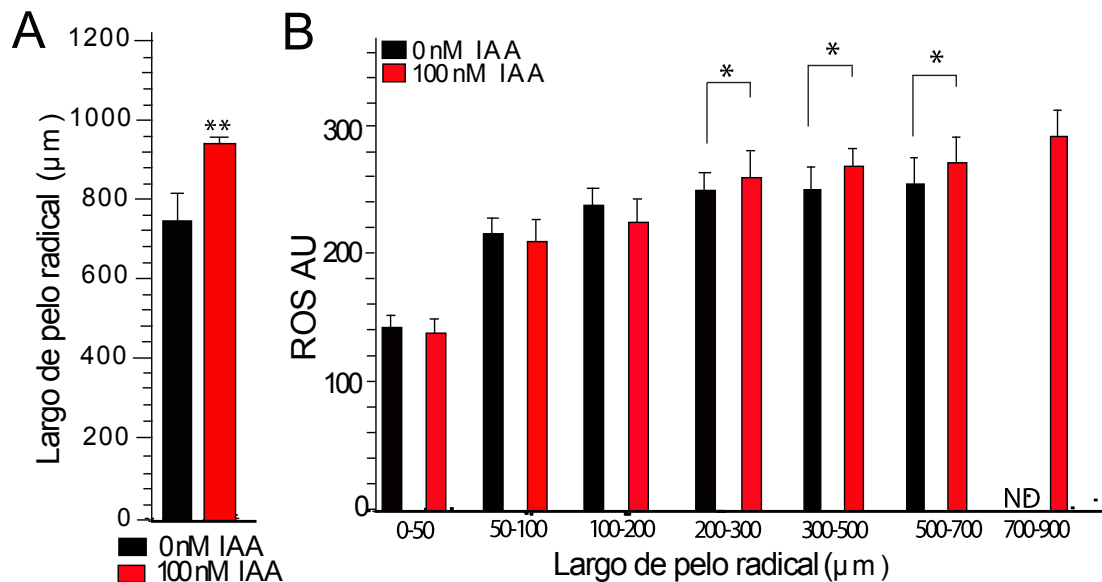


Figura 14R: La producción de $citROS$ relacionada al crecimiento de pelo radical es modulada por auxinas.

A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 tratadas con 100 nM IAA y sin tratar (media \pm SEM, n= 30) **B)** Niveles promedio de $citROS$, expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) medidos con la sonda fluorescente $H_2DCF-DA$ en distintos estadios de pelos radicales de raíces Wt Col-0 tratadas con 100 nM IAA y sin tratar (media \pm SD, n= 200). P-valores de la prueba de ANOVA: (*) $P < 0,01$, (**) $P < 0,001$, (***) $P < 0,0001$. ND: valor no detectable.

Para determinar si las auxinas producen el crecimiento estimulando la producción de ROS por parte de las PER_{III} y de las NOXs, se evaluó el efecto del agregado de auxinas exógenas en el pelo radical en mutantes insercionales deficientes en la producción de $citROS$: *nox-1*; *noxh-3 noxj-3* y *per44 per73*.

El tratamiento con 100nM IAA rescató parcialmente el fenotipo y los niveles de $citROS$ en la mutante *nox-1*, produciendo un aumento de aproximadamente un 30% en ambos casos, y casi rescató completamente las deficiencias de $citROS$ y longitud de pelo en las dobles mutantes *noxh-3 noxj-3* y *per44-2 per73-3* (Fig. 15R.A,B). Esto resultados estarían indicando que las auxinas requieren del aporte de ROS tanto de las PER_{III} como de las NOXs, especialmente de la NOXC para activar el crecimiento. En este caso, la ausencia de una de las isoformas de NOXs sería compensada mediante la activación por auxinas de otras isoformas de NOXs y también por la activación de las PER_{III} . Para el caso

de la mutante *per44-1 per73-3* ocurre lo mismo, la ausencia de dos isoformas de PER_{III} es compensada por el resto de las isoformas y también por la activación de las NOXs mediada por auxinas. Es importante destacar el rol protagónico la NOXC en el crecimiento polarizado del pelo radical mediado por auxinas ya que cuando NOXC no está presente, el agregado de IAA exógena es capaz de reactivar parcialmente el crecimiento mediado por la homeostasis de ROS.

Para confirmar estos resultados se decidió bloquear completamente las fuentes de producción de ROS mediante el uso de los inhibidores farmacológicos SHAM y VAS en presencia de 5 μ M IAA. En este caso, la reversión del fenotipo y los niveles de ^{cit}ROS fue casi nula (Fig. 15R.C,D). Este resultado confirma la hipótesis de que las auxinas estimulan la elongación celular del pelo radical estimulando la producción de ^{cit}ROS por parte de las PER_{III} y NOXs. La muy pequeña, pero aun detectable recuperación del crecimiento y de los niveles de ^{cit}ROS en presencia de ambos inhibidores podrían estar sugiriendo la existencia de alguna otra fuente aún desconocida de ROS proveniente de otras enzimas apoplásticas por ejemplo oxalato oxidasas, diaminas oxidasas, lipoxigenasas, etc. Posiblemente, también reguladas vía IAA-RSL4 (y posiblemente RSL2) lo que requiere de futuras investigaciones (Fig. 15R.E).

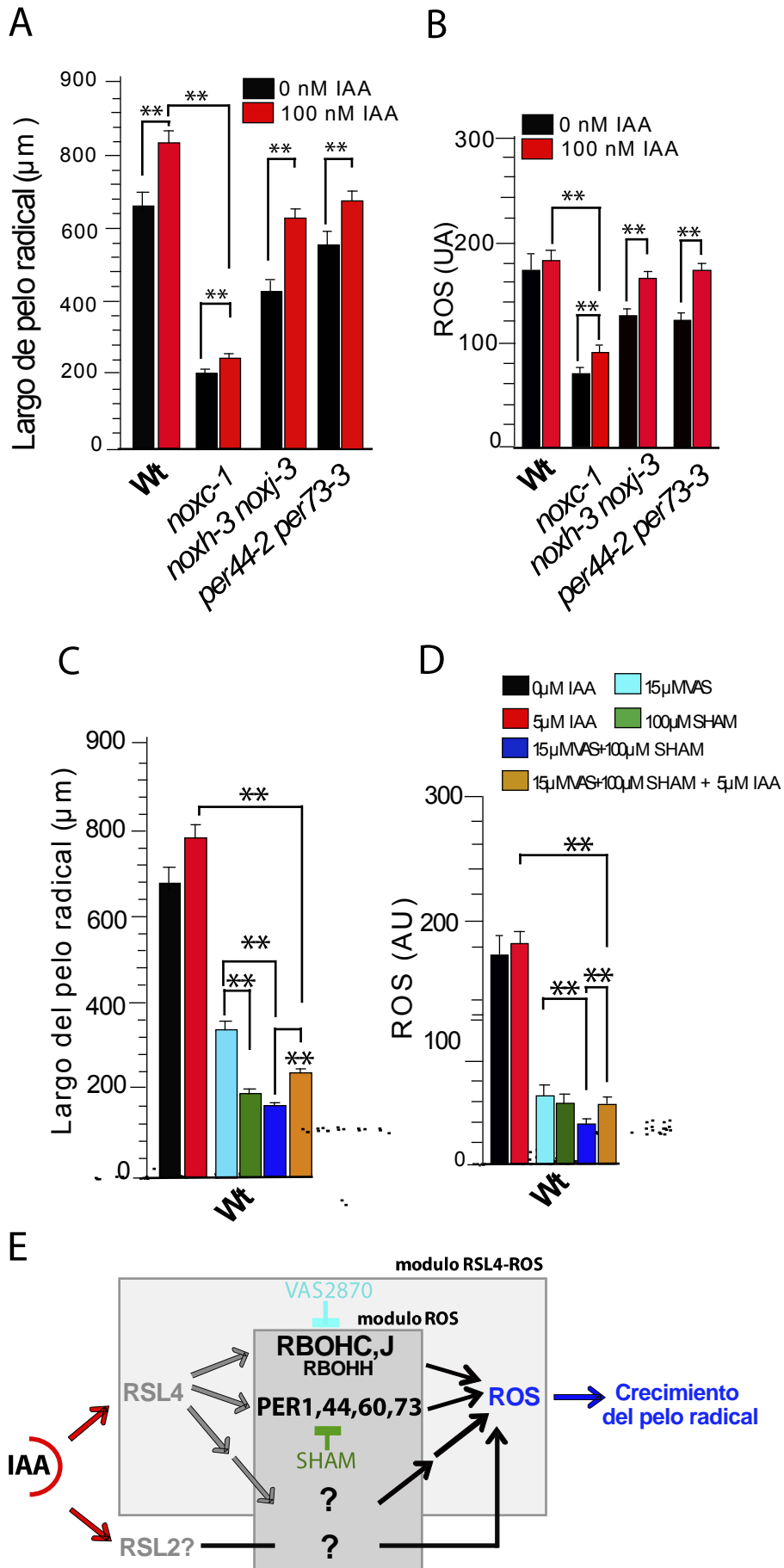


Figura 15R: Auxinas requiere de ROS para estimular el crecimiento del radical. **A)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical (media \pm SEM, n= 30) y **B)** Niveles promedio de $_{cit}ROS$ (Media \pm SD, n= 200) expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) medidos con la sonda fluorescente H₂DCF-DA de plantas Wt Col-0 y mutantes *nox-1*, *noxh-3* *noxj-3*, *per44-2* *per73-3* tratadas con 100 nM IAA y sin tratar. P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001. Pelos radicales de 0 a 200 μ m de longitud fueron analizados. **C)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical (media \pm SEM, n= 30) y **D)** Niveles promedio de $_{cit}ROS$ (Media \pm SD, n= 200) de plantas Wt Col-0 tratadas con IAA (5 μ M IAA), VAS2870 (VAS 15 μ M), SHAM (100 μ M), VAS + SHAM, and VAS + SHAM + IAA. NS: diferencias no significativas. P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001. Las comparaciones entre los tratamientos se realizaron entre pelos radicales en el mismo estadio de crecimiento. **E)** Secuencia de eventos propuesta para las señales de IAA en el pelo radical mediada por RSL4-NOXs+PERs y posiblemente RSL2. Se muestra un camino alternativo en la producción de ROS dependiente de RSL4.

8.2 B) Auxinas estimula el crecimiento mediado por ROS vía RSL4 y posiblemente RSL2.

Como se demostró en esta tesis, el FT RSL4 se une al RHE en los promotores de *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73* activando su expresión, de esta manera aumenta la actividad peroxidasa manteniendo la homeostasis de ROS indispensable para la elongación celular polarizada del pelo radical. También, se demostró que auxinas estimulan la elongación celular del pelo radical estimulando la producción de $_{cit}ROS$ por parte de las *PER_{III}* y *NOXs*. Por otra parte, estudios previos demostraron que los niveles de expresión del FT RSL4 son aumentados en presencia de auxina exógena para controlar el crecimiento de pelos radicales (Yi, Menand et al. 2010). Por consiguiente, se pretende responder si las auxinas estimulan el crecimiento y la homeostasis de ROS en el pelo radical, mediante la activación de la transcripción del FT RSL4. Cabe destacar que RSL4 es considerado un regulador maestro de la diferenciación y de la elongación de los pelos radicales (Yi, Menand et al. 2010, Datta, Prescott et al. 2015) ya que es capaz de regular la expresión de múltiples genes clave necesarios para este proceso (Hwang, Choi et al. 2017, Marzol, Borassi et al. 2017).

Asimismo, se pretende demostrar si RSL2 también está involucrado la regulación mediada por auxinas. La expresión de ambos es controlada por RHD6 y RSL1 (la interacción entre RHD6-RSL1 lidera la iniciación de la morfogénesis de pelo radical). RSL2 es un FT bHLH relacionado con RSL4 (89% idéntico a RSL4 en el dominio bHLH y 40% idéntico a RSL4 comparando la proteína completa). RSL2 es requerido para el crecimiento del pelo radicular y se expresa simultáneamente con RSL4. Sin embargo, se considera que RSL2 tiene un papel menos importante que RSL4 en la regulación de la elongación celular ya que solamente la expresión constitutiva de RSL4 dió como resultado el crecimiento constitutivo del pelo radical (Yi, Menand et al. 2010).

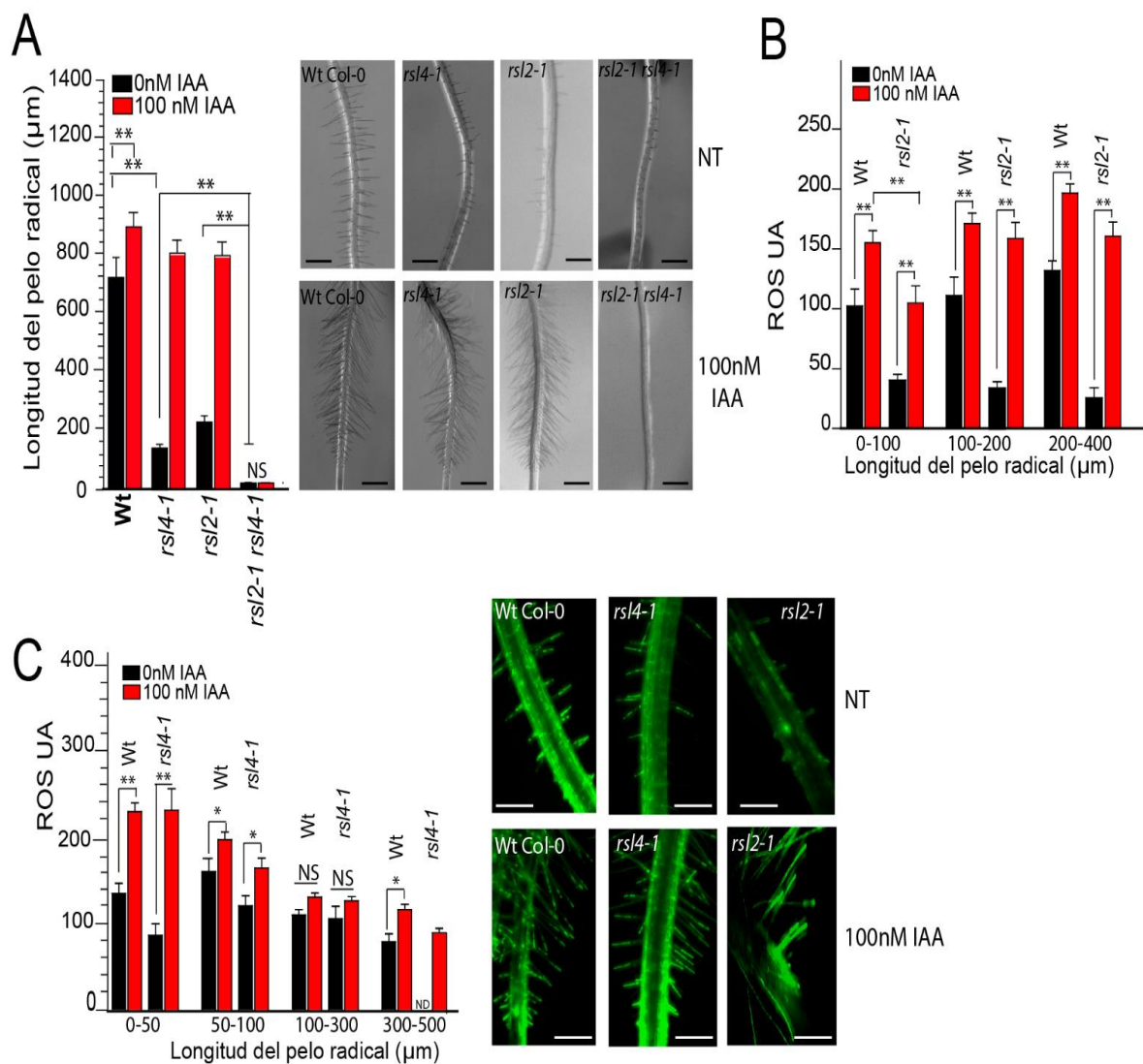
El análisis de fenotipo de pelo radical de las simples mutantes *rsl4-1*, *rsl2-1* y de la doble mutante *rsl4-1 rsl2-1* mostraron una longitud de pelo radical significativamente

más corta (aproximadamente un 80%-90%) que plantas control Wt Col-0 (Fig.11R. A). Además, *rs14-1* y *rs12-1* presentaron niveles de $_{cit}ROS$ disminuidos en los pelos radicales en comparación a plantas Wt Col-0 (Fig. 16R.B,C). Como ya se demostró con anterioridad, esto se debe a que, en ausencia de RSL4, la actividad de PER_{III} se encuentra disminuida (Fig. 13R. C), dando lugar a una disminución en los niveles de $_{cit}ROS$. Cuando se agregó 100nM de IAA al medio de crecimiento se observó una reversión total del fenotipo de las mutantes simples de *rs14-1* y de *rs12-1* tanto en la longitud del pelo como en los niveles de $_{cit}ROS$ (Fig. 16R.A,B,C). Sin embargo, no hubo reversión en la doble mutante *rs14-1 rs12-1* (Fig. 16R.A). Estos resultados indican que tanto el FT RSL2 como RSL4 tendrían funciones parcialmente redundantes en la respuesta de pelos radicales a la presencia de auxinas. Por tal motivo, las mutantes simples fueron capaces de responder a la presencia de IAA y no así la doble mutante. Para corroborar esta hipótesis, se llevó a cabo una de PCR en tiempo real (qPCR) para medir los niveles de transcritos de ambos FT en presencia de auxinas con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 16 R.D) y el resultado demostró que, efectivamente los niveles de transcritos de *RSL2* y de *RSL4* aumentaron en presencia del agregado de auxinas exógenas (100mM IAA). Además, los niveles de transcritos de *RSL2* en la mutante *rs14-1* fueron mucho mayores en presencia de auxinas con respecto al control sin auxinas y lo mismo ocurrió con los niveles de transcritos de *RSL4* en la mutante de *rs12-1* (Fig. 16R.E). Estos resultados resaltan la importancia de ambos FT en el crecimiento del pelo radical mediado por auxinas vía homeostasis de ROS llevado a cabo por los efectores últimos de este proceso: las PER_{III} y NOXs.

Por último, para profundizar en el entendimiento de la regulación de la homeostasis de ROS mediado por auxinas a través de los FT RSL2 y RSL4, se midieron niveles de transcritos de *PER44* mediante qPCR en plantas Wt Col-0 y en las simples mutantes *rs14-1* y *rs12-1* en presencia y en ausencia de auxinas (100nM IAA). El resultado demostró que los niveles de transcritos del gen *PER44* en plantas Wt Col-0, se duplicaron con el agregado de auxinas (Fig. 16R.B). Mientras que, en las líneas mutantes simples *rs14-1* y *rs12-1* los niveles de transcritos del gen *PER44* fueron mucho más bajos con respecto al control Wt Col-0. Con el agregado de auxinas, a las mutantes *rs14-1* y *rs12-1* los niveles de transcritos de las *PER44* alcanzaron los niveles normales (iguales al Wt Col-0 sin el agregado de auxinas) (Fig. 16R.B). Este resultado explica porque se recuperan el fenotipo y los niveles de $_{cit}ROS$ aproximadamente a niveles normales con el agregado de auxinas a las simples mutantes *rs14-1* y *rs12-1* (Fig. 16R. B,C). Los *primer* utilizados para realizar las distintas qPCR están listados en la tabla 4M.

Estos resultados en conjunto demostraron que tanto RSL2 como RSL4 median la respuesta de la planta a auxinas. Aunque estudios previos afirman que sólo RSL4 y no así RSL2 es regulado positivamente por esta fitohormona (Yi, Menand et al. 2010), en esta tesis las evidencias demuestran fuertemente que ambos FT son regulados por auxinas y son necesarios para la regulación de la homeostasis de ROS indispensable para

la elongación celular. Se demostró que RSL4 es capaz de regular positivamente, mediante la unión directa a las regiones promotoras de los genes *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73*, activando su transcripción y que esto permite aumentar su actividad. Las *PER_{III}*, junto con las NOXs son las responsables de la producción de anión O_2^- contribuyendo mayoritariamente al homeostasis de $citROS$ necesaria para mantener el crecimiento polarizado de los pelos radicales. Aún queda por confirmar el rol preciso de RSL2 en la promoción de ROS, aunque podría regular también a los genes *PER_{III}* debido a las evidencias que demostraron su importancia en la regulación de los niveles de $citROS$ (Fig. 16R.A,B). También, queda por dilucidar el mecanismo de acción que tienen las auxinas en este proceso.



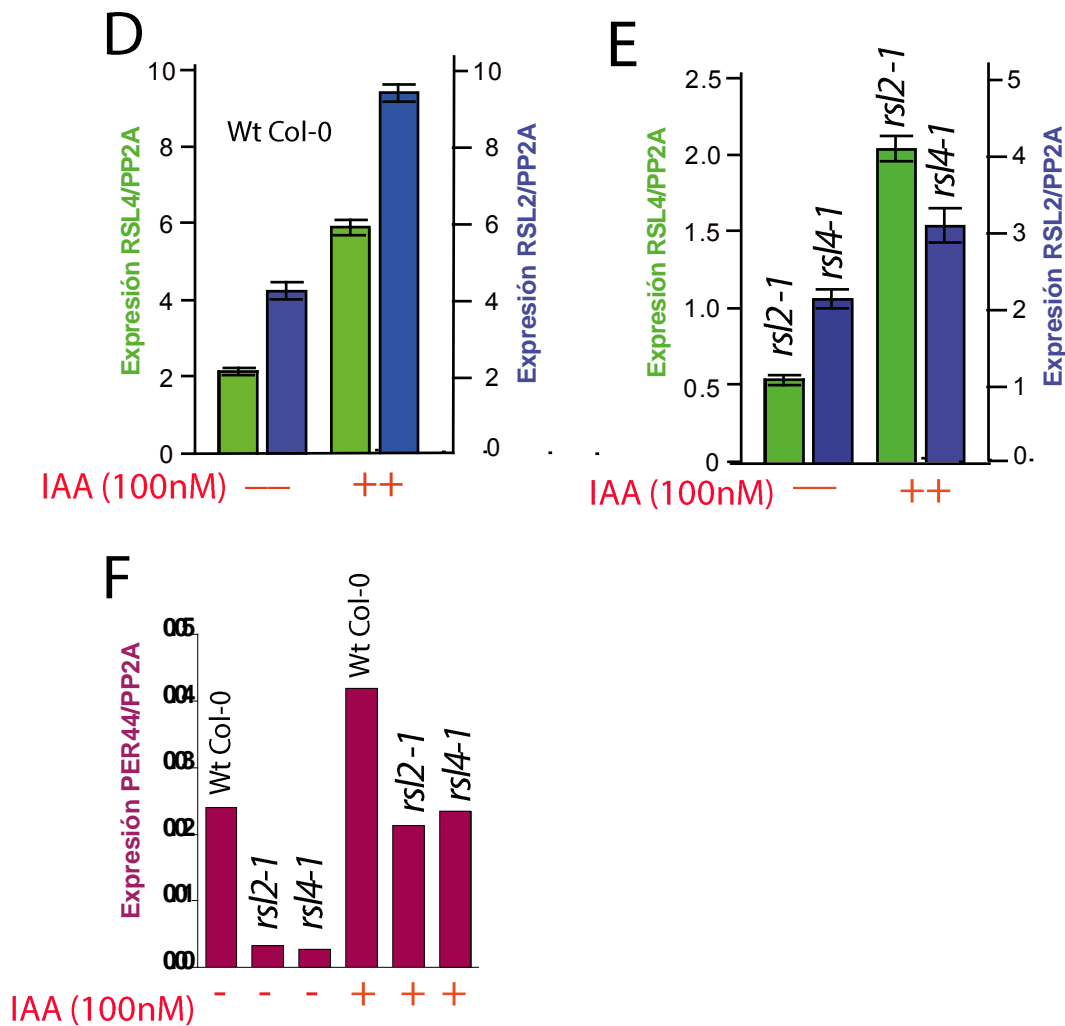


Figura 16R: Regulación mediada por IAA en *rsl4-1*, *rsl2-1* y *rsl2-1 rsl4-1*. **A)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0, *rsl4-1*, *rsl2-1* y *rsl2-1 rsl4-1* cuando se agregó o no en el medio de crecimiento 100nM IAA (media \pm s.e.m., n=40). A la derecha se muestra el fenotipo de pelo radical. Barra de escala: 700 μ m. NT= No Tratada. **B y C)** Análisis cuantitativo de 2 ROS obtenido mediante señal emitida por la oxidación de H₂DCF-DA en pelos radicales de plantas Wt Col-0 y *rsl2-1* **B)** y de plantas Wt Col-0 y *rsl4-1* **C)** cuando crecen en un medio con el agregado o no de 100nM de IAA. A la derecha señal de ROS generada por la oxidación de H₂DCF-DA en Wt Col-0, *rsl4-1* y *rsl2-1* cuando son tratadas o no con 100nM de IAA. NT= No Tratada. Barra de escala: 500 μ m. UA= Unidades Arbitrarias. ND=No detectado. *P*-valor de la prueba de ANOVA (*) *P*<0.01 (**) *P*<0.001. NS= diferencia No Significativa. **D)** Niveles de transcritos de *RSL4* (barras verdes) y *RSL2* (barras azules) relativos a PP2A detectados por qPCR en plantas Wt-Col 0, en presencia y en ausencia de auxinas (100nM IAA) **E)** Niveles de transcritos de *RSL4* (barras verdes) en plantas mutantes *rsl2-1* relativos a PP2A y niveles de transcritos de *RSL2* (barras azules) en plantas mutantes *rsl4-1* relativos a PP2A detectados por qPCR en plantas Wt-Col 0, en presencia (+) y en ausencia (-) de auxinas (100nM IAA) **F)** Niveles de transcritos de *PER44* relativos a PP2A detectados por qPCR en plantas Wt-Col 0, *rsl4-1*, *rsl2-1* en presencia (+) y en ausencia de auxinas (-) (100nM IAA) (media \pm s.e.m). *P*-value de one-way anova, (**) *P*<0.001. NS=Diferencia No Significativa

8.2 C) ARFs

Entonces, con estos resultados quedó demostrado que las auxinas estimulan la producción de ^{cit}ROS mediante el aumento en los niveles de transcripto de RSL4 quien es el encargado de activar la transcripción de los genes que codifican para las PER1, PER44, PER60 y PER73 aumentando su actividad y permitiendo el crecimiento del pelo radical de *Arabidopsis thaliana*. También se resalta el rol protagónico de RSL4 en este proceso. Aun así, queda una pregunta por responder: ¿Cuál es el mecanismo molecular que establece la conexión entre las auxinas, RSL4 y las PER_{III}? Se hipotetiza que la respuesta mediada por auxinas es llevada a cabo a través de los ARFs, los cuales activarían la transcripción de *RSL4*. Este último, regula así la transcripción de los genes que codifican para las PER_{III}.

Los ARFs interactúan con los sitios Aux-RE presentes en regiones regulatorias de diferentes genes. En ausencia de auxinas estos ARFs se encuentran inhibidos por los co-receptores de auxinas Aux/IAAs (Guilfoyle, Hagen et al. 1998). Por lo tanto, nos preguntamos en este trabajo si los ARFs regulan directamente la expresión de RSL4 uniéndose a sitios Aux-RE en su región promotora. Para validar esta hipótesis, mediante análisis de bases de datos *EFP Browser Toronto* se detectaron los ARFs que se expresaban en las raíces de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó la herramienta de visualización “absoluta” (*Absolute mode*) de *EFP Browser Toronto* en donde el nivel de expresión del gen en cada tejido es directamente comparable con la señal más alta obtenida del propio gen. Bajos niveles se colorean en amarillo y altos niveles en rojo (Winter, Vinegar et al. 2007).

Si bien sólo ARF7 muestra una marcada expresión en pelos radicales, se observó que ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 se expresan la zona meristemática y en la zona de elongación de la raíz (Fig. 17R.A). Aunque solo ARF7 muestra una marcada expresión en pelos radicales, en esta tesis se tuvieron en cuenta los todos los ARFs que aparecían expresados en células epidérmicas de la zona de expansión de la raíz. Se hipotetizó que estos ARFs serían capaces de afectar la diferenciación celular y definir el destino celular a tricoblasto. Es por esto, que en esta tesis se tuvo tanto en cuenta los ARFs que se expresan en pelos radicales como en otras células de la epidermis de la zona de elongación de la raíz. Con el fin de corroborar los datos obtenidos a partir de las bases de datos, se utilizaron líneas reporteras de estos ARFs: pARF5::SV40-3xGFP, prARF5::GUS-GFP, pARF7::SV40-3xGFP, prARF8::SV40-3xGFP y pARF19::SV40-3xGFP (Rademacher, Möller et al. 2011) (Tabla 2M). Para la generación de estas líneas se fusionaron aproximadamente 2000pb río arriba de sitio de inicio de la transcripción de la región promotora de cada uno de los genes *ARFs* al reportero SV40-3xGFP o en el reportero GUS-GFP (para el caso del promotor de *ARF5*). Debido a que SV40 genera una señal de localización nuclear, las 3 proteínas GFP concadenadas se localizan exclusivamente en el núcleo y produce señales fluorescentes fuertes que pueden

asignarse fácilmente a una célula individual (Rademacher, Möller et al. 2011). Se utilizó microscopía de campo claro y microscopía confocal para analizar GUS y GFP, respectivamente. Los datos experimentales coincidieron con la información obtenida en la base de datos de expresión (Fig. 17R. B). ARF7 se expresa en células meristemáticas y en pelos radicales, ARF8 en células de la zona de elongación de la raíz y ARF19 tanto en células meristemáticas como en células epidérmicas de la zona de elongación de la raíz. Se detectó expresión de ARF5 en células meristemáticas, pero no en pelos radicales mediante el uso del reportero SV40-3xGFP, sin embargo, se detectaron niveles bajos de expresión en pelos radicales por medio de la técnica de GUS (sección 21 de materiales y métodos) (Fig. 17R. B).

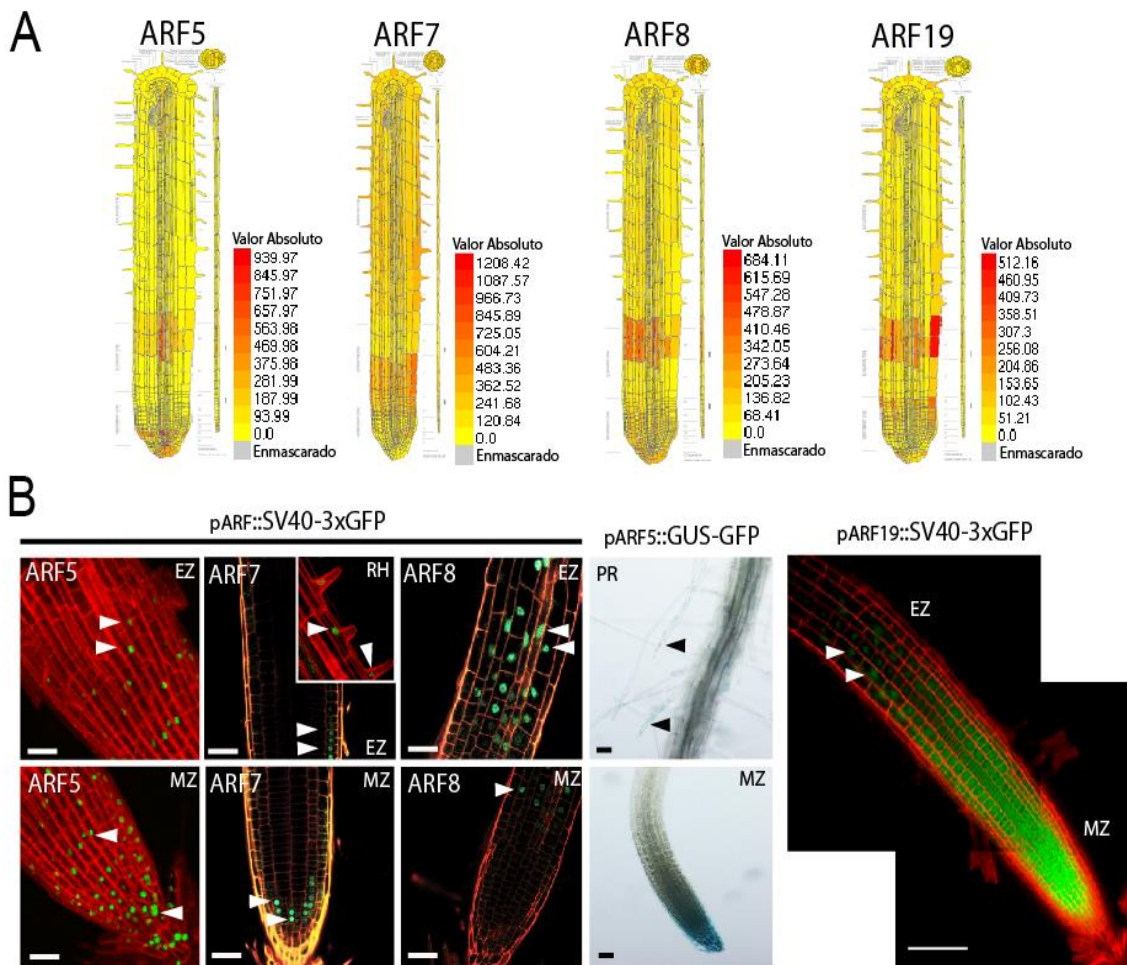


Figura 17R: Niveles de expresión de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 en células de la raíz. A) Niveles de expresión absolutos de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 según *EFP Browser Toronto (Absolute mode)*. Los niveles se encuentran representados mediante un degrade de colores en el cual el rojo representa el valor máximo y amarillo el mínimo. **B)** Patrones de expresión de ARF5, ARF7, ARF8y ARF19 en las zonas meristemáticas (MZ), en la zona de elongación de la raíz (EZ) y en los pelos radicales (RH). Líneas reporteras de *Wt Col-0/ pARFs::SV40-3xGFP* fueron analizadas para ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 así como el reportero *pARF5::GUS-GFP*. La expresión de *GUS* se observó tanto en el ápice la raíz como en los pelos

radicales. Las flechas blancas señalan la expresión de GFP y las flechas negras señalan la expresión de GUS. Barra de escala= 100µm.

Como numerosos ARFs son expresados en las células tricoblásticas de *Arabidopsis thaliana*, (Bargmann, Vanneste et al. 2013) es de esperar un alto grado de redundancia funcional, haciendo difícil el estudio de estos mediante la utilización de mutantes insercionales de T-ADN. De acuerdo con esto se mostró previamente que la doble mutante *arf7 arf19* no presenta cambios en el fenotipo de pelo radical (Okushima, Overvoorde et al. 2005, Wilmoth, Wang et al. 2005). A esto, se le suma la imposibilidad de estudiar la simple mutante de *arf5* (Hardtke and Berleth 1998) ya que no presenta raíz y es letal embrionaria.

Por consiguiente, se optó por utilizar una estrategia de estudio diferente. Se generaron líneas transgénicas individuales en el *background* Wt Col-0 transformadas con diferentes construcciones de *ARF5*, *ARF7* y *ARF8* bajo el control del promotor fuerte específico de pelo EXPANSINA7 (p7) (Wt Col-0/ p7:ARF5^{OE}, p7::ARF7^{OE}, p7::ARF8^{OE}) (Tabla 2M). Esto permite generar niveles elevados de expresión de los ARFs en pelos radicales y comprobar si son capaces de promover el crecimiento de los mismos. Mediante qPCR se detectaron niveles aumentados de transcritos de cada uno de los ARFs sobre-expresados en comparación al control (Wt Col-0/p7::GFP) (Fig. 18R. B). Es decir, los niveles de transcritos de *ARF5* se encontraron 25 veces aumentados en la línea transgénica p7::ARF5^{OE} con respecto al control, los niveles de *ARF7*, 3 veces aumentados en la línea p7::ARF7^{OE} con respecto al control y *ARF8*, 7 veces aumentados en p7::ARF8^{OE} con respecto al control (Fig. 18R. B). Este aumento en los niveles de transcrito tiene un efecto directo en la elongación celular del pelo radical ya que todas estas líneas mostraron longitud de pelo radical más largo que el control p7::GFP (Fig. 18R. A). Estos resultados estarían indicando que estos ARFs actúan como un regulador positivo del crecimiento. Por otro lado, se detectó que los niveles de ^{cit}ROS se mantienen altos en etapas muy tardías del desarrollo de los pelos radicales (pelos con longitudes mayores a 700µm) (Fig. 18R. C). Esto indica que la sobre-expresión de estos ARFs mantienen el sistema de crecimiento de los pelos radicales encendido durante más tiempo, incluido la producción de ROS, generando pelos radicales más largos.

Como la expansión celular del pelo radical mediada por auxinas es llevada a cabo mediante el aumento en los niveles de expresión del FT RSL4 (Yi, Menand et al. 2010) y por otro lado, estudios previos muestran que *ARF5*, *ARF7* y *ARF19* actúan como activadores de la transcripción de sus genes blancos (Tiwari, Hagen et al. 2003) se quiso determinar si *ARF5*, *ARF7* y *ARF19* estarían estimulando la producción de RSL4. Para este propósito, mediante qPCR se midieron los niveles del transcrito de *RSL4* en las líneas sobre-expresantes de los ARFs. Se detectó un aumento significativo en los niveles transcrito de *RSL4* cuando se sobre-expresa *ARF5*, *ARF7* y *ARF8* (Fig. 18R.A) sugiriendo que estos ARFs regulan la expresión de RSL4.

Como la línea p7::ARF5^{OE} presentó niveles de transcripto de RSL4 mucho más elevados con respecto al control que las demás líneas sobre-expresantes de ARFs, así como cambios más drásticos en el fenotipo y niveles de *citROS*, se decidió determinar mediante un ensayo de CHIP-PCR si ARF5 es capaz de interactuar con el promotor de *RSL4* para activar su transcripción. Mediante un análisis bioinformático llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Nadra (IQUIBICEN-CONICET) se buscaron secuencias en *cis* de Aux-RE TGTCN[CG] y [GC]NGACA reportados con anterioridad (Lee and Cho 2006, Wang and Estelle 2014) 1000pb río arriba del sitio del inicio de la transcripción del gen de *RSL4*. Se encontraron 8 Aux-RE en la región promotora analizada (Tabla 3R).

Posición desde el codón de inicio de la transcripción.	Secuencia	Dirección
-863	GGTCTT	<i>Reverse</i>
-584	GGTCTC	<i>Reverse</i>
-575	TGTCCG	<i>Reverse</i>
-313	TGTCGT	<i>Forward</i>
-288	TGTCGA	<i>Forward</i>
-285	GGTCGA	<i>Reverse</i>
-209	TGTCGT	<i>Reverse</i>
-117	TGTCTC	<i>Forward</i>

Tabla 3R: Elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) en la región regulatoria del gen de *RSL4*. Elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) en las regiones regulatorias río arriba del inicio de la transcripción del gen de *RSL4*.

Luego, en colaboración con el grupo del Dr. Hyung-Taeg Cho se realizó el ensayo de CHIP-PCR. Para este, se utilizaron líneas transgénicas transformadas con una construcción de *ARF5* fusionado con *GFP* bajo el control de un promotor inducible por estradiol. El plásmido utilizado fue PMDC7 (Wt Col-0/*PMDC7::ARF5_GFP*) (Tabla 2M). Para la PCR se diseñaron cebadores que amplificaban 9 zonas del promotor de *RSL4* numeradas del 1 al 9 desde el comienzo de la secuencia estudiada. De estas, las zonas 2, 4, 6, 7 y 8 (posiciones -863, -584, -313, -288, -285, -209, -117) corresponden con las encontradas mediante el ensayo bioinformático previamente explicado y a su vez, en el ensayo de CHIP-PCR se detectaron enriquecidas (Fig. 18R. D). Con estos ensayos se demostró que ARF5 es capaz de interactuar con el promotor de *RSL4* y que esta interacción se refleja en un aumento en la transcripción del gen *RSL4*. Debido a que

tanto RSL4 como RSL2 mostraron estar involucrados en el crecimiento polarizado mediado por auxinas (Fig. 15R) surge la pregunta si los ARFs son capaces de regular a *RSL2*. Si bien el agregado auxina fue capaz de aumentar la transcripción de *RSL2* (Fig. 15R.D), no se realizaron estudios que muestren si los ARFs son capaces de interactuar directamente con la región promotora de *RSL2*, aunque la misma contiene tres sitios Aux-RE.

Con estos experimentos se pudo concluir que la respuesta a auxinas está mediada por diferentes ARFs (ARF5, ARF7, ARF8 y posiblemente ARF19), los cuales se unen y activan la transcripción de *RSL4* (y posiblemente *RSL2*). A su vez, *RSL4* es capaz de unirse y activar la transcripción de *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73*. Es posible que *RSL4* también sea capaz de regular la transcripción de *RSL2*. Finalmente, estas *PER*_{III} junto con las NOXs son las responsables de la producción de anión O₂⁻ que contribuye mayoritariamente a la homeostasis de citROS necesaria para el crecimiento polarizado de los pelos radicales (Fig.18R. E).

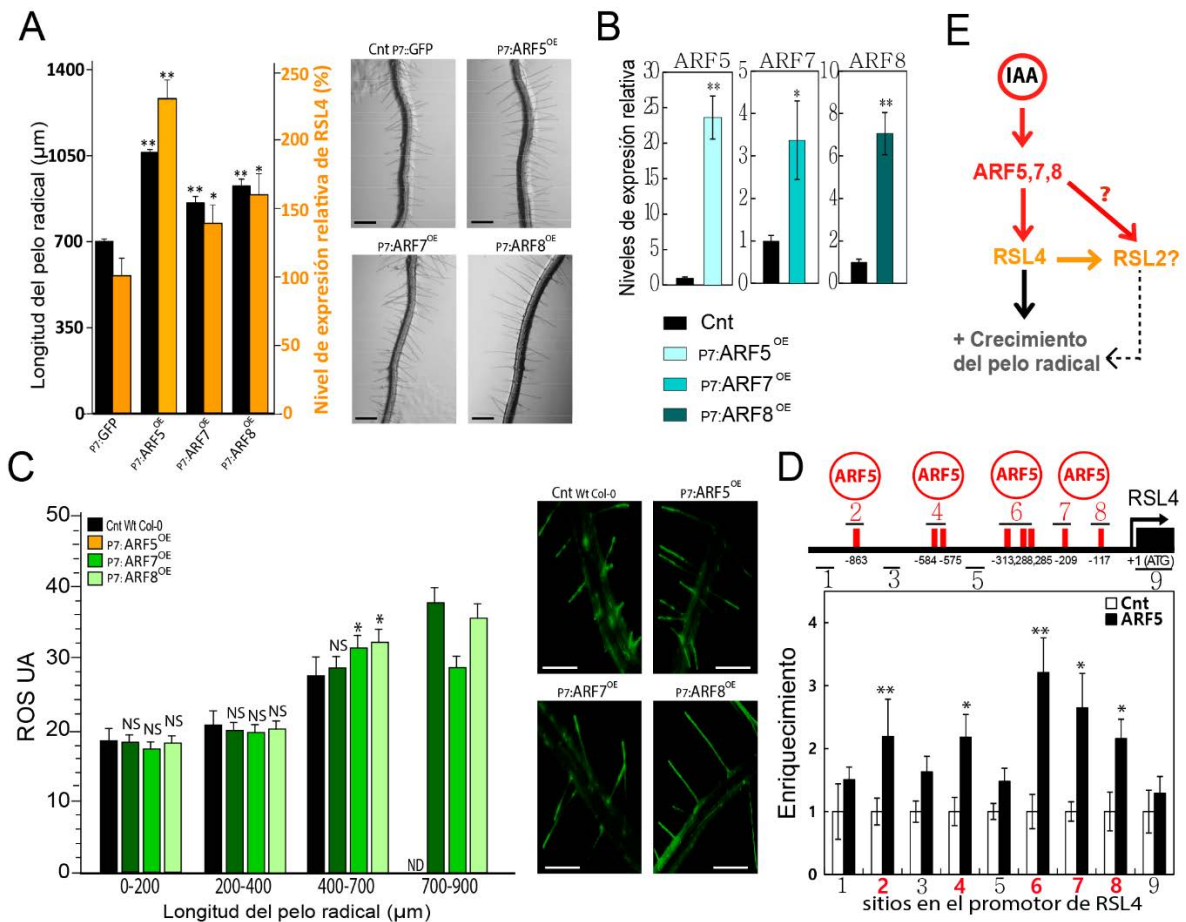


Figura 18R: Activación de la transcripción de RSL4 mediada por los ARFs. A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical (barras negras, media ± s.e.m., n=40) y niveles de transcritos relativos a PP2A de *RSL4* (media ± s.e.m., n=2) detectados por qPCR (barras naranjas) de plantas transgénicas que sobreexpresan GFP o ARF5 o ARF7 o ARF8 bajo el control del promotor fuerte de *EXP7* (p7:GFP como control, p7:ARF5^{OE}, p7:ARF7^{OE}, p7:ARF8^{OE}). NS= diferencia No Significativa. *P*-value de *one-way anova*, (**)

P<0.001, (*) P<0.01. A la derecha, fenotipo de pelo radical de las mismas plantas. Barra de escala: 900 μ m. **B)** Niveles de transcriptos relativos a PP2A de ARF5, ARF7, ARF8 en las líneas p7:ARF5^{OE}, p7:ARF7^{OE}, p7:ARF8^{OE} respectivamente (media \pm s.e.m., n=2). *T-test value* (**) P<0.01 (*) P<0.05 **C)** Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante la oxidación de la sonda H₂DCF-DA en los diferentes estadios del desarrollo de los pelos radicales de plantas Wt Col-0 y plantas transgénicas (p7:ARF5^{OE}, p7:ARF7^{OE}, p7:ARF8^{OE}). UA= Unidades Arbitrarias. NS= diferencia No Significativa. ND=No Detectado. *P-value* de *one-way anova*, (*) P<0.01. A la derecha, señal de ROS generada por la oxidación de H₂DCF-DA en las mismas plantas. Barra de escala: 300 μ m. **D)** Arriba, regiones en el promotor de *RSL4* amplificadas en el ensayo de CHIP numeradas del 1 al 9, como barras rojas se indican los sitios Aux-REs determinados mediante ensayos bioinformáticos. Abajo, enriquecimiento de cada región utilizada para hacer CHIP-PCR mostrada en plantas control y sobre-expresantes de pMDC7::ARF5_GFP. La expresión de ARF5 es inducible por estradiol. Como control se utilizó el vector vacío. Los valores son relativos a cada valor control. *T-test value* (**) P<0.001 (*) P<0.01 **E)** Eventos propuestos desde el aumento en la disponibilidad de IAA y la producción de ROS con el consecuente crecimiento del pelo radical.

Otro de los motivos por los cuales se produce la reversión del fenotipo y de los niveles de ^{cit}ROS observada en las mutante *rsl4-1* y *rsl2-1* con el agregado de 100nm de IAA exógena (Fig. 16R. A,B,C) podría ser la unión directa de los ARFs a los promotores de genes involucrados en la homeostasis de ROS, induciendo su transcripción. Por lo tanto, se buscaron en las regiones promotoras 2500pb río arriba de sitio de inicio de la transcripción de los genes de *PER1*, *PER 44*, *PER60* y *PER73* y del gen *NOXC* (que la principal NOX involucrada en la producción de O⁻) secuencias Aux-RE. Se encontraron varios posibles sitios Aux-RE en las regiones promotoras de estos genes (Tabla 4R). Probablemente, la regulación de la transcripción de los genes de *PER1*, *PER 44*, *PER60* y *PER73* podría ser regulada no sólo por *RSL4* y *RSL2* sino también por los ARFs. De todas maneras, estudios posteriores de CHIP-PCR y análisis de transcriptos por qPCR son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Gen	Posición desde el codón de inicio de la transcripción.	Secuencia	Dirección
PER1 <i>At1g05240</i>	-78	TGTCTC	<i>Forward</i>
PER44 <i>At4g26010</i>	-2039	GGTCTC	<i>Forward</i>
	-1828	GGTCTT	<i>Forward</i>
	-79	GGTCGA	<i>Reverse</i>
	-235	TGTCGA	<i>Reverse</i>
	-257	TGTCGA	<i>Reverse</i>
PER60	-115	GGTCTC	<i>Reverse</i>

<i>At5g22410</i>	-327	GGTCTT	<i>Reverse</i>
PER73 <i>At5g67400</i>	-448	GGTCTT	<i>Reverse</i>
NOXC <i>At5g51060</i>	-342	TGTCGA	<i>Reverse</i>
	-517	TGTCGT	<i>Forward</i>
	-1245	TGTCTC	<i>Forward</i>
	-2417	TGTCGA	<i>Forward</i>

Tabla 4R: Elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) en la región regulatoria de genes relacionados con la homeostasis de ROS. Elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) en las regiones regulatorias río arriba del inicio de la transcripción de los genes *PER1*, *PER44*, *PER60*, *PER73* y *NOXC*.

8.2 D) Efecto no transcripcional de auxinas en los niveles de ^{cit}ROS .

Se demostró que las auxinas inducen la elongación rápida de células en tallo, coleóptilo e hipocotilo en minutos después del tratamiento. Se cree que el efecto rápido es el resultado activación de una bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, que induce la eliminación de H^+ , acidificación extracelular, activación de expansinas y la subsecuente relajación de la pared celular. La activación de ATPasas produce una hiperpolarización en la membrana plasmática, activando canales dependientes de voltaje que contribuirían a la absorción de agua necesaria para la elongación celular. Nuevo material se integra dentro de la pared celular, mantenido la arquitectura de la misma durante la extensión celular (Perrot-Rechenmann 2010).

Por lo tanto, se testeó si las auxinas son capaces de desencadenar una respuesta rápida no transcripcional que impacte en la homeostasis de ROS ligada al crecimiento del pelo radical. Para ello se agregó *in vivo* $1\mu M$ de IAA a pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan *HyPer* y no se observaron cambios significativos en los niveles de $^{cit}H_2O_2$ durante los primeros 10 minutos posterior al agregado de la hormona (Fig. 19R. A). Para confirmar este resultado se realizó otro experimento que consistió en crecer plantas Wt Col-0 durante siete días en medio de crecimiento MS 0.5X y luz continua. Luego se aplicó un tratamiento con 100nM de IAA en MS 0.5X líquido y el tratamiento control (MS 0.5X líquido sin el agregado de IAA) durante 10 minutos. Se prosiguió a cuantificar los niveles de ^{cit}ROS utilizando $H_2DCF-DA$. No se observaron modificaciones en los niveles de ^{cit}ROS en plantas tratadas con IAA con respecto al control sin tratar con IAA (Fig. 19R. B).

En términos generales, los resultados sugieren que el principal blanco de auxinas es RSL4 (y posiblemente RSL2) y la activación transcripcional de genes relacionados con la producción de ^{cit}ROS involucrados en el crecimiento del pelo radical. No se puede

excluir la activación de algún blanco directo no transcripcional involucrado en la respuesta a IAA del pelo radical, aunque no se hallaron cambios significativos en $\text{citH}_2\text{O}_2/\text{citROS}$ luego de la estimulación con IAA al menos en las condiciones experimentales testeadas.

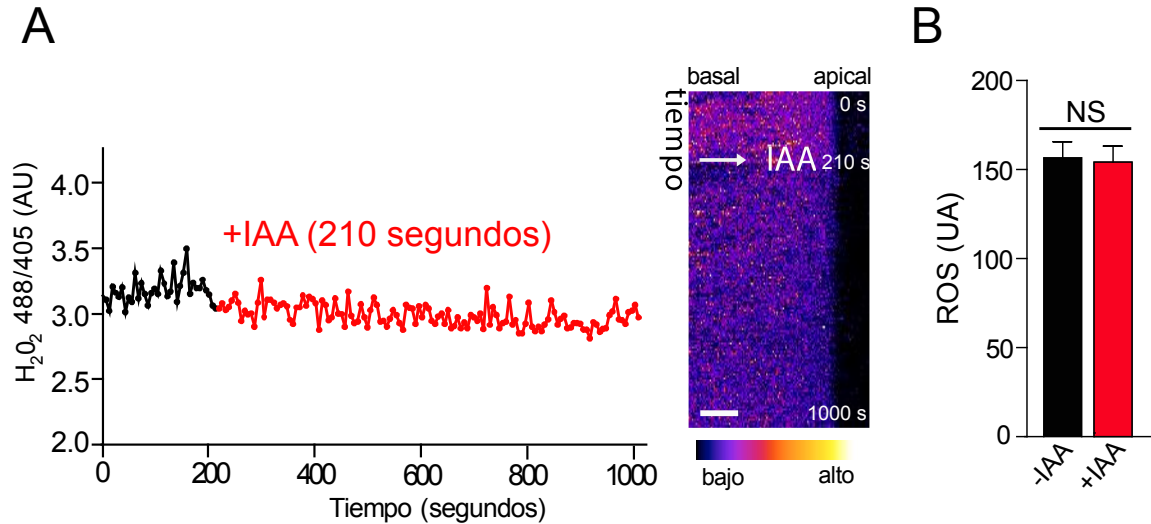


Figura 19R: Efecto no transcripcional de auxinas en los niveles de citROS . **A)** Análisis cuantitativo de los niveles de citH_2O_2 (488/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biosensor *HyPer* tratado con $1\mu\text{M}$ de IAA a los 210 segundos. A la derecha el *kymograph* correspondiente, la flecha indica el momento en el cuál se agregó IAA. **B)** Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante la oxidación de la sonda $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ de pelos radicales de plantas Wt Col-0 sin tratar y tratados por 10 minutos con 100nM de IAA. (media \pm s.e.m., $n=20$). NS= diferencia no significativa.

9. Transporte de ROS mediado por acuaporinas a través de la membrana plasmática.

Como se determinó previamente, las PER_{III} junto con las NOXs son las principales enzimas que contribuyen a la homeostasis de citROS . Las PER_{III} producen anión O_2^- en el apoplasto celular que es transformado a H_2O_2 mediante la acción enzimática de las SODs o de forma espontánea. El H_2O_2 resultante debe ser transportado al citoplasma para activar sistemas transportadores de Ca^{2+} necesario para la retroalimentación de ROS-Ca^{2+} que sostiene el crecimiento celular junto con muchos otros *targets*. (Loahavisit, Shang et al. 2012, Görlach, Bertram et al. 2015, Mangano, Juárez et al. 2016).

A pesar de que el H_2O_2 puede difundir libremente a través de la membrana, recientemente se ha indicado que las acuaporinas de tipo PIP (por *Plasma membrane Intrinsic Proteins*), que han sido descritas como las proteínas responsables del transporte de H_2O en las células vegetales, son capaces de transportar también H_2O_2 (Bienert, Møller et al. 2007, Dynowski, Schaaf et al. 2008, Tian, Wang et al. 2016). Se ha demostrado que ciertas isoformas de las PIP de *Arabidopsis*, que incluyen a AtPIP2;2 ,

AtPIP2;4, AtPIP2;5 y AtPIP2;7, son permeables a H₂O₂ cuando fueron expresadas en levaduras (Dynowski, Schaaf et al. 2008, Hooijmaijers, Rhee et al. 2012) y que la isoforma AtPIP1;4 es capaz de transportar H₂O₂ en respuesta a infección por patógenos bacterianos en ensayos realizados *in planta* (Tian, Wang et al. 2016).

El patrón de expresión de las 13 PIPs presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Johanson, Karlsson et al. 2001) indicó que *AtPIP2;4* y *AtPIP2;7* se encuentran altamente expresadas en las células de los pelos radiculares. Si bien, distintos trabajos muestran que estas dos PIPs pueden transportar H₂O₂ (Dynowski et al., 2008; Hooijmaijers et al., 2012) aún no se ha estudiado si existe alguna vinculación entre el transporte de H₂O₂ asociado a las PIPs y el crecimiento polarizado del pelo radical.

Para evaluar esta posibilidad, se expusieron plántulas Wt Col-0 crecidas durante 10 días a dos inhibidores de acuaporinas por separado: cloruro de mercurio (20μM HgCl₂) y azida de sodio (10mM NaN₃) y se midieron los niveles de ^{cit}ROS de los pelos radicales utilizando H₂DCF-DA (ver sección 9.C de materiales y métodos). El mercurio se une a un residuo de cisteína ubicado en el centro del poro de la acuaporina ocluyéndolo (Preston, Jung et al. 1993, Kuang, Haller et al. 2001, Savage and Stroud 2007). La azida induce una acidosis intracelular, por bloqueo de la respiración a través de la vía del citocromo, lo que conduce al cierre de PIPs (Tournaire-Roux, Sutka et al. 2003). Con ambos inhibidores se observó, que los niveles de ^{cit}ROS disminuyeron drásticamente (aproximadamente un 80%) con respecto al control (Fig. 20R. A). Entonces, al bloquear las acuaporinas el pasaje de H₂O₂ desde el apoplasto hacia el citoplasma es impedido, lo que estaría indicando que este pasaje es posible gracias a la acción de estos transportadores.

Para corroborar estos resultados, se utilizaron plantas transformadas con el biosensor *HyPer* que permite hacer mediciones en tiempo real. Los niveles de ^{cit}H₂O₂ disminuyen luego del agregado de los inhibidores de acuaporinas en el pelo radical (Fig. 20R. B,C). Para verificar que este efecto sea debido a un impedimento del transporte de H₂O₂ se agregaron de manera secuencial 1μM H₂O₂- 20μM HgCl₂- 1μM H₂O₂. Con el primer agregado de 1μM H₂O₂ extracelular se observó un aumento en la señal del biosensor, lo que significa que la célula es capaz de detectar e incorporar H₂O₂ en el citoplasma. Al bloquear las acuaporinas con 20μM HgCl₂, los niveles de ^{cit}H₂O₂ detectados con el biosensor disminuyen rotundamente. Finalmente, al agregar nuevamente 1μMH₂O₂ extracelular, los niveles de ^{cit}H₂O₂ no volvieron a aumentar (Fig. 20R. D). Esto señala que las acuaporinas serían las responsables del transporte de H₂O₂ desde el apoplasto hacia el citoplasma. Por lo tanto, el O₂⁻ producido en el apoplasto por las PER_{III} y las NOXs es transformado mediante la intervención o no de las SOD en H₂O₂ el cual es transportado al citoplasma mediante las acuaporinas. Este transporte es necesario para mantener los niveles de ROS y Ca²⁺ citoplasmáticos que mantienen la expansión polarizada del pelo radical.

En *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas varias acuaporinas tipo PIP y estas se expresan en diversos tejidos. Se analizó *in silico* en de la base de datos *genevestigator* los patrones de expresión de las PIPs y se observó que en pelos radicales se expresan mayoritariamente PIP2;7 y PIP2;4. Se aislaron mutantes insercionales de T-ADN simples para ambas y se midió la longitud del pelo radical y $_{cit}ROS$, pero no se observó una diferencia significativa con respecto a Wt Col-0 (resultados no mostrados, resultados preliminares). Esto podría deberse a una redundancia de función de acuaporinas tipo PIP en *Arabidopsis thaliana*. En el laboratorio se está generando la doble mutante *pip2;4-1 pip2;7-1* para poder determinar si anulando la expresión de ambas en simultáneo se puede observar una alteración del transporte de ROS.

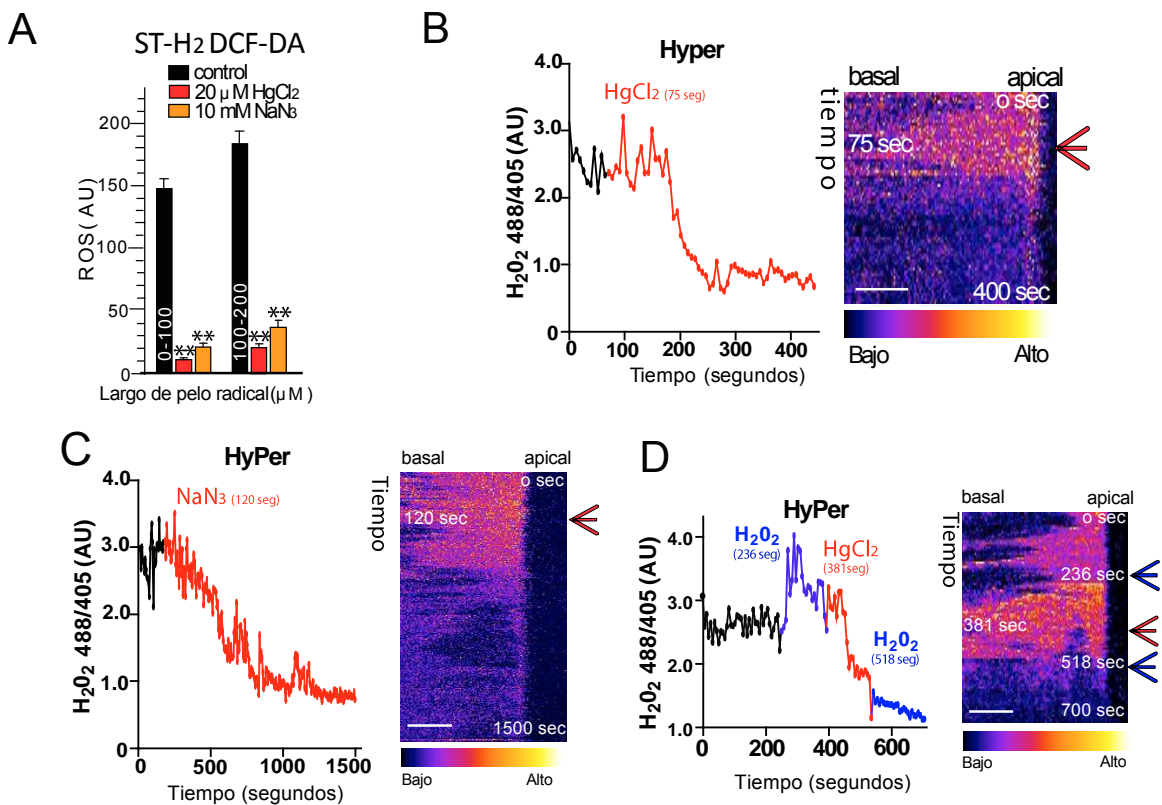


Figura 20R: Transporte de H₂O₂ mediado por las acuaporinas tipo PIP. **A)** Análisis cuantitativo de $_{cit}ROS$ obtenido mediante la oxidación de H₂DCF-DA en pelos radicales de plantas Wt Col-0 incubadas con 20μM de HgCl₂ o con 10mM de NaN₃ (media ± s.e.m., n=10). UA: Unidades Arbitrarias. *P*-valor de la prueba de ANOVA, (**) *P*<0.001. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo estadio de crecimiento. **B)** Niveles de $_{cit}H_2O_2$ (488/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biosensor *HyPer* tratado con 20μM de HgCl₂ **C)** o con 10mM de NaN₃. A la derecha, el *kymograph*, la flecha indica el momento en el que se agregó el inhibidor correspondiente. **D)** Niveles de H₂O₂ $_{cit}$ en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biosensor *HyPer* tratadas en orden con 1 μM de H₂O₂ extracelular, 20μM de HgCl₂ y con 1 μM de H₂O₂ extracelular. A la derecha, el *kymograph* las flechas indican en orden el momento del agregado de H₂O₂, HgCl₂ y H₂O₂ secuencialmente. UA=Unidades Arbitrarias. Escala de colores utilizada en el *kymograph*: FIRE. Barra de escala: 5μm.

Discusión

En esta tesis fue posible identificar a las PER_{III} involucradas en el desarrollo del pelo radical y demostrar la función que cumplen este proceso, así como su regulación transcripcional, utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana*. Las PER_{III} son enzimas que se caracterizan por presentar un grupo hemo y ser secretadas al espacio extracelular. Pero lo más destacado es que llevan a cabo tres ciclos enzimáticos diferentes (Fig. 9I. D), llamados ciclo peroxidativo, ciclo hidroxílico y ciclo oxidativo. (Welinder, Justesen et al. 2002, Passardi, Penel et al. 2004). Durante su ciclo peroxidativo, las PER_{III} usan H₂O₂ como agente oxidante para producir radicales libres en componentes fenólicos y glicoproteínas estructurales que pueden, en forma subsecuente forman enlaces covalente estables. Esta actividad contribuye a la rigidización de la pared celular y por lo tanto limita el crecimiento. Las PER_{III} pueden también causar la relajación de la pared celular mediante su ciclo hidroxílico, en el cual el H₂O₂ y el O₂ apoplástico es convertido por las PER_{III} en radicales hidroxilo •OH, que producen clivajes de polisacáridos en una forma no enzimática y un relajamiento general de la pared celular (Fig. 9I. D). Por lo tanto, las PER_{III} pueden cumplir roles opuestos en la expansión celular, siendo capaces de causar tanto la relajación como la rigidización de la pared celular dependiendo de las condiciones de crecimiento. (Chen and Schopfer 1999, Dunand, De Meyer et al. 2003, Passardi, Cosio et al. 2005). Finalmente, en el ciclo oxidativo las PER_{III} generan radicales super-óxido (O₂^{•-}) a partir de la reducción de ¹O₂ que puede ser dismutado a H₂O₂, ya sea espontáneamente o enzimáticamente mediante la SOD modulando así los niveles de apoROS (Fig. 9I. D).

1. Las PER_{III} en el crecimiento polarizado y su implicancia en los niveles de ^{cit}ROS.

La inhibición de las PER_{III} mediada por SHAM (inhibidor farmacológico de las PER_{III}) y mediciones con la sonda H₂DCF-DA, demostraron que las PER_{III} son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis de ^{cit}ROS que permite el crecimiento polarizado del pelo radical. Teniendo en cuenta el tiempo de vida media de cada una de las ROS, es probable que las acciones necesarias para la elongación celular estén mediadas por H₂O₂. Además fue demostrado en estudios previos que altos niveles de H₂O₂ están presente en el citoplasma durante el crecimiento polar (Monshausen, Bibikova et al. 2007). Para corroborarlo, se utilizó el biosensor *HyPer* que mide específicamente H₂O₂. El resultado indicó que los niveles de ^{cit}H₂O₂ fueron menores en

pelos radicales de plantas crecidas en medio suplementado con 75 μM de SHAM con respecto al control sin tratar con SHAM (Fig. 2R.B).

Por lo tanto, en base a estos resultados fue posible determinar que las PER_{III} mediante su ciclo oxidativo producen anión O^{2-} en el apoplasto celular y éste es transformado espontáneamente o mediante SOD a H_2O_2 durante la expansión del pelo radical. Aunque H_2O_2 se produce en el apoplasto, tiene influencia tanto en la pared celular como en el citoplasma (Monshausen, Bibikova et al. 2007, Mangano, Juárez et al. 2016). Existen evidencias que indican que las PER_{III} también producen ROS necesario para el crecimiento y la determinación del tamaño final de la célula (Bolwell, Blee et al. 1999, Cosio and Dunand 2008), lo que apoya estos resultados. El apoH_2O_2 producido, sería entonces, transportado al citoplasma celular por las acuaporinas tipo PIP (posiblemente AtPIP2;4 y AtPIP2;7). Este transporte sería necesario para promover el influjo de Ca^{2+} al citoplasma y que, a su vez, el aumento de Ca^{2+} citoplasmático libre estimula la producción de ROS. El gradiente de Ca^{2+} es necesario para la regulación del citoesqueleto de actina y la exocitosis de vesículas hacia el ápice del pelo radical que contribuyen a la generación de nueva membrana y pared celular (Fig. 2I). Se postula que existe una retroalimentación positiva entre citROS y citCa^{2+} necesaria para sostener este crecimiento polarizado (Cardenas 2009). Inclusive se ha descrito el mecanismo molecular de regulación positiva mediante el cual NOXC (RHD2) es activada por Ca^{2+} y que a su vez NOXC produce ROS en pelos radicales (Takeda, Gapper et al. 2008). Además, recientemente se determinó que la actividad de las PER_{III} está promovida por Ca^{2+} aunque no se sabe si esta es una regulación directa o indirecta (Plieth and Vollbehre 2012). Ensayos realizados con los inhibidores VAS2870 y SHAM en simultáneo demostraron que las PER_{III} contribuyen a la generación de ROS producido por parte de las NOXs durante la expansión polarizada del pelo radical (Fig. 3R.A,B). Estos ensayos también indicaron que, niveles muy bajos de ROS son suficientes para el inicio del desarrollo del pelo radical o quizás, ROS no sería requerido para esta etapa del desarrollo.

Para determinar cuáles son específicamente las PER_{III} involucradas en la homeostasis de ROS esencial para la expansión polarizada del pelo radical se realizó un análisis de co-expresión *in-silico*. Para ello se utilizaron genes de pared celular conocidos, importantes para el desarrollo del pelo radical como carnada. En la red, se pudieron detectar varias PER_{III} altamente co-expresadas con los genes carnada (Fig. 4R. A) y algunas de ellas no habían sido asociadas previamente con el desarrollo del pelo radical. También, se detectaron varios genes de EXTs que presentaban el motivo Tyr-X-Tyr que les permitiría formar uniones intermoleculares entre ellas mediante la acción de PER_{III} (Held et al., 2004; Cannon et al., 2008) conformando, una red en la pared celular de los pelos radicales (Cannon et al., 2008; Ringli, 2010; Lampion et al., 2011). Además, varias de ellas (EXT7, EXT11, EXT14, EXT16 y EXT18) demostraron ser cruciales para el correcto crecimiento del pelo radical (Velasquez, Ricardi et al. 2011). También se

identificó en la red de co-expresión al FT RSL4 (At1g27740), que es un regulador maestro del crecimiento del pelo radical (Yi, Menand et al. 2010, Datta, Prescott et al. 2015), ya que controla la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas requeridas para la morfogénesis del pelo radical. Consistentemente, estas mismas PER_{III} fueron identificadas a través genómica funcional en células tricoblásticas (Birnbaum, Shasha et al. 2003, Brady, Orlando et al. 2007, Deal and Henikoff 2010). Por lo tanto, gracias a estos dos enfoques, fue posible identificar a las PER_{III} que parecieran ser importantes para el desarrollo radical: PER1, PER2, PER8, PER44, PER60 y PER73. Si bien algunas de ellas ya habían sido asociadas al crecimiento del pelo radical (Lan, Li et al. 2013, Kwon, Sparks et al. 2015) no se determinó cuál es el rol que cumplen en este caso. Por otro lado, mediante el análisis de bases de datos como *EFP Browser Toronto* se observó que las PER_{III} detectadas en la red, se expresaban en abundancia en las raíces y en protoplastos de pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*.

Para obtener una evidencia *in vivo* se analizó la línea reportera del promotor de PER44 y se corroboró que la misma se expresa específicamente en células tricoblásticas, que luego van a dar lugar a pelos radicales. Se determinó también que PER44 es esencial para el desarrollo de los pelos radicales ya que su expresión decae cuando cesa el crecimiento máximo alcanzado. Mediante el análisis de línea mutantes insercionales de T-ADN se demostró que PER1, PER44, PER73 son las enzimas que se encargan de la producción de ROS necesario para el crecimiento del pelo radical. Las líneas simples mutantes *per1-2*, *per44-2* y *per73-3* presentaron pelos radicales más cortos que el control Wt Col-0 y una reducción (del 30% aproximadamente) en los niveles de ^{cit}ROS. La ausencia de fenotipos aditivos en las líneas múltiples mutantes, obtenidas mediante cruzamientos, con respecto a las mutantes simples demostró la existencia de algún mecanismo compensatorio en la producción de ROS necesario para la elongación celular. Es posible que se aumente la actividad del resto de las PER_{III} presentes en el pelo radical. Si bien previamente, AtPER1 y AtPER73 (Lan, Li et al. 2013) así como AtPER44 y AtPER57 (Kwon, Sparks et al. 2015) han sido asociadas al crecimiento del pelo radical, ya que los mutantes correspondientes presentaron pelos de longitudes menores al Wt Col-0, no se ha demostrado el rol específico que llevan a cabo en este proceso.

En base a estos resultados en su conjunto, se concluye que PER1, PER44 y PER73 son necesarias para mantener el crecimiento polarizado del pelo radical. Estas PER_{III} a través de su ciclo oxidativo, junto con las NOXs (NOXC, NOXH y NOXJ) producen O²⁻ en el apoplasto celular y éste es transformado espontáneamente o mediante SOD a H₂O₂. Éste último, es transportado por las acuaporinas tipo PIP hacia el citoplasma, lo que contribuye a la homeostasis de ^{cit}ROS y desencadena respuestas río abajo necesarias para mantener el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 1C).

2. Evidencias de la formación de la red de EXTs en la pared celular.

En las células vegetales, la secreción, el ensamblado, la rigidización y la relajación de los componentes de la pared celular impulsan los procesos de morfogénesis y mantienen la forma celular correcta de cada célula individual. Como ejemplos se puede mencionar las modificaciones de la pared celular que ocurren durante la lignificación de la endodermis en las bandas de Caspari (Lee et al., 2013), el desarrollo de los vasos xilemáticos (Oda and Fukuda, 2012), la liberación desde el tubo polínico de las células espermáticas durante la fertilización (Escobar-Restrepo et al., 2007; Boisson-Dernier et al., 2009) y la apertura y cerrado de las células estomáticas (Bergmann and Sack, 2007).

Durante la expansión polarizada del pelo radical, la pared celular debe ser suficientemente laxa como para permitir la expansión celular y lo suficientemente rígida para soportar grandes presiones de turgencia, lo cual les sirve para focalizar el crecimiento en ciertas direcciones. La pared celular está compuesta por polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, pectinas y HRGPs, entre las que se encuentran las EXTs. Las EXTs son glicoproteínas altamente repetitivas con motivos hidrofílicos rígidos de Ser-Hyp₄ O-glicosilados (Fig. 8I.A) y motivos hidrofóbicos potencialmente *crosslinkables*. Las modificaciones post-traduccionales de las HRGPs de tipo EXTs incluyen la hidroxilación de los residuos de prolina en 4-hidroxi prolina (4Hyp), la conversión de Pro en Hyp en la vía secretora, que modifica la conformación proteica y provee de grupos hidroxilos reactivos hacia modificaciones posteriores como la O-glicosilación. Los azúcares incorporados por la acción de glicosiltransferasas que están involucrados en esta glicosilación incluyen a oligosacáridos de tipo arabinósidos y unidades de galactosa (Egelund et al., 2007; Gille et al., 2009; Velasquez et al., 2011a; Velasquez et al., 2011b; Velasquez et al., 2012) (Fig. 9I.A). Las EXT O-glicosiladas que son secretadas en la pared celular podrían formar una red covalente ordenada (Fig. 9I.B) (Brady et al., 1998; Held et al., 2004; Cannon et al., 2008). La polimerización de las EXTs estaría mediada por PER_{III} específicas de pelo radical a través de su ciclo peroxidativo como se demostró *in vitro* (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996). Esta hipótesis se apoya en evidencias previas donde fue demostrado que moléculas de ${}_{apo}H_2O_2$ acopladas a la actividad de ciertas PER_{III} afecta directamente el grado de rigidización de la pared celular al oxidar compuestos de la pared celular permitiendo que se unan covalentemente mediante su ciclo peroxidativo, como es el caso de la unión de monolignoles para formar polímeros de lignina (Iiyama, Lam et al. 1994, Passardi, Penel et al. 2004, Lee, Rubio et al. 2013). Por otro lado, estudios previos demostraron que el H_2O_2 suministrado exógenamente inhibió la expansión del pelo radical, mientras que el tratamiento con quelantes de ROS (como por ejemplo, ácido ascórbico) causó el la ruptura del pelo radical (Monshausen, Bibikova et al. 2007), lo que refuerza la noción de que ${}_{apo}ROS$ modula el crecimiento celular al impactar en las propiedades de la pared celular (Fig. 1C).

En este trabajo se demostró mediante un alineamiento escalonado *in silico* que los residuos Tyr del motivo Tyr-X-Tyr presente en la secuencia peptídica de las EXTs son factibles de producir *crosslinking* formando enlaces IDT, pulquerosina y Di-IDT. Los enlaces IDT son intra-cadena, mientras que los enlaces pulquerosina e id-IDT son inter-catenarios. Las dimensiones de la unidad EXT más pequeña dentro de esta putativa red sugeriría que varias cadenas de EXTs estarían unidas mediante alineamiento lateral de hasta 6 moléculas (ancho promedio de alrededor de 10 nm y largo promedio de 127 nm) (Cannon et al., 2008). Teniendo en cuenta los datos aportados por este trabajo más las conclusiones descriptas previamente obtenidas con los experimentos de AFM para la AtEXT3 (Cannon et al., 2008), queda en evidencia la estructura dendrítica que apoya la hipótesis de una red 3D auto ensamblada de EXTs en la pared celular. Además, ya ha sido mostrada la existencia de una interacción directa entre EXT y pectinas, mediante AFM (Valentin et al., 2010), y también han sido sugeridas uniones químicas específicas entre ellos (Qi et al., 1995). Por otro lado, mediante *docking* se compararon las energías de interacción de AtPER44 y GvP1 con péptidos cortos de EXTs con distintos grados de modificaciones postraduccionales y en todos los casos, las energías de interacción obtenidos fueron similares para ambas PER_{III} (Fig. 9R.D), lo que permite sugerir que AtPER44 sería capaz de *crosslinkear* a EXTs en la pared celular (Fig. 1C).

Si bien se ha demostrado *in vitro* que los monómeros de EXTs son ensamblados en una red dendrítica por la actividad de una PER_{III} (Schnabelrauch, Kieliszewski et al. 1996), hasta el momento no hay disponibles modelos convincentes para los mecanismos *in vivo* que expliquen cómo se dan estas asociaciones durante el ensamblado de la pared celular. En esta tesis no se pudo demostrar, el *crosslinking* de EXTs *in vivo* en la pared celular del pelo radical, debido a limitaciones técnicas. Futuros experimentos han sido planteados para demostrar fehacientemente si PER1, PER44, PER60 y PER44 son capaces de *crosslinkear* EXTs en la pared celular durante el crecimiento polarizado del pelo radical.

3. Regulación transcripcional de las PER_{III}.

Las auxinas son fitohormonas que promueven la diferenciación y el desarrollo de los pelos radicales (Lee and Cho 2013, Velasquez, Barbez et al. 2016, Zhang, Huang et al. 2016). Las auxinas pueden actuar de manera rápida no transcripcional, como en el caso de la activación de la bomba de protones en la membrana plasmática y los canales iónicos también como en el caso de la reorientación de los microtúbulos, sin embargo, el mecanismo molecular es desconocido (Perrot-Rechenmann 2010, Paque and Weijers 2016). Las auxinas también pueden actuar a nivel transcripcional cambiando los niveles de expresión de miles de genes dando lugar a una respuesta fisiológica característica (Perrot-Rechenmann 2010, Weijers and Wagner 2016). El mecanismo de acción de la respuesta transcripcional, se basa en activar los ARFs que son los encargados de

activar/reprimir numerosos genes de respuesta a auxinas. Los ARFs se unen a elementos en *cis* de respuesta a auxinas (Aux-REs) en los promotores de genes de respuesta a auxinas (Guilfoyle, Hagen et al. 1998) (Fig. 6I).

En esta tesis, se determinó que las auxinas inducen el crecimiento del pelo radical estimulando la producción de ROS. Cuando las plantas fueron crecidas en un medio con 100nm de IAA exógena los niveles de $_{cit}ROS$ se mantuvieron elevados en etapas avanzadas del desarrollo de pelos radicales. Esto se debe a que, los pelos radicales mantienen toda su maquinaria activa permitiendo que el sistema de crecimiento polarizado mediado por ROS siga encendido por más tiempo. De esta forma, los pelos radicales alcanzan longitudes superiores a 800 μm (Fig. 14R). Mientras que, en plantas que crecen en un medio control sin el agregado de IAA exógena, a cierta longitud del desarrollo (aproximadamente 600 μm) los pelos cesan sus actividades fisiológicas de crecimiento por algún estímulo desconocido, detienen la producción de ROS y se detiene el crecimiento (Fig. 14R). Para confirmar estos resultados, se decidió bloquear completamente las fuentes de producción de ROS mediante el uso de los inhibidores farmacológicos SHAM y VAS2870 en presencia de 5 μM IAA exógena. Al boquear ambos tipos de enzimas, el pelo fue incapaz de responder a la presencia de IAA exógena y de retomar su crecimiento (Fig. 15R.C,D). Este resultado demostró que las auxinas estimulan la elongación celular del pelo radical estimulando la producción de $_{cit}ROS$ por parte de las PER_{III} y NOXs. La muy pequeña, pero aun detectable recuperación del crecimiento y de los niveles de $_{cit}ROS$ en presencia de ambos inhibidores más el agregado de IAA exógena (Fig. 15R.C,D) podrían estar sugiriendo la existencia de alguna otra fuente aún desconocida de ROS proveniente de otras enzimas apoplásticas por ejemplo oxalato oxidasas, diaminas oxidasas, lipoxigenasas, etc. Además, el tratamiento con auxinas rescató parcialmente el fenotipo y los niveles de $_{cit}ROS$ en la mutante *nox-1*, y rescató casi completamente las deficiencias de $_{cit}ROS$ y longitud de pelo en las dobles mutantes *noxh-3 noxj-3* y *per44-2 per73-3*. Esto se debe a que, la ausencia de una de las isoformas de NOXs sería compensada mediante la activación por auxinas de otras isoformas de NOXs y también por la activación de las PER_{III} . Para el caso de la mutante *per44-1 per73-3* ocurre lo mismo, la ausencia de dos isoformas de PER_{III} es compensada por el resto de las isoformas y también por la activación de las NOXs mediada por auxinas. Es importante destacar el rol protagónico la NOXC en el crecimiento polarizado del pelo radical mediado por auxinas ya que cuando NOXC no está presente, el agregado de IAA exógena es capaz de reactivar parcialmente el crecimiento mediado por la homeostasis de ROS. Esto indica que ambos tipos de enzimas productoras de ROS son indispensables para permitir el normal desarrollo del pelo radical. En base a estos resultados en su conjunto, se determinó que las auxinas estimulan el crecimiento polarizado a través de la producción de ROS por parte de las PER_{III} y de las NOXs (principalmente NOXC).

Por otra parte, se demostró que la respuesta a auxinas esta medida por la activación de la transcripción de los FTs RSL2 y RSL4 (de tipo bHLH). Cabe destacar que, RSL4 es considerado un regulador maestro de la diferenciación y de la elongación de los pelos radicales (Yi, Menand et al. 2010, Datta, Prescott et al. 2015) ya que es capaz de regular la expresión de múltiples genes clave necesarios para este proceso (Hwang, Choi et al. 2017, Marzol, Borassi et al. 2017). Mientras que RSL2 (89% idéntico a RSL4 en el dominio bHLH) también es requerido para el crecimiento del pelo radicular y se expresa simultáneamente con RSL4, sin embargo se considera que RSL2 tiene un papel menos importante que el RSL4 en la regulación de la elongación celular (Yi, Menand et al. 2010). En esta tesis se demostró que los niveles de transcripto de ambos FT se vieron aumentados en plantas Wt Col-0 en presencia de auxinas exógena con respecto al control sin el agregado de auxinas (Fig. 16R. D). Contrariamente a lo establecido previamente por Yi, Menand et al. (2010) que determinaron que sólo los niveles de transcripto de *RSL4* y no de *RSL2* aumentaron en presencia de auxinas exógena. Además, cuando se agregó IAA a los mutantes de *rsl4-1* y *rsl2-1*, el largo de pelo radical y los niveles de ^{cit}ROS de los pelos radicales se revirtieron a niveles de Wt Col-0 (Fig. 16.A,B,C). No obstante, esta reversión no se observó en la doble mutante *rsl2-1 rsl4-1* (Fig. 16.A,B,C). Estos resultados indican que tanto el FT RSL2 como RSL4 tendrían funciones parcialmente redundantes en la respuesta de pelos radicales a la presencia de auxinas. Por lo tanto, en este trabajo se destacó la importancia de ambos FT en el crecimiento del pelo radical mediado por auxinas vía homeostasis de ROS. Es posible que una vez que RSL4 está activo, estimule la expresión RSL2 (Yi, Menand et al. 2010, Datta, Prescott et al. 2015) y ambos actúen en conjunto para desencadenar el crecimiento polarizado mediado por ROS (Fig. 1C). Los efectores últimos en este proceso son las PER_{III} y las NOXs como enzimas productoras de ROS. Mediante Chip-PCR se demostró el FT RSL4 se une al RHE presente en los promotores de *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73* activando su expresión (Fig. 13R.A,B). De esta manera, aumenta la actividad peroxidasa manteniendo la homeostasis de ROS indispensable para la elongación polarizada del pelo radical. Esto se ve reflejado en la disminución de actividad peroxidasa en la línea mutantes *rsl4-1* (Fig. 13R. C). Por otro lado, el agregado de IAA exógena a plantas WT Col-0 elevó los niveles de transcripto de *PER44* (Fig. 16R.F). En concordancia con estos resultados, estudios previos demostraron que los niveles de transcritos de *PER1* y *PER73* se encuentran disminuidos en la línea mutante *rsl4* y aumentados en la línea sobre-expresante de RSL4 (Yi, Menand et al. 2010).

Las enzimas NOXC y NOXJ también son activadas directamente por el FT RSL4 (Mangano, Juárez et al. 2016, Marzol, Borassi et al. 2017). Además, recientemente se demostró que RSL4 se une a RHE y desencadena (directa o indirectamente) la expresión de 124 genes implicados en la homeostasis de ROS, la síntesis y remodelación de la pared celular, el metabolismo y la señalización, necesarios y suficientes para desencadenar el crecimiento del pelo radical (Vijayakumar, Datta et al. 2016, Hwang,

Choi et al. 2017). Aún no se conoce el rol específico de RSL2 dentro de la regulación de los genes PER_{III} y NOXs ni cómo actúa en cooperación con RSL4. Alternativamente, no se puede descartar que otros TFs también puedan actuar aguas debajo de auxina e independiente de RSL2 / RSL4 para modular las actividades de NOXs y PER_{III} y activar la producción de ROS necesaria para la elongación celular. Recientemente, se determinó que el mediador transcripcional PFT1 (MED25) regula la transcripción de un grupo de PER_{III} (distintas a las identificadas en este trabajo) afectando los niveles de ROS y el desarrollo del pelo radical (Sundaravelpandian, Chandrika et al. 2013), probablemente a través de un mecanismo que no involucra RSL4. Además otros FTs han sido descritos como reguladores de la expresión de las PER_{III} : KUA1 reprime directamente la expresión de un conjunto PER_{III} (AtPER7, PER8, PER10, AtPER30, AtPER35, AtPER44 y AtPER57) que regulan la homeostasis de ROS en el apoplasto, lo que determina el tamaño final de los órganos (Lu, Wang et al. 2014). El FT UPBEAT1 (UPB1) regula el equilibrio entre la proliferación celular y la diferenciación en el meristema de raíz regulando directamente la expresión de un conjunto de PER_{III} (AtPER39, AtPER40 y AtPER57) las cuales modulan el equilibrio de ROS entre las zonas de proliferación celular y la zona de elongación celular donde comienza la diferenciación (Tsukagoshi, Busch et al. 2010).

En esta tesis se estableció también, que los ARF5, ARF7, ARF8 (y posiblemente ARF19) están involucrados en el mecanismo de acción de auxinas en el pelo radical. Se determinó que el promotor de *RSL4* poseía numerosos elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE). Mediante Chip-PCR se demostró que ARF5 fue capaz de interactuar con el promotor de *RSL4* en varios de los sitios Aux-RE presentes en su región promotora. Ésta interacción estimularía la expresión de *RSL4* ya que la sobre-expresión de ARF5 presentó niveles elevados del transcritto *RSL4* con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 18R. A). Las líneas sobre-expresantes de ARF7 y de ARF8 también presentaron mayores niveles de transcritto de *RSL4* con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 18R. A) por lo que, probablemente también sean capaces de interaccionar directamente con el promotor de *RSL4*.

Para evaluar si las auxinas producen una respuesta rápida no transcripcional que impacte en la homeostasis de ROS ligada al crecimiento del pelo radical se llevaron a cabo experimentos a tiempos cortos con $H_2DCF-DA$ y con el biosensor *HyPer*. Los resultados demostraron que no se producen cambios significativos en los niveles de ^{cit}ROS y de $^{cit}H_2O_2$ durante los primeros 10 minutos posteriores al agregado de la hormona (Fig. 19R. A,B). Estos resultados refuerzan la idea de que las auxinas estimulan el crecimiento mediado por ROS provocando un efecto en la regulación transcripcional de los genes involucrados en este proceso (Mangano, Juárez et al. 2016) (Fig. 1C).

Por lo tanto, en esta tesis, fue posible determinar una conexión molecular entre la respuesta de los pelos radicales a auxinas con el crecimiento polarizado asociado al homeostasis de ROS, resaltando el rol fundamental que cumplen de las *PER1*, *PER44*,

PER60 y PER73 en este proceso (Fig. 1C). Fue posible demostrar que las auxinas (mediante ARF5, ARF7, ARF8 y posiblemente ARF19) estimulan la transcripción de los FT RSL2 y RSL4. RSL4 (y tal vez RSL2) se une al RHE presente en los promotores de *PER1*, *PER44*, *PER60* y *PER73* activando su expresión. De esta manera, aumenta la actividad peroxidasa, se genera $O_2^{\bullet-}$ que es dismutado a H_2O_2 y transportado al citoplasma por las acuaporinas tipo PIP. Por lo tanto, estas PER_{III} junto con las NOXs producen ROS indispensable para la elongación polarizada del pelo radical (Fig. 1C). Además, el $apoH_2O_2$ impactaría en la estructura de la pared celular ya que sería utilizado por las PER_{III} en su ciclo peroxidativo para *crosslinkear* EXTs. Las EXTs formarían una red unida covalentemente en la pared celular provocando la rigidización de la misma durante el desarrollo del pelo radical (Fig. 1C). Las PER_{III} , mediante su ciclo hidroxílico, pueden producir radicales hidroxilo $\bullet OH$, que producen clivajes de polisacáridos en una forma no enzimática (Fig. 1C). No está claro cómo efectos opuestos sobre los polímeros de la pared celular se coordinan durante el crecimiento polarizado (Passardi, Penel et al. 2004, Dunand, Crèvecoeur et al. 2007). Es posible proponer que las oscilaciones en el pH que ocurren durante el crecimiento (Monshausen, Bibikova et al. 2007) puedan estar regulando directamente la actividad catalítica de las PER_{III} como ocurre con las expansinas (McQueen-Mason and Cosgrove 1995, Cosgrove 2000). Siguiendo ésta línea de razonamientos, es posible proponer que el influjo de H_2O_2 desde el apoplasto al citoplasma también podría estar regulado por el pH. Existen evidencias que demuestran que la acidificación del citosol desencadena una reducción drástica en la permeabilidad del agua de varias acuaporinas tipo PIP (Byrt, Zhao et al. 2017). Por lo tanto, sería posible que las oscilaciones en el pH durante la expansión celular regulen directamente la actividad de las PER_{III} o bien, la entrada de H_2O_2 al citosol. Una vez que las moléculas de H_2O_2 se transportan al citoplasma, se desencadenan respuestas aguas abajo relacionadas con el crecimiento polar (Foreman, Demidchik et al. 2003, Takeda, Gapper et al. 2008).

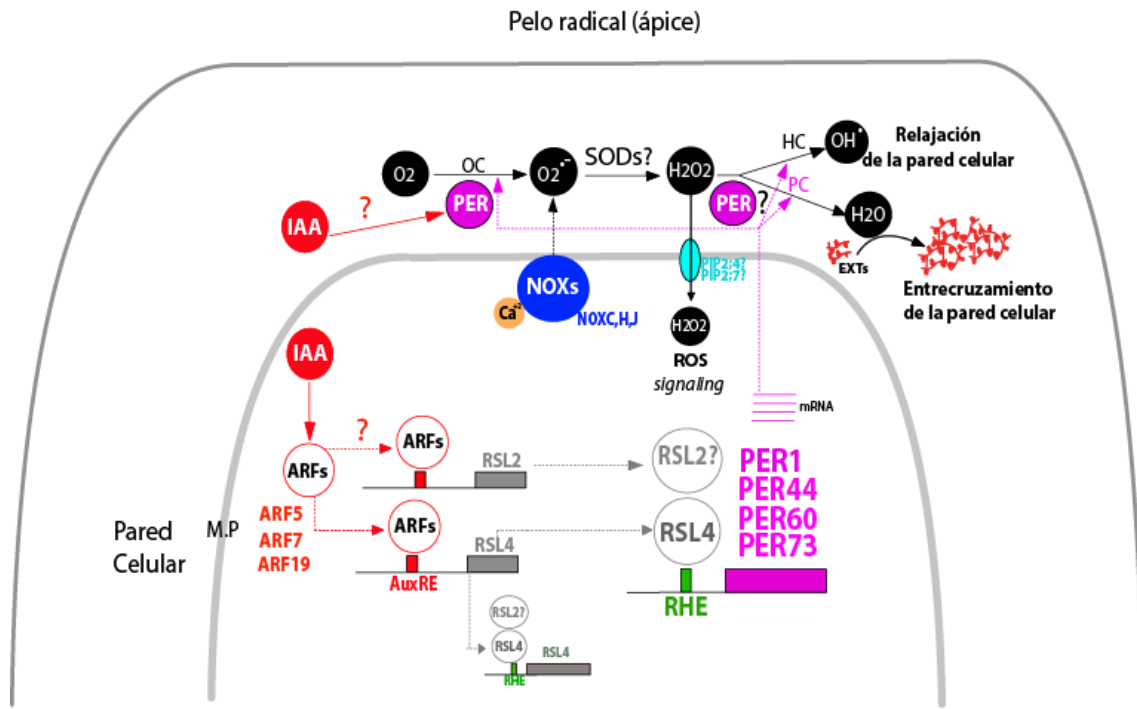
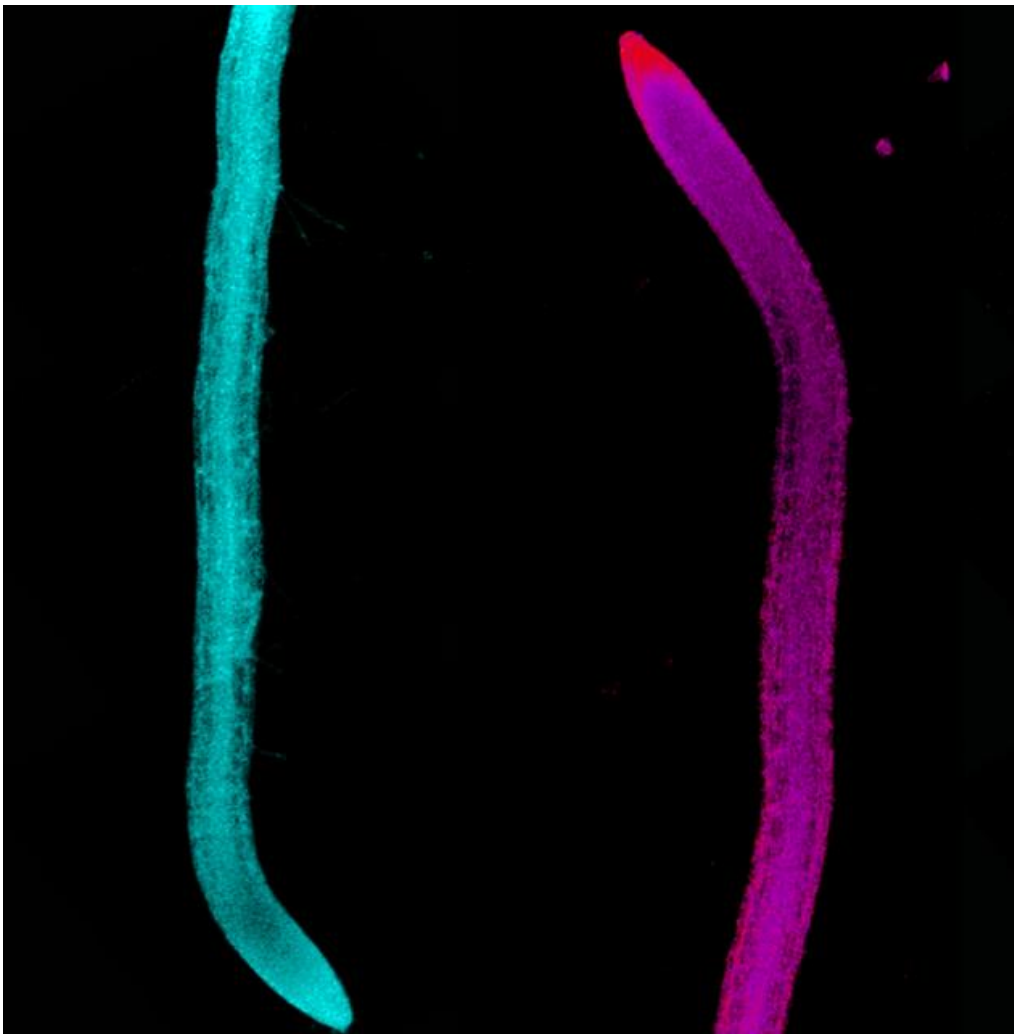


Figura 1C: Modelo propuesto para regulación del crecimiento mediado por ROS. Se observa todos los componentes propuestos para la regulación del crecimiento polarizado asociado con la producción de ROS en el apoplasto por parte de las NOXs y las PER_{III} en respuesta de la célula a auxinas. También se observa el rol específico que cumplen las PER_{III} en el entrecruzamiento de EXTs en la pared celular. MP=Membrana plasmática.

Capítulo 2

Identificación AtCEPs involucradas en el clivaje de EXTs durante el crecimiento polarizado del pelo radical.



Capítulo 2: Identificación AtCEPs involucradas en el clivaje de EXTs durante el crecimiento polarizado del pelo radical.

Resultados

1. Análisis de homología de secuencias

Las cisteína-endopeptidasas de tipo papaína (CysEP o CEP) son proteasas involucradas en la MCP. No se encontraron genes homólogos en mamíferos o levaduras aunque son ubicuas en plantas (Hierl, Vothknecht et al. 2012). Se caracterizan por presentar una señal de retención en el RE (KDEL) en el extremo C-terminal (CEP-KDEL) que les permite localizarse en vesículas derivadas de RE llamadas ricinosomas, en el caso del ricino. Las CEPs son sintetizadas como pre-pro-enzima, y son co-traduccionalmente transportadas al RE donde la pre-secuencia es removida y almacenada en los ricinosomas como enzima inactiva (pro-enzima). En los últimos estadios de la MCP se libera la pro-enzima de los ricinosomas debido al colapso vacuolar y la consecuente acidificación del citosol, desencadenando la maduración de la enzima. La enzima activa es capaz de clivar proteínas. En la fig. 20R.B se representa con un esquema la pre-pro-secuencia, la pro-secuencia y la secuencia de la enzima madura (Schmid, Simpson et al. 1998, Schmid, Simpson et al. 1999, Beers, Woffenden et al. 2000, Schmid, Simpson et al. 2001).

RcCysEP de ricino (*Ricinus communis*) ha sido la más estudiada (Schmid, Simpson et al. 1998). RcCysEP muestra una amplia e inusual especificidad de sustrato. El sitio de corte (representado con una flecha ↓) dentro de un sustrato se denota como P2-P1- ↓ -P1 -P2. RcCysEP, como es típico para las CEPs, tiene una clara preferencia por aminoácidos neutros con cadenas laterales alifáticas y no polares (Leu, Val, Met) o aromáticas (Phe, Tyr, Trp) en la posición P2 y no presenta una clara preferencia en la posición P1 (Than, Helm et al. 2004, Hierl, Höwing et al. 2014). La cristalización del RcCysEP purificada de ricino, como miembro fundador de CEPs (Schmid, Simpson et al. 1998) reveló que RcCysEP se pliega en dos dominios distintos de aproximadamente el mismo tamaño, como es habitual para las CEPs. El plegamiento de RcCysEP también es muy similar a la cisteína peptidasa específica de prolina del jengibre (*Zingiber officinale*). Sin embargo, la hendidura del sitio activo de RcCysEP, es más amplia en comparación

con la proteasa de jengibre y de la papaína (Than et al., 2004). Por lo tanto, RcCysEP presenta la capacidad de aceptar hidroxiprolinas glicosiladas cerca del sitio de clivaje, esto le brinda la habilidad de digerir EXTs. Esta capacidad fue demostrada mediante ensayos *in vitro* donde RcCysEP fue capaz de degradar EXTs purificadas de tabaco (Helm, Schmid et al. 2008).

Arabidopsis thaliana codifica para tres CEPs (AtCEPs) en su genoma. Estos genes se denominan *AtCEP1* (At5g50260), *AtCEP2* (At3g48340) y *AtCEP3* (At3g48350). Se realizó un alineamiento *in-silico* utilizando el software Mega.6 (<http://www.megasoftware.net/>) de las secuencias proteicas que son codificadas por los genes *AtCEP1*, *AtCEP2* y en comparación con RcCysEP. El resultado mostró que las secuencias de *AtCEP1*, *AtCEP2* y *AtCEP3* presentaron un alto porcentaje de identidad y de similitud con la secuencia que codifica para RcCysEP principalmente la secuencia de gen *AtCEP1* que presentó un 83% de identidad y un 74% de similitud con respecto a RcCysEP (Fig. 21R A). Los aminoácidos correspondientes al sitio activo se mantienen conservados (indicados con una flecha en la Fig. 21R. C). Este resultado sugeriría que la CEPs de *Arabidopsis thaliana* (CEP1, CEP2 y CEP3) podrían ser capaces de clivar EXTs en la pared celular tal como fue demostrado *in vitro* para su homólogo RcCysEP (Helm, Schmid et al. 2008).

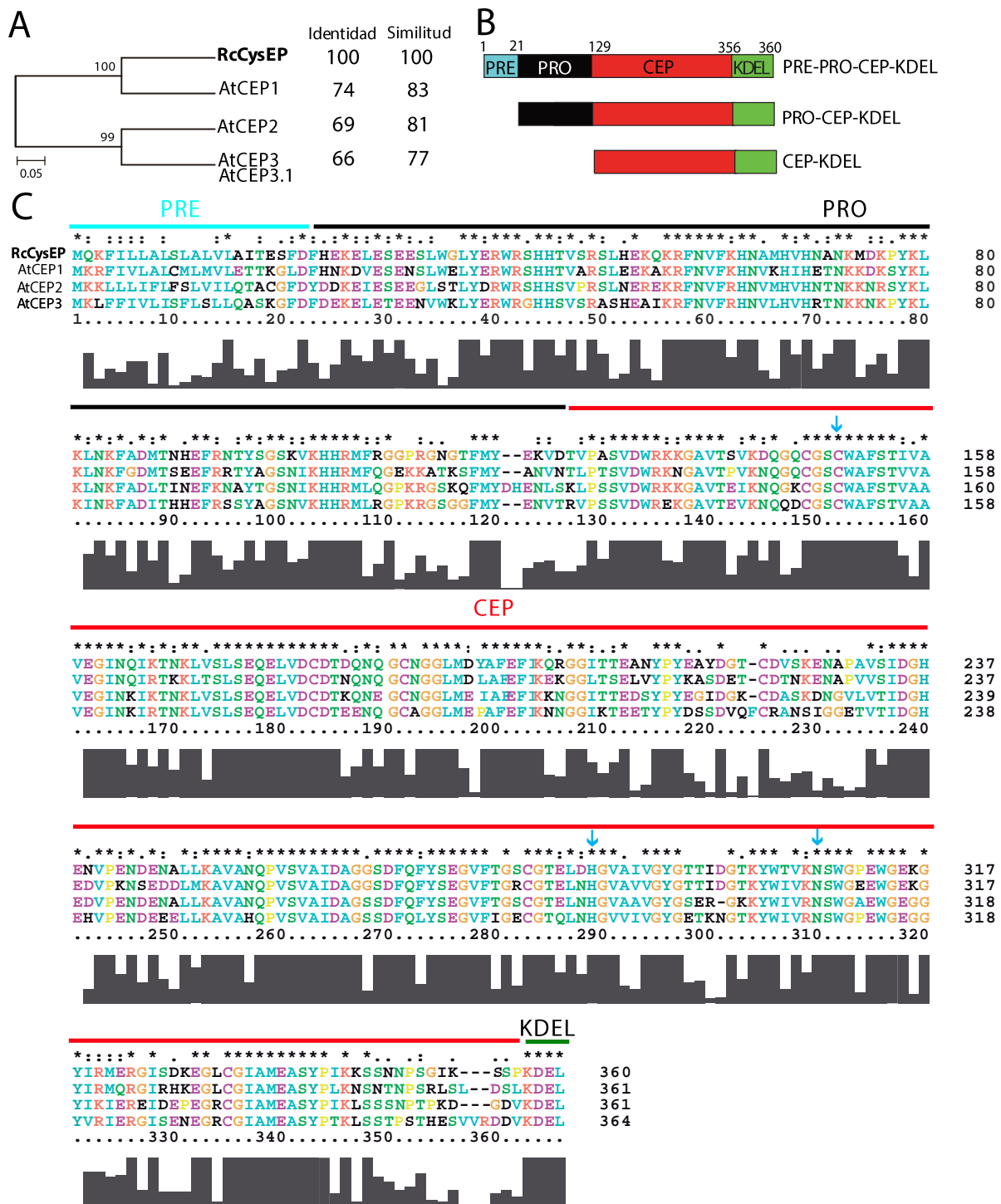


Figura 21R: Análisis de la secuencia proteica de CEPs. A) Árbol filogenético realizado con las secuencias proteicas de las CEPs (AtCEP1, AtCEP2, AtCEP3) presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* con respecto a la CEP de ricino (RcCysEP). B) Esquema ilustrativo de la pre-pro-secuencia, la pre-secuencia y la secuencia de la enzima madura de una AtCEP1. C) Alineamiento de las secuencias proteicas de AtCEP1, AtCEP2, AtCEP3 presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* con respecto a la CEP de ricino (RcCysEP). Los aminoácidos conservados pertenecientes al sitio activo se indican con una flecha azul.

2. Expresión de CEPs en pelo radical.

Mediante el análisis de bases de datos *EPF Browser Toronto* (<http://bar.utoronto.ca>) se observó la expresión de CEPs en las raíces y en protoplastos de pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó la herramienta de visualización “relativa” (*relative mode*) en donde el nivel de expresión del gen en cada tejido es normalizado con el obtenido para el gen At3g27340 que codifica para N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol de la familia de proteínas N-acetilasa (Winter, Vinegar et al. 2007). El análisis mostró que la expresión de CEP1 es abundante en pelos radicales que se encuentran en estadíos medios y avanzados del desarrollo. Mientras que, CEP3 presentó mayores niveles de expresión en los estadíos iniciales del crecimiento del pelo radical (Fig. 22R.A). También se estableció que los niveles más elevados de expresión en la raíz, tanto de CEP1 como CEP3 están en la zona de elongación (Fig. 21R.A). No hay información disponible para AtCEP2 en la base de datos de *EPF Browser Toronto*.

Para poder confirmar los datos obtenidos *in silico*, se utilizaron las siguientes líneas transgénicas reporteras del promotor: pCEP1::3xHA-EGFP-KDEL (Höwing, Huesmann et al. 2014) y pCEP2::3xHA-mCherry-KDEL (Hierl, Höwing et al. 2014) (ver tabla 3M). Las líneas fueron cedidas por la Dra.Christine Gietl (Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Freising, Germany). Las construcciones utilizadas contienen la región promotora 2kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción fusionado a un reportero fluorescente EGFP o mCherry. También contiene la etiqueta 3xHA (Hemaglutinina de influenza humana) y las secuencia PRE-PRO y KDEL pertenecientes a la proteína, aunque carece de la secuencia que codifica para la subunidad madura de la enzima, resultando ser un reportero transcripcional, pero no traduccional.

Estas líneas se caracterizaron en un microscopio confocal. Los resultados mostraron que la expresión de CEP2 se limitó a las células epidérmicas de la raíz, específicamente a las células tricoblásticas y no presentó expresión en células epidérmicas atricoblásticas ni en otras regiones de la raíz. También se determinó su expresión en pelos radicales durante todos los estadios del desarrollo del mismo (Fig. 22R.C). Mediante un análisis cuantitativo de los niveles de expresión de mCherry (ver sección de 17 de materiales y métodos) utilizando la línea pCEP2::3xHA-mCherry-KDEL se pudo discriminar la existencia de una expresión diferencial durante el desarrollo del pelo radical. Se observaron niveles más altos de expresión de CEP2 en etapas tempranas del desarrollo del pelo radical (Fig. 22R.D), lo que sugiere que se requiere de CEP2 en células que se expanden activamente. Además, este patrón de expresión coincide con el resultado del patrón de expresión de CEP3 obtenido a partir de la base de datos *EPF Browser Toronto* (Fig. 20R. A). Para el caso de CEP1 se pudo observar una marcada expresión en pelos radicales y en células epidérmicas de la raíz, sin embargo, no se ve una marcada diferencia en la expresión entre células epidérmicas tricoblásticas y atricoblásticas (Fig.22R. B). Es necesario llevar a cabo la cuantificación de la fluorescencia de este reportero para determinar si existen diferencias en los niveles de expresión entre los distintos estadios. Estos resultados indicaron que CEP2 se expresa específicamente en

células tricoblásticas, que luego van a dar lugar a pelos radicales. Además, tanto CEP1 como CEP2 son esenciales para el desarrollo de los pelos radicales. Posiblemente podrían estar actuando de manera secuencial durante este proceso: CEP2 estaría actuando en las primeras etapas del desarrollo del pelo y luego, CEP1 en los estadios finales del crecimiento del pelo radical.

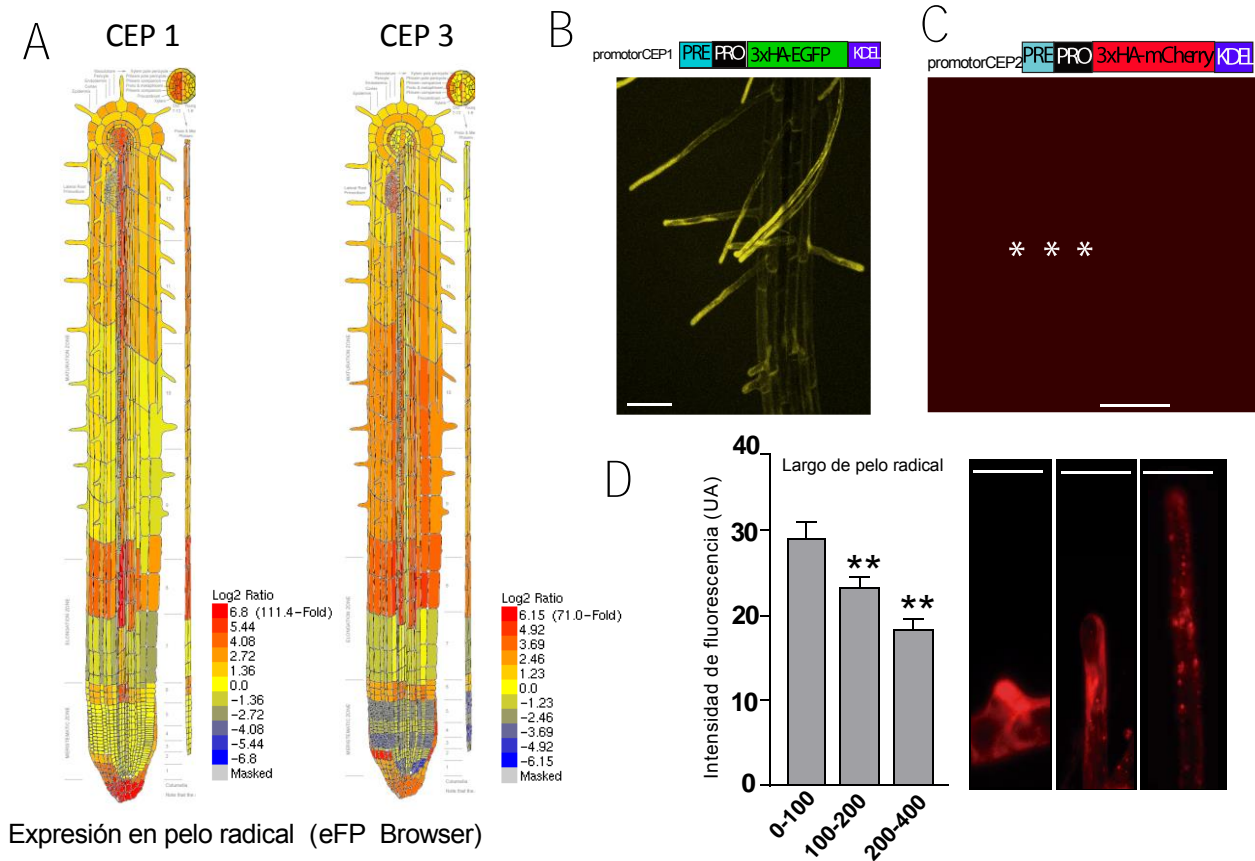


Figura 22R: Expresión del reportero de promotor de CEP. **A)** Patrón de expresión de CEP1 y CEP3 en la raíz de *Arabidopsis thaliana* basado en la herramienta *Arabidopsis EFP Browser*. Representado en valores relativos a At3g27340. **B)** Arriba, gráfico de la construcción utilizada para generar el reportero de promotor de CEP1. Abajo: expresión del reportero de promotor de CEP1 en células epidérmicas tricoblásticas y en pelos radicales. Barra de escala: 200 μ m **C)** Arriba, gráfico de la construcción utilizada para generar el reportero de promotor de CEP2. Abajo: expresión del reportero de promotor de CEP2 en células epidérmicas tricoblásticas, denotadas con asteriscos (*) y el pelos radicales en crecimiento. Barra de escala: 200 μ m. **D)** Cuantificación de la fluorescencia de mCherry expresadas en unidades arbitrarias (UA) en distintos estadios de crecimiento del pelo radical. Los asteriscos representan el P-valor de la prueba One-way ANOVA, (***) $P < 0.001$, NS: diferencias no significativas. Barra de escala: 100 μ m.

3. Análisis de los mutantes de T-ADN de CEPs

Arabidopsis thaliana codifica para tres CEPs por lo tanto, se obtuvieron y analizaron mutantes insercionales de T-ADN de los genes que codifican para CEP1, CEP2 y CEP3 (ver tabla 1M) con la finalidad de determinar el rol de cada una de ellas en el crecimiento polarizado del pelo radical. Estos mutantes se generaron mediante la inserción al azar en alguna región del gen, de una secuencia de transposón (T-ADN), lo que provoca una interrupción del gen en cuestión. Primero se comprobó la presencia de la inserción y que esta estuviese en estado de homocigosis (ver sección 2 de materiales y métodos). Luego, se realizó una PCR semi-cuantitativa (RT-PCR) para determinar los niveles de transcritos presentes en las líneas mutantes de CEP1 y CEP2 (ver sección 10.B de materiales y métodos). Los *primers* utilizados se encuentran listados en la tabla 4M. El sitio de pagado de los mismos está graficado en la Fig 23R.A. Para *cep2-2* y *cep1-3* no se detectaron niveles de transcritos, por lo que se consideran mutantes nulos. Para el caso de *cep2-1* y *cep1-2*, en cambio, sí se observaron niveles de transcritos, aunque mucho menores que los niveles WT por lo que la inserción del T-ADN logro un efecto *knock-down* en la transcripción del gen (Fig. 23R.B).

Se procedió a medir la longitud de pelo radical, como se muestra en la Fig. 23R.C, los mutantes *cep2-2* y *cep1-3* presentaron mayor longitud de pelo radical con respecto al control Wt Col-0. Ese resultado indica que las enzimas CEP1 y las CEP2 estarían involucradas o bien, en el desensamblado de la red de EXTs en la pared celular del pelo radical o llevando a cabo un control de calidad de las EXTs mal glicosiladas en el sistema secretorio (como fue planteado en la hipótesis) lo que termina impactando en el crecimiento. También es posible que las CEPs estén involucradas en la MCP por lo que, la ausencia de ellas, retrasaría este proceso permitiendo que el pelo continúe elongando y se refleja en el fenotipo observado. Tal como ocurre durante el desarrollo del grano de polen, en la mutante *cep1* donde la MCP del *tapetum* es retrasada resultando en un grano de polen con morfología anómala (Zhang, Sheng et al. 2014). Dada la ausencia de cambios en el fenotipo de pelo radical de las líneas mutantes *cep3-1* y *cep3-2* con respecto al control Wt Col-0, CEP3 pareciera no tener participación en procesos del desarrollo en el pelo radical. La falta o reducción de los niveles de transcrito en las mutantes *cep2-2* y *cep1-3* (lo que provoca una deficiencia de la proteína en cada caso) es causante del fenotipo observado. Para determinar si la pérdida de la funcionalidad de la proteína debido al gen *knockeado* en mutantes es efectivamente responsable del fenotipo observado, para el caso de la mutante *cep1-3* se midió el fenotipo de la línea mutante complementada: *cep1-3/ pCEP1::3xHA-EGFP-KDEL* cedida por la Dra. Christine Gietl (Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Freising, Germany) que presenta la secuencia que codifica para la proteína CEP1 bajo el control de su promotor endógeno (2,0 kb río arriba del codón de inicio de la transcripción) (ver tabla 3M). La construcción utilizada presenta también la etiqueta HA y la proteína verde fluorescente (Höwing, Huesmann et al. 2014) (Fig. 23R.E). Se observó, que la complementación fue capaz de

revertir el fenotipo completamente al nivel del Wt Col-0 (la longitud medida fue aún menor que el control Wt Col-0) (Fig. 23R. C), reafirmando así, que el fenotipo observado en la mutante *cep1-3* es debido a la deficiencia de la funcionalidad de CEP1. Con los resultados obtenidos hasta ahora se concluye que CEP1 y CEP2 son reguladores negativos del crecimiento del pelo radical, aunque aún queda determinar con precisión el rol de estas enzimas.

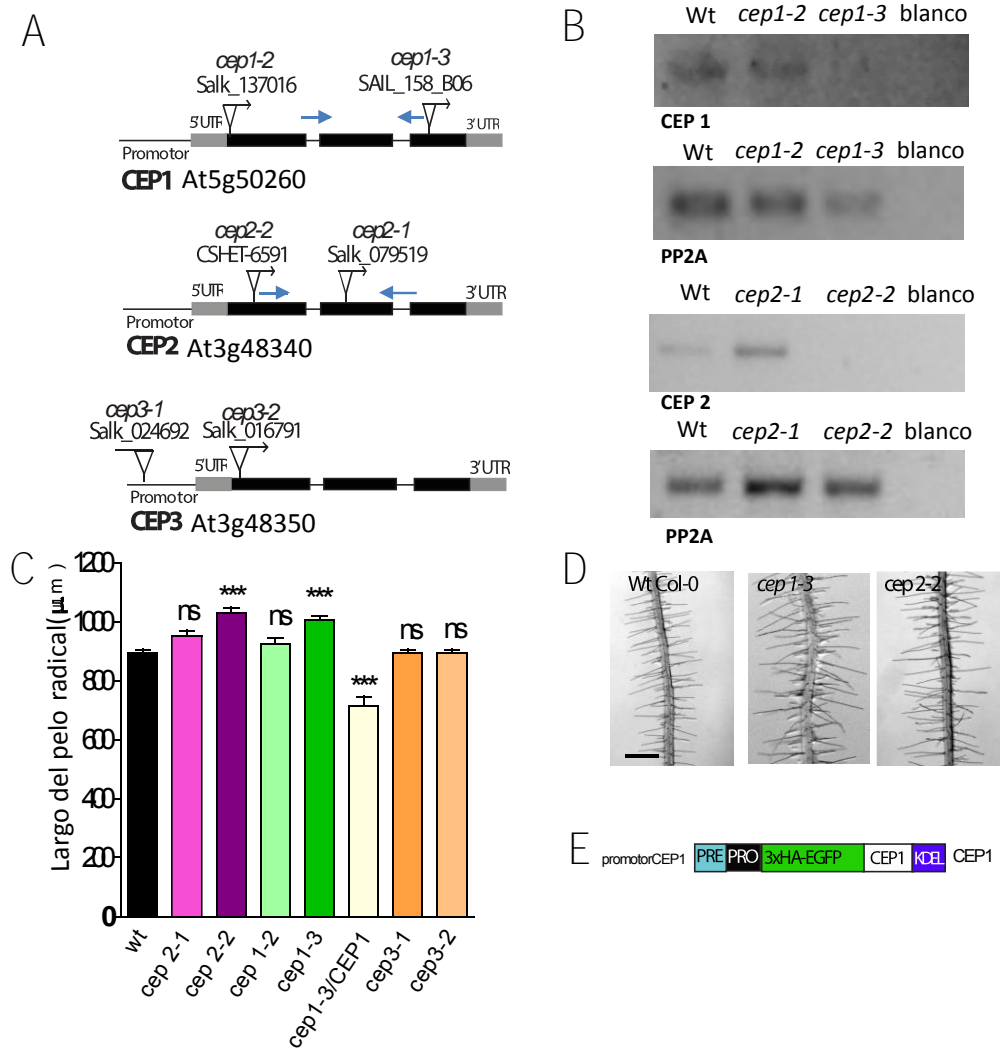


Figura 23R: Análisis de mutantes insercionales de T-ADN de CEPs. **A)** Estructura de los genes que codifican para las CEPs presentes en el genoma de *Arabidopsis*. Las cajas negras representan los exones y las líneas conectoras, los intrones. Se denota con un triángulo vacío el lugar de inserción del T-DNA de los mutantes analizados. Las flechas azules indican el sitio de unión de los *primers* utilizados para el análisis por RT-PCR. Los sitios de inserción del T-ADN son estimativos. **B)** RT-PCR de las mutantes insercionales de T-ADN de CEPs. Como control de carga se utilizó el gen correspondiente a la fosfatasa alcalina (PP2A). Blanco: agua **C)** Largo promedio de pelos radicales en los mutantes insercionales simples de T-DNA de las CEPs y de la línea complementada de CEP1 (*cep1-3/CEP1*) comparados con Wt Col-0. (media ± s.e.m., n=20-40). P-valores de la prueba de ANOVA: (*) P<0,01, (**) P<0,001, (***) P<0,0001. **D)** Imágenes seleccionadas de mutantes insercionales de T-ADN de CEPs y Wt Col-0 donde se muestra el fenotipo de pelo radical. Barra de escala: 500 µm y **E)** Esquema de la construcción utilizada para la complementación genética de la mutante insercional de T-ADN *cep1-3*. Promotor CEP1 (2.0 kb río arriba del codón de inicio

de la transcripción), los dominios PRE y PRO más 3xHA+EGFP y la secuencia codificante AtCEP1 incluyendo la señal de retención en retículo KDEL.

4. Localización subcelular CEP2

Como se mencionó anteriormente, las CEPs se sintetizan como pre-pro-enzimas y se transfieren cotraduccionalmente al ER, donde se elimina la pre-secuencia. Las CEPs puede almacenarse como enzimas inactivas en compartimentos derivados del ER. Se encontró un orgánulo esférico rodeado por una membrana única impregnada con ribosomas, con un diámetro promedio de 1 μm en tejido de endosperma senescente de ricino. Éste orgánulo, se descubrió en estudios ultraestructurales y citoquímicos de forma independiente por dos grupos en 1970. Se lo llamó "cisterna dilatada", ya que parecía desarrollarse a partir del RE (Vigil 1970) o "ricinosoma", ya que solo se encontraba en el poroto de ricino en ese momento (Mollenhauer and Totten 1970). Los ricinosomas fueron "redescubiertos" con la identificación de su enzima marcadora CEP (Schmid, Simpson et al. 1998). Los riciosinomas con su CEP han sido identificados por microscopía inmuno-electrónica en el endosperma de semillas germinadas de ricino (Schmid, Simpson et al. 1999, Schmid, Simpson et al. 2001), en la nucela de semillas de ricino en maduración (Greenwood, Helm et al. 2005), en pétalos de flores de *Hemerocallis* (Schmid, Simpson et al. 1999), en cotiledones de *Vicia sativa* (Becker, Senyuk et al. 1997), en ovarios no polinizados de *Pisum sativum* (Cercós, Santamaría et al. 1999), en anteras de tomate (Senatore, Trobacher et al. 2009) y en células del endospermas de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* (Trobacher, Senatore et al. 2013). Por lo tanto, la acumulación de CEPs y la aparición de ricinosomas se pueden utilizar como un pronosticador temprano de PCD. Sin embargo, no hay evidencia de la existencia ricinosomas en *Arabidopsis thaliana*, a pesar de numerosos intentos de aislamiento de tales organelas en esta planta modelo. Se demostró mediante el uso de marcadores moleculares de RE y ensayos de co-localización que tanto AtCEP1 como AtCEP2 se almacena en organelas que presentan membranas derivadas del RE en hojas para el caso de AtCEP1 y en la zona de elongación de la raíz y en la caliptra en el caso de AtCEP2 y dichas organelas fueron apodadas "ricinosomas-like" (Hierl, Höwing et al. 2014, Höwing, Huesmann et al. 2014).

Para determinar la localización subcelular de CEP2 se utilizó la línea transgénica pCEP2::3xHA-mCherry-CEP2-KDEL (ver tabla 3M). La misma consiste en un reportero funcional de la proteína CEP2. La construcción utilizada para generar la línea contiene la secuencia que codifica para la subunidad madura de la enzima CEP2 fusionado a mCherry bajo el control del promotor endógeno (2Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción), están incluidas las secuencias pre-pro enzima y la secuencia KDEL (señal de retención en retículo). También contiene la etiqueta 3xHA (Fig. 24R.A). Plantas transgénicas pCEP2::3xHA-mCherry-CEP2-KDEL fueron crecidas en medio MS 0.5X 0.8% agar planta pH 5.8 en luz continua (18-23°C) durante 8 días. Utilizando un microscopio confocal ZEISS LSM5 Pascal con la configuración adecuada para visualizar mCherry, se

procedió a la obtención de imágenes de pelos radicales sin plasmolizar (Fig. 24R.B) y plasmolisados con 0.8% manitol (Fig. 24R.C). La plasmólisis permite distinguir si la fluorescencia en el borde de la célula proviene del apoplasto, de la pared celular o del citoplasma. No se observó señal de mCherry en el espacio apoplástico ni en la pared celular cuando se llevó a cabo la plasmólisis, indicando que CEP2 no se localiza en estos compartimientos en las condiciones estudiadas. No se descarta que esta enzima pueda dirigirse a estos compartimientos especialmente a la pared celular mediante algún estímulo o condición específica como, por ejemplo, cambios en el pH celular. Ha sido demostrado *in vitro* que la enzima CEP adopta su conformación activa ante cambios en el pH celular inducida por la muerte celular programada (Hierl, Höwing et al. 2014).

La señal de mCherry se observó en estructuras redondeadas dentro de la célula lo que sugiere que la enzima CEP2 estaría dirigida a la vía secretora, posiblemente a los compartimientos del RE y/o de Golgi. Incluso fue demostrado con anterioridad que, durante la formación de caliptra en la raíz de *Arabidopsis thaliana*, CEP2 se localiza en organelas rodeadas por membrana derivadas del RE (Hierl, Höwing et al. 2014). Por otro lado, no existe un informe previo sobre la localización de las CEPs en el apoplasto o en la pared celular, lo que indica que las CEPs actuarían dentro de la ruta secretora para procesar sus sustratos. Futuros experimentos son necesarios para definir exactamente dónde se dirigen las CEPs dentro de las células. Se plantea llevar a cabo un ensayo de co-expresión de las proteínas AtCEP1 y AtCEP2 con marcadores del RE y Golgi. De todas maneras, estos resultados apoyan la hipótesis de que AtCEP1 y AtCEP2 residan en el ER donde es posible que puedan actuar como un componente del programa de control de calidad del estado de O-glicosilación y el plegamiento de las EXTs.

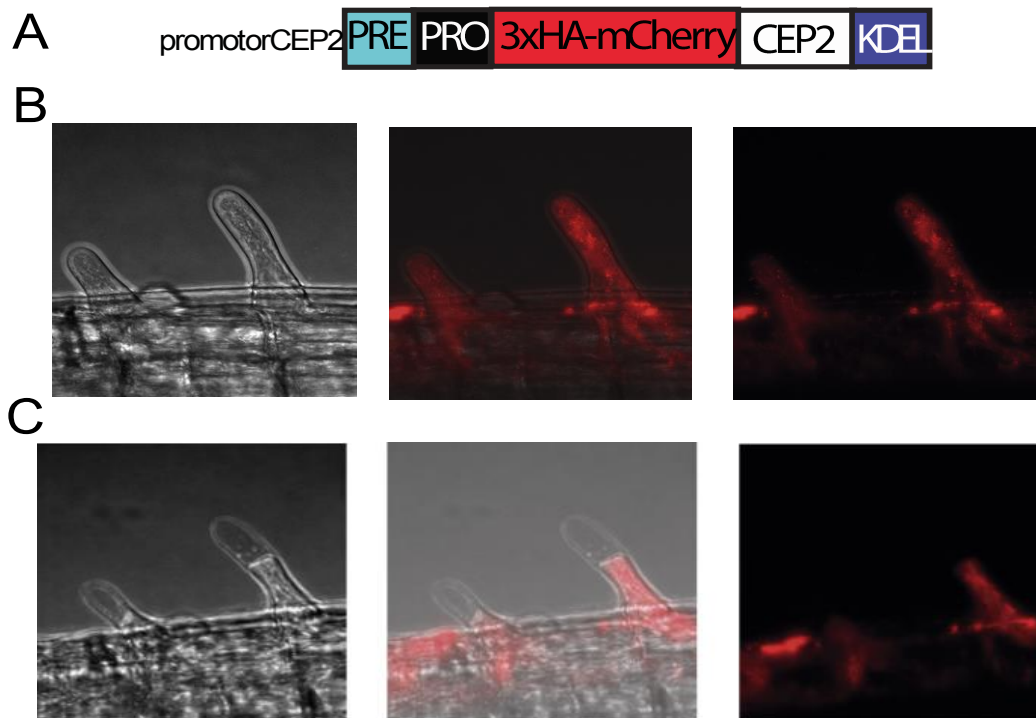


Figura 24R: Localización subcelular de CEP2. **A)** Esquema de la construcción utilizada para determinar la localización subcelular de CEP2: promotorCEP2::3xHA-mCherry-CEP2-KDEL, incluye el promptpre endógeno de CEP2 (2.0 kb rio arriba del codón de inicio de la transcripción) y los dominios PRE y PRO más 3xHA+mCherry y la secuencia codificante AtCEP2 incluyendo la señal de retención en retículo KDEL. **B)** Señal fluorescente de mCherry en pelos radicales (sin plasmolizar) de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0 transformadas con la construcción promotorCEP2::3xHA-mCherry-CEP2-KDEL **C)** Imágenes después de realizar plasmólisis con manitol 8% en un microscopio confocal. La señal de mCherry se localiza en esferas posiblemente derivadas del retículo endoplásmico el citoplasma. No hay señal de mCherry en la membrana plasmática ni en la pared celular. En B y C a la izquierda imagen con luz transmitida a la derecha señal de mCherry obtenida con microscopio confocal y en el centro la fusión de ambas imágenes. Barra de escala: 100 μ m

5. Interacción de AtCEP1 con péptidos de tipo EXTs mediante modelado molecular.

Para testear la factibilidad de una posible interacción entre péptidos de tipo EXTs y AtCEP1 se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Alejandro Nadra y Lic. Ariel Aptekman (FCEyN-UBA) los análisis *in silico* descritos a continuación. En este caso, se utilizó AtCEP1 porque presentó mayor porcentaje de identidad y de similitud con su homólogo RcCysEP en comparación con AtCEP2. En primer lugar, se generó un modelo estructural de AtCEP1 tomando como molde a las estructuras cristalográficas de una cisteína endopeptidasa de RcCysEP y una cisteína proteasa de *Ambrosia artemisiifolia* (pdb 1S4V y 5EF4 respectivamente). Una vez obtenido el modelo estructural, se realizaron las corridas de *docking* en dos etapas entre AtCEP1 y péptidos cortos de EXTs con distintos grados de modificaciones postraduccionales: sin modificaciones postraduccionales (SPPPPYVYSPPPYSPSPLVYY), hidroxilado pero no glicosilado (SOOOVYSOOOOYVYSPSPLVYY) siendo O=hidroxyprolina, solamente arabinosilado (SOOOVYSOOOOYVYSPSPLVYY arabinosilado) y completamente glicosilado (SOOOVYSOOOOYVYSPSPLVYY arabinosilado + galactosilado). Se llevó a cabo una primera etapa exploratoria sobre toda la superficie y luego, una segunda etapa de *docking* localizado, que se realizó sobre una región de la proteína AtCEP1 donde se obtuvieron los mejores *dockings* de la primera etapa (por energía y densidad de resultados sobre la zona). Luego de las corridas de *docking*, se analizaron los siguientes parámetros 1) la energía de interacción y 2) la diversidad en sitios de *docking* (relacionado con el RMSD por *root-mean-square deviation of atomic positions*). Los resultados se presentan en la Tabla 5R y en la Fig.25R. En base a estos análisis, AtCEP1 reconocería con mayor afinidad a péptidos cortos de EXT no hidroxilados y no glicosilados, en segunda medida a péptidos de EXT hidroxilados pero no glicosilados, y finalmente, con menor afinidad a las EXT glicosiladas solo con arabinosa y con arabinosa y galactosa. Si bien las diferencias en energía de interacción son relativamente pequeñas, la magnitud y el orden de preferencias son consistentes en todas las corridas de *docking*. Sin embargo, no aparece un único y/o claro surco de interacción y la cisteína candidata a ser catalítica (por homología) se encuentra "oculta" hacia el *core* de la proteína. Ambas características

dificultan deducir un putativo mecanismo de corte para lo que harían falta ensayos complementarios.

En base a estos resultados, podríamos postular que la AtCEP1 y tal vez las otras AtCEPs serían capaces de interactuar en forma diferencial con EXT no glicosiladas que con EXT completamente glicosiladas. Esto podría establecer una forma de censar el *estatus* de las EXTs en el RE y Aparato de Golgi durante su procesamiento, apoyando la hipótesis 2B planteada en esta tesis. Igualmente es necesario obtener mutantes de la AtCEP1 que validen cuál es la cisteína catalítica (y/u otros residuos) que afecten la afinidad de la enzima por el péptido EXT. De esta forma será posible definir con mayor precisión cual es el surco catalítico de unión al sustrato. Por otro lado, determinar si la AtCEP1 actúa como monómero o multímetro podría ayudar a descartar algunas zonas de interacción no específica. Trabajos futuros son necesarios para poder entender como es el mecanismo de acción de las AtCEP1 sobre los péptidos de tipo EXTs.

Tabla 5R: Análisis del *docking* de CEP1 con el péptido EXT

SPPPPYVYSPPPPYSPSPLVYY				SOOOVYSOOOOYSPSPLVYY arabinosilado			
Modo	Afinidad (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Modo	Afinidad (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
Promedio	-7.6	9.156	20.921	Promedio	-6	4.087	20.609

SOOOVYSOOOOYSPSPLVYY arabinosilado + galactosilado				SOOOVYSOOOOYSPSPLVYY			
Modo	Afinidad (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Modo	Afinidad (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
Promedio	-6.5	26.746	41.174	Promedio	-8.2	3.985	9.043

Los valores RMSD se calculan en relación con el mejor modo y usan solo átomos móviles pesados. Se proporcionan dos variantes métricas RMSD, RMSD. l.b (RMSD lower bound) RMSD. u.b (RMSD upper bound), que difieren en cómo se corresponden los átomos en el cálculo de la distancia: RMSD. u.b empareja cada átomo en una conformación consigo mismo en la otra conformación, ignorando cualquier simetría RMSD. u.b empareja con cada átomo en una conformación con el átomo más cercano del mismo tipo de elemento en la otra conformación.

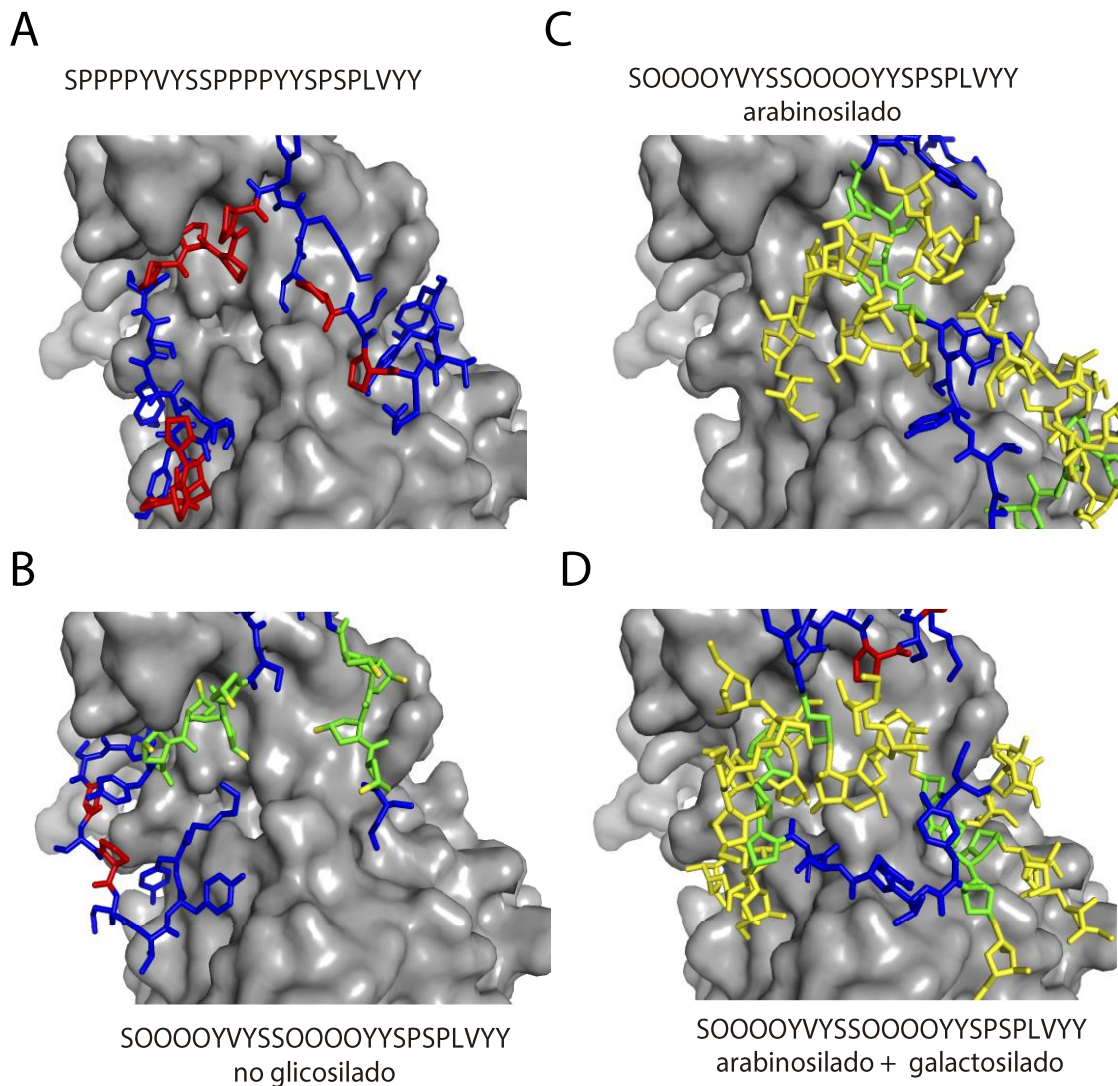


Figura 25R: Representación de superficie de CEP1 y su unión al sustrato, péptidos cortos de EXT con diferentes grados de modificaciones post-traduccionales. A) sin modificar B) hidroxilado pero no glicosilado C) solo arabinosilado D) completamente glicosilado (arabinosilado y galactosilado). En azul el esqueleto peptídico, en verde las hidroxiprolinas, los azúcares en amarillo y las prolinas en rojo.

6. NAC1 promueve la expresión de los genes *CEP1* y *CEP2* durante la organogénesis

El FT NAC1 (petunia NAM and Arabidopsis ATAF1, ATAF2, y CUC2), es miembro de la familia de factores de transcripción NAC (Aida, Ishida et al. 1997) que se caracteriza por presentar un dominio N-terminal conservado de unión a ADN y un dominio C-terminal de activación. NAC1 está involucrado en la regeneración de plantas y en la formación de raíces laterales (Xie, Frugis et al. 2000, Asahina, Azuma et al. 2011). Recientemente se demostró que NAC1 se expresa en respuesta al daño celular y promueve la formación

de raíces adventicias en explantos de hojas durante la organogénesis *de novo* (Chen, Cheng et al. 2016). La organogénesis *de novo* es un tipo de regeneración de plantas en el que se producen raíces y brotes adventicios a partir de órganos heridos y desprendidos. Esta habilidad les permite a las plantas recuperarse de los daños y sobrevivir en la naturaleza (Duclercq, Sangwan-Norreel et al. 2011). Durante éste proceso, el FT NAC1 regula la expresión de genes que codifican para las proteínas CEP1 y CEP2 las cuales tendrían un rol en la degradación de EXTs de la pared celular permitiendo la emergencia de los nuevos órganos (Chen, Cheng et al. 2016).

En base a los conceptos discutido y teniendo en cuenta la importancia de la O-glicosilación de las EXTs en el proceso de expansión celular de pelos radicales (Velasquez, Ricardi et al. 2011, Velasquez, Ricardi et al. 2015), se planteó la hipótesis que el FT NAC1 podría estar regulando la expresión de las enzimas CEP1 y CEP2. Ambas enzimas, estarían implicadas en el procesamiento EXT O-glicosiladas para ser secretadas la pared celular durante el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

6.1 Expresión del FT NAC1 en pelos radicales.

Como primera medida, para determinar si el FT NAC1 presenta algún rol en el desarrollo de pelos radicales, se evaluó la expresión del mismo utilizando la línea reportera pNAC1::NAC1-GUS cedida por Lin Xu (Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, China). La construcción utilizada para generar esta línea (Ver tabla 3M) presenta la región promotora del gen NAC1 (2Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción) la secuencia codificante del gen *NAC1* fusionado al reportero GUS. Mediante la tinción con el colorante GUS (ver sección 21 de materiales y métodos) se observó que el FT NAC1 se expresa en pelos radicales (Fig. 26R). Futuros experimentos son necesarios para definir en rol de NAC1 en pelos radicales y si éste regula la expresión de los genes que codifican para las peptidasas CEP1 y CEP2. Se plantea analizar mutantes insercionales de T-ADN del gen *NAC1* para observar si existen cambios morfológicos en el desarrollo del pelo radical. También, se llevará a cabo un ChIP-PCR para establecer si el FT NAC1 es capaz de unirse directamente a las regiones promotoras de los genes *CEP1* y *CEP2*. Para este propósito, se utilizará la línea transgénica inducible por β -estradiol Wt Col-0/ pER8::3 \times FLAG-NAC1 con la etiqueta FLAG necesaria para el ensayo en cuestión. Por último, se planea determinar si existen diferencias en los niveles de expresión de los transcritos de CEP1 y CEP2 en líneas mutantes de T-ADN de *nac1* con respecto al control Wt Col-0.

Wt Col-0 pNAC1::NAC1-GUS



Figura 26R: Expresión del FT NAC1 en pelo radical: Imagen de líneas reporteras de Wt Col-0/ pNAC1::NAC1-GUS y Wt Col-0 teñidas con reactivo GUS. La expresión de GUS se observó en pelos radicales de la línea transgénica Wt Col-0/ pNAC1::GUS. Barra de escala= 100µm.

Discusión

Las Cisteína proteasas son un grupo de enzimas divididas en varias familias, existe un grupo único, las cisteína-endopeptidasas de tipo papaína (CEPs), que contienen una señal de retención en RE, KDEL C-terminal. Para este grupo de enzimas, no se han encontrado genes homólogos en mamíferos o levaduras (Gietl et al., 2000), sin embargo, son ubicuas en plantas (Hierl, Vothknecht et al. 2012). Se trata de proteasas involucradas en el proceso de MCP. Las CEPs son sintetizadas como pre-pro-enzima, y son co-traduccionalmente transportadas al RE donde la pre-secuencia es removida y almacenada en compartimentos asociadas al ER (ricinosomas) como enzima inactiva o pro-enzima. En los últimos estadios de la MCP, se libera la pro-enzima de los ricinosomas debido al colapso vacuolar y la consecuente acidificación del citosol, desencadenando la maduración de la enzima. La enzima activa es capaz de clivar proteínas (Schmid, Simpson et al. 1999, Hierl, Höwing et al. 2014, Höwing, Huesmann et al. 2014). Se han encontrado varias CEP en células o tejidos asociados a la MCP donde estas proteínas desempeñan un papel importante en la degradación de proteínas intracelulares (Tanaka, Yamauchi et al. 1991, Becker, Senyuk et al. 1997, He and Kermode 2003, Zhang, Liu et al. 2014). Las CEPs fueron originalmente identificadas en ricinosomas, vesículas especializadas derivadas del RE, de *Ricinus communis* (ricino) (Schmid et al., 1999), por lo que la CEP de ricino (RcCysEP) ha sido la más estudiada (Schmid, Simpson et al. 1998). RcCysEP muestra una amplia e inusual especificidad de sustrato. El sitio de corte dentro

de un sustrato (representado con una flacha ↓) se denota como P2-P1- ↓ -P1 -P2. RxCysEP (como es típico para las CEPs) tiene una clara preferencia por aminoácidos neutros con cadenas laterales alifáticas y no polares (Leu, Val, Met) o aromáticas (Phe, Tyr, Trp) en la posición P2 y no presenta una clara preferencia en la posición P1. La cristalización de RxCysEP purificada como miembro fundador de CEPs (Schmid, Simpson et al. 1998) reveló que RxCysEP se pliega en dos dominios distintos de aproximadamente el mismo tamaño, como es habitual para las CEPs. El plegamiento de RxCysEP también es muy similar a la cisteína peptidasa específica de prolina del jengibre (*Zingiber officinale*). Sin embargo, la hendidura del sitio activo de RxCysEP, es más amplia en comparación con la proteasa de jengibre y de la papaína (Than et al., 2004). Gracias a esta característica RxCysEP presenta la capacidad de aceptar hidroxiprolinas glicosiladas cerca del sitio de clivaje, brindándole la habilidad de digerir a las EXTs. Esta capacidad fue demostrada mediante ensayos *in vitro* donde RxCysEP fue capaz de degradar la EXT P1 de tabaco madura, la cual presenta el módulo repetitivo Ser-(Hyp)₄-Thr-Hyp-Hyp-Val-Tyr-Lys, dando lugar a 17 péptidos que contenían al módulo Ser-(Hyp)₄ (Helm, Schmid et al. 2008).

Dada la capacidad que presentan las CEPs de digerir EXTs (Helm, Schmid et al. 2008, Hruz, Laule et al. 2008) se hipotetizó que estas enzimas podrían regular el desensamblado de la red de EXTs en el apoplasto, lo que permitiría la relajación de la pared celular durante la expansión polarizada del pelo radical en *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, debido a que las CEPs presentan una señal de localización en RE (KDEL) sumado a la importancia de la O-glicosilación de las EXTs en el proceso de expansión celular de pelos radicales (Velasquez, Ricardi et al. 2011, Velasquez, Ricardi et al. 2015), fue factible suponer que las CEPs serían las encargadas de ejercer un control de calidad en aquellas EXTs mal procesadas (subglicosiladas o sobreglicosiladas) en el sistema secretorio en el RE-Golgi.

Arabidopsis thaliana codifica para tres CEPs (AtCEPs) en su genoma: AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 (Helm, Schmid et al. 2008). Mediante construcciones reporteras con sus promotores endógenos y el gen de la β-glucuronidasa se pudo determinar la marcada especificidad de tejido y órganos de estas peptidasas tanto en tejidos reproductivos como vegetativos. En raíz, AtCEP1 se expresa durante la formación de raíces laterales, AtCEP2 en el principio de la caliptra y en la zona de elongación y AtCEP3 en la zona de transición hipocótilo-raíz (Helm, Schmid et al. 2008). Se demostró que AtCEP1 es un ejecutor crucial de la PCD de *tapetum*, lo cual, es necesario para permitir el desarrollo funcional de polen (Zhang, Sheng et al. 2014), AtCEP1 también está involucrada en la defensa contra patógenos (Höwing, Huesmann et al. 2014). Por otro lado, un estudio reciente sugiere la presencia de AtCEP2 en la base de las hojas jóvenes, en el hipocótilo y en la zona de elongación de la raíz, que son tejidos en activo crecimiento, podría indicar una función de AtCEP2 en la relajación de la pared celular necesaria para la extensión de las células, apoyando la hipótesis planteada en este trabajo.

En esta tesis fue posible identificar cuáles son CEPs involucradas en el desarrollo del pelo radical, aunque aún queda por determinar con precisión el rol que llevarían a cabo. En primer lugar, mediante el análisis de bases de datos *EFP Browser Toronto* (<http://bar.utoronto.ca>) se observó la expresión de CEPs en las raíces y en protoplastos de pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. El análisis mostró que la expresión de CEP1 es abundante en pelos radicales que se encuentran en estadios medios y avanzados del desarrollo. Mientras que, CEP3 presentó mayores niveles de expresión en los estadios iniciales del crecimiento del pelo radical (Fig. 22R.A). También se estableció que los niveles más elevados de expresión en la raíz, tanto de CEP1 como CEP3 están en la zona de elongación (Fig. 22R.A). No hay información disponible para AtCEP2 en la base de datos de *EFP Browser Toronto*. Para confirmar los datos obtenidos *in silico*, se utilizaron líneas transgénicas reporteras del promotor: pCEP1::3xHA-EGFP-KDEL (Höwing, Huesmann et al. 2014) y pCEP2::3xHA-mCherry-KDEL (Hierl, Höwing et al. 2014). Ambos son reporteros transcripcionales no traduccionales.

La expresión de CEP2 se limitó a las células epidérmicas de la raíz, específicamente a las células tricoblásticas y no presentó expresión en células epidérmicas atricoblásticas ni en otras regiones de la raíz (Fig. 22R.C). También se determinó su expresión en pelos radicales. Se observaron niveles más altos de expresión de CEP2 en etapas tempranas del desarrollo de pelos radicales y niveles significativamente menores en las últimas etapas de crecimiento (Fig. 22R.D). Para el caso de CEP1 se pudo observar una marcada expresión en pelos radicales y en células epidérmicas de la raíz, sin embargo, no se ve una marcada diferencia en la expresión entre células epidérmicas tricoblásticas y atricoblásticas (Fig.22R.B). Estos resultados indicaron que, tanto CEP1 como CEP2 son esenciales para el desarrollo de los pelos radicales sugiriendo que se requieren ambas CEP en células que se expanden activamente. Además, es posible proponer que CEP1 y CEP2 podrían estar actuando de manera secuencial durante este proceso: CEP2 estaría actuando en las primeras etapas del desarrollo del pelo y luego, CEP1 en los estadios finales del crecimiento del pelo radical.

Para abordar desde otra perspectiva la implicancia de las CEPs en el crecimiento polarizado del pelo radical, se evaluaron mutantes insercionales de T-ADN. Se aislaron y analizaron al menos dos alelos mutantes para cada gen, los mutantes *cep2-2* y *cep1-3* presentaron mayor longitud de pelo radical con respecto al control Wt Col-0 (Fig. 23R.C). Además, se observó, que la complementación de *cep1-3* fue capaz de revertir el fenotipo completamente al nivel del Wt Col-0 (Fig. 23R.C), reafirmando así, que el fenotipo observado en la mutante *cep1-3* es debido a la deficiencia de la funcionalidad de CEP1. Por lo tanto, en base a los fenotipos anormales detectados en las líneas mutantes nulas *cep1-1* y *cep2-1*, se determinó que CEP1 y CEP2 son reguladores negativos del crecimiento del pelo radical. De todas maneras, no se puede descartar la posibilidad que las CEPs estén involucradas en la MCP de los pelos radicales. La ausencia de estas enzimas retrasaría este proceso lo que permitiría que el pelo continúe elongando y se

refleja en el fenotipo observado, tal como ocurre durante el desarrollo del grano de polen en la mutante *cep1* donde la MCP del *tapetum* es retrasada resultando en un grano de polen con morfología anómala (Zhang, Sheng et al. 2014). Dada la ausencia de cambios en el fenotipo de pelo radical de las líneas mutantes *cep3-1* y *cep3-2* con respecto al control Wt Col-0, CEP3 pareciera no tener participación en procesos del desarrollo en el pelo radical, por lo tanto, se focalizaron el resto de los ensayos en las enzimas CEP1 y CEP2 con más detalle.

Mediante el análisis de la localización subcelular, se determinó que AtCEP2 se localizó dentro de la célula, lo que sugiere que la enzima AtCEP2 estaría dirigida a la vía secretora, posiblemente a los compartimentos del RE y/o de Golgi, donde es posible que puedan actuar como un componente del programa de control de calidad del estado de O-glicosilación y el plegamiento de las EXTs (Fig. 2C). Si bien AtCEP2 no se localizó en el espacio apoplástico ni en la pared celular (al menos en las condiciones estudiadas) no se descarta que esta enzima pueda dirigirse a estos compartimientos mediante algún estímulo o condición específica como por ejemplo, cambios en el pH celular (Hierl, Höwing et al. 2014) (Fig. 2C). RcCysEP fue descubierta en orgánulos esférico derivados del ER denominados ricinosomas o "cisterna dilatada" (Schmid, Simpson et al. 1998). Sin embargo, no hay evidencia de la existencia ricinosomas en *Arabidopsis thaliana*, a pesar de numerosos intentos de aislamiento de tales organelas en esta planta modelo. Estudios previos demostraron, mediante el uso de marcadores moleculares de RE y ensayos de co-localización que tanto AtCEP1 como AtCEP2 se almacena en organelas que presentan membranas derivadas del RE en hojas para el caso de AtCEP1 y en la zona de elongación de la raíz en la caliptra en el caso de AtCEP2 y dichas organelas fueron apodadas "ricinosomas-like" (Hierl, Höwing et al. 2014, Höwing, Huesmann et al. 2014). Por otro lado, no existe un informe previo sobre la localización de las CEPs en el apoplasto o en la pared celular, lo que indica que las CEP actuarían dentro de la ruta secretora para procesar sus sustratos. Futuros experimentos son necesarios para definir exactamente dónde se dirigen las CEPs dentro de las células. Se plantea llevar a cabo un ensayo de co-expresión de las proteínas AtCEP1 y AtCEP2 con marcadores del RE y Golgi. De todas maneras, estos resultados apoyan la hipótesis de que AtCEP1 y AtCEP2 residan en el ER donde es posible que puedan actuar como un componente del programa de control de calidad del estado de O-glicosilación y el plegamiento de las EXTs (Fig. 2C).

Las secuencias genéticas de *AtCEP1*, *AtCEP2* y *AtCEP3* presentaron un alto porcentaje de identidad y de similitud con respecto la secuencia que codifica para RcCysEP (la actividad *in vitro* RcCysEP demostró ser capaz de digerir EXTs), principalmente la secuencia de gen *AtCEP1* que presentó un 83% de identidad y un 74% de similitud con respecto a RcCysEP. Además, los aminoácidos correspondientes al sitio activo se mantuvieron conservados para todos los casos. Esto indicaría que *AtCEP1*, *AtCEP2* y *AtCEP3* también podrían ser capaces de clivar EXTs como fue demostrado *in vitro* para su homólogo RcCysEP. Por lo tanto, como *AtCEP1* fue la más parecida en

secuencia a RcCysEP, fue utilizada para testear una posible interacción con péptidos de tipo EXTs. Para ello, se generó un modelo estructural de AtCEP1 tomando como molde a las estructuras cristalográficas de RcCysEP y una cisteína proteasa de *Ambrosia artemisiifolia* (pdb 1S4V y 5EF4 respectivamente). Luego, se llevaron a cabo de ensayos *in silico* de *docking* los cuales indicaron que AtCEP1 sería capaz de interactuar en forma diferencial con EXTs no glicosiladas que con EXTs completamente glicosiladas (Fig. 25R). En base a estos resultados, podríamos postular que la AtCEP1 y tal vez las otras AtCEPs serían capaces de interactuar en forma diferencial con EXT no glicosiladas que con EXTs completamente glicosiladas. Esto podría establecer una forma de censar el *estatus* de las EXTs en el RE y Aparato de Golgi durante su procesamiento.

Finalmente, se evaluó si el FT NAC1 regula de manera positiva la expresión de genes que codifican para las proteínas CEP1 y CEP2 durante la expansión de pelos radicales, tal como se demostró recientemente para la generación *de novo* de raíces adventicias (Chen, Cheng et al. 2016). En este trabajo, mediante el uso del reportero del promotor de NAC1 (pNAC1:NAC1-GUS) se pudo demostrar que FT NAC1 se expresa en pelos radicales (Fig. 26R). Sin embargo, queda por determinar si, efectivamente el FT NAC1 está regulando directamente la expresión de CEP1 y CEP2 en pelos radicales. Para ello, futuros experimentos fueron planteados y se cuenta con las herramientas necesarias para poder llevarlos a cabo: analizar mutantes insercionales de T-ADN del gen *NAC1* para observar si existen cambios morfológicos en el desarrollo del pelo radical, determinar si existen diferencias en los niveles de expresión de los transcritos de CEP1 y CEP2 en líneas mutantes de T-ADN del gen *NAC1* con respecto al control Wt Col-0. También, se llevará a cabo un CHIP-PCR para establecer si el FT NAC1 es capaz de unirse directamente a las regiones promotoras de los genes *CEP1* y *CEP2*.

En base a los conceptos establecidos en esta tesis, se podría establecer que AtCEP1 y AtCEP2 serían las candidatas ideales para el sensado del estado de *O*-glicosilación y de plegamiento de las EXTs en el RE y Aparato de Golgi (Fig. 2C) actuando como componentes en el programa de control de calidad de las EXTs. Estas enzimas actuarían de manera secuencial (AtCEP2 en los primeros estadios y luego AtCEP1) durante el crecimiento polarizado del pelo radical probablemente reguladas por el FT NAC1 (Fig. 2C). De todas maneras, trabajos futuros son necesarios para precisar el rol específico de las CEPs en la expansión celular y definir su regulación transcripcional. Hasta el momento no hay información sobre cómo se detecta y controla el plegamiento de las *O*-glicoproteínas durante su procesamiento a lo largo de la vía secretora de las plantas como si existe para las *N*-glicoproteínas. Cuando éstas últimas no se pueden plegar de manera adecuada, se degradan mediante los procesos ERAD (Vembar and Brodsky 2008) y UPOM (Xu, Wang et al. 2013) los cuales son fundamentales para mantener la homeostasis glicoproteica global (Kim, Hipp et al. 2013). Por lo tanto, si bien futuras evidencias son requeridas para lograr una correcta asociación entre las CEPs y las EXTs

in vivo, podría tratarse de una de las primeras aproximaciones vinculadas con el control del estado de glicosilación y plegamiento de las proteínas *O*-glicosiladas en plantas.

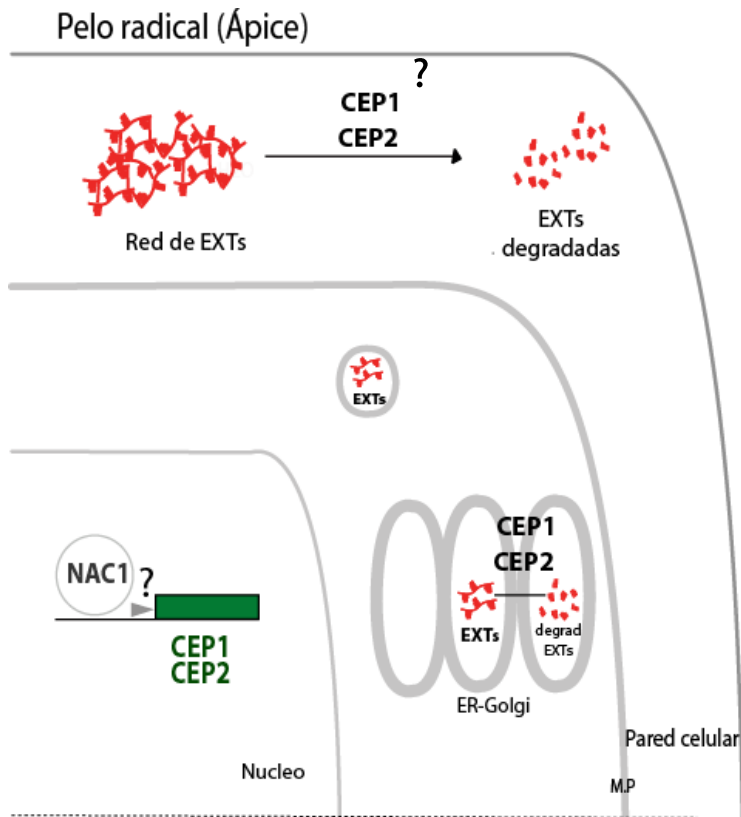


Figura 2C: Modeo propuesto para la función de las CEPs en el pelo radical. Se muestra la función propuesta para CEP1 y CEP2 en la proteólisis de EXTs en el sistema secretorio (RE-Golgi) donde estarían ejerciendo un control de calidad de la *O*-glicosilación y el plegamiento de EXTs. También, podrían estar involucradas en la degradación de EXTs en la pared celular. Es posible que estén reguladas positivamente por el FT NAC1. M.P: pared celular.

Referencias

- Abramoff, M. D., P. J. Magalhaes and S. J. Ram (2004). "Image processing with ImageJ." Biophotonics international **11**(7): 36-43.
- Aida, M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa and M. Tasaka (1997). "Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant." The Plant Cell **9**(6): 841-857.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas and R. Cheuk (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana." Science **301**(5633): 653-657.
- Altenhöfer, S., P. W. Kleikers, K. A. Radermacher, P. Scheurer, J. R. Hermans, P. Schiffers, H. Ho, K. Winkler and H. H. Schmidt (2012). "The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease." Cellular and Molecular Life Sciences **69**(14): 2327-2343.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." Annu. Rev. Plant Biol. **55**: 373-399.
- Asahina, M., K. Azuma, W. Pitaksaringkarn, T. Yamazaki, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, K. Okada and T. Nishimura (2011). "Spatially selective hormonal control of RAP2. 6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(38): 16128-16132.
- Balcerowicz, D., S. Schoenaers and K. Vissenberg (2015). "Cell fate determination and the switch from diffuse growth to planar polarity in Arabidopsis root epidermal cells." Frontiers in plant science **6**.
- Barbez, E. and J. Kleine-Vehn (2013). "Divide Et Impera--cellular auxin compartmentalization." Curr Opin Plant Biol **16**(1): 78-84.
- Bardgett, R. D., L. Mommer and F. T. De Vries (2014). "Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes." Trends in Ecology & Evolution **29**(12): 692-699.
- Bargmann, B. O., S. Vanneste, G. Krouk, T. Nawy, I. Efroni, E. Shani, G. Choe, J. Friml, D. C. Bergmann and M. Estelle (2013). "A map of cell type-specific auxin responses." Mol Syst Biol **9**(1): 688.
- Baumberger, N., C. Ringli and B. Keller (2001). "The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in Arabidopsis thaliana." Genes Dev **15**(9): 1128-1139.
- Baumberger, N., M. Steiner, U. Ryser, B. Keller and C. Ringli (2003). "Synergistic interaction of the two paralogous Arabidopsis genes LRX1 and LRX2 in cell wall formation during root hair development." Plant J **35**(1): 71-81.

- Becker, C., V. I. Senyuk, A. D. Shutov, H. Nong, J. Fischer, C. Horstmann and K. Müntz (1997). "Proteinase A, A Storage-Globulin-Degrading Endopeptidase of Vetch (*Vicia Sativa* L.) Seeds, is not Involved in Early Steps of Storage-Protein Mobilization." The FEBS Journal **248**(2): 304-312.
- Beers, E. P., B. J. Woffenden and C. Zhao (2000). "Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death." Plant Mol Biol **44**(3): 399-415.
- Belousov, V. V., A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Terskikh and S. Lukyanov (2006). "Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide." Nature methods **3**(4): 281-286.
- Benfey, P. N., M. Bennett and J. Schiefelbein (2010). "Getting to the root of plant biology: impact of the Arabidopsis genome sequence on root research." Plant J **61**(6): 992-1000.
- Berger, F., J. Haseloff, J. Schiefelbein and L. Dolan (1998). "Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries." Current Biology **8**(8): 421-430.
- Bernhardt, C., M. M. Lee, A. Gonzalez, F. Zhang, A. Lloyd and J. Schiefelbein (2003). "The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root." Development **130**(26): 6431-6439.
- Bernhardt, C. and M. L. Tierney (2000). "Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from Arabidopsis, is regulated by cell-type-specific developmental pathways involved in root hair formation." Plant Physiol **122**(3): 705-714.
- Bienert, G. P., A. L. Møller, K. A. Kristiansen, A. Schulz, I. M. Møller, J. K. Schjoerring and T. P. Jahn (2007). "Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes." Journal of Biological Chemistry **282**(2): 1183-1192.
- Birnbaum, K., D. E. Shasha, J. Y. Wang, J. W. Jung, G. M. Lambert, D. W. Galbraith and P. N. Benfey (2003). "A gene expression map of the Arabidopsis root." Science **302**(5652): 1956-1960.
- Boisson-Dernier, A., D. S. Lituiev, A. Nestorova, C. M. Franck, S. Thirugnanarajah and U. Grossniklaus (2013). "ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases." PLoS biology **11**(11): e1001719.
- Bolwell, G. P., K. A. Blee, V. S. Butt, D. R. Davies, S. L. Cardner, C. Gerrish, F. Minibayeva, E. G. Rowntree and P. Wojtaszek (1999). "Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells." Free radical research **31**(sup1): 137-145.
- Bollig, K., M. Lamshöft, K. Schweimer, F.-J. Marner, H. Budzikiewicz and S. Waffenschmidt (2007). "Structural analysis of linear hydroxyproline-bound O-glycans of *Chlamydomonas reinhardtii*—conservation of the inner core in *Chlamydomonas* and land plants." Carbohydrate research **342**(17): 2557-2566.
- Boyes, D. C., A. M. Zayed, R. Ascenzi, A. J. McCaskill, N. E. Hoffman, K. R. Davis and J. Grolach (2001). "Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants." Plant Cell **13**(7): 1499-1510.
- Brady, J. D., I. H. Sadler and S. C. Fry (1996). "Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link." Biochem J **315** (Pt 1): 323-327.

- Brady, J. D., I. H. Sadler and S. C. Fry (1998). "Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: its role in cross-link formation." Phytochemistry **47**(3): 349-353.
- Brady, S. M., D. A. Orlando, J.-Y. Lee, J. Y. Wang, J. Koch, J. R. Dinneny, D. Mace, U. Ohler and P. N. Benfey (2007). "A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns." Science **318**(5851): 801-806.
- Byrt, C. S., M. Zhao, M. Kourghi, J. Bose, S. W. Henderson, J. Qiu, M. Gilliam, C. Schultz, M. Schwarz, S. A. Ramesh, A. Yool and S. Tyerman (2017). "Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2;1 regulated by Ca(2+) and pH." Plant Cell Environ **40**(6): 802-815.
- Cannon, M. C., K. Terneus, Q. Hall, L. Tan, Y. Wang, B. L. Wegenhart, L. Chen, D. T. Lamport, Y. Chen and M. J. Kieliszewski (2008). "Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(6): 2226-2231.
- Canton, J. and S. Grinstein (2014). "Priming and activation of NADPH oxidases in plants and animals." Trends in immunology **35**(9): 405-407.
- Caramelo, J. J. and A. J. Parodi (2015). "A sweet code for glycoprotein folding." FEBS letters **589**(22): 3379-3387.
- Cardenas, L. (2009). "New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells." Plant Signal Behav **4**(1): 4-8.
- Casimiro, I., A. Marchant, R. P. Bhalerao, T. Beeckman, S. Dhooge, R. Swarup, N. Graham, D. Inze, G. Sandberg, P. J. Casero and M. Bennett (2001). "Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation." Plant Cell **13**(4): 843-852.
- Cercós, M., S. Santamaría and J. Carbonell (1999). "Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea." Plant Physiology **119**(4): 1341-1348.
- Colón-Carmona, A., D. L. Chen, K.-C. Yeh and S. Abel (2000). "Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro." Plant Physiology **124**(4): 1728-1738.
- Cosgrove, D. J. (2000). "Expansive growth of plant cell walls." Plant Physiology and Biochemistry **38**(1): 109-124.
- Cosgrove, D. J. (2000). "Loosening of plant cell walls by expansins." Nature **407**(6802): 321-326.
- Cosio, C. and C. Dunand (2008). "Specific functions of individual class III peroxidase genes." Journal of experimental botany **60**(2): 391-408.
- Cosio, C., P. Ranocha, E. Francoz, V. Burlat, Y. Zheng, S. E. Perry, J. J. Ripoll, M. Yanofsky and C. Dunand (2017). "The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue formation." New Phytol **213**(1): 250-263.
- Costa, A., I. Drago, S. Behera, M. Zottini, P. Pizzo, J. I. Schroeder, T. Pozzan and F. L. Schiavo (2010). "H₂O₂ in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a Ca²⁺-dependent scavenging system." The Plant Journal **62**(5): 760-772.

- Creissen, G., J. Firmin, M. Fryer, B. Kular, N. Leyland, H. Reynolds, G. Pastori, F. Wellburn, N. Baker and A. Wellburn (1999). "Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress." The Plant Cell **11**(7): 1277-1291.
- Crow, J. P. (1997). "Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species." Nitric Oxide **1**(2): 145-157.
- Curtis, M. D. and U. Grossniklaus (2003). "A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta." Plant Physiol **133**(2): 462-469.
- Chapman, E. J. and M. Estelle (2009). "Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants." Annu Rev Genet **43**: 265-285.
- Chen, S. x. and P. Schopfer (1999). "Hydroxyl-radical production in physiological reactions." The FEBS Journal **260**(3): 726-735.
- Chen, X., J. Cheng, L. Chen, G. Zhang, H. Huang, Y. Zhang and L. Xu (2016). "Auxin-independent NAC pathway acts in response to explant-specific wounding and promotes root tip emergence during de novo root organogenesis in Arabidopsis." Plant physiology: pp. 01733.02015.
- Chen, Y., W. Dong, L. Tan, M. A. Held and M. J. Kieliszewski (2015). "Arabinosylation Plays a Crucial Role in Extensin Cross-linking In Vitro." Biochemistry insights **8**(supple 2): 1.
- Chen, Z. (2001). "A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats." Plant Physiology **126**(2): 473-476.
- Cheng, S.-H., M. R. Willmann, H.-C. Chen and J. Sheen (2002). "Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family." Plant Physiology **129**(2): 469-485.
- Chevalier, D., M. Batoux, L. Fulton, K. Pfister, R. K. Yadav, M. Schellenberg and K. Schneitz (2005). "STRUBBELIG defines a receptor kinase-mediated signaling pathway regulating organ development in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(25): 9074-9079.
- Cho, H. T. (2007). "A cis-Element for Root Hair Specificity Has Been Co-opted Repeatedly Through the Divergence of Upstream Fate-Determining Machineries." Plant Signal Behav **2**(2): 117-119.
- Cho, H. T. and D. J. Cosgrove (2002). "Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis." Plant Cell **14**(12): 3237-3253.
- Datta, S., H. Prescott and L. Dolan (2015). "Intensity of a pulse of RSL4 transcription factor synthesis determines Arabidopsis root hair cell size." Nature Plants **1**: 15138.
- Davey, C. A. and R. E. Fenna (1996). "2.3 Å resolution X-ray crystal structure of the bisubstrate analogue inhibitor salicylhydroxamic acid bound to human myeloperoxidase: a model for a prereaction complex with hydrogen peroxide." Biochemistry **35**(33): 10967-10973.
- Deal, R. B. and S. Henikoff (2010). "A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue." Developmental cell **18**(6): 1030-1040.

Dick-Perez, M., Y. Zhang, J. Hayes, A. Salazar, O. A. Zabolina and M. Hong (2011). "Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR." Biochemistry **50**(6): 989-1000.

Diplock, A. T. (1991). "Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview." The American journal of clinical nutrition **53**(1 Suppl): 189S-193S.

Dolan, L. and S. Costa (2001). "Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis." J Exp Bot **52**(Spec Issue): 413-417.

Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts and B. Scheres (1993). "Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root." Development **119**(1): 71-84.

Douroupi, T. G., I. S. Papassideri, D. J. Stravopodis and L. H. Margaritis (2005). "Molecular cloning and tissue-specific transcriptional regulation of the first peroxidase family member, Udp1, in stinging nettle (*Urtica dioica*)." Gene **362**: 57-69.

Duclercq, J., B. Sangwan-Norreel, M. Catterou and R. S. Sangwan (2011). "De novo shoot organogenesis: from art to science." Trends in plant science **16**(11): 597-606.

Dunand, C., M. Crèvecoeur and C. Penel (2007). "Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases." New Phytologist **174**(2): 332-341.

Dunand, C., M. De Meyer, M. Crèvecoeur and C. Penel (2003). "Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth." Plant Physiology and Biochemistry **41**(9): 805-811.

Duroux, L. and K. G. Welinder (2003). "The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview." Journal of Molecular Evolution **57**(4): 397-407.

Dynowski, M., G. Schaaf, D. Loque, O. Moran and U. Ludwig (2008). "Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂." Biochem. J **414**: 53-61.

Edwards, S. L., R. Raag, H. Wariishi, M. H. Gold and T. L. Poulos (1993). "Crystal structure of lignin peroxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(2): 750-754.

Egelund, J., N. Obel, P. Ulvskov, N. Geshi, M. Pauly, A. Bacic and B. L. Petersen (2007). "Molecular characterization of two Arabidopsis thaliana glycosyltransferase mutants, rra1 and rra2, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue." Plant Mol Biol **64**(4): 439-451.

Ellis, C. M., P. Nagpal, J. C. Young, G. Hagen, T. J. Guilfoyle and J. W. Reed (2005). "AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana." Development **132**(20): 4563-4574.

Erman, J. E. and L. B. Vitello (2002). "Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering." Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology **1597**(2): 193-220.

Falhof, J., J. T. Pedersen, A. T. Fuglsang and M. Palmgren (2016). "Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology." Molecular Plant **9**(3): 323-337.

- Fawal, N., Q. Li, B. Savelli, M. Brette, G. Passaia, M. Fabre, C. Mathé and C. Dunand (2012). "PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases." Nucleic acids research **41**(D1): D441-D444.
- Ferris, P. J., J. P. Woessner, S. Waffenschmidt, S. Kilz, J. Drees and U. W. Goodenough (2001). "Glycosylated polyproline II rods with kinks as a structural motif in plant hydroxyproline-rich glycoproteins." Biochemistry **40**(9): 2978-2987.
- Finet, C., C. Fourquin, M. Vinauger, A. Berne-Dedieu, P. Chambrier, S. Painsavoine and C. P. Scutt (2010). "Parallel structural evolution of auxin response factors in the angiosperms." The Plant Journal **63**(6): 952-959.
- Fleming, M. B. (2015). The influence of extensin cross-linking on biomass recalcitrance, Colorado State University.
- Foley, R. C., C. A. Gleason, J. P. Anderson, T. Hamann and K. B. Singh (2013). "Genetic and genomic analysis of *Rhizoctonia solani* interactions with *Arabidopsis*; evidence of resistance mediated through NADPH oxidases." PLoS One **8**(2): e56814.
- Foreman, J., V. Demidchik, J. H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee and J. D. Jones (2003). "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth." Nature **422**(6930): 442-446.
- Fowler, T. J., C. Bernhardt and M. L. Tierney (1999). "Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins." Plant Physiol **121**(4): 1081-1092.
- Francoz, E., P. Ranocha, H. Nguyen-Kim, E. Jamet, V. Burlat and C. Dunand (2015). "Roles of cell wall peroxidases in plant development." Phytochemistry **112**: 15-21.
- Fry, S., R. C. Smith, K. F. Renwick, D. J. Martin, S. Hodge and K. J. Matthews (1992). "Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants." Biochemical Journal **282**(3): 821-828.
- Fry, S. C. (1982). "Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein." Biochem J **204**(2): 449-455.
- Fukaki, H., S. Tameda, H. Masuda and M. Tasaka (2002). "Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*." The Plant Journal **29**(2): 153-168.
- Gabaldon, C., L. V. Gomez-Ros, M. J. Nunez-Flores, A. Esteban-Carrasco and A. R. Barcelo (2007). "Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*." Plant Mol Biol **65**(1-2): 43-61.
- Galway, M. E., J. D. Masucci, A. M. Lloyd, V. Walbot, R. W. Davis and J. W. Schiefelbein (1994). "The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root." Developmental biology **166**(2): 740-754.
- Gapper, C. and L. Dolan (2006). "Control of plant development by reactive oxygen species." Plant physiology **141**(2): 341-345.

Garay-Arroyo, A., M. de la Paz Sánchez, B. García-Ponce, E. R. Álvarez-Buylla and C. Gutiérrez (2014). "La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana." REB. Revista de educación bioquímica **33**(1): 13-22.

Gendrel, A.-V., Z. Lippman, C. Yordan, V. Colot and R. A. Martienssen (2002). "Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1." Science **297**(5588): 1871-1873.

Gille, S., U. Hansel, M. Ziemann and M. Pauly (2009). "Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14699-14704.

Gjetting, S. K., C. K. Ytting, A. Schulz and A. T. Fuglsang (2012). "Live imaging of intra-and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor." Journal of experimental botany: ers040.

Goetz, M., A. Vivian-Smith, S. D. Johnson and A. M. Koltunow (2006). "AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis." The Plant Cell **18**(8): 1873-1886.

Görlach, A., K. Bertram, S. Hudecova and O. Krizanova (2015). "Calcium and ROS: a mutual interplay." Redox biology **6**: 260-271.

Greenwood, J. S., M. Helm and C. Gietl (2005). "Ricosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during Ricinus seed development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(6): 2238-2243.

Grierson, C., E. Nielsen, T. Ketelaarc and J. Schiefelbein (2014). "Root hairs." The Arabidopsis Book **12**: e0172.

Grierson, C. and J. Schiefelbein (2009). Genetics of root hair formation. Root Hairs, Springer: 1-25.

Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmasov and J. Murfett (1998). "How does auxin turn on genes?" Plant Physiol **118**(2): 341-347.

Guilfoyle, T. J. and G. Hagen (2007). "Auxin response factors." Current opinion in plant biology **10**(5): 453-460.

Guilfoyle, T. J. and G. Hagen (2007). "Auxin response factors." Curr Opin Plant Biol **10**(5): 453-460.

Guilfoyle, T. J. and G. Hagen (2012). "Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions." Plant Sci **190**: 82-88.

Guo, K., W. W. Kong and Z. M. Yang (2009). "Carbon monoxide promotes root hair development in tomato." Plant Cell Environ **32**(8): 1033-1045.

Hall, Q. and M. C. Cannon (2002). "The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in Arabidopsis." The Plant Cell Online **14**(5): 1161-1172.

Hardtke, C. S. and T. Berleth (1998). "The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development." The EMBO journal **17**(5): 1405-1411.

He, X. and A. R. Kermode (2003). "Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds." Plant Mol Biol **52**(4): 729-744.

Held, M. A., L. Tan, A. Kamyab, M. Hare, E. Shpak and M. J. Kieliszewski (2004). "Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked in vitro." Journal of Biological Chemistry **279**(53): 55474-55482.

Helm, M., M. Schmid, G. Hierl, K. Terneus, L. Tan, F. Lottspeich, M. J. Kieliszewski and C. Gietl (2008). "KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds." Am J Bot **95**(9): 1049-1062.

Hernandez-Barrera, A., C. Quinto, E. A. Johnson, H. M. Wu, A. Y. Cheung and L. Cardenas (2013). "Using hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: a method with virtually unlimited potential in plant biology." Methods Enzymol **527**: 275-290.

Hernández-Barrera, A., A. Velarde-Buendía, I. Zepeda, F. Sanchez, C. Quinto, R. Sánchez-Lopez, A. Y. Cheung, H.-M. Wu and L. Cardenas (2015). "Hyper, a Hydrogen Peroxide Sensor, Indicates the Sensitivity of the Arabidopsis Root Elongation Zone to Aluminum Treatment." Sensors **15**(1): 855-867.

Herrero, J., F. Fernández-Pérez, T. Yebra, E. Novo-Uzal, F. Pomar, M. Á. Pedreño, J. Cuello, A. Guéra, A. Esteban-Carrasco and J. M. Zapata (2013). "Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from Arabidopsis thaliana involved in lignin biosynthesis." Planta **237**(6): 1599-1612.

Hierl, G., T. Höwing, E. Isono, F. Lottspeich and C. Gietl (2014). "Ex vivo processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles." Plant molecular biology **84**(6): 605-620.

Hierl, G., U. Vothknecht and C. Gietl (2012). "Programmed cell death in Ricinus and Arabidopsis: the function of KDEL cysteine peptidases in development." Physiol Plant **145**(1): 103-113.

Hirsinger, C., Y. Parmentier, A. Durr, J. Fleck and E. Jamet (1997). "Characterization of a tobacco extensin gene and regulation of its gene family in healthy plants and under various stress conditions." Plant Mol Biol **33**(2): 279-289.

Hooijmaijers, C., J. Y. Rhee, K. J. Kwak, G. C. Chung, T. Horie, M. Katsuhara and H. Kang (2012). "Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of Arabidopsis thaliana." Journal of plant research **125**(1): 147-153.

Horikawa, K., Y. Yamada, T. Matsuda, K. Kobayashi, M. Hashimoto, T. Matsu-ura, A. Miyawaki, T. Michikawa, K. Mikoshiba and T. Nagai (2010). "Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano." Nature Methods **7**(9): 729-732.

Höwing, T., C. Huesmann, C. Hoefle, M.-K. Nagel, E. Isono, R. Hüchelhoven and C. Gietl (2014). "Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (AtCEP1) is involved in pathogen defense." Frontiers in plant science **5**.

Hruz, T., O. Laule, G. Szabo, F. Wessendorp, S. Bleuler, L. Oertle, P. Widmayer, W. Gruissem and P. Zimmermann (2008). "Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes." Advances in bioinformatics **2008**.

Hunter, C., M. R. Willmann, G. Wu, M. Yoshikawa, M. de la Luz Gutiérrez-Nava and S. R. Poethig (2006). "Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis." Development **133**(15): 2973-2981.

Hwang, J. S., S. A. Lee, S. S. Hong, K. S. Lee, M. K. Lee, B. Y. Hwang and J. S. Ro (2005). "Monoamine oxidase inhibitory components from the roots of *Sophora flavescens*." Arch Pharm Res **28**(2): 190-194.

Hwang, Y., H.-S. Choi, H.-M. Cho and H.-T. Cho (2017). "Tracheophytes contain conserved orthologs of a basic helix-loop-helix transcription factor that modulate ROOT HAIR SPECIFIC genes." The Plant Cell Online **29**(1): 39-53.

Iiyama, K., T. B.-T. Lam and B. A. Stone (1994). "Covalent cross-links in the cell wall." Plant physiology **104**(2): 315.

Ikeda-Saito, M., D. A. Shelley, L. Lu, K. Booth, W. Caughey and S. Kimura (1991). "Salicylhydroxamic acid inhibits myeloperoxidase activity." Journal of Biological Chemistry **266**(6): 3611-3616.

Jackson, P. A., C. I. Galinha, C. S. Pereira, A. Fortunato, N. C. Soares, S. B. Amancio and C. P. Pinto Ricardo (2001). "Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase." Plant Physiol **127**(3): 1065-1076.

Johanson, U., M. Karlsson, I. Johansson, S. Gustavsson, S. Sjövall, L. Fraysse, A. R. Weig and P. Kjellbom (2001). "The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants." Plant physiology **126**(4): 1358-1369.

Jones, A. R., E. M. Kramer, K. Knox, R. Swarup, M. J. Bennett, C. M. Lazarus, H. M. Leyser and C. S. Grierson (2009). "Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development." Nat Cell Biol **11**(1): 78-84.

Joo, J. H., Y. S. Bae and J. S. Lee (2001). "Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism." Plant Physiology **126**(3): 1055-1060.

Kang, M. J., H. S. Jin, Y. S. Noh and B. Noh (2015). "Repression of flowering under a noninductive photoperiod by the HDA9-AGL19-FT module in Arabidopsis." New Phytologist **206**(1): 281-294.

Kang, Y. H., S.-K. Song, J. Schiefelbein and M. M. Lee (2013). "Nuclear trapping controls the position-dependent localization of CAPRICE in the root epidermis of Arabidopsis." Plant physiology **163**(1): 193-204.

Kaya, H., R. Nakajima, M. Iwano, M. M. Kanaoka, S. Kimura, S. Takeda, T. Kawarazaki, E. Senzaki, Y. Hamamura and T. Higashiyama (2014). "Ca²⁺-Activated Reactive Oxygen Species Production by Arabidopsis RbohH and RbohJ Is Essential for Proper Pollen Tube Tip Growth." The Plant Cell Online **26**(3): 1069-1080.

- Keinath, N., R. Waadt, R. Brugman, J. I. Schroeder, G. Grossmann, K. Schumacher and M. Krebs (2015). "Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22-and chitin-induced transient [Ca²⁺] cyt patterns in Arabidopsis." Molecular plant.
- Kelley, D. R., A. Arreola, T. L. Gallagher and C. S. Gasser (2012). "ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in Arabidopsis." Development **139**(6): 1105-1109.
- Kepinski, S. and O. Leyser (2005). "The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor." Nature **435**(7041): 446-451.
- Kerr, E. M. and S. C. Fry (2003). "Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture." Planta **217**(2): 327-339.
- Ketelaar, T., M. Galway, B. Mulder and A. Emons (2008). "Rates of exocytosis and endocytosis in Arabidopsis root hairs and pollen tubes." Journal of microscopy **231**(2): 265-273.
- Kiefer, S., C. Penel and H. Greppin (1985). "Ca²⁺ and Mn²⁺ mediated binding of the glycoprotein peroxidase to membranes of Pharbitis cotyledons." Plant science **39**(1): 37-43.
- Kieliszewski, M. J. and D. T. Lamport (1994). "Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny." The Plant Journal **5**(2): 157-172.
- Kim, D. W., S. H. Lee, S. B. Choi, S. K. Won, Y. K. Heo, M. Cho, Y. I. Park and H. T. Cho (2006). "Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns." Plant Cell **18**(11): 2958-2970.
- Kim, J., K. Harter and A. Theologis (1997). "Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(22): 11786-11791.
- Kim, Y. E., M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl and F. Ulrich Hartl (2013). "Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis." Annual review of biochemistry **82**: 323-355.
- Kirik, V., M. Simon, M. Huelskamp and J. Schiefelbein (2004). "The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis." Dev Biol **268**(2): 506-513.
- Knox, K., C. S. Grierson and O. Leyser (2003). "AXR3 and SHY2 interact to regulate root hair development." Development **130**(23): 5769-5777.
- Koshino-Kimura, Y., T. Wada, T. Tachibana, R. Tsugeki, S. Ishiguro and K. Okada (2005). "Regulation of CAPRICE transcription by MYB proteins for root epidermis differentiation in Arabidopsis." Plant and Cell Physiology **46**(6): 817-826.
- Kuang, K., J. F. Haller, G. Shi, F. Kang, M. Cheung, P. Iserovich and J. Fischbarg (2001). "Mercurial sensitivity of aquaporin 1 endofacial loop B residues." Protein Science **10**(8): 1627-1634.
- Kwak, J. M., I. C. Mori, Z. M. Pei, N. Leonhardt, M. A. Torres, J. L. Dangl, R. E. Bloom, S. Bodde, J. D. Jones and J. I. Schroeder (2003). "NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis." The EMBO journal **22**(11): 2623-2633.

- Kwak, S.-H., R. Shen and J. Schiefelbein (2005). "Positional signaling mediated by a receptor-like kinase in Arabidopsis." Science **307**(5712): 1111-1113.
- Kwasniewski, M. and I. Szarejko (2006). "Molecular cloning and characterization of beta-expansin gene related to root hair formation in barley." Plant Physiol **141**(3): 1149-1158.
- Kwon, T., J. A. Sparks, J. Nakashima, S. N. Allen, Y. Tang and E. B. Blancaflor (2015). "Transcriptional response of Arabidopsis seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development." Am J Bot **102**(1): 21-35.
- Lampert, D. T., M. J. Kieliszewski, Y. Chen and M. C. Cannon (2011). "Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture." Plant Physiol **156**(1): 11-19.
- Lan, P., W. Li, W.-D. Lin, S. Santi and W. Schmidt (2013). "Mapping gene activity of Arabidopsis root hairs." Genome biology **14**(6): R67.
- Laohavisit, A., Z. Shang, L. Rubio, T. A. Cuin, A. A. Very, A. Wang, J. C. Mortimer, N. Macpherson, K. M. Coxon, N. H. Battey, C. Brownlee, O. K. Park, H. Sentenac, S. Shabala, A. A. Webb and J. M. Davies (2012). "Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca(2)+- and K+-permeable conductance in root cells." Plant Cell **24**(4): 1522-1533.
- Lassig, R., T. Gutermuth, T. D. Bey, K. R. Konrad and T. Romeis (2014). "Pollen tube NAD (P) H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth." The Plant Journal **78**(1): 94-106.
- Lee, M. M. and J. Schiefelbein (1999). "WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning." Cell **99**(5): 473-483.
- Lee, M. M. and J. Schiefelbein (2002). "Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback." The Plant Cell **14**(3): 611-618.
- Lee, R. D. and H. T. Cho (2013). "Auxin, the organizer of the hormonal/environmental signals for root hair growth." Front Plant Sci **4**: 448.
- Lee, S. H. and H. T. Cho (2006). "PINOID positively regulates auxin efflux in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells." Plant Cell **18**(7): 1604-1616.
- Lee, Y., M. C. Rubio, J. Alassimone and N. Geldner (2013). "A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis." Cell **153**(2): 402-412.
- Lee, Y., M. C. Rubio, J. Alassimone and N. Geldner (2013). "A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis." Cell **153**(2): 402-412.
- Leyser, H. M., F. B. Pickett, S. Dharmasiri and M. Estelle (1996). "Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter." Plant J **10**(3): 403-413.
- Lin, C. Y., L. Y. Huang, W. C. Chi, T. L. Huang, T. Kakimoto, C. R. Tsai and H. J. Huang (2015). "Pathways involved in vanadate-induced root hair formation in Arabidopsis." Physiol Plant **153**(1): 137-148.

- Lin, Q., Y. Ohashi, M. Kato, T. Tsuge, H. Gu, L.-J. Qu and T. Aoyama (2015). "GLABRA2 Directly Suppresses Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Genes with Diverse Functions in Root Hair Development." Plant Cell **27**(10): 2894-2906.
- Liszakay, A., E. van der Zalm and P. Schopfer (2004). "Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth." Plant physiology **136**(2): 3114-3123.
- Liu, X., T. T. Dinh, D. Li, B. Shi, Y. Li, X. Cao, L. Guo, Y. Pan, Y. Jiao and X. Chen (2014). "AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy." The Plant Journal **80**(4): 629-641.
- Lu, D., T. Wang, S. Persson, B. Mueller-Roeber and J. H. Schippers (2014). "Transcriptional control of ROS homeostasis by KUODA1 regulates cell expansion during leaf development." Nature communications **5**.
- Ludevid, M. D., L. Ruiz-Avila, M. P. Valles, V. Stiefel, M. Torrent, J. M. Torne and P. Puigdomenech (1990). "Expression of genes for cell-wall proteins in dividing and wounded tissues of *Zea mays* L." Planta **180**(4): 524-529.
- Mangano, S., S. P. D. Juárez and J. M. Estevez (2016). "ROS regulation of polar growth in plant cells." Plant Physiology **171**(3): 1593-1605.
- Marino, D., C. Dunand, A. Puppo and N. Pauly (2012). "A burst of plant NADPH oxidases." Trends in plant science **17**(1): 9-15.
- Marjamaa, K., E. M. Kukkola and K. V. Fagerstedt (2009). "The role of xylem class III peroxidases in lignification." Journal of Experimental Botany **60**(2): 367-376.
- Martin-Rejano, E. M., J. J. Camacho-Cristobal, M. B. Herrera-Rodriguez, J. Rexach, M. T. Navarro-Gochicoa and A. Gonzalez-Fontes (2011). "Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in *Arabidopsis* seedlings." Physiol Plant **142**(2): 170-178.
- Martinez, A. and M. Speranza (2005). "Ruiz-Due nas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin." Int Microbiol **8**: 195-204.
- Marzol, E., C. Borassi, S. P. D. Juárez, S. Mangano and J. M. Estevez (2017). "RSL4 Takes Control: Multiple Signals, One Transcription Factor." Trends in Plant Science.
- Masucci, J. D. and J. W. Schiefelbein (1994). "The *rhd6* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process." Plant Physiol **106**(4): 1335-1346.
- McQueen-Mason, S. J. and D. J. Cosgrove (1995). "Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding." Plant Physiol **107**(1): 87-100.
- Menand, B., K. Yi, S. Jouannic, L. Hoffmann, E. Ryan, P. Linstead, D. G. Schaefer and L. Dolan (2007). "An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants." Science **316**(5830): 1477-1480.

Merkouropoulos, G., D. C. Barnett and A. H. Shirsat (1999). "The Arabidopsis extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs." Planta **208**(2): 212-219.

Merkouropoulos, G. and A. H. Shirsat (2003). "The unusual Arabidopsis extensin gene atExt1 is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses." Planta **217**(3): 356-366.

Michard, E., P. T. Lima, F. Borges, A. C. Silva, M. T. Portes, J. E. Carvalho, M. Gilliam, L.-H. Liu, G. Obermeyer and J. A. Feijó (2011). "Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine." Science **332**(6028): 434-437.

Mirabet, V., P. Das, A. Boudaoud and O. Hamant (2011). "The role of mechanical forces in plant morphogenesis." Annual review of plant biology **62**: 365-385.

Mirosław, K., A. Daszkowska-Golec, A. Janiak, C. Karolina, N. Urszula, G. Sablok and S. Iwona (2015). "Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water-deficiency conditions." Journal of experimental botany: erv498.

Mishina, N. M., K. N. Markvicheva, D. S. Bilan, M. E. Matlashov, M. V. Shirmanova, D. Liebl, C. Schultz, S. Lukyanov and V. V. Belousov (2013). "Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe." Methods Enzymol **526**: 45-59.

Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." Trends in plant science **9**(10): 490-498.

Moehs, C. P., E. F. McElwain and S. Spiker (1988). "Chromosomal proteins of Arabidopsis thaliana." Plant molecular biology **11**(4): 507-515.

Molendijk, A. J., F. Bischoff, C. S. Rajendrakumar, J. Friml, M. Braun, S. Gilroy and K. Palme (2001). "Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth." The EMBO journal **20**(11): 2779-2788.

Mollenhauer, H. H. and C. Totten (1970). "Studies on seeds V. Microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm." Plant physiology **46**(6): 794-799.

Monshausen, G., T. Bibikova, M. Messerli, C. Shi and S. Gilroy (2007). "Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(52): 20996-21001.

Monshausen, G. B., M. A. Messerli and S. Gilroy (2008). "Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis." Plant Physiol **147**(4): 1690-1698.

Monshausen, G. B., N. D. Miller, A. S. Murphy and S. Gilroy (2011). "Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis." The Plant Journal **65**(2): 309-318.

Nelson, B. K., X. Cai and A. Nebenfuhr (2007). "A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants." Plant J **51**(6): 1126-1136.

- Neuhaus, J.-M. (1996). "Protein targeting to the plant vacuole: Targeting and glycosylation of plant secretory proteins." Plant physiology and biochemistry **34**(2): 217-221.
- Nielsen, K. L., C. Indiani, A. Henriksen, A. Feis, M. Becucci, M. Gajhede, G. Smulevich and K. G. Welinder (2001). "Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2." Biochemistry **40**(37): 11013-11021.
- Niu, Y., R. Chai, L. Liu, G. Jin, M. Liu, C. Tang and Y. Zhang (2014). "Magnesium availability regulates the development of root hairs in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." Plant Cell Environ **37**(12): 2795-2813.
- Niu, Y. F., G. L. Jin, R. S. Chai, H. Wang and Y. S. Zhang (2011). "Responses of root hair development to elevated CO₂." Plant Signal Behav **6**(9): 1414-1417.
- Noh, B., S.-H. Lee, H.-J. Kim, G. Yi, E.-A. Shin, M. Lee, K.-J. Jung, M. R. Doyle, R. M. Amasino and Y.-S. Noh (2004). "Divergent roles of a pair of homologous Jumonji/Zinc-Finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time." The Plant Cell **16**(10): 2601-2613.
- Okushima, Y., H. Fukaki, M. Onoda, A. Theologis and M. Tasaka (2007). "ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*." Plant Cell **19**(1): 118-130.
- Okushima, Y., P. J. Overvoorde, K. Arima, J. M. Alonso, A. Chan, C. Chang, J. R. Ecker, B. Hughes, A. Lui, D. Nguyen, C. Onodera, H. Quach, A. Smith, G. Yu and A. Theologis (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**(2): 444-463.
- Ouellet, F., P. J. Overvoorde and A. Theologis (2001). "IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype." The Plant Cell **13**(4): 829-841.
- Paque, S. and D. Weijers (2016). "Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything." BMC biology **14**(1): 67.
- Passardi, F., C. Cosio, C. Penel and C. Dunand (2005). "Peroxidases have more functions than a Swiss army knife." Plant cell reports **24**(5): 255-265.
- Passardi, F., D. Longet, C. Penel and C. Dunand (2004). "The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants." Phytochemistry **65**(13): 1879-1893.
- Passardi, F., C. Penel and C. Dunand (2004). "Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall." Trends in plant science **9**(11): 534-540.
- Passardi, F., M. Tognolli, M. De Meyer, C. Penel and C. Dunand (2006). "Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation." Planta **223**(5): 965-974.
- Paulsen, C. E. and K. S. Carroll (2009). "Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches." ACS chemical biology **5**(1): 47-62.
- Pekker, I., J. P. Alvarez and Y. Eshed (2005). "Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity." The Plant Cell **17**(11): 2899-2910.

Penel, C. and H. Greppin (1994). "Binding of plant isoperoxidases to pectin in the presence of calcium." FEBS letters **343**(1): 51-55.

Perrot-Rechenmann, C. (2010). "Cellular responses to auxin: division versus expansion." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a001446.

Piontek, K., A. Smith and W. Blodig (2001). Lignin peroxidase structure and function, Portland Press Limited.

Pitts, R. J., A. Cernac and M. Estelle (1998). "Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis." Plant J **16**(5): 553-560.

Piya, S., S. K. Shrestha, B. Binder, C. N. Stewart Jr and T. Hewezi (2014). "Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in Arabidopsis." Frontiers in plant science **5**.

Plieth, C. and S. Vollbehr (2012). "Calcium promotes activity and confers heat stability on plant peroxidases." Plant Signal Behav **7**(6): 650-660.

Preston, G. M., J. Jung, W. Guggino and P. Agre (1993). "The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel." Journal of Biological Chemistry **268**(1): 17-20.

Price, N. J., C. Pinheiro, C. M. Soares, D. A. Ashford, C. P. Ricardo and P. A. Jackson (2003). "A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from lupin." J Biol Chem **278**(42): 41389-41399.

Rademacher, E. H., B. Möller, A. S. Lokerse, C. I. Llavata-Peris, W. van den Berg and D. Weijers (2011). "A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family." The Plant Journal **68**(4): 597-606.

Ringli, C. (2010). "The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the Arabidopsis LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall." Plant J **63**(4): 662-669.

Roberts, K. and A. H. Shirsat (2006). "Increased extensin levels in Arabidopsis affect inflorescence stem thickening and height." J Exp Bot **57**(3): 537-545.

Rogg, L. E., J. Lasswell and B. Bartel (2001). "A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development." Plant Cell **13**(3): 465-480.

Rounds, C. M., E. Lubeck, P. K. Hepler and L. J. Winship (2011). "Propidium iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs." Plant Physiology **157**(1): 175-187.

Rubinstein, A. L., J. Marquez, M. Suarez-Cervera and P. A. Bedinger (1995). "Extensin-like glycoproteins in the maize pollen tube wall." Plant Cell **7**(12): 2211-2225.

Ruiz-Duenas, F., S. Camarero, M. Perez-Boada, M. Martinez and A. Martinez (2001). A new versatile peroxidase from Pleurotus, Portland Press Limited.

Rymen, B., A. Kawamura, S. Schäfer, C. Breuer, A. Iwase, M. Shibata, M. Ikeda, N. Mitsuda, C. Koncz and M. Ohme-Takagi (2017). "ABA suppresses root hair growth via OBP4 transcriptional-regulator repression of the RSL2 promoter." Plant Physiology: pp. 01945.02016.

- Ryu, K. H., Y. H. Kang, Y.-h. Park, I. Hwang, J. Schiefelbein and M. M. Lee (2005). "The WEREWOLF MYB protein directly regulates CAPRICE transcription during cell fate specification in the Arabidopsis root epidermis." Development **132**(21): 4765-4775.
- Salazar-Henao, J. E., I. C. Vélez-Bermúdez and W. Schmidt (2016). "The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis." Development **143**(11): 1848-1858.
- Sauer, M., S. Robert and J. Kleine-Vehn (2013). "Auxin: simply complicated." J Exp Bot **64**(9): 2565-2577.
- Savage, D. F. and R. M. Stroud (2007). "Structural basis of aquaporin inhibition by mercury." Journal of molecular biology **368**(3): 607-617.
- Schiefelbein, J., M. Galway, J. Masucci and S. Ford (1993). "Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of Arabidopsis thaliana." Plant Physiol **103**(3): 979-985.
- Schiefelbein, J., X. Zheng and L. Huang (2014). "Regulation of epidermal cell fate in Arabidopsis roots: the importance of multiple feedback loops." Frontiers in Plant Science **5**: 47.
- Schmid, M., D. Simpson and C. Gietl (1999). "Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(24): 14159-14164.
- Schmid, M., D. Simpson, F. Kalousek and C. Gietl (1998). "A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment." Planta **206**(3): 466-475.
- Schmid, M., D. J. Simpson, H. Sarioglu, F. Lottspeich and C. Gietl (2001). "The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(9): 5353-5358.
- Schnabelrauch, L. S., M. Kieliszewski, B. L. Upham, H. Alizedeh and D. Lamport (1996). "Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val—Tyr—Lys as putative intermolecular cross-link site." The Plant Journal **9**(4): 477-489.
- Schnabelrauch, L. S., M. Kieliszewski, B. L. Upham, H. Alizedeh and D. T. Lamport (1996). "Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site." Plant J **9**(4): 477-489.
- Senatore, A., C. P. Trobacher and J. S. Greenwood (2009). "Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato." Plant Physiology **149**(2): 775-790.
- Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta and K. Yoshimura (2002). "Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes." Journal of experimental botany **53**(372): 1305-1319.
- Shin, R., A. Y. Burch, K. A. Huppert, S. B. Tiwari, A. S. Murphy, T. J. Guilfoyle and D. P. Schachtman (2007). "The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction." The Plant Cell **19**(8): 2440-2453.

- Shin, R. and D. P. Schachtman (2004). "Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(23): 8827-8832.
- Shirsat, A., A. Bell, J. Spence and J. Harris (1996). "The Brassica napus extA extensin gene is expressed in regions of the plant subject to tensile stresses." Planta **199**(4): 618-624.
- Showalter, A. M. (1993). "Structure and function of plant cell wall proteins." Plant Cell **5**(1): 9-23.
- Showalter, A. M., B. Keppler, J. Lichtenberg, D. Gu and L. R. Welch (2010). "A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins." Plant Physiol **153**(2): 485-513.
- Shpak, E., E. Barbar, J. F. Leykam and M. J. Kieliszewski (2001). "Contiguous hydroxyproline residues direct hydroxyproline arabinosylation in Nicotiana tabacum." Journal of Biological Chemistry **276**(14): 11272-11278.
- Simon, M., M. M. Lee, Y. Lin, L. Gish and J. Schiefelbein (2007). "Simon M1, Lee MM, Lin Y, Gish L, Schiefelbein J. (2007) Distinct and overlapping roles of singlerepeat MYB genes in root epidermal patterning. Dev Biol. 2007 Nov 15;311(2):566-78. Epub 2007 Sep 14." Developmental biology **311**(2): 566-578.
- Skulachev, V. P. (1998). "Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades." FEBS letters **423**(3): 275-280.
- Smith, J. J., E. P. Muldoon and D. T. Lamport (1984). "Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures." Phytochemistry **23**(6): 1233-1239.
- Smith, J. J., E. P. Muldoon, J. J. Willard and D. T. Lamport (1986). "Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures." Phytochemistry **25**(5): 1021-1030.
- Smulevich, G., C. Jakopitsch, E. Droghetti and C. Obinger (2006). "Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG)." Journal of inorganic biochemistry **100**(4): 568-585.
- Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk and H. Youngs (2004). "Toward a systems approach to understanding plant cell walls." Science **306**(5705): 2206-2211.
- Sorensen, I., F. A. Pettolino, A. Bacic, J. Ralph, F. Lu, M. A. O'Neill, Z. Fei, J. K. Rose, D. S. Domozych and W. G. Willats (2011). "The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls." Plant J **68**(2): 201-211.
- Stratford, S., W. Barnes, D. L. Hohorst, J. G. Sagert, R. Cotter, A. Golubiewski, A. M. Showalter, S. McCormick and P. Bedinger (2001). "A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (Pex) proteins in monocots and dicots." Plant molecular biology **46**(1): 43-56.
- Sundaravelpandian, K., N. N. Chandrika and W. Schmidt (2013). "PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in Arabidopsis." New Phytol **197**(1): 151-161.

- Tagu, D., N. Walker, L. Ruiz-Avila, S. Burgess, J. A. Martinez-Izquierdo, J. J. Leguay, P. Netter and P. Puigdomenech (1992). "Regulation of the maize HRGP gene expression by ethylene and wounding. mRNA accumulation and qualitative expression analysis of the promoter by microprojectile bombardment." Plant Mol Biol **20**(3): 529-538.
- Takeda, S., C. Gapper, H. Kaya, E. Bell, K. Kuchitsu and L. Dolan (2008). "Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells." Science **319**(5867): 1241-1244.
- Tanaka, N., M. Kato, R. Tomioka, R. Kurata, Y. Fukao, T. Aoyama and M. Maeshima (2014). "Characteristics of a root hair-less line of Arabidopsis thaliana under physiological stresses." J Exp Bot **65**(6): 1497-1512.
- Tanaka, T., D. Yamauchi and T. Minamikawa (1991). "Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing Phaseolus vulgaris fruits." Plant Mol Biol **16**(6): 1083-1084.
- Than, M., M. Helm, D. Simpson, F. Lottspeich, R. Huber and C. Gietl (2004). "The 2.0-Å crystal structure of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase from germinating endosperm of Ricinus communis confirms its function in the final stage of programmed cell death." J. Mol. Biol **336**: 1103-1116.
- Tian, S., X. Wang, P. Li, H. Wang, H. Ji, J. Xie, Q. Qiu, D. Shen and H. Dong (2016). "Plant aquaporin AtPIP1; 4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways." Plant Physiology: pp. 01237.02015.
- Tiwari, S. B., G. Hagen and T. Guilfoyle (2003). "The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription." Plant Cell **15**(2): 533-543.
- Tognolli, M., C. Penel, H. Greppin and P. Simon (2002). "Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana." Gene **288**(1): 129-138.
- Torres, M. A. and J. L. Dangl (2005). "Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development." Current opinion in plant biology **8**(4): 397-403.
- Torres, M. A., J. L. Dangl and J. D. Jones (2002). "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(1): 517-522.
- Tournaire-Roux, C., M. Sutka, H. Javot, E. Gout, P. Gerbeau, D.-T. Luu, R. Bligny and C. Maurel (2003). "Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins." Nature **425**(6956): 393-397.
- Trobacher, C. P., A. Senatore, C. Holley and J. S. Greenwood (2013). "Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid." Planta **237**(3): 665-679.
- Tsukagoshi, H., W. Busch and P. N. Benfey (2010). "Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root." Cell **143**(4): 606-616.
- Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen and T. J. Guilfoyle (1997). "Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements." Plant Cell **9**(11): 1963-1971.

- Uslu, V. V. and G. Grossmann (2016). "The biosensor toolbox for plant developmental biology." Current opinion in plant biology **29**: 138-147.
- Valentin, R., C. Cerclier, N. Geneix, V. Aguié-Beghin, C. Gaillard, M. C. Ralet and B. Cathala (2010). "Elaboration of extensin-pectin thin film model of primary plant cell wall." Langmuir **26**(12): 9891-9898.
- Varaud, E., F. Brioude, J. Szécsi, J. Leroux, S. Brown, C. Perrot-Rechenmann and M. Bendahmane (2011). "AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp." The Plant Cell **23**(3): 973-983.
- Veitch, N. C. (2004). "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." Phytochemistry **65**(3): 249-259.
- Velasquez, M., J. S. Salter, J. G. Dorosz, B. L. Petersen and J. M. Estevez (2012). "Recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls." Front Plant Sci **3**.
- Velasquez, S. M., E. Barbez, J. Kleine-Vehn and J. Estevez (2016). "Auxin and cellular elongation." Plant Physiology: pp. 01863.02015.
- Velasquez, S. M., N. D. Iusem and J. M. Estevez (2011). "Root hair sweet growth." Plant Signal Behav **6**(10): 1600-1602.
- Velasquez, S. M., E. Marzol, C. Borassi, L. Pol-Fachin, M. M. Ricardi, S. Mangano, J. S. Denita, S. J. Salgado, D. J. Gloazzo and S. E. Marcus (2015). "Low sugar is not always good: Impact of specific O-glycan defects on tip growth in Arabidopsis." Plant Physiol.
- Velasquez, S. M., M. M. Ricardi, J. G. Dorosz, P. V. Fernandez, A. D. Nadra, L. Pol-Fachin, J. Egelund, S. Gille, J. Harholt, M. Ciancia, H. Verli, M. Pauly, A. Bacic, C. E. Olsen, P. Ulvskov, B. L. Petersen, C. Somerville, N. D. Iusem and J. M. Estevez (2011). "O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth." Science **332**(6036): 1401-1403.
- Velasquez, S. M., M. M. Ricardi, C. P. Poulsen, A. Oikawa, A. Dilokpimol, A. Halim, S. Mangano, S. P. D. Juarez, E. Marzol and J. D. S. Salter (2015). "Complex regulation of Prolyl-4-hydroxylases impacts root hair expansion." Molecular plant **8**(5): 734-746.
- Vembar, S. S. and J. L. Brodsky (2008). "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." Nature reviews Molecular cell biology **9**(12): 944-957.
- Vigil, E. L. (1970). "Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm." The Journal of cell biology **46**(3): 435-454.
- Vijayakumar, P., S. Datta and L. Dolan (2016). "ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE4 (RSL4) promotes root hair elongation by transcriptionally regulating the expression of genes required for cell growth." New Phytologist **212**(4): 944-953.
- Vincken, J.-P., H. A. Schols, R. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. Voragen and R. G. Visser (2003). "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture." Plant physiology **132**(4): 1781-1789.

- Wada, T., T. Tachibana, Y. Shimura and K. Okada (1997). "Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC." Science **277**(5329): 1113-1116.
- Walker, A. R., P. A. Davison, A. C. Bolognesi-Winfield, C. M. James, N. Srinivasan, T. L. Blundell, J. J. Esch, M. D. Marks and J. C. Gray (1999). "The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein." The Plant Cell **11**(7): 1337-1349.
- Wang, J.-W., L.-J. Wang, Y.-B. Mao, W.-J. Cai, H.-W. Xue and X.-Y. Chen (2005). "Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis." The Plant Cell **17**(8): 2204-2216.
- Wang, R. and M. Estelle (2014). "Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway." Current opinion in plant biology **21**: 51-58.
- Weigel, D. and J. Glazebrook (2002). Arabidopsis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Weijers, D. and D. Wagner (2016). "Transcriptional responses to the auxin hormone." Annual review of plant biology **67**: 539-574.
- Welinder, K. G. (1992). Plant peroxidases: structure-function relationships. Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects: 1-24.
- Welinder, K. G., A. F. Justesen, I. V. Kjaersgard, R. B. Jensen, S. K. Rasmussen, H. M. Jespersen and L. Duroux (2002). "Structural diversity and transcription of class III peroxidases from Arabidopsis thaliana." Eur J Biochem **269**(24): 6063-6081.
- Welinder, K. G., A. F. Justesen, I. V. Kjærsgård, R. B. Jensen, S. K. Rasmussen, H. M. Jespersen and L. Duroux (2002). "Structural diversity and transcription of class III peroxidases from Arabidopsis thaliana." The FEBS Journal **269**(24): 6063-6081.
- Wilmoth, J. C., S. Wang, S. B. Tiwari, A. D. Joshi, G. Hagen, T. J. Guilfoyle, J. M. Alonso, J. R. Ecker and J. W. Reed (2005). "NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation." Plant J **43**(1): 118-130.
- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V. Wilson and N. J. Provart (2007). "An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets." PLoS One **2**(8): e718.
- Winterbourn, C. C. (2014). "The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1840**(2): 730-738.
- Wolf, S., T. Rausch and S. Greiner (2009). "The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus." The Plant Journal **58**(3): 361-375.
- Won, S. K., Y. J. Lee, H. Y. Lee, Y. K. Heo, M. Cho and H. T. Cho (2009). "Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in Arabidopsis." Plant Physiol **150**(3): 1459-1473.

- Woodward, A. W. and B. Bartel (2005). "Auxin: regulation, action, and interaction." Ann Bot **95**(5): 707-735.
- Worley, C. K., N. Zenser, J. Ramos, D. Rouse, O. Leyser, A. Theologis and J. Callis (2000). "Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling." The Plant Journal **21**(6): 553-562.
- Xie, Q., G. Frugis, D. Colgan and N.-H. Chua (2000). "Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development." Genes & development **14**(23): 3024-3036.
- Xu, C., S. Wang, G. Thibault and D. T. Ng (2013). "Futile protein folding cycles in the ER are terminated by the unfolded protein O-mannosylation pathway." Science **340**(6135): 978-981.
- Yi, K., B. Menand, E. Bell and L. Dolan (2010). "A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs." Nature genetics **42**(3): 264-267.
- Zhang, D., D. Liu, X. Lv, Y. Wang, Z. Xun, Z. Liu, F. Li and H. Lu (2014). "The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in Arabidopsis." Plant Cell **26**(7): 2939-2961.
- Zhang, S., L. Huang, A. Yan, Y. Liu, B. Liu, C. Yu, A. Zhang, J. Schiefelbein and Y. Gan (2016). "Multiple phytohormones promote root hair elongation by regulating a similar set of genes in the root epidermis in Arabidopsis." Journal of experimental botany: erw400.
- Zhang, Y., X. Sheng, X. Meng and Y. Li (2014). "The circular F-actin bundles provide a track for turnaround and bidirectional movement of mitochondria in Arabidopsis root hair." PLoS One **9**(3): e91501.
- Zhao, Y. (2010). "Auxin biosynthesis and its role in plant development." Annual review of plant biology **61**: 49-64.