

Tesis Doctoral

Componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y transporte de iones calcio (Ca^{2+})

Denita Juárez, Silvina Paola

2017-09-19

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:

Denita Juárez, Silvina Paola. (2017-09-19). Componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y transporte de iones calcio (Ca^{2+}). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Denita Juárez, Silvina Paola. "Componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y transporte de iones calcio (Ca^{2+})". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-09-19.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y transporte de iones calcio (Ca^{2+}).

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

Lic. Silvina Paola Denita Juárez

Director de tesis: Dr. José M. Estevez

Consejero de estudios: Dra. Anabella Srebrow

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, 2017

Fecha de defensa: 19 de septiembre del 2017

Componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Transporte de Iones Calcio (Ca²⁺).

Los pelos radicales son importantes para la absorción de nutrientes y agua así como para el anclaje de la planta al suelo. Estos poseen un crecimiento polarizado, es decir que crecen únicamente en un solo sentido. Este tipo de crecimiento se caracteriza por tener un comportamiento oscilatorio acompañado por un gradiente de las Especies Reactivas de oxígeno (ROS) y de iones Ca²⁺. Además, para mantener el crecimiento polarizado es necesaria una vía de retroalimentación positiva entre Ca²⁺-ROS, donde intervienen enzimas como las NADPH oxidasas (NOXs) que producen anión superóxido (O₂⁻) en el apoplasto celular. En este trabajo se observó que además de la ya descrita NOXC, NOXH y NOXJ son requeridas para el crecimiento polarizado de los pelos radicales. Además se determinó que existe una conexión molecular entre la regulación transcripcional ejercida por la hormona auxina y la producción de ROS por parte de las NOXs. Mediante ensayos de Inmuno-precipitación de la Cromatina (ChIP) seguidos de PCR se observó que el factor de respuesta a auxinas 5 (ARF5) interactúa con el promotor del factor de transcripción tipo bHLH *RSL4 (Root hair defective 6 like 4)* estimulando la expresión de *RSL4*. A su vez, *RSL4* mostró ser capaz de interactuar y activar la transcripción de los genes de *NOXC* y *NOXJ*. Por otro lado, se identificó mediante ensayos farmacológicos que familias de transportadores de Ca²⁺ están involucrados en el mantenimiento del gradiente y de las oscilaciones de Ca²⁺ asociadas a ROS. Particularmente, se caracterizó la familia de ATPasas de Ca²⁺ tipo PIIA (ECAs). Cuando esta familia es inhibida por el ácido ciclopiazónico (CPA) las oscilaciones y los niveles de Ca²⁺ se vieron afectados y esto influyó en los niveles de ROS, demostrando la interrelación entre ambos componentes. Dentro de esta familia, se demostró que ECA3 contribuye al mantenimiento de las oscilaciones y los niveles de Ca²⁺ citoplasmático normales durante el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

Palabras Claves: *Arabidopsis thaliana*, Auxinas, , ATPasas de Ca²⁺ tipo PIIA (ECAs), Ácido ciclopiazónico (CPA), Crecimiento Polarizado, Especies Reactivas de Oxígeno, Factores de Transcripción de Respuesta a Auxinas (ARFs), NADPH Oxidasas (NOXs), Oscilaciones de Ca²⁺, Pelos Radicales, Regulación transcripcional de *NOXs*, *RSL4*, Transporte de Ca²⁺.

Molecular components that regulate polarized growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs: Reactive Oxygen Species (ROS) and Calcium Transport (Ca²⁺).

Root hairs are important for water and nutrient uptake as well as they are necessary for attaching plants to the soil. These cells have a polarized growth that means they grow only in one direction. This type of growth is characterized by an oscillatory behavior based on a tip-Ca²⁺ and ROS gradients. A positive amplification loop exists between Ca²⁺ and ROS signaling molecules. NADPH oxidases (NOXs), which synthesize superoxide anion in the apoplast, are involved in ROS homeostasis. Besides the already characterized NOXC, in this work it was determined that NOXH and NOXJ are also required for polarized growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. In addition, there is a molecular connection between the transcriptional regulation mediated by the hormone auxin and the ROS production. Immunoprecipitation of the chromatin (ChIP)-PCR assays showed that the auxin response factor 5 (ARF5) is able to bind to the promoter of a bHLH transcription factor called *RSL4 (Root hair defective 6 like 4)* and this interaction stimulates *RSL4* expression. In addition, *RSL4* was able to bind and activate the transcription of the *NOXC* and *NOXJ* genes. On the other hand, pharmacological assays allowed to identify which Ca²⁺ transporter families are involved in gradient maintenance and in the regulation of Ca²⁺ oscillations associated to ROS. In particular, a Ca²⁺ ATPase type PII family (ECAs) was characterized in detail. When the ECA-family is inhibited with cyclopiazonic acid (CPA), Ca²⁺ levels and its oscillations were affected impacting on ROS levels, proving a close relationship between ROS and Ca²⁺. In the root hair polarized growth, *ECA3* showed to be involved in the maintenance of normal Ca²⁺ levels and Ca²⁺ oscillations.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, Auxins, Ca²⁺ ATPases type PIIA (ECAs), Cyclopiazonic Acid (CPA), Polarized Growth, Reactive Oxygen Species, Auxin Response Factors (ARFs), NADPH Oxidases (NOXs), Ca²⁺ Oscillations, Root Hairs, Transcriptional Regulation of the NOXs, *RSL4*, Ca²⁺ Transport.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a Silvina Mangano por todo lo que me enseñó y por el apoyo que me ha dado y que da a todos en el laboratorio.

A Juan, Cecilia Borassi, Eliana, a Javier, Rodrigo, Cecilia Beyrne y a Silvina nuevamente por todas esas discusiones de ciencia y de la vida. A través de los años en el laboratorio generamos una amistad. Juntos aprendimos un montón de cosas, nos ayudamos mutuamente, nos aguantamos tal cual somos y nos divertimos mucho.

A José por darme el lugar de trabajo y las herramientas necesarias para realizar la tesis.

A Luciana, Melina, Martín y a Martiniano que han sido grandes compañeros.

A todos los integrantes de la FIL y del IFIBYNE que me dieron lugar y ayuda constante para llevar a cabo el trabajo de investigación de esta tesis.

A los que a través de estos años han sido profesores míos colaborando con mi crecimiento profesional.

A los colaboradores Dr. Alejandro Nadra, Dr. Hyung-Taeg Cho, Hee-Seung Choi, Dra. Laura Barberini y Dr. Jorge Muschiatti por sus contribuciones claves en esta tesis.

Al Dr. Andrea Bassi, Dr. Alex Costa y Dr. Gianluca Valentini por darme el lugar y las herramientas necesarias para poder aplicar SPIM en mis mutantes.

A Alessia, Gandolfo y Andrea por toda la ayuda, enseñanzas profesionales y por hacer de mi estadia en Milán una experiencia super enriquecedora desde lo profesional hasta lo personal.

A mi familia por darme el apoyo en cada decisión que he tomado en mi vida y colaborar con todo lo que tienen a su alcance para que yo pueda cumplir mis objetivos.

A mi mamá que siempre está conmigo aguantándome y acompañándome.

A mi familia de corazón de Buenos Aires (Sole, Meco, Capo, Ale, Tomás, Nabi, Martín, Rafa, Yeni) que me ayudaron siempre tanto en lo profesional como en lo personal.

Y por último, a Yoel por acompañarme, cuidarme, apoyarme y ayudarme siempre de manera incondicional en todos mis proyectos, por escucharme practicar los seminarios y por ocuparse de miles de cosas simplemente para que yo pudiera centrarme en mi tesis y en mis proyectos.

Hipótesis

Existe una estricta regulación de los niveles de Ca^{2+} y de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*.

Los niveles de ROS en el citoplasma celular están regulados por la producción de anión O_2^- en el apoplasto por parte de las NADPH oxidasas (NOXs). Estas están involucradas indirectamente en la regulación de los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos.

El gradiente de Ca^{2+} necesario para el crecimiento polarizado es generado por la participación de numerosos sistemas de transporte de Ca^{2+} que directa o indirectamente influyen en los niveles de ROS citoplasmáticos.

Objetivo General

Identificar y caracterizar los componentes moleculares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales a nivel de la expansión celular: especies reactivas de oxígeno (ROS) y transporte de iones calcio (Ca^{+2}).

Objetivos específicos

ROS

-Identificar y caracterizar las enzimas NADPH oxidasas involucradas en la homeostasis de ROS citoplasmáticas para el crecimiento polarizado de los pelos radicales y su relación con los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos (Ca^{2+} cit).

-Caracterizar la regulación transcripcional de los genes que codifican para las NADPH oxidasas.

-Caracterizar la interrelación entre ROS y Ca^{2+} en respuesta a estímulos intracelulares (auxinas) y extracelulares (fosfato inorgánico).

Ca^{2+}

-Identificar los transportadores de Ca^{+2} involucrados en el crecimiento polarizado de los pelos radicales mediante el uso de inhibidores farmacológicos y herramientas genéticas (mutantes insercionales de T-ADN).

-Caracterizar los transportadores de Ca^{2+} que regulan el crecimiento polarizado y su interrelación con ROS mediante el uso de biosensores fluorescentes (*Hyper* y *Camaleón*).

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Denita-Juárez, Silvina P.*; Mangano, Silvina & Estevez, José M. (2015). **Improved ROS Measurement in Root Hair Cells**. *Plant Cell Expansion: Methods and Protocols*, p. 67-71. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1242. DOI 10.1007/978-1-4939-1902-4_6, ©Springer Science+Business Media New York 2015.

Mangano, Silvina*; Denita-Juárez, Silvina P.* & Estevez, José M. (2016). **ROS regulation of polar growth in plant cells**. *Plant physiology*, vol 171(3), p. 1593-1605.

Mangano, Silvina*; Denita-Juarez, Silvina P.*; Choi, Hee-Seung*; Marzol, Eliana*; Hwang, Youra; Ranocha, Philippe; Velasquez, Silvia M.; Borassi, Cecilia; Barberini, María Laura; Artekman, Ariel A.; Mschietti, 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.

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.

*Estos autores contribuyeron igualmente al trabajo.

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.

Ca²⁺cit: Ca²⁺ citoplasmático.

cADN: ADN copia.

CaM: Calmodulina.

CFP: Proteína fluorescente cian.

CNQX: 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione.

CPA: ácido ciclopiazónico.

CPKs o CDPKs: Proteínas quinasas dependientes de Ca²⁺.

cpYFP: Proteína fluorescente amarilla circularizada.

EXP: Expansina.

EXT: Extensina.

FAD: Adenina Flavin Dinucleótido.

FRET: Energía de resonancia Förster.

FT: Factor de transcripción.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

H₂O₂cit: H₂O₂ citoplasmático.

IAA: ácido 3-indol-acético.

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.

mH: Medio de crecimiento de plantas *Hoogland*.

MS: sales *Murashige and Skoog*.

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

NADPH: Nicotinamida adenina di nucleótido fosfato.

NOXs: NADPH oxidasas.

p7: promotor de *EXPANSINA7*.

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.

ROSapo: Especies reactivas del oxígeno apoplásticas.

ROScit: Especies reactivas del oxígeno citoplasmáticas.

TM: Transmembrana.

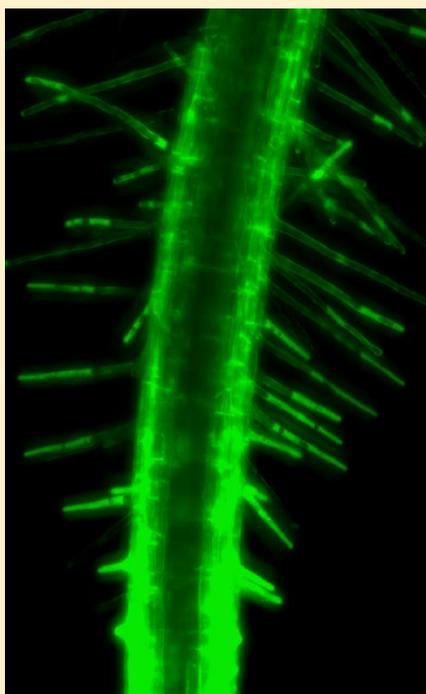
Wt: planta de genotipo salvaje.

YC3.6: biocensor de Ca^{2+} *Camaleón 3.6*.

YFP: proteína fluorescente amarilla.

Capítulo 1

Caracterización de las enzimas que mantienen la homeostasis de ROS, su regulación transcripcional y su interrelación con Ca^{2+} .



Capítulo 1. Caracterización de las enzimas que mantienen la homeostasis de ROS, su regulación transcripcional y su interrelación con Ca²⁺.

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 radicales y el tubo polínico han sido incorporadas como excelentes modelos para estudiar la expansión celular polarizada. Este tipo de crecimiento se caracteriza por la polarización celular de todos los componentes celulares de manera que la célula crece únicamente en un sentido (**Fig. 1.11.B**).

La función biológica de los pelos radicales es incrementar el área superficial radical facilitando la absorción de nutrientes y agua (H₂O) del suelo, los cuales son fundamentales para el crecimiento y mantenimiento vegetal. Además, participan en el anclaje de la raíz al sustrato y a la asociación de la raíz con microorganismos [1].

Los pelos radicales se desarrollan a partir de células tricoblásticas de la epidermis de la raíz en la zona de diferenciación de la misma. La determinación del destino celular es dependiente de la posición celular, solo células que estén en contacto con dos células del cortex de la raíz van a dar lugar a pelos radicales (**Fig. 1.11.A**). Las células que no desarrollan pelos radicales se denominan atricoblastos. Todas las células de la epidermis de la raíz poseen la capacidad de desarrollar pelos radicales pero los componentes complejos moleculares involucrados son inhibidos en las células atricoblásticas con la consecuente inhibición del desarrollo del pelo.

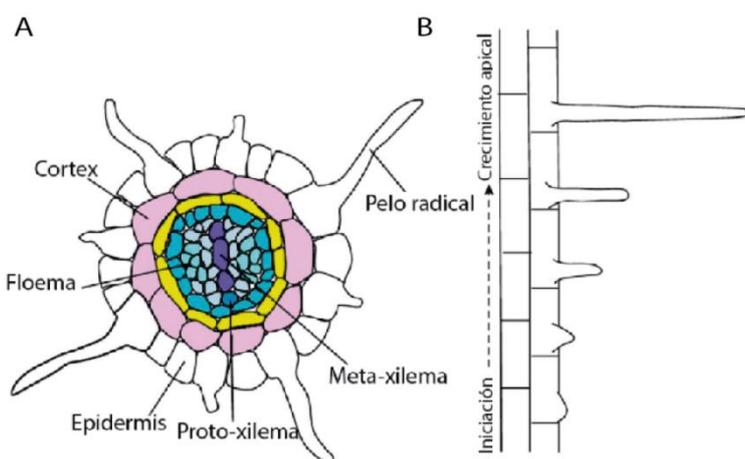


Figura 1.11: Esquema de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. (A) Corte transversal de la raíz, se puede observar la formación de pelos radicales a partir de células de la epidermis que se encuentran en contacto con dos células del cortex (determinación del destino celular dependiente de la posición) (B) Desarrollo de un pelo radical creciendo por el ápice del mismo (crecimiento polarizado) Esquema extraído y modificado de Salazar-Henao et al. (2016) [2]

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) [3-6]. Otras señales como la disponibilidad de H₂O, monóxido de carbono [7] y niveles de dióxido de carbono también pueden afectar el desarrollo de los pelos radicales [8-10]. El crecimiento polarizado de los pelos radicales también responde a señales endógenas como etileno y auxinas [11].

Durante la expansión celular polarizada, la zona apical de los pelos radicales se caracteriza por la formación un gradiente de Ca^{2+} citoplasmático (Ca^{2+} cit) y de Especies Reactivas de Oxígeno citoplasmáticas (ROScit). Estos se encuentran más concentrados en el ápice de la célula y su concentración va disminuyendo hacia la base del pelo radical. Además, el Ca^{2+} cit y las ROScit tienen comportamiento oscilatorio, es decir que se alternan momentos de altas concentraciones con momentos en que los niveles disminuyen (Fig. 1.3I). Las ROS son producidas mayoritariamente en el apoplasto celular por las NADPH oxidasas o NOXs (también conocida como RHD2 por *root hair defective 2* y como RBOHC por *Respiratory Burst Oxidase Homolog protein C*). El gradiente de Ca^{2+} es necesario para la exocitosis de vesículas que contribuyen a la generación de nueva membrana y pared celular del ápice del pelo. Además, el Ca^{2+} 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. 1.2I). Se postula que existe una retroalimentación positiva entre ROS y Ca^{2+} necesaria para sostener el crecimiento polarizado [12]. Por otro lado, es crítico el pH citoplasmático y apoplástico. El pH citoplasmático se caracteriza por ser oscilatorio al igual que los niveles de ROScit y Ca^{2+} cit. Los cambios en el pH son regulados mayormente por ATPasas de H^+ de membrana (AHA) [13]. Otras enzimas como las ROP GTPasas han mostrado ser cruciales en la regulación del crecimiento polarizado de los pelos radicales [14, 15]. 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. 1.2I).

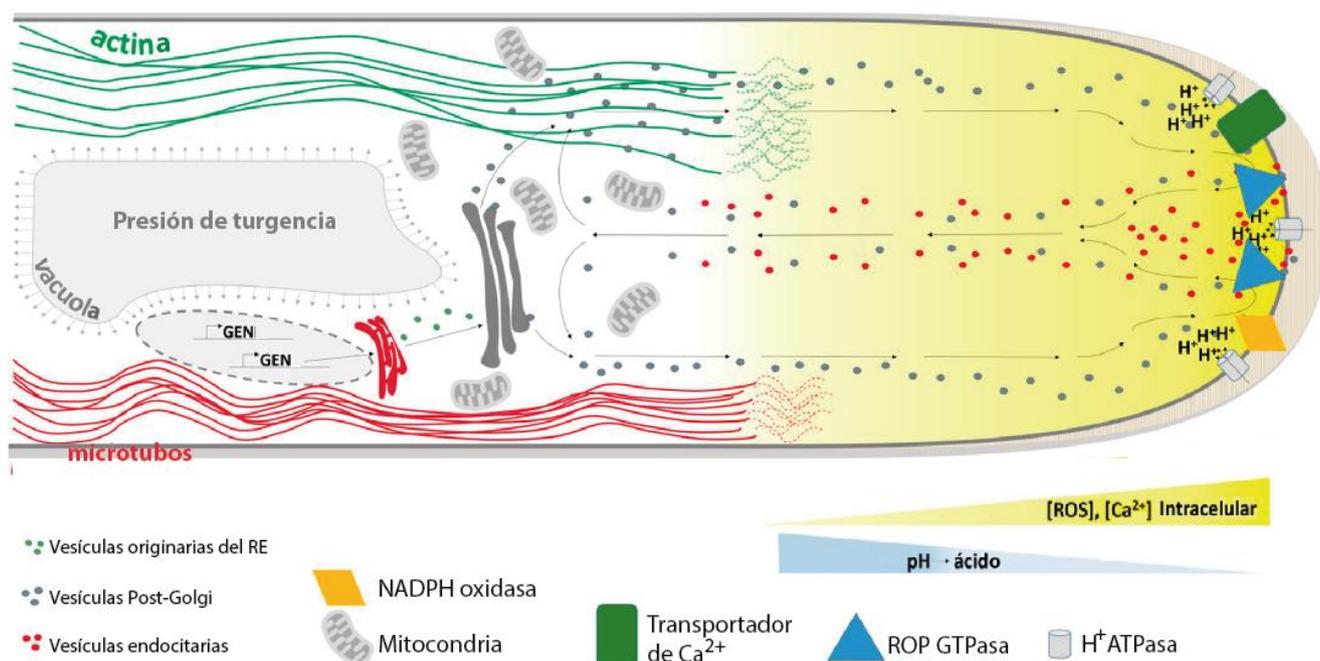


Figura 1.2I: Componentes moleculares y celulares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. Se puede observar gráficamente los diferentes componentes moleculares (ROPGTPasa, H^+ ATPasa, Transportadores de Ca^{2+} , NADPHoxidasa) y celulares (Vesículas originarias 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 y la transcripción y expresión de estos está finamente regulada. Figura extraída y modificada de Balcerowicz et al. (2015) [16].

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 (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) 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 (1O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos [17].

Es importante aclarar que en esta tesis se limitara la discusión de ROS a HO^\cdot , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y 1O_2 .

Niveles elevados de Ca^{2+} cit en el ápice del pelo radical activa la producción de ROS apoplásticas (ROSapo) en una reacción catalizada por las NOXs. El balance de los niveles de ROScit y ROSapo están regulados por la síntesis y los sistemas de depuración a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos [18]. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se pueden incluir al Ascorbato, al glutatión, al tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides [19]. 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 [18] 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 $1 \mu m/min$ [15, 20] 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 Ca^{2+} cit, ROScit y pH [21] (**Fig. 1.3I**). En los pelos radicales, estas fluctuaciones en las concentraciones de ROSapo y los cambios en pH apoplástico/ citoplasmático precede los picos de crecimiento por 7-8 segundos, mientras que las oscilaciones en Ca^{2+} cit están adelantadas solamente 5-6 segundos [21, 22] (**Fig. 1.3I**). Estos antecedentes indican que el crecimiento polarizado en los pelos radicales es precedido y quizás transientemente reprimido por niveles elevados de Ca^{2+} cit y consecuentemente, concentraciones elevadas de ROSapo y alcalinización del pH apoplástico.

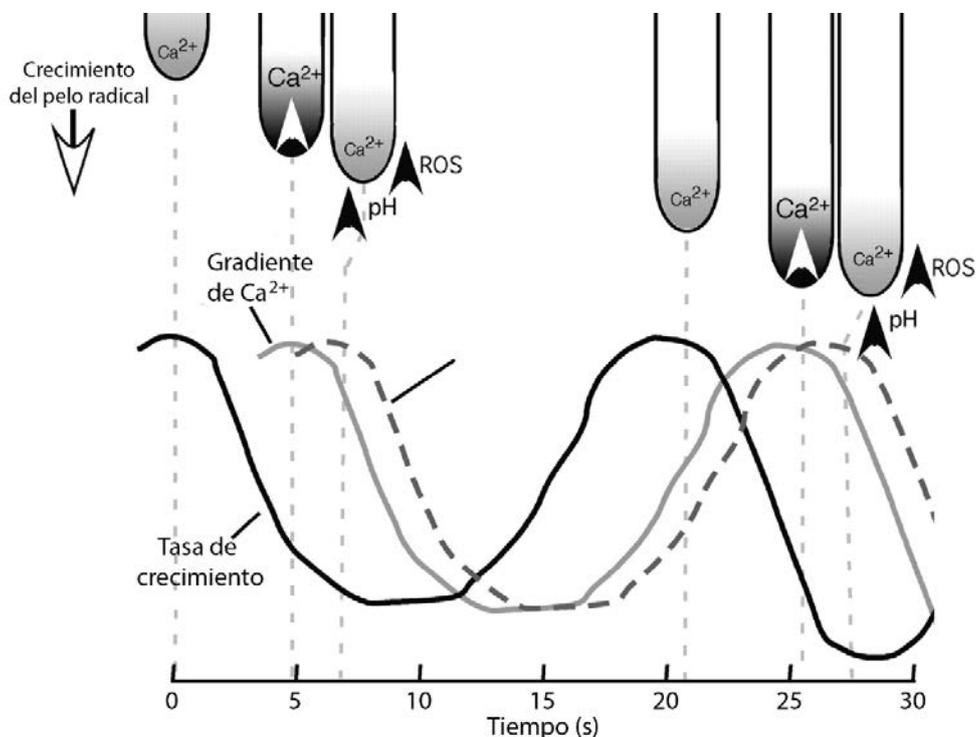


Figura 1.3I: Comportamiento oscilatorio en pelos radicales. Relación temporal y espacial entre el crecimiento, el gradiente de Ca^{2+} en el ápice del pelo radical, pH de la pared celular y ROS. Esquema extraído y modificado de Monshausen et al. (2008) [21].

1.2 NADPH oxidasas: NOXs

A pesar de que las ROS son producidas en numerosos compartimientos intracelulares (ejemplo: cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas) [23, 24]; esta tesis está enfocada en las ROS generadas en la cara extracelular de la membrana plasmática (apoplasto) y transportadas al medio citoplasmático. Las principales enzimas responsables de la producción de anión superóxido (O_2^-) que contribuyen a la homeostasis de ROSapo son las Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas (NADPH oxidasas, NOXs) las cuales también son conocidas como Oxidasas Homologas del Estallido respiratorio (RBOHs, *Respiratory Burst Oxidase Homolog*). Estas catalizan la producción de anión O_2^- , transfiriendo electrones a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática desde el dador citoplasmático NADPH a una molécula de Oxígeno (O_2) vía Adenina Flavin Dinucleótido (FAD) (Fig. 1.4I). Como consecuencia de esta reacción se genera una diferencia de voltaje transmembrana (TM) [25].

Estas enzimas son proteínas con seis dominios TM, un dominio regulador N-terminal que incluye un sitio de pegados de la GTPasa ROP, dos sitios de unión a calcio tipo *EF-hands*, y numerosos sitios de fosforilación susceptibles a quinasas dependientes de Ca^{2+} llamadas CPKs o CDPKs (por *Calcium Dependent Phosphorilation Kinases*) (Fig. 1.4I) [7]. Ambas modificaciones tienen efectos sinérgicos en la actividad de las NOXs, aunque parece que la fosforilación podría ser un pre-requisito para la activación de las NOXs por Ca^{2+} [26-28].

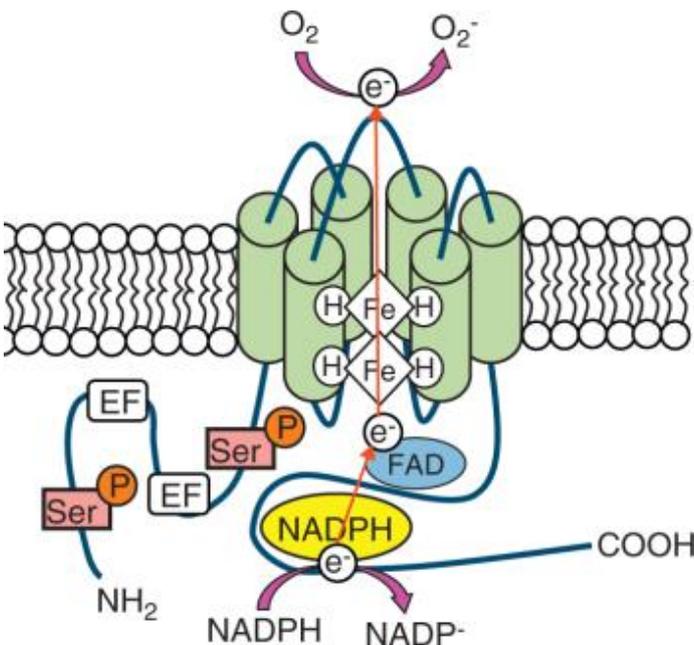


Figura 1.4I: Estructura de las NOXs en plantas. Se observan los diferentes dominios de las NOXs. La enzima posee 6 dominios TM que son capaces de quelar el Fe^{2+} necesario para la translación de electrones (e^-) a través de la membrana. Finalmente estos son los responsables de la reducción del O_2 . En el extremo C-terminal se encuentran los sitios de unión a co-factores como NADPH y FAD y en el extremo N-terminal se encuentran los sitios de fosforilación y las *EF-Hands*. Esquema extraído y modificado de Suzuki et al. (2011) [29]

Experimentos llevados a cabo en líneas celulares HEK293 (células de hígado humano embrionario) muestran que induciendo mutaciones en los dominios *EF-hands* de las proteínas NOXC y NOXH/NOXJ se suprime completamente o parcialmente la capacidad de estas de catalizar la síntesis de O_2^- [30]. Por otro lado, numerosos residuos de Ser han sido identificados como posibles sitios de fosforilación de las NOXs, incluyendo la Ser-318/Ser-322 en la NOXC [7, 31-34]. En las secuencias de aminoácidos de las NOXH y NOXJ la Ser-318 es conservada mientras que las Ser-322 es remplazada por una treonina potencialmente fosforilable. Esto sugiere la existencia de un posible mecanismo de activación en común entre estas tres NOXs.

Dentro del extremo C-terminal de las NOXs se encuentra un sitio de unión a FAD/NADPH fundamental para la catálisis del producto final ya que donan los electrones requeridos para la reducción del O_2 y su transformación en O_2^- . Finalmente, este es mayoritariamente convertido a H_2O_2

de manera espontánea con la intervención o no de la enzima SOD. Estas dos moléculas poseen diferentes características físico químicas, el anión O_2^- es altamente inestable y es incapaz de difundir a través de las membranas celulares. En contraste, H_2O_2 es considerado un segundo mensajero ya que posee numerosas características para esto. Entre ellas, esta molécula es relativamente estable (vida media aproximada: 1ms) y puede moverse a través de las membranas vía acuaporinas. Además, H_2O_2 reacciona selectivamente con residuos de Cisteína de las proteínas de señalización (Ejemplo: peroxirredoxinas, tiorredoxinas y quinasas tipo receptores ricas en cisteína) [35]. Por otro lado, H_2O_2 puede tener un impacto directo en el estado redox de proteínas ricas en cisteína, así como en receptores del tipo quinasas ricas en Cisteínas (CRKs, *Cys-rich receptor-like kinases*, [36]. Debido a la reactividad de la molécula, los niveles de H_2O_2 son finamente regulados mediante sistemas antioxidantes con gran precisión. Aumentos excesivos en las concentraciones de esta molécula tiene efectos nocivos en la célula, desencadenando fenómenos celulares como apoptosis.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas 10 NOXs (NOXA-NOXJ) y estas han sido implicadas en la señalización de ROS asociada a numerosos procesos del desarrollo y a respuestas de estrés biótico y abiótico [37, 38]. La NOXB mostró estar involucrada en seed after-ripening (Müller et al., 2009). Tanto la NOXD como NOXF están involucradas en el cierre de los estomas inducido por el ácido absísico [39] y en la defensa de la planta a patógenos [40]. La NOXF está involucrada en la formación de la banda de Caspari de las raíces [41]. Dos NOXs (NOXH y NOXJ) han sido implicadas en la expansión celular del tubo polínico y en la fertilización [30, 42] y una NOX (NOXC, también conocida como RHD2 por *Root Hair Defective 2*) ha sido implicada en el desarrollo y crecimiento polarizado del pelo radical [7]. Se demostró que la actividad de la NOXC está regulada positivamente por Ca^{2+} y que posee numerosos posibles sitios de fosforilación que incluyen Ser-318/Ser-322 en el extremo N-terminal de la proteína [7, 43]. Recientemente, se describió en monocotiledóneas una NOX que posee gran similitud a las proteínas NOXH y NOXJ (nombrada RTH5, por *Root Hair less 5*), posee un rol importante en la transición entre la formación de la protuberancia y el crecimiento del ápice en los pelos radicales en estas plantas [44].

1.2.a Regulación de la actividad de las NOXs mediada fosforilación

La fosforilación de las NOXs en su dominio N-terminal es fundamental ya estimula la producción de anión O_2^- por parte de las mismas [7]. Esta puede ser mediada por mecanismos independientes de Ca^{2+} , por ejemplo la quinasa BIK1 (por *Botrytis-induced kinase 1*) es capaz de fosforilar directamente residuos específicos de la NOXD [45]. Por otro lado, la fosforilación de las NOXs puede ser mediada por quinasas dependientes de Ca^{2+} (CPKs o CDPKs, *Calcium Dependent Protein Kinases*). Estas son proteínas Ser/Thr quinasas que actúan como sensores de Ca^{2+} y se encuentran ampliamente distribuidas en plantas [46]. Estas proteínas tienen un dominio N-terminal variable (V), un dominio con actividad quinasa, un dominio con actividad auto-inhibitoria y un dominio tipo calmodulina (CaM) que incluye motivos *EF-hands* en el extremo C-terminal de la proteína. La unión de Ca^{2+} a estos sitios desencadena cambios conformacionales que afectan la actividad de la quinasa [47, 48]. A pesar de que ninguna de las CPKs tiene dominios transmembrana, la mayoría de estas tienen potenciales motivos de miristoilación y palmitoilación al principio del dominio variable y estos serían responsables de la asociación de las CPKs a la membrana [49, 50]. Se ha demostrado que diferentes CPKs se localizan en diferentes membranas celulares incluyendo membrana plasmática, membrana del RE y membranas de los peroxisomas [51, 52]. Dos CPKs de patatas mostraron ser capaces de inducir la producción de anion O_2^- mediante la fosforilación de dos residuos de serina en el dominio N-terminal de la *StNOXB* (*St: Solanum tuberosum*) [31, 53].

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas 34 CPKs que se agrupan en 4 subgrupos en base de la similitud en sus secuencias [49]. Solo algunos sustratos de estas enzimas han sido identificados. CPK1 ha sido implicada en la defensa de la planta a patógenos. La

sobreexpresión de esta en un sistema heterólogo (protoplastos de tomate) resulta en la activación de la actividad de las NOXs con aumento de la producción de ROS [54]. Además, la CPK5 mostró ser capaz de fosforilar a NOXD *in vivo*. Estas quinasas han mostrado especificidad de sustrato determinado por un dominio variable N-terminal que estaría determinando la localización subcelular de la proteína, lo cual es fundamental para la determinación de su actividad [53].

Además, en *Arabidopsis*, la actividad de las NOXs mostró ser regulada por la fosforilación mediada por proteínas quinasas que interactúan con CBL (CIPK, *Cbl-Interacting Protein Kinases*). Se demostró que la unión directa de Ca^{2+} así como la fosforilación mediada por CIPK26 causa la activación sinérgica de la NOXF [55, 56]. Este efecto sinérgico también fue observado en la NOXD [57].

1.3 Las ROSapó son transportadas hacia el citoplasma para activar respuestas río abajo.

Como se mencionó anteriormente las NOXs producen O_2^- en el apoplasto celular, sin embargo, la mayoría de los trabajos enfocados en crecimiento polarizado observan niveles fisiológicos de ROS en el citoplasma, especialmente cerca del ápice del pelo radical [22]. Se debe tener en cuenta que ROScit también pueden ser producidas por numerosas enzimas en diferentes compartimientos intracelulares, y también como productos inespecíficos de la cadena de transporte electrones en mitocondrias y en cloroplastos. No se conoce la regulación entre la producción de ROS en el apoplasto y la producción de ROS en los compartimientos intracelulares ni de qué manera estos contribuyen a la homeostasis de ROScit.

Como se mencionó previamente, el anión O_2^- producido por las NOXs en el apoplasto celular es transformado de manera espontánea a H_2O_2 . Estudios recientes muestran que el H_2O_2 se transporta a través de la membrana plasmática mediante acuaporinas tipo proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP, *Plasma membrane Intrinsic Protein*) [58, 59]. Las acuaporinas son proteínas que forman poros en las membranas celulares, a través de los cuales se mueve el H_2O por ósmosis. El paso de H_2O a través de las acuaporinas puede ser inhibido por cloruro de mercurio (HgCl_2) y azida de sodio (NaN_3) [60-62].

Hasta el momento se han secuenciado acuaporinas en todas las especies de plantas y están altamente conservadas. En *Arabidopsis thaliana*, se encuentran aproximadamente 35 acuaporinas de las cuales 13 son de tipo PIP. En un trabajo reciente se detectó que se activa el influjo de H_2O_2 apoplástico a través de las PIP1;4 cuando la planta es infectada por un patógeno y esta lo reconoce mediante la detección patrones moleculares asociados a patógenos [63]. Por otro lado, se ha demostrado en sistemas heterólogos (por ejemplo: midiendo la toxicidad del H_2O_2 en levaduras) el transporte de H_2O_2 por varias proteínas PIP, incluyendo PIP2;4 y PIP 2;7 las cuales están altamente expresadas en pelos radicales. El mutante de *pip2-4* está reportado de tener pelos radicales más largos que plantas tipo salvaje (Wt, *wild type*) cuando se crecen en condiciones normales o en ausencia de fosfato [64].

No se encuentra establecido cómo concentraciones elevadas de ROScit son traducidas en una respuesta río abajo. Se demostró que la proteína inducible por estrés oxidativo 1 (OXI1, *OXidative signal-Inducible1*), la cual pertenece a la familia de AGC quinasas, es requerida para los eventos de respuesta a ROS en la elongación de los pelos radicales [65, 66]. Estos estudios sobre OXI1 (también llamada AGC2-1) conectan la señal del estallido oxidativo con las respuestas río abajo [65, 67]. Recientemente, se postuló que OXI1 activa a una proteína quinasa citoplasmática tipo receptor MRI (MARIS). Esta está presente tanto en los pelos radicales como en los tubos polínicos y se postula que actúa río abajo de *Catharanthus roseus* RLKs (CrRLK), FERONIA (FER) y ANXUR1 (ANX1)/ANX2 [68] (Boisson-Dernier et al., 2015). Por otro lado, OXI1 es capaz de fosforilar proteínas involucradas en la vía de las MAP quinasas de manera dependiente de ROS lo que resulta en la activación de genes involucrados en la respuesta de ROS [69]. Numerosas mutantes de la cascada de

señalización de las MAPK exhiben defectos en el crecimiento de pelo radical, sugiriendo que componentes de esta cascada son reguladores positivos del crecimiento del pelo radical [70-72]. Por el contrario, el mutante de MAPK6 (*mapk6wb/ir*) es capaz de desarrollar pelos radicales más largos de lo regular, por lo que este pareciera ser un regulador negativo del crecimiento polarizado [73]. No está claro como estos componentes de la cascada de las MAPK se encuentran asociadas a la activación de OXI1 mediante H₂O₂ citoplasmático como ha sido reportado para heridas, daño celular y otras señales como Ca²⁺, hormonas (por ejemplo auxinas y etileno) o el estado de nutrientes (por ejemplo fosfato), los cuales también pueden ser asociados a la respuesta mediada por MAPK. Por otro lado, la proteína IRE (*Incomplete Root hair Elongation*) [74] la cual es una quinasa tipo AGC al igual que OXI1, también promueve el crecimiento de los pelos radicales, haciendo aún más compleja la interpretación de la regulación del crecimiento polarizado mediado por ROS.

1.4 Mecanismo molecular de la diferenciación celular.

Los pelos radicales, además de ser buenos modelos para estudiar el crecimiento polarizado, también son muy estudiados para comprender los mecanismos moleculares de diferenciación celular. En la epidermis de las raíces se encuentran dos tipos celulares: aquellos que no son capaces de formar pelos llamados atricoblastos y los que se diferencian en pelos llamados tricoblastos. En *Arabidopsis thaliana*, el destino celular de las células de la epidermis se encuentra caracterizado y es dependiente de la posición celular (**Fig. 1.11, A**) [75, 76]. Las células de la epidermis que se encuentran en la posición de una célula que no va a dar pelo radical, expresan un complejo que incluye numerosos factores de transcripción (FTs). Entre ellos se incluye el factor WER (WEREWOLF), GL3/EGL3 (GLABRA3 asociado al activador de GLABRA3) y una proteína tipo WD40 llamada TTG (*Transparent Test Glabra*) (**Fig. 1.51**). Estos son capaces de influenciar la expresión del FT denominado GL2 (GLABRA2) [77]. GL2 suprime directamente la expresión del FT de la familia bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), RHD6 (*root hair defective 6*) y de los FTs tipo RHD6 (RSL) como RSL1, RSL2 resultando en la inhibición de la morfogénesis de los pelos radicales (**Fig. 1.51**) [78]. En la posición de pelo radical, un receptor tipo quinasa rico en repeticiones de leucina llamado SCRAMBLE recibe señales externas de los tejidos internos de la raíz [79] y suprime la expresión de WER inhibiendo así la formación del complejo WER-GL3/EGL3-TTG (**Fig. 1.51**). Debido a la ausencia de este complejo inhibitorio, RHD6 se expresa activando la transcripción de los genes requeridos para la diferenciación celular a tricoblastos (**Fig. 1.51**). Estudios demuestran que RHD6 regula directamente la expresión del gen *RSL4* y *RSL2* (homólogo de RHD6) e indirectamente regula a EXPANSINA 7 la cual es una proteína específica de pelo radical (EXP7).

Los genes específicos para la morfogénesis de los pelos radicales incluyen aquellos que regulan la organización de la pared celular, la secreción vesicular y otros procesos fundamentales para la diferenciación celular [77]. Se han identificado genes específicos de pelos que son expresados solamente en este tipo celular y están involucrados en los procesos mencionados. Estos genes están caracterizados por contener en sus zonas promotoras elementos específicos de pelos radicales (RHE, *Root Hair Element*) de aproximadamente 16-17bp [80, 81].

Entre los reguladores positivos de la diferenciación y el crecimiento de los pelos radicales se pueden mencionar la deficiencia de fosfato (señal extracelular) y la presencia de la fitohormona auxina (señal intracelular) entre otros. El primero actuaría como señal de deficiencia de nutrientes en el suelo en que la planta crece estimulando el crecimiento del pelo radical para ayudar a aumentar la superficie de contacto con el suelo y así favorecer la absorción de nutrientes. En presencia de niveles elevados de fosfato se reprime el crecimiento polarizado de los pelos radicales. El segundo es una señal interna que activa diferentes procesos celulares que desembocan en un aumento en la longitud del pelo radical entre otras cosas. No se conoce si las auxinas son capaces de modificar el

destino celular a tricoblastos afectando de alguna manera la formación del complejo inhibitorio WER-GL3/EGL3-TTG.

Poco es conocido sobre la regulación transcripcional de las NOXs durante el crecimiento polarizado. En los pelos radicales, RSL4 es considerado un regulador maestro del crecimiento ya que regula numerosos genes que son necesarios para la diferenciación celular por lo que podría ser un factor involucrado en la regulación de los genes *NOXs* [11, 82].

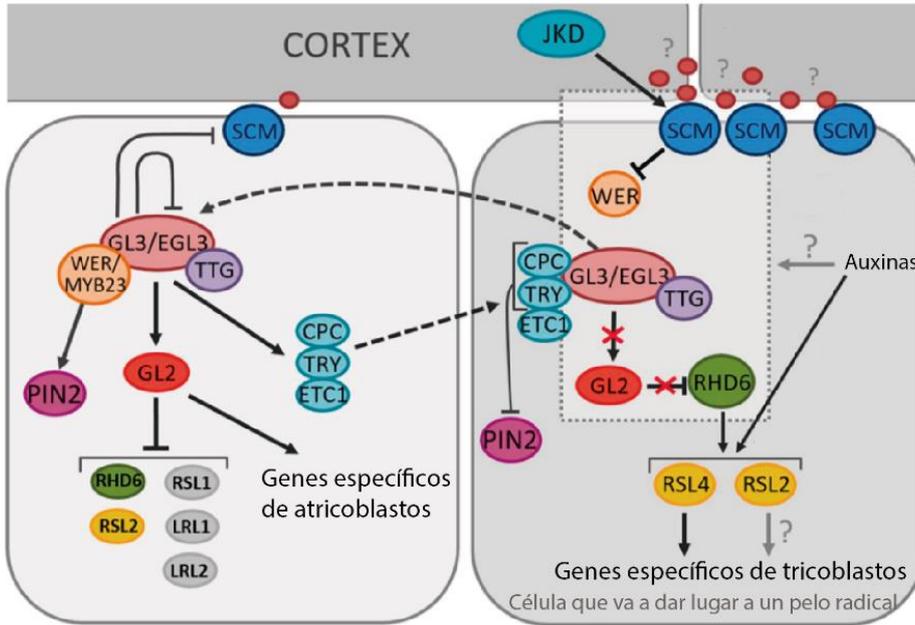


Figura 1.5I: Mecanismo molecular de diferenciación de las células epidérmicas de la raíz. Se encuentran graficados los FTs y complejos que definen el destino celular de tricoblastos/ atricoblastos. Gráfico extraído y modificado de Balcerowicz et al. (2015) [16].

1.4.a Regulador maestro de la diferenciación y desarrollo de los pelos radicales.

RSL4 es un FT de la familia bHLH y su expresión está regulada por RHD6. Estudios del transcriptoma de plantas Wt, de la mutante de *rsl4* y de líneas que sobre-expresan RSL4 de *Arabidopsis thaliana* demuestran que RSL4 regula positivamente la expresión de numerosos genes relacionados con la diferenciación de los pelos radicales, incluyendo numerosos genes específicos de pelo [3].

Se ha demostrado que 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, en el momento en el cual los niveles de RSL4 caen drásticamente. Plantas mutantes de *rsl4* mostraron un fenotipo de pelo radical corto. Por otro lado, plantas q sobre-expresan RSL4 (plantas transgénicas transformadas con la construcción 35S::RSL4) muestran pelos radicales de mayor longitud y que esto es debido a que RSL4 estimula el crecimiento por un período más prolongado sin modificar las velocidades de crecimiento [3].

Además de RSL4, dentro de la familia de bHLH se encuentra RLS2. Las mutantes de *rsl2* mostraron pelos radicales más cortos demostrando que son necesarios para el desarrollo de los mismos. Por otro lado, la sobre-expresión de RSL2 no exacerbó el crecimiento de los pelos radicales demostrando que este es menos importante que RSL4 ya que, solamente la expresión constitutiva de RSL4 resulto en un crecimiento constitutivamente activado [3].

Estudios previos muestran que RSL4 es activado por concentraciones elevadas de auxina endógena, aunque el mecanismo por el cual se activa es aún desconocido [3, 82] (**Fig. 1.6I**). Se demostró que la presencia de auxinas estimula la expresión de RSL4 inclusive en plantas que no están presentes RHD6 ni RSL1. En contraste los niveles de transcripto de RSL2 disminuyeron cuando se

tratan plantas Wt con auxinas. Además, RSL4 mostró ser requerido para que la planta pudiera responder a auxinas en plantas en donde se encuentran mutados los genes *rsl2* o *rhd6 rsl1* [3].

RSL4 controla el crecimiento celular regulando la expresión de 124 genes [3, 83, 84], todos estos contienen elementos regulatorios tipo RHE [83] (**Fig. 1.6I**). RSL4 es capaz de regular la transcripción de su propio gen [83] 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. 1.6I**). Dentro de estos se pueden mencionar el supresor de Actina (*SAC1*), *EXO70A1* (Subunidad de exocitosis 70A1), *PRX7* (Peroxidasa7) y *CPK11* (Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} 11) [84]. Además, RSL4 regula positivamente genes como *EXPA7* (Expansina7), *EXP18* (Expansina18) y otros genes específicos de pelo radical [3] (**Fig. 1.6I**).

La expresión de RSL4 y RSL2 puede ser modificada por otras hormonas de plantas como etileno, ácido abscísico y citoquininas (**Fig. 1.6I**). 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. Además, RSL4 contiene posibles secuencias regulatorias de unión a factores tipo B que responden a citoquininas (ARR, *Arabidopsis response regulator*) generando una posible conexión entre RSL4 con citoquininas [85] (**Fig. 1.6I**). Sin embargo, estudios posteriores son necesarios para confirmar que la expresión de RSL4 se encuentra regulada por citoquininas. Finalmente, el ácido abscísico (ABA) demostró ser un represor del crecimiento polarizado inhibiendo la expresión de RSL2 mediante la regulación de la actividad de la proteína de unión a OBF 4 (*OBF4*, *OBF Binding Protein 4*). En este experimento la expresión de RSL4 no se vio afectada [86].

Por otro lado, niveles bajos de fosfatos en el medio en el cual crecen las plantas estimulan el desarrollo de los pelos radicales y se demostró que la respuesta de la raíz a este proceso es regulado mediante la modificación de la actividad de RSL4 [3]. Es decir que RSL4 además de coordinar señales hormonales es capaz de integrar señales ambientales (**Fig. 1.6I**). Se observó que la longitud del pelo radical está determinada por la cantidad de RSL4 acumulado en un pulso de expresión de la misma 4hs antes del inicio de la elongación del pelo radical y su posterior degradación mediado por el proteasoma 26S. La cantidad de RSL4 durante este pulso es modulada en parte en respuesta a bajo fosfato en el medio de crecimiento. La síntesis de RSL4 se incrementa en condiciones de bajo fosfato y este incremento prolonga la fase de crecimiento del pelo radical [82]. 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. 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. 1.6I**) [11].

Toda esta información nos demuestra que RSL4 es suficiente para promover la diferenciación y crecimiento celular de los pelos radicales y que se lo debe considerar como un regulador maestro del crecimiento polarizado [11]. Este es capaz de coordinar señales hormonales, ambientales y factores del desarrollando activando el crecimiento polarizado [85] (**Fig. 5I**).

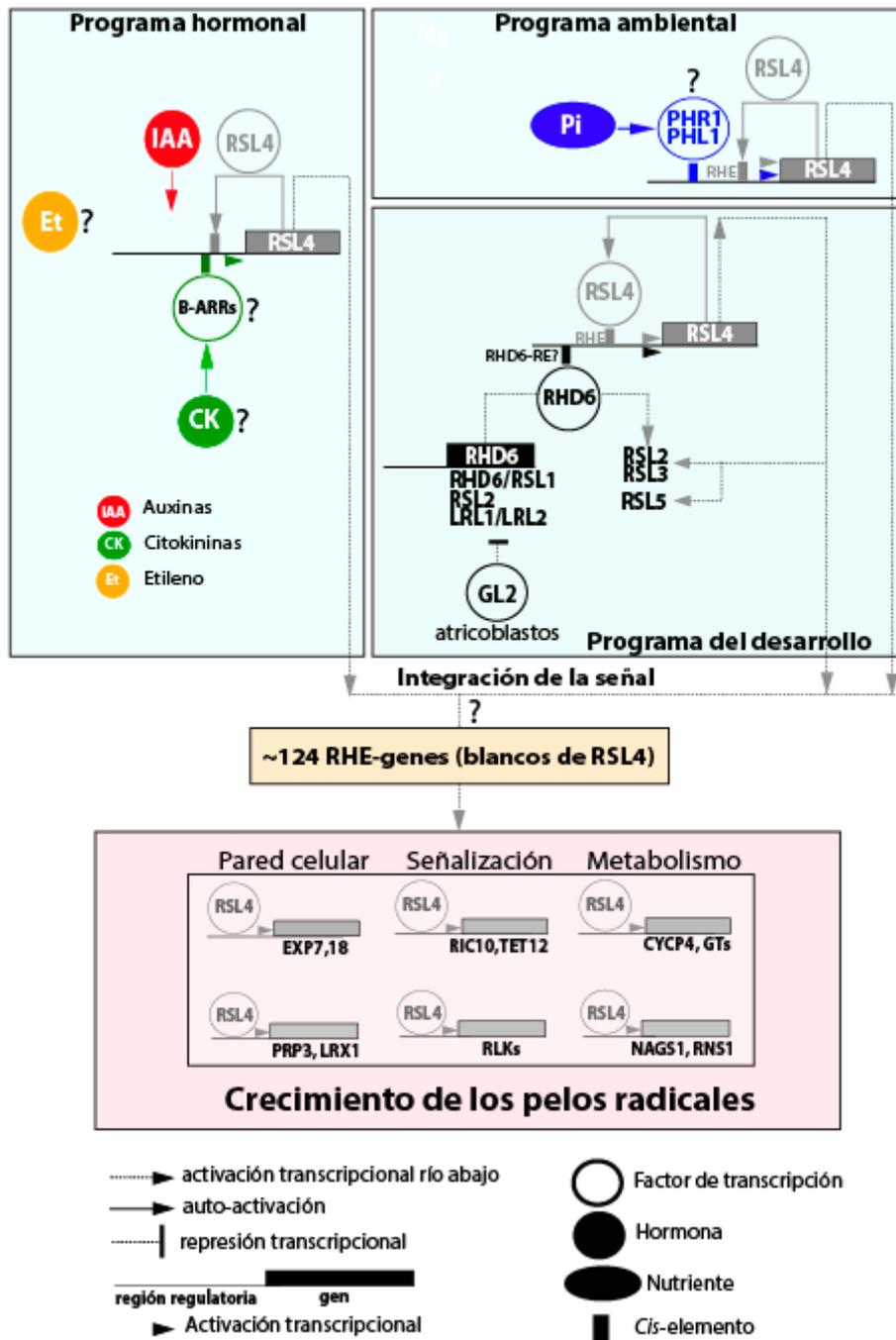


Figura 1.6I. Regulación del crecimiento de los pelos radicales mediado por RSL4. Durante el desarrollo RSL4 (y RSL2) es regulado por RHD6-RSL1. GL2 es el principal inhibidor del desarrollo de los pelos radicales en células atricoblásticas que actúa inhibiendo FTs como RHD6 y RSL4. La respuesta de los 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 pelos radicales. Aux-RE: Elementos de respuesta a auxinas, CYCP: ciclinas tipo P, EXP: Expansinas, GTs: glicosiltransferasas, LRL: *Lotus japonicus Roothairless Like*, LRX: extensina rica en leucinas, NAGS: acetiltransferasa de aminoácidos, PRP: proteínas ricas en prolina, 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 et al. (2017). [11]

1.5 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 patógenos [87]. 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 adventicias, la diferenciación y elongación de los pelos radicales. El nivel de auxinas en los diferentes tejidos de la planta depende tanto del metabolismo local de las auxinas así como del transporte de la hormona entre las células. 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 [88].

El compuesto más abundante y fisiológicamente más importante, es el ácido 3-indol-acético (IAA) que se encuentra en grandes cantidades en tejidos jóvenes tanto de la parte aérea como de la raíz de *Arabidopsis thaliana* [89, 90]. 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.

Las auxinas tienen efectos en la célula tanto a nivel genómico como no genómico, aunque de este último se conoce poco de los mecanismos moleculares. A nivel genómico, esta hormona estimula la actividad de FTs de respuesta a auxinas (ARFs, *Auxin Response Factors*) que son los encargados de activar/reprimir numerosos genes responsables de los efectos fisiológicos (**Fig. 1.71**). 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*) (**Fig. 1.71**) [90, 91]. El rol de ABP1 como receptor de auxinas en la membrana plasmática es aún muy discutido. TIR1 es una proteína *F-BOX* que es 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), resultando 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 Aux/IAA se ubiquitinan y se degradan vía proteosoma 26S (**Fig. 1.71**). De esta manera los ARFs son liberados y pueden cumplir su función (**Fig. 1.71**) [92, 93]. En la estructura de la mayoría de las Aux/IAA se pueden identificar 4 dominios (I-IV) [94]. Se ha descrito mediante análisis de secuencia, como por ensayos de doble-híbrido, que tanto en los factores Aux/IAA como en 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 la formada por homodímeros [95]. El dominio I puede inactivar la función de los ARFs reprimiendo la transcripción de respuesta a auxina [96]. El dominio II es importante para controlar la estabilidad de la proteína y su interacción con el complejo SCF^{TIR1/AFB} [96-99]. 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 [96].

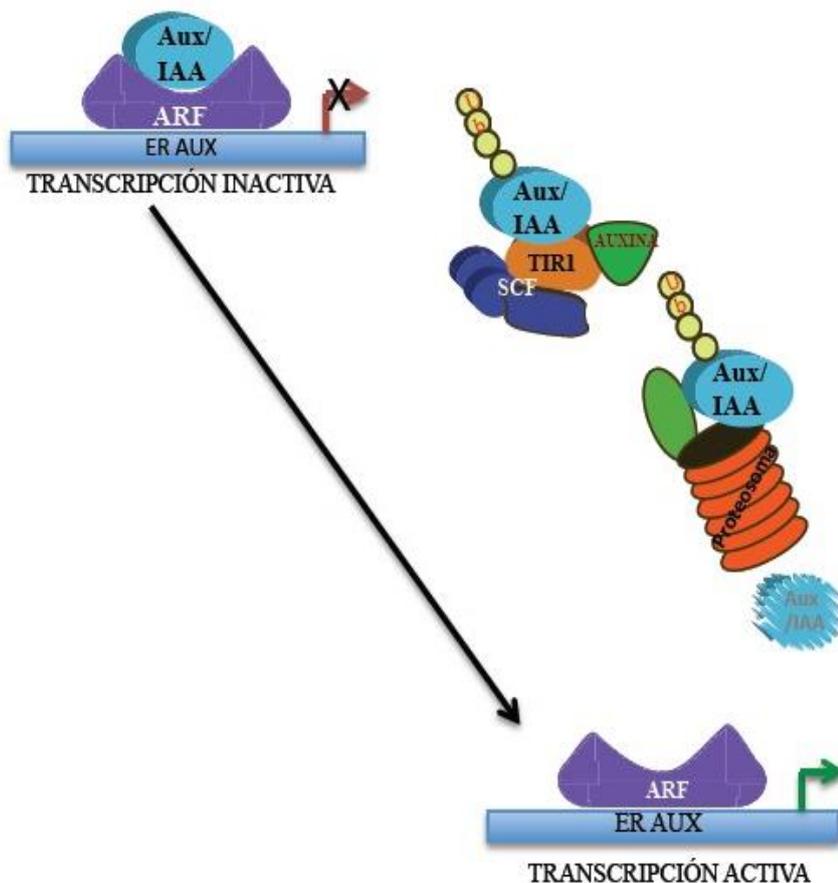


Figura 1.71: Regulación molecular mediada por auxinas. Cuando los niveles de auxinas (IAA) son bajos los ARFs se encuentran inhibidos por el complejo Aux/IAA. En presencia de auxina este complejo es degradado vía proteosoma y los ARFs quedan disponibles para activar/inhibir la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Esquema extraído y modificado de Garay-Arroyo et al. (2014). [100]

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*, *Auxin Response Elements*) que típicamente poseen la configuración TGTCNC (en donde N puede ser T, C, G, A) [92]. Existe un interés creciente en determinar cuándo y dónde los genes de respuesta a auxinas se expresan y cómo está regulada su expresión [101].

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 [92, 102, 103]. 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 [92, 96]. Este tipo de ensayos determinaron que ARF5/ARF6/ARF7/ARF8/ARF19 serían activadores de la transcripción y el resto fueron clasificados como represores [96, 104].

Además de poder interactuar con ellos mismos, se ha reportado que los ARFs pueden regular y ser regulados por otros FTs [105]. Un estudio reciente muestra que el factor de transcripción 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* [106]. Además, el factor de transcripción bHLH BIGPETA1p (BPEp) interactúa con ARF8 y como consecuencia se desencadena el crecimiento del pétalo [107]. Ensayos de doble híbrido y de coimmunoprecipitación 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 [94].

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, otros tienen redundancia de funciones. Por ejemplo, tanto

ARF1 como ARF2 controlan la senescencia de las hojas y la abscisión del órgano floral [108], mientras que ARF3 interactúa con la proteína KANADI formando un complejo que es esencial para la especificación de la polaridad de las hojas [109]. Un estudio reciente indica que ARF3 integra la función de diferentes proteínas en la determinación meristemática floral [110]. ARF4 ha sido estudiado principalmente por su rol en la polarización de los órganos [111]. El doble mutante *arf3 arf4* muestra reducida la identidad abacial de todos los órganos laterales incluyendo las hojas [112, 113]. 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 mejorados en el doble mutante *arf5 arf7* [114]. ARF8 está reportado como un regulador de la fertilización y el desarrollo de frutos [115], y tanto ARF6 como ARF8 tienen funciones en la maduración de las flores [113]. Ensayos con microARN y utilización de mutantes demostraron que ARF10 y ARF16 están involucrados en controlar la formación de la cápsula de la raíz [116]. ARF19 y ARF7 tienen funciones redundantes controlando la expansión de las hojas y el desarrollo de las raíces laterales [117]. Los simples mutantes de *arf7* y *arf19* no mostraron fenotipo aparente pero la doble mutante *arf7 arf19* mostró ausencia total de la formación de raíces laterales, fenotipo similar a *sr1*. El gen *SLR1* codifica para el represor transcripcional Aux/IAA14. La mutación en *sr1* afecta a la estabilidad de IAA14, generando un mutante dominante estable, con lo que la respuesta a las auxinas está constitutivamente reprimida [118]. Finalmente es importante resaltar que *ARF7* y *ARF19* se encuentran altamente expresados en pelos radicales pero la doble mutante *arf7 arf19* no muestra anomalías en el desarrollo del pelo radical [119, 120].

1.6 Regulación molecular por señales externas: Fosfato inorgánico (Pi)

El fósforo es un macro-elemento esencial para el crecimiento de las plantas. Participa en numerosos procesos metabólicos como la fotosíntesis, la transferencia de energía y la síntesis y degradación de los carbohidratos. El fósforo es adquirido principalmente mediante la absorción de fosfatos inorgánicos (Pi) por parte de las raíces, principalmente por los pelos radicales. Debido a la incapacidad de las plantas de moverse y poder buscar los nutrientes necesarios, estas han desarrollado numerosos mecanismos de adaptación al medio ambiente que la rodea. Entre ellos se encuentran repuestas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas que permiten a las plantas sobrevivir bajo condiciones de bajo Pi [121]. Entre estos el sistema de las raíces de las plantas es altamente plástico y se puede adaptar en respuesta a condiciones ambientales. Un parámetro importante es la disponibilidad de fosfato (Pi) en el medio de crecimiento, el cual es un buen indicador de la disponibilidad de nutrientes en el suelo [122]. Cuando un suelo o el medio en donde crecen las plantas esta privado de Pi (estrés por bajo Pi) se reduce el crecimiento de la raíz principal, se estimula el desarrollo de raíces laterales y se induce la elongación de los pelos radicales con la consecuente activación de captura de Pi [121, 123, 124]. Este fenotipo es muy similar al observado cuando las plantas crecen en un medio rico de auxinas. Estudios demuestran que la ausencia de Pi en el medio exacerba la sensibilidad de las raíces de las plantas a auxinas aunque los mecanismos moleculares aún son desconocidos [121, 125].

En *Arabidopsis thaliana* existen numerosas proteínas que están involucrados en la respuesta a la privación de fosfato. Entre ellas, se demostró LPR1 y LPR2 (*Low-Phosphate Root 1* y *Low-Phosphate Root 2*) median parte de la respuesta de la raíz a la ausencia de Pi en el medio [126]. Además, cumplen un rol fundamental los transportadores de Pi que se encuentran en la membrana plasmática y permiten el pasaje de este hacia el citoplasma celular. En el genoma de *Arabidopsis* se encuentran codificados 9 transportadores de alta afinidad a Pi denominados PHT1;1–9. PHT1;1 (PT1) and PHT1;4 (PT2) mostraron ser los más activos en las raíces [127]. Ambos genes se inducen por la privación de Pi y esta inducción es rápida y reversible, sugiriendo que se encuentra involucrada una regulación a nivel traduccional [128, 129].

Mediante una búsqueda masiva de una población de líneas mutagenizadas de *Arabidopsis thaliana* se detectó un FT de la súper-familia MYB denominado PHR1 (por *PHosphate starvation response Regulator 1*) y PHR1-like (PHL1) ya que se encuentran relacionados con el gen *PSR1* (por *Phosphorus Starvation Response 1*) de *Chlamydomonas reinhardtii* [130]. Ensayos demostraron que este factor actúa río debajo de la cascada de señales de la privación de Pi y que actuaría estimulando la transcripción de genes necesarios para la respuesta de la planta a Pi. La transcripción de este factor sería independiente o levemente regulada por la privación de Pi [131].

La transcripción de numerosos genes es modificada en condiciones de privación de Pi y esto podría estar regulado por RSL4. Este último demostró ser requerido para la respuesta de los pelos radicales a la ausencia de Pi en plantas de *Arabidopsis thaliana* [3]. Se observó que la triple mutante *rhd6-3 rsl1-1 rsl4-1* no era capaz de desarrollar pelos radicales en ausencia de Pi en comparación de la doble mutante *rhd6-3 rsl1-1* la cual en ausencia de Pi es capaz de desarrollar pelos radicales. Además, a diferencia de la transcripción de *RSL2*, los niveles de transcripto de *RSL4* son regulados por Pi [3].

Resultados

1.1 Producción de O_2^- en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*

1.1.a Inhibición química de las NOXs.

Con el fin de determinar la relevancia de la producción de anión O_2^- por parte de las NOXs en los niveles de ROS citoplasmáticas (ROScit) se realizó un ensayo de inhibición química de las misma mediante el uso de VAS2870 (3-benzyl-7- (2-benzoxazolyl) thio-1,2,3-triazolo [4,5-d]). Estudios previos muestran que este compuesto interfiere con la asociación de las NOXs a sus proteínas complementarias, las cuales son requeridas para su función [132]. Se observó que a concentraciones crecientes de VAS2870 en el medio en el cual se crecen plantas Wt Col-0 (*Murashige and Skoog* 0.5X (MS0.5X) 0.8% agar para plantas y pH 5.8) se inhibió el crecimiento de los pelos radicales de manera dosis/dependiente (**Fig. 1R.A,C**). Se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC50) de VAS2870 (IC50=7,5 μ M) la cual refleja la concentración del inhibidor a la cual la longitud de los pelos radicales se redujo al 50 %. Por otro lado, mediante el uso del derivado de la fluoresceína 2',7'-Dichlorofluoresceína di acetato (H₂DCFDA) se determinaron los niveles de ROScit en los pelos radicales cuando las plantas crecen durante 5 días en un medio con el inhibidor. Esta sonda es una variante de la fluoresceína, está reducida químicamente y se utiliza como indicador de ROS en las células. La pared celular y las membranas son permeables a la sonda y una vez que esta entra en la célula, estereosas intracelulares disocian los grupos acetatos de la molécula. Este cambio imposibilita la salida de la sonda de la célula y al entrar en contacto con moléculas altamente oxidantes la sonda se oxida y en consecuencia la molécula no fluorescente H₂DCFDA se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente [133]. Esta última puede ser excitada con la longitud de onda de 488nm y emite en el rango de 517–527nm (Ver **sección 5** de materiales y métodos). Es importante remarcar que la oxidación de la sonda es irreversible, por lo que solo se puede observar la acumulación de la oxidación de la misma en el tiempo de incubación. Además, se debe tener en cuenta que esta sonda no es radiométrica, por lo que no se puede saber la cantidad de sonda que ingresa en la célula. Los niveles de ROScit detectados disminuyeron drásticamente con el agregado de concentraciones crecientes de VAS2870 en el medio de crecimiento de las plantas (**Fig. 1.1R.B,C**). Este resultado indicó que al inhibir la producción de anión O_2^- por parte de las NOXs, los niveles de ROScit se vieron dramáticamente afectados, demostrando que las NOXs contribuyen mayoritariamente a este “pool” de ROScit y que su rol es fundamental para mantener el crecimiento polarizado de los pelos radicales asociado a la homeostasis de ROS.

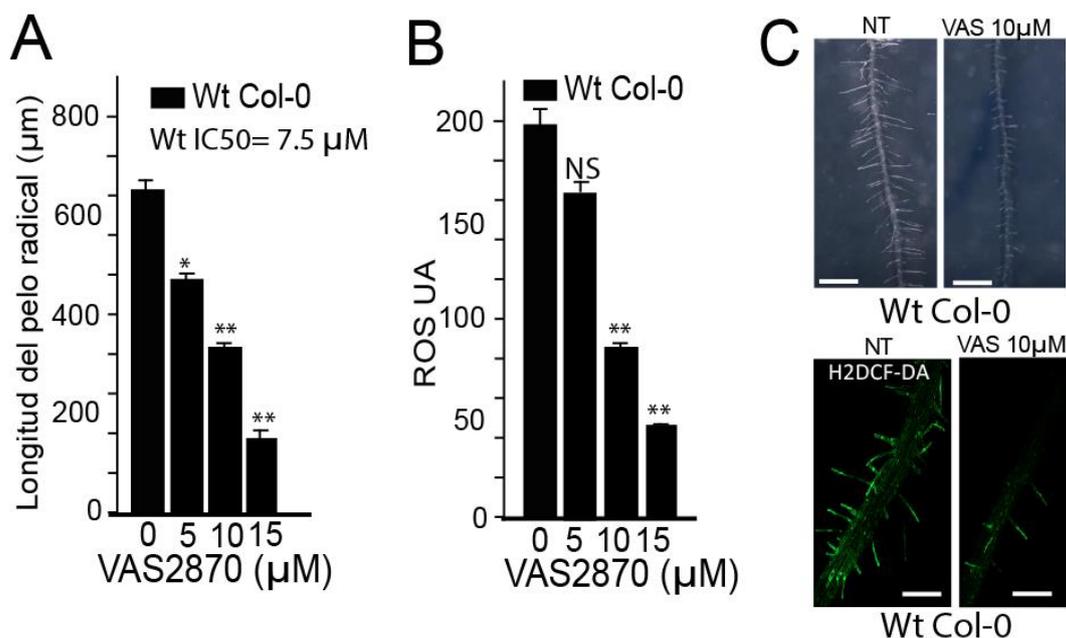


Figura 1.1R: Inhibición de las NOXs mediante el uso de VAS2870. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio de crecimiento concentraciones crecientes de VAS2870 (media \pm s.e.m., n=20) *P-value* de one-way anova, (**) $P < 0.001$, (*) $P < 0.01$. **(B)** Análisis cuantitativo de los niveles de ROScit en plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio de crecimiento concentraciones crecientes de VAS2870 (media \pm s.e.m, n=15) *P-value* de one-way anova, (**) $P < 0.001$. UA= Unidades Arbitrarias. NS= Diferencia No Significativa. **(C)** En la parte superior, fenotipo de las plantas Wt Col-0 sin tratar y tratadas con 10 µM de VAS2870. Barra de escala: 1000µm. En la parte inferior, señal de ROS generada por la oxidación de H₂DCF-DA en raíces de plantas Wt Col-0 sin tratar y tratadas con 10µM de VAS2870. Barra de escala: 500 µm. NT= No tratado.

Con el fin de determinar cómo VAS2870 afecta específicamente a los niveles de H₂O₂ citoplasmáticos (H₂O₂cit) y a su vez como esto afecta a los niveles y a la dinámica de Ca²⁺cit se utilizaron los biocensores *Hyper* y *Camaleón* (YC3.6). *Hyper* es un biocensor radiométrico, reversible y capaz de censar H₂O₂. Esta molécula afecta al dominio OxyR del biocensor modificando la conformación de la proteína y como consecuencia cambia su espectro de excitación-emisión (Ver **sección 6** de materiales y métodos). Se utilizaron plantas que expresan de manera constitutiva *Hyper* en el citoplasma celular (Ver **Tabla 2M**) y se adquirió la señal emitida de los pelos radicales a través del tiempo (cada 6,25 segundos) mediante el uso de un microscopio confocal. Durante la adquisición de las imágenes se agregó VAS2870 (10µM) y se registró cómo éste afecta los niveles de H₂O₂cit *in vivo* mediante la relación de la señal emitida cuando se excitó el biocensor secuencialmente con los láseres de longitud de onda de 405nm y 488nm (la emisión máxima se mantiene siempre a 516 nm). Se graficó la relación de la señal obtenida cuando se excita con cada una de las longitudes de onda (488/405nm UA, siendo UA=Unidades Arbitrarias) en función del tiempo (eje X). Además, los resultados se representaron mediante la herramienta colorimétrica *kymograph* (Ver **sección 6.a** de materiales y métodos). En el *kymograph* se representa las variaciones de los niveles de H₂O₂cit en el tiempo (eje Y) mediante la escala de color *FIRE* (escala de color utilizada). Ésta representa en blanco/amarillo niveles altos de H₂O₂cit y en negro/azul niveles bajos. Por otro lado, en el *kymograph* se puede observar la zona apical del citoplasma del pelo radical y la zona continua a esta (zona basal).

Los niveles de H₂O₂cit de pelos radicales que expresan el biocensor *Hyper* disminuyeron drásticamente inmediatamente después de que se agregó al medio 10µM de VAS2870 (**Fig. 1.2R.A**). Esto confirma resultados previos que sugieren que los niveles de H₂O₂cit son mantenidos principalmente por la producción de anión O₂⁻ producido por las NOXs en el apoplasto celular, su posterior transformación a H₂O₂ y transporte hacia el citoplasma. Se corroboró la especificidad del biocensor agregando extracelularmente H₂O₂ (**Fig. 1.2R.C**).

Por otro lado, se realizó el mismo procedimiento en plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor *Camaleón* (YC3.6), el cual se encuentra bajo el control del promotor fuerte 35S (Ver **Tabla 2M**). Este es un biocensor radiométrico y reversible que permite visualizar y cuantificar la dinámica de Ca^{2+} , en este caso de Ca^{2+} citoplasmático (Ca^{2+} cit) ya que el biocensor se expresa en el citoplasma (Ver **sección 6** de materiales y métodos). Mediante la relación de la señal detectada en el microscopio confocal a través del tiempo en los canales correspondientes a la proteína fluorescente amarilla Venus (516nm) y la proteína fluorescente Cian (CFP, 505nm) se obtuvo información de los niveles de Ca^{2+} en función del tiempo y al igual que con *Hyper* esta señal se graficó en un *kymograph* (Ver **sección 6.b** de materiales y métodos). Al agregar 10 μM de VAS2870 durante la adquisición de imágenes, se observó una disminución drástica de los niveles de Ca^{2+} cit (**Fig. 1.2R.B**). Esto se correlaciona con lo observado con *Hyper* y sustenta la hipótesis de la existencia de una retroalimentación positiva entre estos dos componentes. Además, cuando se agregó H_2O_2 (1 μM) extracelularmente a plantas que expresan el biocensor YC3.6 se detectó un aumento en los niveles de Ca^{2+} cit (**Fig. 1.2R.D**). La aplicación del inhibidor a plantas que expresan los biocensores demostraron que al inhibir la producción de anión O_2^- por parte de las NOXs en los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* los niveles de H_2O_2 cit y de Ca^{2+} cit disminuyen.

Es importante aclarar que la aplicación de microscopía confocal convencional, sin ningún tipo de adaptación para el modelo de estudio, no permite medir las oscilaciones de Ca^{2+} cit o H_2O_2 cit. Esto es debido a que con el fin de mantener el pelo enfocado se generan oscilaciones que ocultan las oscilaciones fisiológicas generadas en el sistema de estudio. Es por esto que únicamente se midieron niveles de Ca^{2+} o de H_2O_2 cit y no se realizó ningún análisis de las oscilaciones.

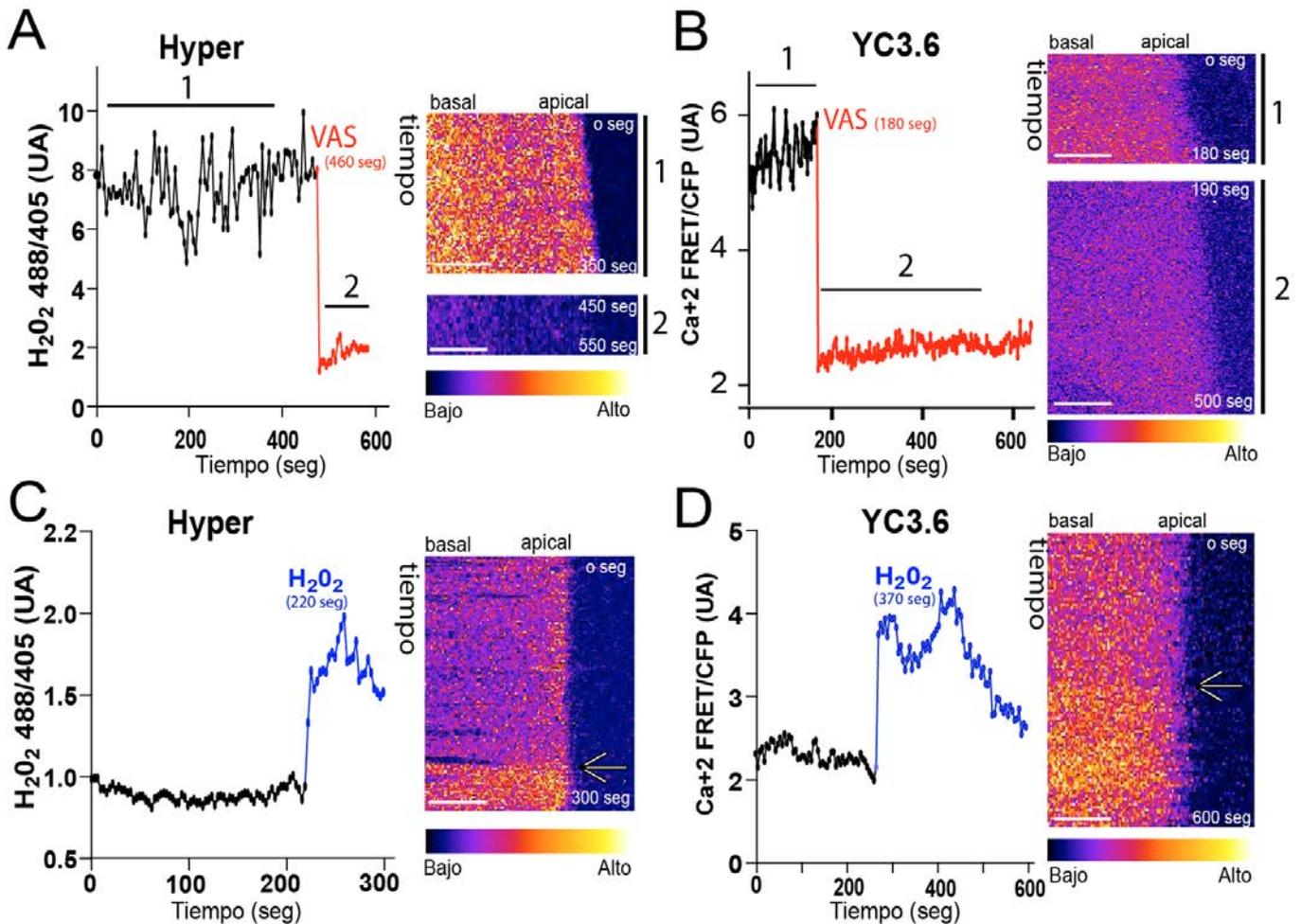


Figura 1.2R: Inhibición de la producción de O_2^- y el consecuente efecto en los niveles de H_2O_2 y Ca^{2+} cit. (A) Niveles de H_2O_2 cit en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor *Hyper* tratado con $10 \mu M$ de VAS2870. Los niveles de H_2O_2 cit están basados en la relación de la emisión del biocensor cuando se lo excita a 488/405nm en el ápice del pelo radical. A la derecha se encuentra un *Kymograph* en donde en el eje Y se encuentra representado el tiempo, en el X se observa la zona apical del pelo (apical) y la zona continua del ápice (basal) y en escala colorimétrica (*FIRE*) se representan los niveles de H_2O_2 en donde el blanco/amarillo son niveles altos y negro/azul niveles bajos. (B) Niveles de Ca^{2+} cit en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor YC3.6 tratado con $10 \mu M$ de VAS2870. Los niveles están basados en la relación de FRET con respecto a CFP (FRET/CFP). A la derecha se observa un *kymograph* en donde en el eje Y se encuentra representado el tiempo, en el X se observa la zona apical del pelo (apical) y la zona continua del ápice (basal) y en escala colorimétrica (*FIRE*) se representan los niveles de Ca^{2+} en donde el blanco/amarillo son niveles altos y negro/azul niveles bajos. (C) Niveles de H_2O_2 cit en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor *Hyper* tratadas con H_2O_2 extracelularmente ($1 \mu M$). A la derecha se encuentra un *kymograph*, la flecha indica el momento en el que se agregó H_2O_2 . (D) Niveles de Ca^{2+} cit en un pelo radical de una planta Wt Col-0 que expresa el biocensor YC3.6 cuando se agregó $1 \mu M$ de H_2O_2 extracelularmente. A la derecha se encuentra un *kymograph* y la flecha indica el momento en el que se agregó H_2O_2 . (A)(B)(C)(D) Escala de colores utilizada: *FIRE*. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: $5 \mu m$.

1.1.b. Identificación de las NOXs involucradas en el desarrollo de los pelos radicales.

Previamente, se había establecido un rol importante para NOXC (también conocida como RHD2 por *root hair defective 2* y como RBOHC por *Respiratory Burst Oxidase Homolog protein C*) en el mantenimiento de los niveles de ROS en pelo radical y consecuentemente la mutante *nox*c presentaba pelos radicales muy cortos debido a la deficiencia en la producción de ROS [7]. A pesar de esto, en la mutante *nox*c se detectan niveles remanentes de ROS sugiriendo que otras NOXs podrían estar activas y contribuyendo a la generación de ROS en el pelo radical. Debido a esto, se quiso determinar si otras NOXs, aparte de la NOXC, son necesarias para el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* asociado a la homeostasis de ROS.

Mediante alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las diferentes NOXs se determinaron dos grupos filogenéticamente separados (Grupo I: NOXA-NOXG y Grupo II: NOXH y NOXJ) (**Fig. 1.3R.A**). Análisis de microarreglos del programa *genevestigator* (<http://www.genevestigator.com>) permiten determinar los niveles de expresión de las diferentes NOXs en diferentes tipos celulares. Se analizó únicamente células de la raíz y los tubos polínicos ya que estos últimos poseen el mismo tipo de crecimiento que los pelos radicales y los mecanismos son comparables (**Fig. 1.3R.A**). Gracias a esta herramienta, se determinó que las NOXs incluidas en el grupo I se encuentran expresadas en numerosas células de los diferentes tejidos de la raíz, pero que en pelos radicales las NOXs con niveles de transcritos más elevados corresponden a NOXC, NOXE y NOXF. Por otro lado, la NOXH y la NOXJ del grupo II se encuentran mayoritariamente expresadas en tubos polínicos (**Fig. 1.3R.A**). Se aislaron numerosas mutantes insercionales de T-ADN (transposón de la región denominada T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, ver **sección 1.a** de materiales y métodos) y de transposón dspm [40] homocigotas de cada una de estas *nox*s y se generaron múltiples mutantes mediante cruzamientos con la finalidad de determinar el rol de cada una de ellas en el crecimiento polarizado. La estructura de los genes *NOX*s se pueden observar en la **Fig. 1.3R.B** y se encuentra resaltado el sitio de donde cae el T-ADN o dspm de las mutantes insercionales aisladas que serán posteriormente analizadas en este estudio (**Fig. 1.3R.B**).

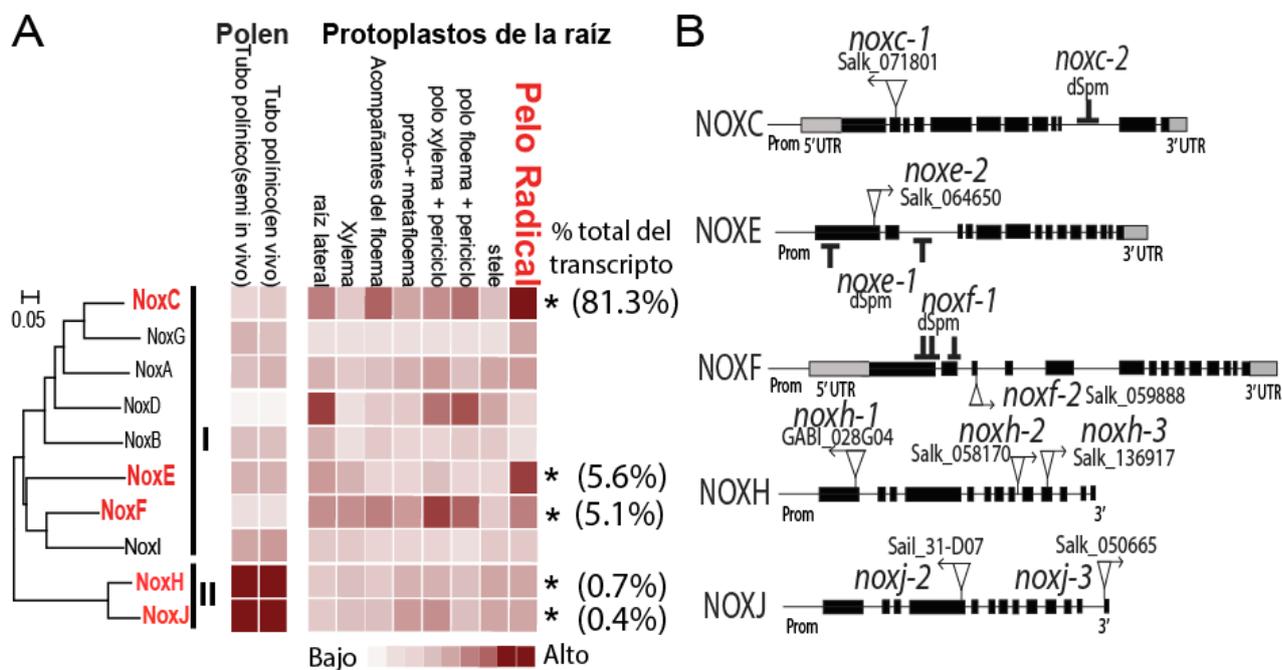


Figura 1.3R: Genes NOXs y sus niveles de transcritos. (A) Se observa el alineamiento múltiple de las proteínas NOXs de *Arabidopsis* usando el método parsimónico de secuencia de proteínas. El árbol está combinado con la expresión relativa de los genes de la familia de las NOX en *Arabidopsis* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos del microarreglos de *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis, Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) son relativos a la expresión máxima de cada gen. (*) Indica un nivel de transcripción elevado en pelo radical. Se muestran en porcentajes las cantidades absolutas de cada transcritpo. (B) Estructura de los genes de las diferentes NOXs que se expresan en pelo radiale y polen. Se resaltan la posición de inserción del T-ADN y el transposón (dspm) de las líneas utilizadas en esta tesis. La orientación de la secuencia del T-ADN respectivo de cada línea está representado por flechas negras.

Se determinó el fenotipo de pelo radical en cada línea mutante insercional de T-ADN y dspm de manera de evaluar la contribución de cada una de las NOXs en el crecimiento polarizado. Dentro del Grupo I, solamente las simples mutantes nulas de *nox-1* [41] y *nox-2* [37, 40] poseen fenotipo de pelo corto en comparación con Wt Col-0 (**Fig. 1.4R.A,B**). Las mutantes individuales de la *nox-1* y *nox-2* no presentaron fenotipos de pelo radical distintivo a plantas Wt Col-0. La longitud media de los pelos radicales de las mutantes dobles *nox-2 noxe-1*, *nox-2 noxf-1* y de la triple mutante *nox-2 noxf-1 noxe-1* mostraron ser significativamente menor que Wt Col-0 pero es probable que sea debido a la contribución de la mutación en *nox-2* ya que no mostraron una diferencia significativa con respecto a esta. Se observó una pequeña contribución de *NOXE* y *NOXF* al fenotipo detectado, ya que la triple mutante *nox-2 noxe-1 noxf-1* presenta pelos radicales significativamente más cortos que la doble mutante *nox-2 noxf-1*, *nox-2 noxe-1* y que la simple mutante *nox-1* y *nox-2*. Por otro lado, se detectó que dos alelos diferentes de la doble mutante *noxh noxj* (*noxh-1 noxj-2* y *noxh-3 noxj-3* [134, 135] poseían los pelos radicales significativamente más cortos que los de las plantas Wt Col-0 (**Fig. 1.4R.A,B**). Este fenotipo observado fue exclusivo de la doble mutante ya que las simples mutantes *noxh-1*, *noxh-3*, *noxj-2* y *noxj-3* no presentaron afectado el crecimiento de los pelos radicales (**Fig. 1.4R.A,B**). Estos resultados indicarían que la *NOXH* y *NOXJ* tendrían redundancia de función. Además, que la *NOXC*, *NOXH* y *NOXJ* serían las *NOXs* más relevantes en la regulación del crecimiento polarizado de los pelos radicales.

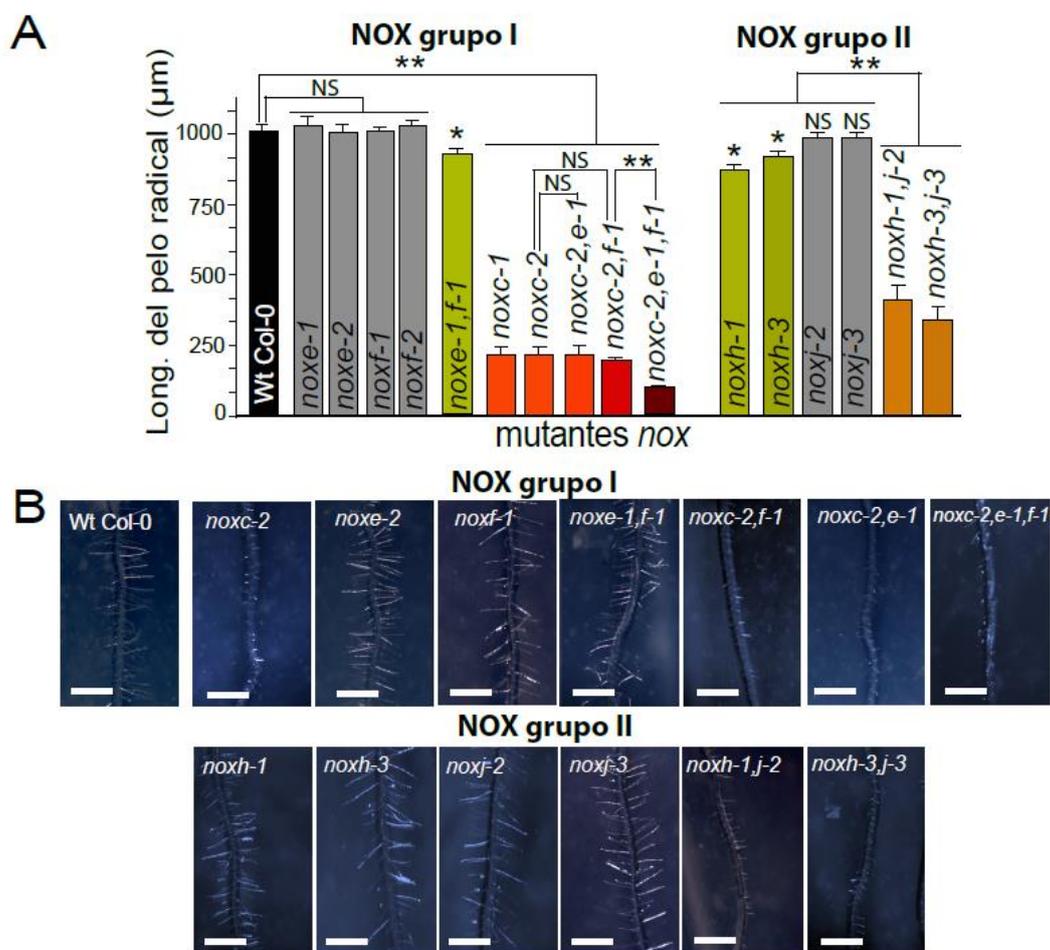


Figura 1.4R: NOXH y NOXJ en conjunto con la NOXC son requeridas para el desarrollo del pelo radical. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0, simples y múltiples mutantes de las *nox*s (media \pm s.e.m., n=20-40) NS= diferencia No Significativa. *P*-value de one-way anova, (**) $P < 0.001$, (*) $P < 0.01$. **(B)** Fenotipo de pelo radical de Wt Col-0, simples y múltiples mutantes de las *nox*s. Barra de escala=1000µm.

Posteriormente se determinaron los niveles de ROScit en las diferentes mutantes insercionales simples y dobles de las *nox*s que mostraron fenotipo de pelo corto. Los niveles de ROScit se midieron mediante la técnica de la H₂DCFDA (ver sección 5 de materiales y métodos) [136]. Estos se encontraron disminuidos tanto en la simple mutante *nox*c-2 como en aquellas múltiples mutantes en las que *nox*c se encontraba mutada (**Fig. 1.5R.A,C**). Además, se observaron niveles de ROScit más bajos en los pelos radicales de la doble mutante *nox*h *nox*j en comparación con los de plantas Wt Col-0 (**Fig. 1.5R.B,C**). Los experimentos realizados muestran que además de la NOXC, NOXH y NOXJ serían requeridas para el correcto crecimiento de los pelos radicales asociado a la homeostasis de ROScit.

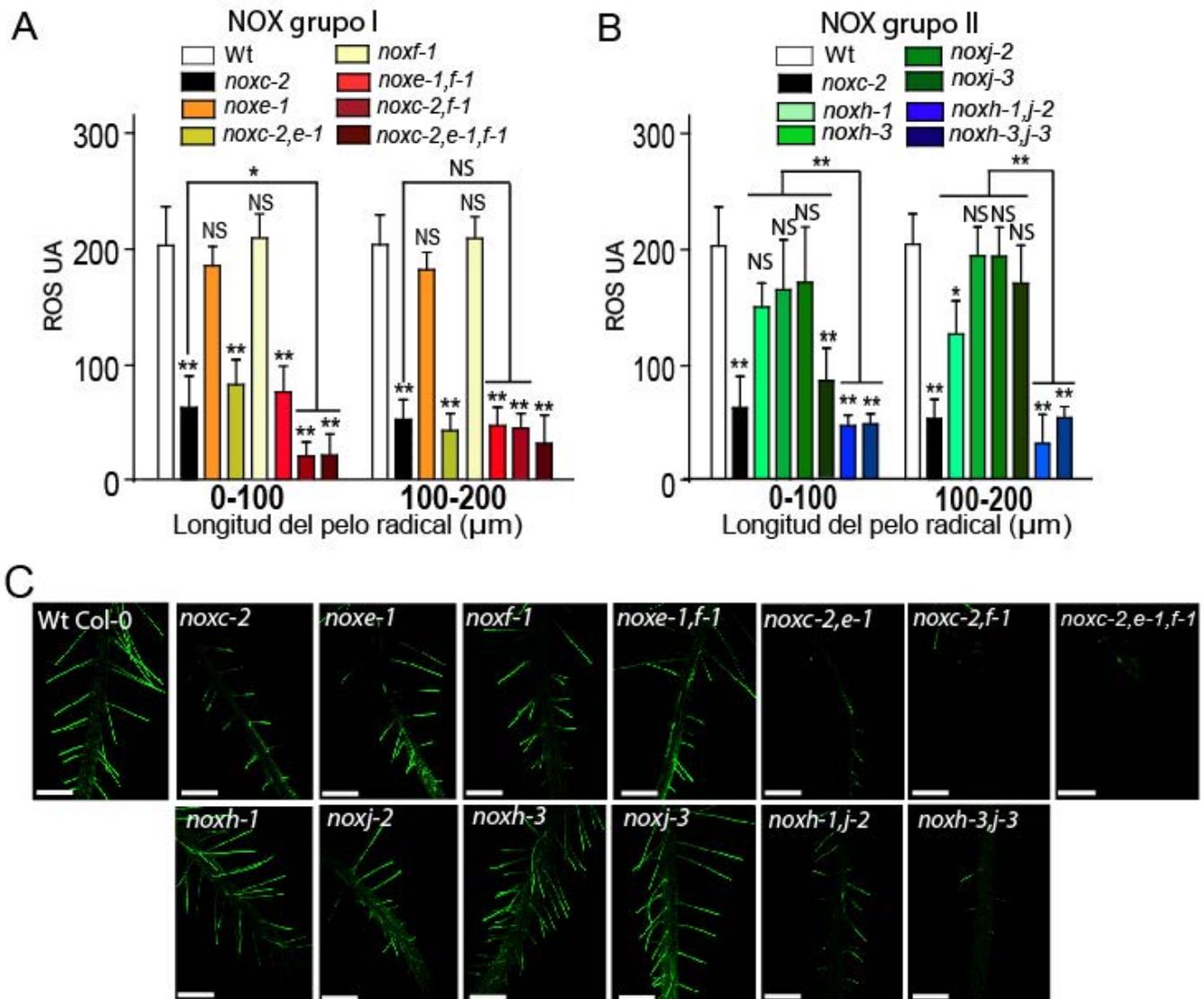


Figura 1.5R: Contribución de las NOXs a los niveles de ROScit. (A,B) Análisis cuantitativo de ROScit obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA de Wt Col-0 y de simples y múltiples mutantes de *nox*s en diferentes etapas del desarrollo (pelos de longitudes comprendidas entre 0-100micrometro y 100-200μm) (media ± s.e.m., n=20). UA= Unidades Arbitrarias. NS= diferencia No Significativa. P-value de one-way anova, (**) P<0.001, (*) P<0.01. (C) Señal de ROScit generada por la oxidación de H₂DCFDA en las diferentes mutantes de *nox*s. Barra de escala: 500 μm.

Teniendo en cuenta que se requerirían tanto la NOXC como la NOXH y la NOXJ para el crecimiento de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*, surgió la siguiente pregunta ¿Por qué son necesarias 3 NOXs diferentes para mantener el crecimiento polarizado? Se hipotetizó que serían requeridas de manera secuencial durante el desarrollo. Con el fin de responder esta pregunta se realizó un análisis más detallado de los niveles de ROScit en los estadios iniciales del desarrollo del pelo radical de las plantas Wt Col-0 como en la mutante simple *nox*c y en la mutante múltiple *noxh-1 noxj-2* (longitudes de pelos radicales comprendidas entre 0 μ m – 250 μ m) (**Fig. 1.6R.A,B**). Se observó que la mutante *nox*c posee los niveles de ROScit siempre disminuidos con respecto al Wt Col-0 desde el inicio del desarrollo de los pelos radicales, especialmente en pelos de longitudes entre 150-200 μ m. Por otro lado, la doble mutante *noxh-1 noxj-2* mostró una diferencia menos significativas que la *nox*c con respecto a la Wt Col-0 en estadios tempranos (longitudes de los pelos radicales entre 0-200 μ m); mientras que entre 200-250 μ m de longitud los niveles de ROScit en la doble mutante disminuyeron drásticamente (**Fig. 1.6R.A,B**). Esto sugiere que NOXC sería fundamental en el inicio del desarrollo del pelo radical y que los niveles de ROScit presentes son principalmente debidos a la contribución de esta. Para mantener los niveles de ROScit en estadios más avanzados participarían las NOXH y NOXJ. Análisis con líneas reporteras de NOXC, NOXH y NOXJ son necesarios para confirmar estos resultados.

Mediante cruza entre la mutante *nox*c-1 con la línea transgénica que expresa el biocensor YC3.6, se generó una línea mutante para *nox*c que expresa YC3.6. Esta línea permitió medir los niveles de Ca²⁺cit en la mutante *nox*c. Se observó que los niveles de Ca²⁺cit estaban significativamente disminuidos en la mutante *nox*c-1 con respecto al control (Wt Col-0/YC3.6) en todos los estadios del desarrollo de los pelos radicales analizados (**Fig. 1.6R.C**). Con estos resultados se podría afirmar que cuando se encuentra mutado el gen de la *nox*c los niveles de ROScit disminuyen afectando los niveles de Ca²⁺cit. Esto reafirma la hipótesis de la existencia de una vía de retroalimentación positiva entre ROS y Ca²⁺ como fue postulado anteriormente [7, 12]

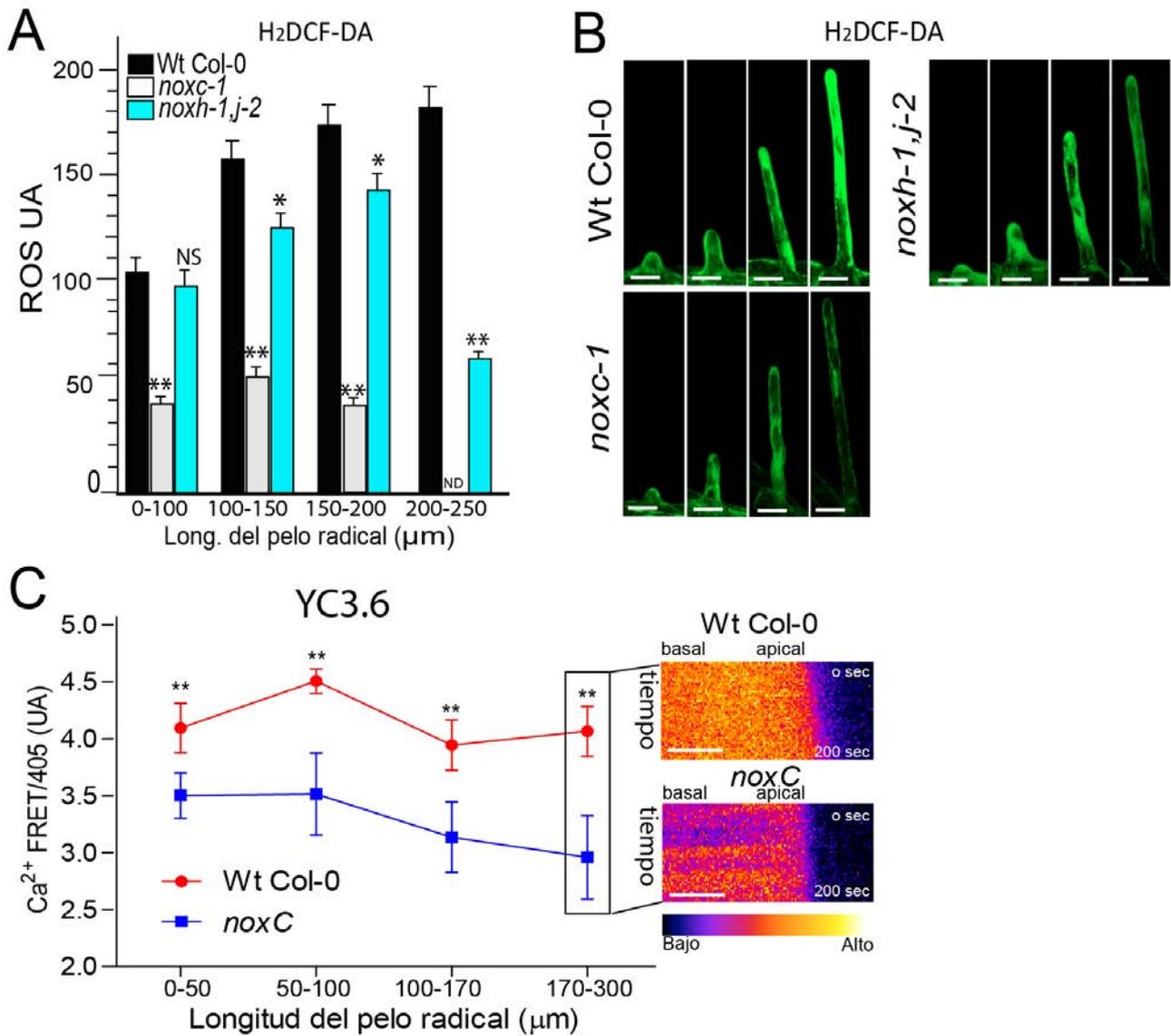


Figura 1.6R: Contribución de las NOXC, NOXH y NOXJ a la homeostasis de ROScit y Ca²⁺cit. (A) Análisis cuantitativo de ROScit obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA (media ± s.e.m., n=20). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. UA= Unidades Arbitrarias. NS= diferencia No Significativa. P-value de one-way anova, (**) P<0.001, (*) P<0.01. **(B)** Señal de ROScit generada por la oxidación de H₂DCF-DA en las diferentes mutantes de las *nox*s en diferentes estadios iniciales del desarrollo. Barra de escala: 50 μm. **(C)** Niveles de Ca²⁺ citoplasmáticos (FRET/CFP) en pelos radicales de Wt Col-0 y en la mutante *noxC* que expresan el biocensor YC3.6 en diferentes estadios del crecimiento de los pelos radicales (media ± s.e.m., n=15). A la derecha se muestra un *kymograph* que representa la señal del biocensor a través del tiempo en un pelo radical de longitud comprendida entre 170 y 300μm. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. T-test P-value (**) P<0.01. Escala de colores utilizada: FIRE. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: 5μm.

Previamente se demostró cómo el crecimiento polarizado y los niveles de ROScit se ven afectados por la aplicación del inhibidor VAS2870 en el medio de crecimiento de las plantas. Se observó que a medida que se aumenta la concentración de VAS2870 en el medio de crecimiento de plantas Wt Col-0 la longitud de los pelos radicales decrece y los niveles de ROScit disminuyen. Se agregaron concentraciones crecientes del inhibidor a las mutantes con la intención de lograr inhibir completamente la producción de anión O₂⁻ y suprimir completamente el crecimiento del pelo radical.

Concentraciones de 0, 5, 10 y 15 μM de VAS2870 en el medio de crecimiento de la mutante *nox-1* no mostraron tener efecto en el crecimiento de los pelos radicales ya que la longitud media de los pelos radicales se mantuvo constante (**Fig. 1.7R.A**). A pesar de esto, se observó una disminución significativa en los niveles de ROScit en presencia del inhibidor (**Fig. 1.7R.B**). Esto indicaría que niveles muy bajos de ROScit son suficientes para el inicio del crecimiento polarizado de los pelos radicales o que ROScit no sería requerido para el mismo. Cuando se incubó la doble mutante *noxh-1 noxj-2* con las mismas concentraciones crecientes de VAS2870 el crecimiento polarizado se vió inhibido y la longitud máxima de los pelos radicales alcanzada es comparable con la mutante de la *nox-1* y los niveles de ROScit se nivelaron a los alcanzados en la mutante *nox-1* (**Fig. 1.7R.A,B**).

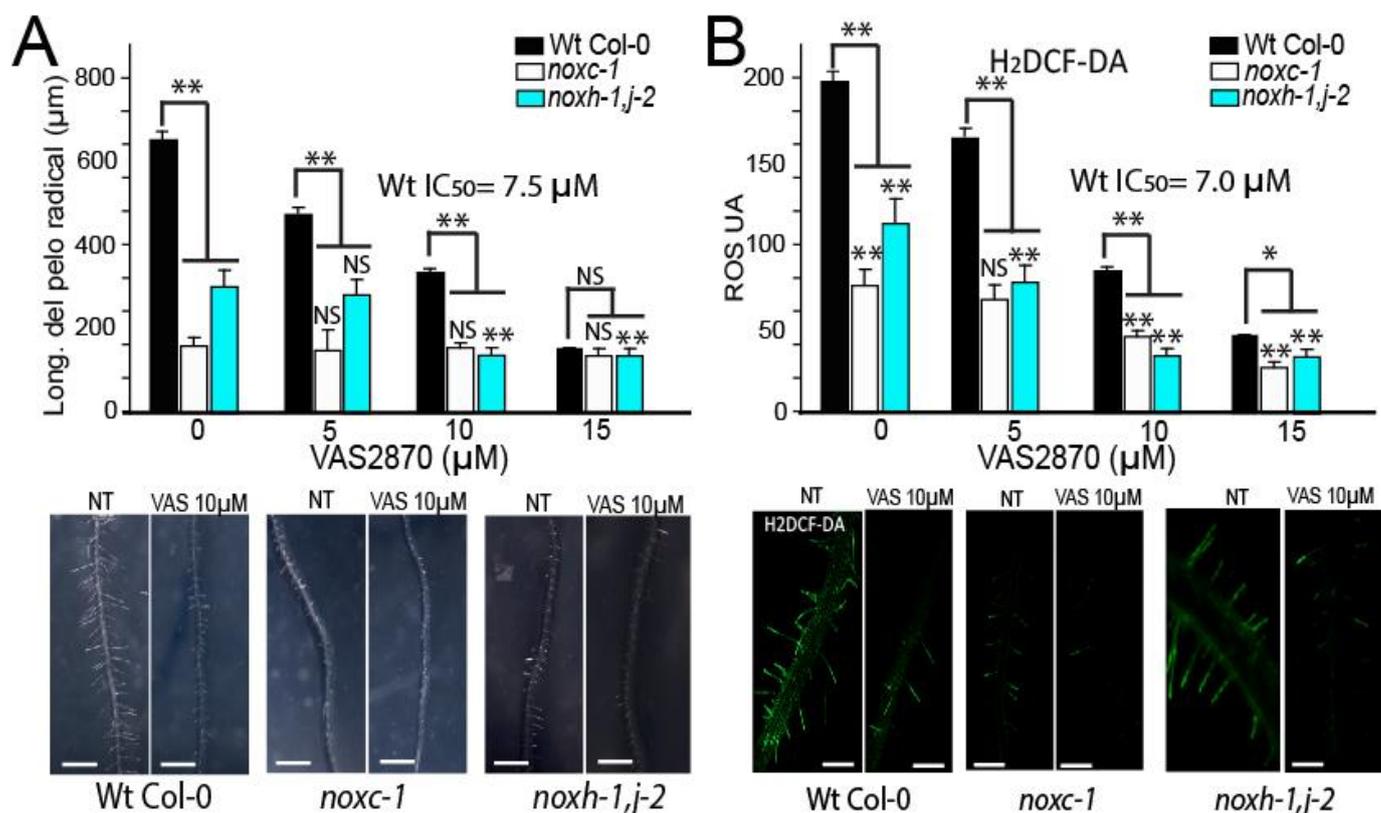


Figura 1.7R: Efectos de VAS2870 en *nox-1* y en *noxh-1 noxj-2*. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0, de la simple mutante *nox-1* y las múltiples mutantes *noxh-1 noxj-2* cuando se agregó en el medio de crecimiento de las plantas concentraciones crecientes de VAS2870 (0-15 μM) (media \pm s.e.m., n=25) NS= diferencia No Significativa. P-value de one-way anova, (**) P<0.001. Abajo, fenotipo de pelo radical de Wt Col-0, simples y múltiples mutantes de las *nox*s tratadas o no con 10 μM de VAS2870. Barra de escala: 700 μm . NT= No Tratada. (B) Análisis cuantitativo de ROScit obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA cuando se agregó concentraciones crecientes del inhibidor VAS2870 (0-15 μM) en el medio de crecimiento de plantas Wt Col-0 y de la simple mutante *nox-1* y la doble mutante *noxh-1 noxj-2*. UA= Unidades Arbitrarias. NS= diferencia No Significativa. (media \pm s.e.m., n=15-20) P-value de one-way anova, (**) P<0.001, (*) P<0.01. Abajo, señal de ROScit generada por la oxidación de H₂DCF-DA en Wt Col-0 y de las diferentes mutantes de las NOXs cuando son tratadas o no con 10 μM de VAS2870. NT= No Tratada. Barra de escala: 200 μm .

1.2 Transporte de ROS a través de la membrana plasmática.

Las NOXs producen anión O_2^- en el apoplasto celular, y como se determinó previamente este contribuye mayoritariamente a la homeostasis de ROS_{cit}. En el apoplasto el anión O_2^- es transformado a H_2O_2 mediante la acción enzimática de la Super Óxido Dismutasa (SOD) o químicamente sin la intervención de la enzima. El H_2O_2 resultante no es capaz de difundir a través de la membrana plasmática de manera pasiva por lo que debe existir algún tipo de transportador que permita su pasaje de forma rápida del apoplasto al citoplasma. Por otro lado, estudios previos establecieron que las ROS son capaces de activar sistemas transportadores de Ca^{2+} [66, 137, 138]. No se conoce cómo y si para esto es necesario el transporte de las ROS hacia el citoplasma o si son capaces de activar los transportadores por la cara apoplástica de la célula [66, 137, 138]. Recientemente, se describió que las acuaporinas de plantas son capaces de transportar *in vitro* e *in vivo* otras moléculas además de H_2O como H_2O_2 [59] por lo que estas son excelentes candidatos a ser los responsables del pasaje de H_2O_2 (y posiblemente de otras ROS) del apoplasto al citoplasma. Para responder este interrogante se utilizó $HgCl_2$ y azida de sodio (NaN_3) los cuales están descritos como bloqueadores de las acuaporinas [60-62]. Se realizaron ensayos midiendo como se ven afectados los niveles de ROS_{cit} de los pelos radicales cuando se agrega $20\mu M$ de $HgCl_2$ o $10mM$ de NaN_3 durante tiempos cortos (TC, 10min) o por tiempos prolongados (TL, 30min). Con cada uno de estos inhibidores se observó resultados similares, en tiempos cortos los niveles de ROS_{cit} disminuyeron drásticamente (aproximadamente un 80%) (**Fig. 1.8R.A**). Cuando el tratamiento se aplicó por un tiempo mayor (30 min) los niveles de ROS_{cit} se encontraban disminuidos pero la diferencia con respecto a las plantas sin tratar no fue tan drástica (**Fig. 1.8R.B**). Lo que indicaría que existe algún mecanismo celular para contrarrestar la inhibición de las acuaporinas.

Por otro lado, se agregó *in vivo* cada uno de estos inhibidores en plantas que expresaban los biocensores *Hyper* y *Camaleón* y se observó en tiempo real que es lo que sucedía con los niveles de H_2O_2 y Ca^{2+} cuando las acuaporinas son bloqueadas. Los niveles de H_2O_2 _{cit} disminuyeron drásticamente luego del agregado de $20\mu M$ de $HgCl_2$ y $10mM$ de NaN_3 (**Fig. 1.8R.C,D**). Con el fin de determinar si el efecto analizado era debido a una disminución en el transporte de H_2O_2 se realizó un ensayo con el biocensor *Hyper* en donde se agregaron de manera secuencial H_2O_2 - $HgCl_2$ - H_2O_2 . Cuando se agregó primero $1\mu M$ de H_2O_2 se observó un aumento en la señal obtenida del biocensor lo que demostró que el pelo estaba detectando e incorporando el H_2O_2 que se encontraba en el medio. Luego, al agregar $20\mu M$ de $HgCl_2$ se observó una drástica disminución en los niveles de H_2O_2 _{cit} detectados (**Fig. 1.8R.F**). Finalmente, después del bloqueo de las acuaporinas, se agregó nuevamente $1\mu M$ de H_2O_2 en el medio, pero los niveles de H_2O_2 _{cit} no aumentaron (**Fig. 1.8R.F**). Esto demostró que una vez bloqueadas las acuaporinas, aunque se agregue H_2O_2 de manera exógena, este no es capaz de pasar al citoplasma. Además, este experimento sugeriría que la disminución en los niveles de H_2O_2 _{cit} observados al agregar $HgCl_2$ es debido al bloqueo de las acuaporinas y a la inhibición del pasaje de H_2O_2 hacia el citoplasma. Además, se agregó $HgCl_2$ a un pelo radical de una planta que expresa el biocensor YC3.6. Se observó que al inhibir el pasaje de H_2O_2 del apoplasto hacia el citoplasma los niveles de Ca^{2+} _{cit} disminuyen drásticamente por lo que este transporte sería requerido para mantener los niveles de Ca^{2+} _{cit} (**Fig. 1.8R.E**). Este podría ser, entre otras cosas, debido a que los transportadores de Ca^{2+} son activados por H_2O_2 en los dominios citoplasmáticos de las proteínas. Este resultado debería ser confirmado por alguna metodología complementaria. Resumiendo, se podría

decir que las NOXs producen anión O_2^- en el apoplasto celular y este es transformado mediante la intervención o no de las superóxido dismutasas (SOD) en H_2O_2 y este sería transportado al citoplasma mediante las acuaporinas. Este transporte sería necesario para mantener los niveles de Ca^{2+} cit (**Fig. 1.8R.G**).

En *Arabidopsis thaliana* se encuentran numerosos representantes de las acuaporinas tipo PIP y estas se expresan en diversos tejidos. Se analizó *in silico* micro arreglos de la base de datos *genevestigator* y se observó que en pelos radicales se expresan mayoritariamente PIP2;7 y PIP2;4 entre otras. Se aislaron mutantes insercionales de T-ADN simples para ambas *pips* y se midió la longitud del pelo radical y ROScit, pero no se observó una diferencia significativa con respecto a Wt Col-0 (resultados no mostrados, resultados preliminares). Este podría deberse a una alta redundancia 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 se puede observar una alteración del transporte de ROS.

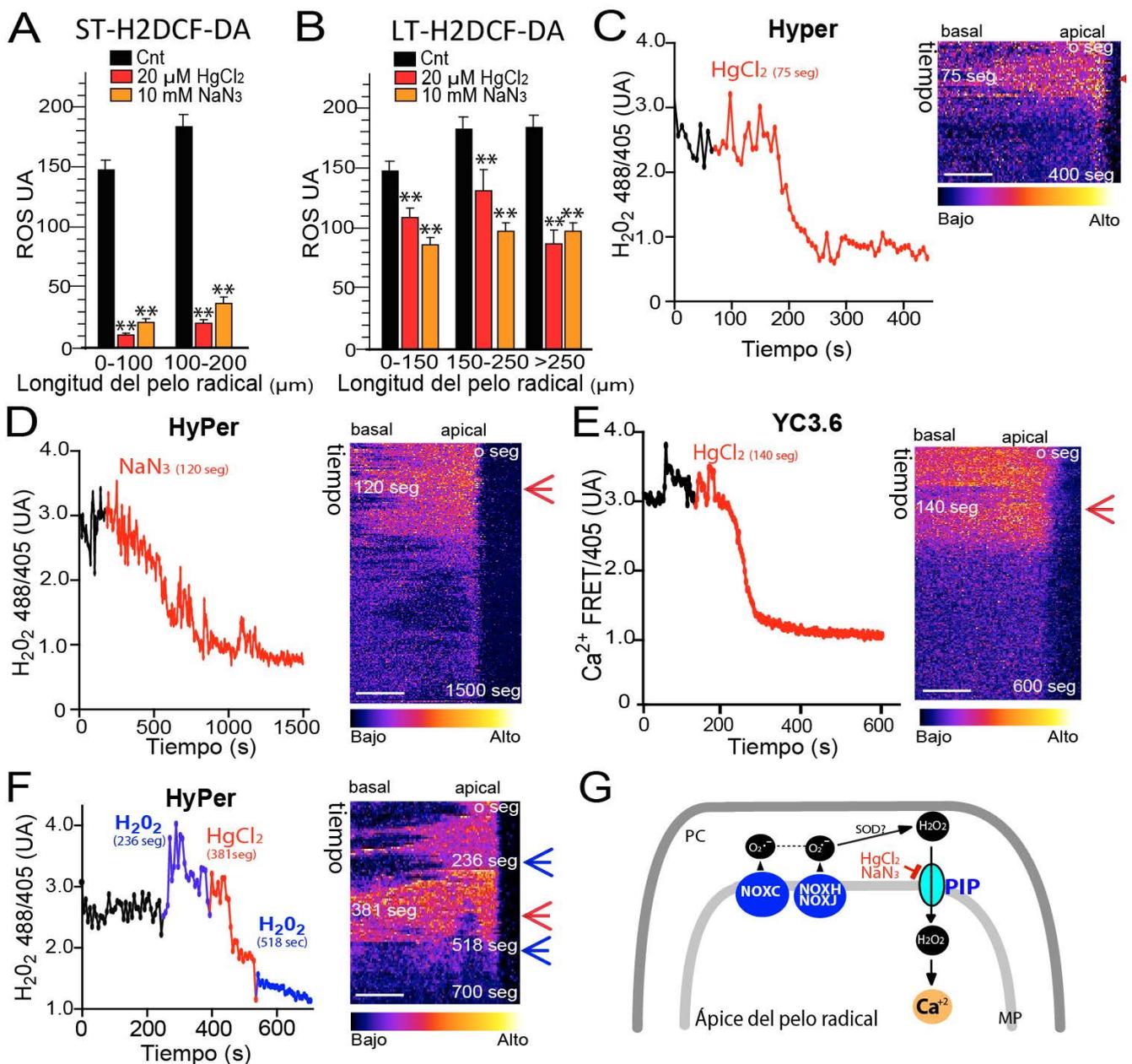


Figura 1.8R: Transporte de H₂O₂ mediado por las acuaporinas tipo PIP. (A) Análisis cuantitativo de ROS en pelos radicales obtenido mediante la oxidación de H₂DCF-DA de plantas Wt Col-0 incubadas o no por 10 min con 20 μM de HgCl₂ o con 10 mM de NaN₃. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes (media ± s.e.m., n=10). UA= Unidades Arbitrarias. *P*-value de one-way anova, (**) *P*<0.001. (B) Análisis cuantitativo de ROS en pelos radicales obtenido mediante la oxidación de H₂DCF-DA de plantas Wt Col-0 incubadas o no durante 30 min con 20 μM de HgCl₂ o con 10 mM de NaN₃ (media ± s.e.m., n=10). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. UA= Unidades Arbitrarias. *P*-value de one-way anova, (**) *P*<0.001. (C) Niveles de H₂O₂cit (488/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor *Hyper* tratado con 20 μM de HgCl₂. A la derecha, el *kymograph*, la flecha indica el momento en el que se agregó HgCl₂. (D) Niveles de H₂O₂ citoplasmáticos (488/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor *Hyper* tratado con 10 mM de NaN₃. A la derecha, el *kymograph*, la flecha indica el momento en el que se agregó NaN₃. (E) Niveles de Ca²⁺ cit (FRET/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor YC3.6 tratado con 20 μM de HgCl₂. A la derecha, el *kymograph*, la flecha indica el momento en el que se agregó HgCl₂. (F) Niveles de H₂O₂cit en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor *Hyper* tratadas en orden con 1 μM de H₂O₂ extracelular, 20 μM de HgCl₂ y finalmente 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. (C)(D)(E)(F) UA=Unidades Arbitrarias. Escala de colores utilizada en el *kymograph*: FIRE. Barra de escala: 5 μm. (G) Modelo propuesto desde la síntesis de anión O₂⁻ en el apoplasto celular hasta el aumento de Ca²⁺cit.

1.3 Regulación del crecimiento polarizado mediado por auxinas.

Las auxinas son hormonas presentes en las plantas que controlan numerosos procesos fisiológicos, entre ellos el desarrollo de raíces laterales y el crecimiento de los pelos radicales promoviendo su desarrollo. No se ha determinado si esta promoción del crecimiento de los pelos radicales por auxinas es mediada por ROS o por otros mecanismos. Por otro lado, se ha demostrado que esta hormona es capaz de revertir numerosos fenotipos de mutantes de pelos radicales ya que es capaz de controlar a nivel transcripcional numerosos genes [139]. El compuesto más abundante y fisiológicamente más importante, es el ácido 3-indol-acético (IAA) que se encuentra en grandes cantidades en tejidos jóvenes tanto de la parte aérea como de la raíz de *Arabidopsis thaliana* [89, 90]. Las auxinas son transportadas en los atricoblastos mediante PIN2-AUX1 y luego por difusión se distribuyen en los tricoblastos donde promueven el crecimiento de los pelos radicales [88].

Cuando se agregó 100nM de IAA en el medio de crecimiento de plantas Wt Col-0 se observó un aumento en la longitud máxima de los pelos radicales, los niveles de ROScit aumentaron en los diferentes estadios del desarrollo y además se mantuvieron elevados en pelos radicales de longitudes superiores al control (**Fig. 1.9R.A,B**). Se pudo observar la misma tendencia en la respuesta de los pelos radicales cuando se agregó en el medio de crecimiento 5μM de IAA (**Fig. 1.9R.A,C**).

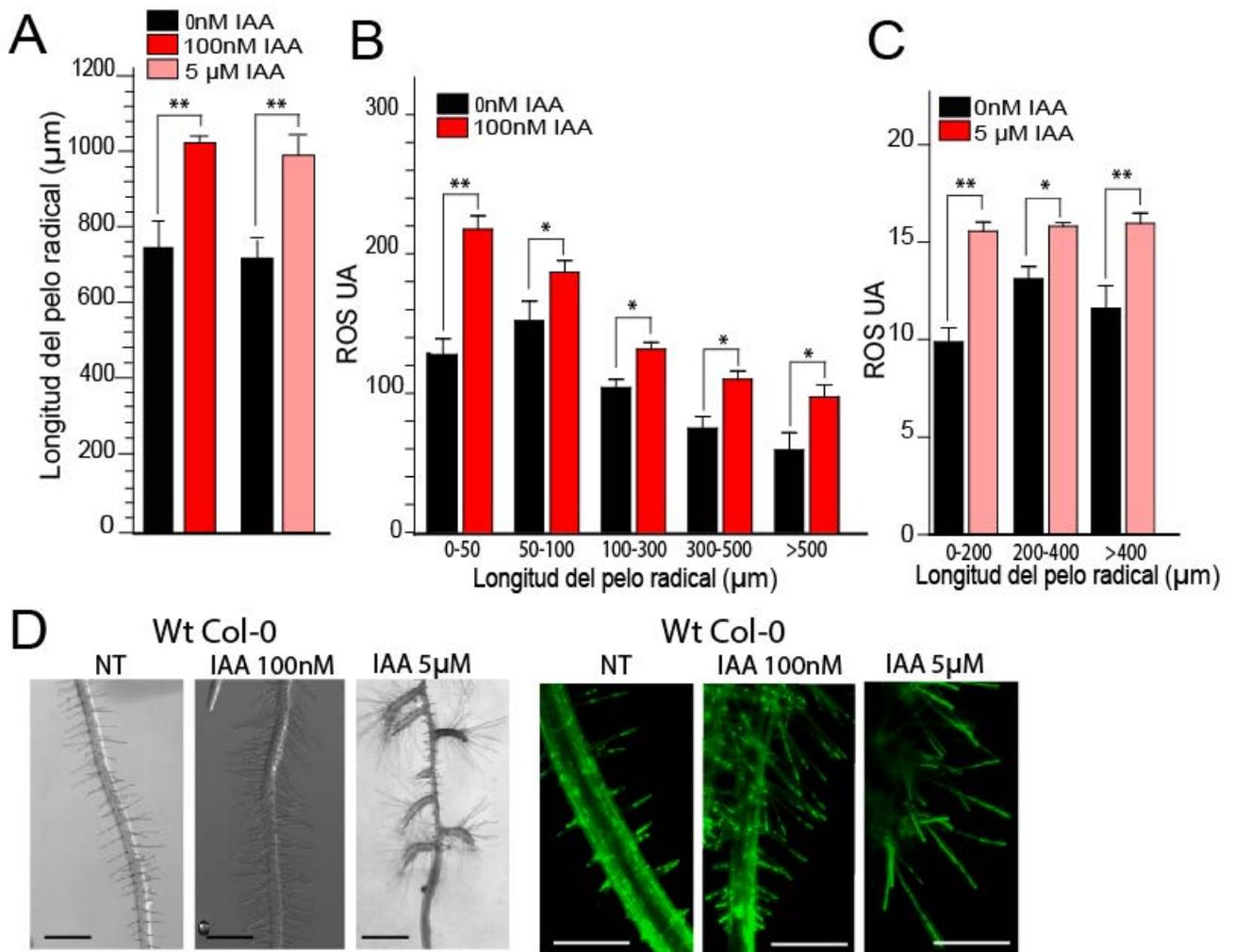


Figura 1.9R: Regulación del crecimiento polarizado mediada por IAA. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0 tratado o no con 100nM de IAA y 5µM de IAA (media ± s.e.m., n=40). *T-test value* (**) $P < 0.01$ (B) Análisis cuantitativo de ROScit obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se le agregó o no 100nM de IAA al medio de crecimiento (media ± s.e.m., n=25). (C) Análisis cuantitativo de ROScit obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se le agregó o no 5µM de IAA al medio de crecimiento (media ± s.e.m., n=20). (B)(C) La comparación estadística se realizó entre pelos que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T-test value* (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.01$. UA=Unidades Arbitrarias. (D) A la izquierda fenotipo de pelo radical de planta Wt Col-0 tratada o no con 100nM de IAA y 5µM de IAA. Barra de escala: 900 µm. NT= No Tratada. A la derecha señal de ROScit generada por la oxidación de H₂DCF-DA en plantas Wt Col-0 tratadas o no con 100nM de IAA o 5µM de IAA. Barra de escala: 400 µm. NT= No Tratada.

Con el fin de determinar si la estimulación del crecimiento de los pelos radicales por IAA era mediada por las NOXs se trató a la mutante *nox-1* y a la doble mutante *noxh-1 noxj-2* con 100nM de IAA. Se detectó una reversión muy leve del fenotipo de pelo radical corto de la mutante *nox-1* y una reversión total del fenotipo de pelo corto en la doble mutante *noxh-1 noxj-2* (Fig. 1.10R.A,C). Además, esta respuesta se vio acompañada con un aumento en los niveles de ROScit a niveles similares a Wt Col-0 en la doble mutante *noxh-1 noxh-2* y un aumento parcial leve de ROScit en la mutante *nox-1* (Fig. 1.10R.B,C). Por lo tanto, la respuesta de los pelos radicales a auxinas estaría mediada principalmente por la NOXC. Estos experimentos remarcan una vez más la función primordial de la NOXC dentro del crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*.

Con el fin de entender el mecanismo por el cual opera la reversión observada y teniendo en cuenta que auxinas controlan variadas respuestas en la planta a nivel transcripcional, se podría especular que el agregado de IAA estimularía la expresión de las NOXs de manera de compensar parcialmente o totalmente el fenotipo observado.

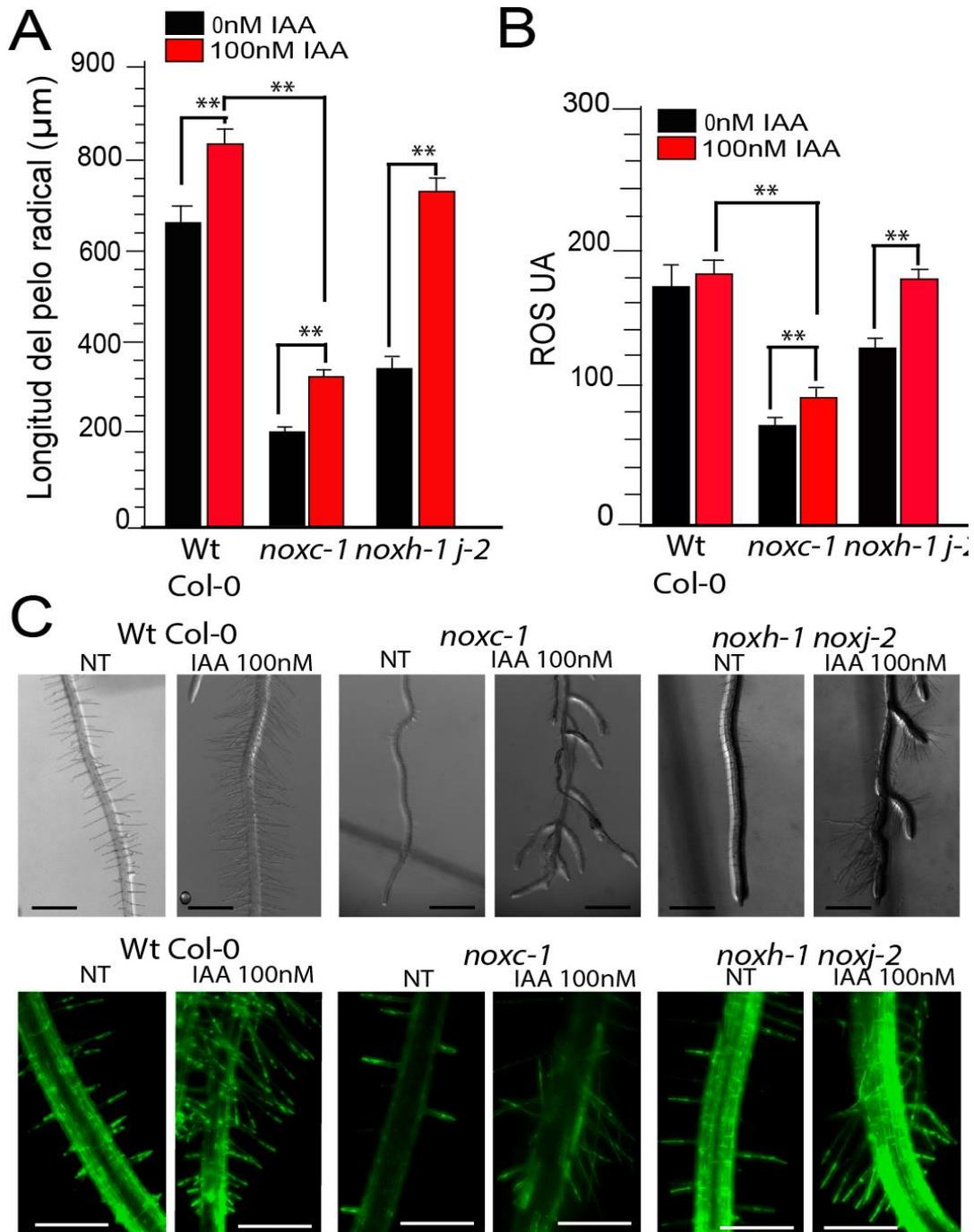


Figura 1.10R: Respuesta de las mutantes *noxs* a la presencia de IAA. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0, simple mutante *nox-1* y de la doble mutante *noxh-1 noxj-2* tratadas o no con 100nM de IAA (media \pm s.e.m., n=40). *P*-value de *one-way anova*, (**) $P < 0.001$ (B) Análisis cuantitativo de ROScit obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0, simple y múltiple mutante de las *noxs* tratadas o no con 100nM de IAA. *P*-value de *one-way anova*, (**) $P < 0.001$. (C) Arriba: fenotipo de pelo radical de Wt Col-0, simple y múltiple mutantes de las *noxs* tratadas o no con 100nM de IAA. Barra de escala: 1000 μm . Abajo: Señal de ROS generada por la oxidación de H₂DCF-DA en plantas Wt Col-0, simple y multiple mutantes de las *noxs* tratadas o no con 100nM de IAA. Barra de escala: 600 μm . NT= No Tratada.

1.4 Regulación transcripcional de las NOXs.

Las auxinas pueden actuar a nivel transcripcional y los genes que responden a la misma poseen en la secuencia de sus promotores elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) que son capaces de unir los factores de transcripción (FTs) de respuesta a auxinas (ARFs, *Auxin Response Factors*). En ausencia de esta hormona, los ARFs se encuentran inhibidos por el complejo Aux/IAA y en presencia de auxinas este dominio es ubiquitinado y degradado en el proteosoma de manera que los ARFs quedan libres para activar/reprimir la transcripción de sus genes blancos [90] (**Fig. 1.7I**). Por otro lado, se ha demostrado que RSL4 coordina las señales de diferentes hormonas como auxinas y señales extracelulares como fosfato [3]. Además se considera a RSL4 como un regulador maestro del desarrollo de los pelos radicales. A pesar de los antecedentes que generan una conexión molecular entre RSL4 y auxinas, la transcripción de *RSL2* mostró ser reprimida en presencia de auxinas demostrando que la regulación de este gen también puede ser controlada por auxinas [3]. Finalmente, es importante remarcar que se demostró en esta tesis la respuesta de los pelos radicales a auxinas estaría mediada por la NOXC. No se conoce la relación entre todos estos componentes en la regulación del crecimiento polarizado de los pelos radicales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se hipotetiza que la transcripción de las NOXs (NOXC, NOXH y NOXJ) sería regulada por los FTs RSL2 y RSL4. Además, que la expresión de estos últimos estaría regulada entre otros FTs (RHD6 y RSL1) por los ARFs ya que en la doble mutante *rhd6 rsl1*, la presencia de auxinas estimuló la expresión de RSL4 indicando la existencia de un mecanismo de regulación independiente de RHD6 y RSL1 [3]. De esta manera se genera una conexión molecular entre la respuesta a auxinas con el crecimiento polarizado asociado a la homeostasis de ROS. No se puede descartar la posibilidad de que los ARFs sean capaces de regular directamente la expresión de las NOXs.

Para comprobar esta hipótesis, primero se realizó un estudio bioinformático basado en la identificación y análisis de los genes que son regulados por RSL4 [3]. Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Nadra (IQUIBICEN-CONICET). Primero se identificó posibles blancos de RSL4, para esto se seleccionaron genes en los cuales su transcripción se encontraba reprimida en la línea mutante de *rsl4* y se compararon con genes que se encontraban altamente expresados en la línea transgénica que sobre-expresa RSL4 [3]. Una vez seleccionado 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 (*Root Hair Element*) TN₆CA[CT]G[TA], en donde N puede ser A/T/C/G [80]. Esto sugirió que RHE no solo sería una secuencia *cis* de pegado específico de pelo sino que RSL4 podría ser el FT que reconoce este elemento. Las regiones promotoras de los genes *NOXC*, *NOXH* y *NOXJ* muestran numerosas regiones RHEs, sugiriendo que los genes de las *NOXs* podrían actuar como objetivos directos del FT RSL4 (**Tabla 1.1R**). En la tabla 1.1R podemos ver que el gen *NOXC* posee dos sitios putativos de unión de RSL4, *NOXH* posee cuatro sitios y *NOXJ* solo uno.

Gen	Posición desde el codón de inicio de la transcripción.	Secuencia	Dirección
NOXC <i>At5g51060</i>	-1410	CAAGTCCG-ACCACGTC	<i>Forward</i>
	-330	CATGTGAA-TTCACGAG	<i>Forward</i>
NOXH <i>At5g60010</i>	-739	AGAGTGGC-GGCACGTG	<i>Forward</i>
	-803	CCTGTCTTCGTACGTG	<i>Reverse</i>
	-809	GGGTCGGTGGCACGTG	<i>Forward</i>
	-920	TTCTGGCTGCCACGGT	<i>Forward</i>
NOXJ <i>At3g45810</i>	-851	AAATTAGT-TCCACGAC	<i>Reverse</i>

Tabla 1.1R: Elementos de respuesta a RSL4 en el promotor de las NOXs. Elementos específicos de pelos radicales (RHE) en las regiones regulatorias río arriba del inicio de la transcripción de los genes de las NOXs (*NOXC*, *H* y *J*).

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) en una línea transgénica transformada con la construcción $p_{RSL4}::RSL4-GFP$ (Wt Col-0/ *promotorRSL4::RSL4-GFP*) (Tabla 2M). El estudio de esta línea acoplada a ChIP-PCR permitió comprobar si RSL4-GFP era capaz de interactuar *in vivo* con la zona promotora de los genes de *NOXC*, *NOXH* y *NOXJ*. Los sitios RHE -1410 y -330 (nomenclatura basada en la posición del nucleótido del inicio de la secuencia detectada con respecto al inicio de la transcripción del gen) de la región promotora de *NOXC* así como el sitio -851 de la región promotora de la *NOXJ* se encontraron significativamente enriquecidos en el ensayo de ChIP-PCR (Fig. 1.11R.A). Estos resultados indican que RSL4 sería capaz de interactuar con dos secuencias RHE en el promotor de *NOXC* y con una secuencia en el promotor de *NOXJ*. No se detectó enriquecimiento de los 4 posibles sitios RHE en el promotor de *NOXH*.

Con el fin de determinar cómo influye la interacción de RSL4 con los promotores del gen *NOXC* en los niveles de transcripción de estos genes, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR). Además, se quiso identificar como otros FTs de transcripción como RSL2 afectan la transcripción de *NOXC*. Para esto se extrajo el ARNm de plantas mutantes simples nulas de *rs14-1* [3], *rs12-1* [3] y de la doble mutante *rs14-1 rs12-1*. Se realizó la retro-transcripción del ARNm generando ADNcopia (cADN) y se cuantificó los niveles de transcripto de la *NOXC* en los distintos mutantes en comparación a plantas Wt Col-0. Se observó que cuando RSL4 no está presente disminuyen significativamente los niveles de transcripción de *NOXC*, es decir que RSL4 es necesario para activar la transcripción de *NOXC* (Fig. 1.11R.A). Esta disminución también se observó en el doble mutante *rs14-1 rs12-1* pero no así en la simple mutante *rs12-1*. RSL2 no pareciera estar involucrado en la regulación transcripcional de *NOXC*. Con estos resultados se puede afirmar que RSL4 sería capaz de interactuar con el promotor de *NOXC* y que esta interacción estimularía la transcripción del gen favoreciendo la producción de ROS asociada al crecimiento polarizado (Fig. 1.11R.C). Aún resta por determinar como

la interacción de RSL4 con el promotor de *NOXJ* afecta la transcripción del mismo y si la transcripción de *NOXH* y *NOXJ* es regulada por RSL2.

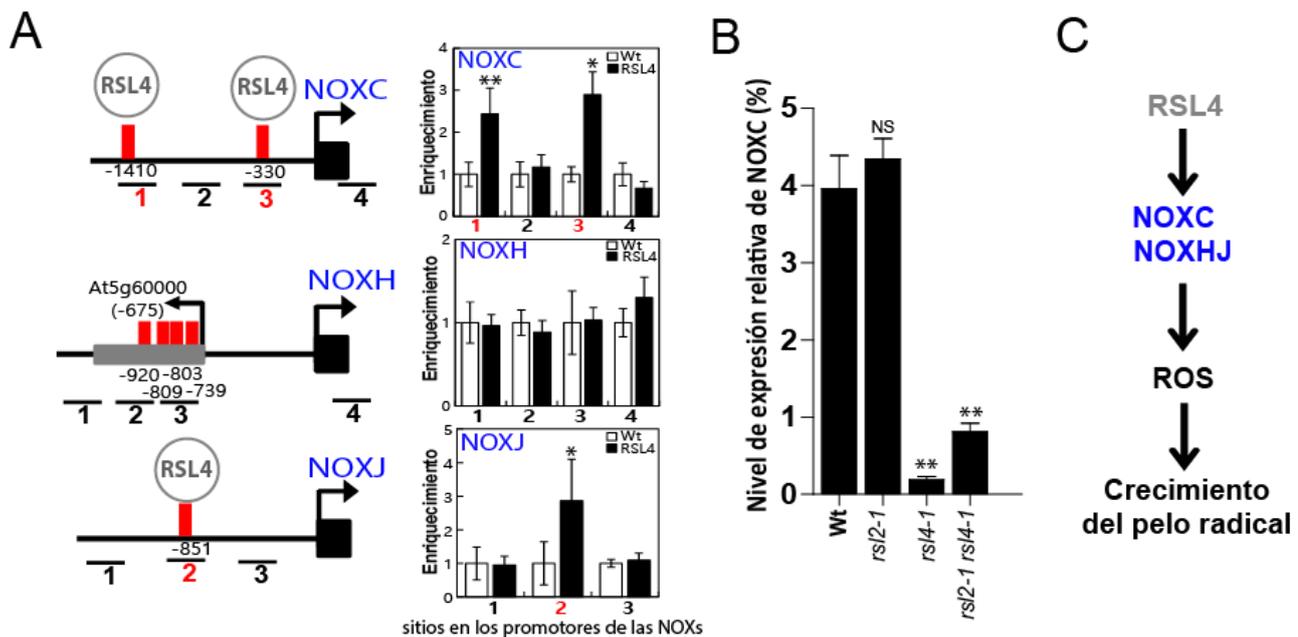


Figura 1.11R: Regulación transcripcional de los genes *NOXC*, *H* y *J*. (A) Se observan los elementos de respuesta a RSL4 determinados mediante análisis bioinformáticos como barras rojas y las regiones que fueron utilizadas para hacer ChIP-PCR están representadas como líneas numeradas #1-4 (en rojo se encuentran aquellas regiones que se encuentran enriquecidas en la línea $p_{RSL4}::RSL4-GFP$). Exones de genes vecinos están indicados como una caja gris. A la derecha análisis cuantitativo del enriquecimiento de las secuencias detectado mediante ChIP-PCR de cada región estudiada en las líneas que expresan RSL4-GFP con respecto al Wt Col-0 (media \pm SD, $n=2$). RSL4= $p_{RSL4}::RSL4-GFP$. Los valores son relativos al respectivo valor Control (Wt Col-0) de cada uno. *T-test value* (**) $P<0.01$ (*) $P<0.05$. (B) Niveles de transcritos relativos a PP2A de *NOXC* detectados por qPCR en plantas Control y en la simple mutante de *rsl4-1* y *rsl2-1* y la doble mutante *rsl4-1 rsl2-1* (media \pm s.e.m). *P*-value de one-way anova, (**) $P<0.001$. NS=Diferencia No Significativa (C) Eventos propuestos desde la activación de la transcripción de los genes de *NOXC* y *J* por RSL4 hasta el crecimiento del pelo radical mediado por la homeostasis de ROS.

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 (aproximadamente un 80%-90%) más corta que plantas Wt Col-0 (Fig. 1.12R.A). Además, *rsl4-1* y *rsl2-1* tenían los niveles de ROScit significativamente disminuidos en los pelos radicales en comparación a plantas Wt Col-0 (Fig. 1.12R.B,C). Como se demostró en los ensayos anteriores, esto se debería a que al no estar presente RSL4, los niveles de transcripción de *NOXC* se encuentran disminuidos con la consecuente inhibición de los niveles de ROScit. Cuando se agregó 100nM de IAA al medio de crecimiento se observó una reversión total del fenotipo de la mutante simple de *rsl4-1* y de *rsl2-1* tanto en la longitud del pelo como así en los niveles de ROScit (Fig. 1.12R.A,B,C). No se observó esto cuando se creció en presencia de 100nM de IAA la doble mutante *rsl4-1 rsl2-1* (Fig. 1.12R.A). Estudios previos demuestran que la mutante *rsl2-1* tiene fenotipo de pelo corto y que la transcripción del gen *RSL2* disminuye cuando se trata la planta con auxinas [3]. A pesar de esto, los resultados obtenidos indicarían que RSL4 y RSL2 tendrían funciones redundantes en la respuesta de los pelos radicales a la presencia de auxinas. Es por esto que las mutantes simples fueron capaces de responder a la presencia de IAA y no la doble mutante. Como se vió anteriormente los niveles de transcritos de la *NOXC* no se encuentran modificados en la mutante de *rsl2-1* por lo que es poco probable que la respuesta de

RSL2 a auxinas sea mediada por la NOXC. A pesar de esto, se vió que en presencia de 100nM de IAA tanto la mutante *rs14-1* como *rs12-1* recuperan los niveles de ROScit aproximadamente a niveles normales. Es posible que en la mutante *rs14-1* la regulación de *RSL2* difiera con respecto a cuándo *RSL4* no se encuentra mutado. Siendo esta capaz de compensar la ausencia de *RSL4* en la célula. Además, posiblemente *RSL2* es capaz de controlar la transcripción de *NOXJ* y *NOXH*.

Estos resultados en conjunto sugieren que *RSL4* con la ayuda de *RSL2* median la respuesta de la planta a auxinas y que *RSL4* es capaz de regular directamente a las *NOXs*, activando la transcripción de la *NOXC* y *NOXJ*. Estas últimas son las responsables de la producción de anión O_2^- contribuyendo mayoritariamente a la homeostasis de ROScit necesaria para mantener el crecimiento polarizado de los pelos radicales. Aún queda por probar el rol preciso de *RSL2* en la promoción de ROS y el rol que tienen las auxinas en este proceso.

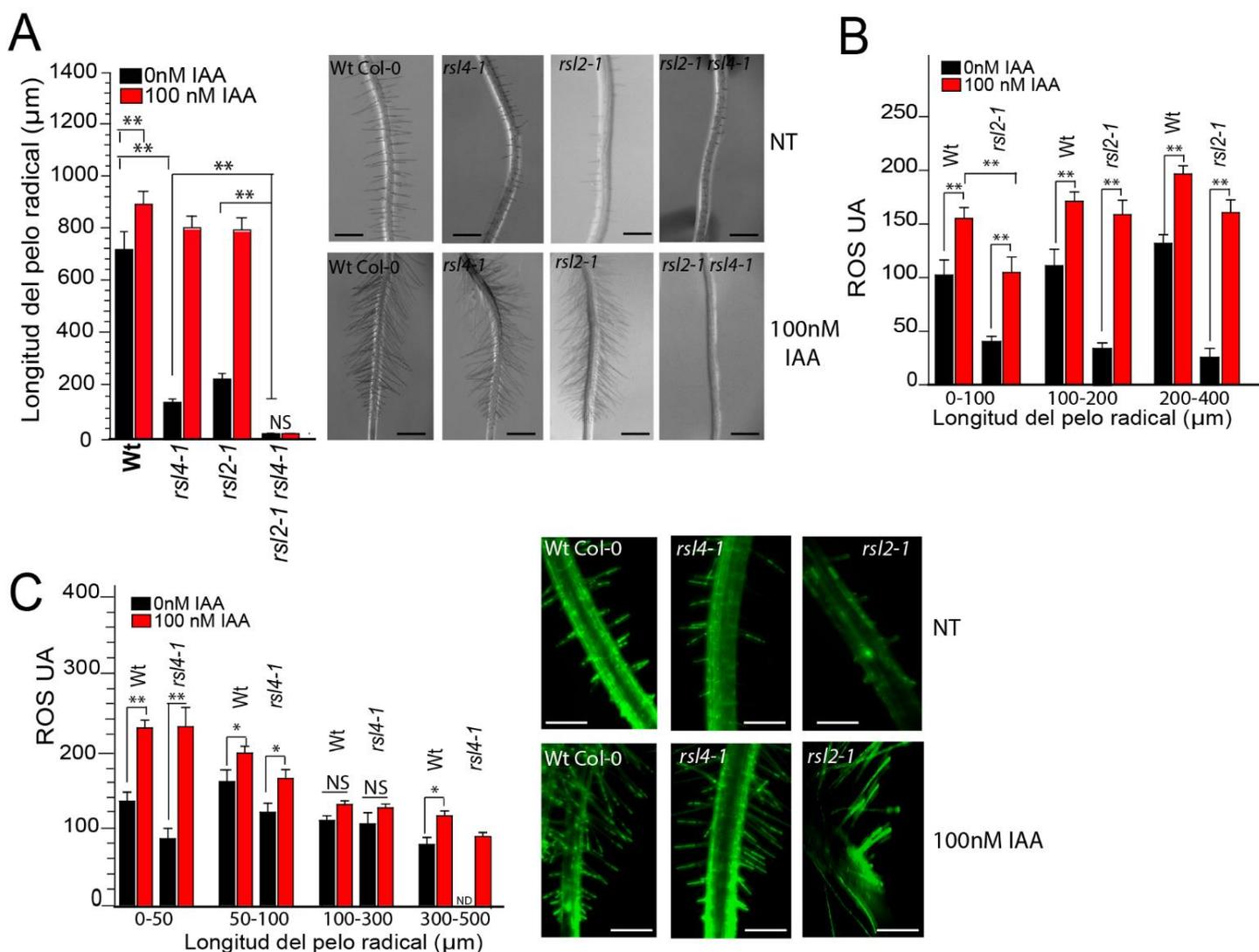


Figura 1.12R: Regulación mediada por IAA en las simples mutantes *rs14-1* y *rs12-1* y la doble mutante *rs12-1 rs14-1*. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0, de la simple mutante *rs14-1*, *rs12-1* y la doble mutante *rs12-1 rs14-1* cuando se agregó o no en el medio de crecimiento 100nM IAA (media \pm s.e.m., n=40). A la derecha se muestra el fenotipo de pelo radical de Wt Col-0, mutantes *rs/s* tratadas o no con 100nM de IAA. Barra de escala: 700 µm. NT= No Tratada. (B) Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de $H_2DCF-DA$ de pelos radicales de longitudes comprendidas entre 0-100µm, 100-200µm y 200-400µm de plantas Wt Col-0 y la mutante *rs12-1* cuando se crecen en un medio con el agregado o no de 100nM de IAA. (C) Análisis cuantitativo de los niveles de ROS obtenido mediante la oxidación de $H_2DCF-DA$ en pelos radicales de longitudes comprendidas entre 0-50µm y 50-

100µm y 100-300µm de plantas Wt Col-0 y la mutante *rs/4-1* cuando se 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 y de las simples mutantes *rl4-1* y *rs/2-1* cuando son tratadas o no con 100nM de IAA. NT= No Tratada. Barra de escala: 500 µm. **(A)(B)(C)** UA= Unidades Arbitrarias. ND=No detectado. *P*-value de one-way anova (*) *P*<0.01 (**) *P*<0.001. NS= diferencia No Significativa.

Con estos resultados se demostró cómo sería la regulación transcripcional de los genes *NOXs*, resaltando el rol protagónico de la *NOXC* y *RSL4* dentro del crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. Aun así, queda una pregunta sin resolver: ¿Cuál es la conexión molecular entre auxinas y las *NOXs*? Una hipótesis es que la respuesta sea mediada por los ARFs, los cuales activarían la transcripción de *RSL4* y este regularía la transcripción de los genes *NOXs*. Estos factores interaccionan con elementos de respuesta a auxina (Aux-RE) presentes en regiones regulatorias de diferentes genes. En ausencia de auxinas estos ARF se encuentran inhibidos por los co-receptores de auxinas Aux/IAAs [93]. En las raíces de *Arabidopsis thaliana* se expresan numerosos ARFs por lo que es posible que posean alta redundancia funcional haciendo difícil el estudio de estos mediante el uso de mutantes insercionales.

Mediante análisis bioinformáticos realizados en colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Nadra se determinó la existencia de secuencias cis Aux-RE en el promotor del gen de *RSL4* (**Tabla 1.2R**). Se observó que se encuentran 8 diferentes Aux-RE río abajo del sitio de inicio de la transcripción de *RSL4* (**Tabla 1.2R**).

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

Tabla 1.2R: 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*.

Por otro lado, mediante el análisis de bases de datos como *EFP Browser Toronto* se observó que numerosos ARFs se expresaban en las raíces 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 se colorean en amarillo y altos niveles en rojo [140]. Se observó que ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 se expresan en células meristemáticas y células de la zona de elongación y a su vez ARF7 se expresa en pelos radicales (**Fig. 1.12R.A**). Se hipotetizó que estos ARFs serían capaces de afectar la diferenciación celular, y para definir el destino celular es necesario que los factores requeridos ya estén expresados en la célula. 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 de las bases se utilizaron líneas reporteras de los diferentes ARFs. Esta son plantas transgénicas

individuales en *background* Wt Col-0 transformadas con las siguientes construcciones: *promotorARF5::SV40-3xGFP*, *promotorARF5::GUS-GFP*, *promotorARF7::SV40-3xGFP*, *promotorARF8::SV40-3xGFP* y *promotorARF19::SV40-3xGFP* (Wt Col-0/ *pARF5::SV40-3xGFP*, *pARF5::GUS-GFP*, *pARF7::SV40-3xGFP*, *pARF8::SV40-3xGFP* y *pARF19::SV40-3xGFP*) [141] (**Tabla 2M**). Estas construcciones reporteras fueron generadas mediante la fusión de 2000pb (con respecto al inicio de la transcripción) de la región promotora de los diferentes *ARFs* fusionada al reportero SV40-3xGFP [141]. SV40 genera un señal de localización nuclear y se encuentra fusionada a 3 proteínas GFP concatenadas generando una amplificación de la señal [141]. Esto permite detectar señales intensas de fluorescencia en los núcleos celulares que pueden ser asignadas a células individuales [141]. Mediante el uso de estas líneas y microscopía (de campo claro para analizar GUS y microscopía confocal para observar aquellas líneas que poseen GFP) se determinó en qué células se expresaban estos factores. Se pudo ver que los datos experimentales coinciden con la información obtenida en la base de datos de expresión (**Fig. 1.12R.B**). ARF5 mostró niveles bajos de transcripción en pelos radicales mediante la técnica de GUS pero no mostró señal de GFP detectable en este tipo celular (**Fig. 1.12R.B**). Además, ARF5 se expresaría en células meristemáticas, ARF7 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 de la epidermis de la zona de elongación de la raíz (**Fig. 1.12R.B**).

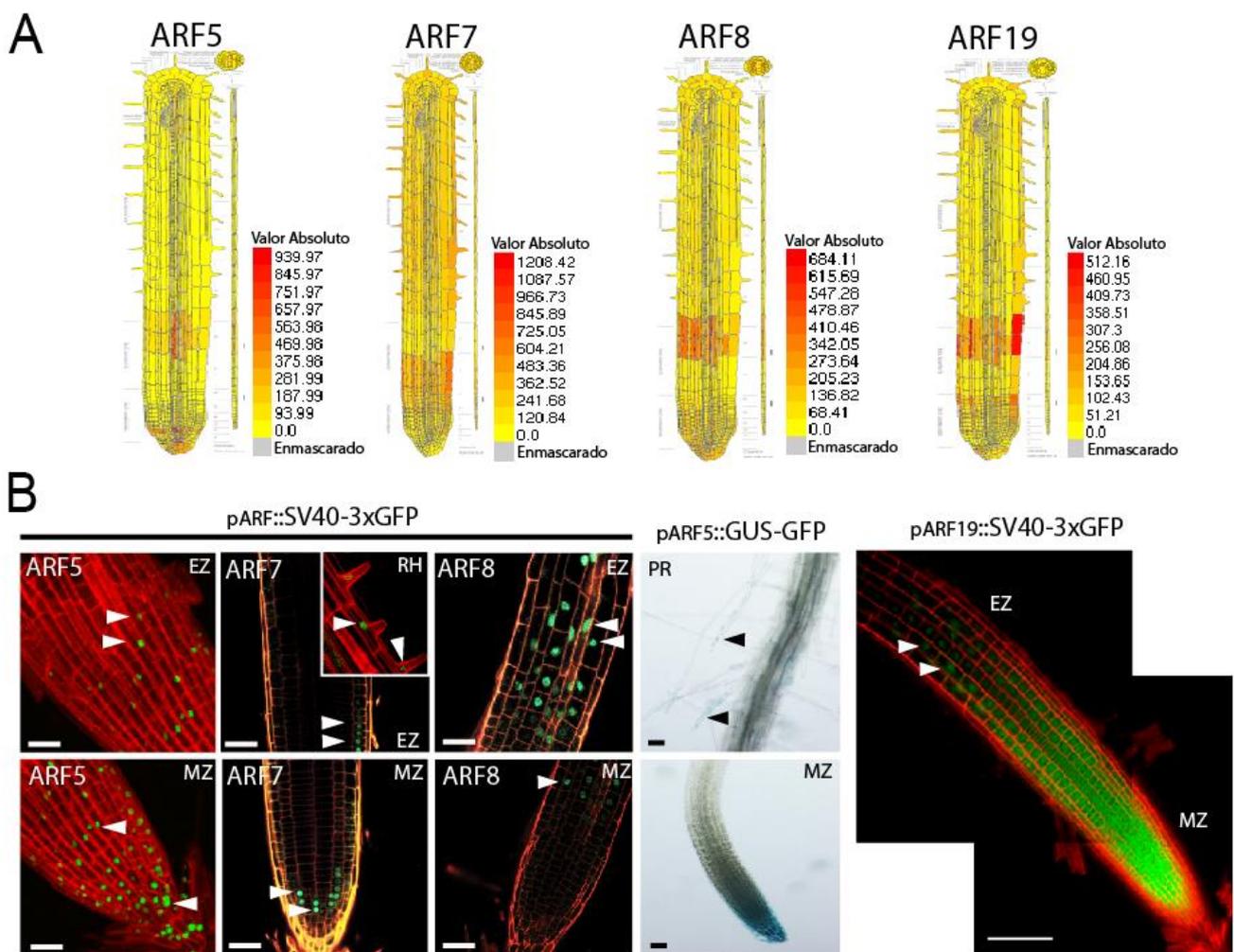


Figura 1.12R: Niveles de expresión de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 en células de la raíz. (A) Niveles de expresión absolutos de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19 según *EFP Browser Toronto (Absolute mode)*. Los niveles se encuentran representados mediante colores en donde el rojo es el valor máximo y amarillo es el mínimo. **(B)** Patrones de expresión de ARF5, ARF7,

ARF8 y ARF19 en las zonas meristemáticas (MZ), en la zona de elongación de la raíz 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 indican la expresión de GFP y las flechas negras indican la expresión de GUS. Barra de escala= 100µm.

Dada la alta redundancia funcional que mostró el análisis de mutantes para varios de estos ARFs [117], 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 se realizó con la finalidad de determinar si niveles de expresión elevados en pelos radicales de estos ARFs podrían promover el crecimiento de los mismos. Mediante qPCR se detectó niveles aumentados de transcritos de cada uno de los ARFs sobre-expresados en cada línea en comparación al control (Wt Col-0/*p7::GFP*) (**Fig. 1.13R.B**). Es decir, los niveles de transcritos ARF5 se encontraron aumentados en la línea transgénica Wt Col-0/*p7::ARF5^{OE}*, ARF7 en la línea Wt Col-0/*p7::ARF7^{OE}* y ARF 8 Wt Col-0/*p7::ARF8^{OE}* (**Fig. 1.13R.B**). Todas estas líneas mostraron fenotipo de pelo radical largo en comparación con el control (Wt Col-0/*p7::GFP*) (**Fig. 1.13R.A**), es decir que estos ARFs actuarían como un regulador positivo del crecimiento. Por otro lado, se detectó que los niveles de ROScit se mantienen en etapas muy tardías del desarrollo de los pelos radicales (pelos con longitudes mayores a 700µm) (**Fig. 1.13R.C**). Esto indicaría 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) logrando pelos radicales más largos. Estudios previos muestran que ARF5, ARF7 y ARF19 actuarían como activadores de la transcripción de sus genes blancos [96]. Con la aplicación de qPCR se detectó un aumento significativo en los niveles de transcripción de *RSL4* cuando se sobre-expresa ARF5, ARF7 y ARF8 (**Fig. 1.13R.A**). Se realizó un ensayo de de CHIP-PCR con la finalidad de determinar si ARF5 y posiblemente el resto de los ARFs era capaz de interactuar con el promotor de *RSL4*. Este ensayo se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Hyung-Taeg Cho. Para este, se utilizaron líneas transgénicas transformadas con una construcción de *ARF5* fusionado con *GFP* bajo el control de un promotor inducible por estradiol en el plásmido PMDC7 (Wt Col-0/*PMDC7::ARF5_GFP*) (**Tabla 2M**). Para realizar la PCR se diseñaron cebadores que amplificaban 9 zonas del promotor de *RSL4* numeradas del 1 al 9 determinado por el comienzo de las secuencias estudiadas. 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. En el ensayo de CHIP-PCR se detectaron enriquecidas las zonas 2,4,6,7 y 8 (**Fig. 1.13R.D**). Con estos ensayos se demostró que ARF5 sería capaz de interactuar con el promotor de *RSL4* y que esta interacción se reflejaría en un aumento en la transcripción del gen *RSL4*. Debido a que tanto *RSL4* como *RSL2* mostraron estar involucradas en el crecimiento polarizado surge la pregunta si los ARFs son capaces de regular a *RSL2*. Estudios previos muestran que la presencia de auxina inhibe la transcripción de *RSL2* [3] pero no hay estudios que muestren si los ARFs son capaces de interactuar con la región promotora de *RSL2* y como esta interacción afectaría su transcripción.

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 *RSL4* es capaz de unirse y activar la transcripción de *NOXC* y *NOXJ* (**Fig. 1.13R.E**). Finalmente, estas NOXs son las responsables de la producción de anión O_2^- que contribuye mayoritariamente a la homeostasis de ROScit necesaria para el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

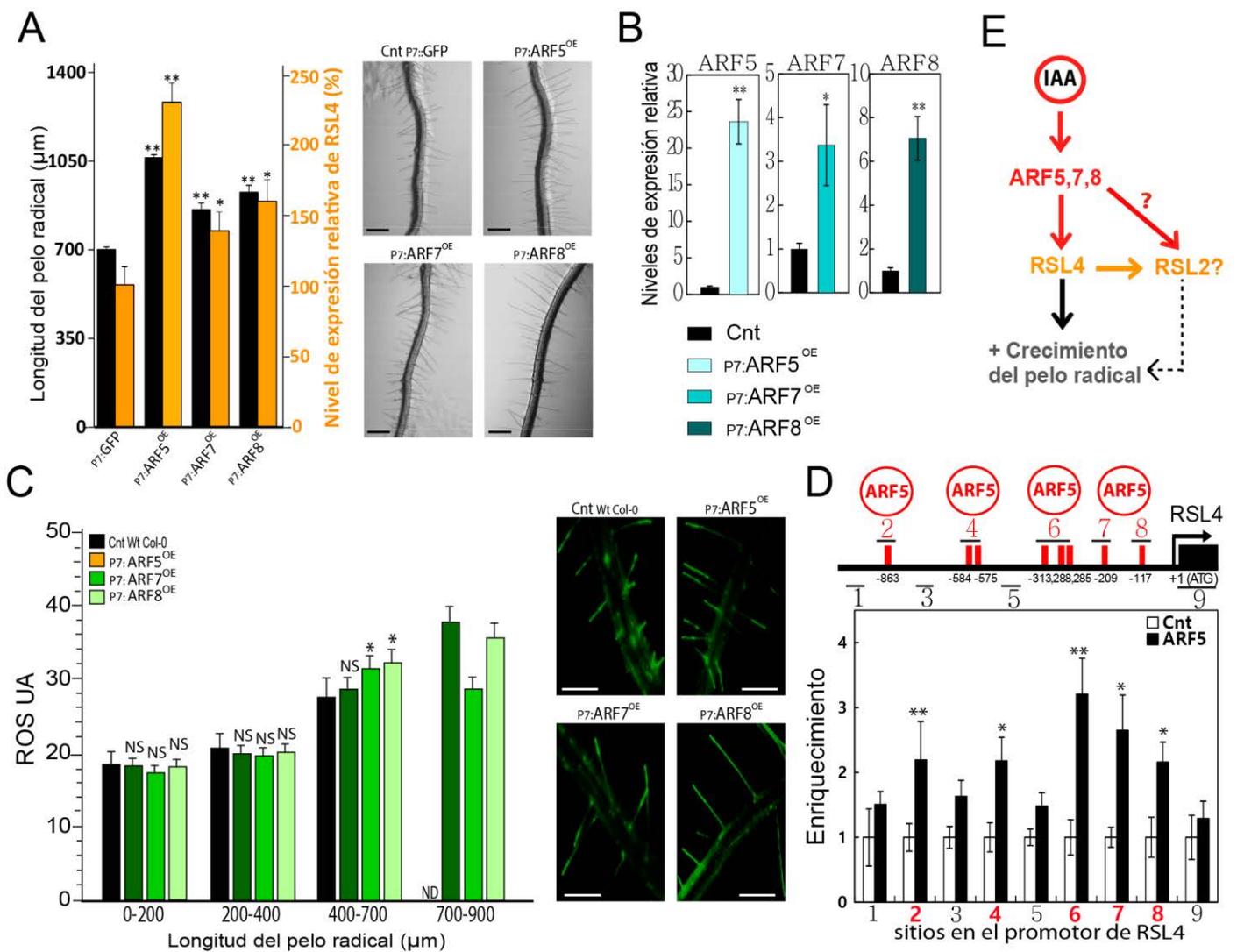


Figura 1.13R: Activación de la transcripción de RSL4 mediada por los ARFs. (A) En negro: análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas transgénicas que sobre-expresan ARF5 o ARF7 o ARF8 bajo el control del promotor fuerte de *EXP7* y como control plantas con expresión de GFP (*p7::GFP*, *p7::ARF5^{OE}*, *p7::ARF7^{OE}*, *p7::ARF8^{OE}*) (media ± s.e.m., n=40). NS= diferencia No Significativa. *P-value* de *one-way anova*, (**) *P*<0.001, (*) *P*<0.01. En Naranja: Niveles de transcritos de *RSL4* detectados por qPCR en plantas Control (*p7::GFP*) y en plantas transgénicas (*p7::ARF5^{OE}*, *p7::ARF7^{OE}*, *p7::ARF8^{OE}*) (media ± s.e.m, n=2). A la derecha, fenotipo de pelo radical de plantas Wt Col-0 y de las plantas transgénicas (*p7::ARF5^{OE}*, *p7::ARF7^{OE}*, *p7::ARF8^{OE}*). Barra de escala: 900 µm. (C) Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante la oxidación de la sonda H₂DCF-DA en los diferentes estadios del desarrollo de los pelos radicales (longitudes comprendidas entre 0-200µm, 200-400µm, 400-700µm y 700-900µm) 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 Wt Col-0 y de plantas transgénicas (*p7::ARF5^{OE}*, *p7::ARF7^{OE}*, *p7::ARF8^{OE}*). Barra de escala: 300 µm. (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 la línea control y en aquella con transformada con la construcción *p_{MDC7}::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.

Debido a que se observó una reversión del fenotipo de la mutante *rs14-1* con una recuperación de los niveles de ROScit cuando se creció la mutante en un medio que contenía 100nM de IAA, se analizó el promotor del gen *NOXC* con el fin de buscar secuencias Aux-RE. La reversión de *rs14-1* con IAA podría ser por la directa unión de los ARFs al promotor de *NOXC* con la consecuente activación de la transcripción. Se encontraron 4 posibles sitios Aux-RE en el promotor de *NOXC* (**Tabla 1.3R**), por lo que probablemente la regulación de la transcripción de este podría ser regulada también por los ARFs. Estudios posteriores de CHIP-PCR y análisis de transcritos por qPCR son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Posición desde el codón de inicio de la transcripción.	Secuencia	Dirección
-342	TGTCGA	<i>Reverse</i>
-517	TGTCGT	<i>Forward</i>
-1245	TGTCTC	<i>Forward</i>
-2417	TGTCGA	<i>Forward</i>

Tabla 1.3R: Elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) en la región regulatoria del gen de *NOXC*. Elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) en las regiones regulatorias río arriba del inicio de la transcripción del gen de *NOXC*.

1.5 Interrelación entre H₂O₂ y Ca²⁺ en respuesta a estímulos intracelulares y extracelulares mediante el uso de Biocensores.

Con la finalidad de determinar la interrelación entre H₂O₂ y Ca²⁺ en respuesta a diferentes estímulos intracelulares (auxinas) y extracelulares como fosfato inorgánico (Pi) se realizaron diferentes experimentos utilizando principalmente plantas que expresaban los biocensores YC3.6 o *Hyper*.

1.5.a Señal intracelular: auxina.

Como se analizó previamente, las auxinas son hormonas de plantas que estimulan el crecimiento de los pelos radicales entre otros efectos. Cuando se crecieron plantas Wt Col-0 en un medio que contenía 100nM de IAA, la longitud máxima alcanzada por los pelos radicales aumentó junto con los niveles de ROScit (**Fig. 1.9R**). Además, se determinó que la maquinaria de producción y mantenimiento de ROS seguiría encendida en estadios tardíos del desarrollo de los pelos (pelos de longitudes mayores que los alcanzados en plantas Wt Col-0) manteniendo el crecimiento activo. Por otro lado, se caracterizó como esta hormona es capaz de regular la transcripción de numerosos genes incluidos los genes *NOXs*.

Se determinó como diferentes concentraciones de IAA (concentraciones entre 100nM y 5µM) afectan el crecimiento polarizado asociado a la homeostasis de ROS. Con ambas concentraciones se observó los mismos efectos en las plantas: acortamiento de la raíz principal, aumento en el número de raíces laterales y en la longitud de los pelos radicales con un aumento y mantenimiento de ROS en etapas tardías del desarrollo de los pelos radicales, entre otros (**Fig. 1.9R**).

Se realizaron ensayos para conocer como la célula coordina la señal de H₂O₂cit y Ca²⁺cit en respuesta a la presencia de la hormona en períodos prolongados de tiempo (plantas creciendo en un medio con 100nM-5µM de IAA) o en tiempos cortos de incubación de la planta con IAA (agregado *in vivo* de 100nM-5µM de IAA). La finalidad de los experimentos a tiempos cortos fue demostrar si auxinas tenía algún efecto post-traducciona rápido en la célula que modificara los niveles de Ca²⁺cit y H₂O₂cit.

Se determinó que las auxinas no generarían modificaciones en los niveles de ROScit de manera post-traducciona ya que cuando se incubó plantas Wt Col-0 durante 10 minutos con 100nM de IAA no se observó modificaciones en los niveles de ROScit (**Fig. 1.14R.C**). Además, cuando se agregó *in vivo* 1μM de IAA a pelos radicales que expresan Hyper, no se observó ningún cambio en los niveles de H₂O₂cit durante los 10 minutos posteriores al agregado de IAA (**Fig. 1.14R.B**). Por otro lado, se observaron niveles de H₂O₂cit disminuidos en las diferentes etapas del desarrollo de pelos radicales de plantas que expresan *Hyper* crecidas en un medio con 5μM de IAA con respecto a aquellas plantas crecidas en un medio control (**Fig. 1.14R.A**). Por lo que, la incubación con IAA por tiempos cortos no modificaría los niveles de ROScit ni de H₂O₂cit pero si se mantiene la presencia de concentraciones elevadas de IAA en el medio por tiempos prolongados los niveles de H₂O₂cit disminuirían y como se demostró previamente los niveles de ROScit generales aumentarían. Estos últimos resultados muestran la complejidad del sistema, se encontró una situación específica en donde los niveles de H₂O₂cit disminuyen sin afectar el *pool* de ROScit total. Esta diferencia podría deberse a que otras ROS estén aumentadas y que compensen la disminución de H₂O₂cit.

El análisis de Ca²⁺cit en pelos de plantas que expresan el biocensor YC3.6 crecidas en un medio que contenía 5μM de IAA mostró que los niveles de Ca²⁺cit disminuyen en las diferentes etapas del desarrollo de los pelos radicales cuando se los incubaba por tiempos prolongados con IAA (**Fig. 1.14R.D**). Por otro lado, cuando se agregó *in vivo* 1μM de IAA a pelos radicales que expresaban YC3.6 se observó una leve pero significativa disminución en los niveles de Ca²⁺cit (**Fig. 1.14R.E**). Estos resultados indican que la presencia de IAA afectaría los niveles de Ca²⁺cit a largo y a corto plazo, por lo que existiría algún mecanismo independiente de ROScit y H₂O₂cit que regula los niveles de Ca²⁺cit a corto plazo (ya que a corto plazo ni los niveles de ROScit ni de H₂O₂ se ven afectados en presencia de IAA). Posiblemente, la disminución en los niveles de H₂O₂cit a largo plazo sea consecuencia de la disminución en los niveles de Ca²⁺ inicial observada. Además, en estas condiciones la retroalimentación de ROS-Ca²⁺ parece ser mediada exclusivamente por H₂O₂ ya que, como se demostró previamente, en presencia de IAA en el medio de crecimiento de las plantas los niveles de ROScit generales aumentaron (**Fig. 1.9R**). Estos resultados son contradictorios si se tiene en cuenta que la NOXC y la producción de anión O₂⁻ por parte de ésta serían requeridos para que los pelos radicales respondan a IAA. Además, se determinó que la producción de anión O₂⁻ por parte de las NOXs contribuye mayoritariamente a la homeostasis de H₂O₂cit por lo que es probable que la reducción de los niveles de H₂O₂cit se deba a una disminución de la actividad de las NOXs. Por otro lado, la disminución de los niveles de H₂O₂cit quizás sea debido a la activación de sistemas depuradores de ROS. Elevadas concentraciones de ROS son indeseables ya que desencadenarían procesos celulares como apoptosis. Futuros experimentos son necesarios para poder profundizar en estos efectos.

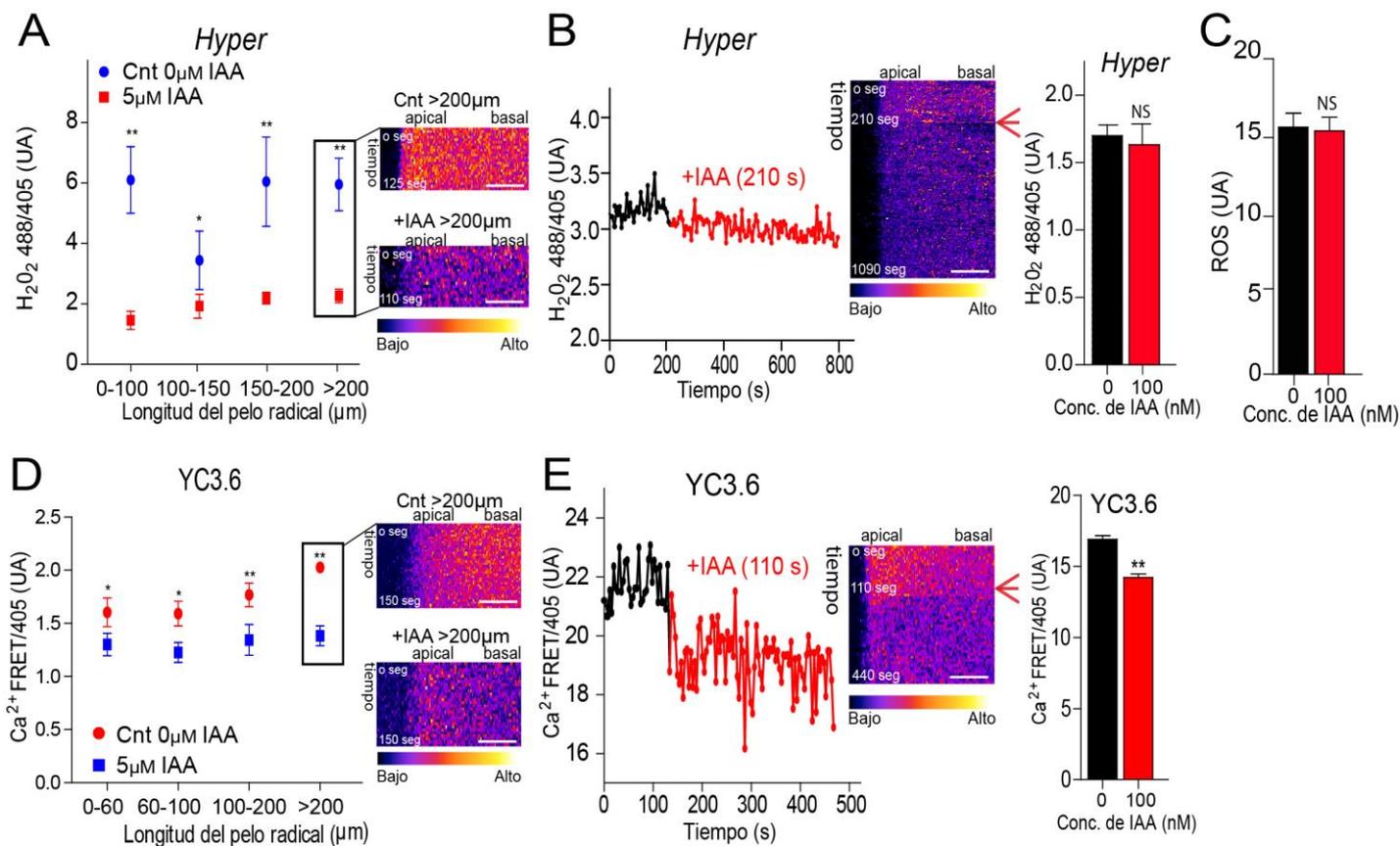


Figura 1.14R: Regulación de los niveles de ROScit, H₂O₂cit y Ca²⁺cit ejercido por IAA. (A) Análisis cuantitativo de los niveles de H₂O₂cit (488/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor *Hyper* crecidas en un medio con o sin 5 μM de IAA (media ± s.e.m., n=8). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. NS= Diferencia No Significativa. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales crecidos con o sin 5 μM de IAA en estadios del crecimiento entre 500-700 μm y mayor a 700 μm. (B) Análisis cuantitativo de los niveles de H₂O₂cit (488/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresa el biocensor *Hyper* tratado con 1 μM de IAA. Se observa el *kymograph*, la flecha indica el momento en el cual se agregó 1 μM de IAA. A la derecha, análisis cuantitativo de los niveles de H₂O₂cit (488/405 UA) en pelos radicales de plantas que expresan el biocensor *Hyper* sin tratar y aquellos tratados durante 10 minutos con 1 μM de IAA. (C) Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante la oxidación de la sonda H₂DCF-DA de pelos radicales de plantas Wt Col-0 sin tratar y de aquellos tratados por 10 minutos con 100 nM de IAA. (media ± s.e.m., n=20). NS= diferencia No Significativa. (D) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor YC3.6 crecidas en un medio control (MS0,5X Agar 0,8%) o en un medio con 5 μM de IAA (media ± s.e.m., n=8). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T-test value* (**)*P*<0.001. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales de longitud mayor a 200 μm crecidos con 5 μM de IAA o no. Escala de colores utilizada: FIRE. UA=Unidades Arbitrarias. (E) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en un pelo radical de Wt Col-0 que expresan el biocensor YC3.6 tratado con 1 μM de IAA. Se observa el *kymograph*, la flecha indica el momento en el cual se agregó 1 μM de IAA. A la derecha, análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en pelos radicales de plantas que expresan el biocensor YC3.6 sin tratar y aquellos tratados durante 10 minutos con 1 μM de IAA.

1.5.b Señal extracelular: Fosfato (Pi).

Para determinar cómo las plantas responden y adaptan su maquinaria de producción de ROS y transporte de Ca²⁺ a la presencia de Pi en el medio se crecieron plantas en un medio Hoogland (mH) con o sin el agregado de 2,5 mM de Pi. El medio Hoogland es un medio de crecimiento de plantas utilizado principalmente para el cultivo de plantas en hidroponía. Este se utilizó para realizar los experimentos de deficiencia de Pi ya que se puede controlar con exactitud la concentración de Pi

agregada en el medio. Por otro lado, un medio MS1X posee mayores cantidades de nutrientes incluido exceso de Pi, por lo que también se utilizó para realizar los experimentos, aunque en este no se puede asegurar que los efectos observados sean exclusivamente debidos al Pi.

Previamente se estableció que la presencia de Pi en el medio de crecimiento de las plantas inhibía el desarrollo de los pelos radicales [121, 123, 124]. Cuando se crecieron plantas Wt Col-0 en un mH con 2,5mM de Pi se observó una disminución de la longitud de los pelos radicales (**Fig. 1.15R.A**). Además, lo mismo fue observado cuando se crecieron plantas Wt Col-0 en un medio MS1X (**Fig. 1.15R.A**). Los niveles de ROS_{cit} en presencia de 2,5mM de Pi no presentaron diferencias significativas en pelos radicales de longitudes menores de 250µm, en etapas posteriores los niveles de ROS_{cit} cayeron drásticamente (**Fig. 1.15R.B**).

Cuando se crecieron plantas que expresan el biocensor *Hyper* en un mH con 2,5mM Pi se observó una disminución en los niveles de H₂O₂_{cit} en pelos mayores a 200µm (**Fig. 1.15R.C**). Por otro lado, mediante el uso del biocensor YC3.6 se determinó que en presencia de 2,5mM de Pi los niveles de Ca²⁺ se ven afectados y estos disminuyen (**Fig. 1.15R.D**). Estos resultados indicarían que la inhibición del crecimiento por la presencia de un exceso de Pi en el medio de crecimiento estaría mediada por una disminución en los niveles de Ca²⁺, ROS_{cit} y H₂O₂_{cit}. No se determinó la causa de la disminución observada ni los factores involucrados en esta regulación. Estudios posteriores son necesarios para determinar si la disminución en los niveles de ROS_{cit} y H₂O₂_{cit} es debido a una inhibición de la actividad de las NOXs mediada por la disminución de Ca²⁺_{cit} o si existe algún tipo de regulación a nivel transcripcional ya que estudios previos muestran que la respuesta de los pelos radicales a la deprivación de Pi es mediada por RSL4 [3, 82]. Además, solo se realizaron experimentos en tiempos prolongados (crecimiento de las plantas en un medio con exceso de Pi) y no se determinó si ocurren modificaciones en los niveles de H₂O₂_{cit} y Ca²⁺_{cit} en tiempos cortos de incubación con Pi.

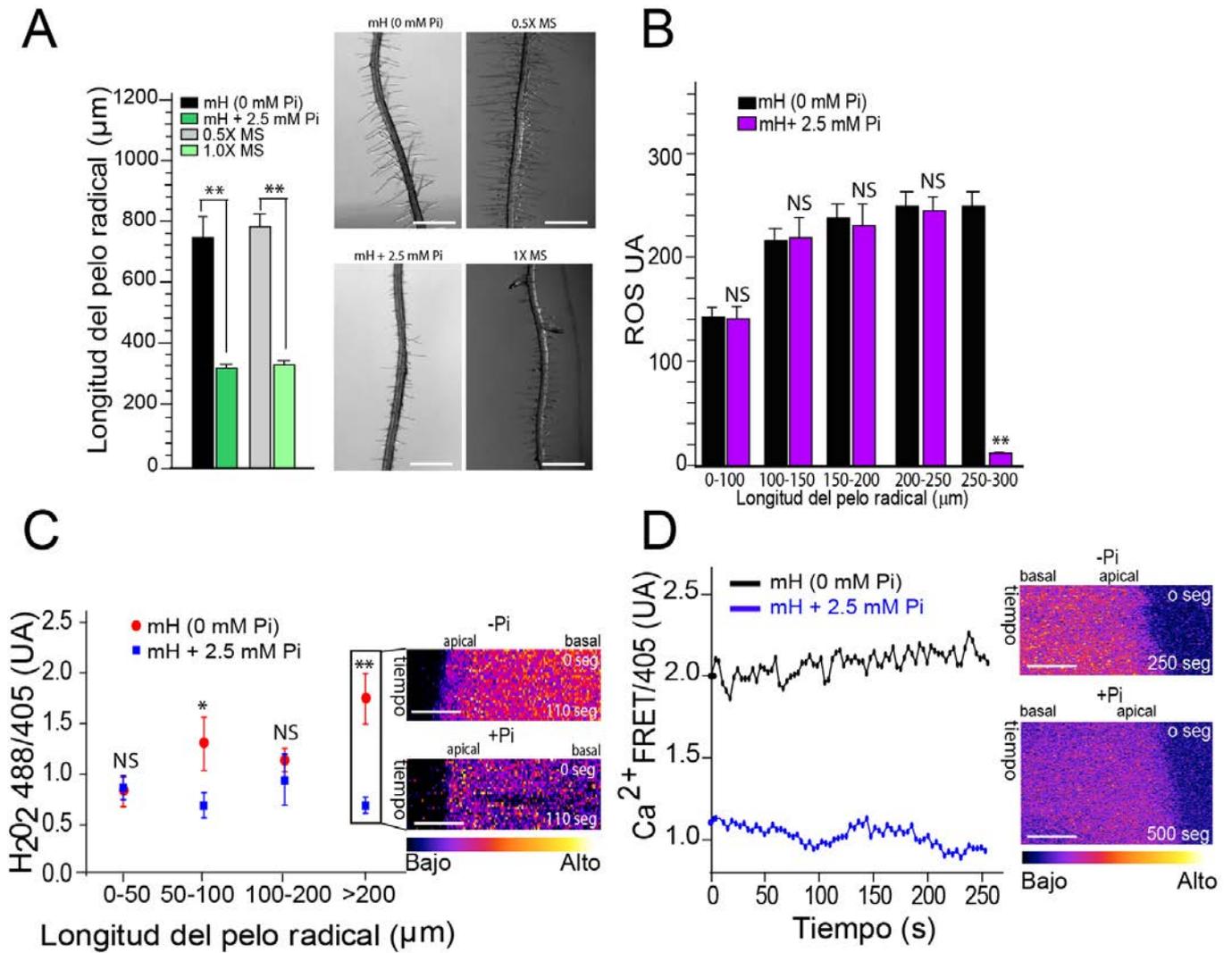


Figura 1.15R: Inhibición del crecimiento polarizado mediado por exceso de Pi. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 crecidas en un medio *Hoogland* (mH) sin y con 2,5mM de Pi, en medio MS0,5X y medio MS1X (media \pm s.e.m., n=40). *P*-value de one-way anova, (**) $P < 0.001$. A la derecha se muestra Fenotipo de pelo radical de plantas Wt Col-0 crecidas en un mH sin y con 2,5mM de Pi, en medio MS0,5X y medio MS1X. Barra de escala: 800 μm . (B) Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante la oxidación de la sonda $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ de diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 crecidas en un mH con o sin 2,5mM de Pi (media \pm s.e.m., n=20). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T*-test value (**) $P < 0.001$. NS= diferencia No Significativa. (C) Análisis cuantitativo de los niveles de H_2O_2 cit (488/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor *Hyper* crecidas en mH con o sin 2,5mM de Pi (media \pm s.e.m., n=7). A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales de longitud mayor a 200 μm crecidos con o sin 2,5mM de Pi. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T*-test value (**) $P < 0.001$, (*) $P < 0.01$. Escala de colores utilizada: *FIRE*. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: 5 μm . (D) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca^{2+} cit (FRET/405 UA) a través del tiempo en pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor YC3.6 crecidas en mH con o sin 2,5mM de Pi. UA=Unidades Arbitrarias. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales crecidos con o sin 2,5mM de Pi. Escala de colores utilizada: *FIRE*. Barra de escala: 5 μm .

1.5.c Integración de señales intracelulares y extracelulares.

Previamente se demostró que altos niveles de Pi en el medio en el cual crecen las plantas inhibe el desarrollo de los pelos radicales y que el agregado de IAA promueve el desarrollo de los mismos. Con la finalidad de determinar como la célula integra estas dos señales se crecieron plantas Wt Col-0 en un mH con 5µM de IAA y 2.5mM de Pi. En estas condiciones de crecimiento se observó un fenotipo intermedio al observado con los tratamientos individuales, se recupera la longitud del Wt Col-0 típica de cuando se crece en un medio sin Pi pero estos no son capaces de seguir elongándose hasta longitudes mayores de 800µm (Fig. 1.16R.A,B). Se observó el mismo comportamiento cuando se crecieron plantas Wt Col-0 en un medio MS1X con 5µM de IAA (Fig. 1.16R.A,B). Estos resultados mostraron que las auxinas lograrían suprimir parcialmente el efecto inhibitorio de la presencia de altos niveles de Pi. Estudios previos demuestran que la respuesta de la planta a Pi es mediada por RSL4 al igual que la respuesta a auxinas [3]. Por otro lado, se demostró que la longitud final alcanzada por el pelo radical depende de la cantidad de RSL4 acumulado, por lo que el fenotipo intermedio observado podría deberse a la regulación de este FT mediada por Pi y auxinas [82]. Estudios posteriores son necesarios para corroborar que la respuesta observada se deba a la regulación directa de RSL4.

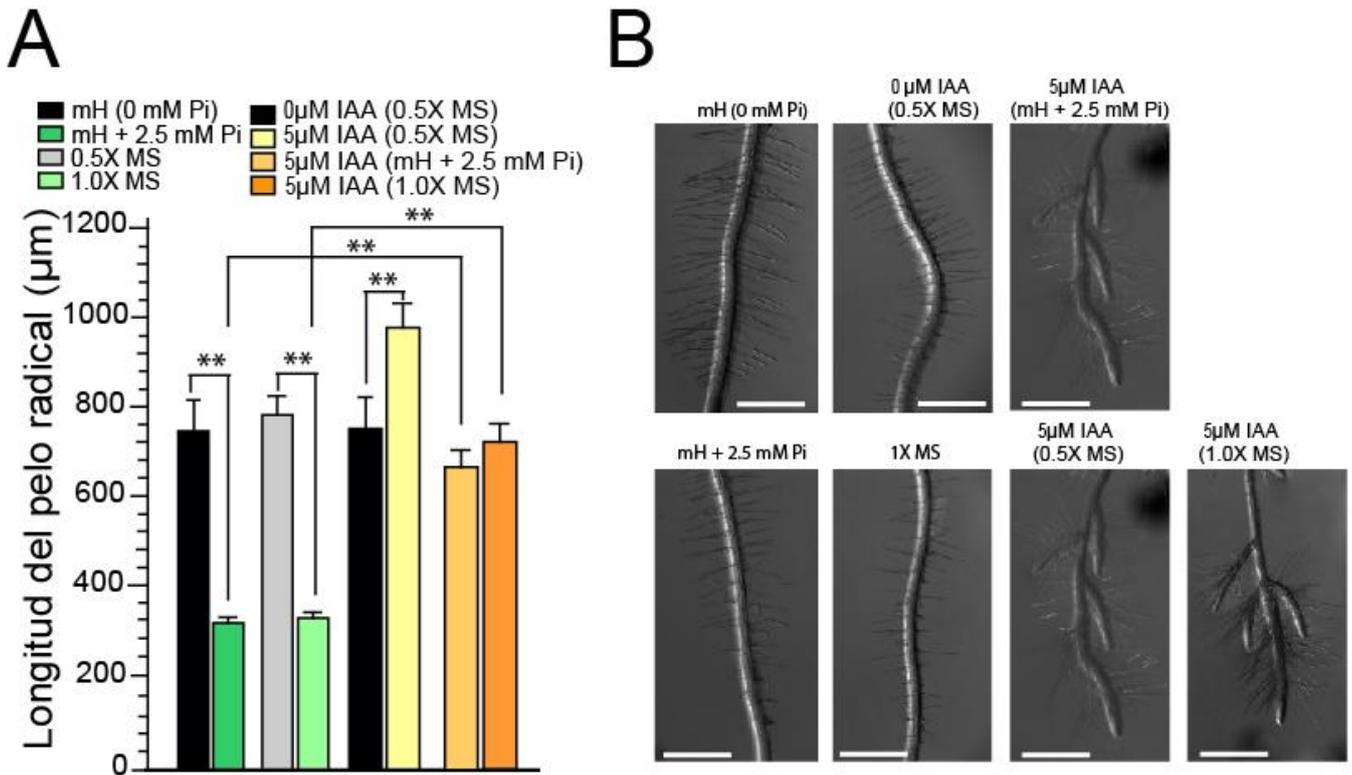


Figura 1.16R: Coordinación de la señal de Pi e IAA en los pelos radicales. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 crecidas en un mH sin y con 2,5mM de Pi, en medio MS0,5X y medio MS1X con el agregado o no de 5µM de IAA (media ± s.e.m., n=40). *P*-value de one-way anova, (**) *P*<0.001. **(B)** Fenotipo de pelo radical de plantas Wt Col-0 crecidas en un mH sin y con 2,5mM de Pi, en medio MS0,5X y medio MS1X con el agregado o no de 5µM de IAA. Barra de escala= 1000µm.

Conclusiones

En esta tesis se estableció que las NOXs están involucradas en mantener la homeostasis de ROS_{cit} durante el crecimiento polarizado y que este afecta los niveles de Ca²⁺_{cit} mediante mecanismos desconocidos (**Fig. 1.17R**). Las enzimas NOXC, NOXH y NOXJ cumplen este rol en los pelos radicales. Estas serían requeridas en diferentes etapas del desarrollo de los pelos radicales, en donde la NOXC actuaría en el inicio del desarrollo de los pelos radicales y la NOXH y NOXJ poseerían funciones redundantes en etapas de elongación posteriores. Además, los ensayos realizados con el inhibidor VAS2870 y la mutante *nox-1* muestran que probablemente niveles muy bajos de ROS sean suficientes para el inicio del desarrollo del pelo radical e incluso quizás ROS_{cit} no sería requerido para esta etapa del desarrollo. Las NOXs producen anión O₂⁻ en el apoplasto celular y éste es transformado espontáneamente a H₂O₂ el cual sería transportado al citoplasma celular por las acuaporinas tipo PIP (**Fig. 1.17R**). Este transporte sería necesario para la activación de los transportadores de Ca²⁺ que contribuyen a la homeostasis de Ca²⁺_{cit}, aunque no se puede descartar la posibilidad de que H₂O₂ y otras especies ROS puedan actuar desde el apoplasto celular (**Fig. 1.17R**).

Por otro lado, se determinó que la NOXC es requerida para mediar la respuesta de los pelos radicales a la hormona auxinas ya que la mutante *nox-1* no es capaz de responder a la presencia de IAA en el medio. Esto no se observó en la doble mutante *noxh-1 noxj-2* ya que en presencia de auxinas esta recupera el crecimiento polarizado y los niveles de ROS_{cit} a niveles comparables a plantas Wt Col-0. Cuando las plantas crecen en un medio con 100nM-5µM de IAA se observa un aumento en la longitud de los pelos radicales con un aumento de ROS_{cit} y la producción de ROS se mantiene en pelos radicales de longitudes mayores a las alcanzadas en la condición control. Cuando las auxinas se encuentran en el medio se liberan numerosos ARFs que son los responsables de la respuesta a la hormona. Se determinó que el promotor de *RSL4* poseía numerosos elementos de respuesta a auxinas (Aux-RE) (**Fig. 1.17R**). ARF5 sería capaz de interactuar con el promotor de *RSL4* y esta interacción estimularía la transcripción de este (**Fig. 1.17R**). La sobre-expresión de ARF7 y ARF8 también mostró estimular la transcripción de *RSL4* por lo que probablemente también sean capaces de interactuar con el promotor de este. Por otro lado, se determinó que *RSL4* es capaz de interactuar con regiones tipo RHE en el promotor de *NOXC* y *NOXJ* (**Fig. 1.17R**). *NOXH* sería regulada por una vía independiente de *RSL4*. No se conoce el rol de *RSL2* dentro de la regulación de los genes *NOXs*. A pesar de que los niveles de transcriptos de la *NOXC* en la mutante *rsl2-1* son normales, cuando se agregó IAA en el medio en donde crecen plantas mutantes de *rsl4-1* el largo y los niveles de ROS_{cit} de los pelos radicales se revierten a niveles de Wt Col-0 por lo que posiblemente cuando IAA está presente puedan regular esta vía otros FT como *RSL2* ya que el doble mutante *rsl4-1 rsl2-1* no es capaz de responder a auxinas. De esta manera, se identificó una conexión molecular entre ROS y la respuesta celular a la hormona auxinas. (**Fig. 1.17R**).

Además de la regulación de las NOXs a nivel de la transcripción de los genes que codifican para estas, la actividad de las NOXs estaría regulada por la unión directa de Ca²⁺ a los sitios *EF-hands* en el extremo N-terminal citoplasmático de la proteína y por la fosforilación del dominio regulatorio por parte de quinasas dependientes de Ca²⁺ estableciendo la relación entre Ca²⁺ y ROS (**Fig. 1.17R**). No se conoce como ROS sería capaz de activar el transporte de iones Ca²⁺ en plantas, pero se especula que podría ser por oxidación y cambio de conformación de los transportadores. Finalmente surge la pregunta que funciones tendría el H₂O₂ en el apoplasto celular y que respuesta desencadenaría río abajo.

Por otro lado, la respuesta de los pelos radicales a señales externas como la privación/exceso de Pi (como así al exceso de nutrientes en general) en el medio de crecimiento estaría mediada por ROS y Ca²⁺.

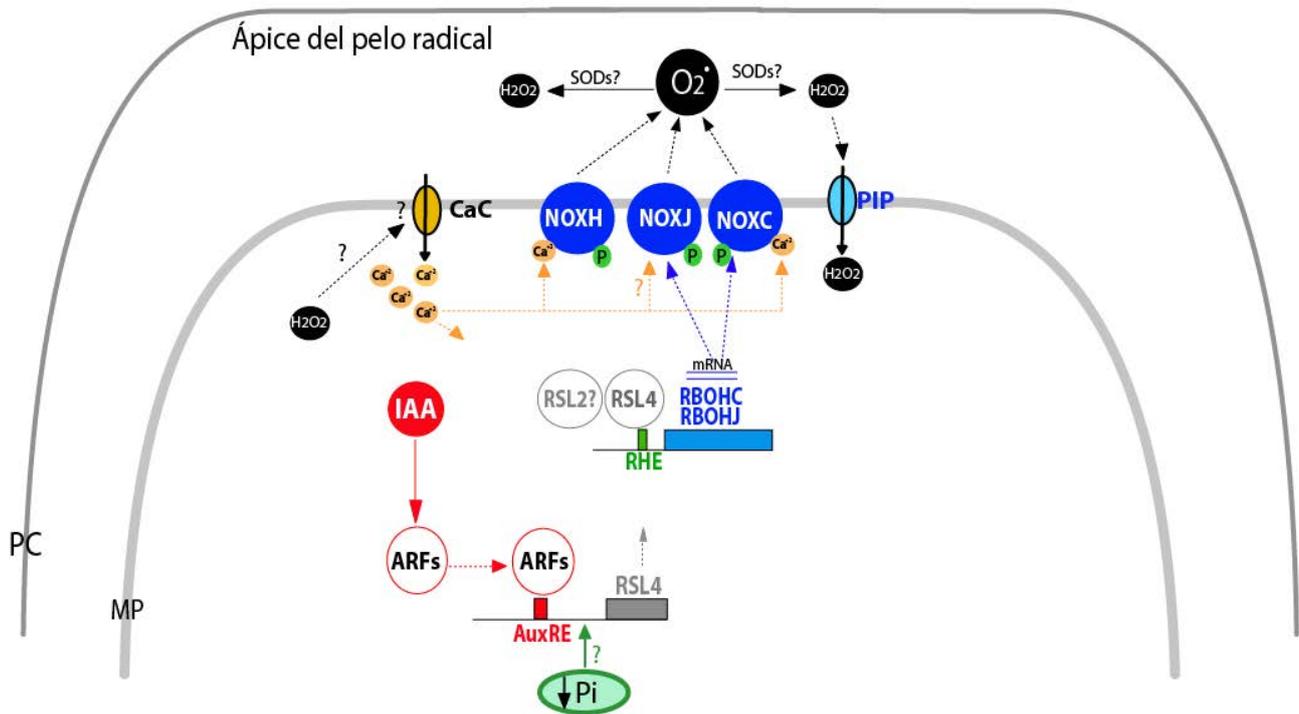
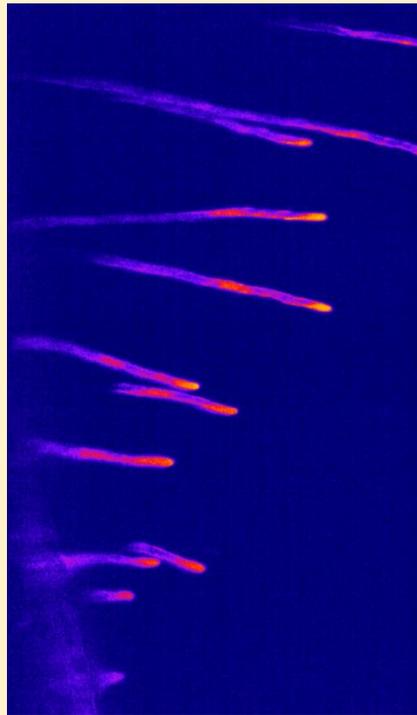


Figura 1.17R: Modelo propuesto de regulación del crecimiento mediado por ROS. Se observa todos los componentes propuestos en la regulación del crecimiento polarizado asociado con la producción de anión O_2^- en el apoplasto por las NOXs, y como este modularía la homeostasis de ROScit, Ca^{2+} cit y la respuesta de la célula a auxinas y Pi. PC=Pared celular. MP=Membrana plasmática.

Capítulo 2

Identificación y caracterización de los transportadores de Ca^{2+} involucrados en la relación ROS- Ca^{2+} y su impacto en el crecimiento polarizado.



Capítulo 2. Identificación y caracterización de los transportadores de Ca^{2+} involucrados en la relación ROS- Ca^{2+} y su impacto en el crecimiento polarizado.

Introducción

El influjo y eflujo de Ca^{2+} a través de las membranas en plantas está estrictamente controlado de manera espacio-temporal [142]. El crecimiento polarizado en pelos radicales y en tubo polínico se caracteriza por un gradiente en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma celular, el cual es más concentrado en el ápice de la célula y disminuye hacia la base de la misma. Por otro lado, las concentraciones de Ca^{2+} cit poseen un comportamiento oscilatorio es decir que se alternan momentos en los cuales las concentraciones son elevadas y otros en los que disminuyen los niveles de Ca^{2+} . El Ca^{2+} es considerado un segundo mensajero y su comportamiento oscilatorio es necesario para coordinar el crecimiento, ya que este regula numerosos procesos fisiológicos como la secreción de componentes celulares [143], participa en la regulación del ensamblaje de los filamentos de actina [144] y regula directa o indirectamente la actividad de numerosas enzimas entre ellas las NOXs [7]. Como se mostró anteriormente las NOXs poseen en el extremo N-terminal sitios regulatorios sitios de unión a Ca^{2+} (*EF-hands*) y sitios de fosforilación mediada por quinasas dependientes de Ca^{2+} .

Los niveles de Ca^{2+} citoplasmático está regulado por numerosos sistemas de transporte que pueden ser clasificados en dos grandes grupos:

1) Aquellos que contribuyen positivamente al gradiente de Ca^{2+} cit. Entre ellos se encuentran aquellos que transportan Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citoplasma de la célula a favor del gradiente de concentración sin gasto de energía (Canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática); y aquellos que liberan Ca^{2+} desde reservorios intracelulares hacia el citoplasma.

2) Aquellos que remueven Ca^{2+} del citoplasma. Estos bombean Ca^{2+} con gasto de energía desde el citoplasma hacia el espacio apoplástico o hacia los sistemas de membrana intracelulares como retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi y vacuola, siendo la Vacuola el principal reservorio intracelular de Ca^{2+} en plantas.

Los sistemas de transporte que contribuyen positivamente a la homeostasis de Ca^{2+} cit pueden ser clasificados dependiendo del modo de activación en:

(a) dependientes de voltaje (VGCs, *Voltage Gated Channels*), entre los cuales se encuentran las ANEXINAS (ANNs, *ANNexins*) y el canal intracelular de dos poros (TPC, *Two Pore Channel*) el cual se encuentra en la membrana de la vacuola,

(b) dependientes de ligando, entre ellos se encuentran los receptores de Glutamato (GLRs, *Glutamate Receptor like*) y los activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs, *Cyclic-Nucleotide Gated Channel*) y,

(c) *activados por estiramiento* o también conocidos como canales mecano sensibles (MSCs, *MechanoSensitive Channels*) [145-147].

La mayoría de estos canales actúan de manera no selectiva y son "permeables a cationes" porque otros cationes también pueden ser transportados (Ejemplo: K^+). Por otro lado, existen numerosos activadores/inhibidores de cada una de las familias de canales previamente mencionadas (**Fig. 2.11**).

Dentro del grupo de transportadores que remueven Ca^{2+} del citoplasma se pueden mencionar: (a) las ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs) y las ATPasas tipo PIIB (ACAs) que se encuentran en las membranas de diferentes compartimientos intracelulares y

(b) los intercambiadores de cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (CAXs) los cuales se encuentran en la membrana plasmática y en tonoplasto (**Fig. 2.11**).

Existen diferentes compuestos farmacológicos que inhiben específicamente las ECAs, ACAs pero no se han descrito aún inhibidores específicos para la los intercambiadores tipo CAXs. (**Fig. 2.11**).

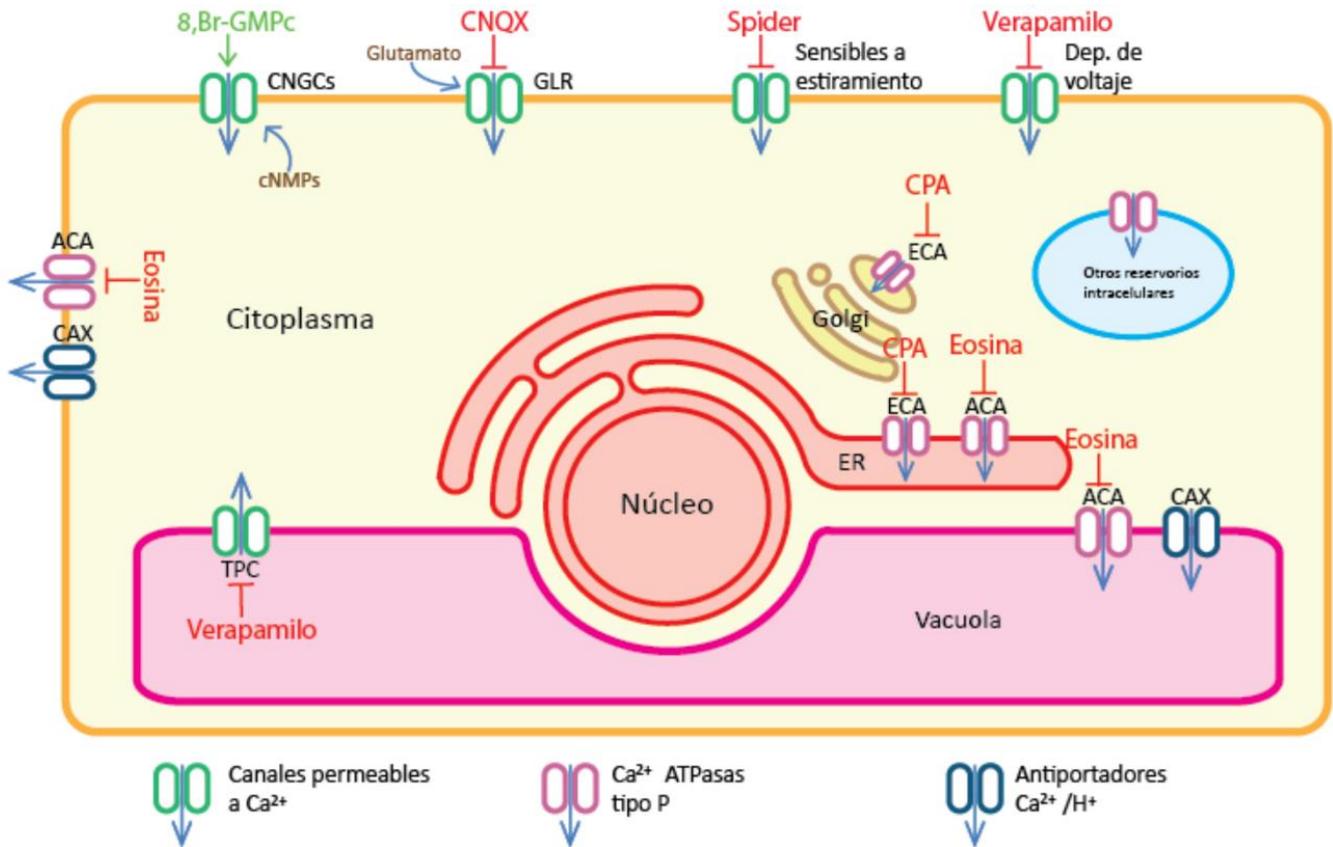


Figura 2.11: Sistemas transportadores de Ca^{2+} identificados en células de *Arabidopsis thaliana*. Las vías de entrada de Ca^{2+} hacia el citoplasma celular identificados hasta el momento son: canales *activados por nucleótidos cíclicos* (CNGC), los cuales son activados por análogos de nucleótidos cíclicos como 8,Br-GMPC; *Receptores de Glutamato* (GLRs), los cuales son inhibidos por CNQX; *Canales sensibles a estiramiento* (MSCs), inhibidos específicamente por GsMTx-4 más conocido como spider; y *Canales dependientes de voltaje* (VGC) inhibidos por Verapamilo, este grupo incluye a TPC en la vacuola [148]. Los transportadores que permiten extraer Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el apoplasto y reservorios intracelulares son las ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs), inhibidas específicamente por CPA; las ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIIB (ACAs) inhibidas por eosina y los intercambiadores de cationes (CAXs). Esquema extraído de Kudla et al. (2010). [148].

2.1 Transportadores de Ca^{2+} que contribuyen positivamente a la homeostasis de Ca^{2+} citoplasmático

2.1.a. Canales de Ca^{2+} dependientes de ligando.

En la membrana plasmática de células vegetales existen dos tipos de canales permeables a Ca^{2+} dependientes de ligando: los canales de Ca^{2+} activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) y los receptores de tipo glutamato (GLRs).

Los CNGCs son canales de Ca^{2+} y su actividad se encuentra regulada por la unión citoplasmática de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC) y/o Guanosin Monofosfato cíclico (GMPC). No existen inhibidores de esta familia de canales, pero es ampliamente utilizado el análogo de GMPC, 8-Br-GMPC como activador de esos canales. Los CNGCs tienen seis dominios transmembrana (TM)

denominados S1-S6, entre el dominio S5 y S6 forman un poro (denominado lazo P) el cual posee un filtro selectivo para el pasaje de Ca^{2+} (**Fig. 2.2I**). Por otro lado, en el extremo C-terminal se encuentran dos dominios regulatorios: un dominio con capacidad de unirse a nucleótidos cíclicos (CNBD, *Ciclid Nucleotide Binding Domain*) y un dominio de unión a CaM (CaMBD, *CalModulin Binding Domain*) (**Fig. 2.2I**). Estos últimos dominios se encuentran superpuestos permitiendo que el propio Ca^{2+} , mediante la unión a CaM, pueda modular la entrada de Ca^{2+} mediada por CNGCs, ya que la unión de CaM- Ca^{2+} al canal provoca la inactivación del mismo. En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado 20 genes que codifican para este tipo de canales CNGCs [146]. CNGC2 codifica a una proteína con actividad de canal de Ca^{2+} y se expresa en el área de las hojas rodeando la zona terminal de las venas menores. Esta, no tiene rol en el desarrollo de la hoja ni en la respuesta de la misma a respuestas hipersensibles pero se demostró que es capaz de mediar el influjo de Ca^{2+} hacia las células de la hoja [149]. CNGC18 es capaz de transportar Ca^{2+} a través de membranas y es fundamental para el correcto crecimiento de los tubos polínicos ya que el mutante *cngc18* mostró un crecimiento polarizado anormal de este tipo celular [150, 151]. Sólo 2 CNGCs se expresan en altos niveles en el pelo radical (CNGC9 y CNGC14). Durante la realización de esta tesis, se demostró que CNGC14 es capaz de transportar Ca^{2+} y que es fundamental para mantener los niveles de Ca^{2+} cit normales en pelos radicales [152]. La mutante *cngc14-1* posee fenotipo de pelo radical corto cuando se crecen las raíces de la planta dentro de un medio *Murashige and Skoog* 0,5X (MS0,5X). Si las plantas crecen sobre el medio en contacto con el aire no muestran ningún fenotipo diferencial con respecto al control (Wt Col-0) [152].

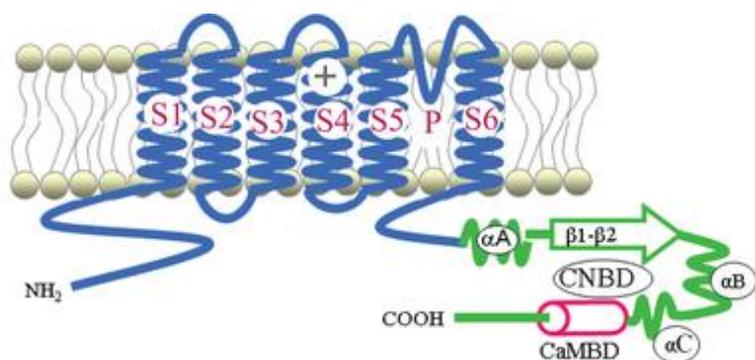


Figura 2.2I: Estructura de los CNGCs en plantas. Se observan 6 dominios TM, el lazo P y en el extremo C-terminal sitios regulatorios, incluido un dominio de unión a nucleótidos cíclicos superpuesto a un sitio de unión a CaM. CNBD: Dominio de unión a CaM. Esquema extraído de Zelman et al. (2012) [153]

Por otro lado, dentro de los canales activados por la unión de un ligando se puede incluir los GLRs. Estos son canales no selectivos de cationes homólogos al receptor ionotrófico de Glutamato en mamíferos. En plantas se hipotetiza que funcionaría como un sensor de aminoácidos [154]. La droga *6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione* (CNQX) ha demostrado ser un antagonista de los canales y ha sido ampliamente utilizada para estudiar estos tipos de canales. Esta bloquea los sitios de unión de glutamato a los GLRs [155, 156].

La estructura de los GLRs muestra 4 dominios TM (M1-M4), en el extremo N-terminal poseen un dominio de unión a ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) y un dominio denominado "amino terminal" (ATD, *Amino Terminal Domain*) (**Fig. 2.3I**). Este dominio ATD es responsable de la interacción entre subunidades, por lo que contribuye en la determinación de la composición final de subunidades del canal [157]. Estos tipos de canales generalmente están formados por 4 subunidades (tetrámeros). Se especula que Gly (Glicina) y Serina (Ser) funcionarían como los mejores agonistas del Glu (Glutamato) el cual al unirse al LBD, abriría el canal permitiendo el pasaje de iones. En células de mamíferos los GLRs conducen Na^{+} , K^{+} y Ca^{2+} en presencia de Glutamato y la selectividad por estos cationes está dada por ciertos aminoácidos orientados hacia el poro del canal que se encuentran en las regiones transmembrana M2 y M3 [154].

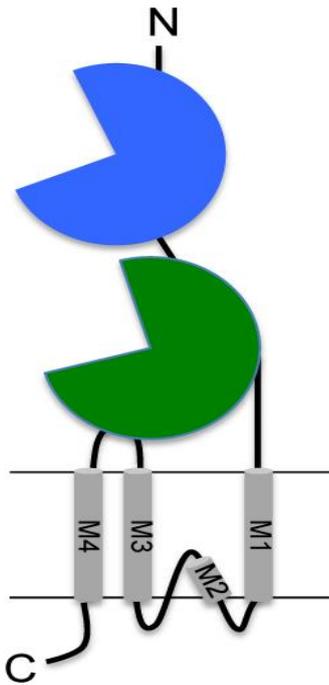


Figura 2.3i: Esquema de la estructura de los GLRs en eucariotas. Se observan 4 dominios TM denominados M1-M4. En verde se muestra el dominio de unión a ligando y en azul se representa el dominio N-terminal (ATD). Esquema extraído y modificado de Price et al. (2012) [154].

En *Arabidopsis thaliana* existen 20 locis correspondientes a estos canales [158]. Por lo menos, 6 de estos se expresan en el grano de polen, como es el caso de AtGLR1.2 y AtGLR3.7 [156]. Estos canales mostraron ser fundamentales para el correcto crecimiento de los tubos polínicos ya que las mutantes con pérdida de función de *glr1.2* y *glr3.7* muestran tubos polínicos más cortos que Wt Col-0, fenotipo similar al que se observa cuando se tratan tubos polínicos con la droga CNQX [156]. Cuando se incubaron tubos polínicos que expresaban el biocensor YC3.6 con 5 mM de D-serina estimulando la actividad de los GLRs, los niveles de Ca^{2+} cit aumentaron rápidamente y se observó una leve extensión del gradiente de Ca^{2+} hacia la base del tubo. Mientras que cuando se agregó 10 mM de D-serina se observó una inhibición del crecimiento polarizado ya que la acumulación de Ca^{2+} se extendió a la zona sub-apical con la consiguiente desaparición del gradiente [156]. En este caso, la inhibición del crecimiento, se induce por un aumento en la concentración de Ca^{2+} cit por encima de los niveles fisiológicos con la consiguiente desaparición del gradiente. Además de tubo polínico, los GLRs están involucrados en otras funciones fisiológicas de la planta como GLR3.1 que demostró tener un rol en el cierre y apertura de los estomas [159]. Los GLRs están también involucrados en el desarrollo de la raíz ya que raíces cortas fueron reportadas para el mutante de arroz *Osglr3.1* [160] y se ha propuesto que los canales heterodiméricos AtGLR3.2/AtGLR3.4 son capaces de modular el desarrollo de raíces laterales mediante la modulación de Ca^{2+} en las células del floema [161]. Aún no se han descrito fenotipos asociados con el inhibidor CNQX ni hay mutantes GLRs que presenten fenotipos de pelo radical anormal.

2.1.b Canales de Ca^{2+} sensibles a estiramiento (MSC).

Los canales sensibles a estiramiento o mecano-sensibles (MSCs, *MechanoSensitive Channels*) forman parte de un mecanismo para percibir y responder a fuerzas mecánicas. Estos canales son capaces de traducir señales como la tensión de la membrana en un influjo de iones. En plantas, los MSCs juegan numerosos roles, como la percepción al contacto, la gravedad y la homeostasis osmótica [162]. Los MSCs son capaces de interactuar con la membrana plasmática y esto es fundamental para responder a cambios de tensión, permitiendo la apertura de poros que se encuentran en el rango de nanoescala. Estos sistemas mecanosensibles pueden adoptar en respuesta a cambios de la tensión en la membrana una variedad de estados conformacionales que determinan su actividad. En plantas estos canales pueden ser homo y heteroméricos y la cantidad de subunidades y las propiedades del

canal varían ampliamente [162]. En *Arabidopsis thaliana* se han descrito tres familias de MSCs: MCAs (*Mid Complementing Activity*), OSCAs (*Osmo-Sensitive and Stretch-Activated Calcium-Permeable Channels*) y los MSL (*MscS-Like*). Los canales dentro de estas familias se encuentran una gran variedad de estructuras, funciones y conductancia de diferentes iones [162]. Estructuras cristalográficas de MSCs de baja conductancia homólogos de los MSL de *Escherichia coli* revelan un canal formado por siete subunidades idénticas. Cada una de ellas posee 3 dominios TM y un gran dominio C-terminal citoplasmático [163].

Estos canales son inhibidos por el péptido GsMTx-4, mejor conocido como *spider* (ya que deriva de un veneno de araña, específicamente de *Grammostola spatulata*) [164]. Este es capaz de unirse a la membrana plasmática y esto es fundamental para su mecanismo de acción [147, 165]. Se han propuesto dos modos generales de acción, uno mediante un efecto físico sobre la membrana [166] y otro más específico sobre los canales propiamente dichos. Está demostrado que este péptido se ubica en la bicapa lipídica cerca del canal y en esta situación posee carga $+5$, afectando a la conductancia a través del canal ya que repele los cationes entrantes como el Ca^{2+} [167].

Los mejores dos ejemplos de canales permeables a Ca^{2+} activados por estiramiento en células de plantas son los osmo-sensibles (OSCA) entre ellos, OSCA1 y CSC1 fueron descubiertos recientemente. En *Arabidopsis thaliana* existen 15 miembros en la familia OSCA y la mayoría de ellos no han sido caracterizados. OSCA1 es un canal no selectivo de cationes permeable a Ca^{2+} activado por señales físicas como hiper-osmolaridad y no es sensible a ROS [168, 169]. CSC1, también llamado como OSCA1.2 ya que pertenece a la familia de canales OSCA y es homólogo a los canales de Ca^{2+} activados por cloruro (CaCCs) [170].

Los miembros de la familia MCA en *Arabidopsis thaliana* fueron identificados en una búsqueda de cADNs que fueran capaces de rescatar el fenotipo observado en los mutantes de *mid1* de *Saccharomyces cerevisiae*, de ahí su nombre [171]. Estudios sugieren que MCA1 y MCA2 poseen diferentes roles en el crecimiento de las plantas. Plantas mutantes nulas de *mca2* mostraron morfología y crecimiento normal, en cambio la mutante de *mca1* y las raíces de la doble mutante *mca1 mca2* tuvieron problemas para penetrar un medio de agar rígido. Por otro lado, la doble mutante mostró un crecimiento retardado cuando se crecen las plantas en un medio con altas concentraciones de Mg^{2+} [172]. Finalmente, se vio que la sobreexpresión de MCA1 en células en cultivo de arroz estimula la producción de ROS por las NOXs [145], lo cual demuestra la interrelación entre los iones Ca^{2+} y ROS.

Los canales MSL fueron identificados basándose en la similitud de estos con los MSCs de *Escherichia coli* de baja conductancia [162]. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificados 10 genes *MSLs*. MSL2 y MSL3 están implicados en el control de la morfología y el tamaño de las organelas [173]. MSL9 y MSL10 se encuentran en la membrana plasmática de células de la raíz. Estos son necesarios para detectar actividad de canales mecano sensibles en protoplasmas derivados de células de la raíz [174]. MSL8 es requerido para mantener un óptimo potencial osmótico de manera de asegurar la integridad celular requerida para guiar la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico [162].

2.1.c Canales activados por voltaje (VGCs)

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* solo se encuentra codificado un gen de canales activados por voltaje (VGCs, *Voltage Gated Channels*) llamado TPC1 (*Two Pore Channel 1*). TPC1 forma un homodímero con dos poros, cada uno de ellos consiste en 6 dominios TM denominados S1-S6, entre el dominio S6 y S7 se encuentra una región conectora entre los poros (**Fig. 2.4I**). La activación de TPC1 requiere tanto de voltaje como de Ca^{2+} citoplasmático, debido a que en la cara citoplasmática posee *EF-hands* que son cruciales para la regulación del canal (**Fig. 2.4I**). La unión de Ca^{2+} a este dominio genera cambios de conformación activando el dominio sensible a voltaje del canal [175].

En *Arabidopsis thaliana* se observó que bajo situaciones de estrés salino, el ápice de las raíces desencadenaba una señal oscilatoria de Ca^{2+} que dependía de la función de TPC1. Este expandía la señal hacia la parte aérea de la planta, sugiriendo que TPC1 es crucial para transmitir señales de Ca^{2+} de larga distancia [176]. A diferencia de mamíferos, en los que TPC1 se expresa tanto en membrana plasmática como en tonoplasto, en plantas, TPC1 se expresa únicamente en el tonoplasto celular [177].

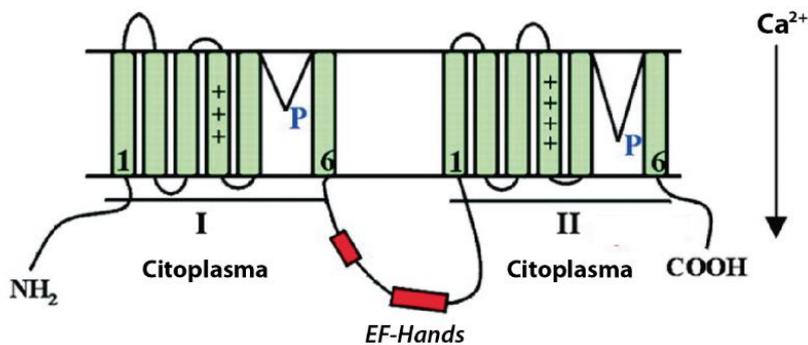


Figura 2.41: Esquema de la estructura de TPC1 en *Arabidopsis thaliana*. Se observan los 6 dominios TM de cada subunidad (1-6), los poros (P) y los sitios de unión a Ca^{2+} (EF-hands). Esquema extraído y modificado de Sanders et al. (2002). [178]

Por otro lado, se ha propuesto a las Anexinas (ANN, *Annexins*) como posibles canales dependientes de voltaje. Estas son fosfo-lipo-proteínas citoplasmáticas capaces de unirse a membranas y de unir Ca^{2+} . Tanto en animales como en plantas tienen una estructura similar. Están compuestas por 4-8 repeticiones homólogas de aproximadamente 70 aminoácidos que contienen motivos conservados de unión a Ca^{2+} y de unión a membranas [179]. En plantas las ANNs están involucradas en las respuestas a estrés y en la tolerancia a drogas. Cuando los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos aumentan, estas se re-localizan en la membrana plasmática y algunas de ellas son capaces de formar canales dependientes de voltaje. En *Arabidopsis thaliana*, la familia de las ANNs está compuesta por ocho miembros (ANN1-8). ANN1 es un transportador permeable a Ca^{2+} sensible a ROS en las raíces, generando una conexión molecular entre ROS y Ca^{2+} citoplasmático [137, 180]. Por otro lado, ANN1 presenta actividad peroxidasa y está demostrado que esta junto a ANN2 y ANN4 están involucrados en la tolerancia de la planta a estrés. Actualmente, no está completamente comprendido el mecanismo molecular por el cual ANN1 es capaz de transportar directamente o indirectamente Ca^{2+} y desencadenar la respuesta mediada por Ca^{2+} en respuesta a ciertos estímulos (ejemplo: ROS).

2.2 Transportadores que remueven Ca^{2+} del citoplasma.

En general, los sistemas que remueven Ca^{2+} del citoplasma realizan cuatro importantes tareas, necesarias para el funcionamiento normal de las células vivas [178]:

1. Mantienen el Ca^{2+} cit al nivel de reposo y ayudan de esta forma a la extinción de señales de Ca^{2+} .
2. Acumulan el Ca^{2+} en compartimentos tales como el RE y la vacuola para liberarlo de forma controlada cuando es requerido.
3. Suplementan Ca^{2+} a organelas específicas que requieren un alto nivel de Ca^{2+} para que se produzcan sus reacciones bioquímicas intraluminales. Por ejemplo, niveles controlados de Ca^{2+} en el lumen del RE son necesarios para el procesamiento adecuado de las proteínas que van a ser secretadas.
4. Aislado el Ca^{2+} , evitan su precipitación con el fosfato inorgánico (Pi) en complejos de baja solubilidad [181].

Es importante remarcar que la vacuola es el mayor depósito de Ca^{2+} intracelular en células vegetales y que estas ocupan un gran volumen dentro de las células (más del 80% del volumen de la célula). El RE es el segundo depósito intracelular de Ca^{2+} más importante en las células vegetales.

Dentro de los transportadores que remueven Ca^{2+} del citoplasma se pueden mencionar las ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs); las ATPasas tipo PIIB (ACAs) y los intercambiadores de cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (CAXs).

2.2.a ATPasas de Ca^{2+}

Las ATPasas de Ca^{2+} son consideradas bombas de Ca^{2+} ya que transportan Ca^{2+} en contra del gradiente de concentración con la energía proveniente de la hidrólisis de ATP. Estas poseen un ciclo catalítico que incluye la utilización de ATP formando un intermediario fosforilado, el desplazamiento vectorial del catión unido y el clivaje final del fosfato de la fosfo-enzima intermediaria [182].

Se puede clasificar a las ATPasas de Ca^{2+} en dos grupos filogenéticos separados: ATPasa tipo IIA (ECAs) y ATPasas tipo PIIB (ACAs, *auto-inhibited Ca^{2+} -ATPasas*) [183] (Fig. 2.5I).

Las ATPasas de Ca^{2+} tienen numerosas funciones en la planta, entre ellas se pueden mencionar: transportar Ca^{2+} hacia los reservorios intracelulares, como RE y vacuola, para ellos actuar como fuentes de la señalización por Ca^{2+} ; modular la señal de Ca^{2+} , proveer Ca^{2+} para el tráfico vesicular y fusión de las mismas; suplementar de Ca^{2+} y posiblemente otros cationes divalentes como Mn^{2+} y Zn^{2+} a organelas para estimular sus reacciones bioquímicas [184].

La estructura de todas las ATPasas de Ca^{2+} es similar. Poseen 10 dominios TM (TM1-TM10), un gran lazo entre los dominios TM4 y TM5 en el cual tienen el sitio de unión a ATP y una Asp que es fosforilada durante el ciclo de reacción (Fig. 2.5I). Además, tienen un lazo pequeño entre TM2 y TM3 que forma parte del dominio responsable de la transmisión de la fuerza (Fig. 2.5I). Tanto ECAs como ACAs contienen los motivos de ATPasas tipo PII incluyendo la secuencia altamente conservada DKTGT (Dominio P) que contiene un residuo de Asp fosforilable, el motivo PEGGL que está considerado jugar un rol central en la transducción de la energía, la secuencia KGAXE que está implicada en la unión a nucleótidos (Dominio N) [185] y el motivo TGES que es parte de un dominio con actividad fosfatasa que tiene la función de desfosforilar el dominio P durante el ciclo catalítico (Dominio A) (Fig. 2.5I) [186]. A nivel estructural, los ACAs se diferencian por poseer un dominio extendido N-terminal que precede a TM1, que contiene un dominio auto-inhibitorio que se solapa parcialmente con un sitio de unión a CaM [185]. Este dominio le confiere a los ACAs propiedades regulatorias únicas ya que la unión de Ca^{2+} -CaM a estas bombas activa el transporte de Ca^{2+} .

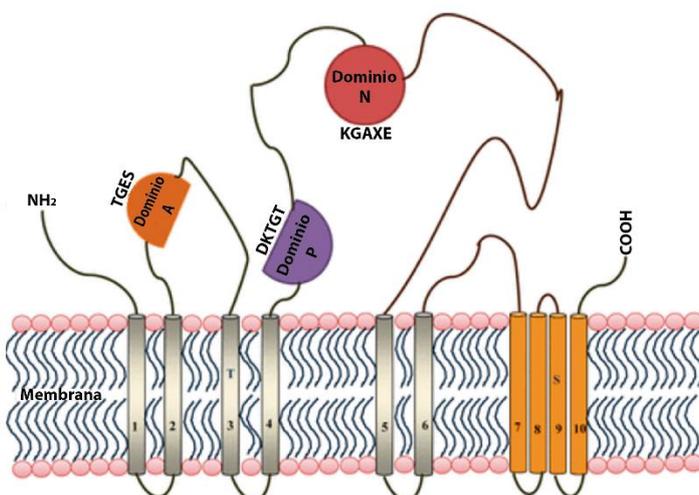


Figura 2.5I: Esquema de la estructura de las ATPasas de Ca^{2+} en plantas. Se observa los 10 dominios TM, el dominio A, N y P y los aminoácidos que caracteriza a cada dominio. Figura extraída y modificada de Huda et al. (2013). [186].

Por otro lado, ECAs y ACAs poseen diferentes afinidades por Ca^{2+} [184] y diferentes especificidades con cationes divalentes. Mientras que ACAs transportan específicamente Ca^{2+} , ECAs pueden transportar Mn^{2+} y Zn^{2+} además de Ca^{2+} [185].

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas 14 ATPasas de Ca^{2+} (4 ECAs y 10 ACAs) (**Fig. 2.6I**) [183].

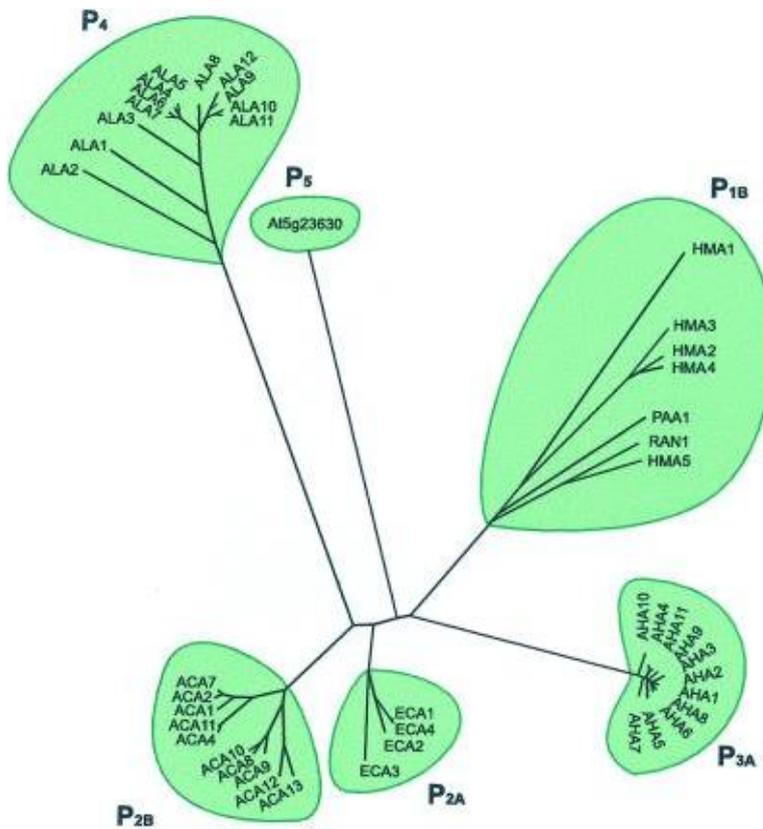


Figura 2.6I: ATPasas en *Arabidopsis thaliana*. Árbol filogenético de las diferentes ATPasas. Se puede observar que los grupos más cercanos son las ATPasas P2A y P2B que corresponden a las ATPasas de Ca^{2+} . También se incluyen las ATPasas tipo P1B (bombas de metales pesados), P3A (Bombas de H^+), P4 (ATPasas implicadas en el *flipping* de aminofosfolípidos) y P5 (especificidad desconocida). Árbol extraído de Axel et al. (2001). [183]

2.2.a.1 ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs)

Las ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs) se caracterizan por su gran homología con la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico de mamíferos SERCA (*SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium transport ATPase*). Este se encuentra en las membranas del RE de los miocitos y posee tres dominios principales: un dominio de fosforilación y de unión a nucleótidos con función regulatoria, un dominio catalítico y un dominio que está involucrado en la transmisión de los cambios de conformación. La afinidad al Ca^{2+} de estas ATPasas de plantas está en el rango de $0,4\text{-}12\mu\text{M}$ [187] y son capaces además de transportar Mn^{2+} [183]. Poseen numerosas localizaciones subcelulares como en RE, Aparato de Golgi y posiblemente en vacuola. Las ECAs son inhibidas de manera específica por el ácido ciclopiazónico (CPA) extraído inicialmente de cultivos de *Penicillium cyclopium*, y no son estimuladas por CaM como las ATPasas tipo PIIIB [188]. CPA inmoviliza una serie de hélices transmembrana involucradas en el transporte de Ca^{2+} [189]. Además, inhibe a las ECAs ya que bloquea el acceso de Ca^{2+} a la ATPasa [189].

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas 4 ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECA1-ECA4). ECA1 y ECA4 son las más relacionados ya que poseen 97% de identidad y se encuentran sólo a 50Kb de distancia en el cromosoma 1, indicando un evento de duplicación. ECA1, ECA2 y ECA4 forman un clúster, ECA3 es el más distante dentro del árbol filogenético de las ATPasas y es la que presenta mayor homología a SERCA (**Fig. 2.6I**) [183]. Ensayos de proteómica muestran que ECA1 y ECA4 se encuentran expresadas en el RE [190] y ECA2 en RE y posiblemente en vacuola [191]. Por otro

lado, experimentos de expresión transiente en *Nicotiana tabacum* demostraron que ECA3 se encuentra en el aparato de Golgi [192]. Estudios posteriores no mostraron concordancia con este resultado ya que ECA3 fusionado con GFP no co-localizaba con marcadores de Golgi [193]. Ensayos de proteómica confirmaron expresión de ECA3 en el aparato de Golgi [194].

Se determinó que la actividad de transporte de ECA1 no es estimulada por CaM y que es insensible a tapsigargina, el cual es un potente inhibidor de ATPasas de Ca²⁺ tipo PIIA de mamíferos [195]. Estudios realizados en sistemas heterólogos (levaduras) demuestran que ECA1 actúa como una bomba de Ca²⁺, regula la homeostasis de Mn²⁺ y que se expresa en las membranas del RE [196]. Por otro lado, mutantes insercionales de *eca1* muestran un descenso en la actividad de bombeo de cationes hacia el RE. A pesar de esto, las mutantes no poseían ninguna diferencia con respecto a plantas Wt Col-0 cuando crecían en un medio estándar. Sin embargo, cuando se crecieron plantas mutantes de *eca1* en un medio pobre en Ca²⁺ y con concentraciones elevadas de Mn²⁺ se observó que estas poseían un fenotipo de pelo radical corto [197].

ECA3 mostró tener un rol crucial en la nutrición y detoxificación de Mn²⁺ en *Arabidopsis thaliana* ya que cuando se crecieron plantas mutantes de *eca3* en un medio sin Mn²⁺ las plantas mostraron un fenotipo clorótico y tanto el crecimiento de la raíz como de los brotes fueron inhibidos en comparación a plantas Wt Col-0. Esto no se observó en las mutantes de *eca2* [192]. Por otro lado, cuando se crecen mutantes de *eca3* en un medio con 3mM de Ca²⁺ se observó una reducción en el crecimiento de la raíz principal. Además, la actividad de ECA3 no puede ser reemplazada por la de ECA1. Cuando se monitoreó la actividad peroxidasa como herramienta para determinar la cantidad de proteínas apoplásticas se observó que las raíces de la mutante *eca3* producían 65% más de proteínas apoplásticas que plantas Wt, sugiriendo que el proceso secretorio se ve afectado en estas mutantes [193].

2.2.a.2 ATPasas de Ca²⁺ tipo PIIB (ACAs)

Las ACAs transportan Ca²⁺ desde el citoplasma hacia el apoplasto celular o hacia los reservorios intracelulares como el RE y vacuola. Estudios bioquímicos muestran que las ACAs son reguladas por un dominio auto-regulatorio (inhibitorio) en el extremo N-terminal. La actividad de la ATPasa es incrementada dos veces por la unión de Ca²⁺-CaM en este dominio. En ausencia de CaM, las ACAs pueden ser activadas por la proteólisis de aminoácidos del extremo N-terminal, se cree que tanto la unión de CaM como la remoción por proteólisis liberan a la ATPasa de su dominio auto-regulatorio [184]. Además, en el extremo N-terminal posee sitios susceptibles a fosforilación por parte de quinasas dependientes de Ca²⁺ (CPKs o CDPKs) y la fosforilación de estos reduce la activación de la ATPasa mediada por CaM [198]. Estas ATPasas se expresan tanto en reservorios intracelulares como vacuola y RE como en la membrana plasmática. Las ACAs se caracterizan por tener gran afinidad por Ca²⁺ (Km=10-15µM) pero poca capacidad de transporte [199]. Las ACAs son particularmente sensibles a la inhibición por derivados de la fluoresceína como eritrosina B o eosina, los cuales se unen al dominio de unión a nucleótidos de la proteína. [185]

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificadas 10 miembros de las bombas ACAs. ACA2 se localiza en la membrana del RE y mostró ser regulada por fosforilación en su extremo N-terminal mediada por CPK1 [200]. ACA9 se ubica en la membrana plasmática de los tubos polínicos y mostró ser esencial para regular el desarrollo del tubo polínico y la fertilización en plantas en floración [201]. ACA13 se expresa en las células de la papilla del estigma y está involucrada en la germinación de los granos de polen y en la fertilización [202]. Se demostró que ACA12 se localiza en la membrana plasmática y la expresión de esta rescata el fenotipo de esterilidad parcial del mutante nulo de *aca9*. A diferencia del resto de los ACAs, la actividad de ACA12 no fue estimulada por CaM [203]. El mutante de *aca10* mostró tener alterado el desarrollo vegetal adulto con una reducción en la elongación de los internodos de las inflorescencias resultando en la formación de manojos florales [204]. Además este fenotipo pudo ser revertido por la sobre-expresión de ACA8, mostrando que

tanto ACA10 como ACA8 poseen actividades relacionadas [204]. Hasta el momento no se han descrito ACAs que estén involucrados en el desarrollo de los pelos radicales.

2.2.b Intercambiadores de cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAXs)

Los intercambiadores de cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAXs, *CA*tion *eX*changers) son proteínas integrales de membrana que para el transporte de Ca^{2+} en dirección opuesta a su gradiente, utilizan el gradiente de H^+ generado a través de la membrana. Este gradiente de H^+ es generado y mantenido por la actividad de la 6-pirofosfatasa (PPiase) y las bombas de protones (H^+ ATPasas). Los CAXs son una familia multigénica que se expresan predominantemente en la membrana de la vacuola [205, 206], aunque también se puede encontrar en la membrana plasmática [207, 208]. Los CAXs intercambian 3 H^+ por 1 molécula de Ca^{2+} y poseen menor afinidad al Ca^{2+} (K_m 10-13 μM) que las ATPasas de Ca^{2+} previamente descritas, pero mayor capacidad de transporte que estas [209].

El primer CAX identificado en plantas que fue clonado y expresado funcionalmente fue CAX1 (*CA*lcium *eX*changer 1) [210]. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran codificados 12 genes que codifican antiportadores relacionados con CAX1 [211]. De estas sólo 4 han sido caracterizadas y solo CAX1 y CAX2 poseen la capacidad confirmada de transportar Ca^{2+} . Mediante la expresión heteróloga de CAX2 de *Arabidopsis* en levaduras y en *Nicotiana tabacum* se determinó que este es capaz de transportar Mn^{2+} además de Ca^{2+} [212]. Hasta ahora, ningún miembro de los CAXs ha sido reportado en pelos radicales. Debido a esto y debido a que no existen inhibidores farmacológicos específicos para esta familia, la caracterización de los CAXs no se incluirán dentro de esta tesis.

Resultados

Identificación de canales transportadores de Ca^{2+} en el crecimiento polarizado de los pelos radiculares utilizando inhibidores farmacológicos.

Como se indicó en la introducción del capítulo 2 se pueden subdividir los sistemas transportadores en dos grandes grupos: aquellos que contribuyen positivamente a los niveles de Ca^{2+} cit y aquellos que remueven Ca^{2+} del citoplasma ya sea hacia fuera de la célula o hacia los reservorios intracelulares. Los canales incluidos dentro del primer grupo permiten el pasaje de Ca^{2+} a favor del gradiente de concentración del ion y no se produce gasto de energía para esto. Dentro de este grupo se encuentran: (a) los canales activados por ligando entre los cuales se incluyen los canales sensibles a nucleótidos cíclicos (CNGCs) y a los receptores de Glutamato (GLRs); (b) los canales sensibles a estiramiento (MSCs); (c) los canales dependientes de voltaje (VGs) que se encuentran en la membrana plasmática pero también permiten la salida de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares como la vacuola hacia el citoplasma.

El segundo grupo remueve Ca^{2+} del citoplasma y esto se produce con gasto de energía. En este se pueden incluir las ATPasas de Ca^{2+} tipo P1A (ECAs) y tipo P1B (ACAs) las cuales se encuentran en numerosas organelas intracelulares y en membrana plasmática. También se encuentran los canales intercambiadores de iones (CAXs) los cuales se expresan en la membrana plasmática y en el tonoplasto celular (**Fig. 2.11**).

Con el fin de determinar qué grupo de proteínas transportadoras de Ca^{2+} son importantes para el mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} y las oscilaciones de este cation en el crecimiento polarizado de los pelos radiculares de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron numerosos tratamientos con inhibidores farmacológicos específicos (**Fig. 2.11**). La utilización de inhibidores farmacológicos es una herramienta sencilla y rápida que permite obtener una aproximación a que familias de transportadores podrían estar involucradas en la generación del gradiente de Ca^{2+} y las oscilaciones típicas del crecimiento polarizado. Por otro lado, presenta numerosas dificultades como inestabilidad y degradación del mismo en las condiciones utilizado, posibles "off targets" en las células, interacción desconocida con compuestos presentes en el medio de crecimiento afectando su actividad, entre otros. Cada inhibidor se colocó en el medio de crecimiento de las plantas y se midió como éste afecta el desarrollo del pelo radical (longitud del pelo radical) y la producción de ROS cit. Luego para aquellas familias de transportadores de Ca^{2+} que resultaran más interesantes se caracterizó la dinámica de Ca^{2+} cit.

2.1 Transportadores de Ca^{2+} que contribuyen positivamente a la homeostasis de Ca^{2+} cit.

2.1.a Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCs).

El inhibidor Verapamilo [(*RS*)-2-(3,4-dimetoxifenil) - 5- [2- (3,4-dimetoxifenil) etil] - (metil) amino - 2- prop- 2- ilpentanenitrilo] bloquea específicamente a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El dominio de unión de este inhibidor está localizado muy cerca del filtro de selectividad de estos canales impidiendo la entrada de Ca^{2+} [213]. Cuando se agregó Verapamilo en concentraciones crecientes (desde 500nM hasta 50 μM) en el medio en donde se crecen plantas Wt Col-0 no se detectó ningún efecto aparente en el desarrollo de los pelos radicales con respecto al Cnt (0 μM Verapamilo) (**Fig. 2.1R.A**). Se observó una disminución de la longitud de los pelos radicales cuando se agregó 50 μM de Verapamilo (**Fig. 2.1R.A**) pero la raíz principal fue notablemente afectada por lo que no se puede asegurar que el fenotipo observado fuese específico de pelos radicales y que no fuese consecuencia del retraso en el desarrollo de la raíz con un consecuente retraso en la aparición de los pelos radicales. A pesar de que los VGCs no parecen intervenir en el crecimiento polarizado de los pelos radicales, se aisló la mutante insercional de *tpc-1*. El gen *TPC1* (At4g03560) es el único homólogo en el genoma de *Arabidopsis thaliana* a los VGCs de mamíferos. Mediante el análisis de bases de datos se observa que su expresión es ubicua en toda la planta, pero posee niveles elevados en pelo radical (**Fig. 2.1R.B**). La mutante insercional *tpc1-2* posee pelos radicales de longitud comparable a Wt Col-0 (**Fig. 2.1R.C**). Es importante mencionar que la localización subcelular de TPC1 en mamíferos es membranas plasmáticas y TPC1 en *Arabidopsis thaliana* se encuentra en las membranas de las vacuolas (tonoplasto) por lo que es esperable que posean funciones diferentes. Los resultados analizados indican que TPC1 no sería requerido para el desarrollo normal de los pelos radicales.

Por otro lado, previamente se había publicado que proteínas llamadas ANNEXINAS (ANNs) eran capaces de formar canales a través de las membranas y su actividad era modulada por voltaje y por ROS [137]. Teniendo en cuenta los niveles de expresión de cada una de las ANNs (**Fig. 2.1R.B**) y la disponibilidad de mutantes, se aislaron simples y múltiple mutantes insercionales nulas de *ann* (*ann1*, la doble mutante *ann1 ann2*, *ann1 ann4* y la triple mutante *ann1 ann2 ann4*). En la bibliografía se encuentra reportado que la mutante *ann1* tiene fenotipo de pelo corto [137]. Se midió la longitud de los pelos radicales y no se observó un fenotipo de pelo radical corto en la simple mutante *ann1* y en ninguna de las múltiples mutantes de *ann1 ann2*, *ann1 ann4* y *ann1 ann2 ann4* comparadas con Wt Col-0 (**Fig. 2.1R.C**). Estos resultados confirman los datos obtenidos en los ensayos farmacológicos, en condiciones fisiológicas normales de crecimiento los VGCs no serían requeridos para el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

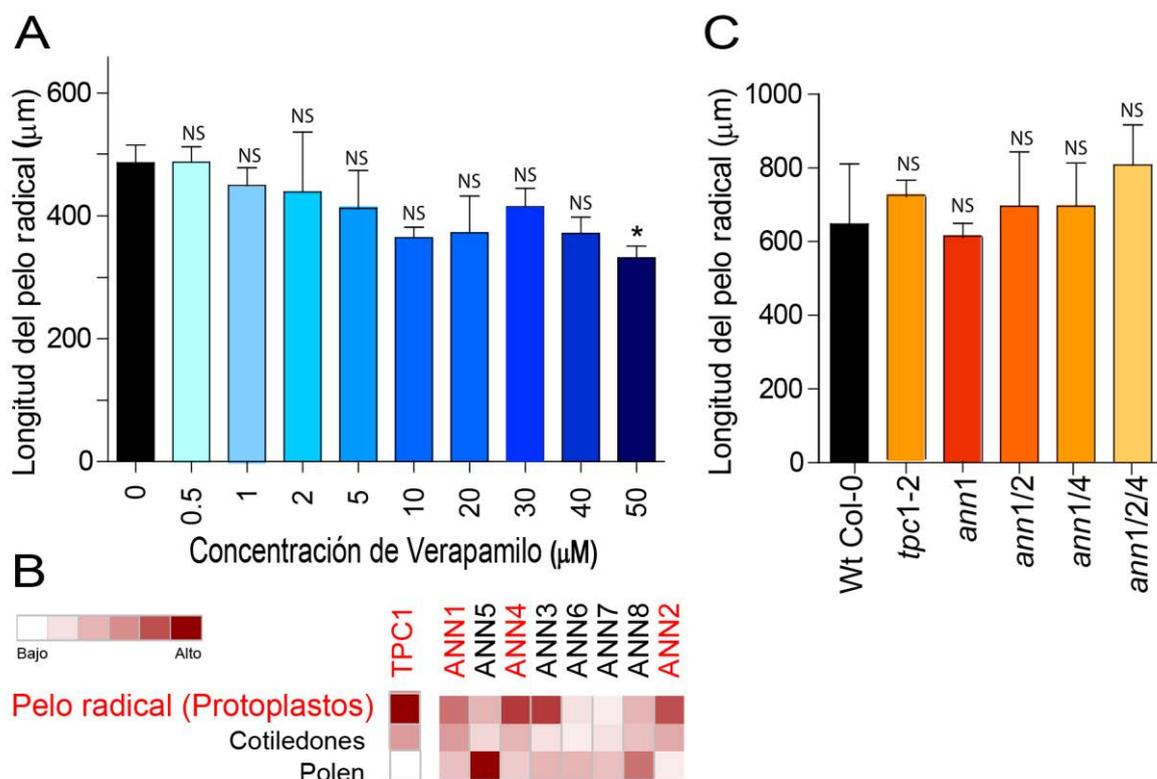


Figura 2.1R: Rol de los VGCs en el crecimiento polarizado. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio concentraciones crecientes de Verapamilo (media \pm s.e.m., n=20) *P*-value de *one-way anova* (*) $P < 0.01$. NS= Diferencia No Significativa. (B) Expresión relativa de los genes de las familias VGCs en *Arabidopsis* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos del *microarray* del programa *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis, Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) son relativos a la expresión máxima de cada gen. (C) Análisis cuantitativo de la longitud de los pelos radicales de los mutantes insercionales simples *tpc1-2*, *ann1* y de los múltiple mutantes *ann1 ann2* (*ann1/2*), *ann1 ann4* (*ann1/4*) y *ann1 ann2 ann4* (*ann1/2/4*) (media \pm s.e.m., n=30). Análisis estadístico: *one-way anova*. NS= Diferencia No Significativa.

2.1.b Canales de Ca^{2+} Mecano-sensibles (MSCs).

Incubando raíces Wt Col-0 de *Arabidopsis thaliana* con concentraciones de 2 μ M y 4 μ M del péptido GsTMx-4 más conocido como *spider* (ya que el mismo es un veneno que se extrae de las arañas) se observó un crecimiento exacerbado de los pelos radicales (Fig. 2.2R.A,C). Estudios previos demuestran que *spider* es capaz de unirse a la membrana plasmática e inhibir específicamente los MSCs (Dutta y Robinson 2004; Suchyna et al. 2004). Este péptido se ubica en la bicapa lipídica cerca del canal y en esta situación posee carga $+5$, afectando a la conductancia a través del canal ya que repele los cationes entrantes como el Ca^{+2} sin afectar el flujo de iones en sentido opuesto (Bowman et al. 2007). El efecto observado cuando se incubaron plantas con *spider* sugiere que los canales MSCs actuarían como reguladores negativos de la expansión celular polarizada en los pelos radiculares. No se observó ningún efecto evidente sobre el largo de raíz total ni de raíces laterales sugiriendo que este es un efecto específico de los pelos radicales. A su vez, el bloqueo de estos canales estimuló directa o indirectamente una mayor producción de ROS (Fig. 2.2R.B,C). Se aislaron mutantes insercionales de T-ADN de diferentes miembros de las familias incluidas dentro de los MSCs (MCA, MSL y OSCA) de acuerdo a los patrones de expresión a nivel transcripcional de los genes de cada familia (obtenidos de *microarreglos* volcados en la base de datos *genevestigator*) (Fig. 2.2R.D) y teniendo en cuenta la disponibilidad de líneas mutantes de T-ADN. No se incluye análisis de niveles de transcripción de MCA2 ya que no hay disponibles *microarreglos* que lo hayan detectado en la

base de datos utilizada. Por otro lado, se analizaron líneas que sobre-expresan MCA1 y MCA2 (MCA1_{OE} y MCA2_{OE}) cedidas por la Dra. Elizabeth Haswell (Departamento de Biología – Universidad de St. Louis). Estas son plantas transgénicas Wt Col-0 transformadas con una construcción que contiene la secuencia de MCAs bajo el control del promotor 35S (Wt Col-0/ 35S::*MCA1*; Wt Col-0/ 35S::*MCA2*) (**Tabla 2M**). Es importante mencionar que cuando los experimentos de fenotipo de los diferentes mutantes y sobre-expresantes fueron realizados no se encontraban disponibles los patrones de expresión a nivel transcripcional de los MSCs. Ninguna de las líneas analizadas mostró algún fenotipo de pelo radical diferencial a Wt Col-0 (**Fig. 2.2R.D**). A pesar de que MSL9 y MSL10 han sido implicados en el transporte de Ca²⁺ desde el apoplasto al citoplasma [174], el doble mutante *msl9-1 msl10-1* poseía una longitud de pelo radical comparable a Wt Col-0 (**Fig. 2.2R.D**), aunque el fenotipo fue inconsistente entre los experimentos realizados, es decir que algunas veces mostraba pelos significativamente más largos que el Wt Col-0 y otras veces no. Debido a esta inconsistencia se decidió no continuar estudiando esta línea en particular. La diferencia entre los datos adquiridos en los experimentos farmacológicos y moleculares puede ser debida a la cantidad de familias y a la redundancia dentro de las mismas de los canales MSCs. Para corroborar esto se deberían realizar cruces entre las mutantes de los canales más expresados en pelos radicales de manera de obtener mutantes múltiples o desarrollar miARNs de manera de disminuir los niveles de transcritos de numerosos MSCs al mismo tiempo. Por otro lado, la inconsistencia se puede deber a la falta de especificidad del inhibidor y que el efecto analizado se deba a efectos secundarios del mismo. Esta línea de investigación se continuará en el laboratorio del Dr. José M. Estevez.

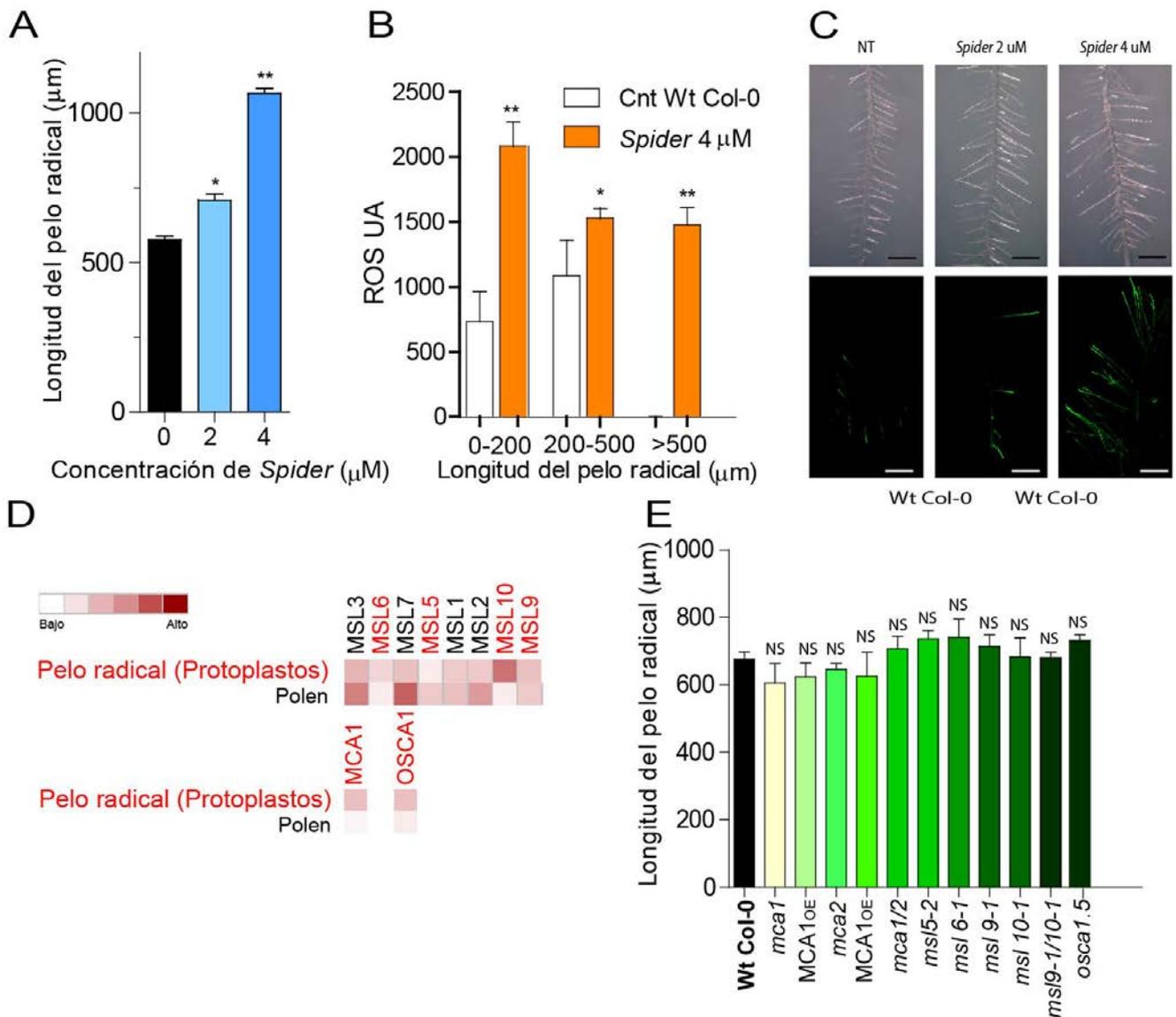


Figura 2.2R: Rol de los MSCs en el crecimiento polarizado. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio concentraciones crecientes del inhibidor *spider* (media \pm s.e.m., n= 15) *P-value* de one-way anova (*) $P < 0.01$ (**) $P < 0.001$. **(B)** Análisis cuantitativo de ROS obtenido mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se le agregó 4 μ M de *spider* en el medio de crecimiento (media \pm s.e.m., n= 15). La comparación estadística se realizó entre pelos que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T-test value* (*) $P < 0.01$ (**) $P < 0.001$ **(C)** Arriba, fenotipo de pelo radical de Wt Col-0 tratadas o no con 4 μ M de *spider*. Barra de escala: 700 μ m. Abajo, señal de ROS generada por la oxidación de H₂DCF-DA en plantas Wt Col-0 tratadas o no con 4 μ M de *spider*. Barra de escala: 600 μ m. NT= No Tratada. **(D)** Expresión relativa de los genes de las familias MSCs en *Arabidopsis* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos del *microarray* del programa *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis, Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) es relativo a la expresión máxima de cada gen. **(E)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de Wt Col-0, simples, múltiples mutantes y sobre- expresantes (MCA1^{OE} y MCA2^{OE}) de los MSCs (media \pm s.e.m., n=20). Análisis estadístico: *one-way anova*. NS= Diferencia No Significativa.

2.1.c Receptores de Glutamato (GLRs).

Los receptores de glutamato (GLRs) son inhibidos específicamente por 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). CNQX actúa con un antagonista del glutamato bloqueando su sitio de unión a los GLRs [156]. Este inhibidor es sensible a la luz por lo que los experimentos fueron realizados en oscuridad con un medio de cultivo de plantas (Agar Chemit 1%) con 1% de sacarosa para incentivar el crecimiento de las raíces de las plantas en estas condiciones. Se incubaron plantas Wt Col-0 con concentraciones crecientes del inhibidor y no se observó efecto aparente sobre los pelos radicales ni en los niveles de ROScit (**Fig. 2.3R.A,B**). Es importante mencionar que los experimentos fueron muy variables, sin resultados consistentes. Se aislaron mutantes insercionales teniendo en cuenta los niveles de transcritos detectados en protoplastos de pelos radicales en estudios de microarreglos (*genevestigator*) y la disponibilidad de las líneas (**Fig. 2.3R.C**). Según la base de datos *genevestigator* *GLR2.1* posee los niveles más altos de transcritos en los pelos radicales, pero lamentablemente, no se pudo aislar mutantes insercionales de *glr2.1*. No se observó fenotipo de pelo radical en los mutantes de *glr2.4*, *glr3.5-1* y *glr3.5-2* en comparación con Wt Col-0 (**Fig. 2.3R.D**). Teniendo en cuenta los experimentos realizados se puede hipotetizar que los GLRs no estarían involucrados en la generación del gradiente de Ca^{2+} necesario para el crecimiento polarizado. Sería necesario realizar estos experimentos con la mutante insercional *glr2.1*.

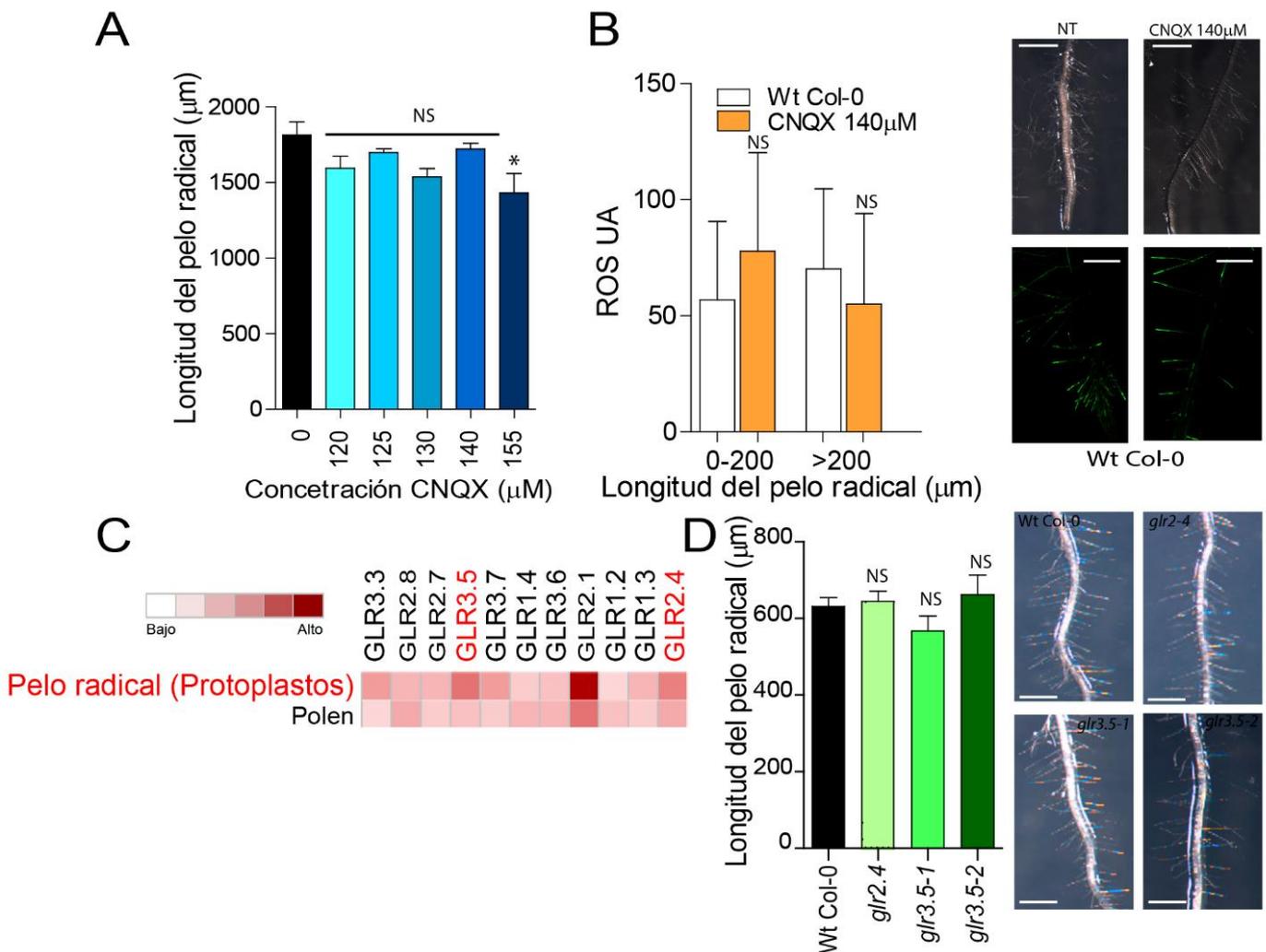


Figura 2.3R: Rol de los GLRs en el crecimiento polarizado. **(A)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio concentraciones crecientes del inhibidor CNQX (media \pm s.e.m., $n = 20$). *P-value* de one-way anova (*) $P < 0.01$. NS= Diferencia No Significativa. **(B)** Análisis cuantitativo de ROS mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se le agregó 140 μ M de CNQX en el medio de crecimiento en pelos radicales de longitudes comprendidas entre 0-200 μ m y mayores a 200 μ m (media \pm s.e.m., $n = 15$). A la derecha arriba, se muestra el fenotipo de pelo radical de plantas Wt Col-0 crecidas en oscuridad con 1% de sacarosa tratadas o no con 140 μ M de CNQX. Barra de escala: 1000 μ m. A la derecha abajo, se muestra la señal de ROS generada por la oxidación de H₂DCF-DA en plantas Wt Col-0 crecidas en oscuridad con 1% de sacarosa tratadas o no con 140 μ M de CNQX. Barra de escala: 1000 μ m. NT= No Tratada. **(C)** Expresión relativa de los genes de la familia GLR en *Arabidopsis* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos del *microarray* del programa *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis, Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) es relativo a la expresión máxima de cada gen. Se muestran únicamente los genes que se expresan en pelo. **(D)** Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 y mutantes insercionales de *glrs*. (media \pm s.e.m., $n = 40$). A la derecha se muestra el fenotipo de pelo radical de plantas Wt Col-0 y simple mutantes de *glrs* (*glr2.4*, *glr3.5-1* y *glr3.5-2*). Barra de escala: 500 μ m.

2.1.d Canales de Ca²⁺activados por nucleótidos cíclicos (CNGC).

No existen inhibidores específicos para los CNGCs pero estos pueden ser activados y estimulados por el análogo de Guanosin Monofosfato cíclico (GMPc) 8,Br-GMPc. Al agregar 8,Br-GMPc en concentraciones crecientes en el medio de cultivo con plantas Wt Col-0, se pudo observar que la activación de estos canales actuó como un inhibidor del crecimiento polarizado. Se observó que a medida que se agregaron concentraciones crecientes de 8, Br-GMPc (50-120µM) en el medio de crecimiento, la longitud de los pelos radicales disminuyó significativamente (**Fig. 2.4R.A,C**). Por lo que se puede hipotetizar que los CNGCs actuarían como reguladores negativos del crecimiento de los pelos radicales. De los veinte genes *CNGCs*, según el análisis de microarreglos volcados en la base de datos *genevestigator*, 9 se expresan en diferentes niveles en el pelo radical. De estos, los que poseen mayores niveles de transcritos son *CNGC14*, *CNGC9* y en menor medida *CNGC6* (**Fig. 2.4R.C**). Se aislaron mutantes insercionales de *cngc9* y *cngc14* y se pudo observar que el segundo posee fenotipo de pelo largo corroborando los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos (**Fig. 2.4R.B,C**). Es importante resaltar que durante la realización de esta tesis doctoral salió publicada la identificación y caracterización del rol de CNGC14 en el crecimiento polarizado de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* [152]. En este trabajo mostraron que CNGC14 es capaz de transportar Ca²⁺ y que es fundamental para mantener los niveles de Ca²⁺cit durante el crecimiento polarizado. Además, vieron que la mutante *cngc14-1* tenía pelos radicales cortos cuando las raíces crecían hacia dentro de un medio MS 0,5X (fenotipo no estudiado en esta tesis). Si las raíces crecían en la superficie del medio, en contacto con el aire no notaron ningún fenotipo diferencial con respecto a Wt Col-0 [152]. Los resultados obtenidos muestran que los CNGCs actuarían regulando el crecimiento polarizado, aunque no queda claro cómo y si esta regulación estimularía o reprimiría el crecimiento polarizado, ya que los resultados obtenidos en esta tesis son diferentes a lo informado en Zhang et al (2017). Esta línea de investigación se continuará en el laboratorio del Dr. José M. Estevez

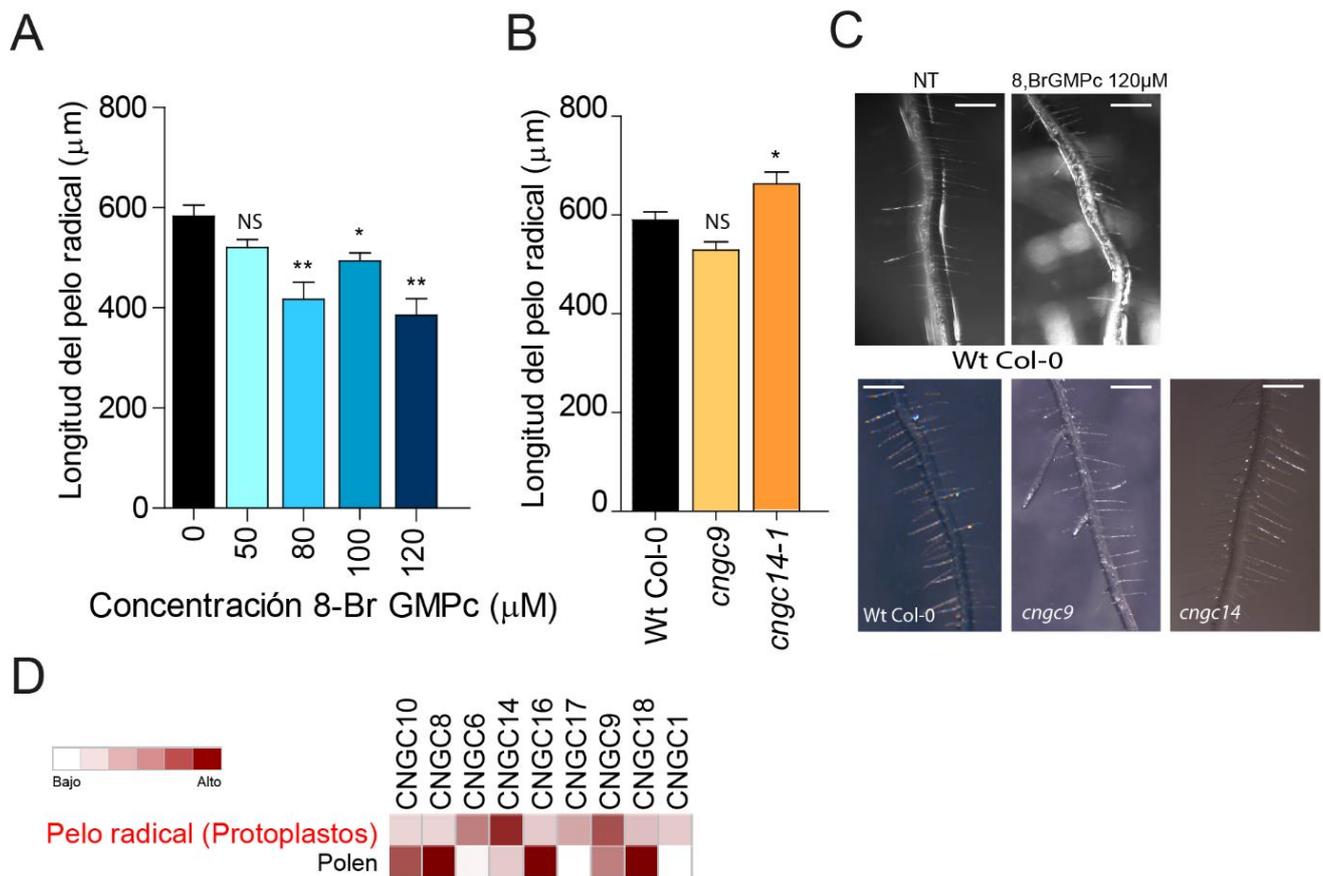


Figura 2.4R: Rol de los CNGCs en el crecimiento polarizado. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio concentraciones crecientes de 8,Br-GMPc (media \pm s.e.m., n= 20) *P-value* de one-way anova (**) $P < 0.001$, (*) $P < 0.01$. NS=Diferencia No Significativa (B) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 y las simples mutantes de *cngc9* y *cngc14-1* (media \pm s.e.m., n= 35). *P-value* de one-way anova (*) $P < 0.01$. NS=Diferencia No Significativa. (C) Arriba, fenotipo de pelo radical de Wt Col-0 tratadas o no con 120 μM de 8,Br-GMPc. Barra de escala: 600 μm . Abajo, fenotipo de pelo radical de Wt Col-0 y de las simples mutantes *cngc9* y *cngc14-1*. Barra de escala: 600 μm (D) Expresión relativa de los genes de la familia CNGC en *Arabidopsis* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos del *microarray* del programa *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis, Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) es relativo a la expresión máxima de cada gen. Se muestran únicamente los genes que se expresan en pelo.

2.2 Canales que remueven Ca^{2+} del citoplasma.

2.2.a ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs).

Las bombas de Ca^{2+} ECAs son inhibidas específicamente por el ácido ciclopiazónico (CPA). Este es una micotoxina originalmente aislada de cultivos de *Penicillium cyclopium* que posee una gran especificidad por ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA. El bolsillo en el cual esta toxina se une a la proteína afectando su actividad se encuentra perfectamente descrito [214] y los aminoácidos involucrados en esto se encuentran conservados en ECA2, ECA3 y posiblemente en el resto de las ECAs (**Anexo 1**). Se encuentra descrito el bolsillo dentro de SERCA (homologo más cercanos en mamíferos a los ECAs) en el cual se adhiere CPA interfiriendo con el pasaje de iones [214]. Al agregar concentraciones crecientes de CPA en el medio en donde se crecen planta Wt Col-0 (5-20 μM) se pudo observar que disminuye la longitud del pelo radical (**Fig. 2.5R.A**). Cuando se agregó una concentración de 20 μM en el medio también se afectó la longitud del largo de la raíz total por lo que la concentración utilizada en los experimentos siguientes fue 10 μM . Los niveles de ROScit en plantas crecidas con 10 μM

(Agar1% + 10 μ M CPA) del inhibidor disminuyeron significativamente con respecto a plantas crecidas en un medio Cnt (Agar 1%+ DMSO) (**Fig. 2.5R.A**). Es importante aclarar que CPA se encuentra disuelto en DMSO por lo que en todos los experimentos el control utilizado posee disuelto en el medio el volumen de DMSO equivalente al volumen de CPA agregado para llegar a una concentración de 10 μ M. Estos resultados muestran que los ECAs están involucrados directa o indirectamente en el crecimiento polarizado y en la regulación de los niveles de ROS. Mediante el análisis de microarreglos (*genevestigator*) se analizó los niveles de transcritos de los diferentes ECAs en protoplastos de pelos radicales. Dentro de esta familia hay 4 candidatos (ECA1-ECA4), los cuales todos poseen altos niveles de transcripción de los pelos radicales y no así en polen (**Fig. 2.5R.C**).

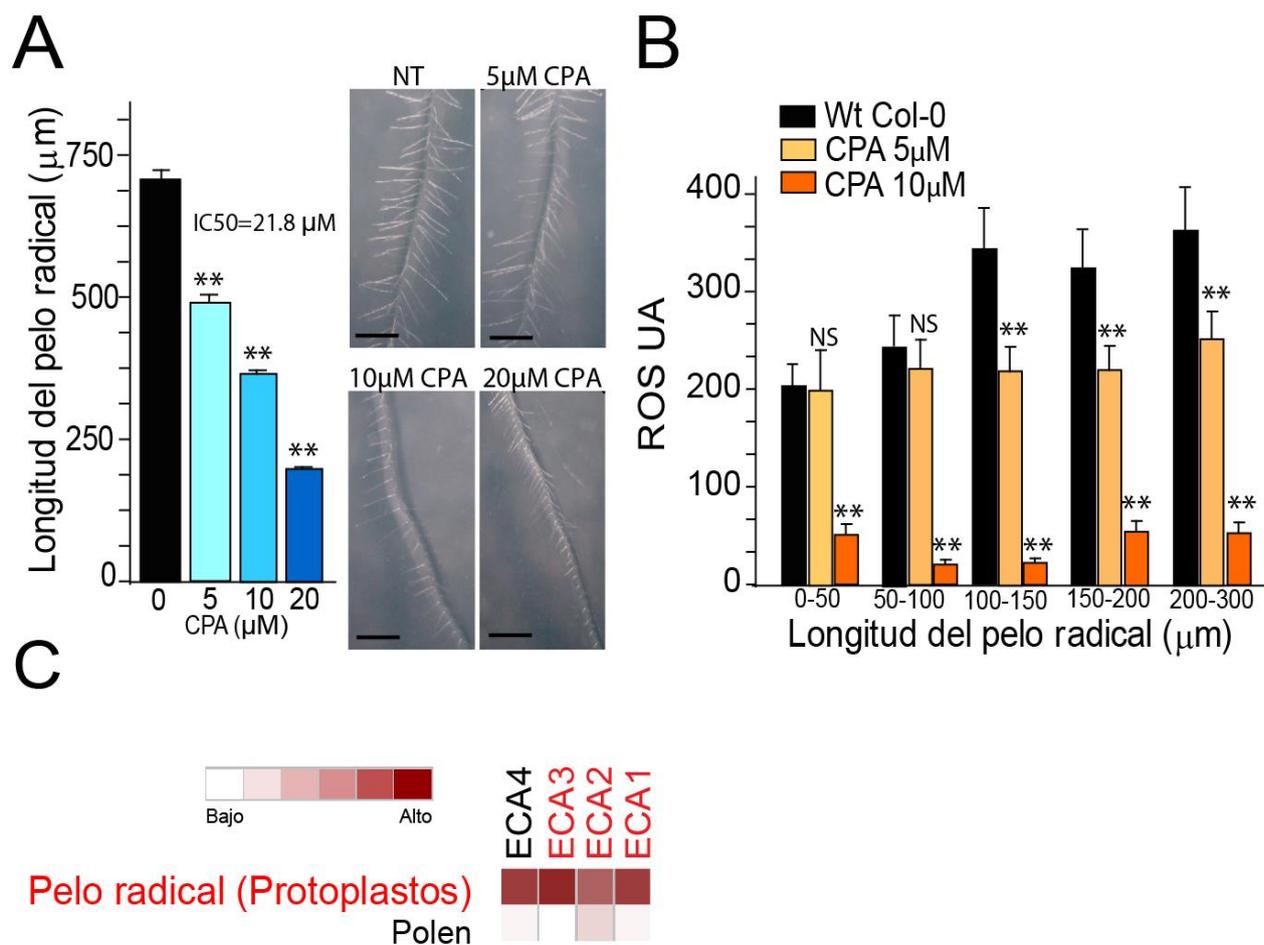


Figura 2.5R: Inhibición del crecimiento polarizado mediado por CPA. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó al medio concentraciones crecientes del inhibidor CPA (media \pm s.e.m., n= 20) *P-value* de one-way anova (**) P <0.001. A la derecha, se muestra el fenotipo de pelo radical de Wt Col-0 tratadas o no con concentraciones crecientes de CPA. Barra de escala: 500 μ m. NT= No Tratada **(B)** Análisis cuantitativo de ROS mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se le agregó 5 μ M y 10 μ M de CPA en el medio de crecimiento (media \pm s.e.m., n= 17). La comparación estadística se realizó entre pelos que se encontraban en el mismo rango de longitudes. *P-value* de one-way anova (**) P <0.001. NS= Diferencia No Significativa. **(C)** Expresión relativa de los genes de la familia ECA en *Arabidopsis* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis*, *Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) son relativos a la expresión máxima de cada gen.

2.2.a.1 Caracterización de los efectos de CPA.

Con el fin de comprender de una manera más profunda de qué manera los ECAs están involucrados en el crecimiento polarizado se realizaron experimentos utilizando plantas que expresan el biocensor YC3.6 en citoplasma (YC3.6) o en el retículo endoplasmático (D4ER-YC3.6) (Ver **sección 6** de materiales y métodos). Esta última línea fue generada y cedida por el Dr. Alex Costa (Departamento de Biociencia, Universidad de Milano). Cuando se agregó 10 μ M de CPA en un pelo radical que expresa YC3.6 analizado *in vivo*, se pudo observar que se acumula Ca²⁺ en las zonas proximales a la vacuola. En este experimento la medición de Ca²⁺ se realizó aproximadamente 30 minutos después de haber colocado 30 μ M CPA (**Fig. 2.6R.A**). La concentración de CPA es superior a la utilizada en experimentos previos (10 μ M), esto es debido a que se buscaba un efecto drástico en un tiempo corto. Por otro lado, se crecieron plantas que expresan YC3.6 en un medio que contiene 10 μ M de CPA durante 5 días y se observó que los niveles citoplasmáticos de Ca²⁺ disminuyeron significativamente comparado con las plantas que crecen en una situación de control, es decir en medio MS0,5X con DMSO (**Fig. 2.6R.B**).

En colaboración con el grupo del Dr. Andrea Bassi (Departamento de física, Politécnico de Milano) y el Dr. Alex Costa (Departamento de Biociencia, Universidad de Milano) se aplicó Microscopía de Iluminación de Plano Único (SPIM, *Selective Plane Illumination Microscopy*) en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan de manera constitutiva el biocensor YC3.6. Esto se realizó con el fin de determinar la velocidad de crecimiento de los pelos radicales y el análisis de la transformada de Fourier de las oscilaciones de la señal de Ca²⁺ obtenida de plantas que expresan el biocensor YC3.6 creciendo en un medio control y en uno que contiene 10 μ M de CPA. La transformada de Fourier es el espectro de frecuencias de una función, esta nos da información de las frecuencias y amplitudes incluidas dentro de la señal de comportamiento oscilatorio (Ver **sección 6.c** de materiales y métodos). Esta metodología fue validada en Candeco et al. (2017) [215]. Debido a que nuestro sistema es un sistema biológico se obtiene una media de frecuencias incluidas en la señal de Ca²⁺ con un error estándar luego del análisis de numerosos pelos radicales. En este caso el tiempo total del experimento fue de 10 minutos. Cuando se crecieron plantas Wt Col-0 que expresan YC3.6 en un medio control (MS 0.5X fitogel 0.5%) se obtuvo una transformada de Fourier con dos componentes principales, uno de baja frecuencia que posiblemente es debido a los movimientos citoplasmáticos de organelas que interfieren con la señal del biocensor (ya que este se encuentra expresado únicamente en citoplasma) y un componente de frecuencias altas con un pico máximo en 0,036 Hz (**Fig. 2.6R.C**). Además, se determinó que en condiciones control los pelos radicales tienen una velocidad de crecimiento de aproximadamente 0,023 μ m/seg (**Fig. 2.6R.C**). Cuando se agregó CPA en el medio de crecimiento, las altas frecuencias desaparecieron y la velocidad de crecimiento disminuyó significativamente a 0,008 μ m/seg (**Fig. 2.6R.C**). No se encontraron diferencias significativas en las oscilaciones de bajas frecuencias (**Fig. 2.6R.C**). Es importante remarcar que en esta técnica no se perturba de ninguna manera a la planta ya que el experimento se realizó *in vivo* mientras la planta crecía en el medio de cultivo. Además de la información sobre las diferencias en las frecuencias, este experimento demostró que para que un pelo radical se pueda desarrollar son imprescindible las frecuencias altas incluidas dentro de las oscilaciones en los niveles de Ca²⁺ en el ápice del pelo radical. Estos resultados demuestran que las ECAs son importantes para mantener el crecimiento polarizado, los niveles y las oscilaciones de Ca²⁺.

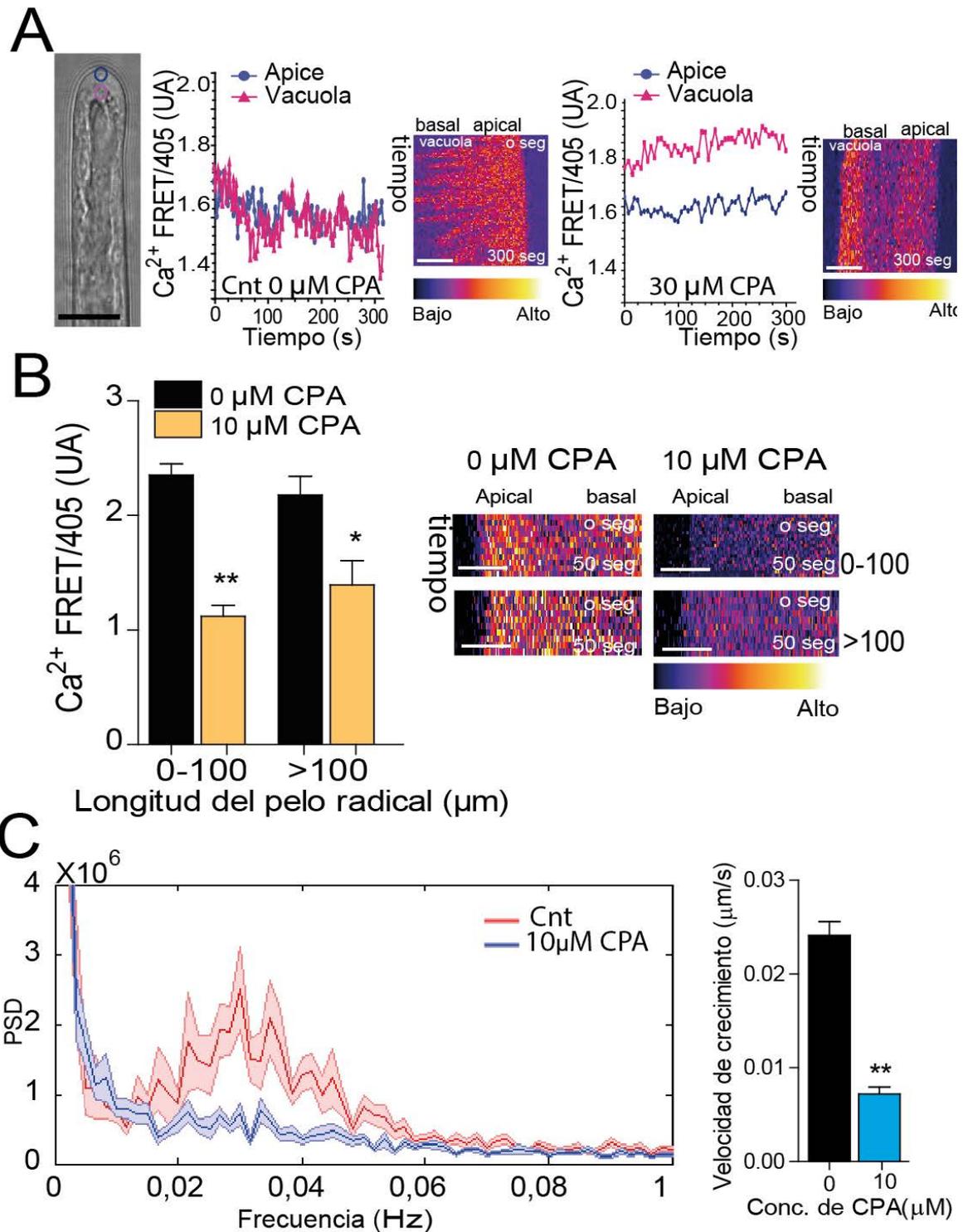


Figura 2.6R: Niveles y oscilaciones de Ca²⁺cit cuando se encuentran inhibidas las ECAs. (A) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en un pelo radical de plantas que expresan el biocensor YC3.6 tratado o no con 30μM de CPA. A la derecha de cada gráfico se observa el *kymograph* de un pelo radical tratado o no con CPA. Escala de colores utilizada: FIRE. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: 7μm. (B) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor YC3.6 crecidas en un medio con o sin el agregado de 10μM de CPA (media ± s.e.m., n=8). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T-test value* (**) P<0.001 (*) P<0.01. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales de longitudes comprendidas entre 0-100μm y longitudes mayores a 100μm crecidas con o sin 10μM de CPA. Escala de colores utilizada: FIRE. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: 5μm. (C) Análisis de Fourier de las oscilaciones de Ca²⁺ extraídas de los ápices de los pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor YC3.6 crecidas en un medio con o sin el agregado de 10μM de CPA (media ± s.e.m., n= 40). A la derecha, análisis cuantitativo de la velocidad de crecimiento de los pelos radicales Wt Col-0 creciendo en un medio con o sin el agregado de 10μM de CPA (media ± s.e.m., n= 40). *T-test value* (**) P<0.001.

Por otro lado, se midió los niveles de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (RE) de los pelos radicales mediante plantas que expresan de manera constitutiva el biocensor D4ER-YC3.6 el cual se expresa específicamente en RE. Este posee la secuencia de aminoácidos KDEL que dirige y retiene al biocensor en el lumen de esta organela. Esta línea fue generada y cedida por el Dr. Alex Costa (Departamento de Biociencia, Universidad de Milano). Cuando se crecen durante 5 días plantas Wt Col-0 que expresan D4ER-YC3.6 en un medio que contiene $10\mu\text{M}$ de CPA se observó una disminución significativa en los niveles de Ca^{2+} dentro del RE en comparación con plantas que crecieron en un medio control (**Fig. 2.7R.A**). Esto demuestra que CPA es capaz de alterar la homeostasis de Ca^{2+} en el RE y posiblemente en otras organelas también. En células vegetales las vacuolas funcionan como un reservorio de Ca^{2+} intracelular pero la homeostasis de Ca^{2+} en RE y aparato de Golgi es importante para numerosos procesos como el plegamiento de proteínas y la secreción celular. Con el fin de poder corroborar si CPA está afectando la secreción celular se utilizaron líneas transgénicas transformadas con una construcción que posee la secuencia codificante para un dominio tipo extensina (versión corta de la construcción, EXT2) y otra codificante para numerosos dominios tipo extensina (versión larga de la construcción, EXT11) fusionadas a la secuencia que codifica para una proteína roja fluorescente (*TOM=TOMATO*) bajo el control del promotor fuerte 35S (*35S::EXT_TOM*) (**Tabla 2M**). Estas líneas fueron generadas y cedidas por la Dra. Margaret Fleming (Universidad del estado de Colorado - USA). Las extensinas son O-glicoproteínas estructurales de la pared celular importantes en el crecimiento polarizado de los pelos radicales [139, 216, 217]. Como todas las proteínas de la pared celular, son plegadas en el RE y sufren modificaciones postraduccionales como la O-glicosilación en esta organela y en aparato de Golgi antes de ser secretadas [139]. La señal en apoplasto y pared celular luego de realizar plasmólisis con 8% de manitol en pelos radicales de plantas transgénicas que expresan EXT_TOM fue muy baja (**Fig. 2.7R.B**). Esto fue observado tanto en los pelos radicales de la línea que posee un dominio extensina (Wt Col-0/ *35S::EXT2_TOM*) como en la que tiene numerosos dominios (Wt Col-0/ *35S::EXT11_TOM*) (**Tabla 2M**). Cuando a estas plantas se las incubó durante 5 días con $10\mu\text{M}$ se observó un incremento significativo en la señal en pared (**Fig. 2.7R.B**). Esto demuestra que CPA está afectando la secreción de glicoproteínas tipo extensinas reafirmando la hipótesis de que este inhibidor puede afectar procesos fisiológicos controlados por la homeostasis de Ca^{2+} en las organelas. El aumento de la secreción de glicoproteínas estructurales de la pared celular como las extensinas podría ser causante de una rigidización de la pared celular inhibiendo el crecimiento ya que es necesario momentos intercalados de rigidización y flexibilización de la pared celular para poder permitir el crecimiento [21].

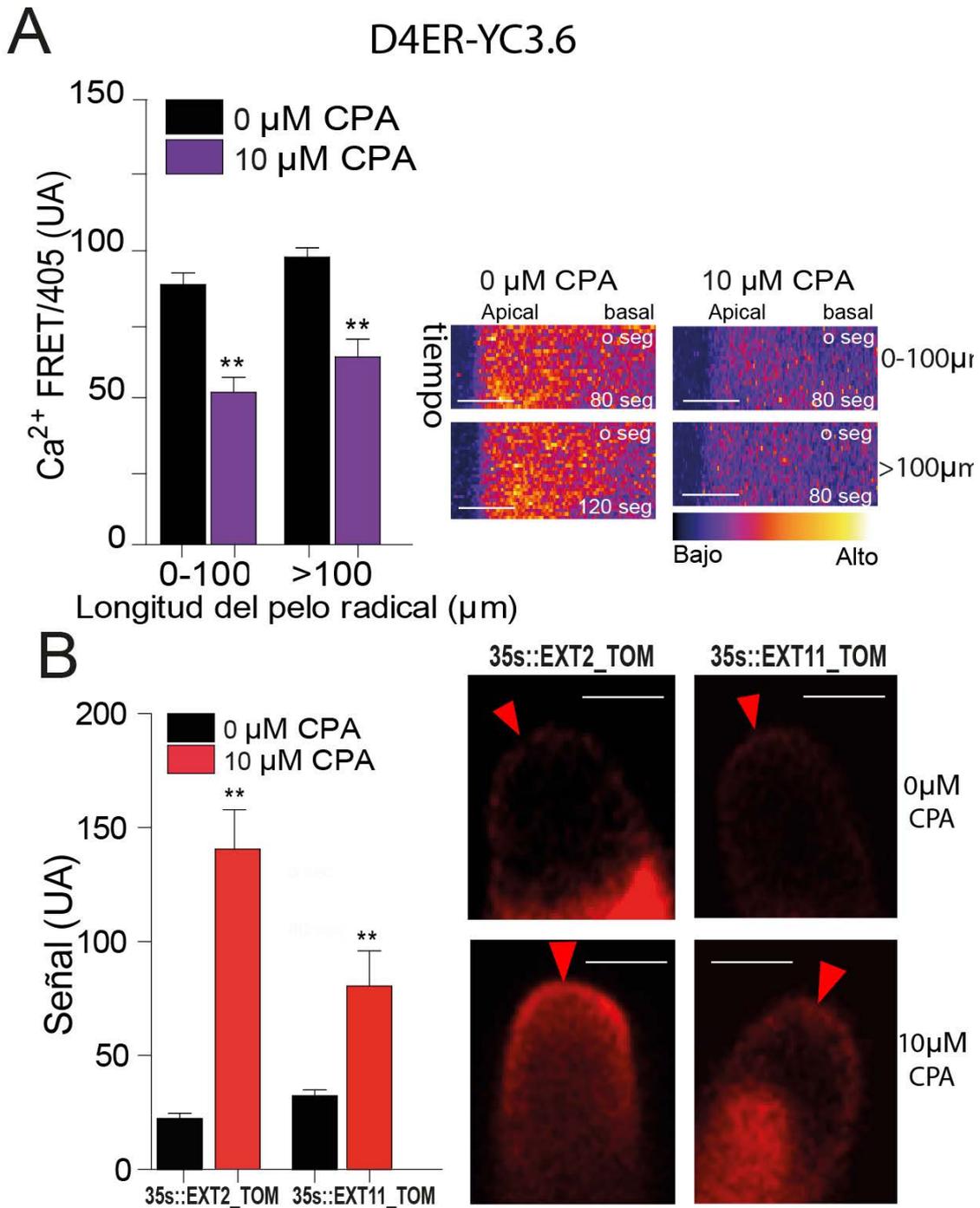


Figura 2.7R: La acumulación de Ca²⁺ en el RE y la secreción celular es regulada por las ECAs. (A) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺ en el RE (FRET/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor D4ER-YC3.6 crecidas en un medio con el agregado o no de 10µM de CPA (media ± s.e.m., n= 10). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T-test value* (**) P<0.001. UA=Unidades Arbitrarias. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales de longitudes comprendidas entre 0-100µm y longitudes mayores a 100µm crecidos con o sin 10µM de CPA. Escala de colores utilizada: *FIRE*. Barra de escala: 5micrometro. **(B)** Análisis cuantitativo de la señal de la pared celular luego de la plasmólisis en el ápice del pelo radical emitida por la plantas transgénicas transformadas con la construcción 35S::EXT2_TOM o 35S::EXT11_TOM crecidas en un medio con o sin el agregado de 10µM de CPA (media ± s.e.m., n=5). *T-test value* (**) P<0.001. A la derecha se observa la señal emitida en la pared y apoplasto celular luego de la plasmólisis de pelos radicales de las plantas transgénicas analizadas crecidas en un medio con el agregado o no de 10µM de CPA. Las flechas indican la pared celular en el ápice del pelo radical. Barra de escala: 5µm.

2.2.a.2 Caracterización de la familia de ATPasas tipo PIIA.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se determinó la estructura de los genes de *ECA1*, *ECA2* y *ECA3* (exones-intrones) y mediante la información extraída de la base de datos *salk* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tADNexpress>) se identificó el sitio en donde se encuentra la inserción del T-ADN de las mutantes a ser analizadas (**Fig. 2.8R.A**). La estructura del gen *ECA1* y *ECA2* difiere notablemente con la del gen de *ECA3*, este último posee 34 exones y 33 intrones (**Fig. 2.8R.A**). No se conoce si esta estructura podría afectar de alguna manera el *splicing* y finalmente la expresión del gen. Se aislaron mutantes insercionales homocigotas de *eca3-2* (*salk_112156*), *eca2-2* (*salk_039146*), la doble mutante *eca3-2 eca2-2* y plantas que sobre-expresan *ECA1* (*ECA1_{OE}*). Estas últimas son plantas transgénicas que poseen el gen *ECA1* bajo el control del promotor fuerte 35S y fueron cedidas por el Dr. Heven Sze (Departamento de Biología celular y genética molecular – Universidad de Maryland). El T-ADN de la mutante *eca1-1* se encuentra en el segundo exón, al igual que el de la mutante *eca2-2*. Se realizó una RT-PCR (los cebadores utilizados para realizar la RT-PCR se indican en la estructura del gen de *ECA2* con flechas rosas) para determinar los niveles de transcripto de *ECA2* en la mutante y se determinó que *eca2-2* es una mutante *knock out* ya que no se observa transcripto en la mutante (**Fig. 2.8R.B**). Por otro lado, El T-ADN en la mutante *eca3-2* se encuentra inserto dentro del 5' UTR de *ECA3*. Este sitio se solapa con el primer exón transcripto del gen. Cuando se realizó una RT-PCR (sitio de pegado de los cebadores indicados como flechas rosas en la estructura del gen) se observó que no hay disminución en los niveles de transcripto. Esto puede ser debido a que en dicha mutante se transcribe el gen, pero el transcripto no está completo. Para corroborar esto, se diseñaron cebadores que se pegan al final del transcripto con el fin de utilizarlos para realizar una qPCR (cebadores indicados en la estructura del gene con flechas violetas y azules) (**Fig. 2.8R.A**). Al hacer el análisis de la qPCR se observó que los niveles de transcriptos de *ECA3* (relativos a PP2A) no muestran diferencia significativa con respecto al Wt Col-0 (**Fig. 2.8R.C**). Este resultado insinuó que quizás la diferencia estaba al principio del transcripto cercano al sitio de inserción del T-ADN de la línea *eca3-2* que pudiese estar afectando el sitio de inicio de la transcripción, empezando en un ATG posterior al correcto, pero generando un transcripto no funcional. Para corroborar esto, actualmente varios experimentos se encuentran en proceso. Además, dada la complejidad del mutante de *eca3-2* se están caracterizando nuevos alelos de mutantes insercionales de *eca3*.

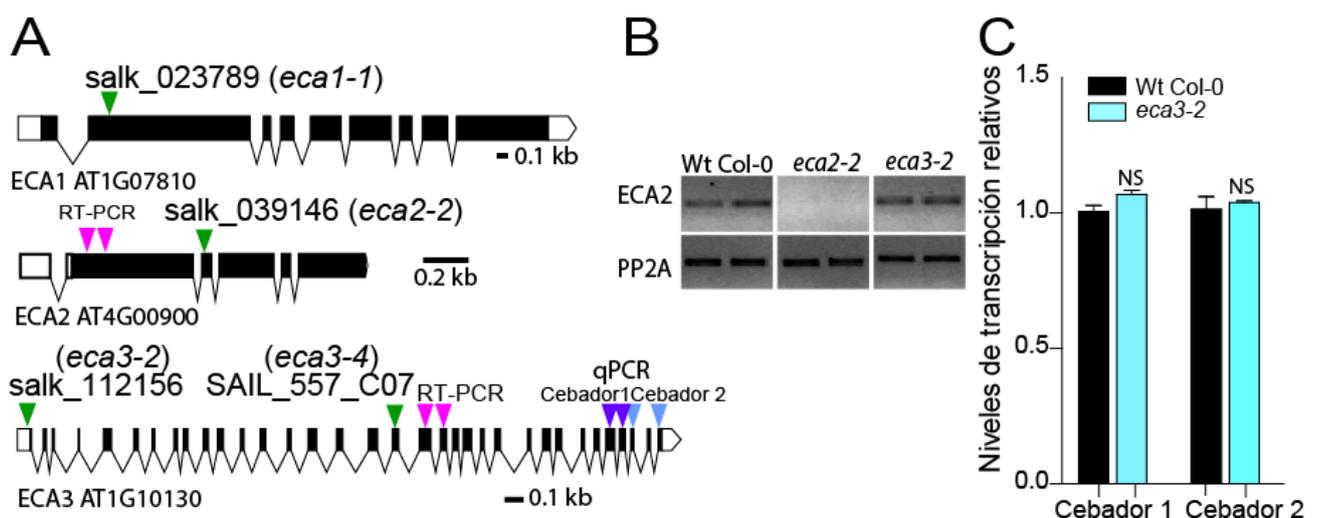


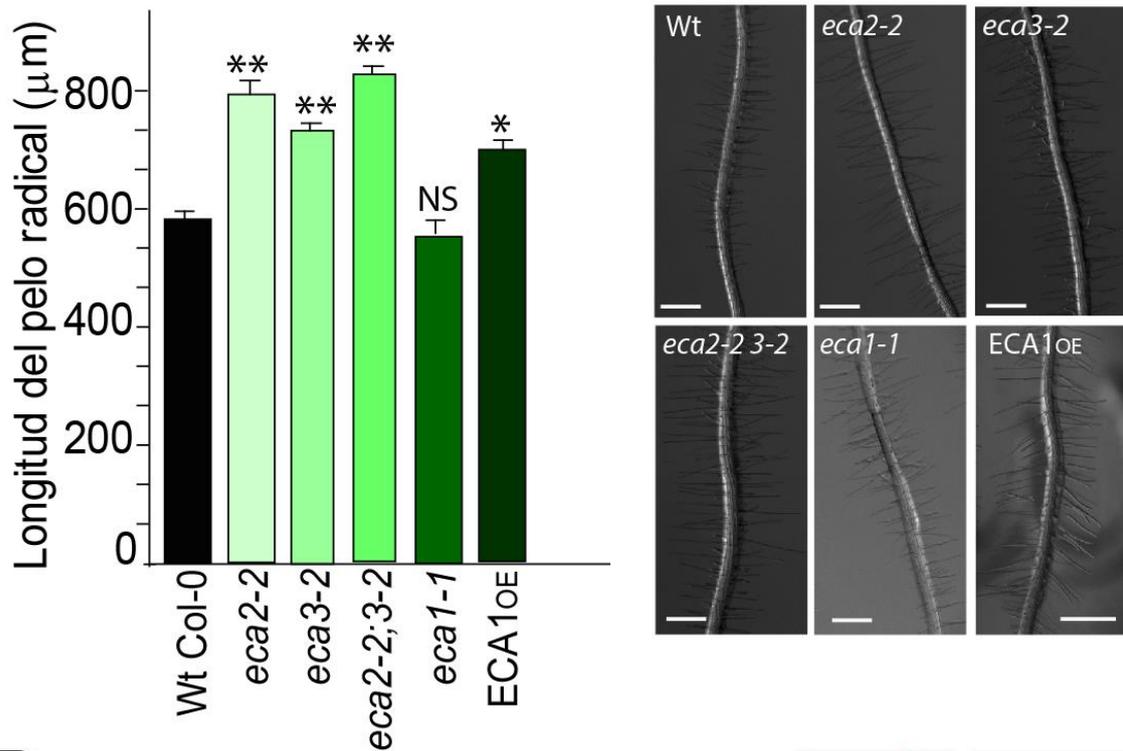
Figura 2.8R: Caracterización de *eca1-1*, *eca2-2* y *eca3-2*. (A) Estructura de los genes *ECA1*, *ECA2* y *ECA3*. Como cajas negras se muestran los exones y como cajas blancas los 5' UTR y 3' UTR. Las flechas verdes indican el sitio de inserción del T-ADN, las flechas rosas indican los sitios de pegado de los cebadores utilizados para la RT-PCR, las flechas azules y celestes indican los sitios de pegado de los cebadores utilizados para hacer qPCR. (B) RT-PCR de la mutante *eca2-2* y *eca3-2*. Como control interno se utilizó PP2A. (C) Niveles de transcriptos de *eca3-2* detectados con dos pares de cebadores diferentes

(Fig. 2.8A) por qPCR en plantas Wt Col-0 y en plantas mutantes *eca3-2* (media \pm s.e.m, n=2). Los niveles de transcriptos son relativos a PP2A.

Se cuantificó la longitud de los pelos radicales en cada una de estas líneas y se observó que en las mutantes simples de *eca3-2*, *eca2-2*, en la doble mutante de *eca3-2 eca2-2* y en la sobre-expresante de ECA1 (ECA1^{OE}) [218]) los pelos radicales crecen hasta longitudes mayores en comparación con pelos radicales de plantas Wt Col-0 (**Fig. 2.9R.A**). Debido a que el fenotipo de la doble mutante *eca3-2 eca2-2* no es más exacerbado que las simples mutantes, estas no parecieran tener efectos aditivos ni funciones redundantes. Es importante remarcar que la localización celular de cada una de las ATPasas es diferente, ensayos de proteómica demuestran que ECA1 y ECA4 se encuentra expresadas en el RE, ECA2 en RE y posiblemente en tonoplasto [191] y ECA3 en aparato de Golgi [190] y esta localización es determinante en la función celular de cada una de las ECAs. Debido a esto podría ser que cada una de las ECAs tuviera funciones independientes no relacionadas como consecuencia de la regulación de los niveles de Ca²⁺ dentro de las organelas.

Se midieron los niveles de ROS en las líneas que presentaban fenotipo y no se observó ninguna diferencia en comparación al Wt Col-0 en etapas tempranas del desarrollo del pelo radical (entre 0-100 μ m) (**Fig. 2.9R.B**). La mutante *eca3-2* posee pelos más largos que Wt Col-0 y en estos se mantienen los niveles de ROScit incluso en pelos radicales de longitudes mayores a 600 μ m (**Fig. 2.9R.A,B**). La simple mutante *eca2-2* y la doble *eca2-2 eca3-2* poseen los niveles de ROS levemente aumentados en pelos de longitud entre 100-300 μ m pero en pelos de mayor longitud (entre 300-600 μ m) disminuye, por lo que este aumento es un aumento transiente o quizás es debido a variaciones que se han observado debido a la técnica por la cual se mide ROScit (**Fig. 2.9R.B**). Estas últimas, al igual que *eca3-2*, mantienen los niveles de ROS en los pelos radicales largos (mayores a 600 μ m de longitud) (**Fig. 2.9R.B**).

A



B

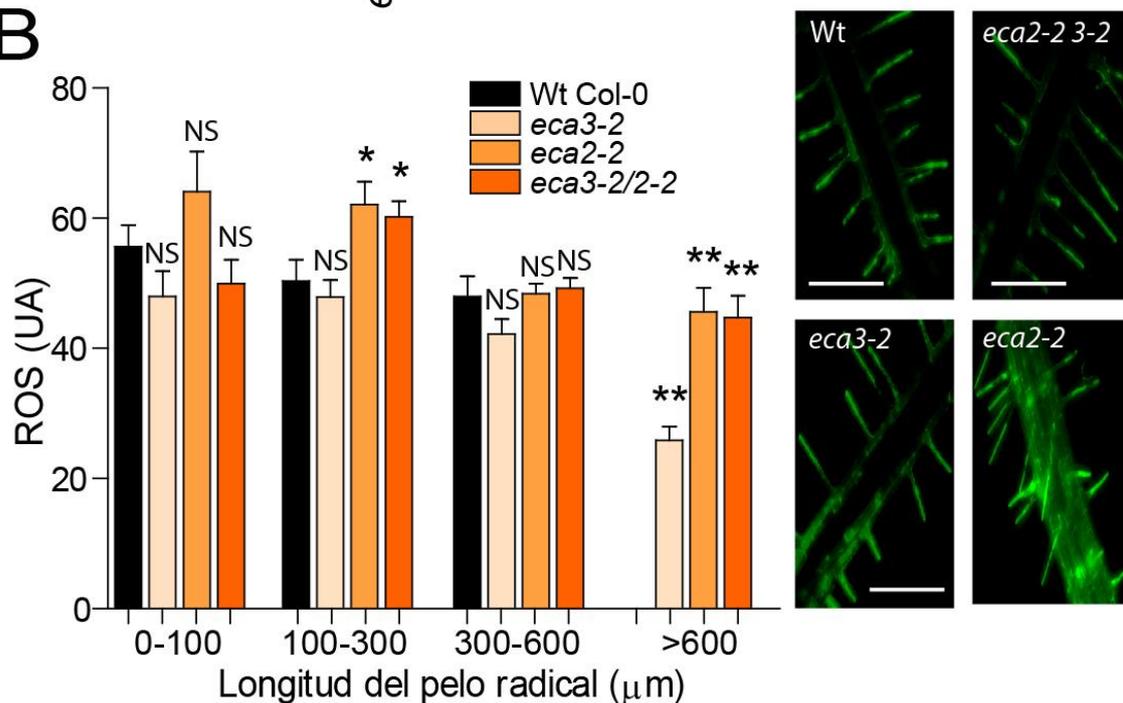


Figura 2.9R: (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0, de las simples mutantes *eca2-2*, *eca3-2*, *eca1-1*, la doble mutante *eca2-2 eca3-2* y la línea transgénica que sobre expresa ECA1 (ECA1^{OE}) (media \pm s.e.m., n= 38). *P-value* de one-way anova (**) $P < 0.001$, (*) $P < 0.01$. NS= Diferencia No Significativa. A la derecha, se muestra el fenotipo de pelo radical de Wt Col-0 y de las diferentes mutantes y líneas sobre-expresantes de ECAs. Barra de escala: 800 μm . **(B)** Análisis cuantitativo de ROS mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se le agregó 5 μM y 10 μM de CPA en el medio de crecimiento (media \pm s.e.m., n= 20). La comparación estadística se realizó en pelos que se encontraban en el mismo rango de longitudes. *P-value* de one-way anova (**) $P < 0.001$, (*) $P < 0.01$. NS= Diferencia No Significativa. A la derecha, se muestra la señal de ROS en plantas Wt Col-0 en las simples y múltiples mutantes de *ecas*. Barra de escala: 1000 μm . NT= No Tratada.

2.2.a.3 Ca²⁺ y H₂O₂ en la mutante *eca3-2*.

Para caracterizar a las mutantes se cruzaron plantas que expresan YC3.6 con las diferentes mutantes *eca2-2* y *eca3-2*. Lamentablemente no se pudo obtener una línea mutante *eca2-2* que expresara el biocensor ya que por algún mecanismo desconocido la sobre- expresión del mismo fue inhibida tanto en la simple mutante *eca2-2* como en la mutante doble *eca3-2 eca2-2*. Debido a esta dificultad técnica, únicamente se caracterizó a la mutante *eca3-2* mediante la expresión de biocensores en la misma. Cuando se analizan los niveles de Ca²⁺cit en plantas mutantes de *eca3-2* que expresan el biocensor YC3.6 se observa una disminución en los niveles de Ca²⁺cit en pelos radicales de longitudes mayores a 350µm en comparación con plantas Wt Col-0/YC3.6. No se observan diferencias significativas en los niveles de Ca²⁺ en pelos radicales de longitud menor a 300µm (**Fig. 2.10R.A**).

Por otro lado, plantas mutantes de *eca3-2* que expresan el biocensor *Hyper* no muestran una diferencia significativa en los niveles de H₂O₂cit en los diferentes estadios del desarrollo analizado (**Fig. 2.10R.B**). Por dificultades técnicas no se pudieron analizar pelos de longitudes mayores a 350µm por lo que no se puede descartar que en pelos mayores a esta longitud no presenten diferencias en los niveles de H₂O₂cit. Estos resultados indicarían que los niveles de Ca²⁺cit se encuentran afectados en la mutante *eca3-2* en pelos radicales de longitudes mayores a 350µm. Esta variación no afectaría los niveles de H₂O₂cit demostrando que existen mecanismos por los cuales Ca²⁺ puede ser regulado independientemente de ROS. Se podría hipotetizar que existe una ventana en las concentraciones de Ca²⁺ las cuales no afectarían los niveles de H₂O₂cit.

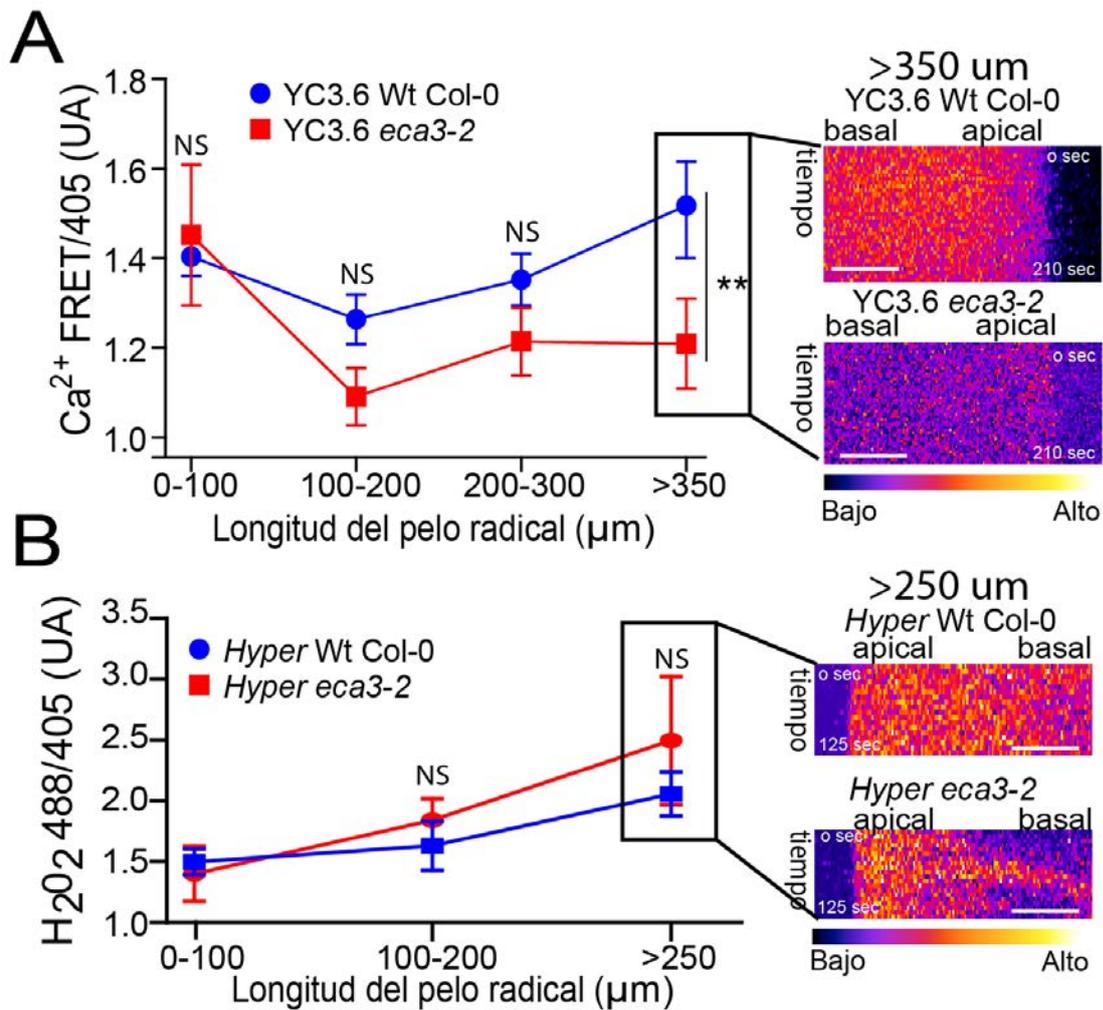


Figura 2.10R: Niveles de Ca²⁺cit y H₂O₂cit en *eca3-2*. (A) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 y del mutante *eca3-2* que expresan el biocensor YC3.6 (media ± s.e.m., n=10). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. *T-test value* (**) P<0.01. NS= Diferencia No Significativa. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales de longitudes mayores a 350µm de plantas Wt Col-0 y de la mutante *eca3-2* que expresan el biocensor YC3.6. Escala de colores utilizada: FIRE. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: 5µm (B) Análisis cuantitativo de los niveles de H₂O₂cit (488/405 UA) en diferentes estadios del desarrollo de pelos radicales de plantas Wt Col-0 y del mutante *eca3-2* que expresan el biocensor *Hyper* (media ± s.e.m., n=7). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. Análisis estadístico: *T-test*. NS= Diferencia No Significativa. A la derecha se observa el *kymograph* de pelos radicales de longitudes mayores a 250µm de plantas Wt Col-0 y de la mutante *eca3-2* que expresan el biocensor *Hyper*. Escala de colores utilizada: FIRE. UA=Unidades Arbitrarias. Barra de escala: 5µm.

Cuando se analizaron pelos radicales de plantas mutantes de *eca3-2* que expresaban el biocensor YC3.6 mediante SPIM, se observó que las frecuencias incluidas dentro de las señales provenientes de las oscilaciones de Ca²⁺ se encuentran significativamente modificadas tanto en pelos cortos como en pelos largos (pelos cortos de longitud menor a 400µm y pelos largos son aquellos de longitudes mayores a 400µm) (Fig. 2.11R.A). No se detectaron variaciones en la velocidad de crecimiento entre Wt Col-0 con respecto a la mutante (tiempo total del experimento 15 minutos) (Fig. 2.11R.A). Es importante mencionar que el análisis de Fourier provenientes de pelos cortos o pelos largos, así como las velocidades de crecimiento difieren notablemente (Fig. 2.11R.B), por lo que todas las comparaciones se realizan entre pelos que están dentro del mismo rango de longitudes. Pelos cortos de Wt Col-0/YC3.6 muestran un pico máximo medio de frecuencia de 0,036Hz. y las

oscilaciones en los pelos largos tienen una amplitud menor y un pico máximo medio de frecuencia mayor a la observada en pelos cortos (aproximadamente 0,04Hz.) (**Fig. 2.11R.B**). Los pelos cortos de la mutante *eca3-2* muestra oscilaciones de menor amplitud (Pelos cortos: Wt Col-0/YC3.6 PSD $\approx 4,5 \times 10^{-3}$, *eca3-2*/YC3.6 PSD $\approx 2 \times 10^{-3}$) que el control y no posee un pico de oscilación máximo tan claro aunque pareciera ser de frecuencia mayores a las encontradas en pelos de plantas Wt Col-0/YC3.6 (aproximadamente 0,042Hz.) (**Fig. 2.11R.A**). Los pelos largos de la mutante *eca3-2* muestran amplitud menor (Wt Col-0/YC3.6 PSD $\approx 3 \times 10^{-3}$, *eca3-2*/YC3.6 PSD $\approx 2 \times 10^{-3}$) y una frecuencia media de 0,036Hz. (**Fig. 2.11R.A**).

Debido a la ausencia de diferencias en las velocidades de crecimiento se decidió realizar un experimento prolongado en el tiempo (60 minutos) en pelos radicales largos para determinar si existía alguna diferencia en el crecimiento de la mutante con respecto a Wt Col-0. La transformada de Fourier analizada muestra el mismo patrón (datos no mostrados), pero cuando se analizan los perfiles de crecimiento de la mutante se observa que el crecimiento no es constante y que las velocidades de crecimiento instantáneos varían con respecto al tiempo (**Fig. 2.11R.C**). Además, se observó que pelos que no crecían eran capaces de recuperar el crecimiento (**Fig. 2.11R.C**). Este patrón no fue observado con frecuencia en plantas Wt Col-0/YC3.6. Se realizó una cuantificación de los eventos de pelos que recuperan el crecimiento luego de haberse detenido y se observó que el 3,9% de los pelos eran capaces de recuperar el crecimiento en plantas Wt Col-0/YC3.6 y un 20,8% en la mutante *eca3-2* (**Fig. 2.11R.C**). Con este resultado se determinó que el fenotipo de pelo largo de la mutante no se debería a cambio en las velocidades de crecimiento promedio si no a la capacidad de los pelos de recuperar el crecimiento luego de que este se detuvo. Se podría especular que las diferencias observadas en las frecuencias de las oscilaciones de Ca^{2+} y la disminución de los niveles de Ca^{2+} cit son responsables del fenotipo observado. Por otro lado, es importante descartar que el fenotipo se deba a que el sistema secretorio se encuentra afectado ya que como se mencionó anteriormente esta ATPasa se encuentra en Aparato de Golgi [192] por lo tanto se hipotetiza que puede estar afectando la homeostasis de Ca^{2+} dentro de la organela afectando la secreción de proteínas [193].

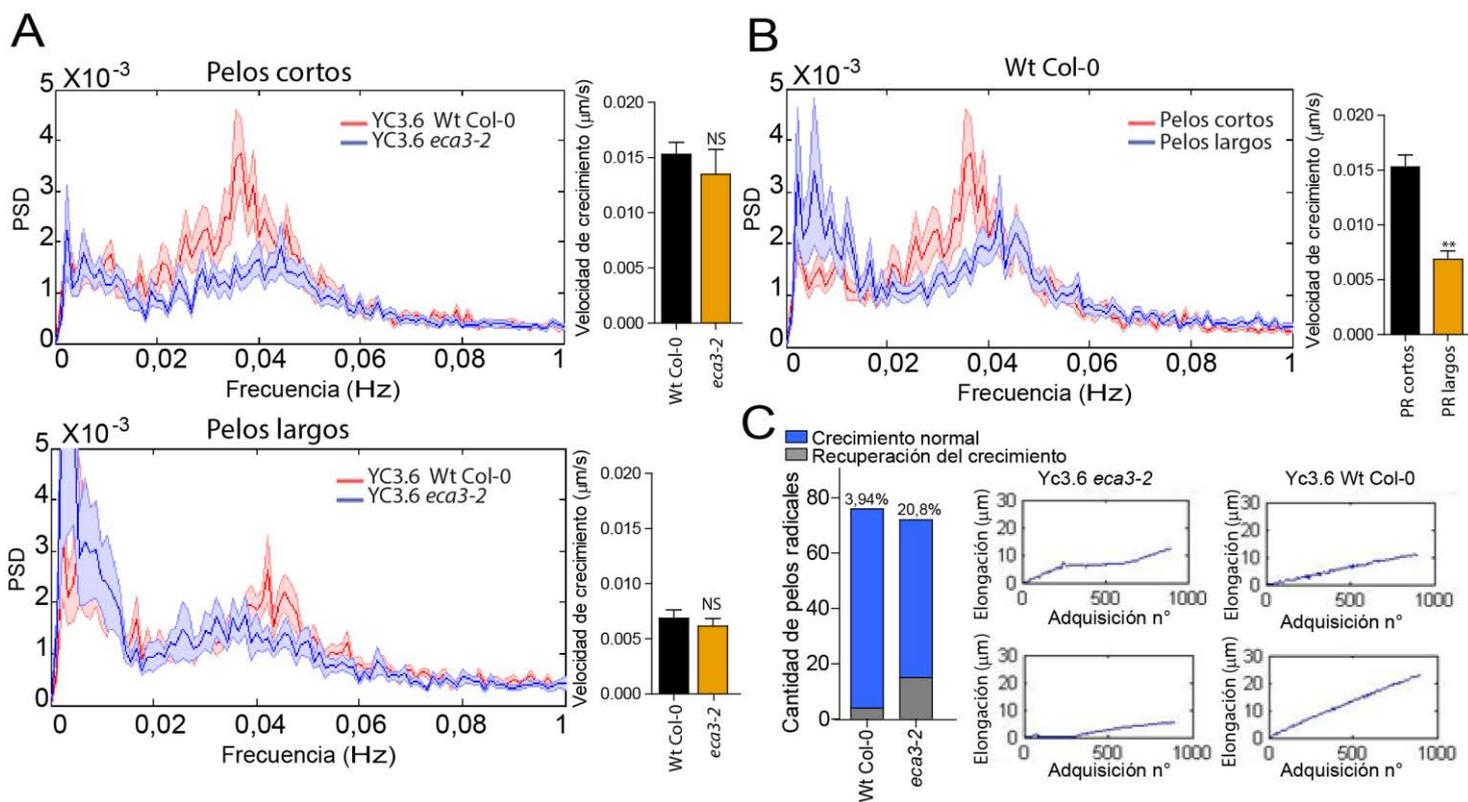


Figura 2.11R: (A) Arriba, análisis de Fourier de las oscilaciones de Ca^{2+} extraídas de los ápices de los pelos radicales de longitudes menores a $400\mu\text{m}$ (pelos cortos) de plantas Wt Col-0 y de la mutante *eca3-2* que expresan el biocensor YC3.6 (media \pm s.e.m., $n = 62$). A la derecha, análisis cuantitativo de la velocidad de crecimiento de los pelos radicales cortos de plantas Wt Col-0 y de la mutante *eca3-2* (media \pm s.e.m., $n = 70$). NS= Diferencia No Significativa. Abajo, análisis de Fourier de las oscilaciones de Ca^{2+} extraídas de los ápices de los pelos radicales de longitudes mayores a $400\mu\text{m}$ (pelos largos) de plantas Wt Col-0 y de la mutante *eca3-2* que expresan el biocensor YC3.6 (media \pm s.e.m., $n = 50$). A la derecha, análisis cuantitativo de la velocidad de crecimiento de los pelos radicales largos de plantas Wt Col-0 y de la mutante *eca3-2* (media \pm s.e.m., $n = 76$). NS= Diferencia No Significativa. (B) Análisis de Fourier de las oscilaciones de Ca^{2+} extraídas de los ápices de los pelos radicales cortos y largos de plantas Wt Col-0 que expresan el biocensor YC3.6 (media \pm s.e.m., $n = 62$). A la derecha, análisis cuantitativo de la velocidad de crecimiento de los pelos radicales cortos y largos de plantas Wt Col-0 (media \pm s.e.m., $n = 62$). *T-test value* (**) $P < 0.001$. (C)

2.2.b Caracterización de la familia de ATPasas tipo PIIB (ACAs).

Cuando se incubaron plantas Wt Col-0 con $0,1\mu\text{M}$ de Eosina, que inhibe específicamente a las ACAs, se observó un aumento en la longitud de los pelos radicales y un leve aumento en los niveles de ROS en estadios iniciales del desarrollo (Fig. 2.12R.A,B). La Eosina es un compuesto derivado de la fluoresceína y actúa como un inhibidor competitivo del nucleósido trifosfato requerido para activar la bomba de tipo ACA [219]. Además, se observó que los niveles de ROS se mantienen elevados en estadios más tardíos del desarrollo de los pelos radicales (Fig. 2.12R.B). Cuando se incrementó las concentraciones de Eosina en el medio de crecimiento de las plantas se observó una disminución de la longitud de la raíz principal sin lograr una diferencia en la longitud de los pelos radicales observada con $0,1\mu\text{M}$ de Eosina (resultados no mostrados), por lo que se eligió como concentración de trabajo $0,1\mu\text{M}$ ya que el efecto es específico del pelo radical. Estos resultados dan un indicio de que los ACAs estarían actuando como reguladores negativos del crecimiento polarizado. La base de datos *genevestigator* muestra que numerosos miembros de los ACAs son expresados en los pelos radicales, aunque mayoritariamente se expresan ACA2 y ACA11 (Fig. 2.12R.C). Es importante mencionar que la localización subcelular de estas es diferente (ACA2 se encuentra en RE y ACA11 tonoplasto) por lo que la función de cada una podría ser completamente

diferente. No se aislaron mutantes insercionales de estos. Esta línea de investigación será profundizada en el laboratorio del Dr. José M. Estevez en el futuro.

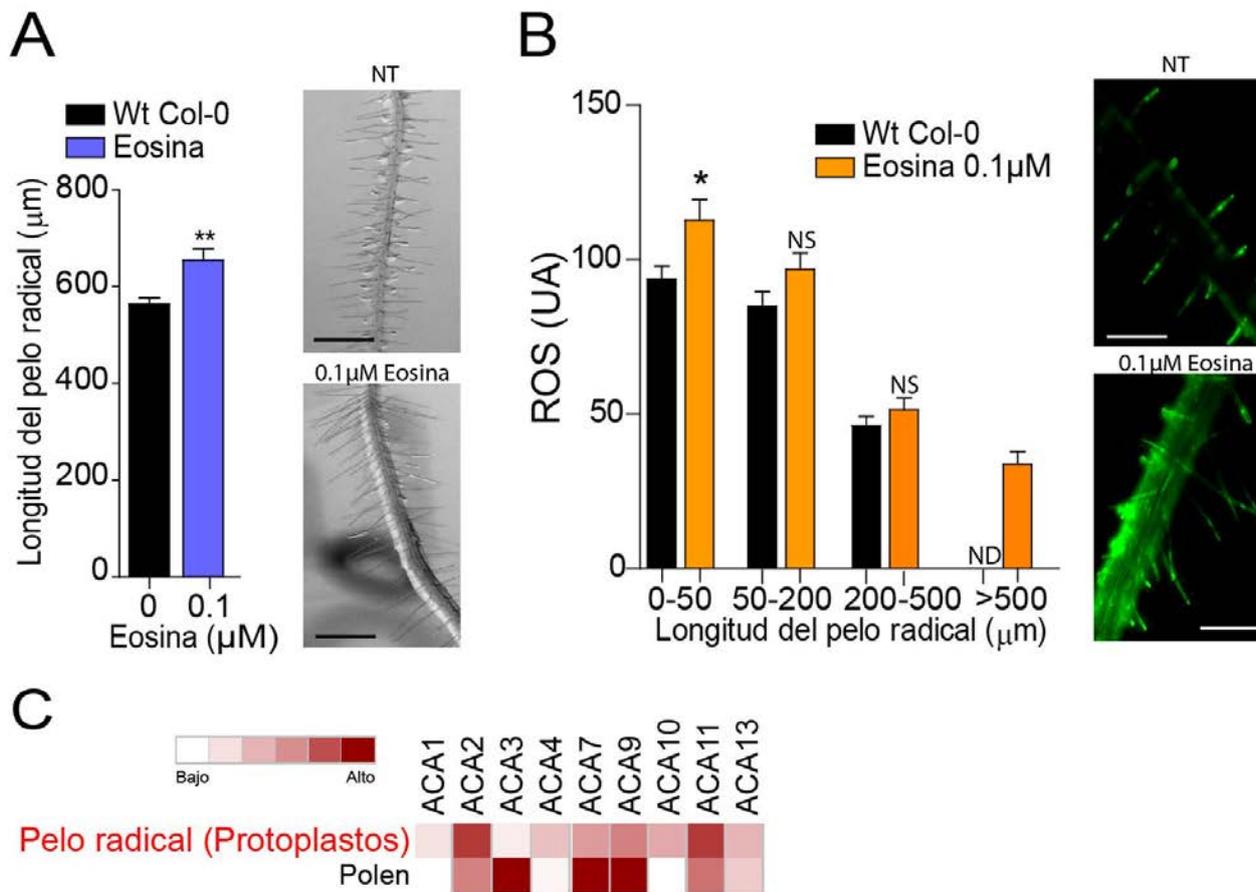


Figura 2.12R: Efectos de Eosina en el crecimiento polarizado. (A) Análisis cuantitativo de la longitud del pelo radical de plantas Wt Col-0 cuando se agregó o no al medio de crecimiento 0,1µM de Eosina (media ± s.e.m., n= 26). *T-test value* (**)*P*<0.01. A la derecha, se muestra el fenotipo de pelo radical de Wt Col-0 tratadas o no con 0,1µM de eosina. Barra de escala: 600 µm. NT= No Tratada (B) Análisis cuantitativo de ROScit mediante el uso de la señal obtenida por la oxidación de H₂DCF-DA en diferentes estadios de Wt Col-0 cuando se agregó o no 0,1µM de eosina en el medio de crecimiento (media ± s.e.m., n=25). *T-test value* (*)*P*<0.01. NS=Diferencia No Significativa. ND=No Detectado. A la derecha se muestra la señal de ROS en plantas Wt Col-0 tratadas o no con 0,1µM de eosina. Barra de escala: 200 µm. NT= No Tratada (C) Expresión relativa de los genes de la familia ACA en *Arabidopsis thaliana* en diferentes tejidos (protoplastos de pelos radicales y polen) de acuerdo a la base de datos *Genevestigator* utilizando la herramienta *Meta-Profile Analysis*, *Anatomy ProfileK*. Los niveles de expresión (en color rojo) son relativos a la expresión máxima de cada gen.

Quando se crecen plantas que expresan el biocensor YC3.6 en tubos que contienen 0.1µM de eosina en un medio con 0,5% de fitogel MS0,5X 0,1% de sacarosa y se miden los niveles de Ca²⁺cit en comparación con plantas creciendo en condiciones control (Fitogel 0,5%, MS 0,5X, 0,1% de sacarosa) se observó que los niveles de Ca²⁺cit no difieren con respecto a las condiciones control (Fig. 2.13R.C). Mediante el análisis de la transformada de Fourier de las oscilaciones de las plantas que crecen en el medio con 0,1µM de eosina, no se observó diferencias en estas en pelos cortos pero sí en pelos largos (Fig. 2.13R.A,B). Se puede observar que el control no muestra un pico central tan claro como en experimentos anteriores, pero de todas maneras pelos largos crecidos en un medio con eosina muestran una amplitud menor (Pelos largos: Cnt ≈ 4 x 10⁻³; 0,1µM Eosina PSD ≈ 2,5 x 10⁻³) y no se podría definir una frecuencia predominante en la señal de Ca²⁺cit (Fig. 2.13R.A,B). Cuando se analizan las velocidades de crecimiento se observa que tanto los pelos más cortos como los más largos crecen a velocidades mayores cuando se encuentran en un medio que contiene 0,1µM de eosina (Fig. 2.13R.A,B). Los resultados analizados muestran que eosina afectaría las oscilaciones de Ca²⁺ en pelos

radicales de longitudes mayores a 400 μ m y las velocidades de crecimiento de los pelos radicales tanto en pelos cortos como largos.

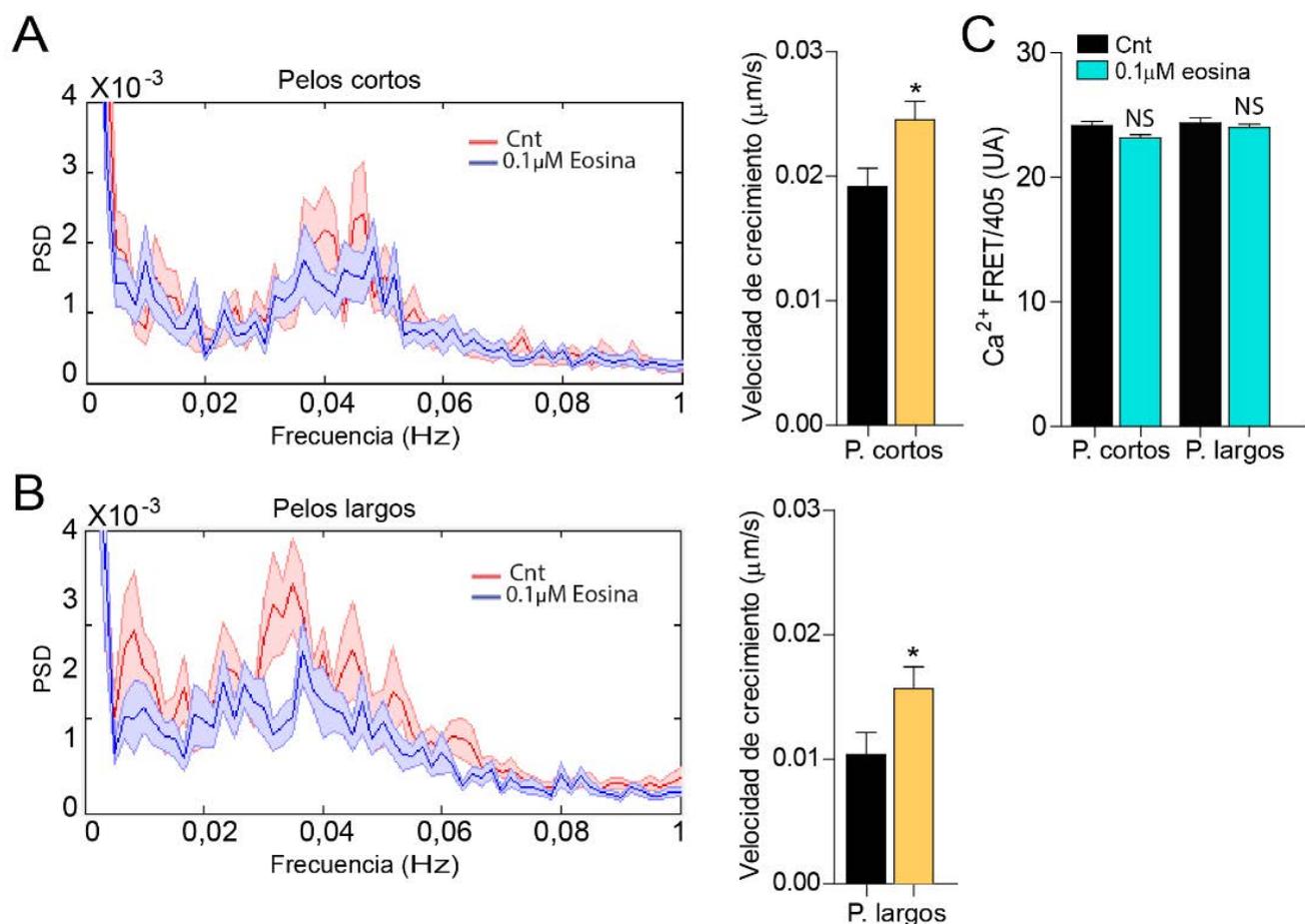


Figura 2.13R: (A) A la izquierda, análisis de Fourier de las oscilaciones de Ca²⁺ de los ápices de los pelos radicales de longitudes menores a 400 μ m de plantas Wt Col-0 que expresan YC3.6 creciendo en un medio con o sin 0,1 μ M de eosina (media \pm s.e.m., n=18). A la derecha, análisis cuantitativo de la velocidad de crecimiento de los pelos radicales cortos (P. cortos) de plantas Wt Col-0 creciendo en un medio con o sin el agregado de 0,1 μ M de eosina (media \pm s.e.m., n=18). *T-test value* (*) $P < 0.01$. (B) A la izquierda, análisis de Fourier de las oscilaciones de Ca²⁺ de los ápices de los pelos radicales de longitudes mayores a 400 μ m de plantas Wt Col-0 que expresan YC3.6 creciendo en un medio con o sin 0,1 μ M de eosina (media \pm s.e.m., n=27). A la derecha, análisis cuantitativo de la velocidad de crecimiento de los pelos radicales largos (P. largos) de plantas Wt Col-0 creciendo con o sin el agregado de 0,1 μ M de eosina (media \pm s.e.m., n=27). *T-test value* (*) $P < 0.01$. (C) Análisis cuantitativo de los niveles de Ca²⁺cit (FRET/405 UA) en P. cortos y P. largos de plantas Wt Col-0 que expresan YC3.6 crecidas en un medio con o sin 0,1 μ M de eosina (media \pm s.e.m., pelos cortos: n=18; pelos largos: n=27). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en pelos radicales que se encuentran en el mismo rango de longitudes. Estadística utilizada: *T-test*. NS= Diferencia No Significativa. UA=Unidades Arbitrarias.

Conclusiones

Mediante la aplicación de técnicas farmacológicas y genéticas se determinó que familias de transportadores de Ca^{2+} estarían involucradas en el mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} y las oscilaciones del mismo durante el crecimiento polarizado de los pelos radicales. Se determinó que los canales VGCs no parecieran intervenir en este proceso ya que no se observó ningún efecto en el crecimiento de los pelos radicales cuando las plantas crecen en presencia de Verapamilo. Se aislaron mutantes insercionales de los posibles VGCs que se expresan en pelos radicales y se determinó que la ausencia de los mismos no parece afectar el desarrollo normal de los pelos radicales. Estos resultados confirman los datos obtenidos en los ensayos farmacológicos, por lo que en condiciones fisiológicas normales de crecimiento los VGCs no son requeridos para el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

El efecto observado cuando se incubaron plantas con el péptido inhibidor *spider* sugiere que los canales MSCs actuarían como reguladores negativos de la expansión celular polarizada en los pelos radiculares. No se logró aislar algún/algunos candidatos dentro de esta gran familia de canales que mostrara ser importantes para el crecimiento polarizado. Esto podría ser debido a la presencia de numerosas sub-familias y la alta redundancia de estos en *Arabidopsis thaliana*.

Por otro lado, mediante la utilización de CNQX y el aislamiento de mutantes insercionales homocigotas de *glr3.5* y *glr2.4* se determinó que los GLRs no estarían involucrados en la generación del gradiente de Ca^{2+} necesario para el crecimiento polarizado, aunque con los experimentos realizados y debido a la falta de la mutante insercional *glr2.1* (la cual es la más expresada en pelo) no se puede afirmar esto.

Se observó que a medida que se agregaron concentraciones crecientes de 8, Br-GMPc (50-120 μM) en el medio de crecimiento de plantas, la longitud de los pelos radicales disminuye. Además la mutante insercional *cngc14-1* muestra fenotipo de pelo radical largo. Los resultados obtenidos muestran que los CNGCs actuarían regulando el crecimiento polarizado aunque como estos influyen en el mismo no está determinado.

La inhibición de los ECAs mediada por CPA mostró una reducción en el crecimiento de los pelos radicales, en los niveles de ROScit, Ca^{2+} cit y de Ca^{2+} dentro del RE. Además, el gradiente de Ca^{2+} cit, las oscilaciones de Ca^{2+} y la velocidad de crecimiento de los pelos fue drásticamente afectada en presencia de CPA. Demostrando el importante rol de las ECAs en el desarrollo de los pelos radicales. Por otro lado, se determinó que la presencia de CPA afecta el proceso de secreción celular, ya que la secreción de glicoproteínas con dominios tipo extensinas se vio incrementado.

Se aisló mutantes insercionales homocigotas de dos *ecas* que poseen alta expresión en pelos radicales: *eca2-2* y *eca3-2* y la doble mutante *eca2-2 eca3-2*. Se determinó que *eca2-2* es una mutante *knock out*, posee pelos radicales más largos y la maquinaria de producción de ROS se mantiene encendida en estadios del desarrollo posteriores al observado en plantas Wt Col-0. Este fenotipo también fue observado también en líneas transgénicas que sobre-expresan ECA1, aunque no se analizó en profundidad la implicancia de ECA1 en el crecimiento polarizado.

No se pudo determinar cómo afecta la inserción del T-ADN (*salk_112156*) a la transcripción del gen *ECA3*. Se determinó que los niveles de transcripto son comparables a plantas Wt Col-0 pero no si el mismo está completo. Por otro lado, se observó que esta mutante posee los pelos radicales más largo y que los niveles de ROS se mantienen en etapas indetectables en Wt Col-0. Además, los niveles de Ca^{2+} se encontraban disminuidos en la mutante en pelos radicales de longitudes mayores a 350 μm ; las frecuencias incluidas en la señal de Ca^{2+} y la amplitud de las oscilaciones son menores que el control. Las diferencias observadas no impactan en la velocidad de crecimiento de los pelos radicales de las plantas mutantes *eca3-2* pero si esto se refleja en la capacidad aumentada de los pelos en recuperar el crecimiento polarizado una vez que este se detuvo. Esto justificaría el fenotipo de pelo radical largo observado.

Finalmente, se determinó que la presencia de eosina en el medio de crecimiento de las plantas provoca un aumento en la longitud de los pelos radicales con un leve aumento en los niveles de ROS en estadios iniciales del desarrollo. Además, estos niveles se mantienen en estadios tardíos en el crecimiento de los pelos que no son detectados en las condiciones de control. Los niveles de Ca^{2+} cit en presencia de eosina no difieren con respecto al control, las frecuencias de las oscilaciones de Ca^{2+} en pelos radicales largos se ven afectadas y las velocidades de crecimiento son mayores que en condiciones control.

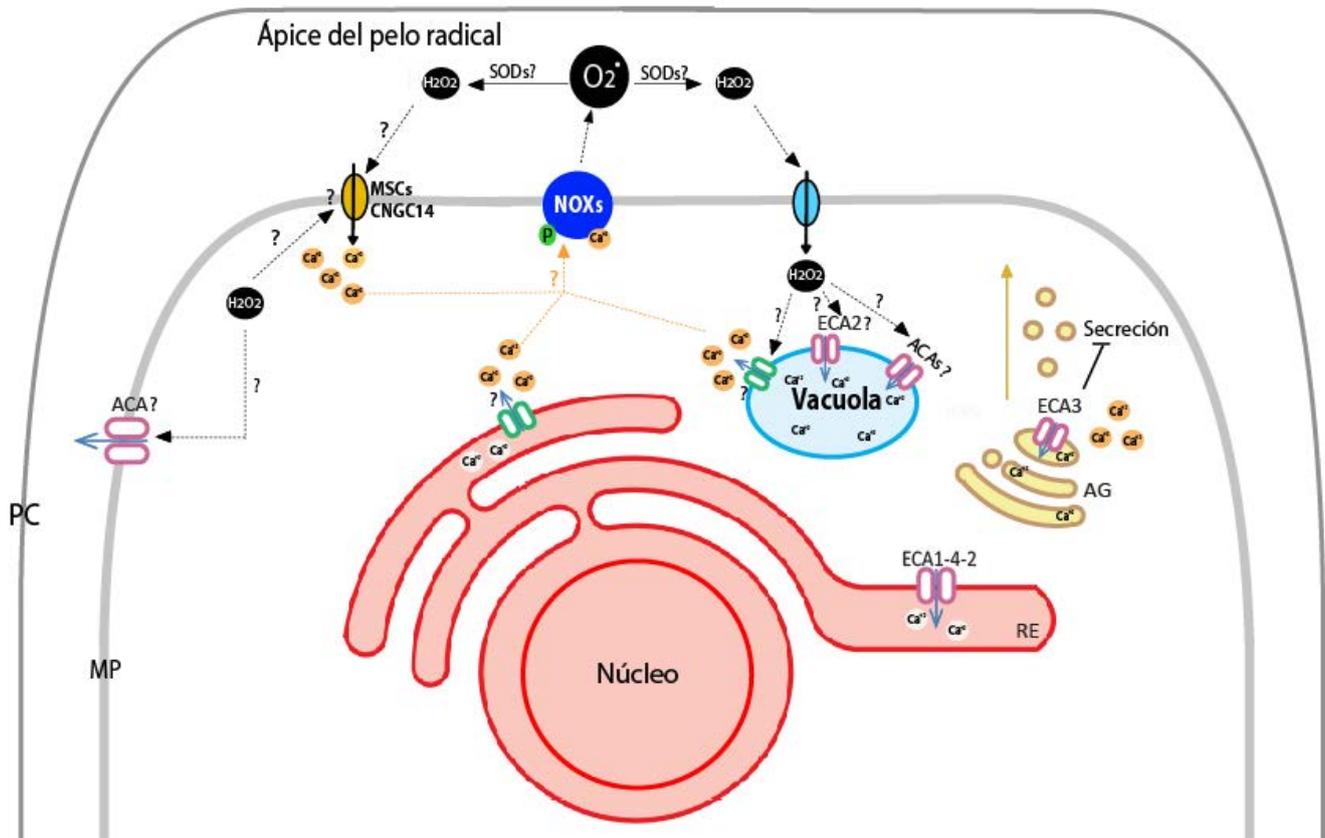


Figura 2.14R: Sistemas de transporte de Ca^{2+} involucrados en el crecimiento polarizado. Canales y bombas de Ca^{2+} que mostraron estar involucrados en el crecimiento polarizado. La regulación ejercida por estos influye o puede ser influenciada por los niveles de ROS cit. No se conoce el mecanismo por el cual esto sucede. MP=Membrana Plasmática. PC= Pared Celular. AG= Aparato de Golgi.

Discusión y conclusiones generales

Las NOXs en el crecimiento polarizado y su implicancia en los niveles de ROS y Ca^{2+} cit.

Los pelos radicales son células únicas que se caracterizan por poseer un tipo de crecimiento muy particular denominado crecimiento polarizado. Numerosos factores son los que determinan el tamaño final de los pelos radicales y este tiene implicancias fisiológicas en la planta. Principalmente porque los pelos aumentan la relación área/volumen de las raíces que están en contacto con el suelo o el medio de crecimiento facilitando la absorción de nutrientes, de H_2O y la interacción con microorganismos (bacterias y hongos). Como se demostró para mantener el crecimiento polarizado es necesario: gradiente de Ca^{2+} y ROS, oscilaciones en estos componentes y una retroalimentación positiva entre ambos. A pesar de que ROS puede ser producido de manera directa o indirecta en numerosos compartimientos intracelulares se demostró que los niveles de ROS cit y específicamente los niveles de H_2O_2 son mantenidos principalmente por la actividad de las NOXs. Además, la producción de anión O_2^- por parte de las NOXs son necesarios para mantener los niveles de Ca^{2+} cit. Debido a que esto fue observado mediante el uso del biocensor YC3.6 y la utilización del inhibidor de las NOXs VAS2870 no se puede corroborar si el decaimiento observado en Ca^{2+} es debido a la ausencia de O_2^- apoplástico, al H_2O_2 apoplástico o al H_2O_2 citoplasmático. Teniendo en cuenta el tiempo de vida media de cada uno, es probable que las acciones estén mediadas por el H_2O_2 . Las NOXs producen anión O_2^- en el apoplasto celular el cual es transformado a H_2O_2 por la acción o no de la superóxido dismutasa (SOD) y luego es transportado al citoplasma (**Fig. 1D**).

Mediante una búsqueda fenotípica de mutantes insercionales de las *nox*s, se determinó que además de la ya descrita NOXC, NOXH y NOXJ son necesarias para mantener el crecimiento polarizado, la producción de O_2^- y la homeostasis de ROS cit de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* (**Fig. 1D**). Análisis filogenéticos muestran que estas NOXs se encuentran muy distantes entre sí y pertenecen a grupos diferentes (NOXC al grupo I, NOXH y NOXJ al grupo II). Posiblemente la regulación de la actividad de la NOXC difiera con respecto a la NOXH y NOXJ. Además, estas poseen diferentes niveles de expresión en los diferentes tejidos. En pelo radical se expresa principalmente la NOXC, NOXE y NOXF aunque las mutantes insercionales de *nox*e y *nox*f no mostraron ninguna alteración en el fenotipo de los pelos radicales en comparación con plantas Wt Col-0. Por otro lado, NOXH y NOXJ se expresan mayoritariamente en polen. Experimentos con líneas reporteras son necesarios para corroborar que estas se expresan en pelo radical. Se demostró que estas son fundamentales para la producción de anión O_2^- asociado al crecimiento en tubos polínicos [42]. Este tipo celular posee el mismo tipo de crecimiento (crecimiento polarizado) que los pelos radicales, y las características del mismo son casi idénticas que en los pelos radicales por lo que no llama la atención que si hay expresión de la NOXH y la NOXJ en pelo radical estén asociadas al crecimiento polarizado de los mismos. Es importante remarcar que parece haber redundancia en la función y en la expresión de la NOXH y la NOXJ ya que la ausencia de una de estas no es suficiente para observar diferencias en el crecimiento polarizado. Por otro lado, simples y múltiples mutantes que poseen la mutación en *nox*c poseen un fenotipo de pelo radical corto (previamente reportado) y los niveles de ROS se encuentran significativamente reducidos. Cuando se midieron los niveles de Ca^{2+} en la mutante mediante el cruzamiento de *nox*c-1 con una línea transgénica que expresa el biosensor YC3.6 se observó que los niveles de Ca^{2+} se encontraban significativamente reducidos en la mutante desde el inicio del desarrollo de los pelos radicales. Además, fenotípicamente el gradiente de Ca^{2+} no es tan evidente como en plantas Wt Col-0. Esto nos demuestra que la producción de anión O_2^- por parte de la NOXC es fundamental para la activación de canales de Ca^{2+} que permitan la entrada de Ca^{2+} hacia el citoplasma celular (**Fig. 1D**). Por otro lado, estos resultados reafirman la hipótesis de una retroalimentación positiva entre ROS y Ca^{2+} aunque el mecanismo es aún desconocido.

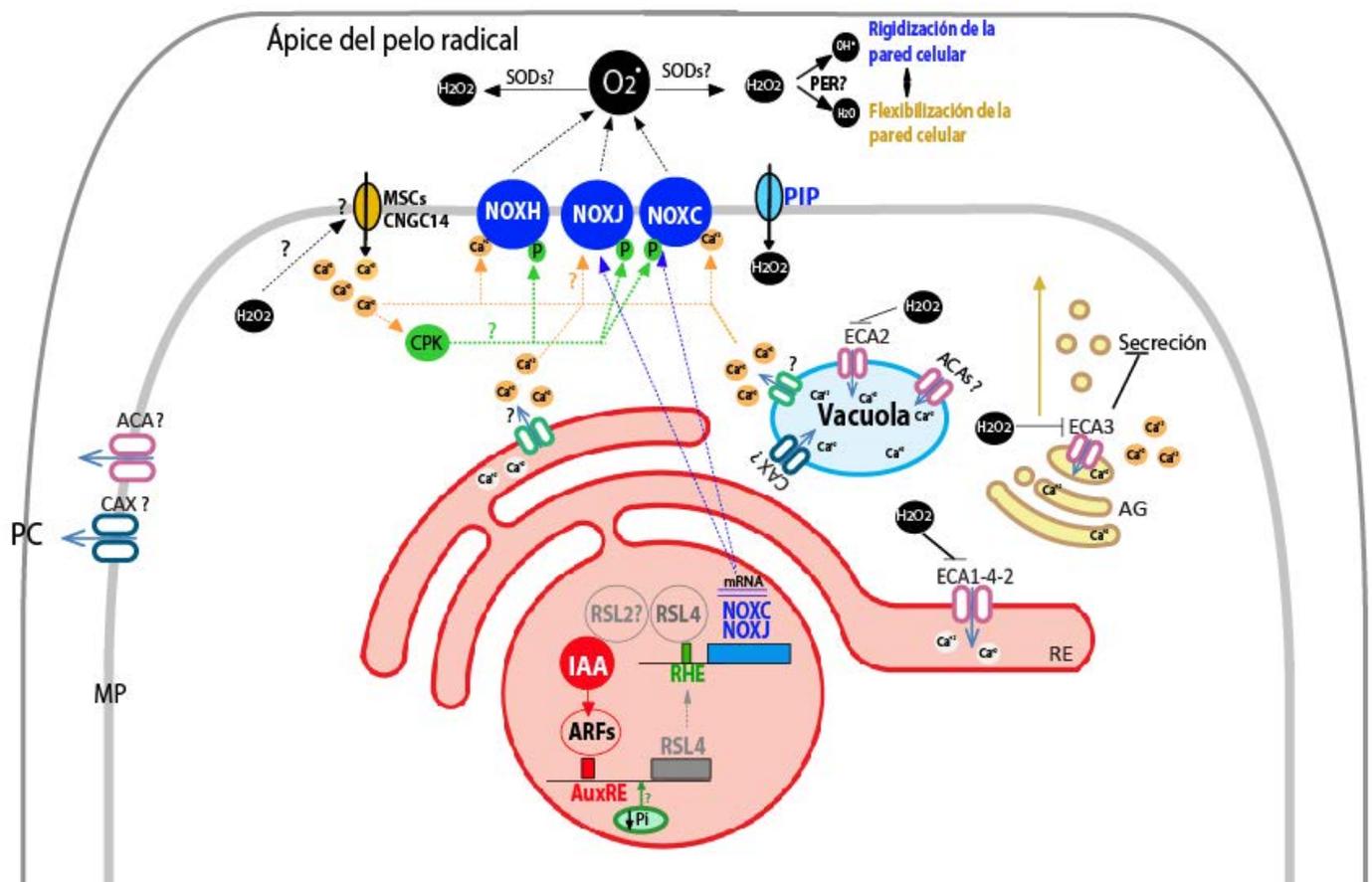


Figura1D: Modelo propuesto de regulación del crecimiento mediado por ROS y Ca²⁺. Se resumen los principales resultados obtenidos en este trabajo. Se observan todos los componentes propuestos en la regulación del crecimiento polarizado y la interacción entre ellos. PC=Pared celular. MP=Membrana plasmática.

Ensayos con inhibidores de acuaporinas demuestran que el H₂O₂ producido en el apoplasto celular es transportado por acuaporinas tipo PIP y que este transporte sería necesario para la activación de los sistemas de transporte de Ca²⁺ (Fig. 1D). Además, la activación de los sistemas de transporte de Ca²⁺ podría ser directa debido a la oxidación de residuos claves que regulan la actividad del transportador o posiblemente indirectamente, en donde intervengan otras proteínas como quinasas en la que su actividad esté regulada por el estado oxidativo de la célula [65, 67] como es el caso de OX11. En mamíferos, los VGCs son dependientes del estado oxidativo de la célula debido a dos residuos de cisteínas que se encuentran en el poro del canal [220]. Es poco probable que ROS esté regulando los niveles de Ca²⁺ asociados al crecimiento polarizado ya que, como se demostró, los VGCs no estarían involucrados en el crecimiento de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. A pesar de esto, trabajos previos muestran que ANNs (que posiblemente formarían parte de la familia VGCs) son capaces de formar poros en la membrana plasmática que permiten el pasaje de Ca²⁺ a través de la membrana celular y que esto es dependiente de H₂O₂ [137]. Por otro lado, el estado redox de residuos específicos de cisteína de SERCA en mamíferos mostraron ser importantes en la función enzimática, por lo que modificaciones de estos residuos podrían resultar en la inhibición/activación de la proteína [221]. Compuestos oxidante de tiol y ROS inhibe la actividad de bombear Ca²⁺ de las SERCA, mientras que agentes reductores incluyendo ditiotretitol y GSH estimulan a SERCA. En este modelo, la cys674 pareciera jugar un papel muy importante en la actividad de SERCA [222]. Este residuo de cisteína se encuentra conservado en ECA2 y en ECA3 (Anexo 1). Además, si se analiza la secuencia de aminoácidos de las ECAs se observa que posee gran similitud con SERCA de mamíferos (49-55% de identidad) y que tiene numerosos residuos de cisteína potencialmente oxidables. Además, para que SERCA funcione correctamente requiere de la hidrólisis de ATP y ROS ha

demostrado prevenir la unión de SERCA con ATP desacoplando la hidrólisis de ATP de la actividad de bombeo de Ca^{2+} [221]. Teniendo en cuenta estos estudios previos se podría hipotetizar que los niveles de ROScit serían capaces de regular la actividad de las ECAs, afectando la actividad de la proteína y consecuentemente afectando la relación en los niveles de Ca^{2+} cit con respecto a Ca^{2+} dentro de los reservorios intracelulares. Cuando los niveles de ROScit aumentan estos inhibirían el bombeo de Ca^{2+} hacia los reservorios intracelulares, favoreciendo la acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma (**Fig. 1D**).

Por motivos evolutivos, es común que numerosas proteínas tengan funciones redundantes en *Arabidopsis thaliana*. A pesar de que la NOXC no pareciera tener función redundante con el resto de las NOXs, NOXH y NOXj parecieran tener funciones redundantes ya que es necesario que ambas estén mutadas para observar una disminución de la longitud del pelo radical. Teniendo esto en cuenta, se quiso demostrar porqué un único tipo celular requeriría tres NOXs diferentes para alcanzar el crecimiento. Se realizaron mediciones detalladas en las etapas iniciales en donde comienza la diferenciación celular hasta que el pelo radical alcanza una longitud de aproximadamente de $250\mu\text{m}$ y se determinó que las NOXs actuarían de manera secuencial en la producción de anión O_2^- asociada al crecimiento. Para corroborar esta hipótesis se debería realizar ensayos con líneas reporteras o ensayos de PCR en tiempo real de manera de ver que la transcripción de las diferentes NOXs se enciende en diferentes estadios del desarrollo.

La presencia de ROScit o niveles detectables del mismo no pareciera ser fundamental para la iniciación del desarrollo de los pelos radicales. Cuando se incubaron plantas mutantes de *nox-1* con el inhibidor de las NOXs, VAS2870, no se pudo detectar disminución en la longitud del pelo radical pero los niveles de ROS se encontraban significativamente disminuidos, incluso en algunos pelos no se detectó ROS. Podría ser que la diferenciación celular, la determinación del tipo celular y el comienzo del desarrollo del pelo sean independientes de la producción de ROS y que estén determinadas por otros componentes. Hay que tener en cuenta que existe la posibilidad que niveles bajos, indetectables por el sistema de medición utilizado estén presentes y sean suficientes para poder desencadenar el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

El H_2O_2 es considerado un segundo mensajero ya que desencadena numerosos eventos río abajo y su concentración se encuentra estrictamente controlada. Exceso en los niveles de esta molécula desencadena muerte celular programada, es por esto que se hipotetiza que las actividades de las enzimas productoras de ROS están altamente reguladas a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional y que la perturbación en cualquiera de estos niveles modifican el crecimiento en los pelos radicales [223]. El H_2O_2 en el apoplasto celular podría estar participando del *cross-linking* de glicoproteínas necesarias para la formación de la pared celular mediado por las PEROXIDASA (PER). Las Peroxidasas apoplásticas (PERs) son enzimas bifuncionales capaces de oxidar compuestos fenólicos y proteínas estructurales de la pared celular (usando H_2O_2 como agente oxidante), que pueden en forma subsecuente forman enlaces covalente estables otorgándole rigidez a la pared celular y limitando el crecimiento. O bien, pueden producir ROS y provocar la ruptura no enzimática de polisacáridos de la pared permitiendo que ésta se relaje y expanda (**Fig. 1D**). Esta línea de investigación forma parte del trabajo experimental de la tesis doctoral de la Lic. Eliana Marzol en el laboratorio del Dr. José M. Estevez.

Auxinas en el crecimiento polarizado

Como se estableció previamente las auxinas son fitohormonas que promueven la diferenciación y el desarrollo de los pelos radicales. Se realizaron numerosos experimentos utilizando la molécula más abundante y activa de las auxinas (IAA) debido a su implicancia de estas en el crecimiento polarizado. Además, con la finalidad de revertir el fenotipo observado en las mutantes *nox*s y determinar si estas son necesarias para mediar la respuesta de los pelos radicales a auxinas,

se agregó 100nM a 5µM de IAA en el medio de crecimiento donde crecen la simple mutante *nox-1* y la doble mutante *noxh-1 noxj-2*. Cuando se agrega 100nM de IAA en el medio que crece la simple mutante *nox-1* se observa una reversión leve del fenotipo exponiendo que la respuesta de los pelos radicales a auxinas es medida por esta enzima. Por otro lado, la doble *noxh-1 noxj-2* mostró una reversión total del fenotipo, demostrando que la respuesta a IAA es independiente de estas y que mediante mecanismos desconocidos IAA es capaz de revertir el fenotipo observado en la doble mutante. Un mecanismo por el cual la doble mutante recupera la longitud y los niveles de ROS normales de pelos radicales de plantas Wt Col-0 podría ser a que IAA estimula la transcripción, expresión y/o actividad de la NOXC y que ésta sería capaz de suplantar la actividad de NOXH y NOXJ. Por otro lado, estas últimas dos no podrían suplantar totalmente la actividad de NOXC en los pelos radicales, ya que cuando la NOXC no está presente no es posible la recuperación del crecimiento polarizado mediado por IAA.

Previamente a este trabajo se había establecido que las auxinas regulan las respuestas principalmente regulando la transcripción de genes y también puede tener efectos a nivel no genómico (no mediados por la transcripción de genes), aunque estos últimos no se encuentran tan estudiados. En esta tesis se estableció que la respuesta de los pelos radicales a esta hormona está mediada por la NOXC y por ROS, por lo que se realizaron experimentos de manera de establecer si existía una conexión entre la regulación transcripcional de esta hormona y ROS. Por otro lado, esta hormona podría estimular la actividad de la NOXC y la producción de ROS mediante mecanismos postraduccionales, pero experimentos a tiempos cortos con el biocensor *Hyper* y con H₂DCFDA demuestran que no hay efectos en los niveles de ROS ni en H₂O₂cit en el citoplasma celular durante los 15 primeros minutos luego del agregado de la hormona. Estos resultados afirman la idea de un efecto a nivel transcripcional de la hormona. Además, experimentos en que las plantas crecen en un medio con 100nm-5µM de IAA muestran que los niveles de ROScit se mantienen elevados en etapas avanzadas del desarrollo en los pelos radicales. Es decir, que en plantas que crecen en un medio control, a cierta longitud del desarrollo de los pelos radicales (aproximadamente 600µm) los pelos cesan sus actividades fisiológicas de crecimiento por algún estímulo desconocido, detienen la producción de ROS y se pierde el gradiente de Ca²⁺. Cuando las plantas crecen en un medio con IAA en esta etapa los pelos radicales mantienen toda su maquinaria activa hasta longitudes superiores (aproximadamente 800µm). Estos resultados dan indicio que la regulación de IAA es debido a que de alguna manera la hormona estimula que el sistema de crecimiento polarizado siga encendido por más tiempo.

Previamente se había establecido que la respuesta de las plantas a auxinas y a Pi en el medio es mediada por el factor de transcripción (FT) de la gran familia bHLH RSL4 [3]. Este es considerado un regulador maestro de la diferenciación y desarrollo de los pelos radicales. Además, en pelos radicales se expresan otros FTs de la misma familia que con funciones similares con RSL2, RSL1 y RHD6 [224]. Las simples mutantes de *rs/2-1*, *rs/4-1* y la doble mutante *rs/4-1 rs/2-1* muestran fenotipo de pelo corto y los niveles de ROS significativamente reducidos en comparación con plantas Wt Col-0. A pesar de haber sido demostrado que RSL4 media la respuesta de los pelos radicales a auxinas [3], cuando se crecen mutantes *knock out* de *rs/4-1* o de *rs/2-1* en un medio conteniendo 100nM de IAA se observa una recuperación del fenotipo de pelo corto y la recuperación de los niveles de ROS a niveles comparables con plantas Wt Col-0. Esto no ocurre cuando ambos se encuentran mutados. Estos resultados indicarían que RSL4 y RSL2 tendrían funciones redundantes aunque esto no coincide con lo reportado en la bibliografía [83](Yi et al 2010). Por otro lado, ensayos de CHIP muestran RSL4 es capaz de interactuar con al menos dos sitios en el promotor de *NOXC* y con al menos un sitio en el promotor de la *NOXJ* (**Fig. 1D**). Mediante el análisis de transcriptos por PCR en tiempo real de la *NOXC* se determinó que esta interacción estimula la transcripción de la *NOXC* (**Fig. 1D**) y probablemente de la *NOXJ* también. Se observaron niveles de transcriptos normales de *NOXC* cuando *rs/2-1* se encuentra mutado, mostrando que RSL2 no regularía la transcripción de la *NOXC*. Además,

estudios previos muestran que la expresión de RSL2 disminuye por el agregado de auxinas en el medio de crecimiento de las plantas [3]. Aunque esto último ocurre cuando RSL4 no se encuentra mutado. Teniendo en cuenta que RSL4 es capaz de auto regular sus niveles de transcripción, se deberían realizar estudios para determinar que suceden con los niveles de expresión de RSL2 cuando se encuentra mutado *rsl4*, tanto en condiciones normales como cuando se encuentran niveles elevados de auxinas en el medio de manera de descartar una posible regulación de RSL2 mediada por RSL4.

Teniendo en cuenta que RSL4 y RSL2 son necesarios para mediar la respuesta a auxinas surge la pregunta cómo estos son regulados por esta hormona. Estudios previos muestran que en presencia de IAA los niveles de transcriptos de RSL2 disminuyen [3]. A pesar de que no se pueden descartar regulaciones post-traduccionales en este trabajo se demostró que ARF5 es capaz de interactuar con al menos 5 sitios del promotor de RSL4 y que esta interacción resulta en un aumento en los niveles de transcripción de RSL4 (**Fig. 1D**). Además, la sobre-expresión de ARF7 y ARF8 mostraron ser capaces de estimular la transcripción de RSL4 por lo que la actividad de estos ARFs parecen ser redundantes. Líneas reporteras mostraron que ARF7 y ARF5 se expresan en pelos radicales. Debido a que otros FTs fundamentales para el desarrollo de los pelos radicales como RSL4 se acumulan en células de la epidermis en la zona de elongación antes de la aparición de los pelos radicales es esperable que los diferentes ARFs se acumulen en esta zona también antes de la aparición de los pelos radicales como se observa en ARF5 el cual se expresa en células meristemáticas y al igual que ARF8 en células de la epidermis de la zona de elongación. Por otro lado, se hipotetiza que ARF19 podría estar involucrado también debido a su patrón de expresión y debido a que se encuentra asociado al desarrollo de raíces laterales otro fenotipo de respuesta a auxinas. Es importante recalcar que todos los ARFs incluidos en este estudio demostraron en ensayos previos [96] ser activadores de la transcripción lo cual es consistente con lo observado en esta tesis. Análisis bioinformáticos muestran que el promotor de *NOXC* posee cuatro sitios AUX-RE por lo que no se puede descartar que en presencia de auxinas la transcripción esté regulada por la interacción directa de diferentes ARFs con el promotor de *NOXC*.

Todos estos resultados demuestran una conexión molecular a nivel transcripcional entre auxinas, las NOXs y en consecuencia con los niveles de ROScit y el mantenimiento de estos (**Fig. 1D**). Además, se observó variaciones en los niveles de Ca^{2+} cit en experimento a tiempos corto, mostrando una regulación pos-traducciona por parte de las auxinas. Previamente se estableció que esta hormona no modifica las oscilaciones de Ca^{2+} en la célula [215] aunque en este trabajo se observó que los niveles de Ca^{2+} se encuentran disminuidos en plantas que crecen en un medio con $5\mu M$ de IAA. Por otro lado, se observó una disminución en los niveles de H_2O_2 y esto es consistente con la teoría de la retroalimentación entre H_2O_2 , en donde la disminución de Ca^{2+} en este caso parece preceder a la de H_2O_2 . A pesar de esto, se observaron niveles elevado de ROScit que se mantienen hasta etapas tardías del desarrollo de los pelos radicales. Como se mencionó previamente la sonda H_2DCFDA es oxidada por todas las especies reactivas de oxígeno, es probable que este aumento en los niveles de ROS se deba a un aumento en los niveles de otras ROS aparte de H_2O_2 . Además, de alguna manera la disminución de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático estarían relacionados con la estimulación del crecimiento de los pelos radicales.

Fosfato inorgánico (Pi) en el crecimiento polarizado

Debido a la función de los pelos radicales en la absorción de agua y de nutrientes, el crecimiento polarizado se encuentra regulado por la disponibilidad de diferentes nutrientes necesarios para la planta como la disponibilidad de fosfato inorgánico (Pi). Estudios previos demuestran que la privación de Pi en el medio de crecimiento de las plantas estimula el crecimiento polarizado de los pelos radicales y que el exceso de este provoca un acortamiento de los pelos

(inhibición del crecimiento polarizado). En este trabajo se pudo determinar que este efecto estaría mediado por una disminución en los niveles de ROS, de H_2O_2 y de Ca^{2+} citoplasmático. No se ha determinado como ocurre esto, ensayos a tiempos cortos son necesarios para determinar si esta regulación es a nivel genómico o si es postraduccional o ambas. Estudios previos demuestran que la respuesta de los pelos radicales a las diferentes concentraciones de Pi en el medio estaría mediada por el FT RSL4 por lo que la respuesta podría estar muy relacionada con la vía de respuesta a auxinas. En este trabajo proponen que RSL4 actuaría coordinando señales endógenas como RHD6 y RSL1 y señales exógenas como aquellas coordinada por PHR1, PHL1, LPR1 y LPR2. Se demostró que LPR1, LPR2 y PHR1 median la respuesta de la raíz a la ausencia de Pi en el medio. PHR1 actuaría estimulando la transcripción de genes necesarios para la respuesta de la planta a Pi. Todas estas señales definirían la cantidad de RSL4 sintetizada al inicio de la elongación de los pelos radicales y esto determinaría la longitud final del pelo radical [3, 225]. Teniendo esto en mente posiblemente FTs regulados por la privación de Pi como PHR1 serían capaces de activar la transcripción de *RSL4* (ya que posee un sitio P1B5 de unión de PHR1 y PHL1) [130] y éste a las *NOXs* generando una conexión molecular entre la respuesta de la planta a privación de Pi y ROS. Además, no habría que descartar una posible regulación directa de Pi en la transcripción de las *NOXs*. Por otro lado, se observó en este trabajo que cuando las plantas crecen en un medio con $5\mu M$ de IAA y con $2,5mM$ se observó un fenotipo intermedio al observado en los tratamientos individuales. Esto nos da idea de que las auxinas son capaces de revertir parcialmente la inhibición ejercida por el exceso de Pi.

Transporte de Ca^{2+} en el crecimiento polarizado

La información disponible demuestra una retroalimentación entre Ca^{2+} y ROS en donde ambos componentes son mutuamente dependientes. En esta conexión se encuentra más claro como Ca^{2+} es capaz de regular la producción de anión O_2^- por parte de las *NOXs* pero no como ROS y en particular la molécula señal más abundante y más estable como lo es el H_2O_2 es capaz de regular el transporte de Ca^{2+} . Además, no se sabe cuál de estos componentes se encuentra río arriba o si existen algún tipo de regulación por una vía independiente de ROS y Ca^{2+} . Para entender esta interacción y como los sistemas de transporte regulan y son regulados por ROS se realizó una búsqueda fenotípica con la finalidad de identificar los sistemas de transportadores involucrados en el crecimiento polarizado. Para esta búsqueda se utilizaron numerosos compuestos farmacológicos que actúan de manera específica activando o inhibiendo específicamente una familia de transportadores de Ca^{2+} . La utilización de inhibidores/activadores químicos tiene la ventaja de que es una herramienta sencilla, realizable a corto tiempo e inhibe todos los miembros de una familia salteando el problema de la redundancia genética en *Arabidopsis thaliana*. La desventaja es que a pesar de ser bastantes específicos de la familia de transportador estudiada estos podrían tener efectos secundarios inespecíficos y que la consecuencia del fenotipo asociado fuese por este efecto. A pesar de usar concentraciones bajas para evitar efectos secundarios en otros tejidos que no sean específicamente los pelos radicales, estos compuestos podrían afectar otros tejidos o estadios del desarrollo de la planta (ejemplo: germinación) afectando indirectamente el crecimiento polarizado. Es por esto que además de la utilización de compuestos farmacológicos se utilizaron herramientas genéticas (mutantes insercionales de T-ADN) independientemente de los resultados farmacológicos.

Las familias de transportadores que contribuyen positivamente a las concentraciones de Ca^{2+} cit y que mostraron tener una función en el crecimiento polarizado fueron los MSCs y los CNGCs (**Fig. 1D**). Mediante ensayos farmacológicos, los MSCs mostraron ser reguladores negativos del crecimiento polarizado. Cuando *spider* se encontraba en el medio en el cual crecen las plantas los pelos radicales se extendían más y los niveles de ROS se encontraban significativamente aumentados. No se pudo medir los niveles de Ca^{2+} debido a la falta de disponibilidad del inhibidor. Es necesario para establecer una relación entre ROS y Ca^{2+} observar si los niveles/oscilaciones de Ca^{2+} se ven

afectadas en presencia de *spider*. Debido a que los MSCs son una gran familia con numerosos miembros dentro de esta, era esperable que existiera una gran redundancia genética dentro de esta. No se pudieron detectar mediante el aislamiento de mutantes insercionales los MSCs involucrados en el crecimiento polarizado de *Arabidopsis thaliana*. A pesar de esto, debido a que la deformación mecánica que sufren los pelos radicales durante el crecimiento en consecuencia de la presión de turgencia ejercida por la vacuola (la cual es fundamental para el crecimiento) y a los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos se hipotetiza que los MSCs serían requeridos para controlar el crecimiento polarizado.

Por otro lado, los CNGCs mostraron estar involucrados en el crecimiento polarizado y durante la realización de esta tesis esto fue confirmado (**Fig. 1D**). En este trabajo mostraron que CNGC14 es capaz de transportar Ca^{2+} y que es fundamental para mantener los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos durante el crecimiento polarizado [152]. El fenotipo observado en este trabajo (pelo corto, cuando la planta crece dentro del medio) es diferente al observado en este trabajo, aunque las condiciones de crecimiento son completamente diferentes. No se logró establecer una relación entre ROS y Ca^{2+} asociada a canales CNGCs ya que no se realizaron mediciones de los mismos.

Los VGCs y los GLRs no mostraron estar involucrados en el crecimiento polarizado de los pelos radicales ni en la retroalimentación entre ROS y Ca^{2+} en las condiciones ensayadas en esta tesis. Estudios previos establecieron una conexión entre las ANNs, H_2O_2 y que estas eran fundamentales para el desarrollo de los pelos radicales [226] pero estos resultados no pudieron ser observados en las condiciones de crecimiento utilizadas en esta tesis.

ATPasas de Ca^{2+} en el crecimiento polarizado.

Dentro de las familias de transportadores de Ca^{2+} que remueven Ca^{2+} del citoplasma con gasto de energía mostraron estar involucradas en el crecimiento polarizado las ATPasas de Ca^{2+} tipo P11A y tipo P11B (**Fig. 1D**). Es importante mencionar que las primeras han sido implicadas en la regulación tanto de Ca^{2+} como de Mn^{2+} y las segundas únicamente de Ca^{2+} .

Las ACAs son autorreguladas por los niveles de Ca^{2+} y se expresan en diferentes localizaciones celulares como membrana plásmática, RE y vacuola. En plantas, las vacuolas son el principal reservorio de Ca^{2+} intracelular [227]. Debido a esto y a que las vacuolas ofrecen la fuerza necesaria para permitir el crecimiento polarizado, es intuitivo pensar que las ACAs estarían regulando el gradiente, los niveles de Ca^{2+} cit y dentro de la vacuola y en definitiva el crecimiento. El ensayo farmacológico con eosina mostró que la inhibición de las ACAs estimula el crecimiento polarizado. Pelos radicales de plantas *Wt Col-0* crecidas en un medio con eosina mostraron velocidades de crecimiento y longitudes mayores que en las plantas control. Además, se vieron afectadas levemente las oscilaciones de Ca^{2+} en los pelos largos, los niveles de Ca^{2+} cit no se modificaron por el tratamiento y la producción de ROS se mantuvo activa en etapas tardías del desarrollo de los pelos radicales (pelos de longitudes mayores de $500\mu\text{m}$). Estos resultados ponen en evidencia que los ACAs están involucrados en el crecimiento polarizado, pero no mediante la regulación de los niveles de Ca^{2+} cit, ya que estos no se vieron modificados en presencia de eosina. Es importante tener en cuenta, que eosina es un inhibidor de amplio espectro y que los efectos observados podrían ser en consecuencia de efectos secundarios. Es por esto **que para confirmar los resultados es necesario utilizar herramientas genéticas aislando mutantes insercionales de las bombas más expresadas en pelos radicales como ACA2 y ACA11**. Es importante mencionar que la localización subcelular de estas es diferente por lo que la función de cada una podría ser completamente diferente. ACA2 se encuentra en RE y su actividad es regulada tanto por CaM como por la fosforilación de su dominio N-terminal por la quinasa dependiente de Ca^{2+} CPK1, reafirmando que la actividad de ACA2 está regulada por los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos [200]. Como se puede observar tanto la regulación de las ACAs como de las NOXs es dependiente de Ca^{2+} y su fosforilación mediada por CPKs. Por otro lado, ACA11

se encuentra en las membranas de la vacuola por lo que quizás su función este más asociada con la acumulación de Ca^{2+} en el principal reservorio de Ca^{2+} de las plantas [228].

ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA (ECAs).

La inhibición de las ECAs mostró una inhibición del crecimiento polarizado de los pelos radicales, mostrando que estas son fundamentales para este. Cuando las ECAs son inhibidas específicamente mediante el uso de CPA se observa afectado el gradiente de Ca^{2+} observándose una acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma en la zona adyacente a la vacuola. Por otro lado, la inhibición a largo plazo provoca un descenso en los niveles de Ca^{2+} cit y la abolición completa de altas frecuencias en las oscilaciones de Ca^{2+} . Cuando se inhibe las bombas ECAs encargadas de la acumulación de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares, a largo plazo, se observó una disminución de los niveles de Ca^{2+} cit demostrando que los reservorios intracelulares contribuirían a los niveles de Ca^{2+} cit y al gradiente del mismo. Esto repercute directamente o indirectamente en la producción de ROS ya que los niveles de ROS se ven afectados y disminuidos. Esta disminución puede ser debido a que la actividad de las NOXs puede ser regulada directamente por la unión de Ca^{2+} en los dominios *EF-hands* [7]. La unión de Ca^{2+} en estos sitios estimula la actividad de las NOXs, si los niveles de Ca^{2+} cit son más bajos de lo normal posiblemente la actividad de estas enzimas se encuentre disminuida. Además, la actividad de estas enzimas es regulada por sitios de fosforilación en su extremo N-terminal susceptibles a quinasas dependiente de Ca^{2+} (CPKs, insertar cita). La actividad quinasa de estas proteínas es regulada por los niveles de Ca^{2+} , por lo que posiblemente a bajos niveles de Ca^{2+} no sean capaces de fosforilar a las NOXs y la actividad de estas últimas sea disminuida [31, 34]. Ensayos con plantas que expresan el biocensor *Hyper* en un medio que contiene $10\mu\text{M}$ de CPA son necesarios para corroborar como este afecta los niveles de H_2O_2 cit y establecer una relación completa entre la regulación de Ca^{2+} y H_2O_2 por parte de las ECAs.

Por otro lado, se observó que CPA afecta los niveles de Ca^{2+} dentro del RE y posiblemente afecte también la homeostasis de Ca^{2+} de otras organelas celulares como el aparato de Golgi, ya que ECA3 se encuentra en las membranas de esta. Estudios previos que monitorean la actividad peroxidasa como herramienta para determinar la cantidad de proteínas apoplásticas sugieren que las mutantes de *eca3* poseen afectado el proceso secretorio [193]. Debido a esto, se probó si CPA afecta el proceso secretorio mediante la utilización de líneas transgénicas transformadas con construcciones que codifican para proteínas con uno o numerosos dominios tipo extensinas fusionadas a la proteína fluorescente roja *TOMATO*. En condiciones normales esta proteína es secretada al apoplasto celular en bajas concentraciones. En presencia de CPA el proceso secretorio se vió afectado, se observó acumulación de proteínas con dominios tipo extensinas en el apoplasto y en la pared celular. De alguna manera la disminución de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares, en el citoplasma y la ausencia de las oscilaciones estimularían la secreción de proteínas. La inhibición del crecimiento polarizado podría ser debido a una excesiva rigidización de la pared celular evitando la extensión celular. Como se estableció previamente para favorecer el crecimiento polarizado son necesarios momentos de flexibilización y rigidización de la pared celular. La flexibilización permitiría la elongación celular debido a la presión de turgencia de la vacuola y la rigidización evitaría la lisis celular. Por lo que el mecanismo de crecimiento está altamente regulado y una perturbación en este (como la excesiva secreción y rigidización de la pared) obstruiría el crecimiento de los pelos radicales.

A pesar de que se ha propuesto que la vacuola es el principal reservorio intracelular de Ca^{2+} , es evidente que para mantener las oscilaciones de Ca^{2+} y el gradiente de Ca^{2+} citoplasmático es necesario la homeostasis de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares como el RE y el aparato de Golgi (**Fig. 1D**). Dentro de la familia de las ATPasas de Ca^{2+} tipo PIIA de *Arabidopsis thaliana* se encuentra 4 miembros y todos se encuentran altamente expresados en pelos radicales. Las simples mutantes insercionales de *eca2-2*, *eca3-2* y la doble mutante *eca2-2 eca3-2* presentan fenotipo de pelo largo.

Este fenotipo es opuesto al observado cuando las plantas crecen en CPA, esto podría ser debido a que CPA afecta a todas las ECAs y quizás si se lograra obtener un cuádruple mutante *eca1 eca2 eca3 eca4* se obtendría un fenotipo similar al obtenido con CPA. Además, cada una de las ECAs podría tener funciones en la célula diferente ya que poseen localizaciones sub-celulares diferentes y la homeostasis de Ca^{2+} dentro de estas organelas podría afectar numerosos y variados procesos celulares como el mantenimiento de las oscilaciones o la secreción celular (**Fig. 1D**). La sobre-expresión de ECA1 afectó el crecimiento polarizado estimulando su elongación y obteniendo pelos radicales más largos. ECA1 y ECA4 se encuentran en las membranas del RE [190] (**Fig. 1D**). Estas habrían surgido como un evento de duplicación por lo que los patrones de expresión son altamente conservados por lo que es posible que posean funciones redundantes. Por otro lado, ECA2 se encuentra expresada en el RE y posiblemente en vacuola, por lo que también afectaría la homeostasis de Ca^{2+} dentro de estas organelas (**Fig. 1D**). La disminución de los niveles de Ca^{2+} en el RE observados en presencia de CPA es consistente con el hecho de que 3 de los miembros de las ECAs se encuentran regulando la homeostasis de Ca^{2+} del RE. La mutante insercional *eca2-2* mostró ser una mutante *knock out* y la ausencia de esta mostró estimular la elongación de los pelos radicales y los niveles de ROS son mantenidos en etapas avanzadas del desarrollo del pelo radical.

La mutante *eca3-2* mostró un fenotipo de pelo radical largo en comparación con Wt Col-0. Además, los niveles de ROS se mantuvieron en etapas avanzadas del desarrollo del pelo en donde en Wt Col-0 ya no se detecta producción de ROS. Además, esta mostró poseer alteradas las oscilaciones de Ca^{2+} cit en pelos cortos y largos y los niveles de Ca^{2+} cit disminuidos en pelos de longitudes mayores a 350 μm . No se detectaron alteración en los niveles de H_2O_2 cit. La variación de los niveles de Ca^{2+} cit no pareciera afectar los niveles de H_2O_2 cit demostrando que existen mecanismos por los cuales Ca^{2+} puede ser regulado independientemente de H_2O_2 . Además, se podría hipotetizar que existe una ventana en las concentraciones de Ca^{2+} las cuales no afectarían los niveles de H_2O_2 cit. Cuando se analizaron los niveles de transcritos mediante RT-PCR en de la mutante *eca3-2* se detectaron transcritos de *ECA3* normales. Con la finalidad de determinar si los transcritos detectados estaban completos o si eran truncos se realizó PCR en tiempo real con cebadores diseñados para que amplifiquen de manera específica el final del transcripto. Se determinó que no existía diferencia en los niveles de transcripto y que el transcripto estaba completo. Finalmente analizando donde cae la inserción del T-ADN en la línea mutante *eca3-2* se detectó que quizás el transcripto era trunco al comienzo y que la traducción iniciaría en un ATG sustituto en la secuencia del transcripto. Aunque debido a dificultades técnicas no se pudo comprobar esto. Es necesario determinar mediante secuenciación el sitio exacto de inserción del T-ADN y como afecta este a la transcripción de *ECA3*. Por otro lado, se deberían realizar los mismos ensayos con otro alelo mutante de *eca3* y ensayos de complementación del fenotipo para corroborar que lo observado es debido a *ECA3*. Todos estos ensayos se encuentran en transcurso.

Mediante ensayos utilizando SPIM se determinó que las oscilaciones incluidas en la señal de Ca^{2+} en la mutante *eca3-2* en pelos largos y pelos cortos difieren con respecto al Wt Col-0 (Tiempo total de medición: 15min). A pesar de poseer diferencias tanto en la amplitud como en las frecuencias incluidas en la transformada de Fourier no se detectó diferencias en las velocidades de crecimiento de los pelos radicales. Con la finalidad de estudiar con más detalle la elongación de los pelos radicales de *eca3-2*, se realizó un análisis del crecimiento y de las oscilaciones de Ca^{2+} en pelos radicales de longitudes mayores a 400 μm durante 1 hora. Se observó los patrones de crecimiento de los pelos individuales y se determinó que las velocidades de crecimiento de los pelos radicales de *eca3-2* variaban en función del tiempo y que había una mayor proporción de pelos radicales de la mutante *eca3-2* que eran capaces de recuperar el crecimiento luego de que este se detuvo en comparación con el control. Es por esto que el fenotipo de pelo largo de la mutante no se debería a cambios en las velocidades de crecimiento promedio si no a la capacidad de los pelos de recuperar el crecimiento luego de que este se detuvo. Esto podría deberse a las diferencias observadas en la oscilaciones y

probablemente a variaciones en el sistema secretor celular ya que estudios previos demostraron que la secreción de proteínas en la mutante *eca3* se encontraba aumentada [193] y es posible que esto esté pasando en la mutante *eca3-2* también. Para responder esto se podría realizar una cruce con la línea transgénica que expresa la construcción *35S::EXT2_TOMATO* o *35S::EXT11_TOMATO* previamente explicadas. Podría ser que un leve aumento (sin llegar a la rigidización constante de la pared celular) en la secreción de proteínas o glicoproteínas necesarias para el crecimiento celular estimulen el crecimiento del pelo radical.

Comparando los resultados obtenidos de plantas creciendo en un medio que contiene CPA o eosina se puede decir que las ECAs son esenciales para el desarrollo de los pelos radicales, no así las ACAs las cuales parecieran tener un rol regulando la velocidad de crecimiento, pero si estas no se encuentran activas el pelo es capaz de desarrollarse normalmente.

Materiales y métodos

1. Material vegetal

Las semillas fueron esterilizadas usando una solución de lavandina 30% por 15 minutos. Luego se procedió a lavarlas 2 veces con agua grado *Mili-Q* estéril. Las semillas estériles se suspendieron en agua *Milli-Q* y se vernalizaron por 24-48hs a 4°C en oscuridad. Al cabo de este tiempo, fueron puestas en placas cuadradas de 120x120 mm con medio agar 0.8% (Duchefa) con sales Murashige & Skoog (MS) pH 5.8. Las placas se sellaron con cinta microporosa (que permite el intercambio gaseoso), y se colocaron verticalmente en una cámara de cría (*Biocontrol*; con alternancia de dos temperaturas entre un rango de 10 a 45°C, refrigeración por unidad condensadora, iluminación 80-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$, con control de fotoperiodo 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 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$), o bajo un ciclo de luz continua (dependiendo del experimento a realizarse posteriormente), por un lapso de entre 7-12 días. Las plántulas fueron luego transferidas a una mezcla de 3 partes tierra, 1 parte vermiculita, 1 parte perlita y 1 parte turba, más el agregado del fertilizante NITROFOSKA (N: 10%, F: 4%, P: 7%) y puestas a crecer nuevamente bajo un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad [229].

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* [230] (ABRC; <https://www.abrc.osu.edu/>). Las líneas mutantes de *msls* fueron cedidas por el grupo de la Dra. Elizabeth Haswell (Departamento de Biología – Universidad de St. Louis); la línea *cngc14-1* fue cedida por Gabrielle Monshausen (Departamento de Biología – Universidad del estado de Pensilvania). Las líneas de transposón *dspm* fueron cedidas por el Dr. Miguel Ángel Torres (Universidad Politécnica de Madrid - España)

1.a Mutantes insercionales de T-ADN.

La mutagénesis con T-ADN se basa en la inserción de un fragmento de ADN por medio de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que infecta a la planta causando tumores conocidos como "agallas" o "tumores del cuello", que crecen en la zona donde se unen la raíz y el tallo. Esta bacteria es capaz de insertar en el genoma de la planta genes que se encuentran en la región de su genoma denominada T-ADN el cual es un transposón. Mediante técnicas de Ingeniería genética, actualmente se puede modificar este T-ADN de manera de insertar en la planta secuencias de ADN conocidas y de interés. Este tipo de técnicas permitió obtener mutantes insercionales de T-ADN de casi todos los genes de *Arabidopsis thaliana* y permite generar plantas transgénicas con construcciones de interés de estudio.

En diferentes organismos, las mutantes han sido cruciales para descubrir y estudiar funciones génicas. *Agrobacterium* inserta al T-ADN de manera casi aleatoria en el genoma de la planta y al insertarse dentro de las regiones codificantes o regulatorias de un gen, ocasiona su interrupción o alteraciones en su regulación transcripcional. Por ejemplo, si el T-ADN cae en un exón es muy probable que se transcriba el gen, pero trunco dando lugar a un transcripto no funcional que posteriormente va a ser degradado (mutante insercional de T-ADN nula); si cae en alguna zona regulatoria del gen puede desencadenar la inhibición de la transcripción del mismo (mutante insercional de T-ADN nula), pero también la exacerbación de la transcripción. Esto último es debido que hay secuencias en las zonas regulatorias del gen que promueven la represión de la transcripción del gen, si el T-ADN irrumpe estas secuencias, la transcripción del mismo ya no se encontraría inhibida. Este tipo de estrategia es conocida como mutagénesis no dirigida y existen bases de semillas que han generado mutantes insercionales para casi todos los genes de *Arabidopsis thaliana* y se

puede acceder a estas líneas y estudiarlas mediante genética inversa. Una de estas bases es ABRC de la cual se adquirieron la mayoría de las líneas mutantes en esta tesis.

1.b Obtención de dobles, triples mutantes y mutantes transgénicos mediante cruzamientos.

Las dobles mutantes *eca3-2 eca2-2*, la triple *ann1 ann2 ann4* y las mutantes insercionales de T-ADN que expresan YC3.6 y *Hyper (eca3-2/Yc3.6, eca3-2/Hyper, noxc/YC3.6)* fueron obtenidas por cruzamiento colocando las anteras con polen de uno de las mutantes simples en los pistilos florales de la otra mutante. Luego se realizó una PCR de genotipo en la generación F2 para confirmar la presencia de los T-ADN correspondientes en estado homocigotas. Se chequeó la expresión del biosensor en la F2 mediante la observación de la fluorescencia del mismo.

2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de tejido vegetal de hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en tierra de aproximadamente de 2 semanas de edad. Se tomaron 2 hojas de tamaño mediano y se congelaron en nitrógeno líquido en tubos de 1,5 ml. Se molió el tejido dentro del tubo con émbolos de plástico y una vez reducido a un fino polvo, se procedió a agregar 500µl de buffer de extracción 2X CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA), se incubó en baño seco a 65°C durante 45 minutos. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó bajo campana 500µl de cloroformo. Posteriormente, la muestra se centrifugó por 10 minutos a 21000 G y se procedió a remover la fase acuosa (que es la que contenía el ADN) y trasvasarla a un tubo limpio de 1,5µl. El paso siguiente fue la precipitación del ADN, para esto se agregó 500µl de alcohol isopropílico frío y se centrifugó por 10 min a 21000G a 4°C. Se descartó el sobrenadante conservando el precipitado. A este se le agregó 500 µl de alcohol etílico con la finalidad de limpiarlo de sales. Se centrifugó durante 10 min a 18000G y se descartó el sobrenadante obtenido. Una vez finalizada la centrifugación, se descartó el alcohol, dejando secar el precipitado durante 10 minutos en baño seco a 50°C o durante 30 min en estufa a 37°C. Finalmente, se re-suspendió el precipitado en 50µl de agua Milli-Q [229]

2.a Genotipo de mutantes insercionales de T-ADN.

Para la identificación de líneas mutantes homocigotas de T-ADN, se extrajo ADN genómico con el protocolo descrito anteriormente. Luego se procedió a realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para comprobar la presencia del T-ADN en el gen estudiado 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 a la banda de la inserción, se utilizó un par de cebadores de los cuales el *forward* se anilla en la secuencia del transposón (T-ADN, cebador LBb1.3 *Salk institute*) y el cebador *reverse* se anilla en la secuencia del gen adyacente al sitio de inserción del transposón. Para amplificar la secuencia del gen Wt, se utilizó una pareja de cebadores donde tanto el *forward* como el *reverse* se anclan en la secuencia del gen (**Fig. 1M**). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 3mM Mg²⁺, 0,2mM dNTPs, 1U Taq polimerasa y aproximadamente 100nM de ADN. El programa de PCR utilizado fue: 94° por 5 min, (94°C por 45 seg, 57°C por 30 seg, 72° por 1 min 15 seg) x 35 ciclos, 72° por 10 min. En cada reacción de PCR se incluyeron 3 controles: ADN de una muestra Wt, ADN de una planta que anteriormente se había detectado la presencia del T-ADN y H₂O Milli-Q como control negativo. Los cebadores utilizados para cada genotipo fueron diseñados con el software *T-ADN Primer Design* (<http://signal.salk.edu/tADNcebadores.2.html>) y se encuentran detallados en la **Tabla M1**.

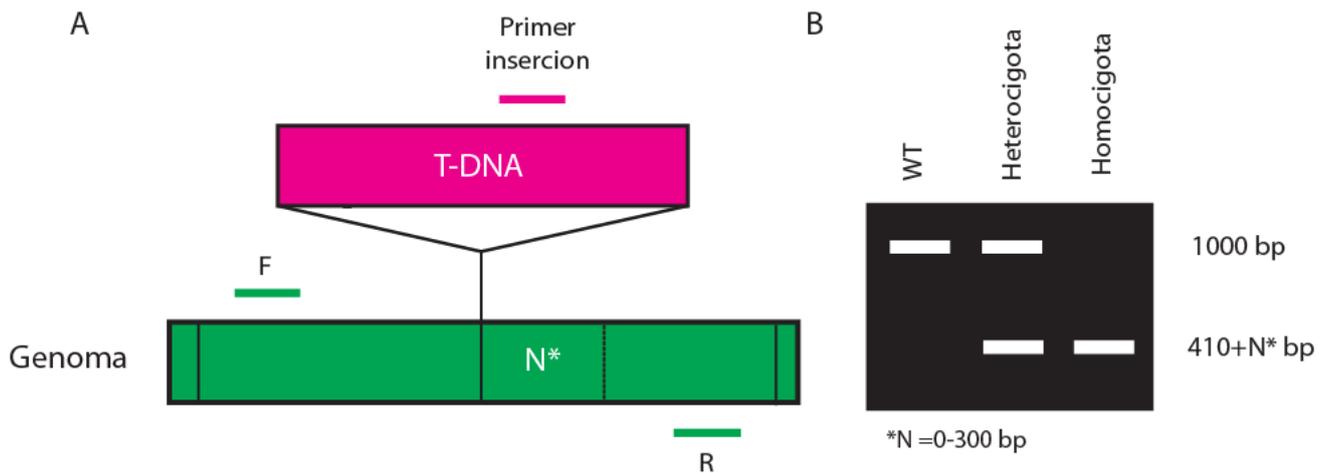


Figura 1M: Genotipo de mutantes insercionales. (A) Esquema de los cebadores utilizados en la PCR para determinar las líneas T-ADN homocigotas mutantes. Se muestran los 3 cebadores utilizados: el F (*forward*), y el R (*reverse*) que se anillan en la secuencia del gen, y el cebador específico para la inserción de T-ADN que se anilla en la secuencia del transposón. (B) Bandas esperadas para una planta Wt Col-0, heterocigota u homocigota para la inserción del transposón, en una corrida electroforética en gel de agarosa.

3. Análisis fenotípicos de pelo radicular

Para los análisis fenotípicos de largo de pelo, las semillas fueron colocadas en medio MS0,5X (*Sigma*) 0.8% de agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en placas cuadradas colocadas verticalmente, y puestas bajo un ciclo de luz continua de 10 días. Se tomaron fotos de las plántulas sin quitarlas de la placa, con una lupa estereoscópica OLYMPUS SZX7 con un aumento de 3.2X. Luego mediante el uso del programa *ImageJ* [231] 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 uno de estos 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 s.e.m).

4. Extracción de ARNm.

La extracción de ARNm de plántula entera se realizó mediante el método de RNAzol[®]. Para esto, se crecieron plantas de *Arabidopsis Thaliana* Wt Col-0, mutantes insercionales de T-ADN homocigotas y líneas transgénicas estudiadas (*eca2-2*, *eca3-2*, *nox*, *rsl4-1*, *rsl2-1*, Wt Col-0/*pEXP7::ARF5*, Wt Col-0/*pEXP7::ARF7*, Wt Col-0/*pEXP7::ARF8*) durante 12 días en placas con medio MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8. De cada genotipo de las mutantes y de las plantas transgénicas se colectó 100 mg de material biológico 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*. Se esperó 15 minutos y luego se procedió a centrifugar la muestra a 12000 g durante 15 minutos. Una vez finalizado la etapa de centrifugado, 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% y se centrifugó durante 3 minutos a 8000g. Finalmente se disolvió el ARNm en agua *Milli-Q* libre de RNAsas. Mediante electroforesis se corroboró la integridad del ARN obtenido (Agarosa 2%). Finalmente, se procedió a cuantificar el ARN extraído y a analizar la pureza del mismo mediante el uso del espectrofotómetro *Nanodrop* de Thermofisher, Invitrogen.

4.a Síntesis del ADN copia (cADN).

Para la síntesis de c-ADN se incubó durante 5 minutos a 72^o, 2µg del ARN extraído mediante el método previamente explicado con 1µl de oligodT (Thermofisher, Invitrogen) en un volumen final de 15µl. Se enfrió en hielo durante 5 minutos y se procedió a agregar el buffer de reacción 5X (Thermofisher, Invitrogen), 0.6mM dNTPs, 0,5 µl de la Retrotranscriptasa (Promega), 0.5 µl RNAasa out, se completó un volumen final de 25 µl con H₂O Milli-Q libre de RNAsas y se dejó incubando a 42°C durante 1h.

4.b Análisis de los niveles de transcripto por RT-PCR.

A partir del cADN proveniente de raíces crecidas durante 12 días, se realizó la amplificación por PCR de las secuencias correspondientes a los transcriptos de *ECA2*, *ECA3* 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 seg, 61°C por 30 seg, 72°C por 30 seg) x 35 ciclos, 72°C por 5 min.

4.c Análisis de los niveles de transcripto por PCR en tiempo real (qPCR).

A partir del cADN proveniente de raíces crecidas durante 12 días, se realizó la amplificación por PCR en tiempo real de las secuencias correspondientes a los transcriptos de *ECA3*, *RSL4*, *NOXC* 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 cebadores utilizados para cada transcripto fueron diseñados con el software *Beacon Designer*, *PREMIER Biosoft International* (www.premierbiosoft.com/molecular_beacons) (**Tabla 2M**). 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 seg, 61°C por 30 seg, 72°C por 30 seg) x 35 ciclos, 72°C por 5 min.

5. Medición de ROScit 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 ROS en las células. Una vez que entra en la célula se disocian los grupos acetato por parte de las estereasas 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. Esta sonda no es reversible, no es radiométrica y es oxidada inespecíficamente por todas las moléculas denominadas ROS.

Se crecieron plantas de *Arabidopsis thaliana* (Wt Col-0 y mutantes) en placas cuadradas con MS0.5X (*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 y el tiempo de exposición fue 80-500ms. Las imágenes se analizaron utilizando el programa *ImageJ*. Para medir los niveles de ROS, se seleccionó una región circular de interés dentro del citoplasma del ápice del pelo radical (ROI) y se calculó la media de las intensidades de los pixeles incluidos en el ROI. Los valores reportados son la media \pm error estándar.

6. Utilización de biosensores como sonda para la detección en tiempo real, reversible y radiométrica de Ca^{2+} y H_2O_2 .

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 [232]. Algunos ejemplos de estos biosensores son aquellos que detectan con una resolución espacio temporal muy alta en diferentes compartimientos sub-celulares muy bajas concentraciones de ROS [233, 234], Ca^{2+} [235-237] y H^+ [22, 238, 239]. Específicamente, una mirada dinámica de las oscilaciones de ROS es obtenida gracias al biosensor codificado genéticamente “*Hyper*” sensible a H_2O_2 [240]. *Hyper* consiste en una proteína fluorescente amarilla circularizada y permutada (cpYFP) que esta acoplada al dominio regulatorio y sensible a H_2O_2 de *Escherichia coli* OxyR (Fig. 2M). En presencia de H_2O_2 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 (Fig. 2M) [234]. Esto, permite utilizar esta sonda de manera radiométrica [233, 241]. Es importante recalcar que *Hyper* es sensible al pH celular.

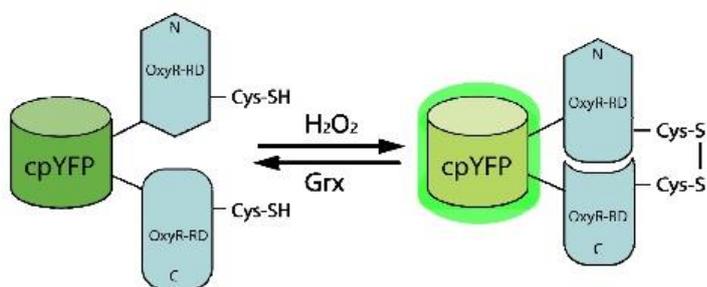


Figura 2M: Censor *Hyper*. Se observan los dos posibles estados de oxidación del dominio OxyR - RD del biosensor. A la izquierda se observa el estado reducido del mismo con una longitud de onda de excitación de 405nm, a la derecha se observa el estado oxidado y la excitación es a 488nm. Esquema extraído de Belousov et al. (2006). [234]

Para la estimación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} se utiliza el censored basado en la transferencia de energía de Förster por resonancia (FRET, *Förster Resonancy Energy Transference*) denominado *Cameleon* (YC, *Yellow camaleón*) 3.6 (YC3.6) [242, 243]. El sistema reportero YC consiste en proteína quimérica que incluye la proteína fluorescente Cian (CFP, *Cyan Fluorescent Protein*), un dominio calmodulina (CaM), un puente glicina-glicina, el dominio de unión a CaM de la cadena liviana de la quinasa de miosina (M13) y la proteína fluorescente amarilla (YFP, *Yellow fluorescent Protein*) (Fig. 3M). Cuando el Ca^{2+} (4 iones de Ca^{2+}) se une al dominio de la CaM provoca un cambio conformacional que permite un aumento de la eficiencia de FRET entre CFP y YFP (Fig. 3M). Se utilizará una nueva variante de YC, el camaleón YC3.6 [244], en la que el fluoróforo receptor es una versión circularmente permutada de la proteína fluorescente Venus en lugar de YFP. En comparación con YCs desarrollados anteriormente (como YC3.1), YC3.6 es igualmente brillante, pero con un rango dinámico 5-6 veces mayor. Además este biosensor puede ser expresado constitutivamente en el citoplasma (YC3.6); o en diferentes compartimientos sub-celulares como el RE (D4ER-YC3.6), ya que posee el péptido señal KDEL el cual impide que la proteína sea secretada del RE [245].

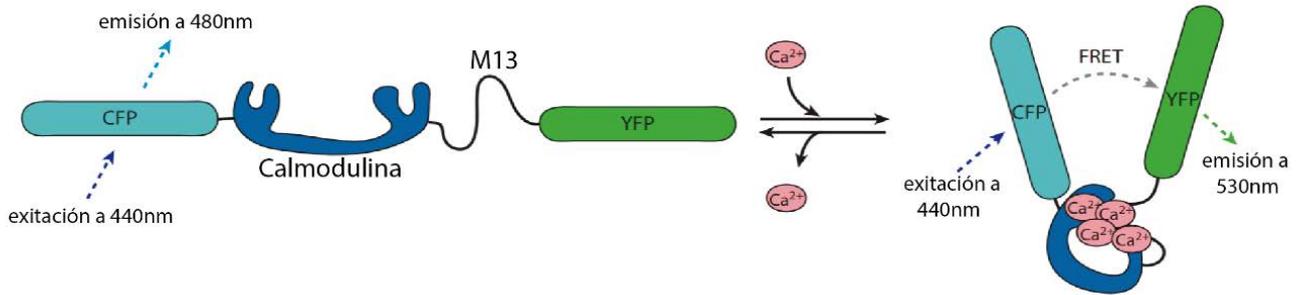


Figura 3M. Censor FRET de Ca^{2+} YC3.6. Se muestra la conformación abierta del sensor sin Ca^{2+} (izquierda) y en su conformación cerrada al unir Ca^{2+} (derecha). Esquema extraído y modificado de Swanson et al. (2011). [246]

6.a Determinación de los niveles de H_2O_2 citoplasmáticos mediante el uso del biosensor *Hyper*.

Se utilizaron plantas de 10 días que sobre- expresan el biosensor *Hyper*, las imágenes de los pelos radicales fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite y 1.2 de apertura numérica. El microscopio está equipado con un láser diodo de 405nm de longitud de onda y uno de argón con una longitud de onda de 488nm. El biosensor fue excitado con ambos láseres de manera secuencial y la emisión (516nm) fue colectada utilizando un espejo dicróico primario y el meta-detector del microscopio. Para los análisis a través del tiempo en el ápice del pelo radical se colectaron imágenes cada 6.25 segundos. Para medir los niveles de H_2O_2 , se utilizó el programa *ImageJ*. Se seleccionó un ROI circular en el citoplasma del ápice del pelo radical analizado y se cuantificó la media de la intensidad de los píxeles incluidos en el ROI a través del tiempo. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (UA) 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. Esta extensión compila la señal del biosensor en la línea trazada a través del tiempo y la gráfica una sobre la otra, generando una imagen en donde la primera línea representa la adquisición de la señal en el tiempo 1 y la última en el tiempo final del experimento. Por lo que, el *kymograph* representa de manera colorimétrica (escala de colores utilizada: *FIRE*) los niveles de H_2O_2 cit en la zona seleccionada (ápice celular) a través del tiempo, ya que este se encuentra representado en el eje Y.

6.b Determinación de los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos y en el retículo endoplasmático (RE) mediante el uso del biosensor *Camaleón* (YC3.6).

Se utilizaron plantas de 10 días que sobre- expresan este biosensor YC3.6 de localización citoplasmática previamente explicado y de localización subcelular de Retículo endoplásmico (D4ER YC3.6). Este último posee una versión de YC3.6 fusionado con el péptido de localización celular de RE (KDEL) [245].

Las imágenes de los pelos radicales fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite y 1.2 de apertura numérica. El biosensor fue excitado con un láser de diodo de longitud de onda de 405nm y la emisión del mismo a 505nm y a 516nm fue colectada en canales separados. Para los análisis a través del tiempo en el ápice del pelo radical se colectaron imágenes cada 3.13 segundos. Para medir los niveles de Ca^{2+} , se utilizó 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 píxeles incluidos en el ROI a través del tiempo. Los resultados se

expresaron como unidades arbitrarias (UA) de la relación entre la señal de FRET (516NM) sobre la obtenida en el canal de 505nm (Ca^{2+} FRET/405 UA). Para la obtención del *kymograph* se utilizó la extensión específica de *ImageJ: Multiple kymograph*. Se siguió el mismo procedimiento explicado en la **sección 6.a** de materiales y métodos. En este caso, el *kymograph* representa de manera colorimétrica (escala de colores utilizada: *FIRE*) los niveles de Ca^{2+} cit en la zona seleccionada (ápice celular) a través del tiempo, ya que este se encuentra representado en el eje Y.

6.c Microscopía de plano de iluminación selectiva (SPIM).

Técnicas de microscopía de epifluorescencia y confocal presentan numerosas limitaciones haciendo muy difícil su aplicación en tejido complejos como las raíces de las plantas. Además, la microscopía confocal no es útil para experimentos prolongados en el tiempo debido a los altos niveles de fototoxicidad que presenta y los tiempos elevados de adquisición de imágenes [21, 219].

En respuesta a estas limitaciones se desarrolló la microscopía de plano de iluminación selectiva (SPIM, *Selective Plane Illumination Microscopy*). En esta, se genera un haz de luz vertical muy fino (6-8 μm) el cual ilumina una muestra fluorescente y la emisión de luz proveniente de la muestra se detecta a 90°. De esta manera se logra excitar y observar a los fluoróforos de un único plano por vez. En este tipo de microscopio, el sistema de detección es una cámara por lo que la obtención de las imágenes es extremadamente rápido. Sistemas robotizados permiten el desplazamiento de las muestras en sentido vertical, horizontal y de rotación durante la adquisición de imágenes permitiendo barrer la muestra en la dirección del haz de luz y coleccionar sucesivos planos. Luego estos se combinan para hacer una reconstrucción tridimensional. Debido a la rapidez de la técnica y a que se ilumina un plano por vez sin afectar el resto se disminuyen los niveles de fotoblanqueo y fototoxicidad en comparación con técnicas como la microscopía confocal, en la cual es necesario iluminar a la muestra completa para obtener la señal de cada plano focal. Además, esta técnica permite obtener las imágenes con una mínima manipulación de la muestra sin alterar el sistema. En el caso de las plantas, las imágenes se obtienen mientras las plantas crecen en un medio nutritivo que tiene un índice de refracción de la luz cercano al del agua. Esto permite estudiar la planta, en particular la raíz, por tiempos prolongados manteniéndola sin alteraciones y con las células que la constituyen vivas. Resumiendo, este tipo de microscopía permite la adquisición rápida de imágenes con un rango dinámico, con una resolución de célula única, tiene baja fototoxicidad y puede ser fácilmente adaptada a plantas ya que se pueden observar especímenes creciendo de manera vertical [215, 247-249]. Esta técnica ha demostrado ser una técnica óptima para estudiar oscilaciones de Ca^{2+} en pelos radicales en plantas que expresan el biocensor YC3.6 [215].

El protocolo seguido para analizar plantas mediante la aplicación de SPIM es el descrito en [215]. Semillas de líneas que sobre-expresan el biocensor YC3.6 (Wt Col-0/35s::YC3.6 y *eca3-2/35s::YC3.6*) fueron transferidas justo después de su germinación desde una placa de Petri con medio MS 0.5X Agar0,8% pH5.8 a tubos de propileno etileno fluorado rellenos con medio 0.5% fitogel (*Duchefa*) MS 0.5X. Se dejó crecer estas plantas en una cámara húmeda durante 7 días. Los tubos fueron transferidos a la cabina de adquisición de imágenes del microscopio, la cual contenía medio MS0.5X líquido. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio que cuenta con un objetivo 20X, NA = 0.5 de inmersión en agua, un láser de estado sólido con una longitud de onda de 435nm, una cámara con un sensor CMOS (*Complementary Metal-Oxide Semiconductor*) dividida en dos canales uno para CFP y otro para Venus y un sistema automatizado que permite la rotación y traslación del tubo. Se tomaron 11 planos de 4 μm cada uno adquiriendo un *stack* de 44 μm de espesor. El tiempo de adquisición fue 4 segundos y el tiempo total del experimento fue 10 min para plantas Wt Col-0/35s::YC3.6 creciendo en un medio con o sin CPA, 15 min o 1 h para plantas *eca3-2/35s::YC3.6*. El área observada fue de aproximadamente 800X450 μm^2 y fue únicamente computada

la relación entre FRET (Venus)/CFP y guardada únicamente la proyección máxima (MIP, *Maximum Intensity Projection*).

El análisis de las imágenes se realizó mediante el uso del programa *ImageJ*. Se seleccionó un ROI en el ápice del pelo y se midió la media de la intensidad de los píxeles incluidos en el ROI a través del tiempo. El procesamiento de los datos se realizó mediante el uso del programa MATLAB. El análisis de las oscilaciones de Ca^{2+} se realizó mediante la obtención de la transformada de Fourier de las señales de Ca^{2+} . La transformada de Fourier es una operación matemática que transforma una señal de dominio tiempo a dominio frecuencia y viceversa. En otras palabras, la transformada de Fourier es básicamente el espectro de frecuencias de una función. Esta contiene todas las frecuencias de las oscilaciones durante el tiempo en el cual existió la señal; es decir, en la transformada de Fourier se obtiene un sólo espectro de frecuencias para toda la función. Se utilizó esta función matemática para desglosar las frecuencias incluidas en la señal de Ca^{2+} y en el gráfico resultante se representan las frecuencias (Hz) y en el eje Y el espectro de densidad de potencia (PSD, *power spectral density*) normalizado \pm error estándar. El PSD está directamente relacionado con la amplitud de la oscilación es decir, a mayor PSD mayor la amplitud de la oscilación.

Por otro lado, mediante la aplicación de la extensión del programa *ImageJ Template matching* se determinó la velocidad de crecimiento del pelo radical. Para esto, se hizo una relación entre el crecimiento a tiempo final del pelo radical sobre el tiempo total del experimento. De esta manera se obtuvo la velocidad de crecimiento promedio a tiempo final. Se observó que las velocidades instantáneas varían con respecto al tiempo pero no se realizó un análisis sistematizado de las mismas y los resultados no se incluyen en esta tesis.

7. Ensayo de GUS.

Ensayo realizado en colaboración con el grupo del Dr. Hyung-Taeg Cho (Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Seúl). Plantas transgénicas transformadas con la construcción promotorARF5::GUS (Wt/pARF5::GUS) y plantas Wt Col-0 fueron incubadas con una solución de GUS (100 mM NaPO_4 pH7.0, EDTA 10 mM, Triton X-100 0.1%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 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 Leica M205FA con un objetivo de 10X.

8. Tratamientos farmacológicos.

8.a Para los tratamientos farmacológicos prolongados con VAS2870, IAA, Verapamilo, Spider, 8,Br-GMPc, eosina y CPA se crecieron plantas de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0 o durante 5 días en placas cuadradas previamente descritas en posición vertical con medio MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C). Luego las plantas se transfirieron a placas conteniendo medio MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 con las diferentes concentraciones de los compuestos farmacológicos y se las dejó crecer en luz continua en placa vertical durante 5 días. En el caso de CNQX, plántulas de 5 días de crecimiento se transfirieron placas con agar 1% (Chemit) y sacarosa 1% más las diferentes concentraciones del inhibidor, las plantas se dejaron crecer en oscuridad en presencia del inhibidor por 5 días.

8.b Se realizó tratamientos de corto y prolongado tiempo con 20 μM de HgCl_2 y con 10mM de NaN_3 , para esto se crecieron plantas Wt Col-0 durante 10 días en placas en posición vertical con MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C), se retiró una planta del medio y se la colocó en un porta objetos. En el caso del experimento a corto plazo, el porta objetos contenía una solución de 20 μM de HgCl_2 (o de 10mM de NaN_3) y 50 μM H_2DCFDA y se dejó incubando la planta 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 5** de materiales y métodos. En el caso del experimento a largo plazo, el porta objetos contenía una solución 20 μ M de HgCl₂ (o de 10mM de NaN₃), se dejó incubando por 20 minutos y luego se agregó H₂DCFDA llegando a una concentración final de 50 μ M, se incubó durante 10 minutos, se lavó y se procedió con la toma y análisis de imágenes de la misma manera. Para los controles se reemplazó el volumen de HgCl₂ o de NaN₃ por H₂O.

8.c Para los tratamientos de tiempo corto con IAA se pre-incubaron plantas Wt Col-0 de diez días 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 H₂DCFDA. Se lavaron las plantas y se procedió con la toma de imágenes y análisis de las mismas como lo explicado en la **sección 5** de materiales y métodos. Para los controles se reemplazó el volumen de IAA por H₂O.

8.d Tratamientos prolongados de los biocensores. Se crecieron plantas que sobre-expresan los diferentes biocensores en placas verticales con MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C) durante 5 días y luego se transfirieron a medios conteniendo 0 μ M de IAA (Cnt), 100nM-5 μ M de IAA; 10 μ M de CPA y MS0,5X Agar 0,8% pH 5.8 (Cnt). Se las dejó crecer por 5 días y luego se procedió con la toma de imágenes y el análisis según lo explicado en la **sección 6.a** y **6.b** de materiales y métodos. Para el experimento de fosfato (PO⁻⁴,Pi), se crecieron plantas que sobre-expresan los biocensores durante 10 días en luz continua en placas que contenían medio Hoogland pH 5.8 con 0mM de Pi (Cnt) y 2.5mM de Pi, o en medio MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 (Cnt) y en medio MS1X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8. Luego se colocaron las plantas en un porta objeto y se procedió con la toma y análisis de imágenes según lo explicado en la **sección 6.a** y **6.b** de materiales y métodos.

8.e Tratamientos farmacológicos *in vivo* con biocensores. Se crecieron plantas que sobre-expresan los diferentes biocensores durante 10 días en placas con MS0.5X (*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 MS0.5X líquido, se tomaron imágenes del pelo seleccionado según lo explicado en la **sección 6.a** y **6.b** de materiales y métodos y durante la adquisición de imágenes se agregó tratamiento correspondiente (100nM IAA, 1 μ M de IAA, 10 μ M VAS2870, 30 μ M CPA, 20 μ M de HgCl₂, 10mM NaN₃) y se continuó con la toma de imágenes. El análisis se realizó de la misma manera que la explicada en la **sección 6.a** y **6.b** de materiales y métodos.

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

Primero se buscó motivos consensos en los promotores de los genes regulados por RSL4 descritos anteriormente [3]. Estos motivos consenso fueron encontrados mediante la aplicación del algoritmo *Meme* de *MEME suite* [156]. Aquellos motivos que mostraban un valor significativo (e-value <1x10⁻¹⁰) y estaban presentes en más del 70% de las secuencias promotoras, alimentaron la base de datos del programa TOMTOM de manera de detectar motivos ya conocidos y de esta manera validar la búsqueda. Como resultado de esta búsqueda un solo motivo fue encontrado TN5-6CA[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<1x10⁻⁵). El motivo se encontró en 400 promotores de genes de la planta. Por otro lado, se buscaron en las 200pb antes del inicio de la transcripción de cada gen apariciones del motivo TN5-6CA[CT]G[TA] en los promotores de los genes *NOXs* y *RSL4*. 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 *RSL4* y *NOXC* [250].

10. Análisis de secreción de proteínas con dominios tipo extensinas

Líneas transgénicas transformadas con la construcción que codifica para una proteína con un solo dominio extensina fusionada con la proteína roja fluorescente *TOMATO* bajo el promotor fuerte del virus del mosaico del coliflor 35s (Wt Col-0/ 35s::*EXT2_TOM*) y otra que codifica para una proteína con numerosos dominios tipo extensina (aproximadamente 30) fusionada con la proteína roja fluorescente *TOMATO* (Wt Col-0/ 35s::*EXT11_TOM*) fueron crecidas en un medio MS0.5X (*Sigma*) 0.8% agar planta (*Duchefa*) pH 5.8 en luz continua (18-23°C) durante 4 días. Estas líneas fueron generadas y cedidas por la Dra. Margaret Brigham Fleming (Departamento de Biología – Universidad del estado de Colorado). Luego las plantas fueron transferidas a un medio con CPA (10µM) y a un medio control MS 0.5X (*Sigma*) agar 0,8% (*Duchefa*) pH 5.8 (Cnt). Después de 5 días 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. La intensidad del láser, PMT, apertura del *pinhole* y 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 e intracelular 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 intensidad de fluorescencia de todos los pixeles incluidos en la línea.

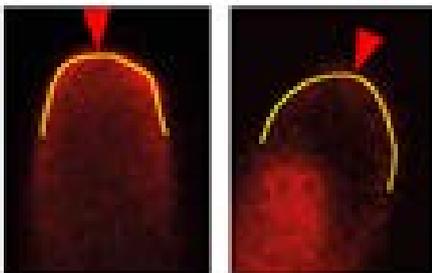


Figura 4M: Medición de la señal de *TOMATO* en la pared celular. En la imagen se ejemplifica mediante una línea amarilla el lugar donde se realizó la media de la intensidad de fluorescencia. La flecha roja indica la pared celular en el ápice del pelo radical.

11. Generación de líneas transgénicas de ARFs y RSL4.

La construcción del promotor de *EXPANSINA7* fusionados con GFP ($p_{E7}::GFP$) del vector binario modificado de pCAMBIA1300-NOS fue utilizada como vector de clonado para que las secuencias clonadas se expresaran específicamente en pelo. Para generar las construcciones de ARF5, ARF7 y ARF8, se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores enlistados en la **Tabla 4M** y de templado el 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 $p_{RSL4}::RSL4-GFP$, se amplificó mediante PCR el promotor de *RSL4* (p_{RSL4}) (-928~+63 bp relativas al inicio de transcripción predictivo, usando ADN genómico como templado) y la región codificante sin el codón de detención (utilizando cADN como templado) mediante el uso de los cebadores enlistados en la **Tabla 4M**. El p_{RSL4} y el fragmento de *RSL4* fueron secuencialmente insertados antes de la secuencia codificante de *GFP* de la construcción $p_{E7}::GFP$. Para las líneas inducibles por estradiol (construcción $p_{MDC7}::ARF5-GFP$), se amplificó mediante PCR la región codificante de *ARF5* sin su codón de detención utilizando los cebadores enlistados en la **Tabla 4M**. El fragmento amplificado fue insertada antes del gen de *GFP* de la construcción $p_{E7}::GFP$ 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 cebadores enlistados 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 [251]. Para generar el reportero $p_{ARF5}::GUS$, se amplificó el fragmento que codifica para *GUS* usando los cebadores enlistados 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 cebadores enlistados 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.

12. Inmuno precipitación de la cromatina y análisis por PCR (ChIP-PCR)

El ensayo de inmuno-precipitación de la cromatina y el análisis por PCR se realizó según lo descrito previamente [252-254]. Plántulas de las líneas transgénicas (Wt Col-0) transformadas con la construcción $p_{RSL4}::RSL4-GFP$ (Wt Col-0/*promotorRSL4::RSL4-GFP*) fueron crecidas durante 10 días en un medio MS0,5X infiltrado en vacío con 1% de formaldehído para favorecer el entrecruzamiento. Las líneas transgénicas transformadas con la construcción inducible por estradiol $p_{MDC7}::ARF5-GFP$, se crecieron durante 4 días en un medio que contenía 1 μ M de estradiol. No se realizó ninguna inducción para las líneas Wt Col-0/ $p_{RSL4}::RSL4-GFP$. 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 [255], 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 de ADN de esperma de salmón asociado a proteína-A en perlas de agarosa (*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/ μ l). 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 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.

13. Expresión de ARF5, ARF7, ARF8 y ARF19.

La señal de GFP de las líneas transgénicas transformadas con la construcción *promotorARFs::SV40-3xGFP* (Wt Col-0/ $p_{ARF5}::SV40-3xGFP$, $p_{ARF5}::GUS-GFP$, $p_{ARF7}::SV40-3xGFP$, $p_{ARF8}::SV40-3xGFP$ y $p_{ARF19}::SV40-3xGFP$) 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 2 μ g/ml de Ioduro de propidio con la finalidad de marcar las paredes celulares.

Tabla 1M: Líneas de mutantes insercionales utilizadas.

Gen	AGI	Nombre	Código	Referencias
RSLs				
RSL2	<i>At3g33880</i>	<i>rsl2-1</i>	SAIL_514_C04	[3]
RSL4	<i>At1g27740</i>	<i>rsl4-1</i>	GT_5_105706	[3]
NOXs				
NOXC	<i>At5g51060</i>	<i>nox-1</i>	Salk_071801	[256]
		<i>nox-2</i>	<i>Transposable line (dspm)</i>	[37, 40]
NOXE	<i>At1g19230</i>	<i>nox-1</i>	<i>Transposable line (dspm)</i>	[37, 40]
		<i>nox-2</i>	Salk_064850	[256]
NOXF	<i>At1g64060</i>	<i>nox-1</i>	<i>Transposable line (dspm)</i>	[37, 40]
		<i>nox-2</i>	Salk_059888	[37]
		<i>nox-3</i>	Salk_034674	[257]
NOXH	<i>At5g60010</i>	<i>nox-1</i>	Gabi_028G04	[134, 135]
		<i>nox-3</i>	Salk_136917	[134, 135]
NOXJ	<i>At3g45810</i>	<i>nox-2</i>	Sail_31_D07	[134, 135]
		<i>nox-3</i>	Salk_050665	[134, 135]
VGCs				
TPC1	<i>At4g03560</i>	<i>tpc1-2</i>	Salk_125650	Esta tesis
ANN1	<i>At1g35720</i>	<i>ann1</i>	Salk_015426	[137]
ANN2	<i>At5g65020</i>	<i>ann2</i>	Salk_054223	[137]
ANN4	<i>At2g38750</i>	<i>ann4</i>	Salk_019725	[137]
MSCs				
MCA1	<i>At4g35920</i>	<i>mca1</i>	T-ADN-tag line of Kazusa ADN Research Institute	[171]

MCA2	<i>At2g17780</i>	<i>mca2</i>	Salk_129208	[172]
MSL5	<i>At3g14810</i>	<i>msl5-2</i>	Salk_127784	[163, 173, 174]
MSL6	<i>At1g78610</i>	<i>msl6-1</i>	Salk_067711	[163, 173, 174]
MSL9	<i>At5g19520</i>	<i>msl9-1</i>	Salk_114626	[163, 173, 174]
MSL10	<i>At5g12080</i>	<i>msl10-1</i>	Salk_076254	[163, 173, 174]
OSCA1.5	<i>At3g21620</i>	<i>osca1.5</i>	Salk_016151	Esta tesis
GLRs				
GLR2.4	<i>At4g31710</i>	<i>glr2.4</i>	<i>Salk_010571</i>	Esta tesis
GLR3.5	<i>At2g32390</i>	<i>glr3.5-1</i>	Salk_023880	Esta tesis
		<i>glr3.5-2</i>	Salk_035264	Esta tesis
CNGCs				
CNGC9	<i>At4g30560</i>	<i>cngc9</i>	Sail_70_E01	Esta tesis
CNGC14	<i>At2g24610</i>	<i>cngc14-1</i>	Salk_206460	[152, 258]
ECAs				
ECA1	<i>At1g07810</i>	<i>eca1</i>	Salk_023789	Esta tesis
ECA2	<i>At4g00900</i>	<i>eca2-2</i>	Salk_039146	Esta tesis
ECA3	<i>At1g10130</i>	<i>eca3-2</i>	Salk_112156	Esta tesis

Tabla 2M: Líneas de plantas transgénicas utilizadas.

Nombre de la línea	Construcción	Background genético	Referencias
YC3.6	35S::YC3.6	Wt Col-0	[21]
pARF5::SV40-3xGFP	promotorARF5::SV40-3xGFP	Wt Col-0	[141]
pARF7::SV40-3xGFP	promotorARF7::SV40-3xGFP	Wt Col-0	[141]
pARF8::SV40-3xGFP	promotorARF8::SV40-3xGFP	Wt Col-0	[141]
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
MCA1^{OE}	35s::MCA1	Wt Col-0	[171]
MCA2^{OE}	35s::MCA2	Wt Col-0	[171]
35s::EXT2_TOM	35s::EXT2_TOM	Wt Col-0	Fleming 2015
35s::EXT11_TOM	35s::EXT11_TOM	Wt Col-0	Fleming 2015
D4ER_YC3.6	35s::D4ER_YC3.6	Rdr6	[245]
ECA1^{OE}	35s::ECA1	Wt Col-0	[218]
pRSL4::RSL4-GFP	promotorRSL4::RSL4-GFP	Wt Col-0	Esta tesis

Tabla 3M: Cebadores utilizados para genotipar las líneas mutantes.

Gen	AGI	Nombre	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
RSLs				
RSL2	<i>At3g33880</i>	<i>rs/2-1</i>	AGCATTGTTTTTCGCATCAC	TCCTCAAAGCCTCTATGCAAG
RSL4	<i>At1g27740</i>	<i>rs/4-1</i>	GGGTGTTTCCACAAACACTTG	CAGATGATGAGAAAGCTTCGG
NOXs				
NOXC	<i>At5g51060</i>	<i>nox-1</i>	TCTAAGACCACGGTACCATCG	CGAGCTTAAGCGTTTGACATC
		<i>nox-2</i>	[40]	[40]
NOXE	<i>At1g19230</i>	<i>nox-1</i>	[40]	[40]
		<i>nox-2</i>	CTACAGTTTTTCATGGCCATCG	TAATTGCAGTGC GTTATTCCC
NOXF	<i>At1g64060</i>	<i>nox-1</i>	CTTCCGATATCCTTCAACCAACTC	GAGATTGCCTTTATACTATAAGTG
		<i>nox-2</i>	CAAAGAGCTCTTCGTGGTTTG	TCTCTATTGTATCTTGTGTACCCG
		<i>nox-3</i>	CAAAGAGCTCTTCGTGGTTTG	TCTCTATTGTATCTTGTGTACCCGb
NOXH	<i>At5g60010</i>	<i>nox-1</i>	GATCAAAGATGCGTAAGCTGC	AGATCTCCGACGATCCTTAGC
		<i>nox-3</i>	AGGTCTTGCAAATGTGTTTCG	GCCGCTAAACCTAAACCAAAC
NOXJ	<i>At3g45810</i>	<i>nox-2</i>	TCAAATATTCATCTCCGGGTG	TCCATAAGTTGATAGCCGTGG
		<i>nox-3</i>	TTCTTCCACCTTTGGTCAATG	CCAAAAGGTCAGTTGTTTCGAC
VGCs				
TPC1	<i>At4g03560</i>	<i>tpc-2</i>	TCTATTTGCCAGTTGGATTGC	GCAGAGGTCAGCAAACCTCATC
ANN1	<i>At1g35720</i>	<i>ann1</i>	TGTTGTTGGTCTCCCTTTTTG	AATCTTGGCTCACAGAAGTGC
ANN2	<i>At5g65020</i>	<i>ann2</i>	TGGGATCAATCTTTTGGTCTG	GATGCTTGCAAGATCTGAAGC
ANN4	<i>At2g38750</i>	<i>ann4</i>	CTCGGTGCACGTAAAGCTTAC	AGGTGAAATTCGGTTGGAATC
MSCs				
MCA1	<i>At4g35920</i>	<i>mca1</i>	[171]	[171]
MCA2	<i>At2g17780</i>	<i>mca2</i>	GGCATAGACGCTCTGAAACTG	TAACGAGAAAAGAAAGCGTGG
MSL5	<i>At3g14810</i>	<i>msl5-2</i>	CCCTCATCTTCTTTTATCG	ACTTCCCATTTCACAAATCC
MSL6	<i>At1g78610</i>	<i>msl6-1</i>	TCCCTTTGTTTTCTCCTCCTC	CGAAGCTGATTGGTCAGTTTC
MSL9	<i>At5g19520</i>	<i>msl9-1</i>	CGGTGTCAAGCATGTGTTATG	AGGTCCCAGAGAGTCTGAAG
MSL10	<i>At5g12080</i>	<i>msl10-1</i>	GTTGGTTTCTGGGTTTAAGCC	TACTTGGAGTAACCGGTGCTG
OSCA1.5	<i>At3g21620</i>	<i>osca1.5</i>	GATACCCGGAAGAAAACCTTG	TGCTTCTGAGCATAGGAGACC
GLRs				
GLR2.4	<i>At4g31710</i>	<i>glr2.4</i>	AGGGAAAACATGTGATTGTGC	TCCAATAATGCCCTTGTAAG
GLR3.5	<i>At2g32390</i>	<i>glr3.5-1</i>	TTCAAAAGCCAACCAAATTTG	CTGAAGATTGTGGACCAATGG
		<i>glr3.5-2</i>	TGAAGTTGCTGCAAATGTGAG	TGTCGACATGTCCACAGCTAG
CNGCs				
CNGC9	<i>At4g30560</i>	<i>cngc9</i>	TTACGCGATGGTACTACCTGG	CAGCATGAAAACGAGACGATC
CNGC14	<i>At2g24610</i>	<i>cngc14-1</i>	TCGGAACAATTGGCAGAATAC	CACCTGCTTGTAAGCAAAGG
ECAs				
ECA1	<i>At1g07810</i>	<i>eca1</i>	AGACCGCTTTACCTTCAAAGC	TCTCAGCAAGCAACTGTCATG
ECA2	<i>At4g00900</i>	<i>eca2-2</i>	TGCTCTTCAAACCTTCTCACG	CAGAAGAACGCGATAGTGAGG
ECA3	<i>At1g10130</i>	<i>eca3-2</i>	TGGTTCTCATTGATGTCGATG	AATCAAGCACCTGCACAAAAC

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

Propósito	Nombre	Secuencia (5' to 3')
ARF5	A5PacI-Fw	AACATTAATTAATCTCTCTGTATGATGGCTTC
	A5SgsI_Rv	TACAGGCGCGCCGTTTCTCCTCTACCAGTTGG
	A5SgsI_R(sin stop)	TTTGGCGCGCCATGAAACAGAAGTCTTAAG
ARF7	A7KpnI_Fw	TTATGGTACCGAGAAAGTAAAGTTGAGTGATCATG
	A7AvrII_Rv	TTATCCTAGGTGTGAGAGAACTCTTCTGC
	A7MluI_R(sin stop)	TATAACGCGTGACCGGTTAAACGAAGTGGCTGAG
ARF8	A8PacI_Fw	AAGTTTAATTAACATGAAGCTGTCAACATCT
	A8SgsI_Rv	GAATGGCGCGCCAAGATGAGTGGAAACGA
pRSL4 & RSL4	ProR4HindIII-Fw	GGAAGCTTCAAGTATATAACAAAAGAATG
	ProR4BamHI-Rv	ACGTGGATCCCTCTAACTGATCAAC
	R4XmaI_Fw	TCAGCCCGGGCGATGGACGTTTTTGTGGAT
	R4AvrII_Rv	TAACTTGTAAGTCCTCCTAGGCATAAGCCGA
pMDC7-ARFs-GFP	attB1-ARF5-1Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTATGATGGCTTCATTGTCT
	attB1-ARF7-1Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAAGCTCCTTCATCA
	attB2-GFP-720Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCC
ChIP-pRSL4	Frag-1Fw	CTTTTCACATGCCATAACTAG
	Frag-1Rv	GGTATTGTAGTTGTATACTTGTATGTA
	Frag-2Fw	TCTTCCCTTCTAGTGTTGTATGG
	Frag-2Rv	AGCTCATTTTAAACACAAAATGTTAC
	Frag-3Fw	ACAGCTGTATGTTTTTGGTATC
	Frag-3Rv	ACTCATTCGTAAGAGAGTGATC
	Frag-4Fw	TATATCATGCTGCCTCCAAA
	Frag-4Rv	CCATGCCGCTTTTTACCTTA
	Frag-5Fw	TTGCGATAATGATTCCACAA
	Frag-5Rv	TTTACATTGGCCACACAAGAG
	Frag-6Fw	GAGATGAATGGATAGTTATAAATAAGAAT
	Frag-6Rv	GATGAACACGATCAGTCAAC
	Frag-7Fw	TGGCTTCGTTTCACTTATTT
	Frag-7Rv	AGAGATCAAGAGATTCTTAAACTG
	Frag-8Fw	AAATCTTCCTTGAGAAATATTCTCT
	Frag-8Rv	TTCTTGAAGTTGTGCAACTATAT
	Frag-9Fw	ATTCTTGGGATCAAAGTCATCACC
	Frag-9Rv	GTAACATTATATATTGGATCTTCCAC
ChIP-pNOXC	NOXC ChIP1-Fw	TCCATGTGAAGAAAAATAGAAAGA
	NOXC ChIP1-Rv	TGGCGTAAATAAAATTAGTAAATTAAG
	NOXC ChIP2-Fw	CCGTAATGTTTGTGGAGTT
	NOXC ChIP2-Rv	ATAGTAATTCTTATGTTTGTCCAAA
	NOXC ChIP3-Fw	CAAATGCACGTTACAACCT
	NOXC ChIP3-Rv	GAATGAGAAAATGGATTTCGTAT
	NOXC ChIP4-Fw	AAGTTCATTAGTAAAACCGAC

	NOXC ChIP4-Rv	CTACAATACCAAATTTTCATTCAAT
ChIP-pNOXH	NOXH ChIP1-Fw	TTCCATTTGATATGACAAGTTG
	NADPoxH ChIP1-Rv	CACTGCTCCAATAATGTTTG
	NOXH ChIP2-Fw	CTTTGTCCGAATTGTACAAAA
	NOXH ChIP2-Rv	AGGTCAGAAGTTGCTGATA
	NOXH ChIP3-Fw	CTAAAGGTACGAGTTTGGA
	NOXH ChIP3-Rv	ACAATATACTTTCAACACAAAAATC
	NOXH ChIP4-Fw	CATCAGCCGCACCTTC
	NOXH ChIP4-Rv	GTGTTTTGTTTATTTAGTTACACATG
ChIP-pNOXJ	NOXJ ChIP1-Fw	AAACTGAGTATTCTCATTAACTATT
	NOXJ ChIP1-Rv	TTATAAGTTCGATCGAAGAGAA
	NOXJ ChIP2- 3Fw	GAAAAATTACCAAGTTATATATAATGGTGT
	NOXJ ChIP2-Rv	TTGTAT ATCTCAGTATATGAGTG
	NOXJ ChIP3-Fw	CGTTTGATCTTCCTTTGTTATAAA
	NOXJ ChIP3-Rv	CTATGAGAAGAGACTAAGAATAG
qPCR	RSL4-qF842	GTGCCAAACGGGACAAAAGT
	RSL4-qR1097	TTGTGATGGAACCCCATGTC
	ARF5-qRT-Fw	TGAACAGCGCAGGCATTAAC
	ARF5-qRT-Rv	TACAGGCGCGCCGTTTCTCCTCTACCAGTTGG
	ARF7-qRT-Fw	CGGAGTTCTTGACAGCTGCAG
	ARF7-qRT-Rv	CACCAGCAGCTGACTCATCC
	ARF8-qRT-Fw	GATCATGGAGAAGGCAGTGG
	ARF8-qRT-Rv	GAATGGCGCGCCAAGATGAGTGGAAACGA
	PP2A qRT-Fw	GTCGACCAAGCGGTTGTGGAGA
	PP2B qRT-Rv	ACGCCAACGAACAAATCACAGA
	NOXC-Fw	TCACATTAGAGTTCTTGGGGATTGG
	NOXC-Rv	TTCGGGAAGTCCGGGATTATTTGC
	ECA3qPCR1-FW	ACCCAAGGAGTAACTTATGGC
	ECA3qPCR1-Rv	CCACTCGGCCAGGATAATG
	ECA3qPCR2-FW	CGAGTGGACTGCTGTTCTGTA
	ECA3qPCR2-Rv	TACTTGTACGCCGGTCCTT
RT-PCR	PP2A RT-PCR Fw	GTCGACCAAGCGGTTGTGGAGA
	PP2A RT-PCR Rv	ACGCCAACGAACAAATCACAGA
	ECA2 RT-PCR Fw	GAACACGGCTCAGGTTTCAGG
	ECA2 RT-PCR Rv	AGAGCCTCAAGTGCTTTCTCAG
	ECA3 RT-PCR Fw	AATGATGAGCGTCTATGTAGCC
	ECA3 RT-PCR Rv	CATCTCAATGTTTCATCGCCAAAAC

REFERENCIAS

1. Grierson, C., et al., *Root hairs*. The Arabidopsis Book, 2014. **12**: p. e0172.
2. Salazar-Henao, J.E., I.C. Vélez-Bermúdez, and W. Schmidt, *The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis*. Development, 2016. **143**(11): p. 1848-1858.
3. Yi, K., et al., *A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs*. Nature genetics, 2010. **42**(3): p. 264-267.
4. Martin-Rejano, E.M., et al., *Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in Arabidopsis seedlings*. Physiol Plant, 2011. **142**(2): p. 170-8.
5. Niu, Y., et al., *Magnesium availability regulates the development of root hairs in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* Plant Cell Environ, 2014. **37**(12): p. 2795-813.
6. Lin, C.Y., et al., *Pathways involved in vanadate-induced root hair formation in Arabidopsis*. Physiol Plant, 2015. **153**(1): p. 137-48.
7. Takeda, S., et al., *Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells*. Science, 2008. **319**(5867): p. 1241-1244.
8. Niu, Y.F., et al., *Responses of root hair development to elevated CO₂*. Plant Signal Behav, 2011. **6**(9): p. 1414-7.
9. Miroslaw, K., et al., *Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water-deficiency conditions*. Journal of experimental botany, 2015: p. erv498.
10. Guo, K., W.W. Kong, and Z.M. Yang, *Carbon monoxide promotes root hair development in tomato*. Plant Cell Environ, 2009. **32**(8): p. 1033-45.
11. Marzol, E., et al., *RSL4 Takes Control: Multiple Signals, One Transcription Factor*. Trends in Plant Science, 2017.
12. Cardenas, L., *New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells*. Plant Signal Behav, 2009. **4**(1): p. 4-8.
13. Falhof, J., et al., *Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology*. Molecular Plant, 2016. **9**(3): p. 323-337.
14. Molendijk, A.J., et al., *Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth*. The EMBO journal, 2001. **20**(11): p. 2779-2788.
15. Hwang, J.-U., et al., *Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(11): p. 5385-5399.
16. Balcerowicz, D., S. Schoenaers, and K. Vissenberg, *Cell fate determination and the switch from diffuse growth to planar polarity in Arabidopsis root epidermal cells*. Frontiers in plant science, 2015. **6**.
17. Diplock, A.T., *Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview*. The American journal of clinical nutrition, 1991. **53**(1 Suppl): p. 189S-193S.
18. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu. Rev. Plant Biol., 2004. **55**: p. 373-399.
19. Creissen, G., et al., *Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress*. The Plant Cell, 1999. **11**(7): p. 1277-1291.
20. Chen, C.Y., et al., *The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes*. The Plant Cell Online, 2002. **14**(9): p. 2175-2190.
21. Monshausen, G.B., M.A. Messerli, and S. Gilroy, *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, 2008. **147**(4): p. 1690-1698.
22. Monshausen, G., et al., *Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(52): p. 20996-21001.
23. Foyer, C.H. and G. Noctor, *Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria*. Physiologia Plantarum, 2003. **119**(3): p. 355-364.

24. Overmyer, K., M. Brosché, and J. Kangasjärvi, *Reactive oxygen species and hormonal control of cell death*. Trends in plant science, 2003. **8**(7): p. 335-342.
25. Canton, J. and S. Grinstein, *Priming and activation of NADPH oxidases in plants and animals*. Trends in immunology, 2014. **35**(9): p. 405-407.
26. Wong, H.L., et al., *Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension*. The Plant Cell Online, 2007. **19**(12): p. 4022-4034.
27. Kimura, S., et al., *Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2012. **1823**(2): p. 398-405.
28. Takahashi, S., et al., *Reactive oxygen species production and activation mechanism of the rice NADPH oxidase OsRbohB*. Journal of biochemistry, 2012. **152**(1): p. 37-43.
29. Suzuki, N., et al., *Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling*. Current opinion in plant biology, 2011. **14**(6): p. 691-699.
30. Kaya, H., et al., *Ca²⁺-Activated Reactive Oxygen Species Production by Arabidopsis RbohH and RbohI Is Essential for Proper Pollen Tube Tip Growth*. The Plant Cell Online, 2014. **26**(3): p. 1069-1080.
31. Kobayashi, M., et al., *Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase*. The Plant Cell Online, 2007. **19**(3): p. 1065-1080.
32. Nühse, T.S., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses*. The Plant Journal, 2007. **51**(5): p. 931-940.
33. Sirichandra, C., et al., *Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase*. FEBS letters, 2009. **583**(18): p. 2982-2986.
34. Dubiella, U., et al., *Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(21): p. 8744-8749.
35. Paulsen, C.E. and K.S. Carroll, *Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches*. ACS chemical biology, 2009. **5**(1): p. 47-62.
36. Chen, Z., *A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats*. Plant Physiology, 2001. **126**(2): p. 473-476.
37. Torres, M.A. and J.L. Dangl, *Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development*. Current opinion in plant biology, 2005. **8**(4): p. 397-403.
38. Müller, K., et al., *The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening*. New Phytologist, 2009. **184**(4): p. 885-897.
39. Kwak, J.M., et al., *NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis*. The EMBO journal, 2003. **22**(11): p. 2623-2633.
40. Torres, M.A., J.L. Dangl, and J.D. Jones, *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, 2002. **99**(1): p. 517-522.
41. Lee, Y., et al., *A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis*. Cell, 2013. **153**(2): p. 402-412.
42. Lassig, R., et al., *Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth*. The Plant Journal, 2014. **78**(1): p. 94-106.
43. Foreman, J., et al., *Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth*. Nature, 2003. **422**(6930): p. 442-446.
44. Nestler, J., et al., *Roothairless5, which functions in maize (Zea mays L.) root hair initiation and elongation encodes a monocot-specific NADPH oxidase*. Plant J, 2014. **79**(5): p. 729-40.
45. Kadota, Y., et al., *Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity*. Molecular cell, 2014. **54**(1): p. 43-55.
46. Harmon, A.C., M. Gribskov, and J.F. Harper, *CDPKs—a kinase for every Ca²⁺ signal?* Trends in Plant Science, 2000. **5**(4): p. 154-159.
47. Harper, J.F., G. Breton, and A. Harmon, *Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases*. Annu. Rev. Plant Biol., 2004. **55**: p. 263-288.
48. Wernimont, A.K., et al., *Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(5): p. 596-601.

49. Cheng, S.-H., et al., *Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family*. *Plant Physiology*, 2002. **129**(2): p. 469-485.
50. Martín, M.L. and L. Busconi, *Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation*. *The Plant Journal*, 2000. **24**(4): p. 429-435.
51. Lu, S.X. and E.M. Hrabak, *An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum*. *Plant Physiology*, 2002. **128**(3): p. 1008-1021.
52. Dammann, C., et al., *Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003. **132**(4): p. 1840-1848.
53. Asai, S., et al., *The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. **288**(20): p. 14332-14340.
54. Xing, T., et al., *Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001. **14**(10): p. 1261-1264.
55. Drerup, M.M., et al., *The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the Arabidopsis NADPH oxidase RBOHF*. *Molecular plant*, 2013. **6**(2): p. 559-569.
56. Kimura, S., et al., *The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of Arabidopsis NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system*. *The Journal of Biochemistry*, 2012. **153**(2): p. 191-195.
57. Ogasawara, Y., et al., *Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtRbohD by Ca²⁺ and phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(14): p. 8885-8892.
58. Dynowski, M., et al., *Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂*. *Biochem. J*, 2008. **414**: p. 53-61.
59. Hooijmaijers, C., et al., *Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant research*, 2012. **125**(1): p. 147-153.
60. Savage, D.F. and R.M. Stroud, *Structural basis of aquaporin inhibition by mercury*. *Journal of molecular biology*, 2007. **368**(3): p. 607-617.
61. Preston, G.M., et al., *The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**(1): p. 17-20.
62. Kuang, K., et al., *Mercurial sensitivity of aquaporin 1 endofacial loop B residues*. *Protein Science*, 2001. **10**(8): p. 1627-1634.
63. Tian, S., et al., *Plant aquaporin AtPIP1; 4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways*. *Plant Physiology*, 2016: p. pp. 01237.2015.
64. Lin, W.-D., et al., *Coexpression-based clustering of Arabidopsis root genes predicts functional modules in early phosphate deficiency signaling*. *Plant physiology*, 2011: p. pp. 110.166520.
65. Rentel, M.C., et al., *OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis*. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 858-861.
66. Mangano, S., S.P.D. Juárez, and J.M. Estevez, *ROS regulation of polar growth in plant cells*. *Plant Physiology*, 2016. **171**(3): p. 1593-1605.
67. Anthony, R.G., et al., *A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis*. *EMBO J*, 2004. **23**(3): p. 572-81.
68. Boisson-Dernier, A., et al., *Receptor-like cytoplasmic kinase MARIS functions downstream of CrRLK1L-dependent signaling during tip growth*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. **112**(39): p. 12211-12216.
69. Moon, H., et al., *NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(1): p. 358-363.
70. Nakagami, H., et al., *A mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(50): p. 38697-38704.
71. Qiu, J.-L., et al., *Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1*. *Plant Physiology*, 2008. **148**(1): p. 212-222.

72. Beck, M., et al., *Arabidopsis* homologs of nucleus-and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell Online*, 2010. **22**(3): p. 755-771.
73. López-Bucio, J., et al., *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of experimental botany*, 2013: p. ert368.
74. Oyama, T., Y. Shimura, and K. Okada, *The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in Arabidopsis*. *Plant J*, 2002. **30**(3): p. 289-99.
75. Dolan, L., et al., *Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root*. *Development*, 1993. **119**(1): p. 71-84.
76. Dolan, L. and S. Costa, *Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis*. *J Exp Bot*, 2001. **52**(Spec Issue): p. 413-7.
77. Grierson, C. and J. Schiefelbein, *Genetics of root hair formation*, in *Root Hairs2009*, Springer. p. 1-25.
78. Lin, Q., et al., *GLABRA2 Directly Suppresses Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Genes with Diverse Functions in Root Hair Development*. *Plant Cell*, 2015. **27**(10): p. 2894-2906.
79. Kwak, S.-H., R. Shen, and J. Schiefelbein, *Positional signaling mediated by a receptor-like kinase in Arabidopsis*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1111-1113.
80. Kim, D.W., et al., *Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns*. *Plant Cell*, 2006. **18**(11): p. 2958-70.
81. Won, S.K., et al., *Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009. **150**(3): p. 1459-73.
82. Datta, S., H. Prescott, and L. Dolan, *Intensity of a pulse of RSL4 transcription factor synthesis determines Arabidopsis root hair cell size*. *Nature Plants*, 2015. **1**: p. 15138.
83. Hwang, Y., et al., *Tracheophytes contain conserved orthologs of a basic helix-loop-helix transcription factor that modulate ROOT HAIR SPECIFIC genes*. *The Plant Cell Online*, 2017. **29**(1): p. 39-53.
84. Vijayakumar, P., S. Datta, and L. Dolan, *ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE4 (RSL4) promotes root hair elongation by transcriptionally regulating the expression of genes required for cell growth*. *New Phytologist*, 2016. **212**(4): p. 944-953.
85. Zhang, S., et al., *Multiple phytohormones promote root hair elongation by regulating a similar set of genes in the root epidermis in Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 2016: p. erw400.
86. Rymen, B., et al., *ABA suppresses root hair growth via OBP4 transcriptional-regulator repression of the RSL2 promoter*. *Plant Physiology*, 2017: p. pp. 01945.2016.
87. Woodward, A.W. and B. Bartel, *Auxin: regulation, action, and interaction*. *Ann Bot*, 2005. **95**(5): p. 707-35.
88. Velasquez, S.M., et al., *Auxin and cellular elongation*. *Plant Physiology*, 2016: p. pp. 01863.2015.
89. Zhao, Y., *Auxin biosynthesis and its role in plant development*. *Annual review of plant biology*, 2010. **61**: p. 49-64.
90. Sauer, M., S. Robert, and J. Kleine-Vehn, *Auxin: simply complicated*. *J Exp Bot*, 2013. **64**(9): p. 2565-77.
91. Kepinski, S. and O. Leyser, *The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor*. *Nature*, 2005. **435**(7041): p. 446-51.
92. Guilfoyle, T.J. and G. Hagen, *Auxin response factors*. *Curr Opin Plant Biol*, 2007. **10**(5): p. 453-60.
93. Guilfoyle, T., et al., *How does auxin turn on genes?* *Plant Physiol*, 1998. **118**(2): p. 341-7.
94. Guilfoyle, T.J. and G. Hagen, *Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions*. *Plant Sci*, 2012. **190**: p. 82-8.
95. Chapman, E.J. and M. Estelle, *Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants*. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 265-85.
96. Tiwari, S.B., G. Hagen, and T. Guilfoyle, *The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription*. *Plant Cell*, 2003. **15**(2): p. 533-43.
97. Colón-Carmona, A., et al., *Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro*. *Plant Physiology*, 2000. **124**(4): p. 1728-1738.
98. Worley, C.K., et al., *Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling*. *The Plant Journal*, 2000. **21**(6): p. 553-562.
99. Ouellet, F., P.J. Overvoorde, and A. Theologis, *IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype*. *The Plant Cell*, 2001. **13**(4): p. 829-841.

100. Garay-Arroyo, A., et al., *La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana*. REB. Revista de educación bioquímica, 2014. **33**(1): p. 13-22.
101. Guilfoyle, T.J. and G. Hagen, *Auxin response factors*. Current opinion in plant biology, 2007. **10**(5): p. 453-460.
102. Kim, J., K. Harter, and A. Theologis, *Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(22): p. 11786-11791.
103. Piya, S., et al., *Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in Arabidopsis*. Frontiers in plant science, 2014. **5**.
104. Ulmasov, T., et al., *Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements*. Plant Cell, 1997. **9**(11): p. 1963-71.
105. Wang, R. and M. Estelle, *Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway*. Current opinion in plant biology, 2014. **21**: p. 51-58.
106. Shin, R., et al., *The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction*. The Plant Cell, 2007. **19**(8): p. 2440-2453.
107. Varaud, E., et al., *AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp*. The Plant Cell, 2011. **23**(3): p. 973-983.
108. Ellis, C.M., et al., *AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana*. Development, 2005. **132**(20): p. 4563-74.
109. Kelley, D.R., et al., *ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in Arabidopsis*. Development, 2012. **139**(6): p. 1105-1109.
110. Liu, X., et al., *AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy*. The Plant Journal, 2014. **80**(4): p. 629-641.
111. Hunter, C., et al., *Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis*. Development, 2006. **133**(15): p. 2973-2981.
112. Pekker, I., J.P. Alvarez, and Y. Eshed, *Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity*. The Plant Cell, 2005. **17**(11): p. 2899-2910.
113. Finet, C., et al., *Parallel structural evolution of auxin response factors in the angiosperms*. The Plant Journal, 2010. **63**(6): p. 952-959.
114. Hardtke, C.S. and T. Berleth, *The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development*. The EMBO journal, 1998. **17**(5): p. 1405-1411.
115. Goetz, M., et al., *AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2006. **18**(8): p. 1873-1886.
116. Wang, J.-W., et al., *Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2005. **17**(8): p. 2204-2216.
117. Wilmoth, J.C., et al., *NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation*. Plant J, 2005. **43**(1): p. 118-30.
118. Fukaki, H., et al., *Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis*. The Plant Journal, 2002. **29**(2): p. 153-168.
119. Okushima, Y., et al., *Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19*. Plant Cell, 2005. **17**(2): p. 444-63.
120. Okushima, Y., et al., *ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis*. Plant Cell, 2007. **19**(1): p. 118-30.
121. Yuan, H. and D. Liu, *Signaling components involved in plant responses to phosphate starvation*. Journal of Integrative Plant Biology, 2008. **50**(7): p. 849-859.
122. Williamson, L.C., et al., *Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2001. **126**(2): p. 875-882.
123. Bates, T. and J. Lynch, *Stimulation of root hair elongation in Arabidopsis thaliana by low phosphorus availability*. Plant, Cell & Environment, 1996. **19**(5): p. 529-538.
124. Bates, T.R. and J.P. Lynch, *Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)*. Am J Bot, 2000. **87**(7): p. 958-63.

125. López-Bucio, J., et al., *Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system*. *Plant Physiology*, 2002. **129**(1): p. 244-256.
126. Svistoonoff, S., et al., *Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture*. *Nature genetics*, 2007. **39**(6): p. 792-796.
127. Shin, H., et al., *Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1; 1 and Pht1; 4 play a major role in phosphate acquisition from both low-and high-phosphate environments*. *The Plant Journal*, 2004. **39**(4): p. 629-642.
128. Muchhal, U.S., J.M. Pardo, and K. Raghothama, *Phosphate transporters from the higher plant Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(19): p. 10519-10523.
129. Karthikeyan, A.S., et al., *Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters*. *Plant Physiology*, 2002. **130**(1): p. 221-233.
130. Bustos, R., et al., *A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 2010. **6**(9): p. e1001102.
131. Rubio, V., et al., *A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae*. *Genes & development*, 2001. **15**(16): p. 2122-2133.
132. Altenhöfer, S., et al., *The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012. **69**(14): p. 2327-2343.
133. Winterbourn, C.C., *The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2014. **1840**(2): p. 730-738.
134. Boisson-Dernier, A., et al., *ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases*. *PLoS biology*, 2013. **11**(11): p. e1001719.
135. Foley, R.C., et al., *Genetic and genomic analysis of Rhizoctonia solani interactions with Arabidopsis; evidence of resistance mediated through NADPH oxidases*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56814.
136. Juarez, S.P., S. Mangano, and J.M. Estevez, *Improved ROS measurement in root hair cells*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1242**: p. 67-71.
137. Laohavisit, A., et al., *Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable conductance in root cells*. *Plant Cell*, 2012. **24**(4): p. 1522-33.
138. Görlach, A., et al., *Calcium and ROS: a mutual interplay*. *Redox biology*, 2015. **6**: p. 260-271.
139. Velasquez, S.M., et al., *O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth*. *Science*, 2011. **332**(6036): p. 1401-3.
140. Winter, D., et al., *An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets*. *PLoS One*, 2007. **2**(8): p. e718.
141. Rademacher, E.H., et al., *A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family*. *The Plant Journal*, 2011. **68**(4): p. 597-606.
142. Wilkins, K.A., et al., *Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots*. *Frontiers in plant science*, 2016. **7**.
143. Hepler, P.K., L. Vidali, and A.Y. Cheung, *Polarized cell growth in higher plants*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2001. **17**(1): p. 159-187.
144. Pei, W., et al., *Control of the actin cytoskeleton in root hair development*. *Plant Sci*, 2012. **187**: p. 10-8.
145. Kurusu, T., et al., *Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells*. *BMC plant biology*, 2012. **12**(1): p. 11.
146. White, P.J., et al., *Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2002. **1564**(2): p. 299-309.
147. Dutta, R. and K.R. Robinson, *Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts*. *Plant Physiology*, 2004. **135**(3): p. 1398-1406.
148. Kudla, J., O. Batistič, and K. Hashimoto, *Calcium signals: the lead currency of plant information processing*. *The Plant Cell*, 2010. **22**(3): p. 541-563.
149. Wang, Y., et al., *CNGC2 is a Ca²⁺ Influx Channel that Prevents Accumulation of Apoplastic Ca²⁺ in the Leaf*. *Plant Physiology*, 2016: p. pp. 01222.2016.
150. Frietsch, S., *The role of cyclic nucleotide-gated channels (CNGC) in plant development and stress responses in Arabidopsis thaliana*, 2006, Thesis dissertation, Ulm University, Germany.

151. Chang, F., et al., *A Putative Calcium-Permeable Cyclic Nucleotide-Gated Channel, CNGC18, Regulates Polarized Pollen Tube Growth*. Journal of Integrative Plant Biology, 2007. **49**(8): p. 1261-1270.
152. Zhang, S., et al., *Arabidopsis CNGC14 Mediates Calcium Influx Required for Tip Growth in Root Hairs*. Molecular Plant, 2017.
153. Zelman, A.K., et al., *Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels*. 2012.
154. Price, M.B., J. Jelesko, and S. Okumoto, *Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins*. Frontiers in plant science, 2012. **3**.
155. Michard, E., F. Alves, and J.A. Feijó, *The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm*. International Journal of Developmental Biology, 2009. **53**(8): p. 1609.
156. Michard, E., et al., *Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine*. Science, 2011. **332**(6028): p. 434-437.
157. Jin, R., et al., *Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain*. The EMBO journal, 2009. **28**(12): p. 1812-1823.
158. Roy, S.J., et al., *Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in Arabidopsis thaliana*. Plant, cell & environment, 2008. **31**(6): p. 861-871.
159. Cho, D., et al., *De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3. 1 impairs long-term Ca²⁺-programmed stomatal closure*. The Plant Journal, 2009. **58**(3): p. 437-449.
160. Li, J., et al., *A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem*. The Plant Cell Online, 2006. **18**(2): p. 340-349.
161. Vincill, E.D., et al., *Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in Arabidopsis*. The Plant Cell Online, 2013. **25**(4): p. 1304-1313.
162. Hamilton, E.S., A.M. Schlegel, and E.S. Haswell, *United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants*. Annual review of plant biology, 2015. **66**: p. 113-137.
163. Maksaev, G. and E.S. Haswell, *Recent characterizations of MscS and its homologs provide insight into the basis of ion selectivity in mechanosensitive channels*. Channels, 2013. **7**(3): p. 215-220.
164. Suchyna, T.M., et al., *Identification of a peptide toxin from Grammostola spatulata spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels*. The Journal of general physiology, 2000. **115**(5): p. 583-598.
165. Suchyna, T.M., et al., *Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 235-240.
166. Hwang, T.-C., R.E. Koeppe, and O.S. Andersen, *Genistein can modulate channel function by a phosphorylation-independent mechanism: importance of hydrophobic mismatch and bilayer mechanics*. Biochemistry, 2003. **42**(46): p. 13646-13658.
167. Bowman, C.L., et al., *Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 249-270.
168. Hou, C., et al., *DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes*. Cell research, 2014.
169. Yuan, F., et al., *OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in Arabidopsis*. Nature, 2014.
170. Schroeder, B.C., et al., *Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit*. Cell, 2008. **134**(6): p. 1019-1029.
171. Nakagawa, Y., et al., *Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(9): p. 3639-3644.
172. Yamanaka, T., et al., *MCA1 and MCA2 that mediate Ca²⁺ uptake have distinct and overlapping roles in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2010. **152**(3): p. 1284-1296.
173. Haswell, E.S. and E.M. Meyerowitz, *MscS-like proteins control plastid size and shape in Arabidopsis thaliana*. Current biology, 2006. **16**(1): p. 1-11.
174. Haswell, E.S., et al., *Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root*. Current biology, 2008. **18**(10): p. 730-734.
175. Guo, J., et al., *Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from Arabidopsis thaliana*. Nature, 2016. **531**(7593): p. 196-201.

176. Choi, W.-G., et al., *Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(17): p. 6497-6502.
177. Peiter, E., et al., *The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement*. Nature, 2005. **434**(7031): p. 404.
178. Sanders, D., et al., *Calcium at the crossroads of signaling*. The Plant Cell, 2002. **14**(suppl 1): p. S401-S417.
179. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. Physiological reviews, 2002. **82**(2): p. 331-371.
180. Richards, S.L., et al., *Annexin 1 regulates the H₂O₂-induced calcium signature in Arabidopsis thaliana roots*. The Plant Journal, 2014. **77**(1): p. 136-145.
181. Sanders, D., C. Brownlee, and J.F. Harper, *Communicating with calcium*. The Plant Cell, 1999. **11**(4): p. 691-706.
182. Inesi, G., *Calcium and copper transport ATPases: analogies and diversities in transduction and signaling mechanisms*. Journal of cell communication and signaling, 2011. **5**(3): p. 227-237.
183. Axelsen, K.B. and M.G. Palmgren, *Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2001. **126**(2): p. 696-706.
184. Sze, H., et al., *Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast*. Annual review of plant biology, 2000. **51**(1): p. 433-462.
185. Bonza, M. and M. De Michelis, *The plant Ca²⁺-ATPase repertoire: biochemical features and physiological functions*. Plant Biology, 2011. **13**(3): p. 421-430.
186. Huda, K.M.K., et al., *Global calcium transducer P-type Ca²⁺-ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling*. Journal of experimental botany, 2013. **64**(11): p. 3099-3109.
187. Tuteja, N. and S. Mahajan, *Calcium signaling network in plants: an overview*. Plant signaling & behavior, 2007. **2**(2): p. 79-85.
188. Hwang, I., D.M. Ratterman, and H. Sze, *Distinction between endoplasmic reticulum-type and plasma membrane-type Ca²⁺ pumps (partial purification of a 120-kilodalton Ca²⁺-ATPase from endomembranes)*. Plant Physiology, 1997. **113**(2): p. 535-548.
189. Moncoq, K., C.A. Trieber, and H.S. Young, *The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(13): p. 9748-9757.
190. Dunkley, T.P., et al., *Mapping the Arabidopsis organelle proteome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(17): p. 6518-6523.
191. Sadowski, P.G., et al., *Sub-cellular localization of membrane proteins*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 3991-4011.
192. Mills, R.F., et al., *ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2008. **146**(1): p. 116-128.
193. Li, X., et al., *A distinct endosomal Ca²⁺/Mn²⁺ pump affects root growth through the secretory process*. Plant Physiology, 2008. **147**(4): p. 1675-1689.
194. Nikolovski, N., et al., *Putative glycosyltransferases and other plant Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics*. Plant Physiology, 2012. **160**(2): p. 1037-1051.
195. Liang, F. and H. Sze, *A high-affinity Ca²⁺ pump, ECA1, from the endoplasmic reticulum is inhibited by cyclopiazonic acid but not by thapsigargin*. Plant Physiol, 1998. **118**(3): p. 817-25.
196. Liang, F., et al., *ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(16): p. 8579-8584.
197. Wu, Z., et al., *An endoplasmic reticulum-bound Ca(2+)/Mn(2+) pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn(2+) stress*. Plant Physiol, 2002. **130**(1): p. 128-37.
198. Harper, J.F., et al., *A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(2): p. 1099-1106.
199. Bose, J., et al., *Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants*. Frontiers in plant science, 2011. **2**.
200. Hwang, I., H. Sze, and J.F. Harper, *A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(11): p. 6224-6229.

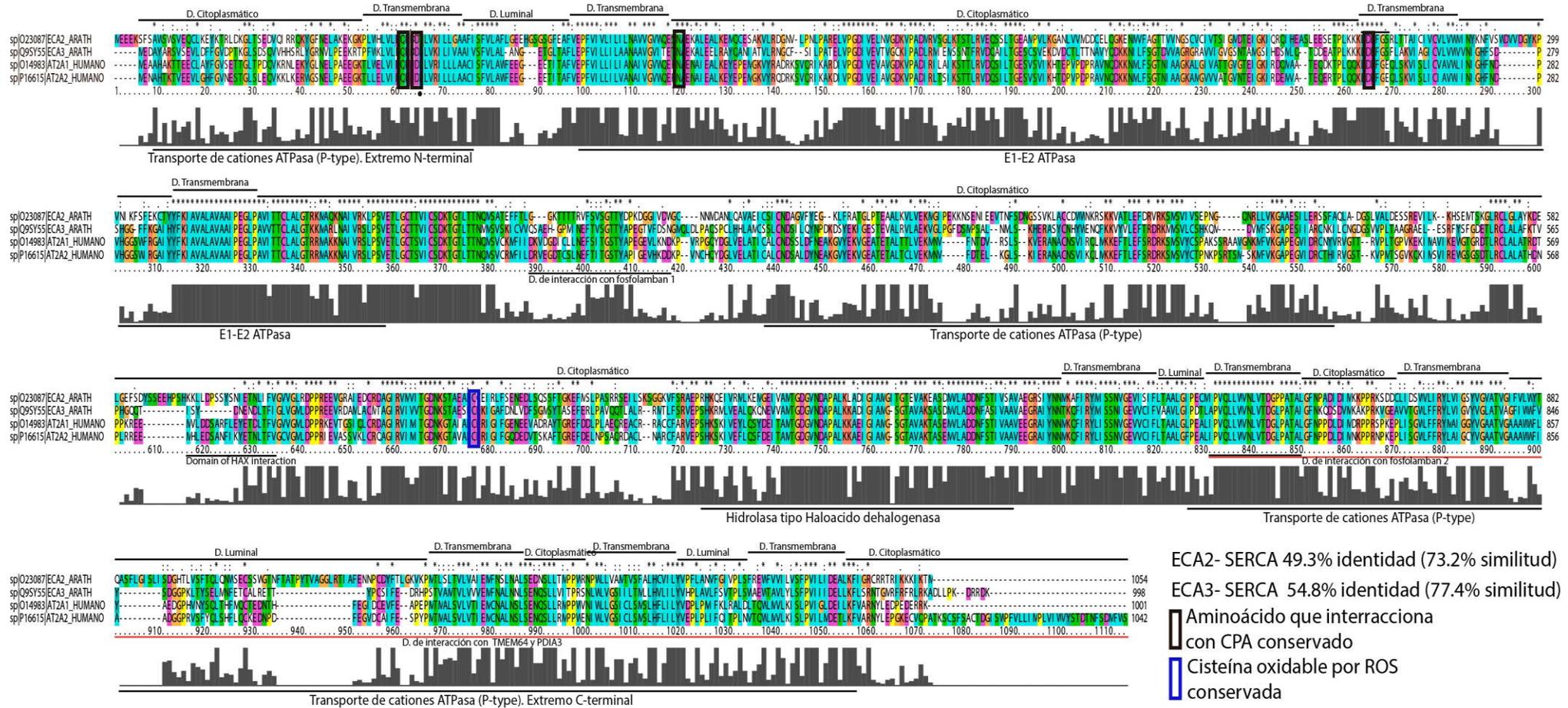
201. Schiøtt, M., et al., *A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9502-9507.
202. Iwano, M., et al., *A pollen coat–inducible autoinhibited Ca²⁺-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae*. The Plant Cell Online, 2014. **26**(2): p. 636-649.
203. Limonta, M., et al., *ACA12 is a deregulated isoform of plasma membrane Ca²⁺-ATPase of Arabidopsis thaliana*. Plant molecular biology, 2014. **84**(4-5): p. 387-397.
204. George, L., et al., *The ACA10 Ca²⁺-ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2008. **146**(2): p. 716-728.
205. Shigaki, T., et al., *Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters*. Journal of Molecular Evolution, 2006. **63**(6): p. 815-825.
206. Martinoia, E., M. Maeshima, and H.E. Neuhaus, *Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism*. Journal of experimental botany, 2006. **58**(1): p. 83-102.
207. Zhai, J., et al., *Ca²⁺/H⁺ exchange in the plasma membrane of Arabidopsis thaliana leaves*. Acta physiologiae plantarum, 2013. **35**(1): p. 161-173.
208. Spalding, E.P. and J.F. Harper, *The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport*. Current opinion in plant biology, 2011. **14**(6): p. 715-720.
209. Hirschi, K., *Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic?* Trends in Plant Science, 2001. **6**(3): p. 100-104.
210. Hirschi, K.D., et al., *CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(16): p. 8782-8786.
211. Mäser, P., et al., *Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis*. Plant Physiology, 2001. **126**(4): p. 1646-1667.
212. Hirschi, K.D., et al., *Expression of Arabidopsis CAX2 in tobacco. altered metal accumulation and increased manganese tolerance*. Plant Physiology, 2000. **124**(1): p. 125-134.
213. Catterall, W.A. and T.M. Swanson, *Structural basis for pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels*. Molecular pharmacology, 2015. **88**(1): p. 141-150.
214. Laursen, M., et al., *Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(20): p. 13513-13518.
215. Candeo, A., et al., *Light Sheet Fluorescence Microscopy Quantifies Calcium Oscillations in Root Hairs of Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 2017: p. pxc045.
216. Velasquez, S.M., N.D. Iusem, and J.M. Estevez, *Root hair sweet growth*. Plant Signal Behav, 2011. **6**(10): p. 1600-2.
217. Velasquez, M., et al., *Recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls*. Front Plant Sci, 2012. **3**.
218. Wu, Z., et al., *An endoplasmic reticulum-bound Ca²⁺/Mn²⁺ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn²⁺ stress*. Plant Physiology, 2002. **130**(1): p. 128-137.
219. Michelis, M.I., A. Camelli, and F. Rasi-Caldogno, *The Ca²⁺ pump of the plasma membrane of Arabidopsis thaliana: characteristics and sensitivity to fluorescein derivatives*. Plant Biology, 1993. **106**(1): p. 20-25.
220. Hudasek, K., S.T. Brown, and I.M. Fearon, *H₂O₂ regulates recombinant Ca²⁺ channel α 1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **318**(1): p. 135-141.
221. Sharov, V.S., et al., *Quantitative mapping of oxidation-sensitive cysteine residues in SERCA in vivo and in vitro by HPLC–electrospray-tandem MS: selective protein oxidation during biological aging*. Biochemical Journal, 2006. **394**(3): p. 605-615.
222. Evangelista, A.M., et al., *Nox4-and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(12): p. 2327-2334.
223. Petrov, V., et al., *ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants*. Frontiers in plant science, 2015. **6**.
224. Pires, N. and L. Dolan, *Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants*. Molecular biology and evolution, 2009. **27**(4): p. 862-874.

225. Zürcher, E., et al., *A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta*. *Plant Physiology*, 2013. **161**(3): p. 1066-1075.
226. Laohavisit, A., et al., *Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺-and K⁺-permeable conductance in root cells*. *The Plant Cell*, 2012. **24**(4): p. 1522-1533.
227. Randall, S.K., *Characterization of vacuolar calcium-binding proteins*. *Plant Physiology*, 1992. **100**(2): p. 859-867.
228. Lee, S.M., et al., *Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca²⁺-ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in Arabidopsis*. *Febs Letters*, 2007. **581**(21): p. 3943-3949.
229. Weigel, D. and J. Glazebrook, *Arabidopsis: A Laboratory Manual* 2002: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
230. Alonso, J.M., et al., *Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003. **301**(5633): p. 653-657.
231. Abramoff, M.D., P.J. Magalhaes, and S.J. Ram, *Image processing with ImageJ*. *Biophotonics international*, 2004. **11**(7): p. 36-43.
232. Uslu, V.V. and G. Grossmann, *The biosensor toolbox for plant developmental biology*. *Current opinion in plant biology*, 2016. **29**: p. 138-147.
233. Costa, A., et al., *H₂O₂ in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a Ca²⁺-dependent scavenging system*. *The Plant Journal*, 2010. **62**(5): p. 760-772.
234. Belousov, V.V., et al., *Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide*. *Nature methods*, 2006. **3**(4): p. 281-286.
235. Horikawa, K., et al., *Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano*. *Nature Methods*, 2010. **7**(9): p. 729-732.
236. Bardgett, R.D., L. Mommer, and F.T. De Vries, *Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes*. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014. **29**(12): p. 692-699.
237. Keinath, N., et al., *Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22- and chitin-induced transient [Ca²⁺] cyt patterns in Arabidopsis*. *Molecular plant*, 2015.
238. Monshausen, G.B., et al., *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*, 2011. **65**(2): p. 309-318.
239. Gjetting, S.K., et al., *Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor*. *Journal of experimental botany*, 2012: p. ers040.
240. Mishina, N.M., et al., *Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe*. *Methods Enzymol*, 2013. **526**: p. 45-59.
241. Hernández-Barrera, A., et al., *Hyper, a Hydrogen Peroxide Sensor, Indicates the Sensitivity of the Arabidopsis Root Elongation Zone to Aluminum Treatment*. *Sensors*, 2015. **15**(1): p. 855-867.
242. Rincón-Zachary, M., et al., *Fluorescence resonance energy transfer-sensitized emission of yellow cameleon 3.60 reveals root zone-specific calcium signatures in Arabidopsis in response to aluminum and other trivalent cations*. *Plant Physiology*, 2010. **152**(3): p. 1442-1458.
243. Swanson, S.J. and S. Gilroy, *Imaging changes in cytoplasmic calcium using the Yellow Cameleon 3.6 biosensor and confocal microscopy*. *Plant Lipid Signaling Protocols*, 2013: p. 291-302.
244. Nagai, T., et al., *Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(29): p. 10554-10559.
245. Bonza, M.C., et al., *Analyses of Ca²⁺ accumulation and dynamics in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis root cells using a genetically encoded Cameleon sensor*. *Plant Physiology*, 2013. **163**(3): p. 1230-1241.
246. Swanson, S.J., et al., *In vivo imaging of Ca²⁺, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants*. *Annual review of plant biology*, 2011. **62**: p. 273-297.
247. Costa, A., et al., *Calcium dynamics in root cells of Arabidopsis thaliana visualized with selective plane illumination microscopy*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e75646.
248. Maizel, A., et al., *High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy*. *The Plant Journal*, 2011. **68**(2): p. 377-385.
249. Berthet, B. and A. Maizel, *Light sheet microscopy and live imaging of plants*. *Journal of microscopy*, 2016. **263**(2): p. 158-164.

250. Cho, H.T., *A cis-Element for Root Hair Specificity Has Been Co-opted Repeatedly Through the Divergence of Upstream Fate-Determining Machineries*. *Plant Signal Behav*, 2007. **2**(2): p. 117-9.
251. Curtis, M.D. and U. Grossniklaus, *A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta*. *Plant Physiol*, 2003. **133**(2): p. 462-9.
252. Gendrel, A.-V., et al., *Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1*. *Science*, 2002. **297**(5588): p. 1871-1873.
253. Kang, M.J., et al., *Repression of flowering under a noninductive photoperiod by the HDA9-AGL19-FT module in Arabidopsis*. *New Phytologist*, 2015. **206**(1): p. 281-294.
254. Noh, B., et al., *Divergent roles of a pair of homologous Jumonji/Zinc-Finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time*. *The Plant Cell*, 2004. **16**(10): p. 2601-2613.
255. Moehs, C.P., E.F. McElwain, and S. Spiker, *Chromosomal proteins of Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 1988. **11**(4): p. 507-515.
256. Lee, Y., et al., *A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis*. *Cell*, 2013. **153**(2): p. 402-12.
257. Xie, H.-T., et al., *Spatiotemporal Production of Reactive Oxygen Species by NADPH Oxidase Is Critical for Tapetal Programmed Cell Death and Pollen Development in Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 2014: p. tpc. 114.125427.
258. Shih, H.-W., et al., *The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in Arabidopsis thaliana*. *Current biology*, 2015. **25**(23): p. 3119-3125.

ANEXO 1

ALINEAMIENTO MULTIPLE DE SECUENCIAS: CLUSTAL 2.0.12



ECA2- SERCA 49.3% identidad (73.2% similitud)

ECA3- SERCA 54.8% identidad (77.4% similitud)

Anexo 1: Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de ECA2, ECA3 Y SERCA. Alineamiento múltiple mediante el uso de CLUSTAL2.0.12. El alineamiento se realizó con las secuencias de aminoácidos de ECA2 de *Arabidopsis thaliana* (ECA2_ARATH), ECA3 de *Arabidopsis thaliana* (ECA3_ARATH), SERCA 1 de humanos (AT2A1_HUMANO) y SERCA2 de humanos (AT2A2_HUMANO). Se encuentran remarcados los diferentes dominios estructurales y funcionales. Se resaltan los aminoácidos conservados que participan en la formación del bolsillo de interacción con CPA y la cisteína oxidable por ROS. Barras grises=histograma representando grado de conservación del aminoácido. * Aminoácido conservado, :aminoácido parcialmente conservado, D.=Dominio.