



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

NAC1 regula la expresión de las peptidasas CEP1-CEP3 que modulan el crecimiento de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana*

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

Lic. Diana Rosa Rodríguez García

Director de tesis: Dr. José M. Estévez.

Consejero de estudios: Dr. Pablo Cerdán

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

Buenos Aires, 2023

NAC1 regula la expresión de las peptidasas CEP1-CEP3 que modulan el crecimiento de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana*

Los pelos radicales (PR) son estructuras unicelulares con crecimiento polarizado capaces de incrementar varias veces su tamaño original favoreciendo la absorción de agua y nutrientes del suelo. Para que la célula vegetal pueda crecer es necesario que ocurran modificaciones estructurales en la pared celular. Entre las proteínas que componen la pared están las extensinas (EXTs), las cuales juegan un papel clave en el crecimiento polar del pelo radical. Las plantas codifican un grupo único de cisteína endopeptidasas (CysEP o CEP) de tipo papaína capaces de procesar las EXTs. Dado que las CEPs pueden escindir EXT y proteínas relacionadas con EXT, actuando como agentes debilitadores de la pared celular, éstas podrían influir en el proceso de elongación celular. El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica tres CEPs (AtCPE1-AtCEP3). En este trabajo se observó que AtCEP1-AtCEP3 se expresan en los PR. Dobles mutantes insercionales de CEPs, *cep1-3cep3-2* y *cep1-3cep2-2* presentaron PR más largos que las plantas de tipo salvaje (Wt), lo que sugiere que la expresión de AtCEPs en los tricoblastos modula negativamente el crecimiento polar de los PR. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se observó que el factor de transcripción NAC1 se une al promotor de AtCEP1, AtCEP2 y, en menor medida, a AtCEP3 y puede regular directamente su expresión. A su vez, la sobreexpresión de NAC1 aumenta los niveles de transcripción de AtCEP1 y AtCEP2 en las raíces, mientras que la pérdida de función de la mutación *nac1-2* reduce la expresión de los genes AtCEP1-AtCEP3 y aumenta el crecimiento de los PR. En correspondencia con esto, la expresión de la construcción represora NAC1-SRDX conduce a una mayor longitud de PR. Finalmente, mostramos que las paredes celulares de los PR en el doble mutante *cep1-3cep3-2* tienen niveles reducidos de EXT, lo que sugiere que los defectos en el alargamiento del pelo radical están relacionados con alteraciones en el procesamiento y la acumulación de EXT. En conjunto, nuestros resultados respaldan la participación de AtCEPs en el control del crecimiento polar de los PR a través del procesamiento EXT y la insolubilización en la pared celular.

Palabras claves: *Arabidopsis thaliana*, cisteína endopeptidasas (CEPs), extensinas, NAC1, pared celular, pelos radicales.

NAC1 directs CEP1-CEP3 peptidase expression and modulates root hair growth in Arabidopsis

Root hairs (RH) are single cells with polarized growth that increase several times their original size, thus allowing the absorption of water and nutrients from the soil. In order for the plant cell to grow, structural modifications in the cell wall are necessary. Among the proteins that make up the wall are extensins (EXTs), which play a key role in the polar growth of the root hair. Plant genomes encode a unique group of papain-type Cysteine EndoPeptidases (CysEPs or CEPs) capable of processing EXTs. Since CEPs are able to cleave EXTs and EXT-related proteins, acting as cell wall-weakening agents, they may play a role in cell elongation. *Arabidopsis thaliana* genome encodes three CEPs (AtCPE1-AtCEP3). Here we report that *AtCEP1-AtCEP3* are expressed in RH cell files. Double mutants *cep1-3cep3-2* and *cep1-3cep2-2* have longer RH than wild type (Wt) plants, suggesting that expression of *AtCEPs* in root trichoblasts restrains polar elongation of the RH. We provide evidence that the transcription factor *NAC1* activates *AtCEPs* expression in roots to limit RH growth. Chromatin immunoprecipitation indicates that *NAC1* binds the promoter of *AtCEP1*, *AtCEP2*, and to a lower extent to *AtCEP3* and may directly regulate their expression. Indeed, *NAC1* overexpression increases *AtCEP1* and *AtCEP2* transcript levels in roots while the loss of function *nac1-2* mutation reduces *AtCEP1-AtCEP3* gene expression and enhances RH growth. Likewise, expression of a dominant chimeric *NAC1-SRDX* repressor construct leads to increased RH length. Finally, we show that RH cell walls in the *cep1-3cep3-2* double mutant have reduced levels of EXT deposition, suggesting that the defects in RH elongation are linked to alterations in EXT processing and accumulation. Taken together, our results support the involvement of *AtCEPs* in controlling RH polar growth through EXT-processing and insolubilization at the cell wall.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, cysteine endopeptidase (CEPs), extensins, *NAC1*, cell wall, root hairs

Agradecimientos

Hacer un doctorado no solo es un desafío académico, también implica un gran desafío en el plano personal. Quiero agradecer profundamente a todas las personas que me apoyaron en esta etapa y contribuyeron a mi crecimiento.

A José por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme las herramientas necesarias para desarrollarme profesionalmente.

A mis compañeros de laboratorio Javier, Viky, Yoss, Leo y Gaby por el aguante, los cafés y las cervezas compartidas, las charlas y las locuras.

A Esteban Miglietta, Andrés Rossi, Ariel Aptekmann, Alejandro Nadra, Lucía Ferrero, Federico Ariel por su ayuda y colaboración en este proyecto.

A Enrique Rojo, José Sánchez Serrano, Maite y Alex por acogerme en su laboratorio y por guiarme y enseñarme con la mejor disposición. Fue muy valioso para mí el tiempo compartido.

A los miembros de mi Comité de Seguimiento de Tesis: Gaby Auge, Santiago Mora y Ken Kobayashi por el tiempo dedicado y por las sugerencias para mejorar.

A las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo: CONICET, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Fundación Instituto Leloir (IIBBA-FIL) y a la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Al equipo de serología Lab SeVa que me permitió contribuir en un contexto tan difícil como lo fue la pandemia de COVID-19 y me dio la oportunidad de acercarme a otras ramas de la ciencia.

A Mori, Gio, Ger, Lu, Hori, Yanni, Diana, Sole, Javier, Yoss y Viky por acompañarme estos años y sentir que puedo contar con ustedes. Me salvó tantas veces tenerles cerca...

A todas las personas de FIL que de una forma u otra me manifestaron su cariño y me brindaron su ayuda.

A mi mamá, mi papá, mi esposo y el resto de mi familia por alentarme siempre a no tomar el camino más fácil. Por tener las palabras precisas en los momentos más complejos, por hacer suyos mis logros, compartir mis alegrías y aceptarme tal cual soy.

A Víctor, por su apoyo incondicional y mantenerse ecuánime cuando he estado a punto del colapso. Gracias amor, por brindarme el sosiego necesario para continuar, por estar ahí.

A mi mamá y mi papá...

Contenido

Índice de tablas	vii
Índice de figuras	vii
Publicaciones	ix
Abreviaturas	x
Introducción.....	1
1. Pelos radicales como modelo celular para el estudio del crecimiento polarizado de la célula vegetal	1
2. Pared celular en plantas	8
2.1 Extensinas	10
3. Cisteínas endopeptidasas (CEPs)	15
3.1 Familia de factores de transcripción NAC.....	17
Hipótesis	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Materiales y Métodos:	20
1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	20
2. Mutantes Insercionales de T-ADN.....	20
3. Análisis de fenotipo del pelo radical	21
4. Análisis de expresión mediante PCR cuantitativa en Tiempo Real (qPCR)	21
5. Obtención de las líneas reporteras transcripcionales de CEP3 y NAC1	22
6. Adquisición de imágenes de las líneas reporteras de AtCEPs y NAC1 mediante el uso de Microscopía Láser Confocal	22
7. Análisis de localización subcelular de AtCEP2.....	23
8. Obtención de las construcciones <i>SS-TOMATO</i> y <i>SS-TOMATO EXT-LONG</i>	24

9. Determinación de los niveles citoplasmáticos y apoplásticos de ROS en el ápice de los pelos radicales	26
10. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina.....	26
11. Modelado y acoplamiento (<i>docking</i>) molecular entre AtCEP1-AtCEP3 y EXTs....	27
Resultados y discusión.....	33
1. Expresión de CEPs en los pelos radicales.....	33
2. Localización subcelular de CEP2.....	37
2.1 Análisis de colocalización	38
3. Caracterización de mutantes insercionales de AtCEPs	42
4. Regulación transcripcional de AtCEPs.....	44
4.1 Influencia del factor de transcripción NAC1 en el crecimiento de los pelos radicales	44
4.2 Relación de AtCEPs con el factor de transcripción NAC1	48
5. Efecto de la actividad de CEPs en la insolubilidad de las EXT en la pared celular	51
6. Estudio de la homeostasis de ROS en mutantes de CEPs.....	53
7. Modelado por homología y acoplamiento (<i>docking</i>) molecular entre AtCEP1-AtCEP3 y EXTs	55
Conclusiones.....	59
Perspectivas futuras.....	62
Referencias Bibliográficas	63

Índice de tablas

Tabla 1. Mutantes insercionales usadas en este estudio.	29
Tabla 2. Líneas transgénicas usadas en este estudio.	30
Tabla 3. Lista de primers usados.	31

Índice de figuras

Figura 1I: Representación de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Figura 2I: Componentes moleculares y celulares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales.	5
Figura 3I: Crecimiento oscilatorio de los pelos radicales.	6
Figura 4I. Modelo de polisacáridos en la pared celular de una hoja de <i>Arabidopsis</i>	9
Figura 5I. Modelo de ensamblaje y entrecruzamiento de redes de extensina (EXT). ...	13
Figura 1. Patrón de expresión de CEP1 y CEP3 en raíz.	33
Figura 2. AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 se expresan en los pelos radicales.	36
Figura 3. La expresión de CEP2 se limita al citoplasma de los pelos radicales.	38
Figura 4. AtCEP2 colocaliza principalmente con el marcador de membrana ER.	41
Figura 5. AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 regulan negativamente el crecimiento del pelo radicular.	43
Figura 6. NAC1 se expresa en pelos radicales.	45
Figure 7. NAC1 regula negativamente el crecimiento de los pelos radicales.	47
Figura 8. NAC1 regula la expresión de CEP1-CEP3.	50
Figura 9. La secreción/insolubilización de EXT se ve afectada por AtCEP1-AtCEP3 en los pelos radiculares.	52
Figura 10. ROS apoplásticas se ven afectadas por AtCEP1-AtCEP3 en los pelos radiculares.	55

Figura 11. Alineación de proteínas y dominios de secuencias AtCEP1-AtCEP3 de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Ricinus</i> CEP 1SV4 (RcCysEP).....	57
Figura 12. Interacción de las enzimas CEPs con péptidos de EXT, determinada mediante un ensayo de acoplamiento (<i>docking</i>) molecular <i>in silico</i>	58
Figura 13. Modelo propuesto para explicar la función de las AtCEPs en el crecimiento polarizado del pelo radical.....	61

Publicaciones

Derivada de esta tesis:

Rodríguez-García DR, Rondón Guerrero YDC, Ferrero L, Rossi AH, Miglietta EA, Aptekmann AA, Marzol E, Martínez Pacheco J, Carignani M, Berdion Gabarain V, et al (2023) Transcription factor NAC1 activates expression of peptidase-encoding AtCEPs in roots to limit root hair growth. **Plant Physiology** **193**: 1000–1010

Otras:

Pacheco JM, Ranocha P, Kasulin L, Fusari CM, Servi L, Aptekmann AA, Gabarain VB, Peralta JM, Borassi C, Marzol E, **Rodríguez-García DR**, et al (2022) Apoplastic class III peroxidases PRX62 and PRX69 promote Arabidopsis root hair growth at low temperature. **Nat Commun** **13**: 1310

Marzol E, Borassi C, Carignani Sardoy M, Ranocha P, Aptekmann AA, Bringas M, Pennington J, Paez-Valencia J, Martínez Pacheco J, **Rodríguez-García DR**, et al (2022) Class III Peroxidases PRX01, PRX44, and PRX73 Control Root Hair Growth in Arabidopsis thaliana. **International Journal of Molecular Sciences** **23**: 5375

Gonzalez Lopez Ledesma, María M., Lautaro Sanchez, Diego S. Ojeda, Santiago Oviedo Rouco, Andrés H. Rossi, Augusto Varese, Ignacio Mazzitelli, Carla A. Pascuale, Esteban A. Miglietta, Pamela E. Rodríguez, Horacio M. Pallarés, Guadalupe S. Costa Navarro, Julio J. Caramelo, Paul W. Rothlauf, Zhuoming Liu, Louis-Marie Bloyet, Marjorie Cornejo Pontelli, Natali B. Rasetto, Shirley D. Wenker, Lila Y. Ramis, Magalí G. Bialer, María Jose de Leone, C. Esteban Hernando, Luciana Bianchimano, Antonella S. Ríos, María Soledad Treffinger Cienfuegos, **Diana R. Rodríguez García**, et al (2022) Longitudinal Study after Sputnik V Vaccination Shows Durable SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies and Reduced Viral Variant Escape to Neutralization over Time. **mBio** **13**: e03442-21

Carla A. Pascuale, Augusto Varese, Diego S. Ojeda, Marina E. Pasinovich, Laura Lopez, Andres H. Rossi, Pamela E. Rodriguez, Esteban A. Miglietta, **Laboratorio SeVa Group**, Ignacio Mazzitelli, et al (2022) Immunogenicity and reactogenicity of heterologous immunization against SARS CoV-2 using Sputnik V, ChAdOx1-S, BBIBP-CorV, Ad5-nCoV, and mRNA-1273. **CR Med.** doi: [10.1016/j.xcrm.2022.100706](https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100706) (*como parte del Laboratorio SeVa Group*)

Rodriguez PE, Silva AP, Miglietta EA, Rall P, Pascuale CA, Ballejo C, López Miranda L, Ríos AS, Ramis L, Marro J, Poncet V, Mazzitelli B, Salvatori M, Ceballos A, Gonzalez Lopez Ledesma MM, Ojeda DS, Aguirre MF, Miragaya Y, Gamarnik AV, Rossi AH; **Laboratorio SeVa Group**; PAMI Group (2022) Humoral response and neutralising capacity at 6 months post-vaccination against COVID-19 among institutionalised older adults in Argentina. **Frontiers in Immunology** **13**: (*como parte del Laboratorio SeVa Group*)

Borassi C, Gloazzo Dorosz J, Ricardi MM, Carignani Sardoy M, Pol Fachin L, Marzol E, Mangano S, **Rodríguez García DR**, Martínez Pacheco J, Rondón Guerrero Y del C, et al (2020) A cell surface arabinogalactan-peptide influences root hair cell fate. **New Phytologist** **227**: 732–743

Marzol E, Borassi C, Bringas M, Sede A, **Rodríguez García DR**, Capece L, Estevez JM (2018) Filling the Gaps to Solve the Extensin Puzzle. **Molecular Plant** **11**: 645–658

Abreviaturas

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

ABRC: Del inglés *Arabidopsis Biological Resource Center*

ARF: Factor de respuesta a auxinas.

cADN: ADN copia.

CEPs: Cisteína Endopeptidasas.

ChIP-qPCR (técnica): Inmunoprecipitación de Cromatina seguido de secuenciación del ADN o qPCR, del inglés *Chromatin Immunoprecipitation*

EXT: Extensina.

FT: Factor de transcripción.

GFP: Proteína verde fluorescente

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HRGP: glicoproteínas ricas en hidroxiprolina

IAA: ácido 3-indol-acético

MS: sales *Murashige and Skoog*.

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

PCD: Muerte celular programada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PR: Pelo radical

qPCR: PCR en tiempo real.

RE: Retículo endoplásmico.

RHE: elementos específicos de pelos radicales.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RT-PCR: Retro-transcripción asociada a PCR.

TM: Transmembrana.

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

Introducción

1. Pelos radicales como modelo celular para el estudio del crecimiento polarizado de la célula vegetal

Las raíces en las plantas proporcionan anclaje estructural y acceso al agua y nutrientes, lo cual es vital para la supervivencia de las mismas. Además, constituyen el sitio de interacciones simbióticas con microorganismos que viven en el suelo (Grierson et al., 2014). A medida que las plantas encuentran suelos heterogéneos en los que los nutrientes y el agua no se distribuyen equitativamente, la arquitectura de su sistema radicular se modifica consecuentemente. En la epidermis de las raíces se encuentran los pelos radicales (PR), que son células con forma tubular que sobresalen de la superficie de la raíz y presentan crecimiento polarizado. La modificación dinámica del crecimiento, longitud, densidad y morfología del pelo radical permite a la planta satisfacer su demanda de agua y nutrientes en diferentes condiciones de suelo (Forde and Lorenzo, 2001; López-Bucio et al., 2003; Morris et al., 2017). Además, los PR también contribuyen al anclaje de la planta al suelo y a la interacción con microorganismos. En varios mutantes con pérdida de función de genes importantes para el desarrollo de los PR, el rendimiento de las plantas se ve afectado cuando se cultivan en medios con valores de pH o fosfato alterados (Wu et al., 2007; Miguel et al., 2015), esto evidencia su importancia para la fisiología de las plantas.

El hecho de que los PR presenten un rápido crecimiento (puede superar velocidades de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$) y de que sean capaces de aumentar cientos de veces su tamaño original, llegando a tener aproximadamente 10 μm de diámetro y 1 mm de longitud o más, los convierte en un excelente modelo para el estudio de la expansión celular polarizada y de procesos moleculares a nivel de célula individual en plantas. Su ubicación en la superficie de la raíz y alejados del cuerpo de la planta implica que son de fácil visualización y accesibles para variedad de manipulaciones experimentales. No son esenciales para la viabilidad de la planta, lo que permite el análisis de todo tipo de mutantes que alteren su función y desarrollo. Los PR se vuelven visibles poco después de la germinación de las semillas, lo que permite realizar pruebas genéticas y fisiológicas

de manera rápida con gran número de individuos cultivados en medios controlados. Además, la falta de una capa de cutícula permite la aplicación sencilla de pruebas físicas y químicas (Grierson et al., 2014). Estas son otras ventajas que implican usar los PR como modelo para el estudio de expansión celular polarizada.

Los PR se forman en la zona de diferenciación de la raíz y completan su desarrollo en la zona de maduración. La distribución de los pelos en la raíz varía según la especie de planta y puede verse afectada por las condiciones de crecimiento. Según estudios del patrón epidérmico de la raíz en diferentes especies, existen tres tipos de diferenciación para que se formen los PR (Dolan *and* Costa, 2001). En el primer tipo, las células epidérmicas de la raíz pueden producir pelos en cualquier posición. En el segundo tipo, los PR se desarrollan a partir de células más pequeñas derivadas de una división celular asimétrica y en el tercer tipo, las células que forman pelos se alternan con células que no dan lugar a pelos.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, que será el objeto de estudio en este trabajo, se manifiesta el tercer tipo de patrón de distribución de diferenciación de PR. Las células que se desarrollan del meristema apical de la raíz pasan a la zona de elongación y una vez que se han expandido totalmente a lo largo de su eje longitudinal, comienzan a diferenciarse de acuerdo a su destino celular (Figura 1| A). En el caso de la epidermis, el destino celular puede ser de tricoblasto, si la célula se diferencia en pelo radical, o de atricoblasto si la célula no desarrolla pelo (Dolan et al., 1993).

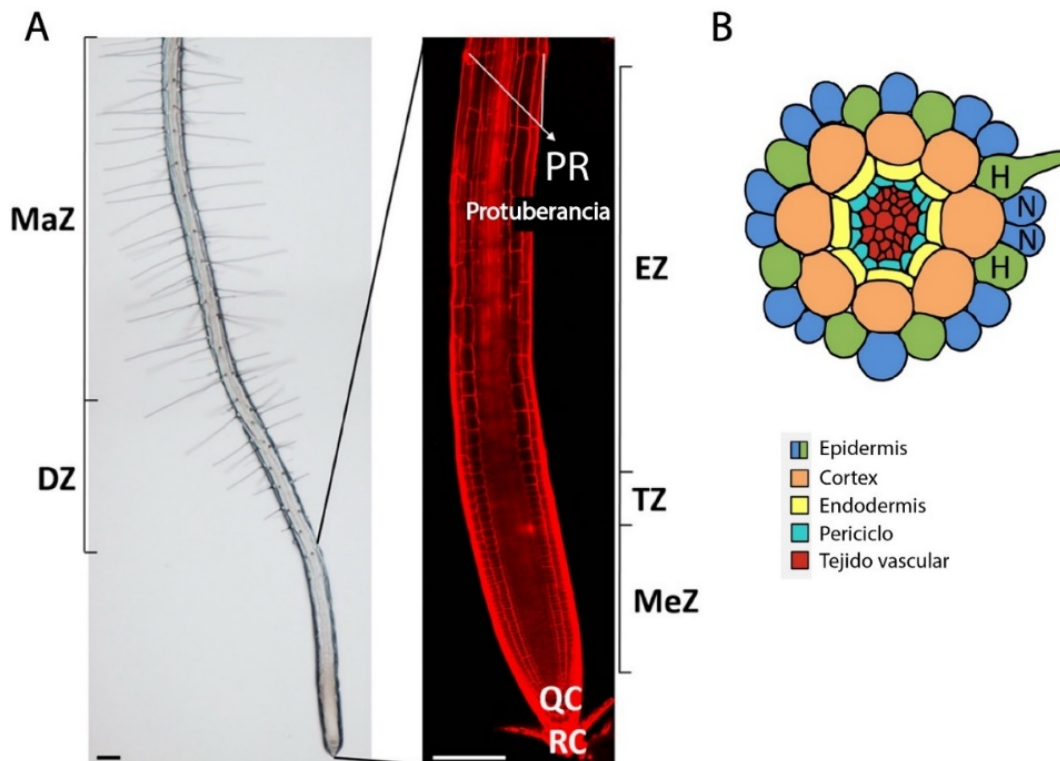


Figura 11: Representación de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

(A) Imagen de campo claro (izquierda) y de microscopía confocal (derecha) de la raíz de una planta de 7 días con sus diferentes zonas de crecimiento. MaZ: zona de maduración, DZ: zona de diferenciación, EZ: zona de elongación, TZ: zona de transición, MeZ: zona meristemática, QC: centro quiescente, RC: cofia. **(B)** Representación esquemática de un corte transversal de la raíz. Células epidérmicas que se encuentran en contacto con dos células del córtex (posición H) dan lugar a la formación de PR. Células en contacto con una única célula cortical (posición N) no desarrollará pelo radical. Adaptado de Balcerowicz et al., 2015.

El destino de las células epidérmicas es regulado por un mecanismo dependiente de la posición. Si una célula epidérmica se encuentra sobre la unión de dos células corticales (posición "H" por *hair*) al diferenciarse, desarrollará un pelo radical, mientras que si la célula epidérmica está en contacto con una sola célula cortical (posición "N" por *non hair*) no desarrollará pelo (Figura 11 B). Los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación tricoblasto o atricoblasto son bastante complejos y se encuentran establecidos desde etapas tempranas en la embriogénesis, lo cual sucede mucho antes de que se manifieste la primera señal de diferenciación epidérmica. Varios estudios sugieren que el destino celular en los tricoblastos está determinado por la ausencia de

una ruta inhibitoria que impide la formación del pelo radical. Este tema se encuentra bien abordado en (Balcerowicz et al., 2015).

Los PR pueden alterar su tamaño, velocidad de crecimiento y densidad en respuesta a determinadas señales medioambientales como la disponibilidad de nutrientes de baja movilidad (ejemplo: fosfato inorgánico, hierro y manganeso) o elementos escasos (ejemplo: vanadio y boro) (Yi et al., 2010; Niu et al., 2014; Lin et al., 2015). El desarrollo de los pelos también se puede ver afectado por estrés salino, hídrico, baja temperatura, metales pesados y estrés oxidativo (Zhang et al., 2023). Señales internas generadas por hormonas como el etileno, auxina, citoquininas, estrigolactonas, ácido jasmónico y ácido abscísico también están estrechamente vinculadas al crecimiento polarizado de los PR (Vissenberg et al., 2020).

Como fue mencionado anteriormente, los PR presentan crecimiento polarizado, el cual da lugar a células tubulares en las que el crecimiento está restringido al ápice. Además de los PR, los tubos polínicos también presentan este tipo de crecimiento. Este proceso es sostenido por un flujo constante de vesículas que, mediante eventos de exocitosis, depositan en el ápice moléculas como polisacáridos y glicoproteínas de la pared celular necesarios para la formación de nueva pared. También son transportadas proteínas integrales de membrana que intervienen en la expansión celular (Figura 2I). Se estima que se requieren más de 9000 eventos de exocitosis por minuto para mantener la expansión celular polarizada (Ketelaar et al., 2008). Durante este crecimiento el citoplasma está altamente polarizado, solo una fina capa rodea a la vacuola central mientras que hay una acumulación en las zonas subapical y apical de la célula. El núcleo suele estar situado en la base del área más densa citoplasmática y sigue la punta a una distancia fija de aproximadamente 75 μm hasta que se detiene el crecimiento del pelo (Ketelaar et al., 2002). La frecuencia y amplitud del crecimiento de los PR depende de las condiciones extracelulares y de una interacción altamente organizada entre la transcripción de genes, el recambio y modificación de proteínas, el citoesqueleto, la pared celular, los gradientes de iones y especies reactivas de oxígeno (ROS) y las proteínas de importación y exportación localizadas en la membrana (Schoenaers et al., 2017).

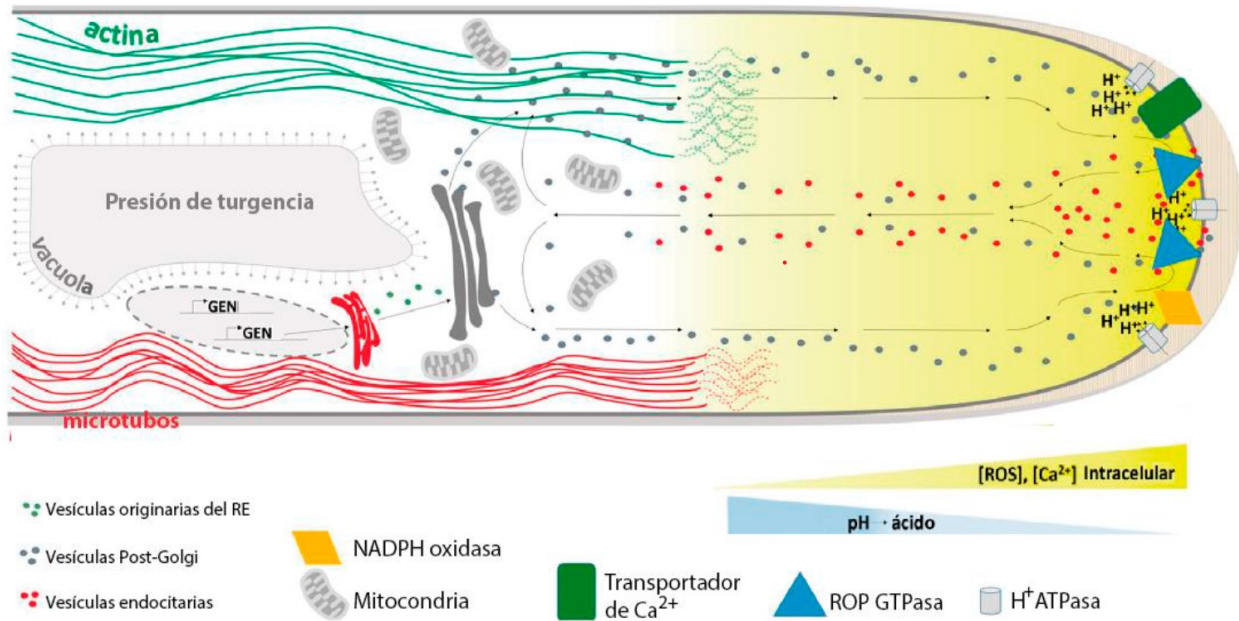


Figura 2I: Componentes moleculares y celulares que regulan el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

Se puede observar gráficamente los diferentes componentes moleculares (ROP GTPasa, H⁺ ATPasa, Transportadores de Ca²⁺, NADPHoxidasa) y celulares (Vesículas originarias del Retículo endoplásmico (RE), vesículas Post-Golgi, vesículas endocíticas, filamentos de actina, microtúbulos, mitocondrias) que regulan el crecimiento polarizado de los PR de *Arabidopsis thaliana*. Además, en este proceso intervienen numerosos genes y la transcripción y expresión de estos está finamente regulada. Figura modificada de Balcerowicz et al. (2015).

El proceso de elongación durante el crecimiento polarizado requiere que se establezca un gradiente de Ca²⁺ citoplasmático (citoCa²⁺) y de especies reactivas de oxígeno citoplasmáticas/apoplásticas (cito/apoROS). Se sabe que después de la iniciación de la formación del pelo, cuando este alcanza entre 5-10µm las concentraciones de Ca²⁺ en el ápice aumentan desde 200nM a 1µM o más y permanecen altas durante todo el proceso de expansión celular (Wymer et al., 1997). El gradiente de Ca²⁺ es importante para que ocurra la exocitosis de las vesículas que contribuyen a la formación de la nueva membrana y pared celular, esto es crucial para que se establezca la dirección del crecimiento. Además, la actividad de las proteínas de unión a actina (ABPs, *acting binding proteins*) es regulada por el gradiente de Ca²⁺ lo cual influye directamente en el citoesqueleto de actina que juega un papel fundamental en el crecimiento polarizado (Grierson et al., 2014). Un incremento en la concentración de Ca²⁺ puede impactar en la generación de ROS y en los niveles de pH. Las ROS son generadas fundamentalmente

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*). En plantas, las NADPH oxidasas contienen seis dominios TM, un dominio regulador N-terminal que incluye un sitio de pegado 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+} (Takeda et al., 2008). Las NADPH oxidasas son activadas por Ca^{2+} mediante la unión directa de Ca^{2+} a los sitios *EF-hands* y por la fosforilación inducida por quinasas dependientes de Ca^{2+} . A su vez, las ROS producidas por la NADPH oxidasa activan los canales de Ca^{2+} dependientes de hiperpolarización (HACC) y estimulan el influjo de Ca^{2+} hacia el citoplasma, estableciéndose así un circuito de retroalimentación positiva entre ROS y Ca^{2+} (Jones et al., 2007; Monshausen et al., 2007; Takeda et al., 2008; Zhang et al., 2022). Otras enzimas, como las ROP GTPasas han mostrado ser de gran importancia para la expansión celular polarizada de los PR, principalmente vinculadas a mantener el gradiente de Ca^{2+} y ROS (Molendijk et al., 2001; Grierson et al., 2014)

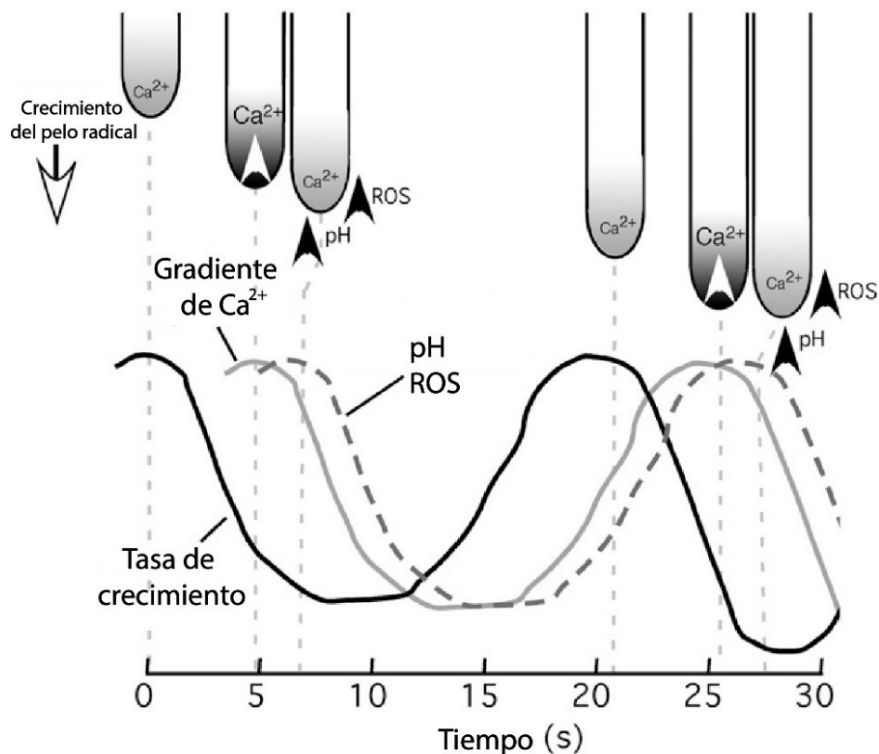


Figura 3I: Crecimiento oscilatorio de los pelos radicales.

Relación temporal y espacial entre el crecimiento, el gradiente de citCa^{2+} , cito/apopH y los niveles de ROS en el ápice de los PR. Los eventos de flexibilización de la pared con un consecuente crecimiento y momentos de rigidización de

la pared celular con el detenimiento del crecimiento se intercalan con las oscilaciones en las concentraciones de citoCa²⁺, citoROS y apopH. Las fluctuaciones en los niveles de apoROS y cambios en cito/apopH preceden a los picos de crecimiento por 7-8 segundos, mientras que las oscilaciones en citoCa²⁺ están adelantadas unos 5-6 segundos. Gráfico extraído y modificado de (Monshausen et al., 2008).

Los niveles de pH apoplástico (apoH) también son cruciales durante el crecimiento polarizado, bajo pH promueve la extensión de la pared celular y por tanto la elongación celular. Los cambios en el pH son regulados mayormente por las H⁺-ATPasas de membrana (AHAs) (Falhof et al., 2016; Zhang et al., 2022). AHA regula directamente el pH apoplástico, lo que afecta la maquinaria enzimática que modifica los componentes de la pared durante la expansión celular (Mangano et al., 2016).

El crecimiento polarizado de los PR se caracteriza por tener comportamiento oscilatorio, durante el que se alternan momentos de flexibilización de la pared, con consecuente crecimiento, y momentos de rigidización en los que se detiene el crecimiento. Esto se ve acompañado por oscilaciones en las concentraciones de Ca²⁺, ROS y niveles de pH. En los PR, estas fluctuaciones en las concentraciones de apoROS y los cambios en pH apoplástico/citoplasmático precede los picos de crecimiento por 7-8 segundos, mientras que las oscilaciones en citoCa²⁺ están adelantadas solamente 5-6 segundos (Figura 3I). Estos antecedentes indican que el crecimiento polarizado en los PR es precedido y quizás temporalmente reprimido por niveles elevados de citoCa²⁺ y consecuentemente, concentraciones elevadas de apoROS (Monshausen et al., 2007; Monshausen et al., 2008; Mangano et al., 2016).

2. Pared celular en plantas

Las paredes celulares son estructuras biológicas complejas y dinámicas que determinan tanto la morfología como las características mecánicas de la planta a lo largo de su desarrollo, brindándole soporte y protección. Éstas desempeñan un papel esencial durante el crecimiento y la expansión celular. El crecimiento, impulsado por la presión de turgencia impuesta por la entrada de agua en la célula, conlleva un aumento de la superficie celular, para lo cual es necesario que ocurran cambios en la pared, ya sea por el alargamiento de componentes existentes o por la deposición de componentes adicionales (Anderson and Kieber, 2020). En su mayoría, la pared se compone por celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina y polímeros de glicoproteínas.

La celulosa es el componente más abundante en la pared celular vegetal. En la mayoría de las células vegetales el crecimiento anisotrópico característico de la expansión celular está asociado al alineamiento de microfibrillas de celulosa (Wolf, 2022). Ésta es sintetizada por complejos hexaméricos de celulosa sintasa (CSC) que se extienden por la membrana plasmática y está compuesta por cadenas de glucanos unidos por enlace β -1,4, que a su vez se unen entre ellas por enlace de hidrógeno para formar microfibrillas de celulosa (Figura 4I). Los CSCs se desplazan por la membrana plasmática y añaden subunidades de glucosa a las microfibrillas inmovilizadas, la orientación de las nuevas microfibrillas de celulosa, importante para la orientación del crecimiento, va a estar determinada por los microtúbulos corticales (Baskin, 2005; Hoffmann et al., 2021; Wolf, 2022). El grado de polimerización de las cadenas de glucano en la celulosa puede variar desde unos pocos cientos de monómeros de glucosa hasta más de 10.000 (Anderson and Kieber, 2020).

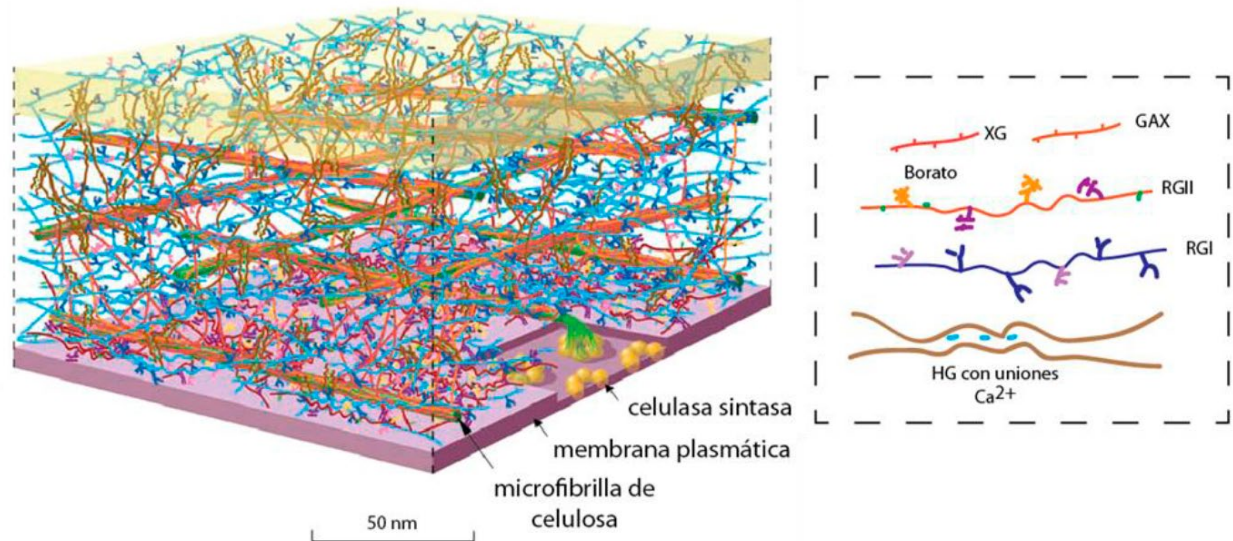


Figura 4I. Modelo de polisacáridos en la pared celular de una hoja de *Arabidopsis*

Xiloglucanos (XG), glucoarabinoxilano (GAX); homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano (RG-I y II). Pectinas: HG, RGI y RGII (Somerville et al., 2004)

Las microfibrillas de celulosa se encuentran en una matriz acuosa de pectina y hemicelulosas, las cuales son sintetizadas en el aparato de Golgi por glicosiltransferasas y transportadas a la pared celular por vesículas secretoras (van de Meene et al., 2017; Hoffmann et al., 2021). Las hemicelulosas son un diverso grupo de polisacáridos que contienen cadenas principales de azúcares neutros, unidos principalmente por enlaces glucosídicos β -1,4. La clase más abundante de hemicelulosas son los xiloglucanos, formados por cadenas principales que contienen xilosa y con cadenas laterales de galactosa y fucosa. Los xiloglucanos se pueden asociar con las microfibrillas de celulosa (Anderson and Kieber, 2020). Las pectinas son polisacáridos ácidos que están formados por cadenas ricas en ácido galacturónico y que pueden contener cadenas laterales con variados azúcares. El tipo de pectina más abundante son los homogalacturonanos (HG), además también están los ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II que se diferencian por el esqueleto azúcares que los conforman y las uniones entre ellos (Atmodjo et al., 2013; Anderson, 2019). En conjunto las hemicelulosas y las pectinas forman la llamada matriz polisacáridica. La lignina, es un compuesto polifenólico

hidrofóbico formado por subunidades de monolignol unidas covalentemente, ésta se puede unir a las cadenas laterales de xilanos.

Otro de los componentes claves en la arquitectura de la pared celular son las proteínas estructurales, las cuales se pueden glicosilar y entrecruzar entre ellas y con los polisacáridos. Éstas incluyen proteínas ricas en prolina, arabinogalactanos (AGPs) y extensinas, que son proteínas ricas en hidroxiprolinas (Cannon et al., 2008; Borassi et al., 2016; Showalter and Basu, 2016). Enzimas, iones, metabolitos pequeños y agua también están presentes en la pared.

2.1 Extensinas

Las proteínas más abundantes en la pared celular de las plantas son las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), dentro de las que se encuentran las extensinas (EXTs). Las EXT se dividen en 5 subfamilias, EXTs clásicas, EXTs cortas, EXTs ricas en módulos repetitivos de leucina (LRXs), receptores quinasa con un dominio extracelular tipo EXT (PERKs) y EXT con homología a formina (FH-EXTs) (Moussu and Ingram, 2023). En este trabajo nos enfocaremos en las EXTs clásicas.

La estructura proteica de las EXTs clásicas se caracteriza por presentar módulos repetitivos de serina-prolina (SP_n) en los que n es usualmente entre 3 y 5, alternados por cortos motivos hidrofóbicos de entrecruzamiento o *crosslinking* (-Tyr-X-Tyr-) y una secuencia señal en el extremo N-terminal que las dirige a la ruta secretora (Cannon et al., 2008; Mishler-Elmore et al., 2021). Se ha demostrado *in vitro* que ocurre entrecruzamiento covalente de las EXTs entre estos residuos de tirosina con la formación de enlaces pulcherosina (Pul) o di-isoditrosina (Di-IDT) (Figura 5I A), este proceso es mediado por peroxidasas (Held et al., 2004; Moussu and Ingram, 2023).

Para que las extensinas lleguen a ser proteínas maduras y funcionales deben ocurrir una serie de modificaciones postraduccionales. En primera instancia las prolinas van a ser hidroxiladas en el retículo endoplasmático (RE) por la acción de enzimas 4-prolil hidroxilasas (P4Hs; prolyl- 4-hydroxylase) para dar lugar a la formación de hidroxiprolinas (Hyp; *Hydroxyproline*)(Lamport, 1967). En *Arabidopsis* se ha demostrado que tres P4Hs: P4H2, P4H5 y P4H13 forman un complejo proteico que se encuentra en

ER y Golgi, lo cual sugiere que la hidroxilación de las prolinas puede ser iniciada en ER y completada en Golgi (Marzol et al., 2018). En los PR P4H5 ha demostrado tener un papel fundamental en el proceso de elongación celular, ya que mutantes nulas de esta enzima dan pelos muy cortos (Velasquez et al., 2011; Velasquez et al., 2015). Después de ser hidroxiladas, las Hyp van a ser O-glicosiladas por adición de hasta 5 unidades de arabinosa; los residuos de serina también pueden ser monogalactosilados por la actividad de serina-galactosiltransferasa 1 (SGT1) (Lamport et al., 2011; Saito et al., 2014). Se plantea que el patrón de O-glicosilación de las Hyp sigue la “Hipótesis de contigüidad de las hidroxiprolinas” (*Hyp-contiguity hypothesis*), la cual propone que las hidroxiprolinas contiguas se arabinosilan con 2-5 residuos de arabinosa por hidroxiprolina, mientras que los grupos de hidroxiprolinas no contiguas se arabinogalactosilan (Kieliszewski, 2001; Shpak et al., 2001). Las modificaciones postraduccionales estabilizan la proteína en una conformación extendida en lugar de globular (Stafstrom and Staehelin, 1986) (Figura 5I B). La conformación rígida y linear que adopta la proteína madura se debe a que los residuos de Hyp crean hélices de prolina II y la glicosilación crea una cubierta estabilizadora de β -L-Arabinofuranosa (β -L-Araf) alrededor de la cadena de polipéptido protegiéndola de la degradación (van Holst and Varner, 1984; Stafstrom and Staehelin, 1986).

Una vez hidroxiladas en el ER y Golgi y O-glicosiladas en Golgi, las EXTs se secretan al apoplasto como precursores monoméricos solubles (Mishler-Elmore et al., 2021). No se conoce mucho sobre la maquinaria de secreción y las vesículas involucradas, sin embargo, nuevos estudios han sugerido que este proceso puede estar mediado por el complejo exocisto (Beuder et al., 2020). El complejo exocisto es un complejo octamérico altamente conservado que se encuentra en todas las células eucariotas y que es fundamental en la secreción post-golgi a la membrana plasmática (TerBush et al., 1996). En las plantas *AtExo70A1* es uno de sus componentes más abundantes y que parece desempeñar un papel más relevante (Synek et al., 2006). Recientemente se vio que la pérdida de función de *AtExo70A2* en la doble mutante *hpat1/3* (HPAT, *hydroxyproline- O- β -arabinosyltransferase*) restauró el crecimiento del tubo polínico (Beuder et al., 2020), previamente se demostró que la mutación de *Hpat1* y *Hpat2* suprime la O-arabinosilación de las Hyp de las EXTs y esto causa severas

afectaciones en el crecimiento del tubo polínico y en la fertilización (MacAlister et al., 2016). La explicación más probable para esta restauración es que la secreción reducida en la triple mutante *exo70A2/hpat1/hpat3* evita que HRGPs mal glicosiladas lleguen a la pared celular, lo cual sugiere que la secreción de las EXTs al apoplasto es mediada por el complejo exocisto y que la secreción de HRGPs mal glicosiladas interfiere con la correcta función de las EXTs teniendo esto un impacto seriamente negativo en la arquitectura de la pared (Mishler-Elmore et al., 2021). Además de intervenir en el crecimiento del tubo polínico (Cole et al., 2005), también se ha visto que el complejo exocisto es importante para el crecimiento de los PR (Wen et al., 2005; Synek et al., 2006), por lo que se puede decir que juega un papel crucial en el crecimiento celular polarizado. Existen unas cisteínas endopeptidasas (CEPs) que podrían estar interviniendo en la regulación postraduccional de las EXTs (Hierl et al., 2014), esto será tratado con más detalle más adelante.

Después de ser secretadas a la pared celular, las EXTs se entrecruzan covalentemente y forman una red interconectada, manteniendo así la integridad de la pared (Cooper and Varner, 1984; Cooper et al., 1987; Tierney and Varner, 1987). El entrecruzamiento de las EXTs ocurre a través de los motivos de tirosina (-Tyr-X-Tyr), las uniones que se forman entre estos motivos son: isoditirosina (IDT), enlace intramolecular muy corto dentro del motivo hidrofóbico altamente conservado Tyr-X-Tyr (Epstein and Lamport, 1984), di-Isoditirosina (di-IDT), derivado tetramérico de Tyr formado por la unión de dos residuos IDT de moléculas cercanas y pulcherosina (Pul), derivado trimérico formado por la unión de un residuo IDT y una Tyr (Fry, 1982; Brady et al., 1996; Brady et al., 1998) (Figura 5I A,B). Existen evidencias *in vitro* de que el *crosslinking* entre EXTs depende de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) apoplásticas, combinada con la actividad de las peroxidasas tipo III (PER_{III}) localizadas en la pared (Schnabelrauch et al., 1996; Jackson et al., 2001; Price et al., 2003).

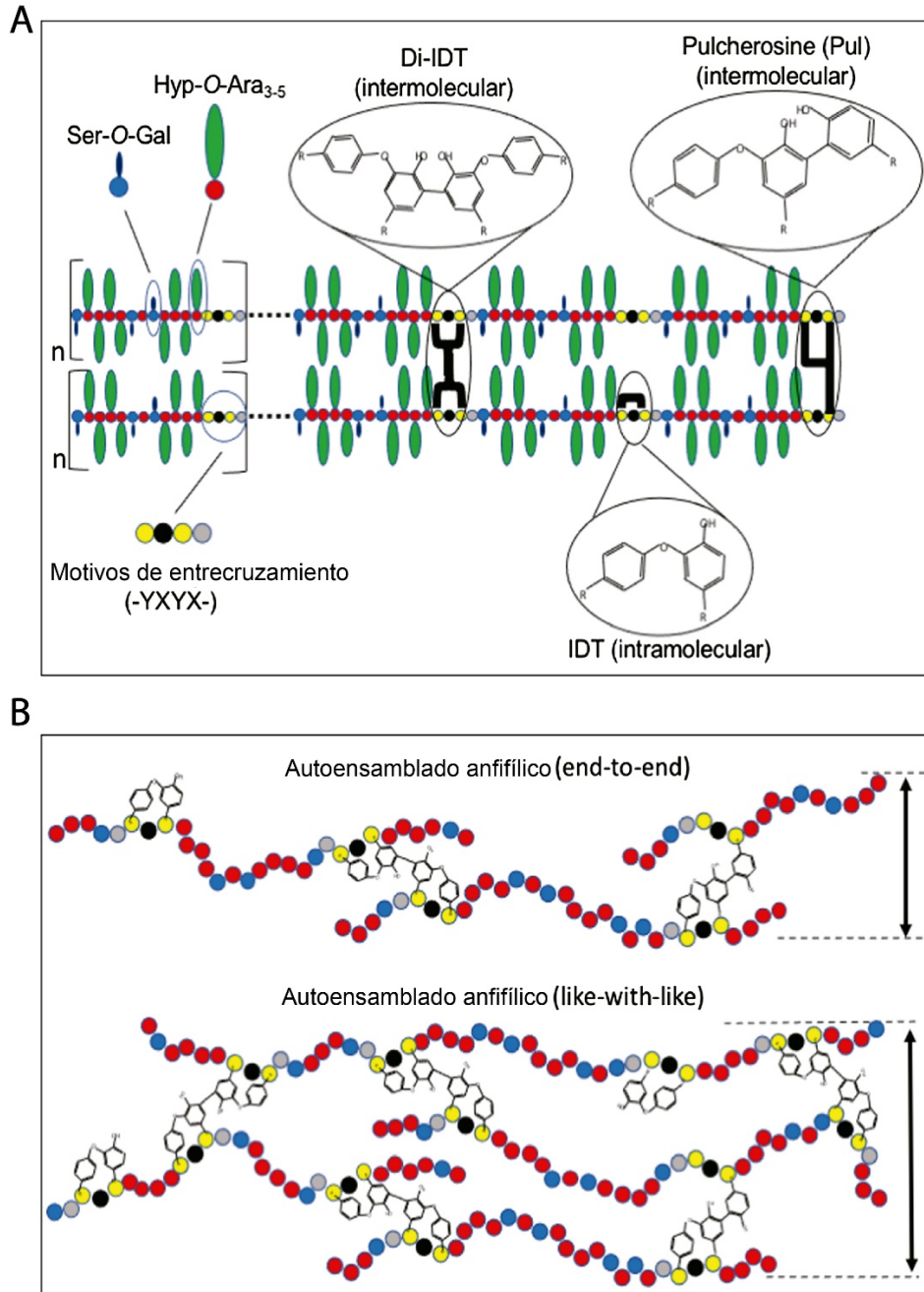


Figura 5I. Modelo de ensamblaje y entrecruzamiento de redes de extensina (EXT).

(A) Autoalineamiento de precursores de EXT mediante interacciones anfílicas entre Hyp-glicomódulos hidrofílicos (Hyp-O-Ara_{3,5} and Ser-O-Gal) y motivos de entrecruzamiento hidrofóbico (-Tyr-X-Tyr-X). **(B)** Representación esquemática de las disposiciones “end-to-end” y “like-to-like” durante el autoensamblamiento anfílico de las EXTs. Los aminoácidos se indican como círculos coloreados: Tyr (amarillo), Hyp (rojo), Ser galactosilada (azul) y aminoácidos variables (X, negro y gris). Adaptado de (Mishler-Elmore et al., 2021).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para 63 posibles extensinas, entre éstas, 20 se definen como EXTs clásicas, las cuales comparten motivos de O-glicosilación y *cosslinking* de Tyr; 12 son EXTs cortas y 31 son quimeras tipo EXT e híbridos de EXTs, que podrían contener otros dominios proteicos (Cannon et al., 2008; Showalter et al., 2010; Velasquez et al., 2012). Que existan tantos genes que codifican EXTs sugiere que desempeñan múltiples funciones o que muchas pueden tener funciones similares, lo que destaca la complejidad detrás de los roles de EXT en el desarrollo de las plantas. Posiblemente debido a la gran redundancia funcional que existe entre las EXTs, han sido proteínas de difícil estudio. Hasta la fecha muy pocos mutantes de genes que codifican EXTs han presentado fenotipos drásticos, solo un mutante de EXTs (*root shoot hypocotyl-defective* [rsh o ext3]) ha mostrado un fenotipo casi letal (Cannon et al., 2008). Las enzimas implicadas en la modificación postraducciona de las EXTs (particularmente la glicosilación) generalmente están codificadas por familias de genes más pequeñas que las propias EXT, es por esto que alterar los niveles de expresión de estas enzimas ha sido utilizado para ayudar a inferir la función de las EXTs (Lamport et al., 2011; Marzol et al., 2018; Moussu and Ingram, 2023).

Los PR han mostrado ser una excepción al efecto de la redundancia génica de las EXTs ya que varios estudios han demostrado que las EXTs son importantes para el desarrollo de los PR. Algunas EXTs (*ext6–7, 12–14, 18*) se identificaron por primera vez a través del análisis de redes de co-expresión con genes de pared celular importantes para el desarrollo de los pelos, los cuales incluyen al factor de transcripción RSL4 (*Root Hair Defective 6 Like-4*) (Datta et al., 2015; Mangano et al., 2017), LRX1 (*leucine-rich extensin*) (Baumberger et al., 2001; Baumberger et al., 2003), y PRP3 (*proline-rich proteins*) (Bernhardt and Tierney, 2000). El papel de estas EXTs fue confirmado más adelante cuando líneas mutantes insercionales de las mismas (*ext6, ext7, ext10, etc.*) mostraron fenotipo de pelo significativamente más corto (Velasquez et al., 2011). Además, mutantes simples *lrx1* y *lrx2* mostraron morfología aberrante de PR (Baumberger et al., 2001; Baumberger et al., 2003; Ringli, 2010). Existen varias evidencias que sugieren que las EXTs también juegan un importante papel durante la embriogénesis (Cannon et al., 2008), el crecimiento del tubo polínico (Mecchia et al.,

2017), la respuesta a daño mecánico (Guzzardi et al., 2004) y la respuesta ante estrés y patógenos (Hammerschmidt et al., 1984; Showalter et al., 1985).

3. Cisteínas endopeptidasas (CEPs)

En las plantas existe un grupo de cisteínas endopeptidasas (CysEP o CEPs) de tipo papaína que se cree podrían estar involucradas en el procesado de las EXTs (Helm et al., 2008). No se han identificado genes homólogos en mamíferos o levaduras para estas proteínas (Schmid et al., 1999). Las CEPs fueron identificadas por primera vez en la planta *Ricinus communis* (Ricino), ubicadas en unas vesículas especializadas denominadas ricinosomas (Schmid et al., 1999; Hierl et al., 2014; Höwing et al., 2014). La función de estas proteasas específicas de plantas ha sido asociada principalmente a la muerte celular programada (PCD) (Hierl et al., 2012).

La estructura proteica de las CEPs se caracteriza por tener la señal de retención en el RE KDEL en su extremo C-terminal. Estas enzimas son sintetizadas inicialmente como pre-pro-enzimas y transportadas co-traduccionalmente al RE. En el RE, la pre-secuencia es eliminada y la enzima resultante se almacena en compartimentos en su forma inactiva, es decir, como pro-enzima. Durante las etapas finales de la PCD, el propéptido N-terminal y el KDEL C-terminal se escinden y la CysEP, es liberada de los ricinosomas. Este proceso desencadena la maduración de la enzima, transformándola en su forma activa con la capacidad de clivar proteínas (Schmid et al., 1999; Beers et al., 2000; Schmid et al., 2001).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres AtCEP, AtCEP1 (At5g50260) AtCEP2 (At3g48340) y AtCEP3 (At3g48350), las cuales tienen amplios patrones de expresión en tejidos vegetativos y reproductivos a lo largo de la planta, incluidos los tejidos de la raíz (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014; Zhou et al., 2016). Se han identificado varias AtCEP en células o tejidos asociados con la PCD, donde juegan un papel crucial en la degradación de proteínas intracelulares (Tanaka et al., 1991; Becker et al., 1997; He and Kermode, 2003; Zhang et al., 2014; Olvera-Carrillo et al., 2015; Chen et al., 2016). Se descubrió que AtCEP1 es un mediador central de la PCD en el tapete, lo que permite la degeneración de las células del tapete y la formación de polen funcional

(Zhang et al., 2014). Recientemente, se reportó que AtCEP1 y AtCEP2 se expresan en las células epidérmicas de la raíz que intervienen en la aparición de LR, y que la pérdida de función de AtCEP1 o AtCEP2 provoca la aparición tardía de los primordios de LR, lo que sugiere que estas KDEL-CysEP podrían estar involucradas en la remodelación de la pared celular durante el desarrollo (Höwing et al., 2018).

Las enzimas tipo papaína generalmente presentan preferencia por los aminoácidos neutros con grandes cadenas laterales alifáticas y no polares (Leu, Val, Met) o aromáticas (Phe, Tyr, Trp) en la posición P2, además de esta afinidad, las CEPs de *Ricinus* (RcCysEP) exhibe una inusual amplia especificidad de sustrato. Esta amplia especificidad de sustrato se debe a que el sitio activo de KDEL-CysEP acepta una amplia variedad de aminoácidos, incluida la prolina y la hidroxiprolina glicosilada de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) de la pared celular (Than et al., 2004). Los residuos de aminoácidos que son esenciales la estructura, generalmente más abierta, del sitio activo, así como los que definen el sitio catalítico, están altamente conservados entre las KDEL-CysEP conocidas (Hierl et al., 2014). Las CEPs pueden reconocer repeticiones Ser-(Hyp)₃₋₅, Hyp O-glicosiladas y prolinas 1 o 2 aminoácidos cerca del sitio de corte de la enzima (Than et al., 2004; Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014). Estas repeticiones Ser-(Hyp)₃₋₅ O-glicosiladas se observan con frecuencia en las O-glicoproteínas estructurales Extensinas (EXT) y posiblemente en un gran número de proteínas apoplásticas no caracterizadas relacionadas con EXT (p. ej., PERK, Forminas y AGP-EXT) (Borassi et al., 2016). Como se había mencionado anteriormente, el entrecruzamiento de EXT mediado por *Tyr* da lugar a la formación de una red de glicoproteínas en la pared celular, lo cual influye significativamente en procesos de expansión celular polarizada (Cannon et al., 2008; Velasquez et al., 2011; Velasquez et al., 2015).

El hecho de que las CEPs puedan escindir EXT O-glicosiladas (Hierl et al., 2014), da crédito a la idea de que podrían desempeñar un papel fundamental en la elongación celular. En estudios previos se demostró que al menos seis EXT (EXT6–7, 12–14, 18) co-reguladas a nivel transcripcional juegan un papel crucial en el proceso de expansión celular polarizada de los PR en *Arabidopsis* (Velasquez et al., 2011; Velasquez et al.,

2015; Marzol et al., 2018) y en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Bucher et al., 2002; Bucher et al., 2002). Las extensinas ricas en leucina 1 y 2 (LRX1 y LRX2), también mostraron ser fundamentales para este tipo de crecimiento (Baumberger et al., 2001; Baumberger et al., 2003; Ringli, 2010). Recientemente, las EXTs de polen (PEXs) y las LRX también se vincularon con la regulación del crecimiento celular polarizado de los tubos polínicos (Ndinyanka Fabrice et al., 2017; Sede et al., 2018; Wang et al., 2018), lo cual evidencia que existe un papel conservado de las EXT y proteínas relacionadas a EXT en el crecimiento celular polarizado. Sobre la base de estos hallazgos, creemos posible que las AtCEPs de *Arabidopsis* puedan desempeñar un papel en la regulación del crecimiento polar relacionado con el procesamiento de EXT O-glicosiladas y proteínas relacionadas con EXT, y posiblemente de otros sustratos durante su maduración a lo largo de la vía secretora.

3.1 Familia de factores de transcripción NAC

Las proteínas de dominio NAC (NAM de petunia y ATAF1, ATAF2 y CUC2 de *Arabidopsis*) constituyen una gran familia de factores de transcripción específicos de plantas que intervienen en muchos aspectos del desarrollo vegetal (Kikuchi et al., 2000; Hegedus et al., 2003; Ooka et al., 2003). El dominio NAC está altamente conservado en la región N-terminal y media la unión del FT al DNA (Ernst et al., 2004; Olsen et al., 2005a). El dominio NAC se caracterizó originalmente en el Meristemo no Apical (NAM) de petunia y en el factor de activación de la transcripción 1 (ATAF1), ATAF2 y *CUP-SHAPED COTYLEDONS* (CUC2) de *Arabidopsis* (Aida et al., 1997). Se ha reportado que las proteínas de la familia NAC regulan la división celular en células madre del tallo de brotes (Abrash and Bergmann, 2009). El gen NAC1, perteneciente a esta familia, promueve el desarrollo de raíces laterales mediante la transducción de señales de auxina corriente abajo de la proteína F-box TIR1 (Xie et al., 2000). El papel de NAC1 en el crecimiento de las raíces de las plantas aún no se ha estudiado a profundidad. Recientemente, se demostró que NAC1 regula el crecimiento de la raíz primaria mediante la represión de la transcripción de E2Fa (Factor a de unión al promotor E2) (Xie and Ding, 2022). En otro estudio más reciente se reportó que NAC1 funciona en coordinación con los reguladores maestros de la transcripción SCR y SHR para controlar las divisiones asimétricas

celulares periclinales de la endodermis durante la formación de la corteza media radicular (Xie et al., 2023). Un estudio publicado en 2016 muestra nuevas funciones en las que NAC1 se induce en respuesta a heridas y promueve la aparición de raíces adventicias en una vía independiente de auxinas. En este estudio también se vio que la expresión de AtCEP1 y AtCEP2 estuvo relacionada a la sobreexpresión del FT NAC1 durante la organogénesis *de novo* de raíces adventicias en *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2016). Teniendo en cuenta esto, creemos que el FT NAC1 es un buen candidato para regular la expresión de AtCEPs durante la expansión celular polarizada de los PR.

Hipótesis

Dada la capacidad que presentan las CEPs de procesar EXTs, se hipotetiza que estas enzimas podrían regular el desensamblado de la red de EXTs en el apoplasto, lo que permitiría la relajación de la pared celular durante la expansión polarizada del pelo radical en *Arabidopsis thaliana*. También, debido a que las CEPs presentan una señal de localización en RE (KDEL) se puede suponer que las CEPs podrían ejercer un control de calidad en aquellas EXTs mal procesadas (subglicosiladas o sobreglicosiladas) en el sistema secretorio en el RE-Golgi

Objetivo general

Identificar componentes moleculares que intervienen en el crecimiento polar de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

- Definir la función de las AtCEPs durante el crecimiento polarizado del pelo radical y si están relacionadas con el procesamiento de EXTs.
- Caracterizar a las AtCEPs específicas involucradas en estos procesos en pelos radicales.
- Determinar la regulación transcripcional de las AtCEPs.

Materiales y Métodos:

1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para todos los experimentos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) salvaje (Wt, *Wild type*). Los mutantes y líneas transgénicas utilizadas fueron diseñadas sobre este ecotipo. Las semillas fueron embebidas en una solución de lavandina 30% v-v por 10 minutos para ser esterilizadas. Luego se lavaron 4 veces con agua grado *Mili-Q* estéril. Una vez estériles y lavadas fueron colocadas a estratificar en tubos de microcentrífuga con agua *Mili-Q* durante 24-72h a 4°C en oscuridad. Pasado este tiempo, se colocaron en placas transparentes cuadradas de 120x120 mm con medio agar 0.8% (Duchefa) m-v, con sales Murashige & Skoog al 50% de lo indicado (MS 0.5X) pH 5.7. Las placas se sellaron con cinta microporosa (permite el intercambio gaseoso), y se colocaron verticalmente en una cámara de crecimiento (*Biocontrol*) a 22°C bajo condiciones de luz continua (intensidad de la luz: 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$), por un lapso de entre 7-15 días según el experimento a realizarse. Después las plántulas fueron transferidas a suelo (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 bajo un ciclo de 16 hs luz/8 hs oscuridad a 22°C (Goodrich, 2002).

2. Mutantes Insercionales de T-ADN

Las líneas de mutantes insercionales de Transposón-ADN (T-ADN) se adquirieron de *Arabidopsis Resource Center* (Alonso et al., 2003) (ABRC; <https://www.abrc.osu.edu/>) o fueron proporcionadas por otros grupos de investigación (Tabla 1). Estas líneas contienen un fragmento de ADN transposón insertado en un gen particular. El gen comprometido por la presencia del transposón suele presentar un menor nivel de expresión o expresión nula.

Para la identificación de líneas homocigotas de T-ADN, se extrajo ADN y se realizó una reacción de PCR para comprobar que la inserción estuviese en estado de homocigosis. Se realizó una reacción de amplificación para detectar la presencia de la inserción y otra para identificar la banda correspondiente al alelo Wt. Para amplificar la banda de la inserción, se utilizó una pareja de *primers* donde el *forward* se une en la

secuencia del transposón y el primer *reverse* a la secuencia del gen. Para la banda WT, se utilizó una pareja de *primers* donde ambos se unen a la secuencia del gen. Los *primers* utilizados fueron diseñados con el software *T-DNA Primer Design* (<http://signal.salk.edu/tADNprimers.2.html>) (Tabla 3).

3. Análisis de fenotipo del pelo radical

Las semillas se colocaron en medio MS 0,5X (*Sigma*) 0.8% de agar planta (*Duchefa*) pH 5.7 en placas cuadradas colocadas verticalmente, y puestas en luz continua durante 7 días. Se tomaron fotos de las plántulas sin quitarlas de la placa, con una lupa estereoscópica OLYMPUS SZX7 usando un aumento de 2.5X. Una vez obtenidas las imágenes se midieron los 7 PR más largos de cada raíz, para esto se usó el programa *ImageJ* (Abramoff, Magalhaes et al. 2004). Se realizó un promedio de la longitud de estos 7 pelos y cada promedio constituyó un n. Por experimento se midieron PR correspondientes a 15-20 raíces (n=15-20) que corresponden a la medición de 100-200 PR. Se graficó la media \pm desviación estándar (media \pm DE). Los resultados se graficaron y procesaron con el software de análisis estadístico *GRAPHPAD PRISM 8.0.1* (*GraphPad Software, Boston, MA, USA*) (<https://www.graphpad.com/>).

4. Análisis de expresión mediante PCR cuantitativa en Tiempo Real (qPCR)

Se realizó la extracción de ARN total de raíces de plantas crecidas durante 10 días en placas verticales a 22°C utilizando el TRITM Reagent Solution (Sigma-Aldrich). El ARN total se cuantificó por espectrofotometría y se verificó su integridad mediante electroforesis, después se trató con DNasa I RQ1 RNase-free (Promega). Una vez obtenido el ARN se procedió a realizar la retrotranscripción del mismo para obtener el ADNc. Con este fin se usó 1µg de ARN, el primer oligo(dT)15 y la transcriptasa reversa MMLV-RT (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del ADNc se realizó la amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) de los transcritos de interés usando los primers correspondientes. Los primers utilizados se encuentran detallados en la Tabla 3. El ADNc fue diluido 20 veces antes de realizar la qPCR. Para la qPCR se utilizó el QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, 5 µL Power SYBR Green PCR Mix (*Applied Biosystems*), 2 µL de ADNc y 0.3 µM de cada primer en un volumen final de 10

μ L por reacción. Para la normalización de los niveles de expresión génica se utilizó el gen *ACT2* (AT3G18780) o *PP2A* (At1G69960) como referencia. El ciclo utilizado fue: 95°C por 10 min., 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min y finalmente una curva de melting desde 60°C a 95°C (0.05°/seg.). Los datos fueron analizados usando el método de análisis de Pfaffl (Pfaffl, 2001) y el programa Qiagen REST© 2009 (Pfaffl et al., 2002). Se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para cada experimento.

5. Obtención de las líneas reporteras transcripcionales de CEP3 y NAC1

Para obtener las líneas *pCEP3-GFP* y *pNAC1-GFP*, se seleccionó una región genómica de 2 kb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción para cada uno de los genes *CEP3* (At3g48350) y *NAC1* (At1g56010), para esto se usó ThaleMine (<https://bar.utoronto.ca/thalemine/begin.do>). Ambas regiones se sintetizaron y clonaron en el vector pUC57 por GenScript Biotech (USA). Mediante la tecnología de clonado de Gateway (Invitrogen), cada una de las regiones de 2 kb fueron primeramente recombinadas en el vector pDONR™207 y subclonadas en el vector de destino pMDC111 (Invitrogen) (Karimi et al., 2002) para la región promotora de *CEP3* o en el vector pGWB4 (Invitrogen) (Nakagawa et al., 2007) para la región promotora de *NAC1*. Ambos constructos se chequearon mediante análisis por restricción enzimática. Ambos vectores contienen un casete con un tag de proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo C- terminal. Todos los constructos fueron utilizados para transformar plantas de *A. thaliana* y generar líneas estables homocigotas fluorescentes. Los distintos vectores obtenidos fueron clonados en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y después mediante la técnica *Floral dip* (Goodrich, 2002) se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0 para generar las líneas transgénicas.

6. Adquisición de imágenes de las líneas reporteras de AtCEPs y NAC1 mediante el uso de Microscopía Láser Confocal

La microscopía láser confocal se realizó utilizando un microscopio ZEISS LSM 880 con un objetivo Plan-Apochromat 20x/0.8 NA y un detector GaAsP para ver las líneas AtCEP1pro:PRE-PRO-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL (excitación: 488nm, intensidad: 45%,

ganancia: 700, emisión: 494 a 573 nm), AtCEP2pro:PRE-PRO-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL (excitación: 543 nm, intensidad: 15%, ganancia: 850, emisión: 583 a 702 nm) y AtCEP3pro::GFP (excitación: 488 nm, intensidad: 30%, ganancia: 600, emisión: 494 a 573 nm). Para la línea NAC1pro::GFP las imágenes se adquirieron en un microscopio Zeiss LSM710 con objetivos Plan-Apochromat 20x/1.0 NA y Plan-Neofluar con aceite 40x/1.30 NA y un detector MultiAlkali (excitación: 488 nm, intensidad: 60%, ganancia: 850, emisión: 493 a 567). En el caso de las líneas Wt/SS-TOMATO-EXT LONG, *cep1-3cep3-2*/SS-TOMATO-EXT LONG y *nac1-2*/SS-TOMATO-EXT LONG, la adquisición de imágenes se realizó utilizando el microscopio Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Alemania) (Excitación: 543 nm láser de argón, intensidad: 40%, ganancia: 804, filtro de emisión: LP560, objetivo Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.4 con aceite), las raíces se plasmolizaron con una solución de manitol al 8% (p/v) cuando fue de interés observar la señal proveniente de la pared celular. Pelos radicales de Col-0 se utilizaron como control negativo para chequear la ocurrencia de señal autofluorescente y no se registró señal en los rangos de emisión descritos anteriormente para los PR. La señal total de la proteína tdTOMATO y la proveniente de la pared celular se cuantificaron en el ápice de los PR utilizando el software ImageJ. Los valores de unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia se expresaron como el promedio \pm SD utilizando el software de análisis estadístico GraphPad Prism 8.0.1 (EE. UU.). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes, cada uno con 5 a 10 raíces, y se observaron aproximadamente entre 5 y 10 pelos por raíz.

7. Análisis de localización subcelular de AtCEP2

Se cruzaron plantas que expresaran la construcción CEP2pro:pre-pro-3xHA-mCherry-CEP2 con líneas que expresaran marcadores del RE y aparato de Golgi unidas a la proteína fluorescente GFP o YFP, obteniéndose plantas doble transgénicas CEP2-mCherry + marcador de orgánulo. Se realizó un análisis de co-localización utilizando la herramienta JACoP (Bolte and Cordelières, 2006), implementación BIOP (Battistella et al., 2019) en ImageJ (1.53t). El análisis se realizó en PR individuales, para lo cual se dibujaron regiones de interés manualmente. Se restó la intensidad de fondo de cada canal como la intensidad media del control de autofluorescencia + 2SD. Se eligió el

método de umbralización Otsu en función de la inspección visual de las imágenes para ambos canales.

Para comparar la localización relativa de CEP2:pre-pro-3xHA-mCherry-CEP2 (Ch2) con cada uno de los diferentes compartimentos subcelulares (Ch1), utilizamos el coeficiente de superposición M2 de Manders (Manders et al., 1993). Se cuantificó la proporción de píxeles positivos en Ch2 que coincidían con píxeles positivos en Ch1 (co-ocurrencia). Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron en un microscopio Zeiss LSM710 con un objetivo de aceite EC Plan-Neofluar 40x/1.30. Las imágenes se adquirieron secuencialmente en diferentes *tracks* para evitar la superposición de excitación y emisión. Se utilizaron los siguientes rangos de emisión para los canales individuales: Ch1 de 519 a 589 nm, Ch2 de 594 a 690 nm. El tamaño de píxel se estableció en 100 nm siguiendo el criterio de muestreo de Nyquist y el *pinhole* se ajustó para obtener un corte óptico de 3.6 μm de espesor. Para cada réplica experimental, se capturaron imágenes de 15 a 25 PR individuales en total de 5 plantas diferentes por marcador de compartimento subcelular.

8. Obtención de las construcciones *SS-TOMATO* y *SS-TOMATO EXT-LONG*

Las líneas (*SS-TOMATO* y *SS-TOMATO EXT-LONG*) fueron generadas y cedidas por la Dra. Margaret Brigham Fleming (Departamento de Biología – Universidad del estado de Colorado). El vector binario pART27, que codifica para la proteína fluorescente tdTomato secretada, con la secuencia señal secretora de la poligalacturonasa de tomate y expresada bajo el promotor constitutivo CaMV 35S (pART-SS-TOM), fue un regalo de la Dra. Jocelyn Rose, de la Universidad de Cornell. La construcción de la proteína reportera completa se cortó del vector pARTSS- TOM mediante digestión con *NotI*. Los fragmentos resultantes se purificaron desde un gel con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Alemania) y se ligaron usando T4 DNA Ligase (New England Biolabs, USA) en el pBlueScript KS+ desfosforilado, también digerido con *NotI* y purificado en gel, para generar el constructo pBS-SS-TOM. El plásmido se confirmó mediante secuenciación con los primers 35S-FP(5-CCTTCGCAAGACCCTTCCTC-3) y OCS RP(5CGTGCACAACAGAATTGAAAGC-3). La secuencia del dominio extensina de

S/PEX1 (accesión NCBI AF159296) fue sintetizada y clonada por GenScript en el plásmido pUC57 (pUC57-EXT). El plásmido pBS-SS-TOM-Long-EXT se obtuvo digiriendo pUC57-EXT y pBS-SS-TOM con *NdeI* y *SgrAI*, seguido de purificación en gel de la banda de 2243 pb de pUC57-EXT y la banda de 5545 pb de pBS-SS-TOM y ligación de los dos fragmentos purificados en el gel. El plásmido pBS-SS-TOM-Long-EXT se confirmó mediante secuenciación con 35S-FP, OCS-RP y tdt-seq-FP (5-CCCGTTCAATTGCCTGGT-3). Ambos plásmidos pBS también se confirmaron mediante digestión. El vector binario pART-SS-TOM-Long-EXT se preparó purificando en gel el fragmento del inserto *NotI* del plásmido pBS-SS-TOM-Long-EXT y ligándolo con el *backbone* de pART-SS-TOM que había sido digerido con *NotI*, purificado en gel y desfosforilado. Este plásmido se confirmó mediante secuenciación. Las construcciones SS-TOM y SS-TOM-Long-EXT se transformaron en plantas de *Arabidopsis* Wt Col-0. La secuencia secretora (SS) de la poligalacturonasa del tomate es MVIQRNSILLIIIFASSISTCRSGT (2.8kDa). La secuencia del dominio EXT-Long es la siguiente:

BAAAAAACTLPSLKNFTFSKNIFESMDETCRPSESKQVKIDGNENCLGGRSEQRTEK
 ECFPVVSKPVDCKGHCVSREGQSPKDPPKTVTPPKPSTPTTPKPNPSPPPPKTLP
 PPPKTSPPPPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPVASPPPPVHSP
 PPPVASPPPPVHSPPPPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPVHSPPPPVHSPPPPVHSP
 PPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPVHSPPPPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPPVASPP
 PPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPVASPPPPVHSPPPPVHSPPPPVHSPPPPVASPPPA
 LVFSPPPPVHSPPPAPVMSPPPPTFEDALPPTLGSLYASPPPIFQGY*(39.5-
 39.9kDa).

El peso molecular predicho para la proteína SS-TOM es de 54.2kDa y de la proteína SS-TOM-EXT-Long es 97.4 kDa. Para la generación de las líneas *cep1-3cep3-2/SS-TOMATO-EXT LONG* y *nac1-2/SS-TOMATO-EXT LONG* las plantas mutantes fueron transformadas por *floral dip*.

9. Determinación de los niveles citoplasmáticos y apoplásticos de ROS en el ápice de los pelos radicales

Los niveles de ROS en los tricoblastos se midieron en plántulas de *Arabidopsis* de 5 días de edad cultivadas en luz continua a 22 °C. Para evaluar ROS citoplasmáticas, las raíces de las plántulas se visualizaron después de ser tratadas con la sonda fluorescente *Peroxy-Orange 1* (PO1; Tocris Bioscience Cat. No 4944) (Dickinson et al., 2010). El PO1 se disolvió en DMSO para crear una solución madre de 500 µM y luego se diluyó nuevamente en agua para obtener una solución de trabajo de 50 µM. Las raíces se incubaron en PO1 durante 15 minutos en la oscuridad y después se enjuagaron con agua, previamente a ser visualizadas en el microscopio confocal. La medición de los niveles de ROS se realizó en una región circular de interés (ROI) seleccionada en el citoplasma del ápice del pelo radical. Para evaluar ROS apoplásticas, las raíces de las plántulas se incubaron en una solución de 50 µM del Reactivo Amplex UltraRed (AUR) (Molecular Probes, Invitrogen) durante 15 minutos en la oscuridad, pasado este tiempo se enjuagaron con agua y se vieron en el microscopio. La cuantificación de la señal de fluorescencia de la sonda AUR se limitó al apoplasto/pared celular.

En ambos casos se tomaron imágenes del ápice de los PR utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Alemania) (Excitación láser de argón de 543 nm, intensidad: 55%, ganancia: 525, filtro de emisión: LP560, objetivo Plan-Neofluar de 40×/1.3 con aceite, detector de MultiAlkali). Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ. Los valores de unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia se expresaron como la media ± SD utilizando el software de análisis estadístico GraphPad Prism 8.0.1 (EE. UU.). Los resultados de ambas mediciones de ROS son representativos de 2 experimentos independientes, cada uno involucrando de 5 a 10 raíces y aproximadamente, entre 5 y 10 tricoblastos por raíz.

10. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó en plantas que expresaban la construcción pER8:3xFLAG-NAC1 (Chen et al., 2016). La metodología seguida fue principalmente como se describe en Ariel et al., 2020. Las plantas se

cultivaron durante 10 días en placas que contenían medio MS 0,5X (pH 5,7; 0,8% agar) colocadas verticalmente en una cámara de cultivo a 22°C y luz continua (140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$). Después de 10 días, las placas se colocaron horizontalmente y se trataron con una solución de β -estradiol 10 μM durante 3 horas. La expresión de NAC1 se verificó mediante qPCR (Figura 8B). El *crosslink* de la cromatina se realizó con formaldehído al 1% (v/v) durante 10 min a temperatura ambiente. El *crosslinking* se detuvo añadiendo glicina (concentración final de 125 mM) e incubando durante 10 min a temperatura ambiente. La cromatina *crosslinkada* se extrajo mediante resuspensión celular, centrifugación, lisis de la membrana celular y gradiente de sacarosa, tal como se describió en Ariel et al., 2020. Los núcleos se resuspendieron en *Nuclei Lysis Buffer* y la cromatina se sonicó utilizando un baño de agua *Bioruptor Pico* (Diagenode; pulsos de 30s encendido/30s apagado, a alta intensidad durante 10 ciclos). Las muestras de cromatina se incubaron durante 12 h a 4 °C con *Protein G Dynabeads* (Invitrogen) recubiertas previamente con los anticuerpos anti-FLAG (Abcam ab18230) o anti-IgG (Abcam ab6702) como control negativo. El ADN inmunoprecipitado se recuperó con fenol: cloroformo: ácido isoamílico (25:24:1; Sigma) y se analizó mediante qPCR con los primers descritos en la Tabla 3. Se usaron dos regiones corriente arriba del gen E2Fa como control positivo (Xie and Ding, 2022). La cromatina sonicada sin tratar se procesó en paralelo y se consideró la muestra de entrada. Se utilizó el software GraphPad Prism 6 para analizar los datos y producir los gráficos.

11. Modelado y acoplamiento (*docking*) molecular entre AtCEP1-AtCEP3 y EXTs

Las secuencias de ADNc de AtCEP se recuperaron de TAIR (AtCEP1: AT1G05240, AtCEP2: AT3G50990, AtCEP3: AT4G26010) y NCBI Nucleotide DB. El modelado de homología se realizó usando un AtCEP de *Ricinus communis* y de *Ambrosia artemisiifolia* usando el modelador 9.14 (Šali and Blundell, 1993). Se usaron como templatado las estructuras cristalinas 1S4V y 5EF4, disponibles en el banco de datos de proteínas. Fueron generadas 100 estructuras para cada proteína y se seleccionó la de mejor puntuación (según la *DOPE score*). El receptor para las corridas de *docking* fue generado por el *script prepare_receptor4* de la AutoDock Suite (<https://autodocksuite.scripps.edu/>), agregando hidrógenos y construyendo enlaces. Se

utilizaron péptidos basados en la secuencia PYYSPSPKVYYPPPSSYVYPPPPS, reemplazando la prolina por hidroxiprolina, y/o añadiendo O-Hyp glicosiladas con hasta cuatro arabinosas por hidroxiprolina en el péptido totalmente glicosilado y una galactosa en la serina, como es habitual en el proceso de glicosilación de O-Hyp en plantas (Strasser, 2016). La estructura inicial del ligando se generó como la estructura más estable por dinámica molecular (Velasquez et al. 2015a). Todos los enlaces del ligando se establecieron para poder rotar. El *docking* se realizó en dos pasos, utilizando Autodock vina (Trott and Olson, 2010). Primero se realizó una búsqueda exploratoria sobre toda la superficie de la proteína (*exhaustiveness* 4, flexibilidad de los átomos), seguida de una más exhaustiva (*exhaustiveness* 8), reduciendo el espacio de búsqueda a una caja de 75 x 75 x 75 centrada sobre el sitio de unión más frecuente encontrado en la ejecución anterior.

Tabla 1. Mutantes insercionales usadas en este estudio.

Gen	Código ATG	Nombre de la línea	Línea mutante	Referencia
<i>NAC1</i>	<i>At1g56010</i>	<i>nac1-2</i>	SALK_135734.19.10.N	Este trabajo
<i>AtCEP1</i>	<i>At5g50260</i>	<i>cep1-2</i>	SALK_137016	Este trabajo
		<i>cep1-3</i>	SAIL_158_B06	(Höwing et al., 2014)
<i>AtCEP2</i>	<i>At3g48340</i>	<i>cep2-1</i>	SALK_079519	This work
		<i>cep2-2</i>	CSHET_6591	(Hierl et al., 2014)
<i>AtCEP3</i>	<i>At3g48350</i>	<i>cep3-1</i>	SALK_024692	Este trabajo
		<i>cep3-2</i>	SALK_016791	Este trabajo

Tabla 2. Líneas transgénicas usadas en este estudio.

Nombre	Construcción	Background	Referencia
PER8pro::AtCEP2	promotorPER8::AtCEP2	Wt Col-0	(Chen et al. 2016)
PER8pro::AtCEP1	promotorPER8::AtCEP1	Wt Col-0	(Chen et al. 2016)
PER8pro::3×FLAG-NAC1	promotorPER8::3×FLAG-NAC1	Wt Col-0	(Chen et al. 2016)
NAC1pro::NAC1-GUS	promotorNAC1::NAC1-GUS	Wt Col-0	(Chen et al. 2016)
AtCEP1pro::3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL	promotorAtCEP1:: PRE-PRO-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL	<i>cep1-3</i>	(Höwing et al. 2014)
AtCEP1pro::3xHA-EGFP-KDEL	promotorAtCEP1:: PRE-PRO-3xHA-EGFP-KDEL	<i>cep1-3</i>	(Höwing et al. 2014)
AtCEP2pro:: 3xHA-mCherry-KDEL	promotorAtCEP2::PRE-PRO-3xHA-mCherry-KDEL	<i>cep2-2</i>	(Hierl et al. 2014)
AtCEP2pro::3xHA-mCherry -AtCEP2-KDEL	promotorAtCEP2::PRE-PRO-3xHA-mCherry-AtCEP2KDEL	Wt Col-0	(Hierl et al. 2014)
AtCEP3pro::GFP	promotorAtCEP3::GFP	Wt Col-0	Este trabajo
NAC1pro::GFP	promotorNAC1::GFP	Wt Col-0	Este trabajo

Tabla 3. Lista de primers usados.

Gen	Secuencia
PP2A RT-F	GTCGACCAAGCGGTTGTGGAGA
PP2A RT-R	ACGCCCAACGAACAAATCACAGA
AtCEP1 RT-qPCR F	GACTCACAAGTGAGCTAGTG
AtCEP1 RT-qPCR R	CTACTACCGCAACTCCATGG
AtCEP2 RT-qPCR F	CCGGTTCCAACATCAAGCATCAC
AtCEP2 RT-qPCR R	AGATCCCGTAAACACTCCCTCTG
AtCEP3 RT-qPCR F	TTCCAGCTTTACTCTGAGGGTGTG
AtCEP3 RT-qPCR R	ACTGAAACCCATGAACCTCAATCC
NAC1 RT-qPCR F	TGAGCTCTCCAAAGGAAGACTGG
NAC1 RT-qPCR R	ACAGAATGAGTCGAGGCCTGTG
CEP1 CHIP A F	CACATGCACGGCTTTTCCAAT
CEP1 CHIP A R	TCAAAGCACAACCTTGTACGCAAC
CEP1 CHIP B F	AGAGCTTGCTTGCGCCATTA
CEP1 CHIP B R	GGGGTTAAAGGATTACTTGTGGGA
CEP2 CHIP A F	ATGGGCTGCGCCAAATGTTC
CEP2 CHIP A R	ACGTCTTAAACCATGCACCGA
CEP2 CHIP B F	TCGGACTTTTTGATTGGAATCCTCT
CEP2 CHIP B R	TCGTGGACCGATCCAAACAG

CEP3 CHIP A F	GAGGACCCAACCCATCTTCATC
CEP3 CHIP A R	ACACGTACGTCCATTCCCATT
E2Fa CHIP B- F	TTGCAGAGAATTGTGATT
E2Fa CHIP B- R	GAGAATCCGATCATAGAC
NAC1_RT-qPCR FW	CTCCTCGAGGCCGTAAAACC
NAC1_RT-qPCR RV	AGACCCAGTCTTCCTTTGGAG
Actin F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
Actin R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

Resultados y discusión

1. Expresión de CEPs en los pelos radicales

Mediante análisis *in silico* usando la base de datos *eFP Browser Toronto* (<http://bar.utoronto.ca>) se estudió la expresión de CEPs en raíces y en PR de *Arabidopsis thaliana*. Se observó que tienen niveles de expresión semejantes a los del gen específico de pelo radical EXP7 (Expansina 7, At1g12560) (Figura 1). Los niveles más elevados de expresión en la raíz para CEP1 y CEP3 se observaron en la zona de elongación. El análisis mostró que la expresión de CEP1 es notable en los PR que se encuentran en estadios más avanzados de su desarrollo, por otro lado, CEP3 presentó niveles de expresión más altos en los estadios iniciales del crecimiento de los PR. No se dispone de información para AtCEP2 en la base de datos del *eFP Browser Toronto*.

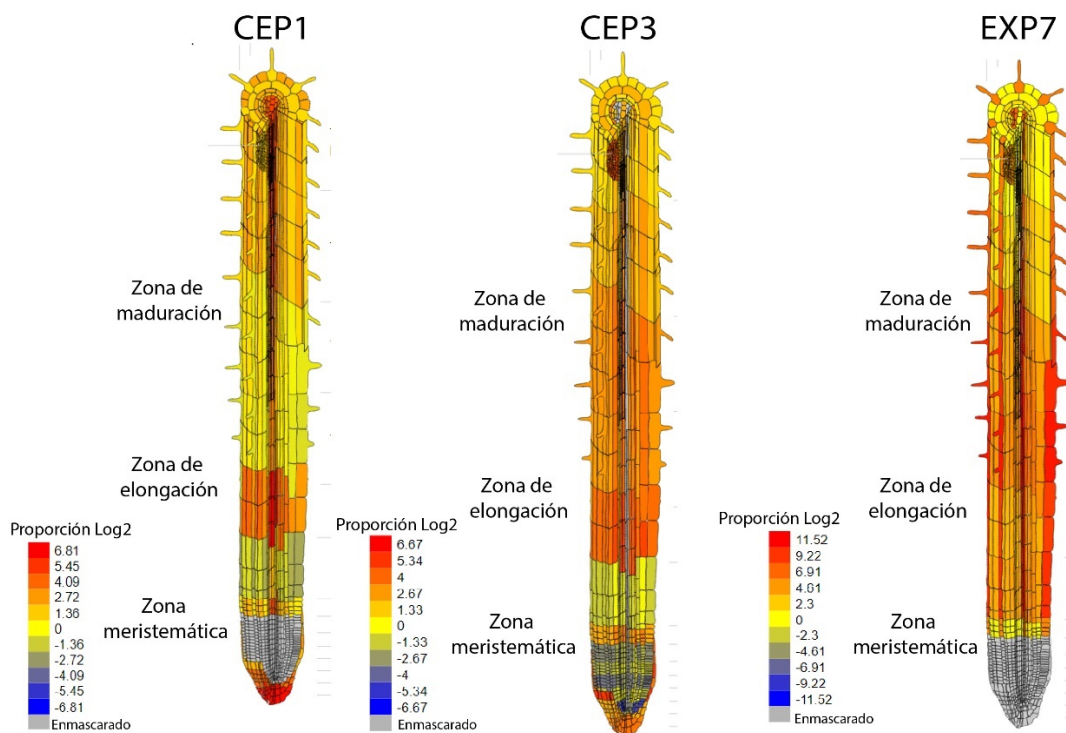


Figura 1. Patrón de expresión de CEP1 y CEP3 en raíz.

Análisis *in silico* de la expresión génica de AtCEPs utilizando *eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>). Se incluyó el gen específico de pelo radical EXP7 (At1g12560) como patrón de comparación.

Teniendo en cuenta lo arrojado por el análisis *in silico* de la expresión de CEPs en raíz, decidimos investigar si estas proteasas, se expresan en PR de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Para el estudio de la expresión de las AtCEPs en los PR se utilizaron los reporteros traduccionales: AtCEP1pro:PRE-PRO-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL y AtCEP2pro:PRE-PRO-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL (Tabla 2), cedidos por la Dra. Christine Gietl (Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Freising, Germany). Los constructos están formados por la secuencia codificante de AtCEP1 y AtCEP2 con sus respectivos promotores endógenos y las secuencias reguladoras de las proteínas PRE-PRO y KDEL unidos a las proteínas fluorescentes GFP y mCherry respectivamente, además, cuentan con el *tag* 3xHA (Hemaglutinina de influenza humana) (Hierl et al., 2014; Höwing et al., 2014). Al tener la secuencia que codifica para las proteínas CEPs y las proteínas fluorescentes estar ubicadas entre el propéptido señal y la enzima madura, estas líneas se consideran reporteros funcionales de las proteínas CEP1 y CEP2. Para analizar la expresión de AtCEP3, se utilizó el reportero transcripcional AtCEP3pro::GFP (generado usando el método de clonado *Gateway*), el cual contiene la región promotora 2kb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción fusionado a la proteína fluorescente GFP. Este reportero carece de la secuencia que va a dar lugar a la enzima madura.

Las raíces de las plantas transgénicas se analizaron usando microscopía confocal. Para CEP2, los resultados mostraron que se expresa en células tricoblásticas de la epidermis de la raíz, sin detectarse expresión alguna en las células atricoblásticas (Figura 2). En estudios anteriores se observó expresión de AtCEP2 en la zona de elongación de la raíz (Hierl et al., 2012; Hierl et al., 2014). Esta zona presenta un crecimiento difuso anisotrópico, caracterizado por la expansión de toda la superficie celular, lo que conlleva un aumento masivo en el volumen celular. Este proceso se acompaña de cambios drásticos y específicos en la pared celular (Balcerowicz et al., 2015). Además, se vio expresión de AtCEP2 en la base de hojas jóvenes y en el hipocótilo (Hierl et al., 2014), tejidos también en activo crecimiento. Esto podría sugerir que AtCEP2 juega un papel en la relajación de la pared celular, necesaria para la expansión de las células, lo cual respalda la hipótesis de este trabajo. En el caso del hipocótilo, se reportó que AtCEP2pro:PRE-PRO-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL se expresa específicamente

en células no-protruyentes, las células a partir de las cuales se forman los estomas, pero no en células protruyentes (Hierl et al., 2014). El patrón alterno de células protruyentes y no protruyentes en el hipocótilo está controlado por mecanismos comunes al patrón alterno de células que dan lugar a PR (tricoblasto) y células que no dan lugar a PR (atricoblasto) en la raíz. Las células no-protruyentes del hipocótilo y los tricoblastos de la raíz se colocan sobre una pared celular anticlinal del cortex subyacente y carecen de expresión de los reguladores del destino celular de GL2 y WER y el marcador *enhancer-trap* J2301, mientras que las células protruyentes del hipocótilo y el atricoblasto se colocan sobre una pared celular de la corteza periclinal y expresan el marcador J2301 y GL2 y WER, que bloquean el desarrollo de estomas o de los PR en estas células (Berger et al., 1998; Grierson et al., 2014). El hecho de que se haya demostrado que CEP2 se expresa en los tricoblastos respalda que las células de los PR comparten mecanismos específicos y características con las células no-protruyentes del hipocótilo (Berger et al., 1998; Grierson et al., 2014).

Para el reportero traduccional CEP1_{pro}: PRE- PRO-3xHA-EGFP-AtCEP1 también se observó expresión en PR (Figura 1). La fluorescencia de AtCEP3_{pro}::GFP fue alta en los tricoblastos de la raíz, pero no es específica de este tipo de células epidérmicas de la raíz (Figura 1). Anteriormente se reportó expresión del promotor de CEP3 en la zona de transición raíz-hipocótilo y a lo largo de las raíces primarias y laterales en el área que rodea el tejido vascular dentro de la endodermis. Además, se encontró actividad de los promotores AtCEP1 y AtCEP3 en tejidos generativos en varias etapas del desarrollo de semillas y frutos (Helm et al., 2008). La expresión específica de AtCEP1 y AtCEP2 en las células de tricoblastos de la raíz y la expresión de AtCEP3 en la epidermis indica que estos genes pueden desempeñar un papel en el crecimiento de estas células especializadas, posiblemente vinculado a la pared celular. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las CEPs pueden tener funciones en el crecimiento y/o expansión celular, además de en la PCD. Sería conveniente para el estudio de expresión de estas endopeptidasas, llevar a cabo la cuantificación de la fluorescencia de los reporteros en los distintos estadios del desarrollo de los PR.

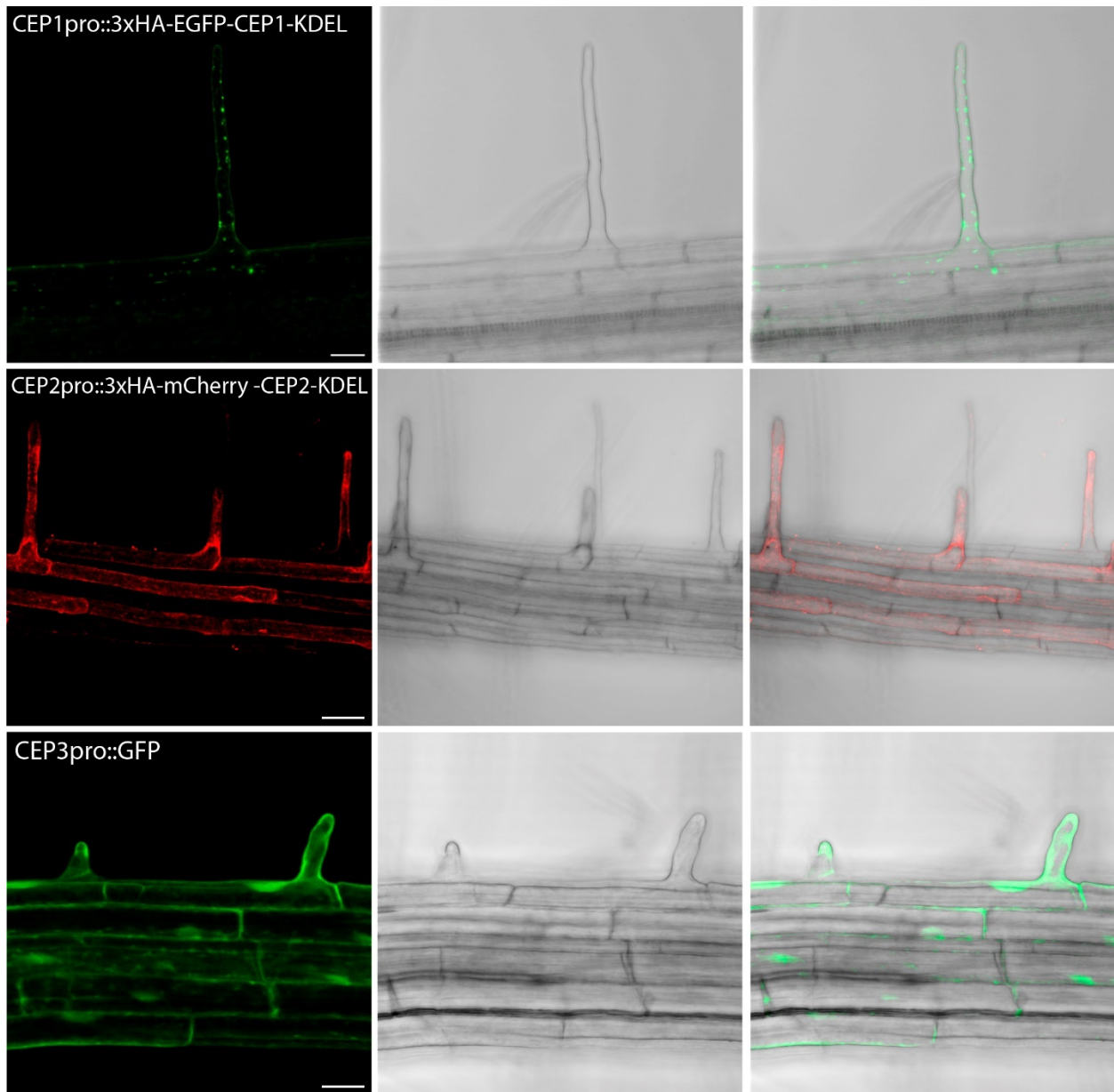


Figura 2. AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 se expresan en los pelos radicales.

AtCEP1 y AtCEP2 se expresan en tricoblastos. Se observaron con microscopía confocal reporteros traduccionales para AtCEP1 (AtCEP1pro::PRE-PRO-GFP-KDEL) y AtCEP2 (AtCEP2pro::PRE-PRO-mCherry-AtCEP2-KDEL). La expresión de AtCEP3 no fue específica para tricoblasto. Se usó un reportero transcripcional de AtCEP3 (AtCEP3pro::GFP). Barra de escala: 50 μm (CEP2) y 25 μm (CEP1 y CEP3). Imagen de microscopía confocal (A la izquierda), imagen de microscopía de campo claro (en el centro) y fusión de las dos (a la derecha).

2. Localización subcelular de CEP2

Dado que las CEPs tienen la capacidad de degradar EXT o proteínas relacionadas a EXT, al menos *in vitro* (Helm et al., 2008), fue de nuestro interés averiguar si existe expresión de estas proteasas en la pared celular de los PR. Para determinar si la señal de la proteína CEP2 se podía detectar en el apoplasto de los PR, raíces de plantas de la línea AtCEP2pro:PRE-PRO-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL (Figura 3A) fueron tratadas con manitol 8% para inducir plasmólisis. La plasmólisis permite distinguir si la fluorescencia en el borde de la célula proviene del apoplasto, de la pared celular o del citoplasma. Las plántulas previamente crecieron en medio MS 0.5X, agar 0.8% a 22°C, con luz continua durante 4-5 días. Una vez colocadas las raíces en la solución de manitol se observó el ápice de los PR en un microscopio confocal ZEISS LSM 880.

Durante la plasmólisis no se detectó señal de mCherry en el espacio apoplástico, ni en la pared celular. Esto sugiere que CEP2 no se encuentra presente en dichos compartimentos, en las condiciones estudiadas. La señal fluorescente mCherry estuvo limitada al citoplasma (Figura 3C). En PR observados sin plasmolisar se pudo visualizar la señal mCherry correspondiente a la enzima CEP2 en estructuras con forma redondeada, semejante a puntos (Figura 3B). En estudios previos se reportó la expresión de CEP2 en la caliptra, también en estructuras puntiformes (Höwing et al., 2018). Además, se vio en la base de hojas jóvenes que mCherry-AtCEP2 se almacena en vesículas redondas derivadas del RE, similares a los ricinosomas (Hierl et al., 2014). En correspondencia con esto, nuestros hallazgos sugieren que CEP2 podría localizarse en vesículas dentro de los PR y ejercer su función en la vía secretora, posiblemente asociada a RE y/o aparato de Golgi. No existen reportes previos de actividad de las CEPs en apoplasto o pared celular, lo cual apoya la hipótesis de que puedan estar dirigidas a la vía secretora. Sin embargo, no se sabe de otras enzimas que sean capaces de clivar a las EXT, por lo que el hecho de que no se haya detectado señal mCherry en apoplasto, en las condiciones estudiadas, no excluye la posibilidad de que ante determinada condición, las CEPs puedan actuar en la pared celular procesando EXT. Por ejemplo, se sabe que en condiciones de bajo pH la enzima pasa a su conformación activa durante la PCD (Hierl et al., 2014).

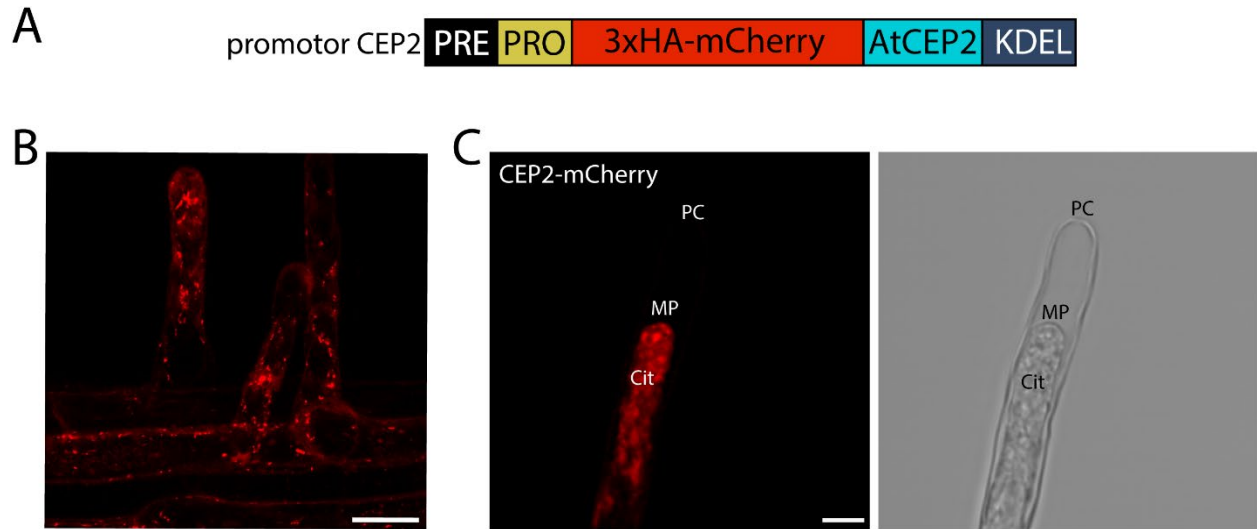


Figura 3. La expresión de CEP2 se limita al citoplasma de los pelos radicales.

(A) Esquema de la construcción utilizada para determinar la localización subcelular de CEP2, incluye el promotor endógeno de CEP2 (2.0 kb río arriba del codón de inicio de la transcripción) y los dominios PRE y PRO más 3xHA+mCherry y la secuencia codificante AtCEP2 incluyendo la señal de retención en retículo KDEL. (B) Señal fluorescente de mCherry en PR de *Arabidopsis thaliana* Wt Col-0 transformadas con la construcción promotorCEP2::3xHA-mCherry-CEP2-KDEL. Barra de escala: 25 μ m. (C) Pelo radical plasmolizado donde se muestra la falta de señal de AtCEP2-mCherry en el apoplasto. A la izquierda imagen de microscopía confocal, a la derecha imagen con luz transmitida. Barra de escala 5 μ m. (PC) Pared celular; (MP) Membrana plasmática; (Cit) Citoplasma.

2.1 Análisis de colocalización

Para determinar la naturaleza de esos orgánulos, se generaron plantas doble transgénicas que contienen marcadores subcelulares de RE y aparato de Golgi y la construcción mCherry-CEP2 (figura 3A) y se estudiaron los niveles de colocalización (Figura 4A,B). El análisis de colocalización se utiliza en biología celular y microscopía óptica para evaluar el grado de asociación o superposición entre dos biomoléculas o estructuras en el interior de una célula. Consiste en identificar y cuantificar la coincidencia espacial de las dos biomoléculas o estructuras en imágenes tomadas con un microscopio (Aaron et al., 2018). La caracterización de estas asociaciones biomoleculares se realiza a partir de imágenes de fluorescencia multicolor. Para esto, se tiene en cuenta dos fenómenos distintos: la co-localización y la co-ocurrencia. El primero determina el grado en que la abundancia de dos fluoróforos que se superponen espacialmente está relacionada entre sí, por lo que es más aplicable cuando se evalúa una relación funcional o estequiométrica entre dos elementos que se superponen. El segundo determina el

grado en que la abundancia de dos fluoróforos que se superponen espacialmente está relacionada entre sí, las mediciones de co-ocurrencia suelen ser más adecuadas para determinar qué proporción de una molécula está presente en una área, compartimento u orgánulo específico (Aaron et al., 2018). Para el presente estudio se decidió usar el método introducido por Manders, que determina la superposición de dos imágenes teniendo en cuenta la intensidad de píxeles, es decir: la co-ocurrencia (Manders et al., 1993). Este método resulta en dos coeficientes M1 y M2. M1 representa la fracción de co-ocurrencia del color 1 con el color 2 y de manera similar, M2 es la fracción de co-ocurrencia del color 2 con el color 1. En general, los coeficientes de Manders son útiles para evaluar en qué medida una estructura o molécula se encuentra en una ubicación u orgánulo particular. El método de Manders se ha utilizado anteriormente para cuantificar la co-ocurrencia de una molécula de interés con las mitocondrias (Bravo et al., 2011), la membrana plasmática (Spira et al., 2012) o el RE (Arruda et al., 2014).

Para este estudio se usaron los marcadores subcelulares del aparato de Golgi NAG-GFP y ST-YFP. La N-acetilglucosaminiltransferasa I (Nag) es una enzima localizada en el aparato de Golgi que participa en la glicosilación de proteínas secretoras y ha sido utilizada como una proteína marcadora de Golgi (Munro, 1998; Grebe et al., 2003). Como segundo marcador del Golgi, utilizamos la N- α -2,6-sialiltransferasa de rata fusionada a YFP (ST-YFP). En las raíces de *Arabidopsis*, la α -2,6-sialiltransferasa de rata se localiza en cisternas y membranas del lado *trans* Golgi (Wee et al., 1998; Grebe et al., 2003). Como marcador para lumen de RE se usó el péptido de retención de retículo HDEL fusionado a GFP. Se ha demostrado en estudios previos que GFP unido a una señal de retención en el RE (GFP-HDEL) muestra una fluorescencia característica en *Arabidopsis* (Hawes et al., 2001; Matsushima et al., 2002). Además, se usó el marcador de membrana de RE KKXX unido a GFP (KKXX-GFP) (Jones et al., 1994; Takemoto et al., 2003).

Las CEPs son sintetizadas como pre-pro-enzimas, se trasladan al RE y se mantienen almacenadas como enzimas inactivas en compartimentos derivados del RE denominados ricinosomas (Schmid et al., 1998). Los ricinosomas se han descrito como orgánulos de almacenamiento de CEPs en estado pro-enzima en el endospermo de semillas germinadas de ricino, en la nucela de semillas de ricino en maduración (Schmid

et al., 1999; Schmid et al., 2001; Greenwood et al., 2005), en las anteras y en el edospermo de semillas en fase de imbibición de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Senatore et al., 2009; Trobacher et al., 2013). Además se ha reportado la presencia de CEPs en cotiledones de *Vicia sativa* (Becker et al., 1997), las vainas en maduración de *Phaseolus vulgaris* (Tanaka et al., 1991) y los pétalos de flores senescentes de *Heimerocallis* (Schmid et al., 1999). En estos tejidos, la aparición de los ricinosomas y la acumulación de KDEL CysEP son un indicador temprano de la etapa final de la PCD del desarrollo.

En nuestros estudios la señal mCherry-AtCEP2 se vio en estructuras redondeadas parecidas a ricinosomas (*ricinosoma-like*) y al hacer el ensayo de colocalización encontramos que la señal mCherry-AtCEP2 colocalizó en niveles muy bajos con marcadores para el aparato de Golgi NAG-GFP y ST-YFP (Figura 4C). Sin embargo, se vieron niveles de colocalización más altos con el marcador de membrana de RE KKXX-GFP y con el marcador de lumen de RE HDEL-GFP, lo que sugiere que AtCEP2 se puede localizar en un compartimento derivado de RE en tricoblastos (Figura 4A,B,C). De hecho, AtCEP2 se observó anteriormente en compartimentos derivados de RE que se asemejaban a ricinosomas y RE-*Bodies* en células de hoja, hipocótilo, caliptra y zona de elongación de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Hierl et al., 2014; Höwing et al., 2014). Las KDEL-CysEP no son glicosiladas (Than et al., 2004), por lo que tiene sentido que no estén dirigidas al aparato de Golgi. Esto se corresponde con nuestros resultados (Figura 4A,B,C). En cotiledones de judía negra (*Vigna mungo*), KDEL-CysEP (Sulfhidrilo-endopeptidasa, SH-EP) se acumula en vesículas KDEL (KV). Las KV se originan en el RE y transportan pro-SH-EP en una ruta independiente de Golgi (Toyooka et al., 2000). Los ricinosomas y las vesículas que acumulan KDEL-CysEP (KV; Toyooka et al., 2000; Okamoto et al., 2003) parecen ser importantes para el transporte eficiente de las KDEL-CysEPs durante la PCD y la remodelación de tejidos. La presencia de pro-AtCEP2 en la base de las hojas jóvenes, en el hipocótilo y en la zona de elongación de la raíz reportada por Hierl et al., 2014 unido a la presencia de AtCEPs en tricoblastos, como muestran nuestros resultados, podría indicar una función de AtCEPs durante la expansión y elongación celular (más allá de su conocido papel durante la PCD). Esta función de las

AtCEPs probablemente esté relacionada con la pared celular, dada su capacidad de procesar EXT y proteínas relacionadas con EXT.

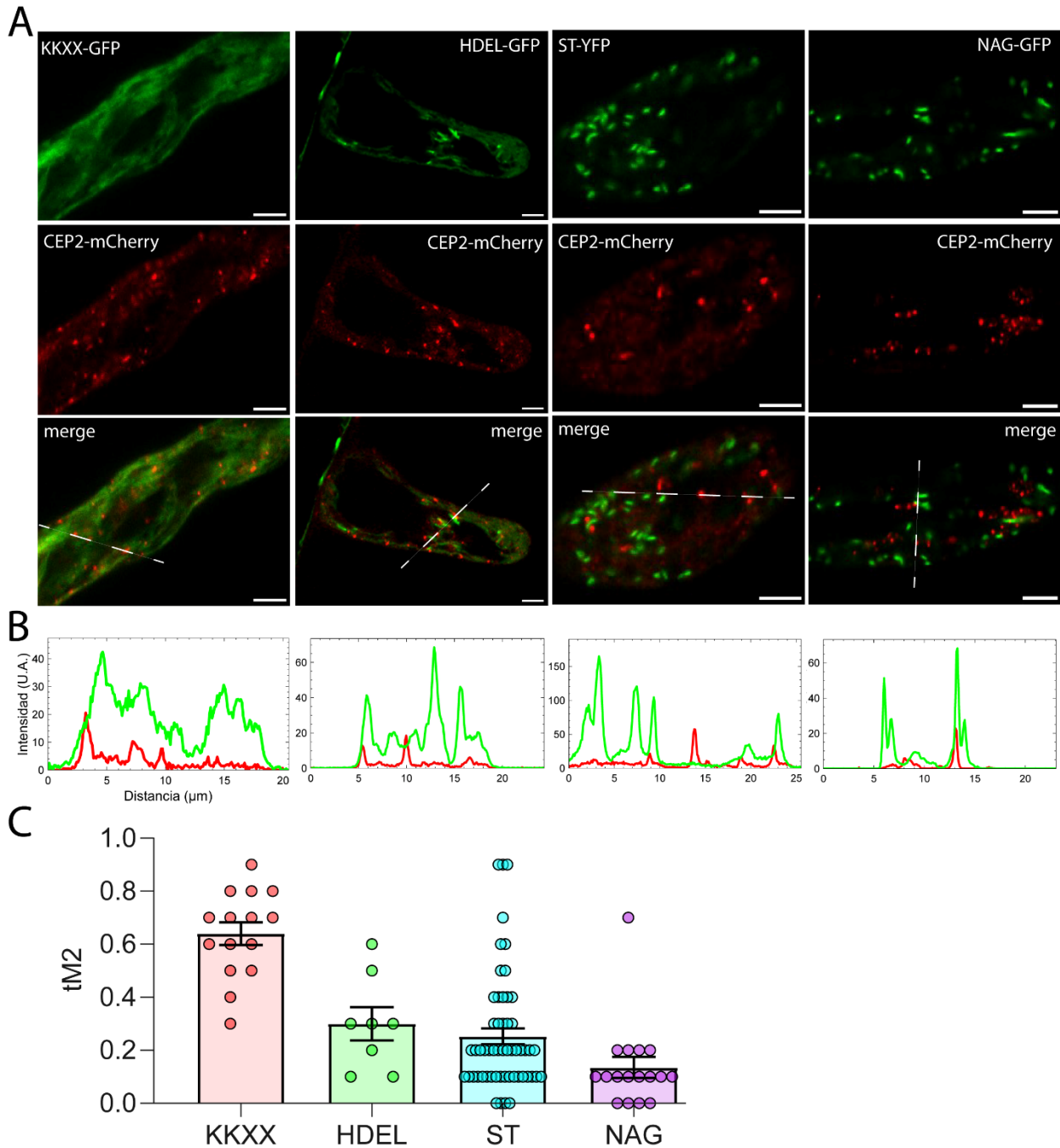


Figura 4. AtCEP2 colocaliza principalmente con el marcador de membrana ER.

(A) Colocalización de AtCEP2-mCherry con marcadores para diferentes compartimentos subcelulares. Se cultivaron plántulas AtCEP2mCherry de siete días de edad (n = 10 raíces con 1–5 PR cada una). HDEL-GFP es un marcador de RE de lumen y KKXX-GFP es un marcador de membrana ER. NAG-GFP es un marcador cis-Golgi y ST-YFP es un

marcador de red trans-Golgi. Barra de escala de 5 μm . **(B)** Perfiles de intensidad de fluorescencia a lo largo de la línea discontinua para la señal de mCherry y el respectivo marcador subcelular. **(C)** Cuantificación de la colocalización utilizando el coeficiente de correlación de Manders.

3. Caracterización de mutantes insercionales de AtCEPs

Con el objetivo de determinar la posible participación de las CEPs en el crecimiento polar de los PR de *Arabidopsis thaliana*, se aislaron mutantes de T-ADN para los tres genes AtCEP, como se muestra en la Tabla 1 y Figura 5B. Se caracterizaron al menos dos alelos de T-ADN para cada gen AtCEP. Los mutantes individuales para AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 no mostraron un fenotipo diferencial en comparación con el control Wt Col-0 (Figura 5A). Por esta razón, se decidió generar dobles mutantes de AtCEPs mediante cruzamiento de las simples mutantes. Se obtuvieron las mutantes dobles homocigotas para la inserción de T-DNA *cep1-3cep3-2* y *cep1-3cep2-2*. Cuando se evaluó el fenotipo de pelo radical de las dobles mutantes de AtCEPs respecto al Wt Col-0 se vio que *cep1-3cep3-2* y *cep1-3cep2-2* mostraron un incremento significativo en la longitud de los PR (Figura 5C). Esto sugiere que las AtCEPs influyen en el crecimiento polar de los PR y que además, podrían tener un efecto redundante. En resumen, nuestros hallazgos indican que las enzimas AtCEP1-AtCEP3 de *Arabidopsis* se expresan en los PR y regulan negativamente su crecimiento.

Nuestros resultados evidencian el papel de las AtCEPs en la expansión celular, como fue demostrado en estudios previos por Höwing et al., 2018. En este trabajo (Höwing et al., 2018) se reportó que AtCEP2 está involucrada en el crecimiento de la raíz primaria. Plantas mutantes de CEP2 presentaron raíces primarias más cortas debido a una reducción en la longitud de las células epidérmicas tricoblasticas de la zona de elongación de la raíz. Lo cual indica que CEP2 es necesaria para la elongación celular. Además, se vio expresión de AtCEP1 y AtCEP2 en las células epidérmicas de la raíz que se separan para permitir la emergencia de la raíz lateral (RL) y que la pérdida de función de AtCEP1 o AtCEP2 provoca una aparición tardía de los primordios de RL, lo que sugiere que estas KDEL-CysEPs pueden estar involucradas en la remodelación de la pared celular para que emerjan las RL.

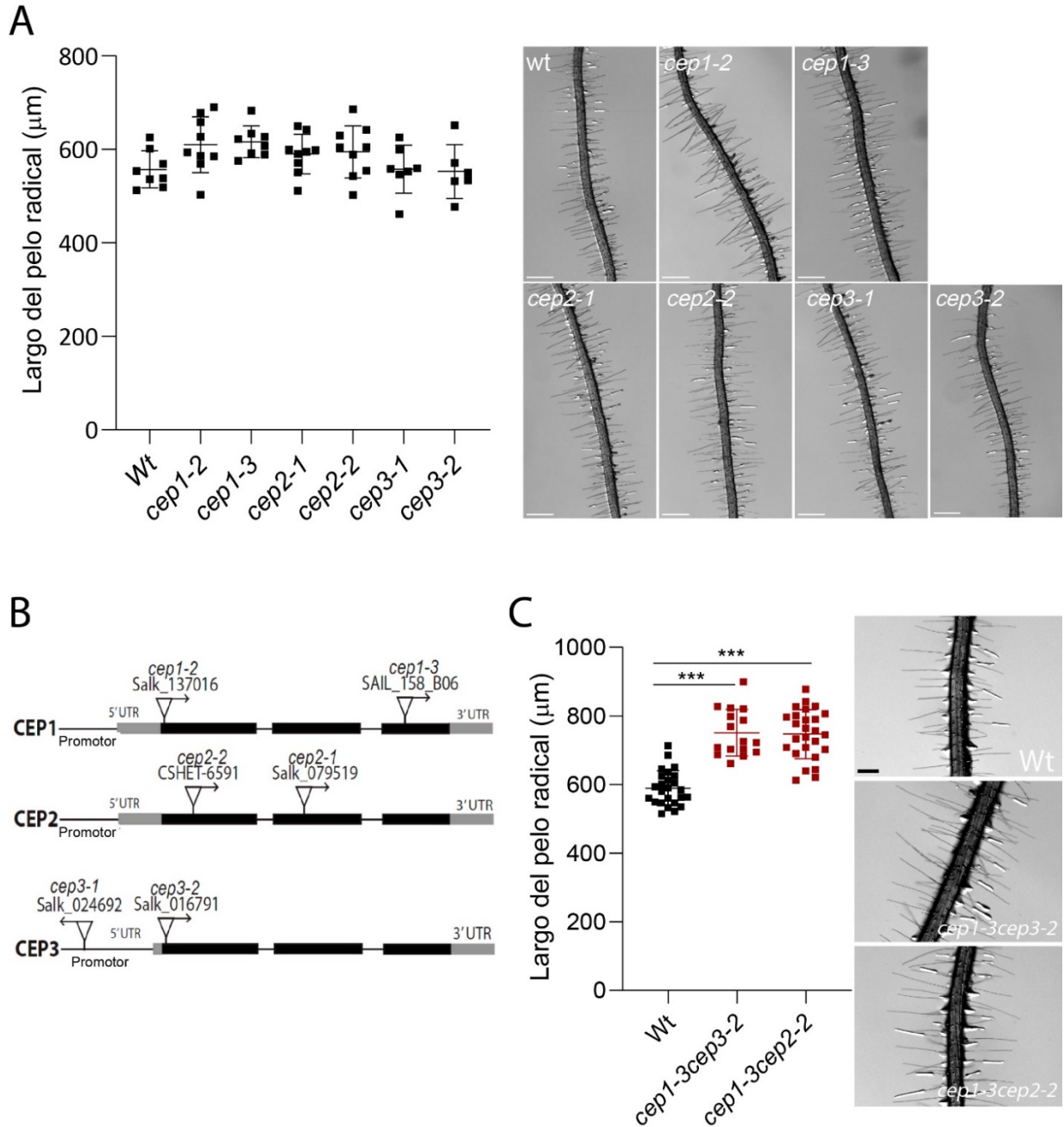


Figura 5. AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 regulan negativamente el crecimiento del pelo radicular.

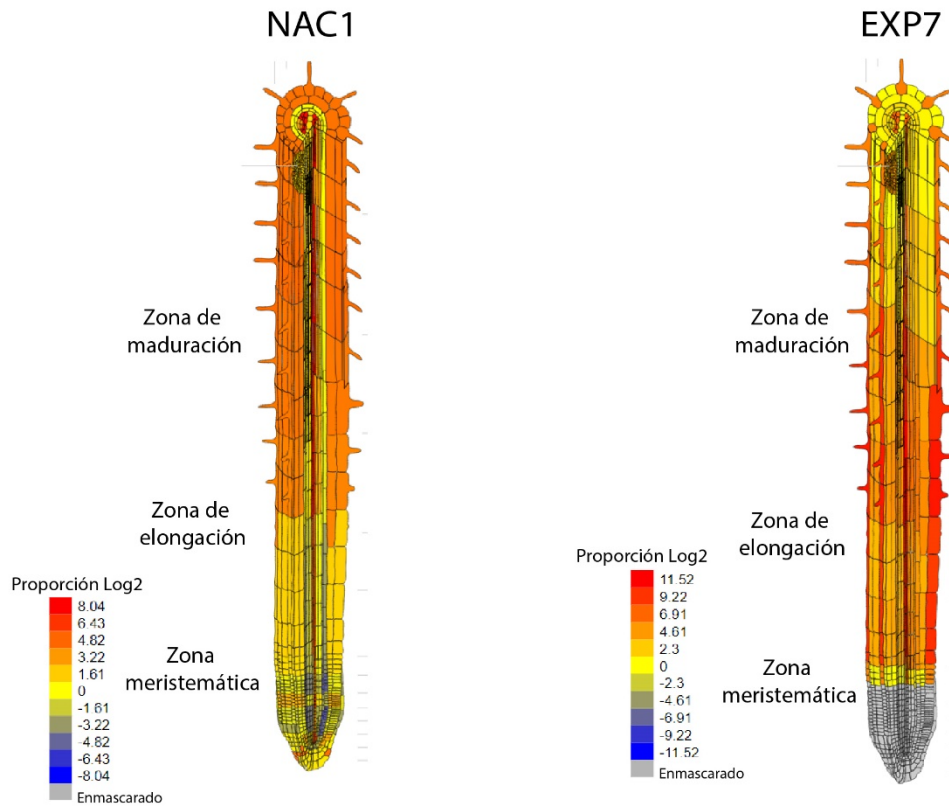
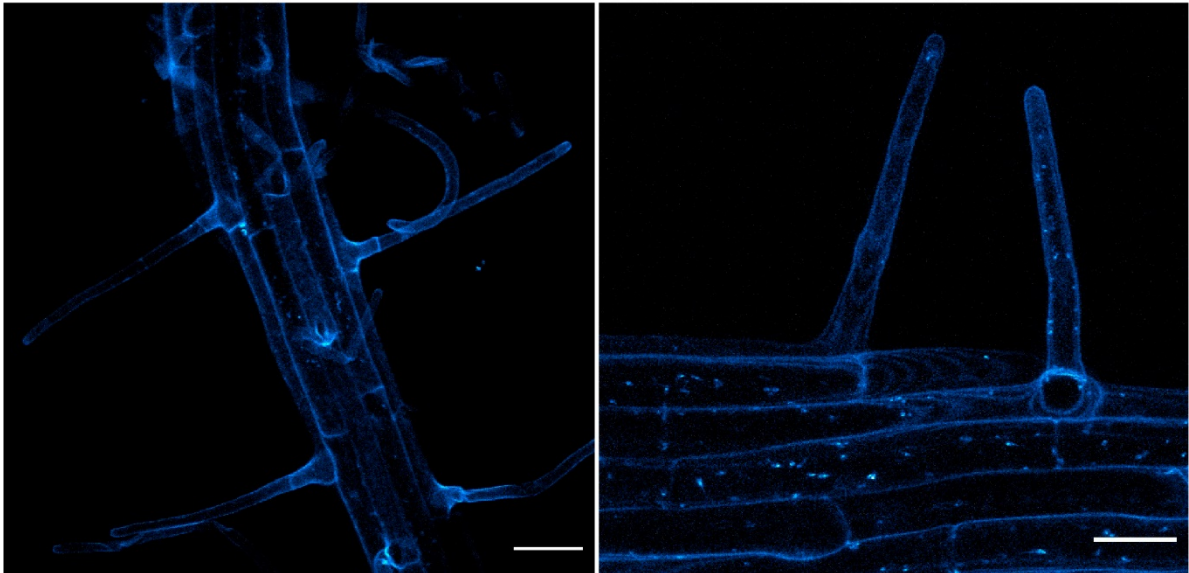
(A) Análisis cuantitativo de la longitud de PR en Wt Col-0 y en mutantes simples de CEPs. Los datos se muestran como la media \pm DE, ($n = 7$ a 10 raíces). (A la derecha) Imágenes seleccionadas de PR en Wt y en mutantes de *cep* simple y doble. Barra de escala = $500 \mu\text{m}$. **(B)** Esquema de los genes AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3 mostrando intrones (líneas finas), exones (rectángulos) y posiciones de las inserciones de T-ADN. **(C)** Análisis cuantitativo de la longitud de los PR en Wt Col-0 y mutantes *cep*. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar ($n = 20$ a 25 raíces). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al Wt según la prueba 1-way ANOVA seguida de la prueba de Dunnett con $P < 0.05$. A la derecha, se muestran imágenes seleccionadas de las RH en Wt y en mutantes *cep* individuales y dobles. Barra de escala = $300 \mu\text{m}$.

4. Regulación transcripcional de AtCEPs

4.1 Influencia del factor de transcripción NAC1 en el crecimiento de los pelos radicales

NAC1 pertenece a la familia de FT específicos de plantas NAC (petunia NAM *and Arabidopsis* ATAF1, ATAF2, *and* CUC2) (Aida et al., 1997). Los FT NAC están involucrados en procesos del desarrollo, defensa y respuesta a estrés abiótico (Olsen et al., 2005b). Se caracterizan por tener un dominio altamente conservado en la región N-terminal llamado NAC que media la unión al ADN (Ernst et al., 2004; Olsen et al., 2005a). NAC1 promueve la formación de raíces laterales mediada por auxinas corriente abajo de la proteína TIR1 (Xie et al., 2000). En un estudio de la organogénesis *de novo* de raíces adventicias, utilizando explantes foliares de *Arabidopsis*, se vio que el daño no solo inicia la transición del destino celular para la regeneración mediada por auxinas, sino que también desencadena la vía NAC para la emergencia de la raíz (Chen et al., 2016). En respuesta al daño se detectó la expresión del FT NAC1. En este contexto, NAC1 actuó por una vía independiente a las auxinas y reguló la expresión de genes CEPs. La sobreexpresión de NAC1 indujo la expresión de numerosos genes durante la organogénesis *de novo* de raíces adventicias, entre ellos destacaron AtCEP1 y AtCEP2. En el trabajo sugieren que el aumento de la expresión de CEPs podría estar relacionado con la degradación de extensinas, lo que favorecería la cicatrización de la herida y esto podría actuar como una barrera para la emergencia de la raíz (Chen et al., 2016). En base a estos hallazgos previos decidimos estudiar si el FT NAC1 podría estar induciendo la expresión de CEPs durante el crecimiento polarizado de los PR.

En el análisis *in silico* usando la base de datos *eFP Browser* Toronto (<http://bar.utoronto.ca>) se vio que NAC1 se expresa en en la epidermis de la raíz (Figura 6A). Teniendo en cuenta esto, se evaluó la expresión de NAC1 en PR usando la línea reportera transcripcional NAC1pro::GFP generada en el laboratorio. Esta línea se caracterizó en el microscopio confocal y se observó señal GFP en pelos, lo cual indica que NAC1 se expresa en los PR (Figura 6B).

A**B****NAC1pro::GFP****Figura 6. NAC1 se expresa en pelos radicales.**

(A) Análisis in silico de la expresión de NAC1 utilizando *eFP Browse* (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>). Se incluyó el gen específico de pelo radical EXP7 (At1g12560) como patrón de comparación. **(B)** Expresión de NAC1 en pelo radical usando el reportero transcripcional NAC1pro:GFP.

Se procedió entonces a evaluar el efecto fenotípico de la pérdida de función de NAC1 en PR. Para esto se aisló y caracterizó la mutante de T-DNA *nac1-2* (Tabla 1, Figura 7A), se llevó a homocigosis y se comprobó que la expresión de transcritos está drásticamente disminuida (Figura 7B). Además se usó una línea transgénica en la que NAC1 está unido al dominio de represión SRDX (LDLDLELRGFA; Figura 7A; Tabla 2) (Hiratsu et al., 2003), lo cual impide la expresión de sus genes *target*.

Se ha visto que un represor quimérico, en el cual un FT se fusionó con el dominio de represión EAR (SRDX), suprimió de manera específica la expresión de genes *target*, lo que resultó en fenotipos similares a los asociados con los correspondientes mutantes alélicos de pérdida de función (Hiratsu et al., 2003). Esta tecnología, conocida como Tecnología de Silenciamiento de Genes con Represores Quiméricos (CRES-T, *Chimeric REpressor gene Silencing Technology*), se ha empleado ampliamente para el análisis funcional de factores de transcripción en plantas (Hiratsu et al., 2003; Matsui et al., 2004).

En ambos casos, tanto para la mutante alélica *nac1-2* como para las líneas 35Spro::NAC1-SRDX-1 y 35Spro::NAC1-SRDX-2 se vio un fenotipo de pelo más largo respecto al Wt Col-0 (Figura 7 C). Nuestros resultados indican que NAC1 se expresa en PR y que regula negativamente el crecimiento de los mismos. Esto se corresponde con lo encontrado para las CEPs, lo cual avala la hipótesis de una posible regulación de CEPs por el factor de transcripción NAC1.

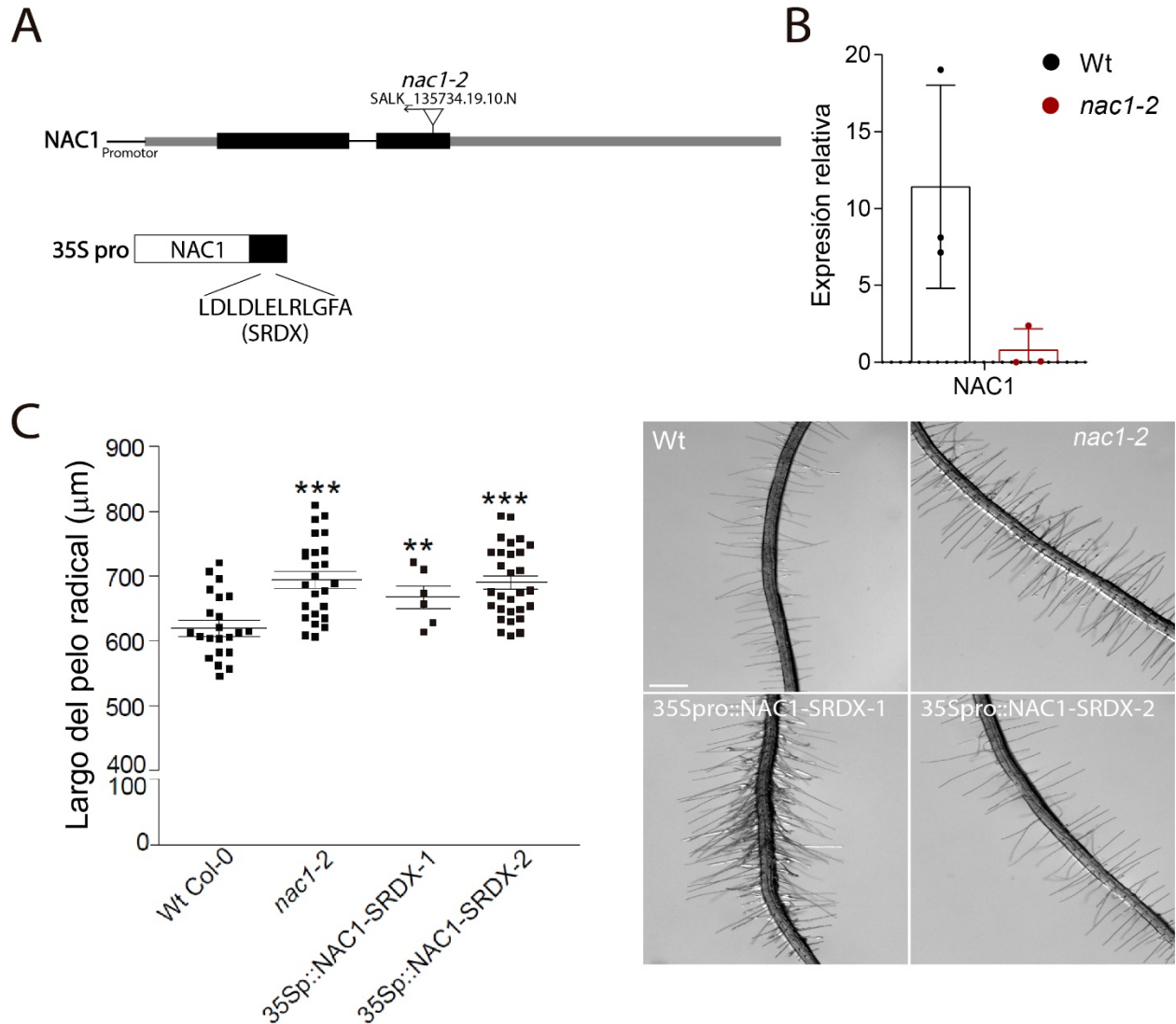


Figure 7. NAC1 regula negativamente el crecimiento de los pelos radicales.

(A) Esquema del gen *nac1* mostrando intrones (líneas finas), exones (rectángulos) y la posición de la inserción de T-ADN. Se muestra un esquema de la línea 35Sp::NAC1-SRD1. (B) Análisis cuantitativo (qPCR) de la expresión de transcritos de *nac1* en la mutante *nac1-2* respecto al Wt Col-0. Expresión relativa al gen de expresión constitutiva PP2A. Los datos representan la media \pm DS (n = 3), se realizó la prueba 2-way ANOVA seguida de la prueba de Sidak, $P < 0.05$. (C) Análisis cuantitativo del fenotipo de los PR en el mutante *nac1-2* y en 2 líneas en las que NAC1 no es funcional (media \pm DS, n = 15 a 20). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al Wt Col-0 según la prueba de ANOVA con $P < 0.05$. A la derecha, se muestran imágenes seleccionadas de los PR, barra de escala = 500 μm

4.2 Relación de AtCEPs con el factor de transcripción NAC1

Dado que se demostró que NAC1 controla la expresión de AtCEP1 y AtCEP2 durante la organogénesis *de novo* de raíces adventicias (Chen et al., 2016), decidimos probar si podría estar ocurriendo una regulación similar en los PR.

Para analizar si la sobreexpresión de NAC1 tendría un efecto directo sobre el crecimiento de los PR, posiblemente induciendo la expresión de AtCEP1/AtCEP2, utilizamos la línea inducible por β -estradiol pER8:3 \times FLAG-NAC1 (Zuo et al., 2000). Raíces de plantas de 10 días fueron tratadas con solución de estradiol 10 μ M durante 4h. En presencia de estradiol, se observó una inducción 75 veces más alta en los niveles de NAC1 (Figura 8B). Después, probamos si el FT NAC1 activa la expresión de AtCEP1-AtCEP3 en las raíces, como se demostró en el ensayo de formación de raíces adventicias *de novo* (Chen et al., 2016). La línea NAC1-FLAG inducible por estradiol aumentó la expresión de CEP1 en 1.6 veces y la de CEP2 4 veces, mientras que no se detectaron cambios para CEP3 (Figura 8B). Además, decidimos estudiar como se comportaba la expresión de transcritos de CEPs en la mutante alélica *nac1-2* respecto al Wt. Por el contrario, el mutante *nac1-2* mostró niveles más bajos de transcritos de las tres AtCEPs (Figura 8A). Estos resultados indican que NAC1 influye en la expresión de AtCEP1-AtCEP3 y, en consecuencia, controla el crecimiento de los PR, posiblemente a través de su actividad de procesamiento de EXT.

Con el objetivo de determinar si NAC1 controla la expresión de los genes de AtCEPs mediante la unión directa a sus regiones promotoras decidimos realizar un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido por qPCR (ChIP-qPCR). Anteriormente se reportó que el sitio de unión a DNA de los FT NAC tiene la secuencia conservada CGT[GA] (Olsen et al., 2005a). Teniendo en cuenta esto, se buscó dicha secuencia en las regiones promotoras de los genes que codifican para las 3 AtCEPs, 2000pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los sitios putativos de unión a NAC1 se buscaron en regiones de cromatina abierta, de acuerdo con conjuntos de datos de ATAC-Seq disponibles públicamente (Maher et al., 2018). Se identificaron 2 sitios en la región promotora del gen *cep1*, 2 sitios para *cep2* y 1 sitio para *cep3* (Figura 8C).

Una vez tenida esta información se realizó el ensayo ChIP-qPCR en colaboración con el grupo del Dr. Federico Ariel. Se utilizaron plantas sobreexpresantes de NAC1 bajo el control de un promotor inducible por estardiol (línea: pER8:3pro::xFLAG-NAC1; inducción 60x) (Figura 8C) y anticuerpos anti-FLAG. Para la qPCR se diseñaron *primers* para amplificar las regiones que se correspondían con los sitios putativos de pegado de NAC1 en los promotores de los genes de AtCEPs. Se usó como control positivo el gen *E2Fa*, ya que se reportó recientemente que su expresión es regulada directamente por NAC1 (Xie and Ding, 2022).

En el experimento se obtuvo que los sitios -100 (posición relativa al codón de inicio de la transcripción) para la región promotora de *cep1*, -1900 para *cep2* y -590 para *cep3* se encuentran enriquecidos en la línea pER8:3pro::xFLAG-NAC1 con respecto al control negativo. Según los resultados de este experimento, se puede afirmar que NAC1 se une a los promotores de los genes que codifican para AtCEPs, por lo que AtCEP1, AtCEP2 y, en menor medida, AtCEP3, son regulados directamente por NAC1 (Figura 8C). En conjunto, esto confirma que NAC1 induce la expresión de las tres CEPs, que modulan el crecimiento de los PR posiblemente mediante el precesamiento de las EXT.

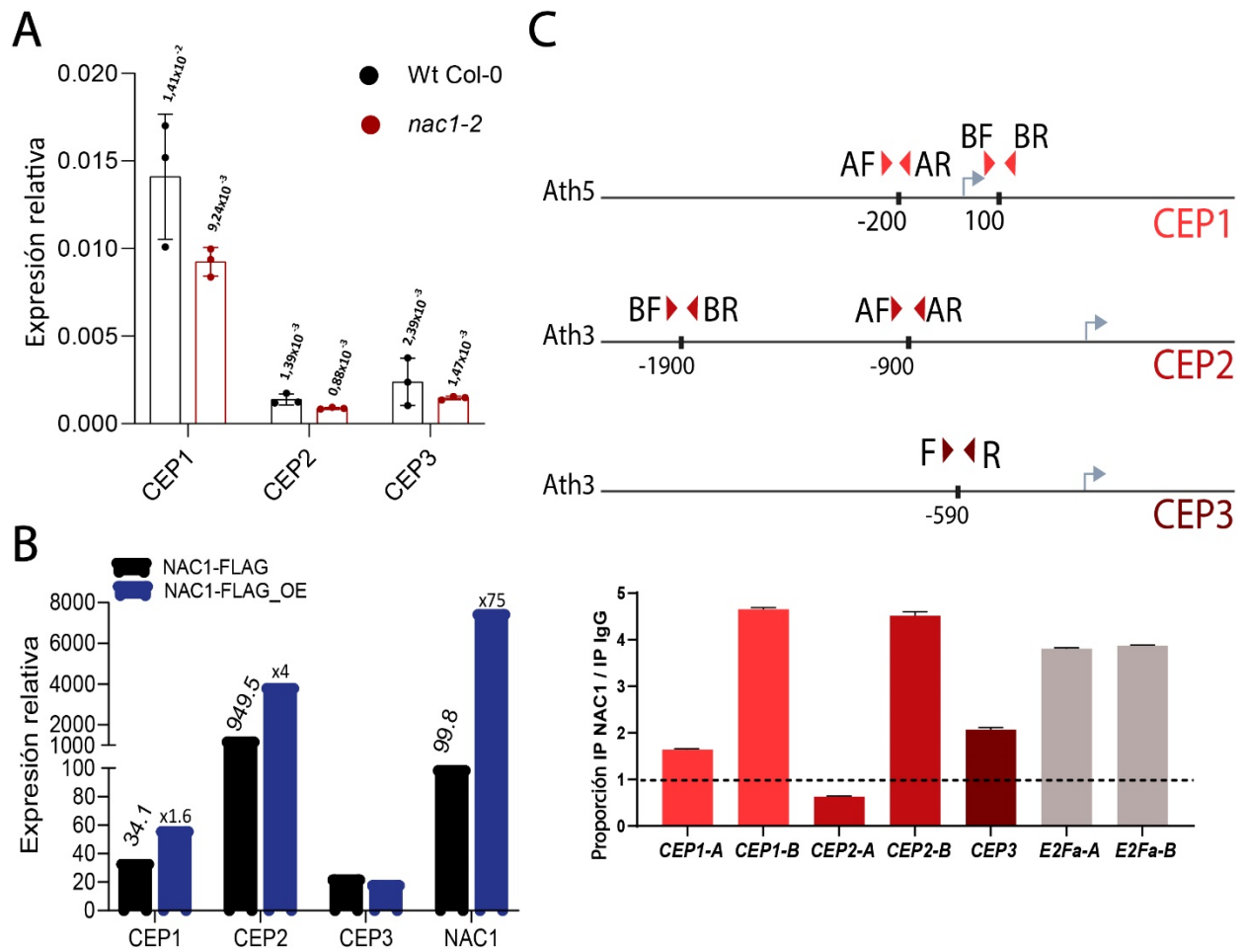


Figura 8. NAC1 regula la expresión de CEP1-CEP3.

(A) Análisis de qPCR de transcritos de *atcep1*, *atcep2* y *atcep3* en Wt Col-0 y el mutante *nac1-2*. La proteína fosfatasa 2 (PP2A) se utilizó para normalizar la expresión génica. Los datos se presentan como la media \pm DS ($n = 3$), se realizó la prueba 2-way ANOVA seguida de la prueba de Sidak, $P < 0.05$. Los números sobre las barras representan la media de los niveles de expresión de los transcritos de *cep*. **(B)** Inducción de CEP1 y CEP2 por línea inducible por estradiol NAC1-FLAG (PER8pro:3 \times FLAG-NAC1). La expresión de los transcritos se normalizaron en relación con ACT2. **(C)** Análisis de ChIP-qPCR de la unión de NAC1 a las regiones promotoras de AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3. En la parte superior se muestran los esquemas de los *loci* que muestran la ubicación de los fragmentos analizados por ChIP-qPCR. Los primers se diseñaron analizando experimentos ATAC-seq en regiones donde la cromatina es accesible (Maher et al., 2018). El enriquecimiento se midió en relación con el control negativo ACTINA.

5. Efecto de la actividad de CEPs en la insolubilidad de las EXT en la pared celular

Las EXTs son proteínas estructurales de la pared celular que han mostrado tener un papel fundamental en el mantenimiento de su integridad (Marzol et al., 2018; Moussu and Ingram, 2023). No se conocen enzimas involucradas en procesar a las EXTs, sin embargo, en estudios previos se demostró que las CEPs son capaces de clivar EXTs *in vitro* (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2012). Teniendo en cuenta esto, hipotetizamos que las AtCEPs podrían procesar EXTs o proteínas relacionadas a EXTs durante el crecimiento polarizado del pelo radical. Decidimos estudiar si la reducción de la actividad de AtCEP en los mutantes tenía un efecto sobre las EXT secretadas e insolubilizadas en la pared celular de los PR. Para ello, utilizamos plantas que expresaron un reportero de EXT (dominio extensina con 29 repeticiones SPPPP), con un péptido señal para su secreción al apoplasto (SS) y unido a la proteína fluorescente tdTomato (SS-TOM-Long-EXT). La proteína tdTomato es resistente al pH ácido, característico del apoplasto de la pared celular (Figura 9A). Es importante destacar que la expresión del reportero no afectó el crecimiento polar de los PR (Pacheco et al., 2022), lo que lo convierte en una línea ideal para monitorear alteraciones *in situ* en la deposición de EXT en la pared.

Se midió la señal fluorescente proveniente de la pared celular en las zonas apicales de PR de líneas con el constructo SS-TOM-Long-EXT en *background* Wt y *cep1-3cep3-2*. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal en condiciones de plasmólisis. Obtuvimos que la estabilización/insolubilización de SS-TOM-Long-EXT en la pared celular del ápice de los PR se redujo drásticamente en el doble mutante *cep1-3cep3-2* en comparación con las plantas Wt Col-0 (Figura 9A,B). Para probar si la expresión total de la construcción SS-TOM-Long-EXT fue similar en ambos *background* genéticos (Wt Col-0 respecto a la doble mutante *cep1-3cep3-2*) sin tratamiento con plasmólisis, se cuantificó la señal total de la proteína tdTomato (Figura 9C,D) y se detectó una señal general más alta en el doble mutante *cep1-3cep3-2* respecto al Wt Col-0. Por tanto, el reportero SS-TOM-Long-EXT se modifica diferencialmente en la zona apical de los PR ante la deficiencia de la actividad de AtCEP1 y AtCEP3. Esto sugiere que las AtCEPs pueden actuar procesando a las EXTs en la vía secretora y ante la deficiencia de su actividad no llega suficiente EXT a la pared celular para ser insolubilizada, lo que conlleva

a un aumento del crecimiento de los PR, posiblemente debido a que se relaja la pared celular porque se afecta el entrecruzamiento de las EXTs, lo cual influye directamente en su rigidez.

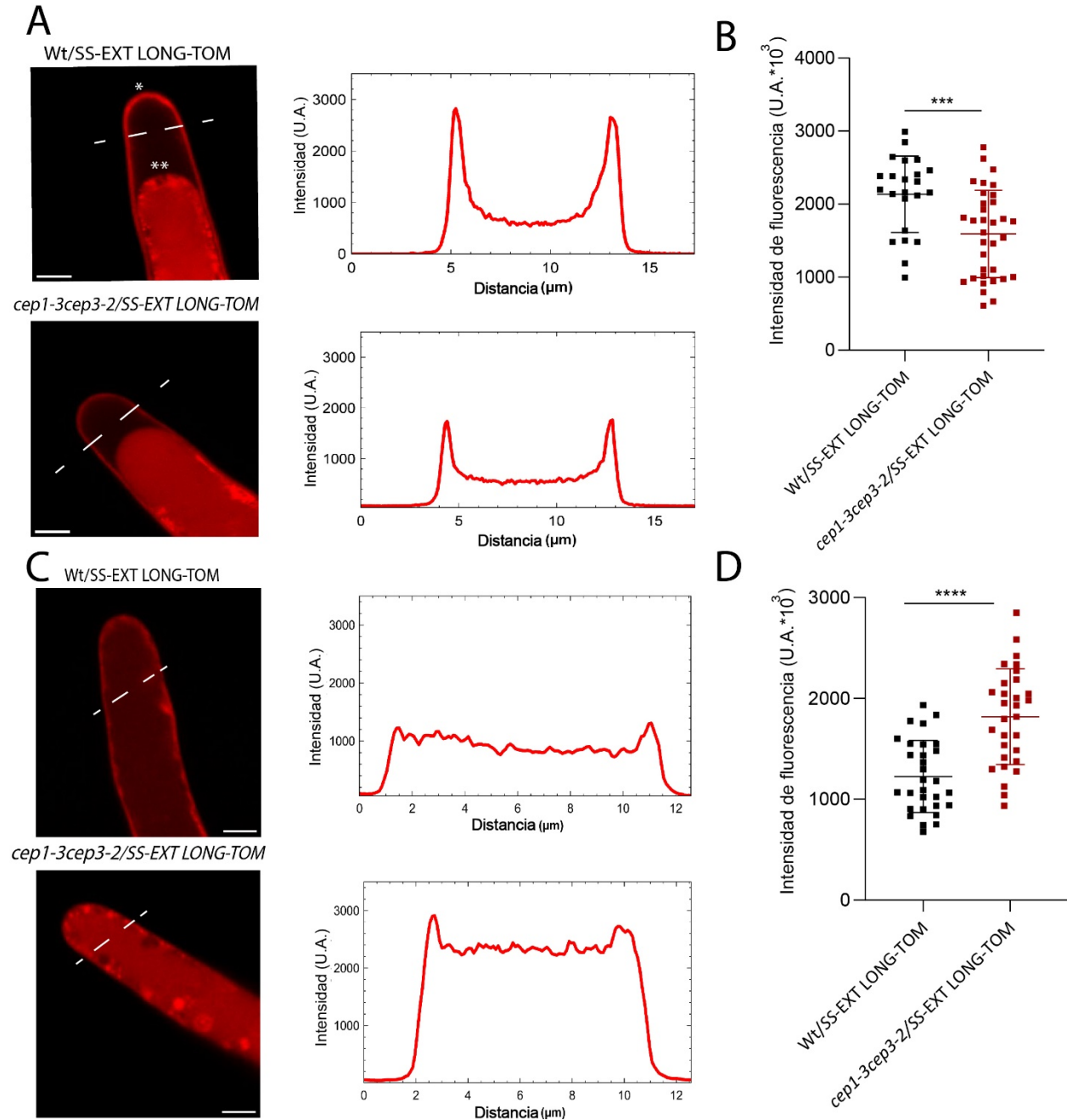


Figura 9. La secreción/insolubilización de EXT se ve afectada por AtCEP1-AtCEP3 en los pelos radiculares.

(A) Señal de SS-EXT LONG-TOM en la zona apical de PR en el doble mutante *cep1-3cep3-2*. Las células se plasmolizaron con una solución de manitol al 8%. (A la izquierda) Perfiles de intensidad a lo largo de la línea discontinua en el ápice de los PR. Barras de escala = 5 μ m (B) Cada punto en el gráfico es la señal derivada de un PR. Los datos

de UA de fluorescencia son la media \pm DS (n = 25-30 PR), prueba t, P < 0.05. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. **(C)** Señal de SS-EXT LONG-TOM en la zona apical de PR en el doble mutante *cep1-3cep3-2*. (A la izquierda) Perfiles de intensidad a lo largo de la línea discontinua en el ápice de los PR. Barras de escala = 5 μ m **(D)** Cada punto en el gráfico es la señal derivada de un PR. Los datos de UA de fluorescencia son la media \pm SD (n = 30), prueba t, P < 0.05. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas.

6. Estudio de la homeostasis de ROS en mutantes de CEPs

Dado que la insolubilización de EXTs en las paredes celulares de los PR en crecimiento está regulada por varios factores, incluida la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Marzol et al., 2022; Pacheco et al., 2022); decidimos estudiar si la disminución de la actividad de AtCEP y NAC1 podría afectar los niveles de ROS. Con este fin, se cuantificaron en el ápice de los PR los niveles de *cito*ROS y de *apo*ROS en las líneas mutantes *cep1-3cep3-2* y *nac1-2* respecto al Wt Col-0.

Para medir *cito*ROS se usó la sonda fluorescente permeable a la membrana plasmática Peroxy-Orange 1 (PO1) (Figura 10^a, panel de abajo). Esta sonda tiene como base boronato, el cual no es fluorescente en su forma reducida, pero se vuelve fluorescente cuando se oxida irreversiblemente por H₂O₂ (Dickinson et al., 2010). Los niveles de *apo*ROS se determinaron con el reactivo impermeable Amplex™ UltraRed (Mangano et al., 2016; Marzol et al., 2022; Pacheco et al., 2022) (Figura 10A, panel de arriba).

La doble mutante *cep1-3cep3-2* mostró niveles más altos de *apo*ROS en el ápice de los PR en comparación con Col-0, mientras que no se observaron diferencias para *nac1-2*. Los niveles de *cito*ROS fueron similares en ambos genotipos respecto al Wt. Esto indica que la homeostasis de ROS cambia en ausencia de CEP1 y CEP3, lo que también puede afectar la insolubilización de EXTs en las paredes celulares. En trabajos anteriores se detectaron cambios en la homeostasis de ROS apoplástico y citoplasmático en la zona apical de PR en plantas de *Arabidopsis* sobrepresantes de las peroxidasas apoplásticas tipo III PRX44/PRX73 y PRX62/PRX69, las cuales, se demostró que están relacionadas a las EXTs (Marzol et al., 2022; Pacheco et al., 2022). Esto puede implicar que existe una relación entre el estado adecuado de las EXT procesadas en la pared celular, la

homeostasis de ROS en la zona apical y el crecimiento equilibrado del pelo radicular como se planteó previamente en Mangano et al., 2018.

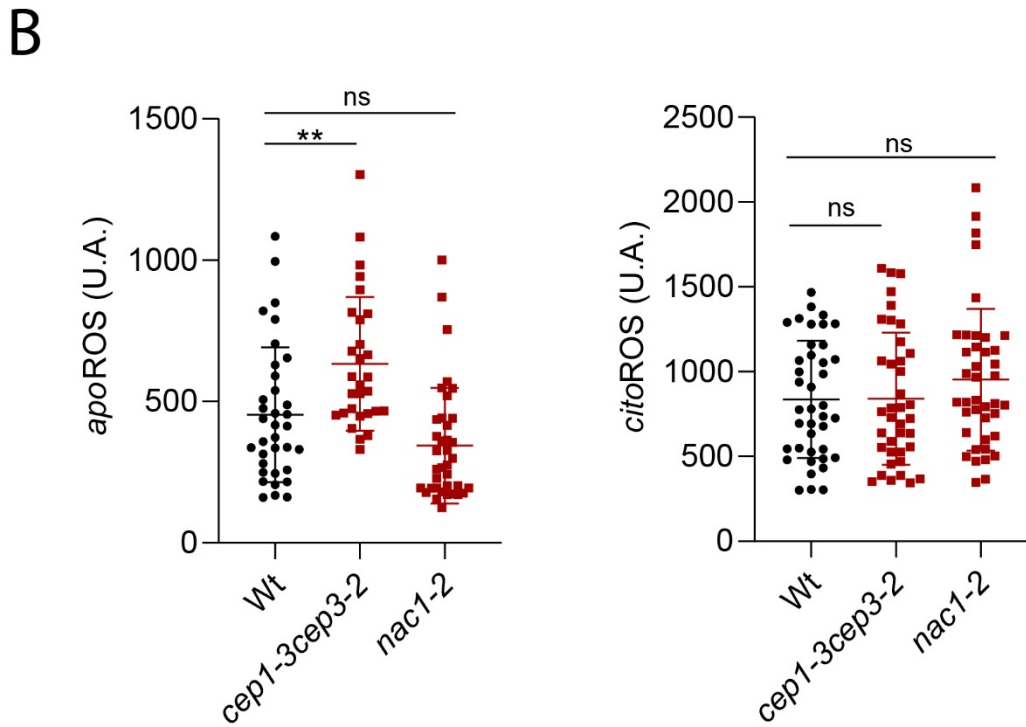
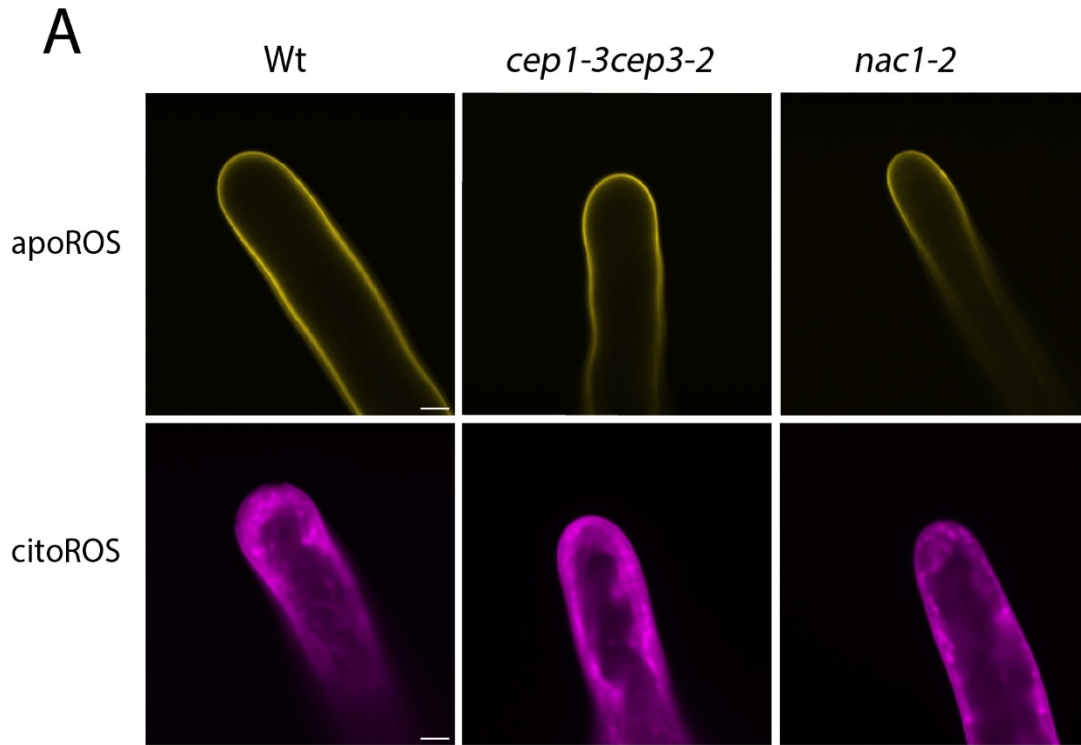


Figura 10. ROS apoplásticas se ven afectadas por AtCEP1-AtCEP3 en los pelos radiculares.

(A) Los niveles de citoROS se midieron utilizando la sonda fluorescente selectiva para peróxido de hidrógeno PO1, y los niveles de apoROS se midieron con Amplex UltraRed en las zonas apicales de los PR en Wt Col-0 y en el mutante doble *cep1-3cep3-2*. Barra de escala = 5 μm . (B) Cada punto en los gráficos representa la señal derivada de un PR. Los datos de UA de fluorescencia son el promedio \pm DS ($n = 35$ a 40 PR), prueba t , $P < 0.05$. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas. "ns" significa que no hay diferencias significativas.

7. Modelado por homología y acoplamiento (*docking*) molecular entre AtCEP1-AtCEP3 y EXTs

Finalmente, para probar si AtCEP1-AtCEP3 podría interactuar con EXT de cadena simple, realizamos un modelo de homología con una cisteína endopeptidasa de Ricino RcCysEP y una cisteína proteasa de *Ambrosia artemisiifolia* (pdb 1S4V y 5EF4 respectivamente) que se sabe que es capaz de escindir y procesar sustratos similares a EXT en condiciones *in vitro*. Las proteínas AtCEP1-AtCEP3 comparten una identidad de secuencia del 66 – 74 % con el *Ricinus communis* RcCysEP mejor caracterizado (Figura 11).

Mediante el análisis de acoplamiento (*docking*), obtuvimos energías de interacción (Kcal/mol) para las tres proteínas AtCEP y se compararon con RcCysEP 1SV4. Analizamos el acoplamiento con cuatro péptidos EXT cortos diferentes, desde péptido no hidroxilado hasta péptido completamente O-glicosilado (Velasquez et al., 2015; Marzol et al., 2022) (Figura 12). En estudios anteriores se demostró que mutantes que llevan EXT sub-O-glicosiladas tienen defectos graves en el crecimiento del PR (Velasquez et al., 2011; Velasquez et al., 2015). Nuestros resultados de acoplamiento para las tres AtCEP mostraron diferencias de energía de interacción consistentes que dependen del estado de glicosilación de EXT, siendo más altas para las especies no O-glicosiladas. En general, observamos energías de interacción más altas (valores negativos más altos) para las variantes de EXT no hidroxiladas que para las variantes EXT O-glicosiladas. Cuando comparamos las energías de interacción entre diferentes AtCEPs que interactúan con sustratos EXT, observamos que AtCEP1 y AtCEP3 mostraron la mayor actividad de interacción con las variantes de EXT no hidroxiladas (Figura 12). En general, esto probablemente indica que AtCEP1 y AtCEP3 podrían interactuar con sustratos EXT y posiblemente catalizar la proteólisis en regiones abiertas de los *backbones* de EXT con

poca o ninguna O-glicosilación, mientras que CEP2 podría preferir regiones O-glicosiladas. Esto concuerda con estudios previos que sugieren que los altos niveles de O-glicosilación en ciertas proteínas restringen físicamente su degradación o procesamiento (Cannon et al., 2008; Marzol et al., 2018).

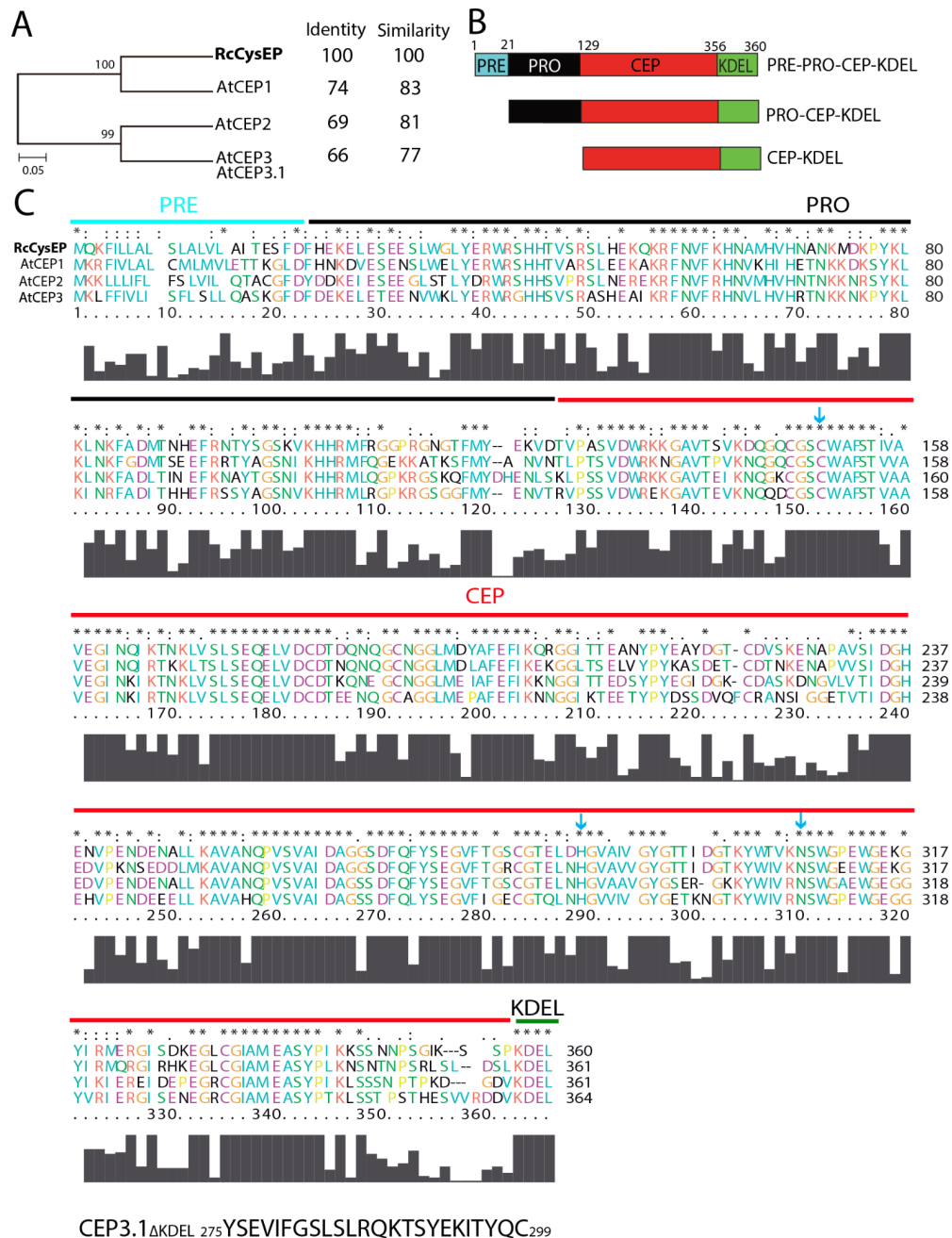


Figura 11. Alineación de proteínas y dominios de secuencias AtCEP1-AtCEP3 de *Arabidopsis thaliana* con *Ricinus* CEP 1SV4 (RcCysEP).

(A) Árbol filogenético de *Arabidopsis* AtCEPs y *Ricinus* AtCEPs. El análisis filogenético se realizó con MEGA6 (Tamura et al., 2007) utilizando el método de Máxima Similitud (Maximum Likelihood) (Saitou y Nei, 1987). Los números en los nodos indican los valores de arranque obtenidos para 1000 iteraciones. La escala representa la distancia evolutiva, expresada como el número de sustituciones por aminoácido. (B) Dominios de las proteasas AtCEPs. (C) Alineación de proteínas AtCEP1-AtCEP3 y *Ricinus* AtCEPs. Se indican los dominios PRE, PRO y KDEL (Rodríguez-García et al., 2023)

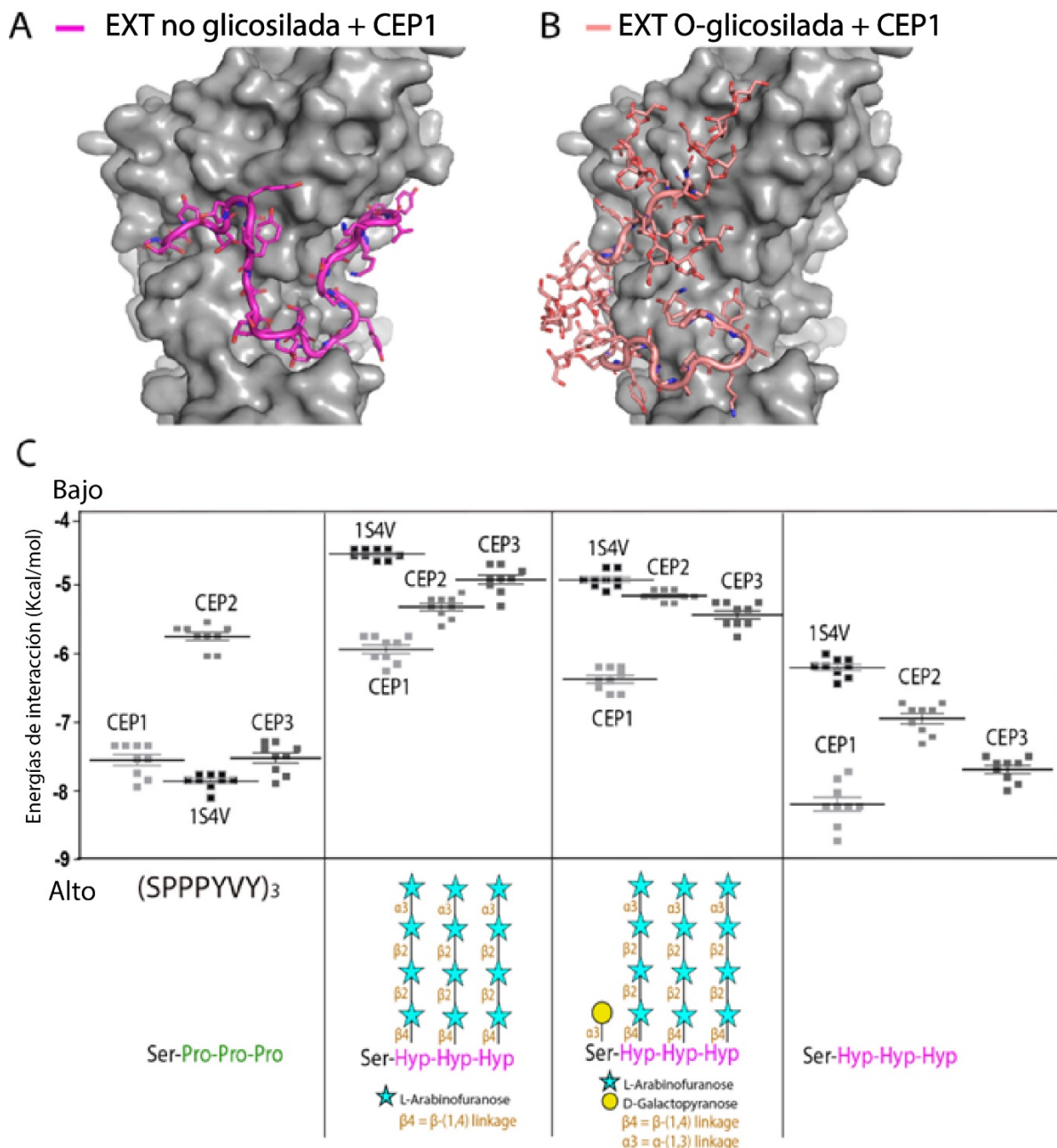


Figura 12. Interacción de las enzimas CEPs con péptidos de EXT, determinada mediante un ensayo de acoplamiento (*docking*) molecular *in silico*.

(A,B) Se muestran diez resultados de *docking* para cada estado de O-glicosilación de EXT superpuestos en la superficie de la proteína AtCEP1 para evaluar la consistencia de los sitios de acoplamiento. **(A)** Modelo de AtCEP1 (superficie de proteína mostrada en gris) acoplada con un sustrato EXT no O-glicosilado (SPPPYVY)₃ (en magenta). **(B)** Modelo de AtCEP1 (la superficie de la proteína se muestra en gris) acoplada con un sustrato O-glicosilado-EXT (la proteína y los O-glicanos se muestran en rojo claro). Péptido EXT arabino-galactosilado = [(S000YVY)₃-AG]. **(C)** Comparación de la energía de unión de diferentes AtCEP1-AtCEP3 y 1S4V (Ricinus AtCEP incluido como control) a sustratos EXT con diferentes grados de O-glicosilación. (de izquierda a derecha) Un péptido EXT no hidroxilado (SPPPYVY)₃, un péptido EXT hidroxilado pero no O-glicosilado [(S000YVY)₃; O = hidroxiprolina], solo se analizaron el péptido EXT arabinosilado [(S000YVY)₃-A] y el péptido EXT arabinogalactosilado [(S000YVY)₃-AG].

Conclusiones

Anteriormente se consideró que la regulación positiva de AtCEPs estaba relacionada con el procesamiento de EXT, ya que EXT promueve la cicatrización de heridas, y esto podría ser una barrera para que emerjan las puntas de raíces cuando estas se regeneran. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que NAC1-AtCEP antagoniza la cicatrización de heridas mediada por EXT, y esto permite la aparición de las puntas de las raíces regeneradas (Chen et al., 2016). Sin embargo, los resultados generales de nuestro estudio sugieren que NAC1 activa directamente la expresión de AtCEP1, AtCEP2 y AtCEP3, lo que a su vez reprime la expansión polarizada del PR en crecimiento. Mediante un análisis de colocalización con varios marcadores subcelulares, detectamos AtCEP2 en compartimentos derivados de RE pero no en el apoplasto. Según nuestros resultados, es plausible que AtCEP1-AtCEP3 puedan actuar juntos como componentes en el programa de control de calidad de EXT, controlando su procesamiento adecuado. Se desconoce cómo se coordina y controla la maquinaria de O-glicosilación requerida para un procesamiento adecuado de EXT y proteínas relacionadas con EXT en la vía secretora (Velasquez et al., 2012; Marzol et al., 2018).

Nuestros hallazgos proporcionan nuevas perspectivas para investigar funciones de AtCEPs en células que no están experimentando PCD pero que se caracterizan por la expansión o remodelación de la pared celular. La participación de proteasas en la remodelación de la pared indica la importancia del componente proteico de la pared celular en este proceso. Sería interesante investigar como ocurre la fusión de la membrana de los ricinosomas con la membrana plasmática durante el desarrollo de la raíz, similar a otras vesículas derivadas del RE. Recientemente, se descubrió que una enzima de procesamiento vacuolar (β VPE) controla la maduración de AtCEP1, transformando esta proproteasa en una proteasa madura. En los mutantes *vpe*, la maduración de AtCEP1 y otras proteasas se inhibió severamente (Cheng et al., 2020). Todavía no está claro si VPE también puede estar actuando en los tricoblastos para controlar el procesamiento de AtCEPs.

En nuestro trabajo encontramos que la regulación inadecuada del procesamiento de EXT por parte de las CEPs desencadena el crecimiento de los PR, en estudios anteriores se reportó que el aumento de la expresión de las peroxidasas apoplásticas tipo III PRX44/PRX73 (Marzol et al., 2022) y PRX62 (Pacheco et al., 2022) también desencadena un fenotipo de PR similar. Estas evidencias indican que los cambios sutiles en el procesamiento y el entrecruzamiento de EXT tienen un efecto directo en el crecimiento de los PR. Actualmente, uno de los principales obstáculos en el estudio de estas glicoproteínas complejas es visualizar los cambios químicos que ocurren en las EXTs (hidroxilación de prolina, O-glicosilación, oligomerización y *tyr-crosslinking*) mientras se sintetizan y se secretan a la pared celular en condiciones *in vivo*.

En términos generales, con la evidencia encontrada en nuestros resultados se puede concluir que:

- AtCEP1-CEP3 son proteasas que se expresan en PR y modulan negativamente el crecimiento de los mismos.
- La enzima CEP2 podría estar dirigida a la vía secretora, posiblemente a los compartimentos del RE, ya que no se detectó expresión en el apoplasto.
- El FT NAC1 regula negativamente el crecimiento polarizado de los PR.
- NAC1 regula directamente la expresión de AtCEP1-AtCEP3, lo que conlleva a una represión del crecimiento del PR.
- La homeostasis de apoROS se ve afectada cuando la actividad de las CEPs está disminuida.
- AtCEP1-AtCEP3 podrían estar actuando como componentes en el control de calidad de EXTs y proteínas relacionadas a EXTs en el sistema secretorio, lo cual influye en las propiedades de la red de EXTs en la pared celular del ápice de los PR en activo crecimiento.

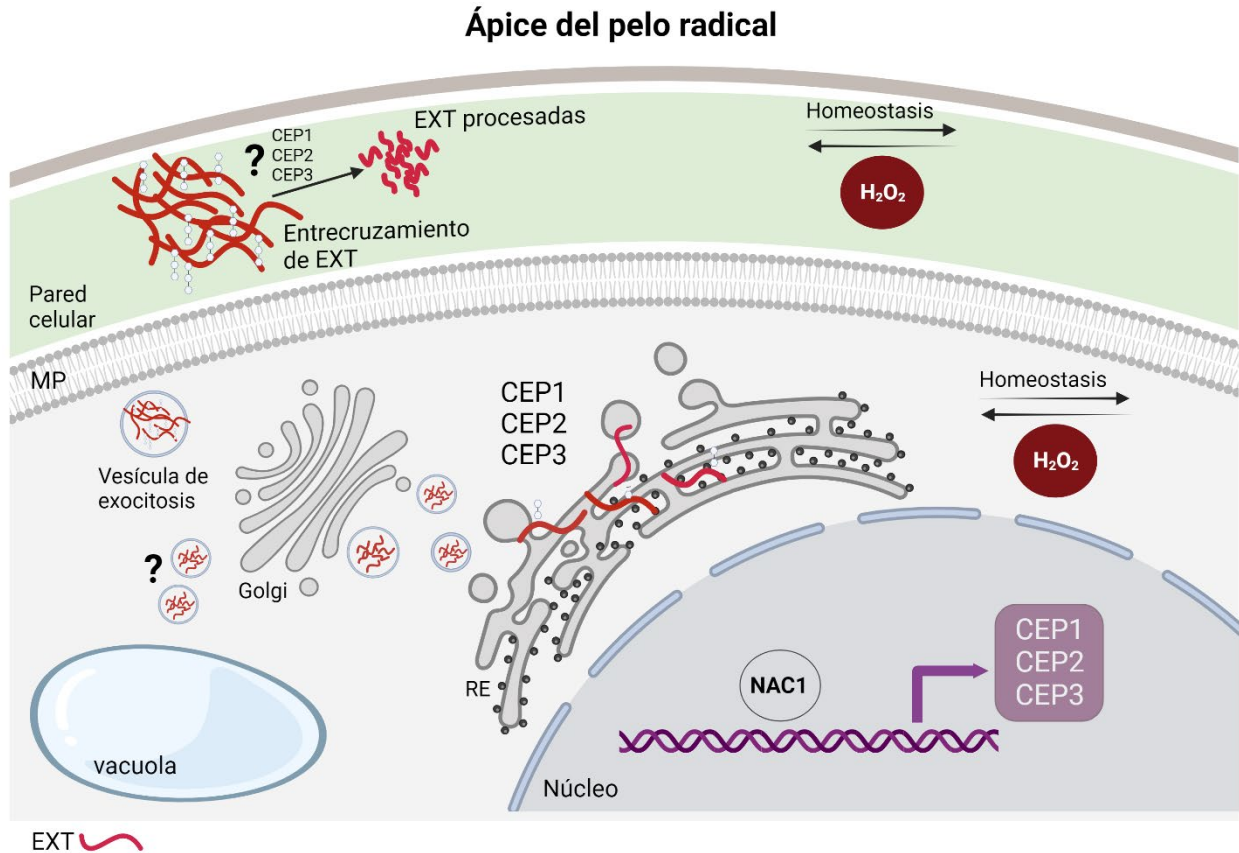


Figura 13. Modelo propuesto para explicar la función de las AtCEPs en el crecimiento polarizado del pelo radical

La expresión de AtCEPs está regulada positivamente por el FT NAC1. CEP2 podría clivar EXTs en el sistema secretorio (RE) donde estaría ejerciendo un control de calidad de la O-glicosilación y el plegamiento de EXTs. Se sabe que CEP1 y CEP2 se expresan en estructuras redondeadas semejante a ricinosoma. La actividad de las CEPs es importante para que se mantenga la homeostasis de ROS en la pared celular. Las AtCEPs podrían estar involucradas en la degradación de EXTs en la pared celular en otras condiciones diferentes a las estudiadas. M.P: membrana plasmática, RE: retículo endoplasmático.

Perspectivas futuras

Investigar qué sucede con el crecimiento polarizado de los PR en líneas sobreexpresantes de CEPs y en la triple mutante y si cuando se afecta la actividad de NAC1 esto influye en la insolubilización de las EXTs en la pared celular.

Evaluar si las CEPs pueden dimerizar, si pueden reconocer otras HRGPs o son específicas de EXTs y si las CEPs procesan EXTs mal glicosiladas.

Referencias Bibliográficas

- Aaron JS, Taylor AB, Chew T-L** (2018) Image co-localization – co-occurrence versus correlation. *Journal of Cell Science* **131**: jcs211847
- Abrash EB, Bergmann DC** (2009) Asymmetric cell divisions: a view from plant development. *Dev Cell* **16**: 783–796
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell* **9**: 841–857
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657
- Anderson CT** (2019) Pectic Polysaccharides in Plants: Structure, Biosynthesis, Functions, and Applications. *In* E Cohen, H Merzendorfer, eds, *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices*. Springer International Publishing, Cham, pp 487–514
- Anderson CT, Kieber JJ** (2020) Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. *Annual Review of Plant Biology* **71**: 39–69
- Ariel F, Lucero L, Christ A, Mammarella MF, Jegu T, Veluchamy A, Mariappan K, Latrasse D, Blein T, Liu C, et al** (2020) R-Loop Mediated trans Action of the APOLO Long Noncoding RNA. *Molecular Cell* **77**: 1055-1065.e4
- Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS** (2014) Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* **20**: 1427–1435
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D** (2013) Evolving views of pectin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 747–779
- Balcerowicz D, Schoenaers S, Vissenberg K** (2015) Cell Fate Determination and the Switch from Diffuse Growth to Planar Polarity in *Arabidopsis* Root Epidermal Cells. *Front Plant Sci* **6**: 1163
- Baskin TI** (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 203–222

- Battistella C, Guiet R, Burri O, Seitz A, Escrig S, Knott GW, Meibom A, Klok H-A** (2019) Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Poly(N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide). *Biomacromolecules* **20**: 231–242
- Baumberger N, Ringli C, Keller B** (2001) The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **15**: 1128–1139
- Baumberger N, Steiner M, Ryser U, Keller B, Ringli C** (2003) Synergistic interaction of the two paralogous *Arabidopsis* genes LRX1 and LRX2 in cell wall formation during root hair development. *Plant J* **35**: 71–81
- Becker C, Senyuk VI, Shutov AD, Nong VH, Fischer J, Horstmann C, Müntz K** (1997) Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization. *Eur J Biochem* **248**: 304–312
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C** (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol* **44**: 399–415
- Berger F, Linstead P, Dolan L, Haseloff J** (1998) Stomata Patterning on the Hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* Controlled by Genes Involved in the Control of Root Epidermis Patterning. *Developmental Biology* **194**: 226–234
- Bernhardt C, Tierney ML** (2000) Expression of AtPRP3, a Proline-Rich Structural Cell Wall Protein from *Arabidopsis*, Is Regulated by Cell-Type-Specific Developmental Pathways Involved in Root Hair Formation¹. *Plant Physiology* **122**: 705–714
- Beuder S, Dorchak A, Bhide A, Moeller SR, Petersen BL, MacAlister CA** (2020) Exocyst mutants suppress pollen tube growth and cell wall structural defects of hydroxyproline O-arabinosyltransferase mutants. *The Plant Journal* **103**: 1399–1419
- Bolte S, Cordelières FP** (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* **224**: 213–232
- Borassi C, Sede AR, Mecchia MA, Salter JDS, Marzol E, Muschiatti JP, Estevez JM** (2016) An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *Journal of Experimental Botany* **67**: 477–487
- Brady JD, Sadler IH, Fry SC** (1996) Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *Biochem J* **315**: 323–327

- Brady JD, Sadler IH, Fry SC** (1998) Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: Its role in cross-link formation. *Phytochemistry* **47**: 349–353
- Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, et al** (2011) Increased ER–mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *Journal of Cell Science* **124**: 2143–2152
- Bucher M, Brunner S, Zimmermann P, Zardi GI, Amrhein N, Willmitzer L, Riesmeier JW** (2002) The Expression of an Extensin-Like Protein Correlates with Cellular Tip Growth in Tomato. *Plant Physiology* **128**: 911–923
- Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lamport DTA, Chen Y, Kieliszewski MJ** (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 2226–2231
- Chen X, Cheng J, Chen L, Zhang G, Huang H, Zhang Y, Xu L** (2016) Auxin-Independent NAC Pathway Acts in Response to Explant-Specific Wounding and Promotes Root Tip Emergence during de Novo Root Organogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **170**: 2136–2145
- Cheng Z, Guo X, Zhang J, Liu Y, Wang B, Li H, Lu H** (2020) β VPE is involved in tapetal degradation and pollen development by activating proprotease maturation in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **71**: 1943–1955
- Cole RA, Synek L, Zarsky V, Fowler JE** (2005) SEC8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiol* **138**: 2005–2018
- Cooper JB, Chen JA, Gerrit-Jan van H, Varner JE** (1987) Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. *Trends in Biochemical Sciences* **12**: 24–27
- Cooper JB, Varner JE** (1984) Cross-Linking of Soluble Extensin in Isolated Cell Walls. *Plant Physiol* **76**: 414–417
- Datta S, Prescott H, Dolan L** (2015) Intensity of a pulse of RSL4 transcription factor synthesis determines Arabidopsis root hair cell size. *Nature Plants* **1**: 1–6
- Dickinson BC, Huynh C, Chang CJ** (2010) A Palette of Fluorescent Probes with Varying Emission Colors for Imaging Hydrogen Peroxide Signaling in Living Cells. *J Am Chem Soc* **132**: 5906–5915

- Dolan L, Costa S** (2001) Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *Journal of Experimental Botany* **52**: 413–417
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84
- Epstein L, Lamport DTA** (1984) An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin. *Phytochemistry* **23**: 1241–1246
- Ernst HA, Nina Olsen A, Skriver K, Larsen S, Lo Leggio L** (2004) Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* **5**: 297–303
- Falhof J, Pedersen JT, Fuglsang AT, Palmgren M** (2016) Plasma Membrane H(+)-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Mol Plant* **9**: 323–337
- Forde B, Lorenzo H** (2001) The nutritional control of root development. *Plant and Soil* **232**: 51–68
- Fry SC** (1982) Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochemical Journal* **204**: 449–455
- Goodrich J** (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. D. WEIGEL & J. GLAZEBROOK. Genetics Research - GENET RES. doi: 10.1017/S0016672302215852
- Grebe M, Xu J, Möbius W, Ueda T, Nakano A, Geuze HJ, Rook MB, Scheres B** (2003) *Arabidopsis* Sterol Endocytosis Involves Actin-Mediated Trafficking via ARA6-Positive Early Endosomes. *Current Biology* **13**: 1378–1387
- Greenwood JS, Helm M, Gietl C** (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 2238–2243
- Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J** (2014) Root Hairs. *The Arabidopsis Book* **12**: e0172
- Guzzardi P, Genot G, Jamet E** (2004) The *Nicotiana sylvestris* extensin gene, Ext 1.2A, is expressed in the root transition zone and upon wounding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1680**: 83–92

- Hammerschmidt R, Lamport DTA, Muldoon EP** (1984) Cell wall hydroxyproline enhancement and lignin deposition as an early event in the resistance of cucumber to *Cladosporium cucumerinum*. *Physiological Plant Pathology* **24**: 43–47
- Hawes C, Saint-Jore C, Martin B, Zheng H-Q** (2001) ER confirmed as the location of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP! *Trends in Plant Science* **6**: 245–246
- He X, Kermode AR** (2003) Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Mol Biol* **52**: 729–744
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, Whitwill S, Lydiate D** (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol Biol* **53**: 383–397
- Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E, Kieliszewski MJ** (2004) Di-isodityrosine Is the Intermolecular Cross-link of Isodityrosine-rich Extensin Analogs Cross-linked in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 55474–55482
- Helm M, Schmid M, Hierl G, Terneus K, Tan L, Lottspeich F, Kieliszewski MJ, Gietl C** (2008) KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds. *American Journal of Botany* **95**: 1049–1062
- Hierl G, Höwing T, Isono E, Lottspeich F, Gietl C** (2014) Ex vivo processing for maturation of *Arabidopsis* KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (*AtCEP2*) proenzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant Molecular Biology* **84**: 605–620
- Hierl G, Vothknecht U, Gietl C** (2012) Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: the function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiologia Plantarum* **145**: 103–113
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, Ohme-Takagi M** (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**: 733–739
- Hoffmann N, King S, Samuels AL, McFarlane HE** (2021) Subcellular coordination of plant cell wall synthesis. *Developmental Cell* **56**: 933–948

- van Holst G-J, Varner JE** (1984) Reinforced Polyproline II Conformation in a Hydroxyproline-Rich Cell Wall Glycoprotein from Carrot Root 1. *Plant Physiology* **74**: 247–251
- Höwing T, Dann M, Müller B, Helm M, Scholz S, Schneitz K, Hammes UZ, Gietl C** (2018) The role of KDEL-tailed cysteine endopeptidases of Arabidopsis (AtCEP2 and AtCEP1) in root development. *PLOS ONE* **13**: e0209407
- Höwing T, Huesmann C, Hoefle C, Nagel M-K, Isono E, Hückelhoven R, Gietl C** (2014) Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (AtCEP1) is involved in pathogen defense. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00058
- Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amâncio SBQ, Ricardo CPP** (2001) Rapid Deposition of Extensin during the Elicitation of Grapevine Callus Cultures Is Specifically Catalyzed by a 40-Kilodalton Peroxidase. *Plant Physiology* **127**: 1065–1076
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG** (1994) Isolation of the Tomato Cf-9 Gene for Resistance to *Cladosporium fulvum* by Transposon Tagging. *Science* **266**: 789–793
- Jones MA, Raymond MJ, Yang Z, Smirnoff N** (2007) NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot* **58**: 1261–1270
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193–195
- Ketelaar T, Faivre-Moskalenko C, Esseling JJ, de Ruijter NCA, Grierson CS, Dogterom M, Emons AMC** (2002) Positioning of Nuclei in Arabidopsis Root Hairs. *Plant Cell* **14**: 2941–2955
- Ketelaar T, Galway ME, Mulder BM, Emons AMC** (2008) Rates of exocytosis and endocytosis in Arabidopsis root hairs and pollen tubes. *J Microsc* **231**: 265–273
- Kieliszewski MJ** (2001) The latest hype on Hyp-O-glycosylation codes. *Phytochemistry* **57**: 319–323
- Kikuchi K, Ueguchi-Tanaka M, Yoshida KT, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano HY** (2000) Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Mol Gen Genet* **262**: 1047–1051

- Lamport DTA** (1967) Hydroxyproline-O-glycosidic Linkage of the Plant Cell Wall Glycoprotein Extensin. *Nature* **216**: 1322–1324
- Lamport DTA, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC** (2011) Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol* **156**: 11–19
- Lin C-Y, Huang L-Y, Chi W-C, Huang T-L, Kakimoto T, Tsai C-R, Huang H-J** (2015) Pathways involved in vanadate-induced root hair formation in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* **153**: 137–148
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 280–287
- MacAlister CA, Ortiz-Ramírez C, Becker JD, Feijó JA, Lippman ZB** (2016) Hydroxyproline O-arabinylosyltransferase mutants oppositely alter tip growth in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **85**: 193–208
- Maher KA, Bajic M, Kajala K, Reynoso M, Pauluzzi G, West DA, Zumstein K, Woodhouse M, Bubb K, Dorrity MW, et al** (2018) Profiling of Accessible Chromatin Regions across Multiple Plant Species and Cell Types Reveals Common Gene Regulatory Principles and New Control Modules. *The Plant Cell* **30**: 15–36
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA** (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* **169**: 375–382
- Mangano S, Denita-Juarez SP, Choi H-S, Marzol E, Hwang Y, Ranocha P, Velasquez SM, Borassi C, Barberini ML, Aptekmann AA, et al** (2017) Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: 5289–5294
- Mangano S, Juárez SPD, Estevez JM** (2016) ROS Regulation of Polar Growth in Plant Cells1[OPEN]. *Plant Physiol* **171**: 1593–1605
- Mangano S, Martínez Pacheco J, Marino-Buslje C, Estevez JM** (2018) How Does pH Fit in with Oscillating Polar Growth? *Trends in Plant Science* **23**: 479–489
- Marzol E, Borassi C, Bringas M, Sede A, Rodríguez Garcia DR, Capece L, Estevez JM** (2018) Filling the Gaps to Solve the Extensin Puzzle. *Molecular Plant* **11**: 645–658

- Marzol E, Borassi C, Carignani Sardoy M, Ranocha P, Aptekmann AA, Bringas M, Pennington J, Paez-Valencia J, Martínez Pacheco J, Rodríguez-García DR, et al** (2022) Class III Peroxidases PRX01, PRX44, and PRX73 Control Root Hair Growth in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 5375
- Matsui K, Tanaka H, Ohme-Takagi M** (2004) Suppression of the biosynthesis of proanthocyanidin in *Arabidopsis* by a chimeric PAP1 repressor. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 487–493
- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2002) An Endoplasmic Reticulum-Derived Structure That Is Induced under Stress Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**: 1807–1814
- Mecchia MA, Santos-Fernandez G, Duss NN, Somoza SC, Boisson-Dernier A, Gagliardini V, Martínez-Bernardini A, Fabrice TN, Ringli C, Muschietti JP, et al** (2017) RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Science* **358**: 1600–1603
- van de Meene AML, Doblin MS, Bacic A** (2017) The plant secretory pathway seen through the lens of the cell wall. *Protoplasma* **254**: 75–94
- Miguel MA, Postma JA, Lynch JP** (2015) Phene Synergism between Root Hair Length and Basal Root Growth Angle for Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology* **167**: 1430–1439
- Mishler-Elmore JW, Zhou Y, Sukul A, Oblak M, Tan L, Faik A, Held MA** (2021) Extensins: Self-Assembly, Crosslinking, and the Role of Peroxidases. *Frontiers in Plant Science* **12**:
- Molendijk AJ, Bischoff F, Rajendrakumar CSV, Friml J, Braun M, Gilroy S, Palme K** (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J* **20**: 2779–2788
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S** (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20996–21001
- Monshausen GB, Messerli MA, Gilroy S** (2008) Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **147**: 1690–1698

- Morris EC, Griffiths M, Golebiowska A, Mairhofer S, Burr-Hersey J, Goh T, von Wangenheim D, Atkinson B, Sturrock CJ, Lynch JP, et al** (2017) Shaping 3D Root System Architecture. *Current Biology* **27**: R919–R930
- Moussu S, Ingram G** (2023) The EXTENSIN enigma. *The Cell Surface* **9**: 100094
- Munro S** (1998) Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* **8**: 11–15
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**: 34–41
- Ndinyanka Fabrice T, Kaech A, Barmettler G, Eichenberger C, Knox JP, Grossniklaus U, Ringli C** (2017) Efficient preparation of Arabidopsis pollen tubes for ultrastructural analysis using chemical and cryo-fixation. *BMC Plant Biol* **17**: 176
- Niu Y, Chai R, Liu L, Jin G, Liu M, Tang C, Zhang Y** (2014) Magnesium availability regulates the development of root hairs in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ* **37**: 2795–2813
- Okamoto T, Shimada T, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Minamikawa T** (2003) C-Terminal KDEL Sequence of A KDEL-Tailed Cysteine Proteinase (Sulfhydryl-Endopeptidase) Is Involved in Formation of KDEL Vesicle and in Efficient Vacuolar Transport of Sulfhydryl-Endopeptidase. *Plant Physiology* **132**: 1892–1900
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K** (2005a) DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science* **169**: 785–797
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K** (2005b) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* **10**: 79–87
- Olvera-Carrillo Y, Van Bel M, Van Hautegeem T, Fendrych M, Huysmans M, Simaskova M, van Durme M, Buscaill P, Rivas S, S. Coll N, et al** (2015) A Conserved Core of Programmed Cell Death Indicator Genes Discriminates Developmentally and Environmentally Induced Programmed Cell Death in Plants. *Plant Physiology* **169**: 2684–2699
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, et al** (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **10**: 239–247

- Pacheco JM, Ranocha P, Kasulin L, Fusari CM, Servi L, Aptekmann AA, Gabarain VB, Peralta JM, Borassi C, Marzol E, et al** (2022) Apoplastic class III peroxidases PRX62 and PRX69 promote Arabidopsis root hair growth at low temperature. *Nat Commun* **13**: 1310
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L** (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36
- Price NJ, Pinheiro C, Soares CM, Ashford DA, Ricardo CP, Jackson PA** (2003) A Biochemical and Molecular Characterization of LEP1, an Extensin Peroxidase from Lupin. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 41389–41399
- Ringli C** (2010) The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the Arabidopsis LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall. *Plant J* **63**: 662–669
- Rodríguez-García DR, Rondón Guerrero Y del C, Ferrero L, Rossi AH, Miglietta EA, Aptekmann AA, Marzol E, Martínez Pacheco J, Carignani M, Berdion Gabarain V, et al** (2023) Transcription factor NAC1 activates expression of peptidase-encoding AtCEPs in roots to limit root hair growth. *Plant Physiology* kiad533
- Saito F, Suyama A, Oka T, Yoko-o T, Matsuoka K, Jigami Y, Shimma Y** (2014) Identification of Novel Peptidyl Serine α -Galactosyltransferase Gene Family in Plants * \diamond . *Journal of Biological Chemistry* **289**: 20405–20420
- Šali A, Blundell TL** (1993) Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology* **234**: 779–815
- Schmid M, Simpson D, Gietl C** (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14159–14164
- Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C** (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* **206**: 466–475

- Schmid M, Simpson DJ, Sarioglu H, Lottspeich F, Gietl C** (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5353–5358
- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport DTA** (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *The Plant Journal* **9**: 477–489
- Schoenaers S, Balcerowicz D, Vissenberg K** (2017) Molecular Mechanisms Regulating Root Hair Tip Growth: A Comparison with Pollen Tubes. *In* G Obermeyer, J Feijó, eds, *Pollen Tip Growth*. Springer International Publishing, Cham, pp 167–243
- Sede AR, Borassi C, Wengier DL, Mecchia MA, Estevez JM, Muschietti JP** (2018) Arabidopsis pollen extensins LRX are required for cell wall integrity during pollen tube growth. *FEBS Lett* **592**: 233–243
- Senatore A, Trobacher CP, Greenwood JS** (2009) Ricinosomes Predict Programmed Cell Death Leading to Anther Dehiscence in Tomato. *Plant Physiology* **149**: 775–790
- Showalter AM, Basu D** (2016) Extensin and Arabinogalactan-Protein Biosynthesis: Glycosyltransferases, Research Challenges, and Biosensors. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Showalter AM, Bell JN, Cramer CL, Bailey JA, Varner JE, Lamb CJ** (1985) Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**: 6551–6555
- Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR** (2010) A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiology* **153**: 485–513
- Shpak E, Barbar E, Leykam JF, Kieliszewski MJ** (2001) Contiguous Hydroxyproline Residues Direct Hydroxyproline Arabinosylation in *Nicotiana tabacum* *. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 11272–11278
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, et al** (2004) Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* **306**: 2206–2211

- Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Söldner R** (2012) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol* **14**: 640–648
- Stafstrom JP, Staehelin LA** (1986) The Role of Carbohydrate in Maintaining Extensin in an Extended Conformation 1. *Plant Physiol* **81**: 242–246
- Strasser R** (2016) Plant protein glycosylation. *Glycobiology* **26**: 926–939
- Su W, Liu Y, Xia Y, Hong Z, Li J** (2011) Conserved endoplasmic reticulum-associated degradation system to eliminate mutated receptor-like kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 870–875
- Su W, Liu Y, Xia Y, Hong Z, Li J** (2012) The Arabidopsis Homolog of the Mammalian OS-9 Protein Plays a Key Role in the Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Misfolded Receptor-Like Kinases. *Mol Plant* **5**: 929–940
- Synek L, Schlager N, Eliás M, Quentin M, Hauser M-T, Zárský V** (2006) AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant J* **48**: 54–72
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L** (2008) Local Positive Feedback Regulation Determines Cell Shape in Root Hair Cells. *Science* **319**: 1241–1244
- Takemoto D, Jones DA, Hardham AR** (2003) GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of Arabidopsis by oomycete pathogens. *The Plant Journal* **33**: 775–792
- Tanaka T, Yamauchi D, Minamikawa T** (1991) Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits. *Plant Mol Biol* **16**: 1083–1084
- TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P** (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 6483–6494
- Than ME, Helm M, Simpson DJ, Lottspeich F, Huber R, Gietl C** (2004) The 2.0Å Crystal Structure and Substrate Specificity of the KDEL-tailed Cysteine Endopeptidase Functioning in Programmed Cell Death of *Ricinus communis* Endosperm. *Journal of Molecular Biology* **336**: 1103–1116
- Tierney ML, Varner JE** (1987) The Extensins. *Plant Physiol* **84**: 1–2

- Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T** (2000) Mass Transport of Proform of a Kdel-Tailed Cysteine Proteinase (Sh-EP) to Protein Storage Vacuoles by Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicle Is Involved in Protein Mobilization in Germinating Seeds. *Journal of Cell Biology* **148**: 453–464
- Trobacher CP, Senatore A, Holley C, Greenwood JS** (2013) Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta* **237**: 665–679
- Trott O, Olson AJ** (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **31**: 455–461
- Velasquez M, Salter JS, Dorosz JG, Petersen BL, Estevez JM** (2012) Recent Advances on the Posttranslational Modifications of EXTs and Their Roles in Plant Cell Walls. *Frontiers in Plant Science* **3**: 93
- Velasquez SM, Marzol E, Borassi C, Pol-Fachin L, Ricardi MM, Mangano S, Juarez SPD, Salter JDS, Dorosz JG, Marcus SE, et al** (2015) Low Sugar Is Not Always Good: Impact of Specific O -Glycan Defects on Tip Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **168**: 808–813
- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, et al** (2011) O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science* **332**: 1401–1403
- Vissenberg K, Claeijs N, Balcerowicz D, Schoenaers S** (2020) Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **71**: 2412–2427
- Wang X, Wang K, Yin G, Liu X, Liu M, Cao N, Duan Y, Gao H, Wang W, Ge W, et al** (2018) Pollen-Expressed Leucine-Rich Repeat Extensins Are Essential for Pollen Germination and Growth1[OPEN]. *Plant Physiol* **176**: 1993–2006
- Wee EG, Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P** (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* **10**: 1759–1768
- Wen T-J, Hochholdinger F, Sauer M, Bruce W, Schnable PS** (2005) The roothairless1 gene of maize encodes a homolog of sec3, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol* **138**: 1637–1643
- Wolf S** (2022) Cell Wall Signaling in Plant Development and Defense. *Annu Rev Plant Biol* **73**: 323–353

- Wu J, Kurten EL, Monshausen G, Hummel GM, Gilroy S, Baldwin IT** (2007) NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. *The Plant Journal* **52**: 877–890
- Wymer CL, Bibikova TN, Gilroy S** (1997) Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **12**: 427–439
- Xie C, Ding Z** (2022) NAC1 Maintains Root Meristem Activity by Repressing the Transcription of E2Fa in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci* **23**: 12258
- Xie C, Li C, Wang F, Zhang F, Liu J, Wang J, Zhang X, Kong X, Ding Z** (2023) NAC1 regulates root ground tissue maturation by coordinating with the SCR/SHR-CYCD6;1 module in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **16**: 709–725
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**: 3024–3036
- Yi K, Menand B, Bell E, Dolan L** (2010) A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet* **42**: 264–267
- Zhang D, Liu D, Lv X, Wang Y, Xun Z, Liu Z, Li F, Lu H** (2014) The Cysteine Protease CEP1, a Key Executor Involved in Tapetal Programmed Cell Death, Regulates Pollen Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**: 2939–2961
- Zhang X, Bian A, Li T, Ren L, Li L, Su Y, Zhang Q** (2022) ROS and calcium oscillations are required for polarized root hair growth. *Plant Signal Behav* **17**: 2106410
- Zhang Y, Yang Z, Zhang Z, Li Y, Guo J, Liu L, Wang C, Fan H, Wang B, Han G** (2023) Root Hair Development and Adaptation to Abiotic Stress. *J Agric Food Chem* **71**: 9573–9598
- Zhou L-Z, Höwing T, Müller B, Hammes UZ, Gietl C, Dresselhaus T** (2016) Expression analysis of KDE1-CysEPs programmed cell death markers during reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Reprod* **29**: 265–272
- Zuo J, Niu Q-W, Chua N-H** (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal* **24**: 265–273