



Identificación, biogénesis y función de *Dominios ER-HMGR* de retículo endoplasmático en *Arabidopsis thaliana*

Ricardo Enrique Grados Torrez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Identificación, biogénesis y función de
***Dominios ER-HMGR* de retículo endoplasmático**
en *Arabidopsis thaliana*

Ricardo Enrique Grados Torrez

Barcelona, 2014

Universidad de Barcelona, Facultad de Biología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de Doctorado de Biotecnología



Identificación, biogénesis y función de
Dominios ER-HMGR de retículo endoplasmático
en *Arabidopsis thaliana*

Memoria presentada por

Ricardo Enrique Grados Torrez

para optar al grado de

Doctor otorgado por la Universidad de Barcelona

Este trabajo fue realizado en el Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)

Los directores de tesis

El autor

Dr. Narciso Campos Martínez Dr. Joan Carles Ferrer Artigas Ricardo E. Grados Torrez

A mis padres y a mi hermana...
por todo su apoyo y por el tiempo que les debo...

“Existen empresas en las cuales el verdadero método lo constituye un cierto y cuidadoso desorden”

“La locura humana es a menudo una cosa astuta y felina. Cuando se piensa que ha huido, quizá no ha hecho sino transfigurarse en alguna forma silenciosa y más sutil”

Herman Melville

AGRADECIMIENTOS

Este agradecimiento va dirigido para todas las personas que de alguna forma u otra, han contribuido con la realización de esta tesis. Un agradecimiento especial al Dr. Narciso Campos por el gran apoyo y enorme implicación en este trabajo, el cual merece todo mi reconocimiento. De igual forma para el Dr. Joan Carles Ferrer por sus consejos y por haber confiado desde un inicio en mi labor y en mis capacidades. A la Dra. Carmen Lopez y a Montse Amenós por el valioso soporte técnico y experiencia brindados que fueron de mucha utilidad a la hora de llevar a cabo las metas propuestas. Al Dr. Francesc Canals por la importante contribución que permitió profundizar en este estudio abriendo puertas hacia futuras investigaciones. Por ultimo al programa de becas MAEC-AECID que hizo posible que formara parte de este trabajo y de su culminación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL CoA REDUCTASA (HMGR).....	3
1.1 Aspectos generales.....	3
1.2 Diversidad génica y especialización funcional en plantas.....	6
1.2.1 Isoformas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.3 Estructura y topología de la HMGR en la membrana.....	11
1.3.1 HMGR en plantas.....	14
1.4 Localización subcelular de HMGR en <i>A. thaliana</i>	16
1.5 Control de la localización subcelular en plantas.....	19
1.5.1 Región NT citosólica.....	19
1.5.2 PP2A.....	21
1.5.3 Región 1L-Extra.....	24
1.6 Regulación de la actividad de HMGR.....	26
2. ORGANIZACIÓN Y MORFOGÉNESIS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	31
2.1 Papel de HMGR en la biogénesis de membranas reticulares.....	31
2.2 Diversidad estructural y funcional del retículo endoplasmático en plantas.....	36
2.3 <i>ER bodies</i>	37
2.3.1 Función.....	37
2.3.2 Componentes.....	43
2.3.3 Biogénesis.....	48

OBJETIVOS

OBJETIVOS.....	53
----------------	----

RESULTADOS

1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	57
1.1 Líneas transgénicas 1S:GFP de <i>A. thaliana</i>	57
1.2 Mutantes <i>hmg1</i> de <i>A. thaliana</i>	64
1.3 Líneas transgénicas 1S:GFPm en fondo mutante <i>hmg1-3</i>	68
2. LA 1S:GFP ALTERA LA MORFOLOGÍA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN PLANTAS.....	73
2.1 Expresión transitoria en hoja de <i>N. benthamiana</i>	73

2.1.1 Organización general del retículo endoplasmático.....	73
2.1.2 Ultraestructura de los agregados de retículo endoplasmático 1S:GFP (<i>ER-1S:GFP</i>).....	77
2.1.3 Efecto de la GFP.....	80
2.1.4 Efecto de la región N-terminal de HMGR1.....	83
2.2 Transformación estable de 1S:GFP en plantas de <i>A. thaliana</i>	85
2.2.1 Alteración del retículo endoplasmático en distintos tipos celulares.....	85
2.2.2 Identificación del <i>dominio ER-HMGR</i>	90
2.2.3 Efecto del silenciamiento de 1S:GFP.....	96
3. CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS DE HMGR Y ER BODIES EN <i>A. Thaliana</i>	98
3.1 Identidad de las <i>vesículas de HMGR</i>	98
3.2 Análisis de los <i>ER bodies</i>	104
3.2.1 Ultraestructura.....	104
3.2.2 Distribución en la planta.....	108
3.2.3 Inmunocitoquímica.....	111
3.3 Coincidencia física y funcional entre <i>vesículas de HMGR</i> y <i>ER bodies</i>	122
4. VERTIDO VACUOLAR DE DOMINIOS <i>ER-HMGR</i> EN RESPUESTA A ESTRÉS	129
4.1 Estrés por herida.....	130
4.1.1 Vertido vacuolar de HMGR y vesículas en células epidérmicas y parenquimáticas de cotiledón y hoja verdadera.....	132
4.1.2 Vertido vacuolar de vesículas en célula endodérmica de raíz.....	141
4.2 Estrés químico.....	143
4.2.1 Vertido vacuolar de vesículas en célula epidérmica y parenquimática de cotiledón e hipocótilo.....	143
4.2.2 Papel del gen <i>HMG1</i> de <i>A. thaliana</i>	148
5. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE INTERACTORES DE 1S:GFP	153

DISCUSIÓN

1. DISECCIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA HMGR DE <i>A. thaliana</i>	161
1.1 Dominios funcionales de HMGR.....	161
1.2 Generación de líneas transgénicas 1S:GFP.....	162
1.3 Efecto proliferativo y morfogénico de 1S:GFP en el retículo endoplasmático.....	164
1.3.1 Análisis ultraestructural de los agregados de retículo endoplasmático.....	166
1.3.2 Papel del dominio de membrana y de la GFP.....	169

1.4 Caracterización de las <i>vesículas de HMGR</i>	172
1.5 Caracterización fenotípica de mutantes <i>hmg1</i>	173
1.6 Complementación del mutante <i>hmg1-3</i>	176
2. IDENTIDAD FÍSICA Y FUNCIONAL DE DOMINIOS ER-HMGR.....	178
2.1 Identificación de los <i>dominios ER-HMGR</i>	178
2.2 Vertido a vacuola en respuesta a herida.....	180
2.3 Vertido a vacuola en respuesta a estrés químico.....	184
3. CARACTERIZACIÓN DE ER BODIES EN A. thaliana.....	189
3.1 Análisis ultraestructural e inmunocitoquímico.....	189
3.2 Relación física y funcional entre <i>ER bodies</i> y <i>dominios ER-HMGR</i>	196
CONCLUSIONES	
CONCLUSIONES.....	203
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	211
1.1 Cepas bacterianas.....	211
1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	211
2. PLÁSMIDOS.....	211
3. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	212
4. ANTICUERPOS.....	213
4.1 Anticuerpos primarios.....	213
4.2 Anticuerpos secundarios.....	214
5. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DEL MATERIAL BIOLÓGICO.	215
5.1 Métodos de trabajo con <i>E. coli</i>	215
5.2 Medio de cultivo de bacterias.	215
5.3 Métodos de trabajo con <i>Arabidopsis thaliana</i>	216
5.3.1 Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	217

6. GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS 1S:GFP DE <i>A. thaliana</i>	217
6.1 Preparación de células competentes.	217
6.2 Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium GV3101Pmp90RK</i>	218
6.3 Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> y genotipado por PCR.	219
6.4 Transformación de <i>A. thaliana</i>	220
7. AGROINFILTRACIÓN	223
8. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE 1S:GFP A PARTIR DE PLÁNTULAS DE <i>A. thaliana</i>	
2.15.4.	225
8.1 Transformación de células competentes BL21 con pGA3.....	226
8.2 Sobreexpresión y purificación de GST-At $\beta''\alpha$	226
8.3 Extracción y purificación de 1S:GFP.....	229
9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.	233
10. GENOTIPADO DE LA LÍNEA MUTANTE <i>hmg1-3</i>.	239
10.1 Extracción de DNA genómico y PCR.....	239
11. MICROBOMBARDEO DE HOJAS DE <i>A. thaliana</i> 2.15.4.	240
12. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE HMGR	242
12.1 Inmunocitoquímica <i>in-situ whole mount</i>	242
13. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	246
13.1 Fijación química para ultraestructura.	246
13.2 Criosustitución de muestras fijadas químicamente.	247
13.3 High pressure freezing (HPF) para ultraestructura.	248
13.4 High pressure freezing (HPF) para inmunocitoquímica.	248
14. ANÁLISIS PROTEÓMICO	249
14.1 Digestión de proteínas en gel de SDS-PAGE.....	249
14.2 Análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LCMS).....	252
BIBLIOGRAFÍA	
BIBLIOGRAFÍA.....	255

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACCT	Aceto-acetil-CoA tiolasa
APS	Persulfato de amonio
BSA	Suero de albúmina bovina
CD1	Dominio catalítico de HMGR1
CMS	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
CMK	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa
Col0	Columbia 0
Da, kDa	Dalton, kilo Dalton
DMAPP	Di-metil-alil di-fosfato
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
cDNA	DNA copia
DO	Densidad óptica
DsRED	Proteína fluorescente roja (<i>Discosomona sp. red</i>)
DTT	Ditiotreitol
DXP	1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
DXR	DXP reductoisomerasa
DXS	DXP sintasa
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGTA	Ácido etilen-glicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetra-acético
fosm	Fosmidomicina
FPP	Farnesil di-fosfato
FPS	FPP sintasa
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GGPP	Geranilgeranil di-fosfato
GGPS	GGPP sintasa
GPP	Geranil di-fosfato
GPS	GPP sintasa
GSH	Glutati3n
GST	Glutati3n S-transferasa
HBMP	Hidroxi-metil-butenil 4-di-fosfato
HDS	IPP/DMAPP sintasa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
HMGR	HMG-CoA reductasa
HMGS	HMG-CoA sintasa
HMGR1S	Isoforma corta de la HMGR1
HMGR1L	Isoforma larga de la HMGR1
HMGR2	Isoforma 2 de la HMGR
<i>i-ER bodies</i>	<i>ER bodies</i> inducidos
IPP	Isopentenil di-fosfato
IDI	IPP isomerasa
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiran3sido
JA	Ácido jasm3nico
MCS	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa
ME	Microscopio electr3nico
MeJA	Metil-jasmonato
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato

MVA	Mevalonato
MVK	MVA quinasa
MVP	5-Fosfo-mevalonato
MVPP	5-Difosfo-mevalonato
mRNA	RNA mensajero
mev	Mevinolina
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, forma reducida
NPG	N-propyl gallate
NT	region N-terminal
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMD	MVPP descarboxilasa
PMK	MVP quinasa
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PP2A	Proteína fosfatasa 2 ^a
PVDF	Fluoruro de polivilideno
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
V	Voltios
xg	Gravedades
1L-Extra	50 residuos de aminoácidos extra en N-terminal de HMGR1L

Introducción

1. 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL CoA REDUCTASA (HMGR).

1.1 Aspectos generales.

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa, HMGR, EC 1.1.1.34) cataliza la conversión irreversible de HMG-CoA en mevalonato (MVA), utilizando NADPH como donador de electrones (Figura I1). Este es el primer paso específico de la vía del MVA para síntesis de isoprenoides en arqueobacterias, hongos, animales y en el citosol de plantas superiores. Sin embargo, algunas eubacterias como la *Pseudomona mevalonii* pueden utilizar MVA como fuente de carbono y poder reductor para catalizar la reacción inversa (Gill *et al.*, 1985). La conversión de HMG-CoA a MVA es un paso crucial en el control y regulación del metabolismo de los isoprenoides (también denominados terpenoides) en mamíferos (Goldstein *et al.*, 1990), hongos (Bason *et al.*, 1986) y plantas (Stermer *et al.*, 1994; Chappel *et al.*, 1995c). A partir de MVA, miles de moléculas son formadas, y aunque esta ruta es muy conocida porque de ella derivan los esteroides (incluyendo el colesterol), los productos formados comprenden un asombroso número de moléculas de gran variabilidad entre especies, tipo celular y estado fisiológico (Hampton *et al.*, 1996).

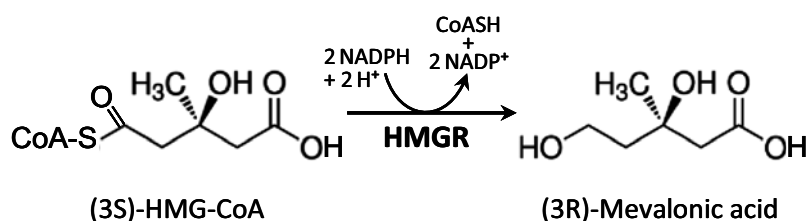


Figura I1. Conversión de la HMG-CoA a mevalonato; reacción catalizada por la HMGR (Extraído de Campos *et al.*, 2014).

En contraste con su gran diversidad estructural y funcional todos los isoprenoides derivan de un único precursor común de cinco átomos de carbono, el isopentenil di-fosfato (IPP) y de su isómero dimetilalil di-fosfato (DMAPP). Estas moléculas, que reciben el nombre de unidades de isopreno, son la base estructural para la formación de isoprenoides (Chappell, 1995a,b; McGarvey and Groteau, 1995; Bramley, 1997; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002).

En 1950 se descubrió la ruta del MVA en animales y hongos (Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002), y se pensó que de ella derivan todos los isoprenoides. Sin embargo, los datos experimentales de la biosíntesis de isoprenoides específicos en plantas y microorganismos, no se podía explicar tomando en cuenta únicamente la vía del MVA

(Lichtenthaler *et al.*, 1997b; McCaskill and Croteau, 1998; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Hacia finales de los años 90, se determinó en bacterias y plantas la existencia de una vía alternativa de síntesis de isoprenoides, la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP).

La mayor parte de organismos sintetizan sus terpenoides a partir de los precursores IPP y DMAPP, que derivan exclusivamente de una de las dos vías de síntesis (Lichtenthaler *et al.*, 1997a; Lange *et al.*, 2000; Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). La vía MEP de los plastos de plantas deriva de procariotas y tiene un origen distinto al de la vía del MVA que se encuentra en el citosol y sistema de endomembranas. Los animales, hongos y las arqueobacterias, sintetizan todos sus isoprenoides a partir de la vía del MVA. En eubacterias, en la mayoría de las algas y en algunos protozoarios, esta síntesis tiene lugar gracias a la vía del MEP. En plantas superiores, en algunas cepas de actinomicetos y en algunas algas, estas dos vías co-existen.

Las plantas son el grupo de organismos más extenso e importante, donde todos sus miembros tienen la capacidad de síntesis de IPP y DMAPP a partir de las dos vías diferentes que se encuentran compartimentalizadas (Figura I2). La vía del MEP tiene lugar en los plastos, mientras que la vía del MVA opera en el citoplasma y retículo endoplasmático (RE) (Lichtenthaler *et al.*, 1997a; McCaskill and Croteau, 1998; Chappell, 2002; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013). Los compartimentos plastídico y citosólico de las células vegetales pueden intercambiar IPP o prenil-difosfatos de forma limitada, como ocurre también en la biosíntesis de ubiquinona en las mitocondrias, donde el IPP necesario es importado dentro de este orgánulo desde el citoplasma (Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013).

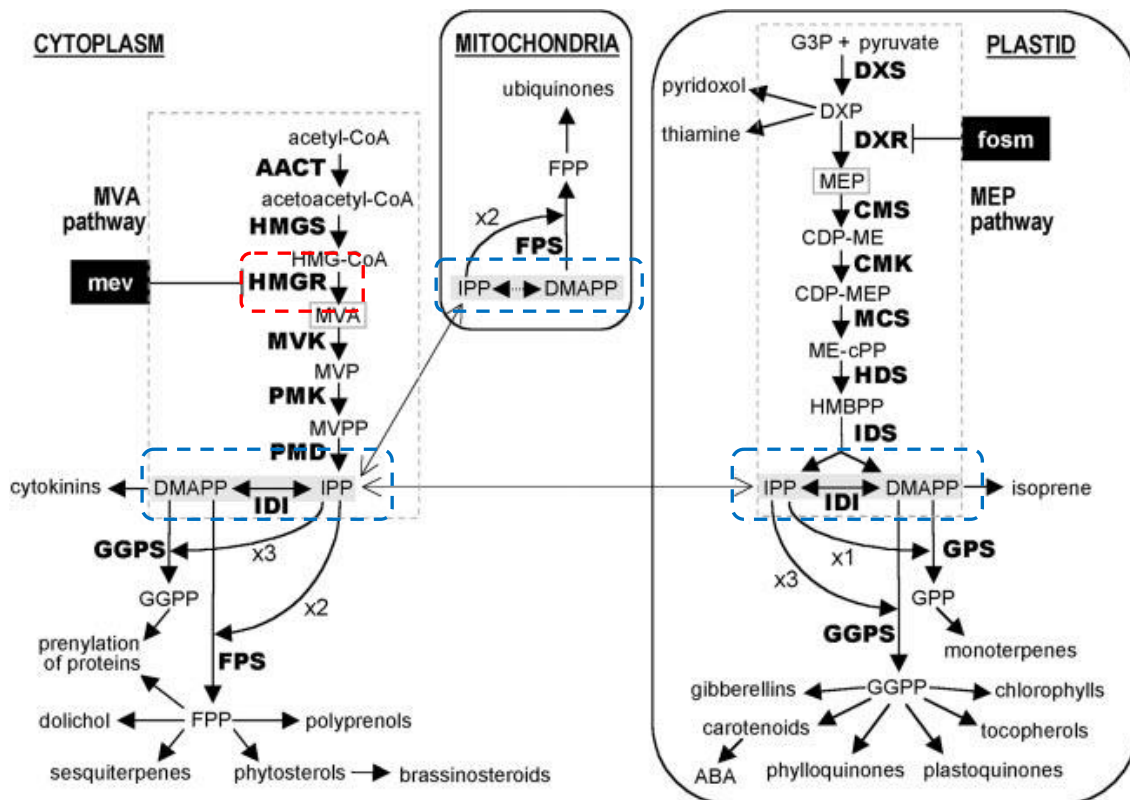


Figura 12. Ruta de síntesis de los isoprenoides en célula vegetal. HMG-CoA (Hiroximetilglutaril-CoA), MVP (5-Fosfomevalonato), MVPP (5-difosfomevalonato), HMBPP (Hidroximetilbutenil 4-difosfato), FPP (Farnesil difosfato), ABA (Ácido abscísico). Las enzimas están en negrita. **AACT** (Acetoacetyl-CoA tiolasa EC 2.3.1.9), **HMGS** (HMG-CoA sintasa EC 4.1.3.5), **HMGR** (HMG-CoA reductasa EC 1.1.1.88), **MVK** (MVA quinasa EC 2.7.1.36), **PMK** (MVP quinasa EC 2.7.4.2), **PMD** (MVPP descarboxilasa EC 4.1.1.33), **IDI** (IPP isomerasa EC 5.3.3.2), **GPS** (GPP sintasa EC 2.5.1.1), **FPS** (FPP sintasa EC 2.5.1.10), **GGPS** (GGPP sintasa EC 2.5.1.29), **DXS** (EC 4.1.3.37), **DXR** (DXP reductoisomerasa EC 1.1.1.267), **CMS** (EC 2.7.7.60), **CMK** (EC 2.7.1.148), **MCS** (EC 4.6.1.12), **HDS** (IPP/DMAPP sintasa). Los cuadros negros indican los sitios de inhibición de la Mevinolina (mev) y fosmidomicina (fosm). (Extraído de Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002).

Los isoprenoides son el grupo de metabolitos de plantas más diverso estructural y funcionalmente. Muchos de ellos participan en procesos esenciales, como la respiración (ubiquinona), fotosíntesis (carotenoides, clorofilas, plastoquinona), y regulación del crecimiento y desarrollo (citoquininas, brassinosteroides, giberilinas, ácido abscísico). Sin embargo, la mayoría de los isoprenoides en plantas son considerados como metabolitos secundarios que participan en la interacción de las plantas con su medio ambiente (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013). Pueden participar en interacciones biológicas complejas como la defensa al ataque por patógenos, la atracción de insectos o en procesos de señalización entre plantas. Algunos isoprenoides también tienen interés biotecnológico. La industria farmacéutica y agroalimentaria ha aprovechado las propiedades de algunos de estos compuestos, para comercializarlos como aromas, pigmentos, polímeros, fibras y fármacos (Chappell, 2002). Los carotenoides son otro ejemplo como precursores de la vitamina A. Los fitoesteroles son utilizados como

nutracéuticos en algunos productos alimentarios con la finalidad de disminuir la absorción intestinal de colesterol.

La HMGR cataliza una etapa limitante en la síntesis de esteroides tanto en células de mamífero (síntesis de colesterol) como en levadura (síntesis de ergosterol). En plantas superiores, HMGR es también la enzima que cataliza la primera etapa limitante en la síntesis de isoprenoides derivados de la ruta del MVA (Stermer, 1994; Chappell, 1995c), y es la enzima clave para el control de esta ruta, de la que derivan los fitosteroides (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013). Por tanto, en animales, plantas y hongos es fundamental mantener un control estricto de la actividad HMGR por medio de distintos mecanismos, como la regulación por retroinhibición, que es conseguida por medio de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (Goldstein *et al.*, 1990; Chappel *et al.*, 1995c; Hampton *et al.*, 1996; Rodríguez-Concepción *et al.* 2013).

1.2 Diversidad génica y especialización funcional en plantas.

Un aspecto característico en la biosíntesis de isoprenoides en plantas es que la mayoría de las enzimas implicadas en esta ruta están codificadas por familias multigénicas, que se originaron a partir de duplicaciones ancestrales. La secuenciación del genoma de *A. thaliana* confirma la existencia de la duplicación local de algunos genes. Los productos de estos genes, pueden sufrir una pérdida de función, pueden conservar las mismas funciones o especializarse hasta adquirir nuevas funciones. La existencia de esta redundancia génica, hace difícil el estudio de la función del producto de un gen en particular a partir de mutantes, pero también hace evidente la existencia de una compleja regulación. En el caso de la síntesis de isoprenoides en *A. thaliana*, muchas de las enzimas están codificadas por familias multigénicas (Tabla I1), hecho que coincide con la gran diversidad de isoprenoides sintetizados para cubrir los distintos requerimientos celulares.

Tabla I1. Familias multigénicas de algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de isoprenoides en *A. thaliana* (Adaptado de Marín, 2003).

Enzima	Genes	Isoformas	Características	Referencias
Acetoacetil-CoA tiolasa (AACT)	• <i>AAT1</i> • <i>AAT2</i>	• AACT1 • AACT2	• Citosólica; expresión constitutiva. • Peroxisomal; expresión en inflorescencias y en raíces.	(Ahumada, 2001)
HMG-CoA reductasa (HMGR)	• <i>HMG1</i> • <i>HMG2</i>	• HMGR1L • HMGR1S • HMGR2	• Expresión en plántulas, raíces e inflorescencias. • Expresión constitutiva • Expresión en tejidos meristemáticos, florales y de raíz.	(Enjuto et al., 1994) (Lumbreras et al., 1995) (Enjuto et al., 1995)
Mevalonato 5-difosfato descarboxilasa (PMD)	• <i>PMD1</i> • <i>PMD2</i>	• PMD1 • PMD2		(Cordier et al., 1999) (Lange i Ghassemian, 2003)
Desoxixilulosa 5-fosfato sintasa (DXS)	• <i>DXS1</i> • <i>DXS2</i> • <i>DXS3</i>	• DXS1 • DXS2 • DXS3	• Plastídica. • Hipotética DXS proplastídica. • Función desconocida.	(Carretero-Paulet, 2003)
Isopentenil difosfato isomerasa (IPI)	• <i>IPI1</i> • <i>IPI2</i>	• IPI1 • IPI2	• Localización plastídica y citosólica. • Localización plastídica citosólica.	(Lange i Ghassemian, 2003)
Farnesildifosfato sintasa (FPS)	• <i>FPS1</i> • <i>FPS2</i>	• FPS1L • FPS1S • FPS2	• Mitocondrial; expresión en inflorescencias. • Citosólica; expresión constitutiva • Expresión en inflorescencias	(Cunillera et al., 1997) (Cunillera et al., 1996) (Cunillera et al., 2000)
Esqualeno sintasa (SQS)	• <i>SQS1</i> • <i>SQS2</i>	• SQS1 • SQS2	• Citosólica/RE	(Del Arco, 1999)
Geranilgeranil difosfato sintasa (GGPS)	• <i>GGPS1</i> • <i>GGPS2</i> • <i>GGPS3</i> • <i>GGPS4</i> • <i>GGPS12</i>	• GGPS1 • GGPS2 • GGPS3 • GGPS4 • GGPS12	• Citosólica • Plastídica • Citosólica • Citosólica • Plastídica	(Lange i Ghassemian, 2003)

La regulación necesaria para cubrir los requerimientos celulares se consigue a través de la síntesis de las distintas isoformas enzimáticas en determinados estados de desarrollo y en diferentes tejidos. Existe la teoría que propone la existencia de canales metabólicos dedicados a la síntesis de isoprenoides específicos. Según este modelo, determinadas isoformas se asociarían entre ellas para dar lugar a productos finales específicos. (Chappell, 1995a,b; McCaskill and Croteau, 1998). Sin embargo, en el caso de *A.*

thaliana, no se ha podido demostrar la interacción directa entre las enzimas de la vía del MVA (Leivar, 2003).

El proyecto del genoma de *A. thaliana*, además de contribuir a la identificación de familias multigénicas, también ha permitido la identificación de su localización cromosómica, observándose que a menudo, los genes que codifican para una misma función proteica se encuentran muy próximos en el genoma y organizados en *clusters* (Lange and Ghassemian, 2003).

En este sentido, a través del estudio de diferentes sistemas vegetales, se ha propuesto que la existencia de familias multigénicas y de varias isoformas enzimáticas, permitiría un ajuste mucho más fino de la maquinaria biosintética, de acuerdo a los requerimientos de isoprenoides específicos en respuesta a diferentes estímulos. Por tanto, cada gen relacionado con la síntesis de isoprenoides, tendría un patrón de expresión particular en función del tejido, del estado de desarrollo o de factores externos. Por otro lado, el uso en la célula de promotores alternativos en un mismo gen, podría dar lugar también, a la síntesis de más de una isoforma. Las isoformas también podrían ser reguladas de forma diferencial y tener localizaciones subcelulares distintas. Además, se han descrito modelos de especialización funcional, en el que cada isoforma sería responsable de la síntesis específica de isoprenoides en determinados estados de desarrollo (Chappell, 1995b).

En el caso particular de la HMGR, existe diversidad en los tres reinos eucariotas, en lo que respecta al número de genes que la codifican. En tanto que en humanos HMGR está codificada por un solo gen (Friesen and Rodwell, 2004), en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) HMGR está codificada por dos genes, *HMG1* y *HMG2*, que dan lugar a dos isoformas funcionales distintas (Koning *et al.*, 1996; Profant *et al.*, 1999). Las dos variantes de HMGR de levadura tienen la misma actividad catalítica, pero su expresión está regulada de forma diferencial (Hampton *et al.*, 1996; Koning *et al.*, 1996).

Algunas isoformas de HMGR de diversas especies de plantas, tienen una diana de N-glicosilación en el segmento de lumen (LS) entre las dos secuencias transmembrana (véase estructura y localización de la HMGR en la Sección 1.3.1). Se ha propuesto que la N-glicosilación de esta diana está relacionada con la especialización funcional. La forma N-glicosilada participaría en la síntesis de fitoalexinas, mientras que la no glicosilada, estaría involucrada en la de esteroides en células meristemáticas (Figura I3) (Denbow *et al.*, 1996; McCaskill *et al.*, 1998). Esta propuesta forma parte de un modelo de canalización de la vía del MVA, en el que distintos equipos enzimáticos, que incluirían isoformas particulares de HMGR, estarían organizados en metabolones independientes,

localizados en subdominios del RE. (Chappel 1995b, McCaskill *et al.*, 1998). La canalización conduciría a la especialización funcional de los distintos equipos enzimáticos.

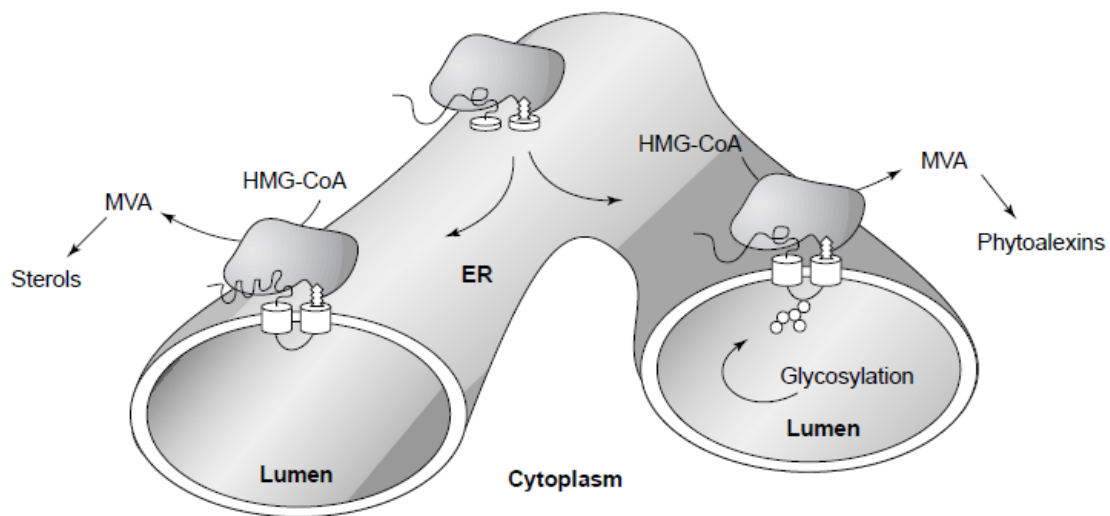


Figura 13. Esquema de la organización de la HMGR en subdominios del RE. La HMGR N-glicosilada estaría involucrada en la síntesis de fitoalexinas. La HMGR no glicosilada estaría implicada en la síntesis de esteroides (Extraído de McCaskill *et al.*, 1998).

En tomate (*Lycopersicon esculentum*), la HMGR está codificada por cuatro genes, *HMG1*, *HMG2*, *HMG3* y *HMG4*. El gen *HMG1* se expresa en frutos inmaduros en desarrollo, pero dicha expresión disminuye cuando la maduración del fruto avanza (Narita *et al.*, 1989). La expresión del gen *HMG2* es rápidamente inducida en tejidos que han sufrido algún ataque por patógenos (Cramer *et al.*, 1993). El tratamiento con un elicitor fúngico induce el incremento en la expresión del gen *HMG2* y la disminución de la expresión del gen *HMG1*. De esta forma, el gen *HMG2* estaría implicado en la biosíntesis de sesquiterpenos (fitoalexinas defensivas) mientras que el gen *HMG1* se relacionaría con la biosíntesis de esteroides necesarios para el desarrollo de la planta (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999).

En patata (*Solanum tuberosum*) existen al menos 12 genes para síntesis de HMGR, clasificados en tres familias: *HMG1*, *HMG2* y *HMG3*. En condiciones de estrés por herida, los genes de la familia *HMG1* son inducidos, lo que resulta en un incremento de la biosíntesis de esteroides; la acumulación de esteroides podría servir para la reparación de las membranas dañadas. La infección producida por el hongo *Phytophthora infestans* o el tratamiento con ácido araquidónico (elicitor) desencadena la inducción de los genes pertenecientes a las familias *HMG2* y *HMG3*, que junto con el gen de la sesquiterpeno ciclasa que también se ve inducido, incrementa los niveles de fitoalexinas asociadas con mecanismos de defensa (Choi *et al.*, 1992). Estas observaciones indican la existencia de una especialización funcional en las isoformas de la HMGR en patata.

La *Hevea brasiliensis* posee tres genes, la *HMG1*, *HMG2* y *HMG3*, los cuales codifican tres isoformas de HMGR. El gen *HMG1* se expresa principalmente en células laticíferas (células secretoras) y es inducido por etileno, por tanto está implicado en la síntesis de látex en esta especie. El gen *HMG3* tiene una expresión constitutiva ubicua para la biosíntesis de isoprenoides (Chye *et al.*, 1992). En otras especies, se han identificado varias familias multigénicas encargadas de la síntesis de HMGR en *Raphanus sativus* (Ferrer *et al.*, 1990), *Pisum sativum*, *Nicotiana sylvestris* (Genschik *et al.*, 1992), *Triticum aestivum* (Aoyagi *et al.*, 1993), *Catharanthus roseus* o *Catharanthus acuminata* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1997) que son expresadas de forma diferencial en respuesta a condiciones de estrés y desarrollo.

1.2.1 Isoformas en *Arabidopsis thaliana*.

En *Arabidopsis thaliana*, tres isoformas de la HMGR (HMGR1S, HMGR1L y la HMGR2) están codificadas por dos genes, *HMG1* y *HMG2*, que se expresan de forma diferencial (Enjuto *et al.*, 1994). A partir del gen *HMG1*, dos transcritos son sintetizados debido a la presencia de dos inicios alternativos de transcripción, produciendo así dos isoformas proteicas (Lumbreras *et al.*, 1995). El transcrito más corto, que codifica la isoforma HMGR1S, es producido en niveles elevados y de un modo generalizado y constitutivo. En cambio, el transcrito largo, que codifica la isoforma HMGR1L, es producido en niveles más bajos y sólo en planta joven o en algunos tejidos como inflorescencias y raíces. La HMGR1S y la HMGR1L son idénticas en secuencia, pero HMGR1L posee una extensión de 50 residuos de aminoácidos (región 1L-Extra) en el extremo N-terminal (Lumbreras *et al.*, 1995). El gen *HMG2*, que codifica para HMGR2, se expresa a niveles más bajos que *HMG1*, en meristemos, raíz, células guarda de estomas y tejido floral (Enjuto *et al.*, 1994) (Figura I4). Así, las isoformas de HMGR de *A. thaliana* codificadas por los genes *HMG1* y *HMG2* (HMGR1S, HMGR1L y HMGR2) muestran regiones citosólicas N-terminal (NT) (véase Sección 1.3.1) de diferentes longitudes (Figura I9), la región NT de HMGR2 tiene 32 aminoácidos; en cambio, las regiones NT de HMGR1S y HMGR1L tienen 50 y 100 aminoácidos, respectivamente.

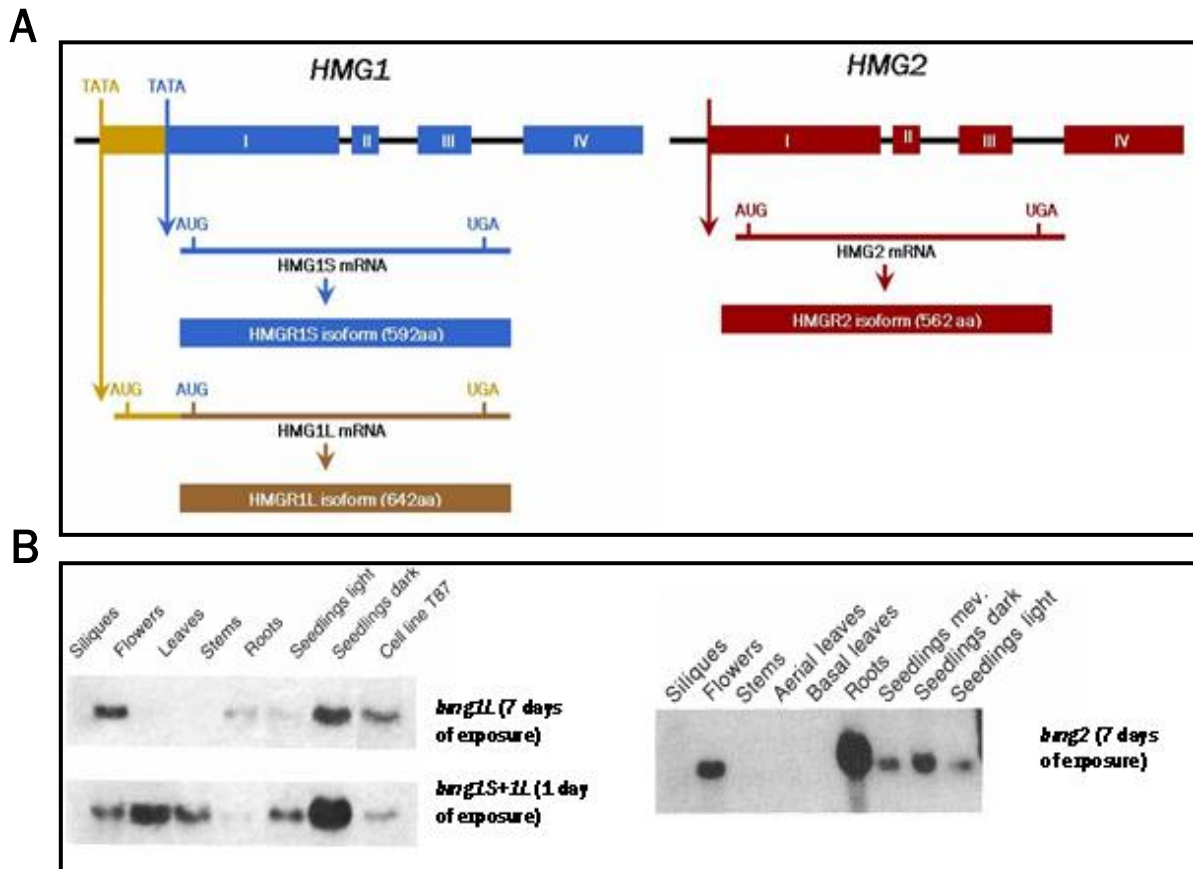


Figura 14. Esquema de la expresión de los genes *HMG1* y *HMG2* de *A. thaliana*. **A.** Las isoformas HMGR1S y HMGR1L son codificadas por el gen *HMG1* a través de un inicio de transcripción alternativo, y la HMGR2 es codificado por el gen *HMG2*. Los rectángulos representan los exones y las líneas los intrones. HMGR1S y HMGR1L son idénticas en secuencia, pero HMGR1L tiene una región extra N-terminal de 50 aminoácidos. **B.** Patrón de expresión de los transcritos *hmg1S*, *hmg1L* y *hmg2*. Se señala el tiempo de exposición para la revelación de cada film, que indica los niveles de expresión de los genes. (Extraído de Enjuto *et al.*, 1994 y Lumbreras *et al.*, 1995).

1.3 Estructura y topología de la HMGR en la membrana.

La HMGR puede ser clasificada en dos grupos de acuerdo a la secuencia de su dominio catalítico: la clase I formada por las HMGRs de eucariotas y la clase II formada por las HMGRs de procariontes (Bochar *et al.*, 1991; Lange *et al.*, 2000). La mayoría de las HMGRs de arqueobacterias pertenecen a la clase I, con algunas excepciones como el *Arqueoglobus*. Por otra parte, todos los miembros de la clase I, a excepción de la HMGR de arqueobacterias y de algunos protozoarios como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major* (Pena-Díaz, 1997), tienen un dominio de membrana en el extremo N-terminal. Las HMGR de clase II por el contrario, no tienen un dominio de membrana. Dentro de una misma clase, el dominio catalítico de las HMGR muestra una gran similitud de secuencia; y la comparación de las HMGR entre las clases I y II, señala que se conserva aún una identidad del 14 al 20% (Lange *et al.*, 2000) (Figura 15). Los residuos esenciales para el reconocimiento del sustrato y catálisis también se encuentran conservados en las HMGR de todos los organismos.

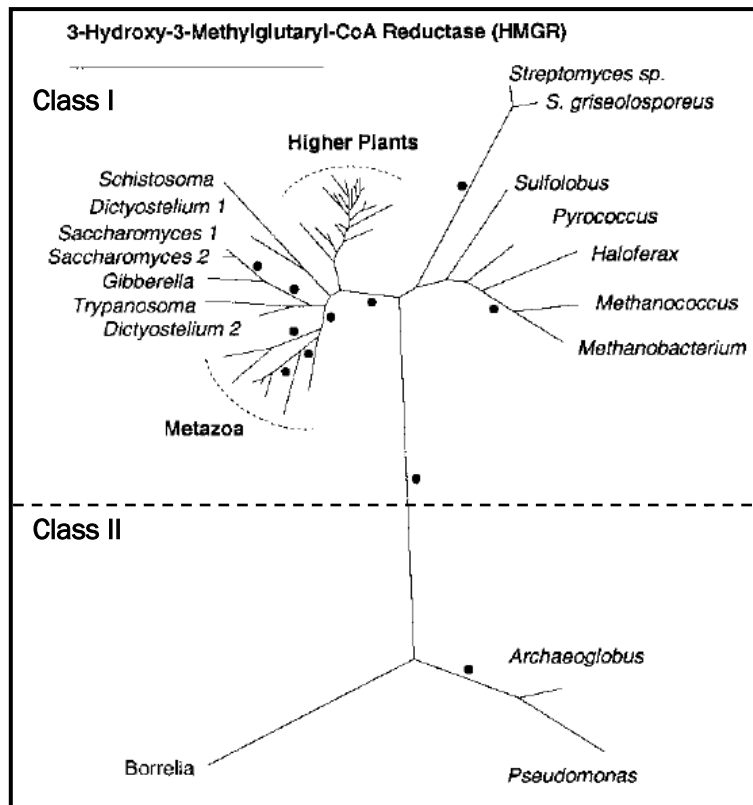


Figura 15. Análisis filogenético del dominio catalítico de la HMGR. La barra indica 100 sustituciones aminoacídicas. (Extraído de Lange *et al.*, 2000).

La HMGR de plantas, animales y hongos pertenece a la clase I y está formada por dos dominios: el dominio N-terminal o de membrana y el dominio catalítico situado en posición C-terminal. El dominio N-terminal no está conservado entre los tres reinos eucariotas y tiene varias secuencias transmembrana que sirven de anclaje al RE. La HMGR de mamíferos consta de ocho segmentos transmembrana (Brown and Simoni, 1984), la de levadura de siete (Hampton *et al.*, 1996) y la de plantas sólo de dos (Campos and Boronat, 1995) (Figura I6). En mamíferos, levaduras y plantas, se ha demostrado que el dominio N-terminal de la HMGR tiene la información necesaria para la retención y el anclaje al RE y para establecer la topología de la proteína en la membrana (Basson *et al.*, 1998, Olender and Simoni, 1992; Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010). La ausencia de conservación del dominio N-terminal de HMGR en plantas, mamíferos y levaduras, sugiere que este dominio confiere a la enzima diferentes propiedades funcionales en estos organismos, que podrían estar relacionadas con una distinta regulación.

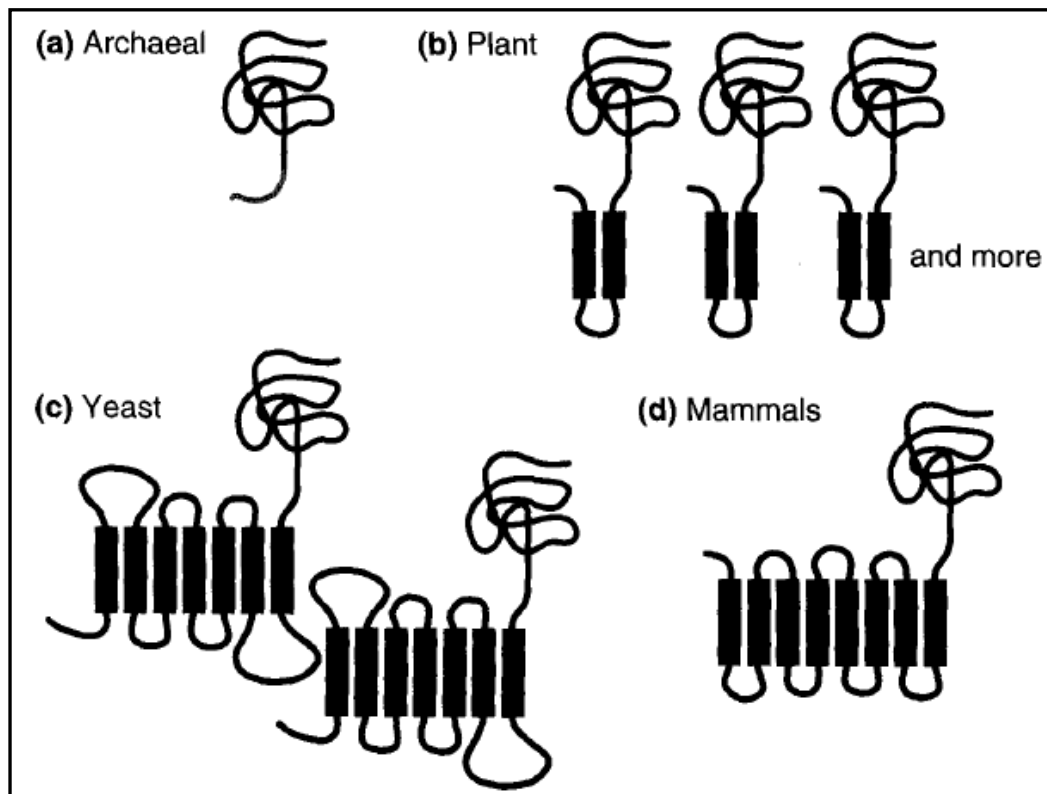


Figura 16. Estructura esquemática de la HMGR de diferentes especies. Se observa la HMGR de: arqueobacterias, plantas, levaduras y mamíferos. En los tres reinos eucariotas, el dominio catalítico altamente conservado está unido al dominio N-terminal mucho más variable anclado en la membrana (Extraído de Hampton *et al.*, 1996).

Estudios cristalográficos han demostrado que la HMGR humana forma tetrámeros (Figura 17) (Istvan *et al.*, 2000). Las cuatro subunidades de la enzima dan lugar a cuatro centros catalíticos, cada uno formado en la interfase de dos monómeros. En plantas todavía no se ha cristalizado el dominio catalítico de HMGR, pero también ha sido purificado en patata, hevea y rábano como dímero o tetrámero (Kondo and Oba, 1986; Wititsuwannakul *et al.*, 1990; Bach *et al.*, 1986).

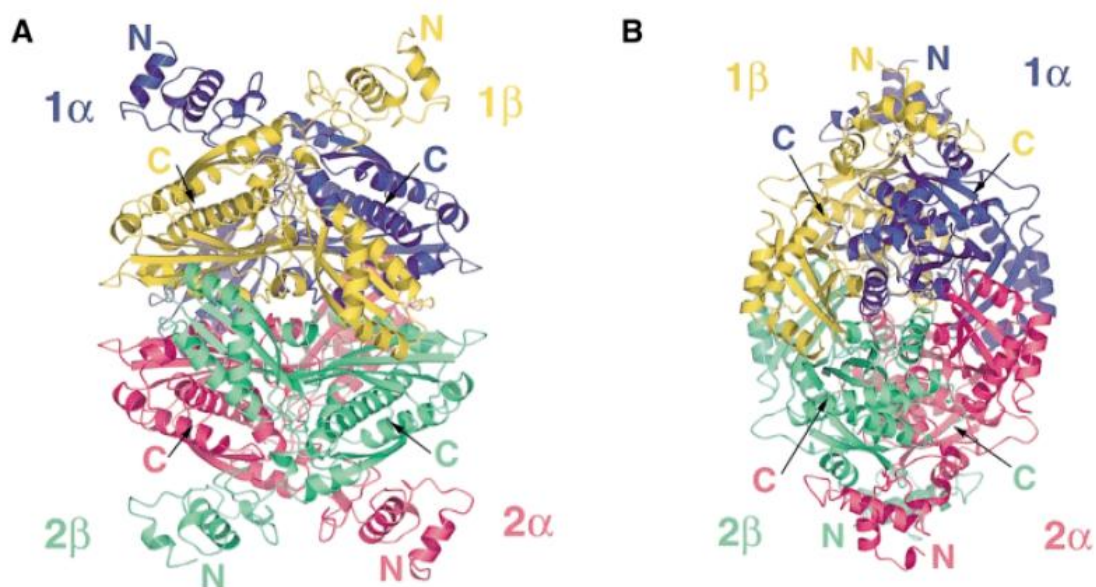


Figura 17. Estructura cuaternaria del dominio catalítico de la HMGR humana, en diagrama de cinta. A y B. Homotetrámero de HMGR. El dímero 1 está constituido por los monómeros “1α” (púrpura) y “1β” (amarillo), mientras que el dímero 2 está compuesto por los monómeros “2α” (rosado) y “2β” (verde) (Extraído de Istvan *et al.*, 2000).

La gran divergencia estructural entre el dominio N-terminal de la HMGR de plantas, en comparación con la HMGR de mamíferos y levaduras, podría reflejar diferencias en las propiedades funcionales de la HMGR entre estos organismos. Considerando la importancia especial que tiene la biosíntesis de la gran diversidad de compuestos isoprenoides en plantas, se podría esperar que en estos organismos haya también una divergencia en los procesos relacionados con su regulación.

1.3.1 HMGR en plantas.

La HMGR de plantas es una proteína de membrana que está formada por un dominio catalítico C-terminal y un dominio de membrana N-terminal unidos por una región *linker*. El dominio de membrana a su vez está constituido por: una región N-terminal (NT), dos segmentos transmembrana (H1 y H2) y un segmento de lumen (LS) (Figura I8).

El dominio catalítico presenta un elevado nivel de conservación en todos los organismos (Lange *et al.*, 2000), y es responsable de la actividad catalítica de la HMGR en el citosol. El segmento de lumen tiene una diana de N-glicosilación que está relacionada con la especialización funcional de algunas isoformas de HMGR en distintas especies de plantas (Denbow *et al.*, 1996; McCaskill *et al.*, 1998) (véase Sección 1.2). La región *linker* es una región muy divergente que podría estar implicada en la proteólisis selectiva pues contiene secuencias PEST (Caelles *et al.*, 1989). La región N-terminal, la cual es también bastante divergente no sólo entre organismos sino también entre isoformas dentro de una misma especie (González, 2002), es considerada como una región que confiere

propiedades específicas para cada isoforma de HMGR. Las dos regiones transmembrana (H1 y H2), son responsables de la inserción y retención de la HMGR en la membrana del RE de forma co-traduccional según el modelo demostrado en las isoformas de HMGR de *A. thaliana* y tomate (Campos and Boronat, 1995; Denbow *et al.*, 1996). Mediante experimentos de síntesis *in vitro* de la isoforma HMGR1S de *A. thaliana*, se demostró que las secuencias transmembrana (H1 y H2) son reconocidas por la Partícula de Reconocimiento de la Señal (*Signal Recognition Particle* o SRP) y como consecuencia esta proteína se inserta de forma co-traduccional en microsomas derivados del RE (Campos and Boronat, 1995). Por tanto, estas dos secuencias hidrofóbicas determinan la topología de la proteína en la membrana. De esta manera, se estableció un modelo topológico, en el cual la región N-terminal y el dominio catalítico en el extremo C-terminal están orientados hacia el citosol, y una pequeña región entre los dos segmentos transmembrana quedaría orientada hacia el lumen (Figura I8A) (Campos and Boronat, 1995).

En plantas la HMGR se encuentra codificada por familias multigénicas, existiendo un gran número de secuencias de isoformas de HMGR, algunas redundantes y otras con funciones especializadas. Todas estas isoformas de HMGR tienen una organización estructural similar. En particular, todas las HMGRs de plantas estudiadas poseen el motivo estructural formado por dos secuencias hidrofóbicas altamente conservadas (H1 y H2) y separadas por una secuencia hidrofílica (LS) también conservada.

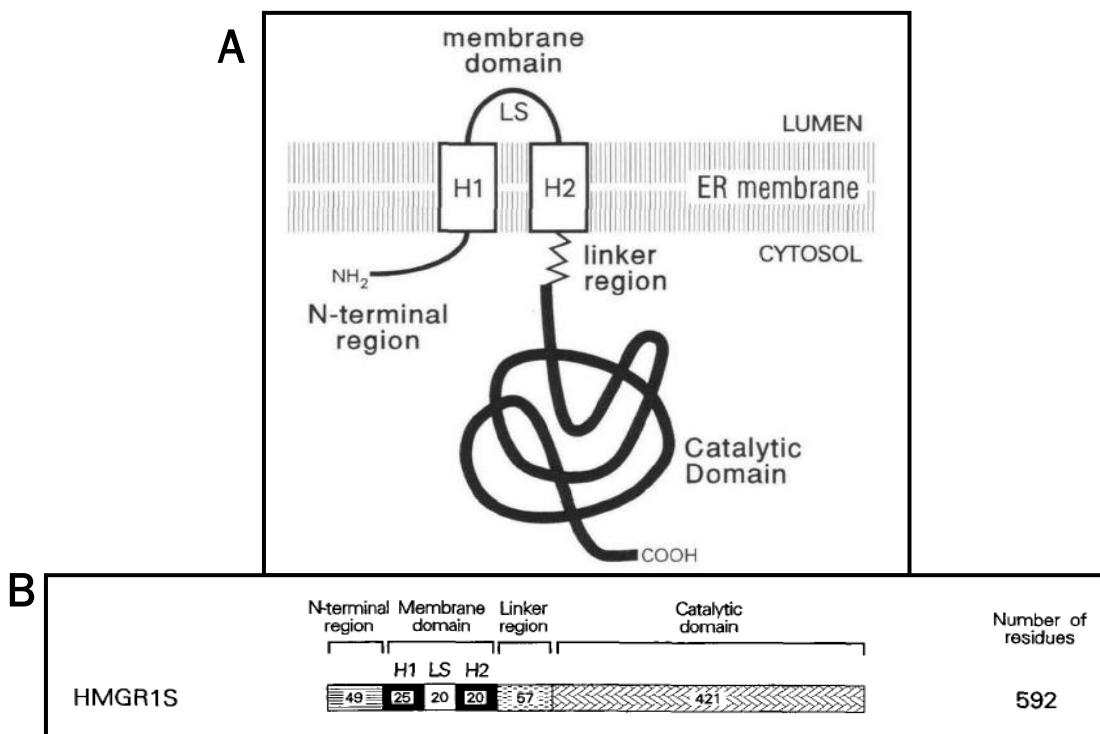


Figura I8. A. Topología de la HMGR de plantas en la membrana del RE. B. Esquema de estructura primaria HMGR1S (Extraído de Campos and Boronat, 1995).

1.4 Localización subcelular de HMGR en *A. thaliana*.

Una primera aproximación para estudiar la localización subcelular de la HMGR en *A. thaliana* fue la construcción de quimeras de las distintas isoformas, en las que su dominio catalítico fue sustituido por GFP. Las proteínas quiméricas con el dominio de membrana de HMGR1S, HMGR1L y HMGR2 fusionado a GFP en C-terminal recibieron la denominación de 1S:GFP, 1L:GFP y 2:GFP, respectivamente (Figura I9). Las construcciones quiméricas fueron utilizadas en ensayos de expresión transitoria por microbombardeo sobre hoja de roseta de *A. thaliana* y epidermis de cebolla (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2006). En ambos casos se estudió la localización subcelular en las células epidérmicas (Figura I10).

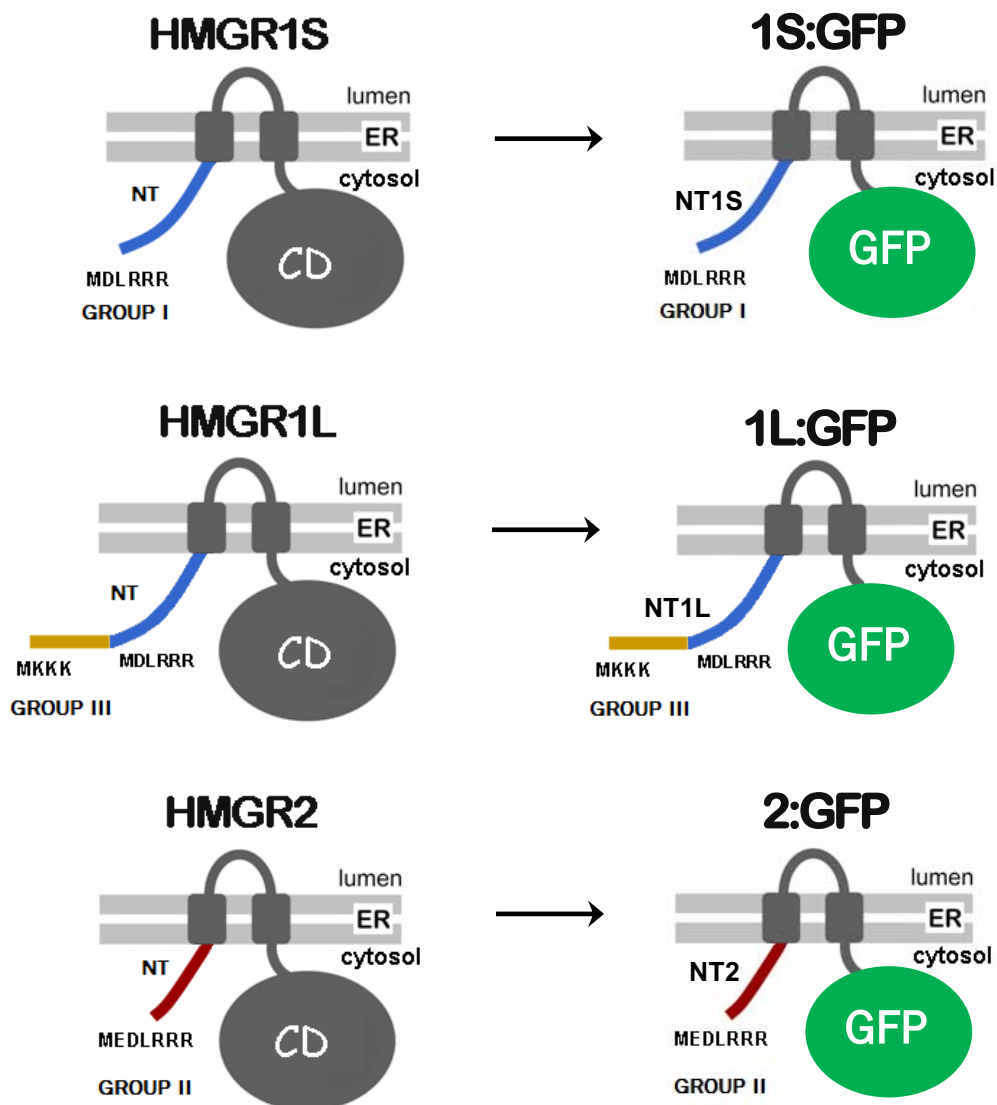


Figura I9. Representación esquemática de las quimeras 1S:GFP, 1L:GFP y 2:GFP. El dominio catalítico de la HMGR1S, HMGR1L y HMGR2 es sustituido por la proteína fluorescente verde (GFP) en las quimeras correspondientes. Las quimeras fueron utilizadas para estudios de localización subcelular por microbombardeo en hoja de *A. thaliana* o epidermis de cebolla, agroinfección en línea celular de *A. thaliana*, agroinfiltración en hoja de *N. benthamiana* o transformación estable en *A. thaliana*.

La fusión del dominio N-terminal de HMGR1S y HMGR2 a GFP, fue suficiente para dirigir las correspondientes quimeras a estructuras vesiculares de tamaño heterogéneo de entre 0.5 y 2 μm (Figuras I10B y I10D) que están conectadas con la trama de RE. Este resultado está de acuerdo con los estudios anteriores que indican la inserción co-traduccional de la HMGR de plantas en la membrana del RE (Campos and Boronat, 1995). En epidermis de cebolla, la expresión transitoria de 1S:GFP también dio lugar a un patrón reticulo-vesicular (Figura I10A). En contraste con los patrones vesiculares, la quimera 1L:GFP se localizan exclusivamente en la trama de RE (Figura I10C). Estos estudios indican que la sola presencia de la región extra de 50 aminoácidos en la isoforma HMGR1L (1L-Extra) es suficiente para evitar su transporte a las estructuras vesiculares.

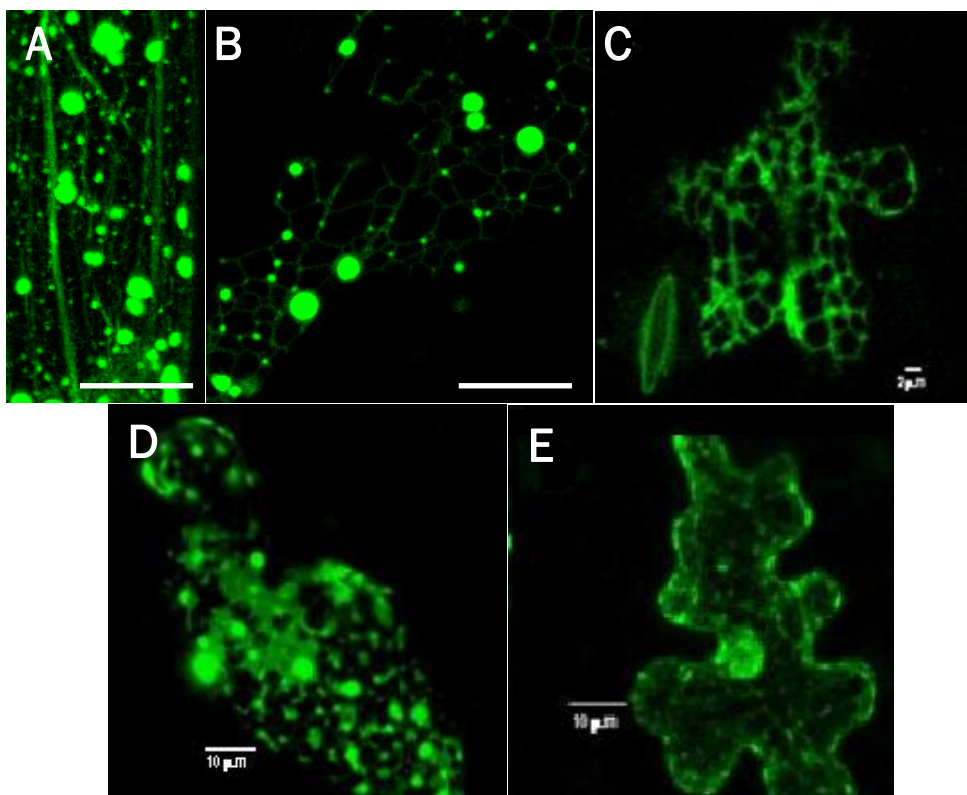


Figura I10. Localización subcelular de HMGR. Proteínas quiméricas de GFP expresadas transitoriamente por microbombardeo y observadas al microscopio confocal. Células epidérmicas de cebolla: (A). Células epidérmicas de hoja de roseta de *A. thaliana*: (B - E). Las quimeras fueron las siguientes: 1S:GFP (A y B); 1L:GFP (C); 2:GFP (D); Δ R1S:GFP (E). La quimera Δ R1S:GFP es similar a 1S:GFP salvo que las argininas en la región N-terminal fueron reemplazadas por alaninas. (Extraído de Leivar, 2003 y Ferrero, 2010).

Para determinar la localización subcelular de la HMGR endógena de *A. thaliana* se utilizó la técnica de inmunocitoquímica *in-situ* en planta entera (*whole mount*). Anticuerpos policlonales generados en conejo contra el dominio catalítico de HMGR1 (anti-CD1) (Manzano *et al.*, 2004) fueron utilizados para experimentos de inmuno-fluorescencia en cotiledones de 6 días, que fueron observados al microscopio confocal (Figura I11). Estos estudios revelaron una red de vesículas, con un contenido de HMGR, situadas en el

citósol, alrededor de los cloroplastos (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010). Las *vesículas de HMGR* presentaban una morfología esférica de 0,2 a 0,6 μm de diámetro (Figura I11A). Estas vesículas no corresponden a los cloroplastos ni tampoco a peroxisomas, ya que no colocalizan con la auto-fluorescencia de clorofila, ni con catalasa detectada inmunocitoquímicamente (Leivar *et al.*, 2005) (Figura I11C).

Hasta el momento, la localización subcelular de la HMGR de *A. thaliana* ha sido estudiada mediante dos estrategias distintas. En la primera, se ha realizado expresión transitoria de la quimera 1S:GFP y se han detectado unos cuerpos aproximadamente esféricos que acumulan la quimera (Figura I10) (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2006; Ferrero, 2010). En la segunda, se ha realizado inmunocitoquímica con un anticuerpo policlonal que reconoce el dominio catalítico de la enzima (anti-CD1) y se han detectado las denominadas *vesículas de HMGR* (Figura I11A) (Leivar, 2003; Ferrero, 2010). Las estructuras vesiculares de ambas aproximaciones tienen un tamaño similar. Esta coincidencia sugiere que las vesículas de 1S:GFP corresponden físicamente a las *vesículas de HMGR*, pero sería oportuno profundizar en estos estudios para confirmar dicha posibilidad.

Para determinar si la localización subcelular de HMGR de *A. thaliana* depende enteramente del dominio de membrana o si también es determinado por el dominio catalítico, en trabajos previos del mismo grupo se realizaron dos tipos de ensayos inmunocitoquímicos. En el primero se analizaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaban elevados niveles del dominio catalítico de HMGR1. Ensayos de *whole mount* demostraron que la proteína desprovista de su dominio de membrana se localiza exclusivamente en citósol (Figura I11B) (Leivar *et al.*, 2005). En el segundo tipo de análisis se realizó doble inmunocolocalización de HMGR y 1S:GFP sobre células en cultivo (Leivar, 2003) o plantas transgénicas de *A. thaliana* (Ferrero, 2010) que expresaban la quimera. Se observó colocalización de HMGR endógena y 1S:GFP en trama de RE y vesículas, indicando que la localización subcelular de HMGR depende enteramente del dominio de membrana. Del conjunto de los resultados y de los publicados anteriormente se propuso que el dominio N-terminal de HMGR de *A. thaliana*, que incluye las secuencias de transmembrana, es necesario y suficiente para dirigir la proteína hacia trama de RE y a las estructuras esféricas (Campos and Boronat 1995; Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010). La ausencia de dominio catalítico HMGR en la quimera 1S:GFP no afecta a su localización subcelular. No obstante, en los dos tipos de ensayo de colocalización de 1S:GFP y HMGR endógena sólo fue posible obtener unas pocas imágenes de células bastante deterioradas (comunicación personal de P. Leivar y S. Ferrero), siendo aconsejable, por tanto, confirmar las conclusiones con otras aproximaciones experimentales.

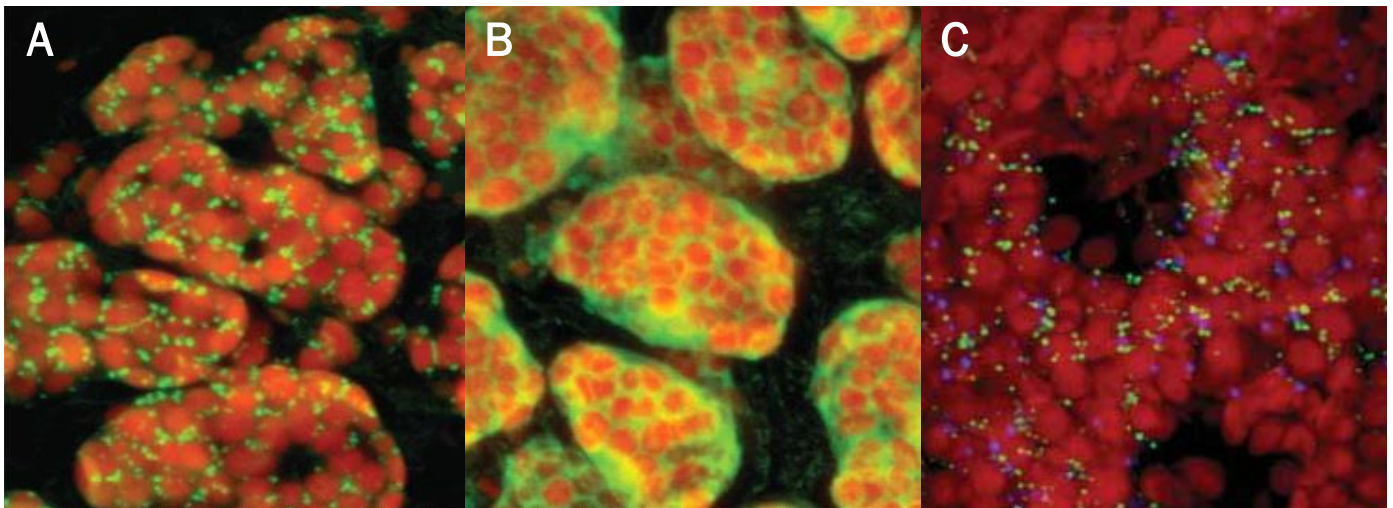


Figura I11. Inmunolocalización *in-situ* de HMGR en célula parenquimática de cotiledón de plantas de *A. thaliana* de 6 días, observadas al microscopio confocal. **A.** Superposición de los canales correspondientes a la inmunodetección de HMGR (verde) y auto-fluorescencia de la clorofila (rojo). Se observa la HMGR localizada en vesículas distribuidas entre los cloroplastos. **B.** Plantas transgénicas que sobre-expresan el dominio catalítico de HMGR1 (CD1). Se observa la HMGR localizada en el citosol. **C.** Inmunodetección de catalasa (azul) y de HMGR (verde) en célula parenquimática de cotiledón de 6 días. Se observa que las vesículas de HMGR no coinciden físicamente con los peroxisomas (Extraído de Leivar *et al.*, 2005).

1.5 Control de la localización subcelular en plantas.

1.5.1 Región N-terminal.

La región N-terminal de la HMGR de plantas está implicada en el control de su localización subcelular. La mayor parte de isoformas de HMGR de plantas tienen un motivo conservado con varios residuos de arginina, próximo a su extremo N-terminal citosólico. Una secuencia aminoacídica consenso fue establecida para este motivo: M[D,E][L,V,I]RRR (una metionina inicial, un aminoácido cargado negativamente, un aminoácido hidrofóbico y tres argininas) (Leivar, 2003). Un estudio comparativo entre los diferentes motivos N-terminales presentes en HMGR de plantas, permitió clasificarlos en tres grupos: El grupo I, el cual presenta el motivo consenso antes mencionado (e.g. *A. thaliana* HMGR1S). El grupo II, compuesto por proteínas que tienen un motivo consenso similar, en el que el grupo de 3 argininas se distancia un residuo más del extremo N-terminal (e.g. *A. thaliana* HMGR2). Mientras que el grupo III, está compuesto por proteínas en las que varios residuos básicos sin una secuencia concreta substituyen al motivo conservado de argininas (e.g. *A. thaliana* HMGR1L) (Leivar, 2003) (Figura I12). En mamíferos un motivo de dos argininas próximas al extremo N-terminal son una señal de retención a RE en proteínas de membrana de tipo I (Schutze *et al.*, 2004). Todos estos datos indican que la región N-terminal de HMGR cumple un rol en su localización en el RE.

Group I	MDLRRR	At-HMGR1S , Ll1, St4	
	MDVRRR	Bv1, Ca1, Ca2, Ca3, Cpa1, Gm1, Le1, Le2, Le3, Lh1, Lp1, Lp2, Md1, Mt1, Ns1, Nt1, St1, St2, St3, Te1, Te2	
	MDVRR	Os1	
	MDARRR	Mt2	
	MDIRRR	Rs1, Rs2	
	MDSRRR	Cr1	
	MDLRRK	Aa1, Aa2	
	MEVRRR	Os3, Mc1	
	MELRRR	Ma1	
	MEHRRR	Ps1	
MDRRR	Cm1		
Group II	MEDLRRR	At-HMGR2	
	MDEVRRR	Hb3	MRRXX
	METHRR	Gh1	MXRRX
	MDVHRR	Mt3	MXXRR
	MDLHRR	Gm2	MRXRX
	MEASRR	Gh2	MXRRX
Group III	MKKK	At-HMGR1L	
	MKVK	Md2	
	MDVQRQR	Ta1	
	MDVQQK	Mt5	
	MDVHQR	Ps2	
	MEHR	Ga1	
	MDTTGRLHHRKH	Hb1	
	MAVEGRRR	Os2	
	MEVQRQ	Mt4	
MEVRGG	Zm1		

Retention signal consensus
in the ER of animal cells

MRRXX
MXRRX
MXXRR
MRXRX
MXRRX

Figura I12. Motivo conservado N-terminal en las HMGR de plantas (adaptado de Campos and Boronat, 1995 y Leivar, 2003). Las isoformas de HMGR de plantas se pueden clasificar en tres grupos en función de la similitud de su motivo N-terminal conservado con el consenso de la señal de retención en el RE descrito en células animales (Schutze *et al.*, 1994). Las secuencias del grupo I tienen dos argininas en posiciones de 1 a 5 y, por tanto, se ajustan al consenso. Las secuencias del grupo II tienen las argininas un residuo más alejado hacia el extremo N-terminal y, por tanto, se desvían ligeramente del consenso. En las secuencias del grupo III existe mayor diversidad de aminoácidos básicos y de su posicionamiento respecto al extremo N-terminal. Los aminoácidos básicos (R, K y H) se destacan en rojo. Las secuencias han sido deducidas a partir de clones de cDNA o ESTs depositadas en las bases de datos públicas. El número de acceso de las secuencias en el GenBank y la especie a la que pertenecen son los siguientes: **At-HMGR1S** (P14891), **AtHMGR1L** (AAB35696) i **At-HMGR2** (P43256) d'*Arabidopsis thaliana*; **Aa1** (AAA68965) i **Aa2** (AAA68966) d'*Artemisia annua*; **Bv1** (BI543436) de *Beta vulgaris*; **Ca1** (AAB69726), **Ca2** (AAB69727) i **Ca3** (P48021) de *Camptotheca acuminata*; **Cm1** (BAA36291) de *Cucumis melo*; **Cpa** (AAD28179) de *Capsicum annum*; **Cr1** (Q03163) de *Catharanthus roseus*; **Gm1** (AW132229) i **Gm2** (BE211556) de *Glycine max*; **Ga1** (BF277945) de *Gossypium arboreum*; **Gh1** (AAC05088) i **Gh2** (AAC05089) de *Gossypium hirsutum*; **Hb1** (P29057) i **Hb3** (Q00583) d'*Hevea brasiliensis*; **Ll1** (BG153912) de *Lupinus luteus*; **Le1** (L40938), **Le2** (P48022) i **Le3** (número no disponible) de *Lycopersicon esculentum*; **Lh1** (AW616289) de *Lycopersicon hirsutum*; **Lp1** (BG136352) i **Lp2** (BG137251) de *Lycopersicon pennellii*; **Md1** (AAK95406) i **Md2** (AAL03986) de *Malus x domestica*; **Mt1** (BG644380), **Mt2** (BE999267), **Mt3** (AW685537), **Mt4** (AW686600) i **Mt5** (AW584544) de *Medicago truncatula*; **Mc1** (BE577251) de *Mesembryanthemum crystallinum*; **Ma1** (AAD03789) de *Morus alba*; **Ns1** (Q01559) de *Nicotiana sylvestris*; **Nt1** (AAB87727) de *Nicotiana tabacum*; **Os1** (P48019), **Os2** (CAA92821) i **Os3** (AAD38873) d'*Oryza sativa*; **Ps1** (AAL37041) i **Ps2** (número no disponible) de *Pisum sativum*; **Rs1** (S29622) i **Rs2** (S29623) de *Raphanus sativus*; **St1** (P48020), **St2** (AAB52551), **St3** (AAB52552) i **St4** (BE472635) de *Solanum tuberosum*; **Te1** (AAC15475) i **Te2** (AAC15476) de *Tagetes erecta*; **Ta1** (BE430132) de *Triticum aestivum*; i **Zm1** (CAA70440) de *Zea mays*.

La proteína quimérica 1S:GFP constituída por la fusión de dominio N-terminal de HMGR1S a GFP se localiza en estructuras retículo-vesiculares de tamaño variable (0,5 – 2 μm) (Figura I10). La sustitución del motivo conservado de argininas en el extremo N-terminal de 1S:GFP por residuos de alaninas (RRR4-6/AAA) dio lugar a una variante quimérica denominada $\Delta\text{R1:GFP}$ (Leivar, 2003). La expresión transitoria de esta variante por microbombardeo en hojas de *A. thaliana* indica que la quimera $\Delta\text{R1:GFP}$ se localiza exclusivamente en la trama de RE (Leivar, 2003; Ferrero, 2010) (Figura I10E). Estos estudios indican que el motivo conservado de argininas en la región N-terminal citosólica de HMGR1S también desempeña un rol en la localización subcelular de la enzima, pues la sustitución de este motivo mediante mutagenesis dirigida fue suficiente para evitar su transporte a estructuras vesiculares.

Aunque el dominio transmembrana de HMGR se inserta co-traduccionalmente en el RE (Campos and Boronat, 1995), la distribución celular final podría estar determinada por otros elementos presentes en la región N-terminal. La región N-terminal de HMGR determina la localización subcelular de la proteína y está implicada en la biogénesis de las estructuras vesiculares derivadas del RE (Antolín-Llovera, 2006; Ferrero, 2010).

1.5.2 PP2A.

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) en plantas consiste en un heterotrímero constituido por una subunidad catalítica de unos 36 kDa (PP2A-C o subunidad C), una subunidad estructural de 65 kDa (PP2A-A o subunidad PR65) y una subunidad reguladora (PP2A-B o subunidad del tipo B) la cual modula la actividad, especificidad y localización subcelular del complejo (Janssens and Goris, 2001) (Figura I13). La gran diversidad en esta enzima recae principalmente en las múltiples variantes de su subunidad reguladora, aunque también se debe a diversidad en las subunidades A y C. En *A. thaliana*, por ejemplo, se han identificado 16 variantes de subunidad del tipo B, que se clasifican en tres grupos, B, B' y B'', que no tienen relación filogenética entre si. En esta especie existen tres variantes de subunidad PP2A-A y cinco de subunidad PP2A-C. Por tanto, en *A. thaliana* se pueden formar en total 240 variantes de PP2A por combinación de las distintas isoformas de las subunidades A, B y C.

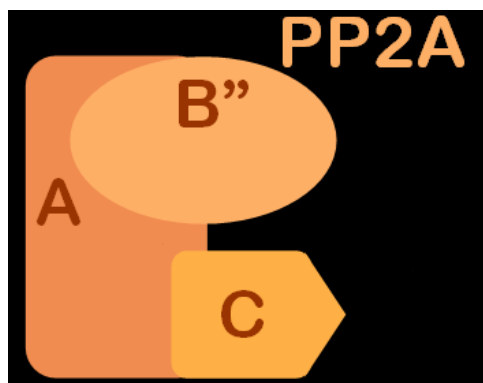


Figura I13. Representación esquemática de la PP2A. Subunidad catalítica (C), subunidad estructural (A) y subunidad reguladora (B'').

Las subunidades reguladoras AtB'' α y AtB'' β de PP2A, interactúan con la región citosólica N-terminal (NT) de las isoformas HMGR1S y HMGR1L y no interactúan con HMGR2 (Leivar *et al.*, 2011) (Figura I14). Esto indica que la región N-terminal de HMGR de *A. thaliana* está implicada en la especialización funcional de la enzima.

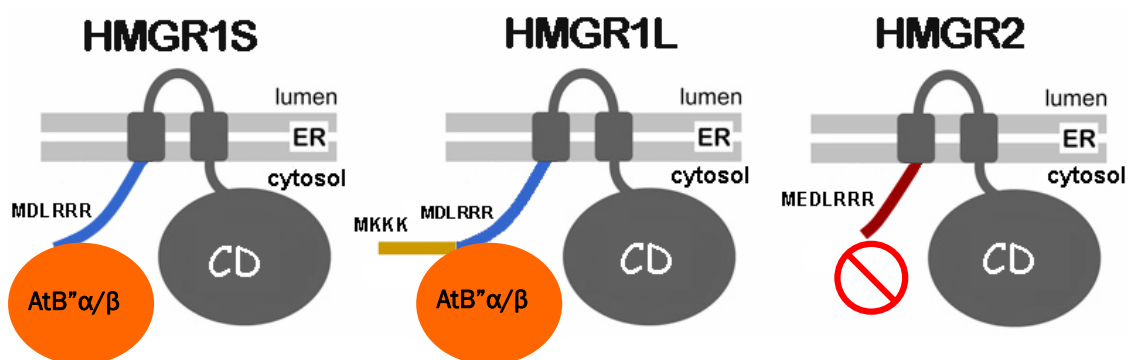


Figura I14. Representación esquemática de la interacción de HMGR con las subunidades reguladoras de PP2A. La AtB'' α y AtB'' β interactúan con la zona en común entre la región N-terminal de HMGR1S y HMGR1L. Estas proteínas no interactúan con HMGR2.

Estudios previos han permitido determinar que la interacción de AtB'' α está limitada a una secuencia peptídica de 11 residuos [RRRPPKPPVTN] presente en las isoformas HMGR1S (posiciones 4 – 14, respecto al extremo N-terminal) y HMGR1L (posiciones 54 – 64). Este péptido puede ser dividido en dos regiones: 1. El motivo de argininas [RRR] conservado en la mayoría de isoformas de HMGR de plantas y 2. Una secuencia rica en residuos de prolina [PPKPPVTN], necesaria para la interacción específica. La isoforma HMGR2 de *A. thaliana* carece de la secuencia rica en prolinas, por lo que no une AtB'' α ni AtB'' β (Leivar, 2003).

En muchas ocasiones los motivos de prolina están implicados en la interacciones proteína-proteína (Kay *et al.*, 2000). Este tipo de secuencia adopta una conformación de

hélice extendida levógira, la cual presenta una superficie hidrofóbica accesible y diferentes residuos que pueden establecer puentes de hidrógeno. Los motivos de prolina están típicamente implicados en interacciones moduladas transitoriamente y participan en procesos que requieren una rápida respuesta a través de interacciones proteína-proteína, como el inicio de las cascadas de señalización. En algunos casos, se ha verificado que la fosforilación sobre residuos adyacentes a la región de prolinas determina la interacción con otras proteínas. La interacción HMGR1S-AtB'' α posee muchas de estas características. Primero, esta interacción se encuentra restringida a una región corta de 11 aminoácidos con una región rica en residuos de prolina y localizada en la región N-terminal de HMGR1S. Por otro lado, ha sido verificado que el calcio actúa como modulador en esta interacción (Antolín-Llovera, 2006), lo que sugiere que está regulada y es probablemente un proceso transitorio. Finalmente, en la región adyacente al motivo rico en prolinas en HMGR1S, se han identificado residuos de serina y treonina, cuya fosforilación podría modular la interacción (Leivar *et al.*, 2003).

Se ha determinado que AtB'' α y PP2A modulan la localización subcelular de HMGR1S en *A. thaliana*. Ensayos de expresión transitoria de 1S:GFP por microbombardeo en hojas, muestran que la quimera se localiza en estructuras retículo-vesiculares de tamaño variable (0.5 – 2 μ m) (Figura I15A), aunque también se observan agregados de mayor tamaño en algunas células (Figura I15B). Sin embargo, en plantas tratadas con cantaridina, un inhibidor de PP2A, se observa que la 1S:GFP se localiza únicamente en la trama reticular en una mayor proporción de células (Figura I15C) (Antolín-Llovera, 2006).

La participación de PP2A en el control de la localización subcelular de HMGR también está respaldada por el estudio de mutantes, entre ellos, *rcn1-1* que es *knock-out* para la isoforma mayoritaria de la subunidad A de PP2A disminuyendo su actividad en un 50 % (Deruère *et al.*, 1999), y *B'' α -1*, *B'' α -2* y *B'' α -3* que son líneas *knock-out* para la isoforma AtB'' α de la subunidad B de PP2A, que es la que interacciona con la región N-terminal de HMGR1S y HMGR1L (Leivar, 2003). La 1S:GFP se localiza principalmente en la trama reticular tanto en la línea *rcn1-1* (Figura I15D), como en las tres líneas mutantes *B'' α -1*, *B'' α -2* y *B'' α -3* (Figura I15 E – G), observándose una reducción notable en el número de células con patrón retículo-vesicular y con estructuras de agregación (Antolín-Llovera, 2006). Estos resultados sugieren que PP2A está implicada en el transporte de 1S:GFP y/o en la formación de estructuras vesiculares, probablemente a través de un proceso de desfosforilación en algún residuo en la región N-terminal de HMGR.

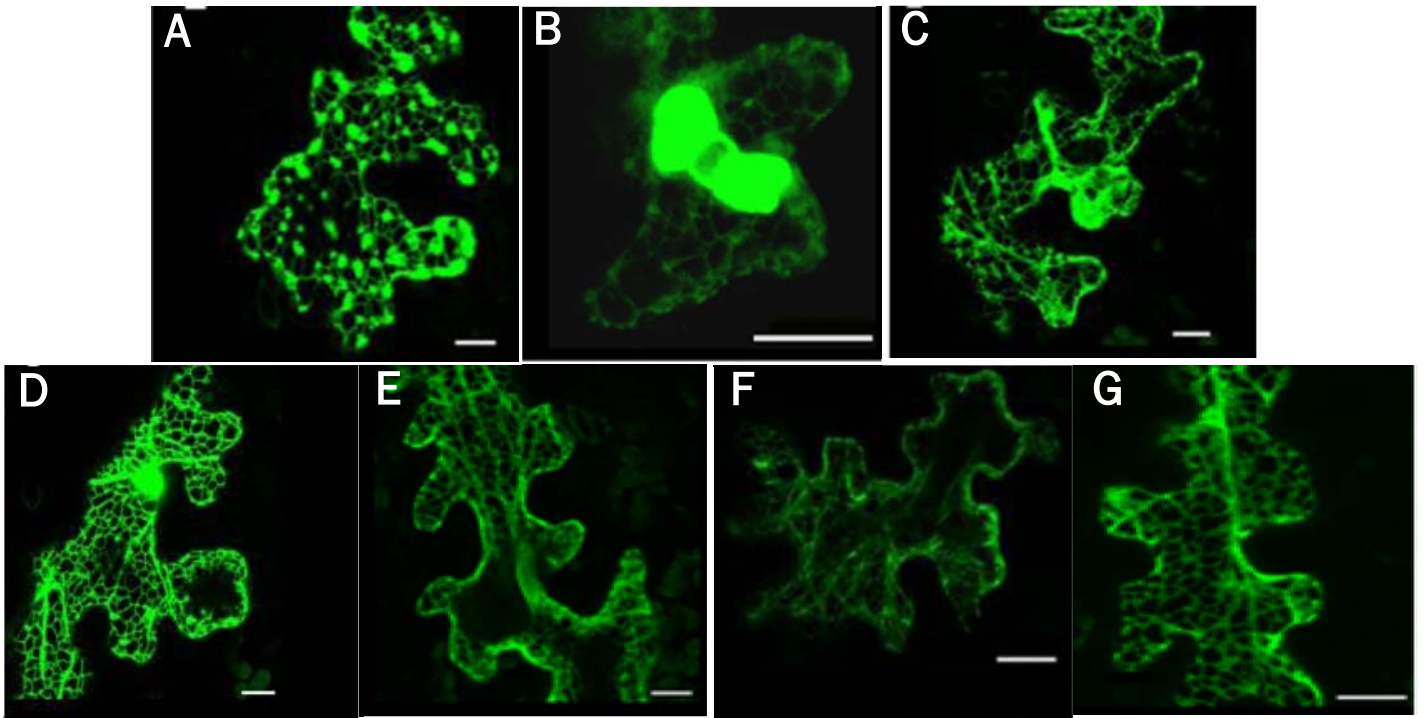


Figura I15. Localización subcelular de la quimera 1S:GFP en células epidérmicas de *A. thaliana*. Hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* de fueron micro-bombardadas con la construcción 1S:GFP. **A y B.** Línea con fondo genético Columbia. **C.** Tratamiento con 10 μ M de cantaridina. **D.** Línea mutante *rcn1-1*. **E.** Línea mutante *B'' α -1*. **F.** Línea mutante *B'' α -2*. **G.** Línea mutante *B'' α -3*. En la muestra tratada con cantaridina (C) y en las líneas mutantes (D, E, F y G) se observa un menor número de células con estructuras vesiculares y agregados de 1S:GFP. Las barras indican 10 μ m. (Extraído de Antolín-Llovera, 2006).

1.5.3 Región 1L-Extra.

En ensayos de expresión transitoria de la quimera 1S:GFP en *A. thaliana* se observa que esta se localiza en estructuras vesiculares conectadas con la trama de RE (Figura I10B). En contraposición la quimera 1L-GFP se localiza sólo en la trama de RE (Figura I10C) (Leivar, 2003). Puesto que la única diferencia entre ambas construcciones es la presencia de la región 1L-Extra del dominio N-terminal de la segunda, estas observaciones indican que dicha región determina la localización diferencial entre las isoformas HMGR1S y HMGR1L (Leivar, 2003). Para profundizar en el estudio del control de la localización subcelular de HMGR, se utilizó la región N-terminal de la isoforma HMGR1L (NT1L) como sonda en un crivado de una librería de cDNA de *A. thaliana* por doble híbrido en levadura (Leivar, 2003). Se identificaron tres proteínas, dos de ellas corresponden a subunidades reguladoras de PP2A (AtB'' α y AtB'' β) que interactúan con la región común en el extremo N-terminal de HMGR1S y HMGR1L (véase Sección 1.5.2), mientras la tercera proteína tiene similitud a la cadena ligera de quinesina tipo I descrita en animales, denominada como AtKLC-1 y que interactúa únicamente con la HMGR1L a través la región extra de 50 aminoácidos (1L-Extra) (Figura I16). AtKLC-1 no

interacciona con el dominio catalítico de HMGR1, tampoco con HMGR1S o HMGR2, ni con otras enzimas de la vía del mevalonato como HMGS o MVK (Leivar, 2003).

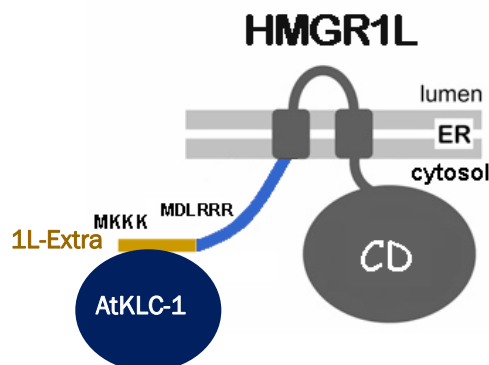


Figura I16. Representación esquemática de la interacción de la cadena ligera de quinesina tipo I (AtKLC-1) con la región 1L-Extra de HMGR1L.

AtB^α y AtB^β interactúan con el motivo conservado de argininas y su implicación en el control de localización subcelular de HMGR y en la biogénesis de vesículas asociadas a la trama de RE ha sido comentado en la Sección 1.5.2. AtKLC-1 podría ser la cadena ligera de quinesina de tipo I y podría estar implicada también en el control de localización subcelular.

Las quinesinas son una familia de proteínas motoras asociadas a los microtúbulos que están implicados en muchos procesos esenciales para la organización y el funcionamiento de la célula eucariota, como el transporte de vesículas, orgánulos, la formación y elongación del huso acromático, la segregación de cromosomas, la dinámica de microtúbulos o la morfogénesis celular (Manning and Snyder, 2000; Goldstein, 2001; Lawrence *et al.*, 2002). La quinesina de tipo I o convencional fue identificada en el axón gigante de calamar *Loligo pelai* (Vale *et al.*, 1985). Esta proteína es un tetrámero formado por dos cadenas pesadas (subunidades KHC) y dos cadenas ligeras (subunidades KLC) (Figura I16). La KHC se une a microtúbulos y lleva a cabo la función motora, mientras que KLC está implicada en el reconocimiento de la proteína que actúa como receptora para el transporte (Vale and Fletterick, 1997).

Se distinguen cuatro regiones en la estructura primaria de KLC: La región en el extremo N-terminal, una región de 200 residuos que interactúa con la KHC mediante una estructura de *coiled-coil* formada normalmente por repeticiones de siete aminoácidos denominada *heptad repeats* (HR) (Gauger and Goldstein, 1993), la región central formada por cinco o seis repeticiones de 34 aminoácidos (TPR de *tetratricopeptid repeats*) implicada en la interacción con la molécula o estructura transportada, y finalmente la región en el extremo C-terminal que es la menos conservada en longitud y

secuencia y podría estar relacionada con la localización subcelular y control de la quinesina (Figura I17).

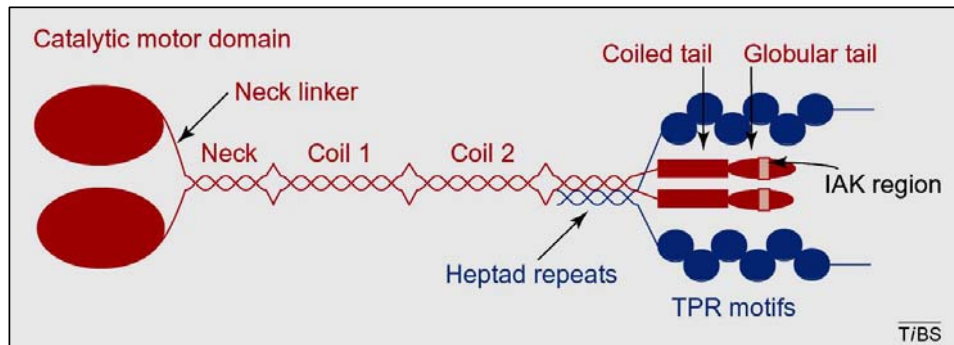


Figura I17. Estructura de la quinesina de tipo I o convencional. La quinesina I es un tetrámero formado por 2 cadenas pesadas (KHC) (en rojo) y dos cadenas ligeras (KLC) (en azul). (Adaptado de Verhey and Rapoport, 2001).

AtKLC-1 interacciona *in vitro* con el homólogo de KHC de *A. thaliana* (Antolín-Llovera, 2006), suponiendo que la quinesina de tipo I también existe en plantas. La cadena ligera de esta quinesina, AtKLC-1 interacciona con la región 1L-Extra de HMGR1L y podría estar implicada en su retención específica en la trama de RE, observada en los ensayos de microbombardeo. La región 1L-Extra también podría estar implicada en la regulación de la actividad enzimática de HMGR1L que podría ser controlada de modo específico (Antolín-Llovera, 2006).

1.6 Regulación de la actividad de HMGR.

La HMGR en mamíferos y levaduras ha sido estudiada ampliamente confirmando su rol como catalizador de un paso limitante en la biosíntesis de colesterol y ergosterol, respectivamente (Goldstein *et al.*, 1990; Hampton *et al.*, 2002). Tanto en levaduras como en células animales, el control sobre HMGR es selectivo y complejo, incluyendo una variedad de mecanismos reguladores, como el de retroinhibición en respuesta a los propios productos de la ruta del mevalonato. Los niveles proteicos y actividad HMGR son reguladas por la concentración final de los productos finales de la vía, principalmente esteroides (Hampton *et al.*, 1996). Los esteroides regulan no sólo los niveles de transcrito sino también la traducción y la estabilidad de la proteína.

La HMGR se controla de manera muy sensible especialmente en mamíferos, donde responde a los niveles de esteroles sanguíneos (Goldstein *et al.*, 1990; Hampton *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1999a). En mamíferos, la enzima también está regulada por fosforilación reversible de un residuo de serina conservado y localizado en el dominio catalítico (Halford and Hardie, 1998).

En plantas, también se ha propuesto que los productos finales de la ruta del mevalonato están implicados en la regulación de la actividad enzimática HMGR. Algunos productos de naturaleza isoprenoide como las citoquininas o los brasinoesteroides se encontrarían involucrados en esta regulación por retroinhibición (Stermer *et al.*, 1994; Cowan *et al.*, 1997). Durante el desarrollo se incrementan los niveles de actividad HMGR en tejidos que tienen una tasa de división celular y crecimiento elevados (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013). Este hecho ha sido relacionado con los altos requerimientos de esteroides para la biosíntesis de nuevas membranas celulares en estos tejidos. Por ejemplo, en hojas jóvenes de plantas de patata y *Arabidopsis*, con elevados niveles de división celular, se requiere una elevada actividad HMGR, en contraste con las hojas maduras (Learned and Connolly, 1997; Korth *et al.*, 2000). Se observó que la actividad HMGR es elevada durante el desarrollo del fruto de tomate, mientras se esté produciendo división celular y elongación (Rodríguez-Concepción and Grissem, 1999). En *A. thaliana* también se encontró actividad HMGR muy reducida en tejidos maduros (Enjuto *et al.*, 1994; Lumbreras *et al.*, 1995; Manzano *et al.*, 2004).

La actividad HMGR es también regulada por distintos factores medioambientales (Figura I18). La inducción de la actividad HMGR en respuesta a herida y al ataque por patógenos, está relacionado con una necesidad de producir esteroides para la reparación de membranas en la célula y la síntesis de fitoalexinas como mecanismo de defensa. El ataque por hongos en patata, promueve la expresión de los genes *HMG2* y *HMG3* (Choi *et al.*, 1992), mientras que en tomate es el gen *HMG2* el que es inducido (Rodríguez-Concepción and Grissem, 1999).

Los casos anteriores contrastan con lo observado en *A. thaliana*. En esta planta, la actividad HMGR está controlada negativamente por herida y metil jasmonato (MeJA), fitohormona que media dicha respuesta (Ribeiro, 2009). Para estudiar este fenómeno, se utilizaron los mutantes de *A. thaliana* *aos*, defectivo en síntesis de MeJA, y *coi1-1* que tiene bloqueada la señalización de dicha hormona (Ribeiro, 2009). AOS es una enzima tipo citocromo P450 que cataliza la reacción de deshidratación del ácido hidroperoxilínoleico, en ausencia de NADPH y oxígeno. Esta reacción constituye el segundo paso en la biosíntesis de ácido jasmónico (JA). La biosíntesis de todos los tipos de jasmonatos biológicamente activos está completamente bloqueada en líneas mutantes *aos* (Park *et al.*, 2002). Por otro lado, líneas mutantes *coi1-1* son insensibles a la acción de MeJA, pues son defectivos en su receptor (Feys *et al.*, 1994). En plantas silvestres de *A. thaliana* de dos semanas, la actividad HMGR disminuye un 50 % 20 min después de agresión por herida, en tanto que dichos niveles se mantienen estables en plantas mutantes *aos* sometidas al mismo tratamiento. La actividad HMGR también se mantiene

inalterada después del tratamiento con MeJA en plantas mutantes *coi1-1*. Cuando plantas silvestres de *A. thaliana* son esprayadas con MeJA, la actividad HMGR disminuye al 50 % en tan sólo 5 min (Ribeiro, 2009). Estas observaciones confirman el control de HMGR por herida y MeJA.

En plántulas de guisante, se demostró que la actividad HMGR disminuye de un 30 a 35 % debido a mecanismos de regulación post-traducciona (Russell *et al.*, 1985). En tubérculos de patata y en algas (*Ochromonas malhamensis*), la actividad HMGR es inducida mediante tratamiento con mevinolina (inhibidor específico de HMGR), posiblemente como mecanismo para contrarrestar el bloqueo de la ruta del MVA (Stermer, 1994). En células de tabaco, la mevinolina también incrementa la actividad HMGR (Hemmerlin and Bach, 2000). En frutos de avocado se ha determinado que una aportación de esteroides exógenos inhibe su desarrollo debido a un incremento en la degradación de HMGR (Cowan *et al.*, 1997).

La HMGR en plantas también está regulada por el calcio. En *Hevea brasiliensis* la proteína calmodulina parcialmente purificada, en presencia de calcio, es capaz de incrementar en más del doble la actividad HMGR en extractos proteicos totales (Stermer *et al.*, 1994). Resultados recientes indican que en *A. thaliana* el calcio favorece la interacción de subunidades reguladoras B'' de PP2A con las isoformas HMGR1S y HMGR1L (codificadas por el gen *HMG1*) (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2006). Estas subunidades de PP2A tienen dos motivos conservados de unión a calcio (*EF-hands*). El secuestro de calcio por la adición de un quelante durante la preparación del extracto de *A. thaliana* produce niveles máximos de actividad HMGR. Por el contrario, la adición de calcio en la extracción disminuye la actividad HMGR a niveles mínimos (Antolín-Llovera, 2006). Al mismo tiempo se pudo comprobar que el aumento de actividad HMGR en extractos de plantas de *A. thaliana* es susceptible a inhibición por calcio cuando esta es debida a la sobreexpresión de la isoforma HMGR1S entera, pero es insensible al calcio cuando es debida a la sobreexpresión del dominio catalítico de la enzima (Antolín-Llovera 2006). PP2A es un regulador negativo de HMGR, probablemente por desfosforilación de un residuo específico, y la interacción de PP2A con el dominio N-terminal de las isoformas HMGR1S y HMGR1L de *A. thaliana* (véase Sección 1.5.2) está mediada por calcio.

Plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobre-expresan el dominio catalítico de HMGR (línea H1CD/2) tienen una actividad 6000 veces superior a las que sobreexpresan la proteína completa (línea H1S/3). El calcio inhibe la actividad HMGR en un 92 – 93 % en la línea que sobreexpresa HMGR1S (línea H1S/3). En cambio, en extractos de la línea de sobreexpresión del dominio catalítico CD1 (línea H1CD/2), el calcio no provoca inhibición.

Dado que los niveles de proteína CD1 son prácticamente los mismos que de proteína HMGR1S en las líneas transgénicas correspondientes, se puede concluir que el dominio de membrana de HMGR1S interviene en la represión por calcio de la actividad HMGR (Antolín-Llovera, 2006).

En *A. thaliana*, la luz disminuye la actividad HMGR mediante un proceso de regulación dependiente de foto-receptor parecido a fitocromo (Learned, 1996; Learned and Connolly, 1997). Se ha establecido una relación inversamente proporcional entre la cantidad de luz durante el crecimiento de la planta y los niveles de actividad HMGR. Por tanto, las plantas crecidas en oscuridad tienen unos niveles de actividad HMGR elevados. Durante el desarrollo de las plantas de *A. thaliana* en condiciones de oscuridad, los genes *HMG1* y *HMG2* tienen niveles de expresión elevados. La luz suprime la expresión del gen *HMG1*, dependiendo de la intensidad de radiación y de la calidad del espectro de luz (Learned, 1996; Learned and Connolly, 1997). El estudio de plantas mutantes para los foto-receptores Cry1 (inducido por luz azul) y PIB (inducido por luz roja), muestra que estos mutantes presentan un incremento en los niveles de expresión de los genes *HMG1* y *HMG2*. Por tanto, los foto-receptores participan modulando la actividad HMGR (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). El fotoperiodo también afecta a la actividad HMGR. En plantas de *A. thaliana* crecidas en condiciones de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad), la actividad HMGR es más elevada que en plantas crecidas en día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) (Manzano *et al.*, 2004). Se han descrito excepciones al principio de inhibición de HMGR por luz, como en el caso de la patata, en la cual la cantidad de proteína HMGR está regulada negativamente a nivel post-traducciona l en condiciones de oscuridad (Korth *et al.*, 2000).

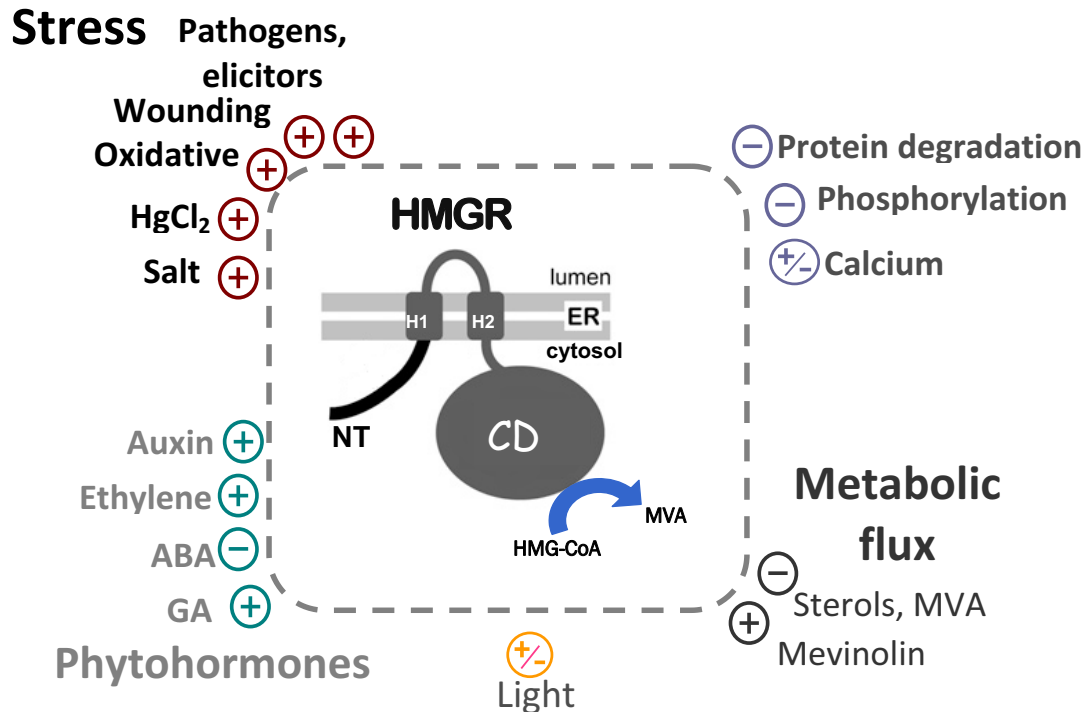


Figura 118. Factores que influyen en la actividad HMGR de plantas. En el lado izquierdo y abajo se observan los diferentes estímulos que afectan la actividad HMGR y arriba a la derecha se presentan posibles mecanismos de regulación.

2. ORGANIZACIÓN Y MORFOGÉNESIS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.

Todas las células eucariotas tienen un retículo endoplasmático (RE) que se desarrolla como una red de membranas y cisternas morfológicamente continuas. La superficie de la membrana del RE ocupa cerca de la mitad del área total de las membranas en la célula (Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). El RE es un organelo dinámico y multifuncional cuya función más prominente consiste en la síntesis de lípidos de membrana, proteínas de membrana y proteínas de secreción (Matsushima *et al.*, 2003a). A pesar de que ciertas proteínas, como las chaperonas del RE, BiP y la proteína disulfuro isomerasa, parecen estar distribuidas por todo el RE (Sitia and Meldolesi, 1992), otras proteínas se encuentran limitadas a regiones específicas del mismo. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa, que es utilizada habitualmente como marcador de RE liso (Galteau *et al.*, 1985), y las proteínas de almacenamiento y liberación de calcio, que se encuentran en regiones especializadas del RE (Sitia and Meldolesi, 1992). Aunque las membranas del RE son físicamente continuas, el RE está constituido por múltiples subdominios (Vertel *et al.*, 1989; Sitia and Meldolesi, 1992; Staehelin, 1997). Algunos de ellos tienen diferencias morfológicas, como el RE liso, el RE rugoso, el RE transicional y la envoltura nuclear (Rose and Doms, 1988). El RE forma la envoltura nuclear y se extiende a lo largo de la periferia celular en una red interconectada de cisternas planas y túbulos. La gran diversidad de morfologías de RE observado en distintas especies y tipos celulares, dejan poco claro los mecanismos involucrados que dan forma a las membranas de RE y que regulan su contenido en la célula (Barlowe, 2009). Sin embargo, se han estudiado proteínas pertenecientes a la familia de los reticulones, como la Rtn1 que es requerida para la formación eficiente de los túbulos de RE, y que junto con DP1 inducen la formación de curvaturas en las membranas de RE (Voeltz *et al.*, 2006; Tolley *et al.*, 2008; West *et al.*, 2011). Por otro lado, también se han estudiado proteínas de la familia de las dinaminas como la Atlastin-GTPasa (proteína G), que cumple un rol en la fusión y fisión de membranas de RE para formar las ramificaciones características de la trama reticular (Barlowe *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011).

2.1 Papel de HMGR en la biogénesis de membranas reticulares.

Estudios previos en mamíferos y levaduras revelaron la capacidad del dominio de membrana de HMGR para inducir proliferación y estructuración de RE liso con formaciones características. Las levaduras expresan dos isoformas funcionales de HMGR: Hmg1p y Hmg2p (Basson *et al.*, 1986). Cada isoforma desencadena la proliferación de membranas en distintas partes de la célula, lo que refleja su destino subcelular particular (Koning *et al.*, 1996). La Hmg1p da lugar a formación de *karmellae*, que están

constituidas por apilamiento de pares de membranas de RE liso alrededor del núcleo (Wright *et al.*, 1998) (Figura I19). La Hmg2p induce apilamientos de membranas de RE liso en zonas más periféricas y regiones cortas de *karmellae* (Koning *et al.*, 1996). Diversas quimeras que tienen el dominio de membrana de Hmg1p unido a secuencias de otras proteínas inducen la proliferación de membranas de RE similares a los generados por la HMGR original (Parrish *et al.*, 1995). Esto indica que el dominio de membrana de HMGR de levadura es suficiente para inducir morfogénesis en RE. Sin embargo, hay evidencias que indican que determinadas secuencias del dominio catalítico también son necesarias para dicho proceso (Profant *et al.*, 1999).

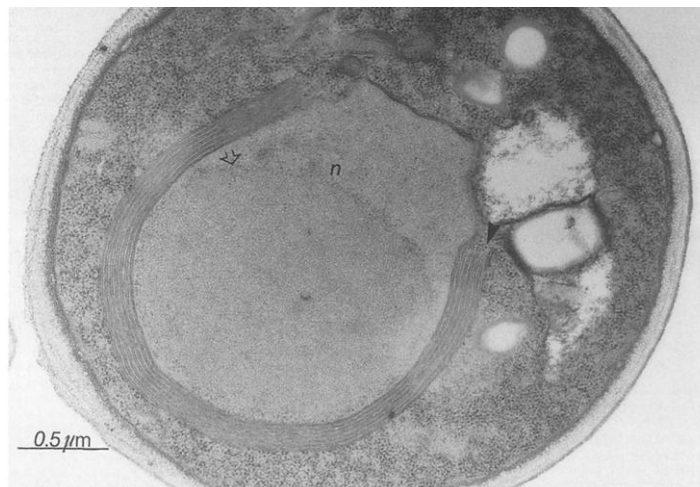


Figura I19. Karmellae peri-nucleares en células de levadura que sobre-expresan la isoforma Hmg1p. Se observan membranas de RE liso, asociadas en pares, que se acumulan y engloban casi totalmente la membrana nuclear. n: núcleo. La barra indica 0.5 μm. (Extraído de Wright *et al.*, 1988).

La proliferación de membranas de RE liso en respuesta a sobreexpresión de HMGR, no ocurre únicamente en levaduras. En células de mamífero, la HMGR induce la formación de apilamientos de RE liso, con sección de celdillas hexagonales, denominado RE cristaloides (Chin *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1983; Orci *et al.*, 1984; Kochevar and Anderson, 1987). En la línea celular UT-1, seleccionada mediante exposición a concentraciones crecientes de compactina, la actividad HMGR es 500 veces superior a la de la línea parental CHO (células de Ovario de Hamster Chino) (Chin *et al.*, 1982). Las células UT-1 acumulan la HMGR sobreproducida en agregados de RE cristaloides (Anderson *et al.*, 1983; Orci *et al.*, 1984) (Figura I20). La sobreexpresión de la proteína truncada que sólo contiene el dominio catalítico incrementa los niveles de actividad enzimática, pero sin que aparezca RE cristaloides, demostrando que el dominio de membrana de HMGR determina el acúmulo de RE y que la proliferación de membranas no es una consecuencia del incremento de la actividad HMGR (Jingami *et al.*, 1987). Estudios cinéticos de la formación de RE cristaloides indican que la HMGR se inserta primero en la cara exterior de la membrana nuclear (Pathak *et al.*, 1986). Si la sobre-

producción persiste, emergen pliegues de membranas para formar estructuras lamelares, que son luego transformadas en RE cristaloides. Cuando la síntesis de HMGR es reprimida después de la formación de estructuras cristaloides, la HMGR es degradada y estas estructuras de RE desaparecen (Orci *et al.*, 1984).

Las estructuras de RE cristaloides no son exclusivas de cultivos celulares de mamífero, transfectados o sometidos a presión de selección, sino que se producen durante el desarrollo normal de determinados órganos. Formaciones de RE cristaloides aparecen en las glándulas suprarrenales del feto de cobaya el día 21 de la gestación, precisamente cuando sus células empiezan a sintetizar elevados niveles de hormonas esteroideas derivadas de MVA (Fawcett, 1981). Los cambios moleculares asociados a esta hipertrofia de RE liso son desconocidos por el momento.

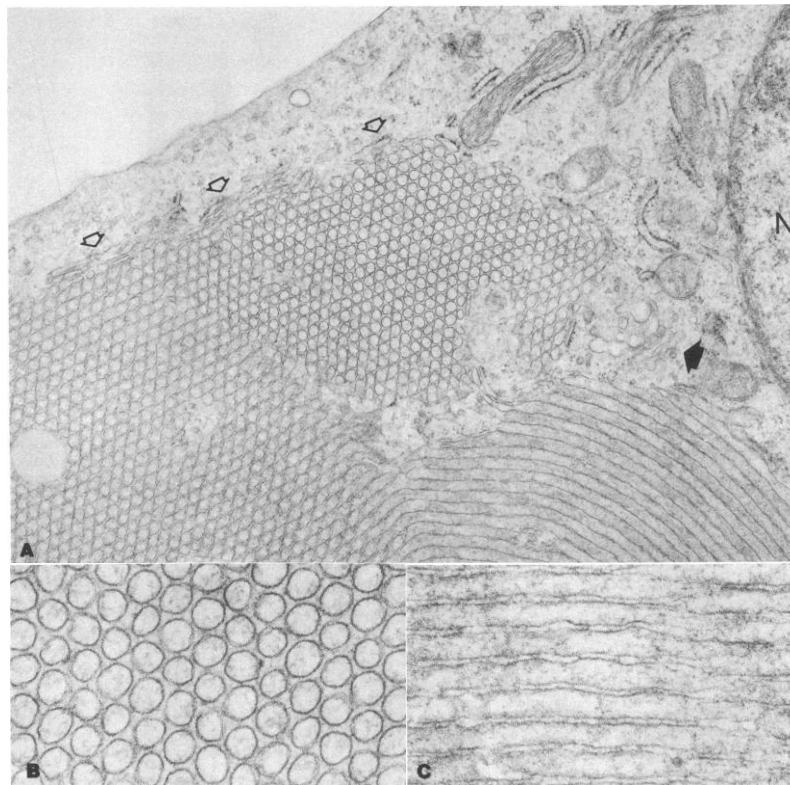


Figura I20. Estructura cristaloides de RE en la línea celular UT-1. Las células fueron crecidas por 5 días y procesadas para microscopía electrónica. **A.** Membranas dispuestas en diferentes orientaciones. Las flechas abiertas indican el RE rugoso. Las flechas negras indican el aparato de Golgi. N: núcleo. **B.** Imagen aumentada de una sección transversal. **C.** Imagen aumentada de una sección longitudinal. A, x33000; B y C, x81000. (Extraído de Chin *et al.*, 1982).

Experimentos de expresión transitoria en células epidérmicas de *A. thaliana* y cebolla revelaron que el dominio de membrana de la isoforma HMGR1S de *A. thaliana* también podría tener efecto morfogénico sobre RE. Este dominio unido a GFP (quimera 1S:GFP) dirige la proteína a la trama de RE, pero se acumula sobretudo en unas vesículas,

aproximadamente esféricas, de naturaleza desconocida y tamaño variable (de 0,5 a 2 μm de diámetro), próximas a dicho orgánulo (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010) (véase Sección 1.4). Estas vesículas no están presentes en el RE original de las células, que pudo ser visualizado mediante transfección en paralelo de marcadores de lumen de RE (Ferrero, 2010). Por tanto, la formación de las estructuras vesiculares es debida a la expresión de 1S:GFP (Ferrero, 2010). Estas vesículas eran altamente fluorescentes, lo cual indicó que acumulaban gran cantidad de 1S:GFP y sugirió que podían estar formadas por membranas (Ferrero, 2010). Aunque su naturaleza era desconocida, se propuso que probablemente derivarían del RE y eran parte del sistema de endomembranas (Ferrero, 2010). Estas evidencias sugieren que el dominio de membrana de algunas variantes de HMGR de plantas también podría tener un efecto morfogenético sobre RE, pero son precisos nuevos abordajes experimentales para confirmar dicha conclusión.

Estudios cristalográficos indican que la proteína GFP puede formar dímeros con orientación anti-paralela (Yang *et al.*, 1996; Zacharias *et al.*, 2002). Cuando la GFP es incorporada a proteínas de membrana o, directamente, a secuencias de transmembrana de dichas proteínas y expresada en células de animales o vegetales, su capacidad de dimerización puede causar agregación del sistema de endomembranas. La ascorbato peroxidasa de *A. thaliana*, se localiza normalmente en la membrana de los peroxisomas que derivan del RE. Su expresión como proteína de fusión con GFP, da lugar a la formación de grandes agregados de membranas que pueden rodear por completo orgánulos enteros como mitocondrias (Mullen *et al.*, 2001). Dependiendo del grado de sobreexpresión, estas alteraciones pueden ser incompatibles con la viabilidad celular. En la línea celular COS-7, obtenida a partir de fibroblastos de riñón de mono, la expresión de GFP fusionada al dominio citosólico de diversas proteínas de transmembrana fue suficiente para provocar proliferación y agregación de retículo endoplasmático liso, que dió lugar a formaciones de membranas apiladas denominadas estructuras OSER por *Organized Smooth Endoplasmic Reticulum* (Snapp *et al.*, 2003).

La dimerización de la GFP puede ser prevenida mediante cambios puntuales en su secuencia aminoacídica (Zacharias *et al.*, 2002). Las sustituciones L221K, F223 y A206K disminuyen significativamente la capacidad de dimerización de la GFP sin afectar a su fluorescencia (Zacharias *et al.*, 2002). De entre ellas, la mutación A206K es la de efecto más drástico, pues aumenta la K_d del dímero en 670 veces y hace que éste sea prácticamente indetectable (Zacharias *et al.*, 2002) (Figura I21B). La expresión de proteínas de membrana fusionadas a GFP-L221K no generó estructuras OSER en células COS-7 (Snapp *et al.*, 2003), indicando que la dimerización de GFP podía contribuir

significativamente a la agregación de RE en este sistema. Sin embargo, en el sistema de expresión transitoria de *A. thaliana* la utilización de GFP monomérica A206K fusionada al dominio de membrana de HMGR1S (quimera 1S:GFPmono) (Figura I21C) indujo la formación de vesículas fluorescentes (Ferrero, 2010) (Figura I21D), indicando que el dominio de membrana de HMGR1S (1-178 aa) y no la capacidad de dimerización de GFP eran responsables de su aparición. Ante la evidencia de que la dimerización de GFP podía afectar a la morfogénesis de RE en células animales, pero no parecía ser necesaria para la alteración del sistema de endomembranas en células de *A. thaliana*, en la presente tesis se planteó la necesidad de retomar este análisis con nuevas aproximaciones experimentales.

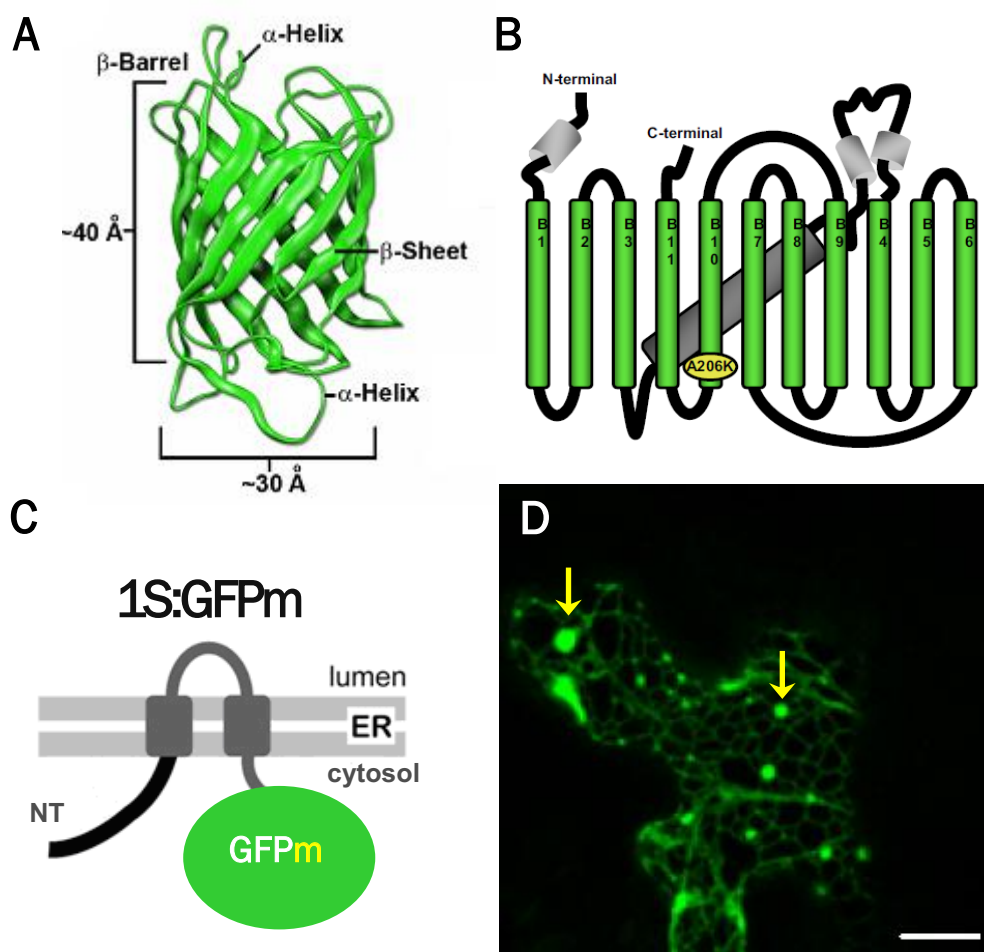


Figura I21. La GFP. **A.** Estructura terciaria. **B.** Representación esquemática. Se observa la presencia de 11 hojas plegadas β . El cambio del aminoácido Ala206 por Lisina en la hoja β 10 provoca la pérdida en la capacidad de dimerización de la GFP. **C.** Representación esquemática de la quimera 1S:GFP monomérica. **D.** Localización subcelular de la 1S:GFP monomérica. Hojas de roseta de planta de entre 10 y 20 días de *A. thaliana* fueron micro-bombardadas y observadas al microscopio confocal. Se observan células epidérmicas. Las barras indican 10 μ m (Extraído de Shaner *et al.*, 2007 y Ferrero, 2010).

2.2 Diversidad estructural y funcional del retículo endoplasmático en plantas.

Las proteínas destinadas a secreción son sintetizadas en el RE rugoso, caracterizado por la presencia de ribosomas unidos a su membrana. En el lumen del RE, estas proteínas sufren procesos de modificación como la formación de puentes disulfuro o la unión de oligosacáridos, antes de continuar su tránsito por medio del transporte vesicular. Las células vegetales se diferencian de las animales por la mayor variedad de vesículas derivadas del RE e involucradas en la acumulación de proteínas particulares (Chrispeels and Herman, 2000; Galili, 2004; Hara-Nishimura *et al.*, 2004; Herman and Schmid, 2004), que además tienen funciones específicas (Okita and Rogers, 1996) (Figura I22). Entre los compartimentos o vesículas derivadas del RE, se encuentran las vesículas COPII, caracterizadas por tener *coat protein II* en su envoltura y presentes en todas las células eucariotas, con un diámetro de 0,05 a 0,1 μm y que actúan como vesículas de transporte. En células vegetales, también existen otras vesículas mayores de RE, como los cuerpos proteicos, que tienen un diámetro de 1 a 2 μm y que se encargan del almacenamiento de proteínas como la prolamina en arroz (Okita and Roger, 1996; Herman and Larkins, 1999). Otra clase de vesículas específicas de plantas son las vesículas acumuladoras de precursores o PAC (*precursor accumulating*) de 0,3 a 0,5 μm de diámetro, que juegan un papel en el transporte de formas inmaduras de proteína en forma de agregados insolubles y que han de ser transportadas desde el lumen del RE (Hara-Nishimura *et al.*, 1998). Estas vesículas son características de la maduración de las semillas, pero también son inducidas en los órganos vegetativos, como hojas de roseta y raíces. Otros compartimentos característicos derivados del RE también aparecen en órganos específicos después de la germinación, como las vesículas KDEL, de 0.2 a 0.5 μm de diámetro, que acumulan cistein-proteasas que tienen una señal de retención (KDEL). Estas vesículas son responsables de la movilización y almacenamiento de proteínas después de la germinación (Toyooka *et al.*, 2000). Los ricinosomas, con 0.9 μm de diámetro, acumulan cistein-proteasas y podrían estar implicados en la muerte celular programada del endospermo (Schmid *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 1999 y Schmid *et al.*, 2001). Los cuerpos proteicos, las vesículas PAC y las vesículas KDEL tienen formas esféricas y se encuentran en semillas secas o germinadas, y sus tamaños son considerablemente mayores que las vesículas COPII. Recientemente, se han descrito unos organelos de RE denominados *ER bodies*, que son vesículas fusiformes mucho más alargadas (1 μm de diámetro máximo, por 10 μm de largo), inducidos en tejidos de la planta en respuesta a distintos tipos de estrés (Nishimura and Matsushima, 2003).

Debido a la versatilidad multifuncional del RE en plantas, parece probable que existan regiones especializadas de RE basados en sus propiedades funcionales (Okita and Rogers, 1996; Staehelin, 1997; Mullen et al., 1999; Choi et al., 2000; Chrispeels and Herman, 2000; Naested et al., 2000; Braun, 2001; Sami-Subbu et al., 2001; Hamada et al., 2003; Matsushima et al., 2003a). Estudios ultraestructurales señalan que ribosomas están presentes en la membrana de *ER bodies* (Hayashi et al., 2001). Se ha propuesto que proteínas como PYK10 son sintetizadas en la membrana de *ER bodies* y son translocadas a su interior, y que la expresión de esta proteína podría desencadenar la formación de este tipo de vesículas (Matsushima et al., 2003a,b).

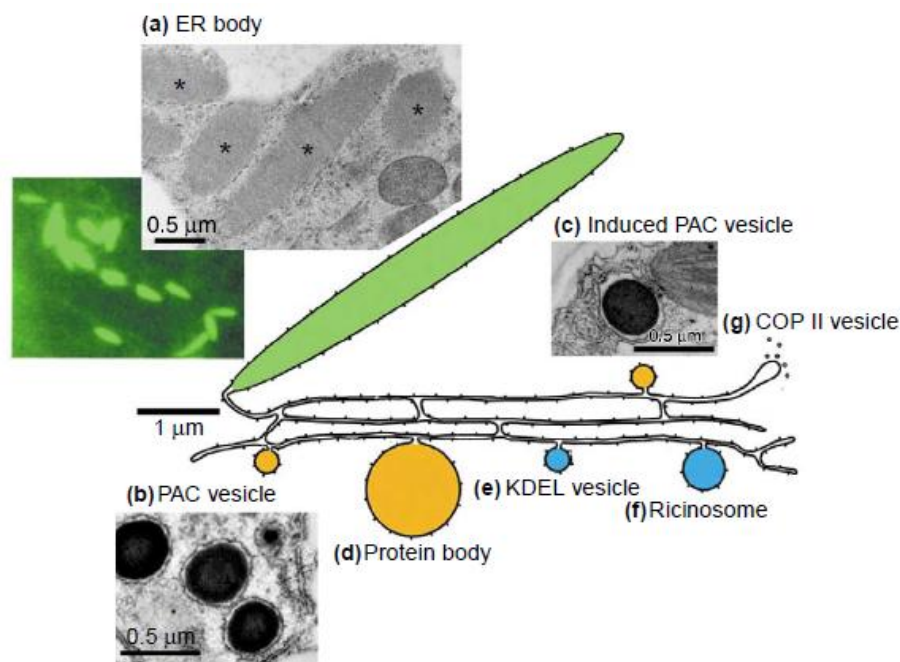


Figura 122. Representación esquemática de compartimentos derivados del RE en plantas. **A.** *ER bodies* (1 µm de diámetro por 10 µm de largo) en plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan GFP-HDEL. **B.** Vesículas PAC (0.3 - 0.5 µm). **C.** Vesículas PAC inducidas en hojas de *A. thaliana*. **D.** Cuerpos proteicos (1 - 2 µm) que acumulan proteínas insolubles. **E.** Vesículas KDEL (0.2 - 0.5 µm). **F.** Ricinosomas (0.2 - 0.5 µm). **G.** Vesículas COPII (0.05 - 0.1 µm) (Extraído de Hara-Nishimura and Matsushima, 2003).

2.3 *ER bodies*.

2.3.1 Naturaleza y morfología.

El término *ER bodies* fue propuesto por diversos autores a partir de la observación de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el marcador de lumen de retículo endoplasmático GFP-HDEL, (Haseloff et al., 1997, Ridge et al., 1999, Hayashi et al., 2001), pero también están presentes en plantas no transformadas (Hayashi et al., 2001; Nakano et al., 2014). En las células de las plantas GFP-HDEL, además de observarse la trama de RE, se encontraron numerosas estructuras fluorescentes alargadas y fusiformes

de 0.5 μm de ancho por 5 μm de largo, que fueron denominadas como *ER bodies* (Hayashi *et al.*, 2001). Dichos orgánulos fueron detectadas inicialmente en células epidérmicas de hipocótilo (Gunning, 1998; Haseloff *et al.*, 1997; Köhler, 1998), y en células epidérmicas de cotiledones jóvenes (Hayashi *et al.*, 2001) (Figura I23). Los *ER bodies* son estructuras dinámicas que se desplazan rápidamente por la trama de RE, cuya morfología es también cambiante. Los *ER bodies* pueden desplazarse linealmente a lo largo de fibras de RE o bascular sobre uno de sus extremos y sus movimientos son más rápidos que los de la trama de RE (Ferrero, 2010).

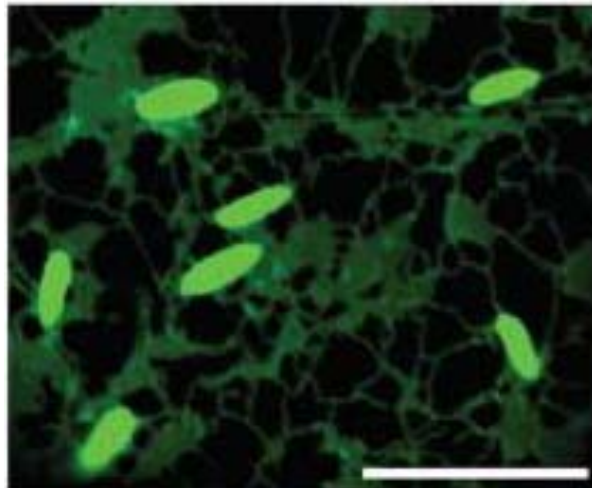


Figura I23. *ER bodies* en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* transgénica GFP-HDEL. La barra indica 10 μm . (Extraído de Matsushima *et al.*, 2004).

Los *ER bodies* habían sido observados anteriormente con microscopio electrónico (ME), en células epidérmicas y de cortex de raíz de rábano (*Raphanus sativus*), advirtiéndose que no eran estructuras comunes a todas las células vegetales. Al microscopio electrónico los *ER bodies* presentan forma de cisternas dilatadas con interior granular o en algunos casos fibroso, rodeado por una membrana que podía tener ribosomas (Behnke and Eschlbeck, 1978; Gunning, 1998). Además, estas estructuras parecían ser dilataciones del RE debido a que en algunos casos, se observó la continuidad del RE en sus extremos (Bonnet and Newcomb, 1965) (Figura I24).

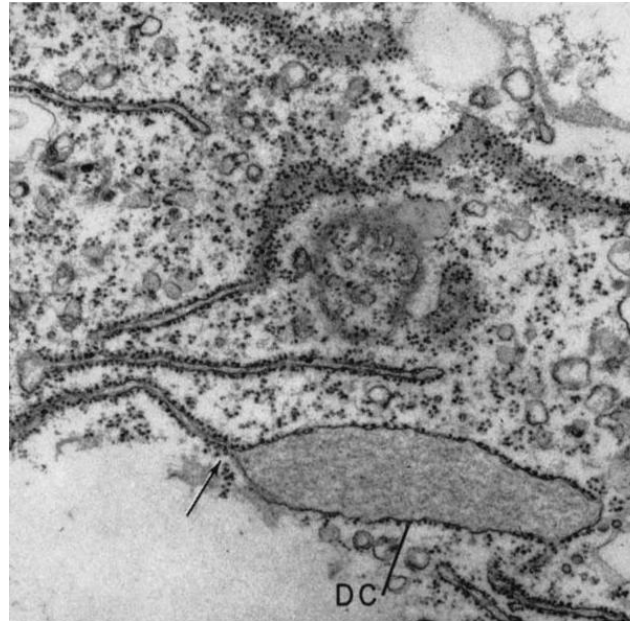


Figura I24. Microscopía electrónica de una sección de un pelo radicular de rábano, la flecha indica la conexión entre una cisterna dilatada (DC) y el RE rugoso. X33000. (Extraído de Bonnet and Newcomb, 1965).

Las cisternas dilatadas de RE que posteriormente fueron denominados como *ER bodies* (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2002), son comunes en los miembros de las familias *Brassicaceae* y *Capparaceae* estrechamente relacionados: *Raphanus sativus* (Bonnet and Newcomb, 1965), *Capparis spinosa*, *Cleome spinosa* (Iversen, 1970a,b; Behnke and Eschlbeck, 1978) *Lepidium sativum* (Iversen y Flood, 1969; Iversen *et al.*, 1983), *Sinapis alba* (Havelange and Courtoy, 1974), *Thlaspi arvense* (Hoefert, 1975) y *Arabidopsis thaliana* (Köhler, 1998; Haseloff and Siemering, 1998; Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura, 2003; Hara-Nishimura *et al.*, 2004, Matsushima *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2011). El orden *Brassicales* incluye a las familias *Brassicaceae*, *Resedaceae* y *Tovariaceae* (The Angiosperm Phylogeny Group, 2003). Agregados proteicos de *ER bodies* fueron observados en las vacuolas de *Tovaria pendula* (*Tovariaceae*) (Behnke and Eschlbeck, 1978). Sin embargo no se identificaron *ER bodies* en *Resedaceae* (Iversen, 1970b; Behnke and Eschlbeck, 1978). Estructuras similares a *ER bodies* han sido observadas en plantas no pertenecientes a *Brassicales*, como *California poppy* (*Eschscholtzia douglasii*) (Iversen, 1970b), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Hawes *et al.*, 2001) y *Mimosa pudica* (Esau, 1975). Un ejemplo en *L. sativum* ilustra cómo estos *ER bodies* con forma de cisternas dilatadas de 1 μm de largo, son distintos a otros orgánulos reconocidos como mitocondrias y aparato de Golgi (Figura I25).

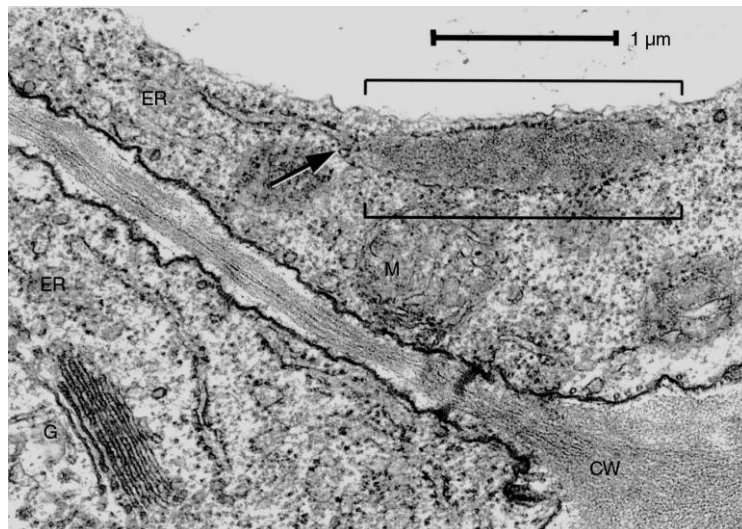


Figura I25. Micrografía electrónica de una sección de la punta de raíz de *L. sativum*. Se compara la estructura de una cisterna dilatada con otros orgánulos como las mitocondrias (M), aparato de Golgi (G) y la pared celular (CW). La flecha indica la continuidad entre la cisterna dilatada y el RE rugoso. (Extraído de Gunning, 1998).

Las reconstrucciones basadas en series de secciones ultra-finas, mostraron la estructura tridimensional de los *ER bodies*, presentes como cisternas dilatadas en el RE y distribuidas en el espacio entre la pared celular y el citoplasma de células vacuoladas. La mayoría de *ER bodies* fueron observados como vesículas alargadas y delgadas que no parecen estar orientadas de ninguna forma especial con relación a los ejes de las células o la raíz (Iversen and Flood, 1969) (Figura I26A). Por este motivo, los cortes longitudinales muestran *ER bodies* con estructuras alargadas, mientras que en los cortes transversales se observan estructuras circulares (Figura I26B).

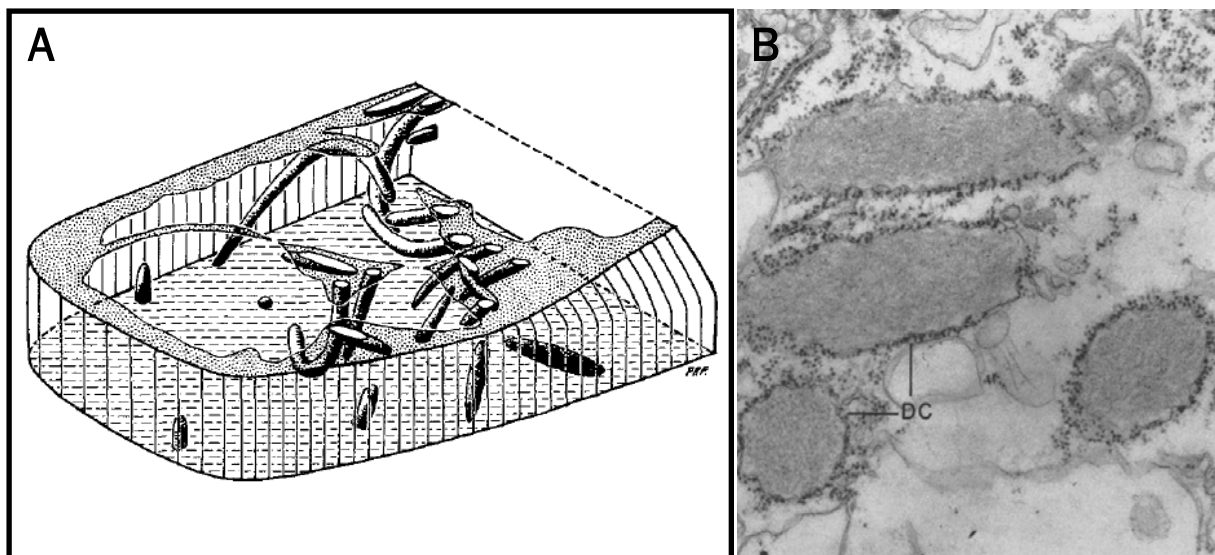


Figura I26. A. Diagrama de una célula cortical de *L. sativum*, construido a partir de una serie de 34 secciones, cada una aproximadamente de 100 nm de espesor. Se observan el contorno de la célula y de las regiones citoplasmáticas. B. Sección de una célula de raíz de *R. sativus*. Se observan cisternas dilatadas cortadas longitudinal y transversalmente, encontrando respectivamente, estructuras alargadas y circulares. x 42000. (Extraído de Iversen and Flood, 1969 y Bonnett and Newcomb, 1965).

Se han realizado estudios ultraestructurales para comparar los *ER bodies* en distintas especies y tipos celulares. En *Sisymbrium officinate*, se han identificado cisternas dilatadas con contenido tubular en células de hipocótilo y otras con contenido filamentososo en raíz. En *Lunaria rediviva*, células vasculares mostraron cisternas dilatadas con un contenido granular denso (Behnke and Eschlbeck, 1978) (Figura I27). Existe, por tanto, diversidad en cuanto a contenido y estructura interna de *ER bodies*.

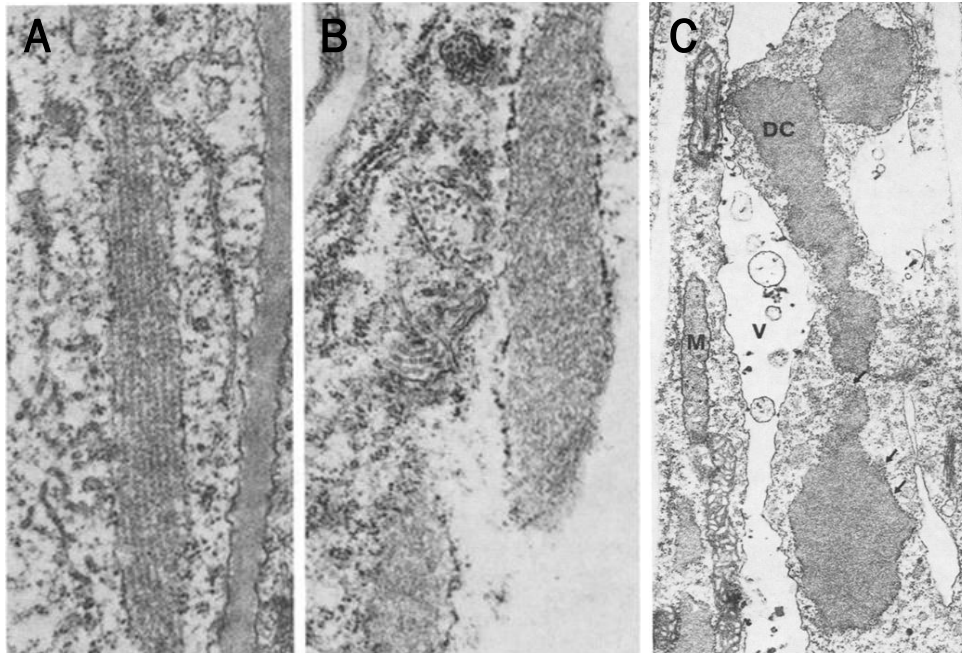


Figura I27. *ER bodies* de *Sisymbrium officinate* **A.** Cisternas dilatadas en hipocótilo de *S. officinate*, con un contenido tubular. **B.** Cisternas dilatadas en células de raíz de *S. officinate*, con un contenido filamentososo. **C.** Cisternas dilatadas en células vasculares de *Lunaria rediviva*, con un contenido granular denso. (Extraído de Behnke and Eschlbeck, 1978).

En el análisis ultraestructural de células epidérmicas de cotiledón de plantas transgénicas de *A. thaliana* GFP-HDEL los *ER bodies* se observaron como estructuras alargadas con contenidos fibrosos y rodeados por una membrana reticular con ribosomas (Gunning, 1998; Hayashi *et al.*, 2001). Ensayos inmunocitoquímicos con un anticuerpo contra GFP, revelaron que estas estructuras presentes en plantas transgénicas GFP-HDEL, acumulaban GFP, confirmando la coincidencia física de las vesículas alargadas observadas al microscopio confocal y el microscopio electrónico (Hayashi *et al.*, 2001) (Figura I28).

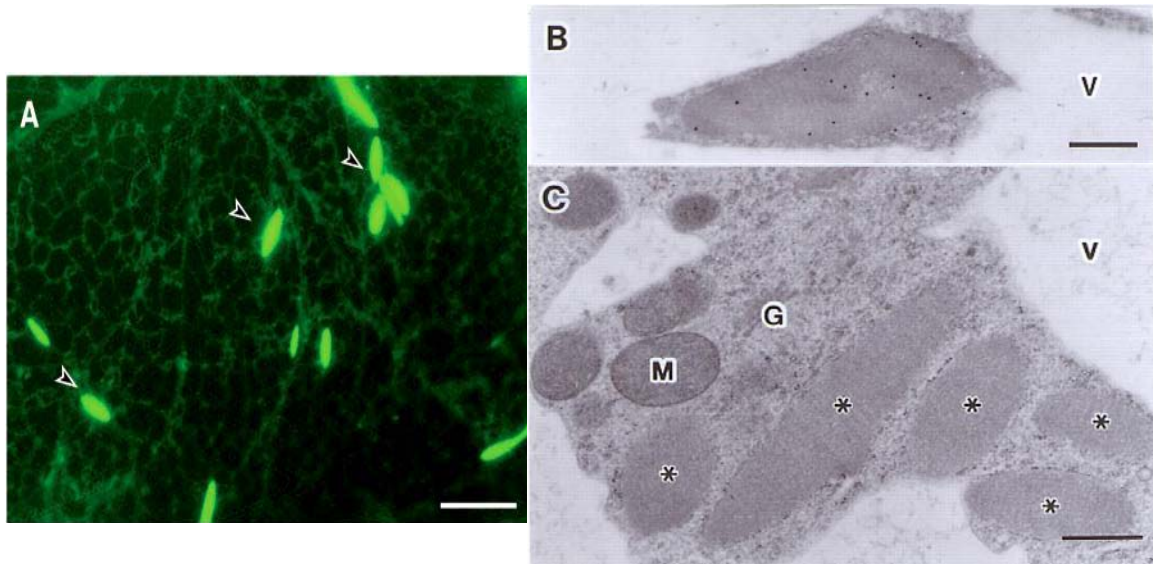


Figura 128. *ER bodies* en célula epidérmica de cotiledón de línea transgénica GFP-HDEL de *A. thaliana*. **A.** Vesículas alargadas fluorescentes observadas al microscopio confocal. **B.** Vesícula inmunomarcada observada al ME. **C.** Vesículas observadas al ME con ribosomas en su membrana exterior y un patrón interno granuloso. Los asteriscos indican a los *ER bodies*. M: Mitocondria, G: Aparato de Golgi, V: Vacuola. Las barras indican: A, 10 μm ; B y C, 0.5 μm . (Extraído de Hayashi et al., 2001).

En plantas transgénicas de *A. thaliana*, la construcción quimérica 1S:GFP se localiza en trama de RE, en agregados que posiblemente derivan de este orgánulo y en el borde de vesículas fusiformes que se desplazan rápidamente por la trama de RE (Ferrero, 2010). Dado que estas vesículas tienen la misma morfología y dinamismo que los *ER bodies*, se propuso que HMGR podía ser un componente de dichos orgánulos (Ferrero, 2010). Para confirmar la posible coincidencia física entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies*, se realizó doble inmunocitoquímica sobre *whole mount* de plántulas de *A. thaliana* transgénicas para GFP-HDEL. Esta proteína es residente del lumen de *ER bodies* y puede ser utilizada como marcador de los mismos. Anticuerpos contra el dominio catalítico de HMGR fueron utilizados para reconocer las *vesículas de HMGR* y anticuerpos contra GFP para reconocer los *ER bodies*. Los resultados de microscopía confocal mostraron una elevada coincidencia física de ambos marcajes en corpúsculos que podrían corresponder a *ER bodies*, pero se obtuvo una resolución relativamente baja con un elevado fondo (Figura I29, extraída de Ferrero, 2010). Parece oportuno, por tanto, continuar con estas investigaciones mediante nuevas aproximaciones técnicas que definan de modo más claro la correlación física entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies*.

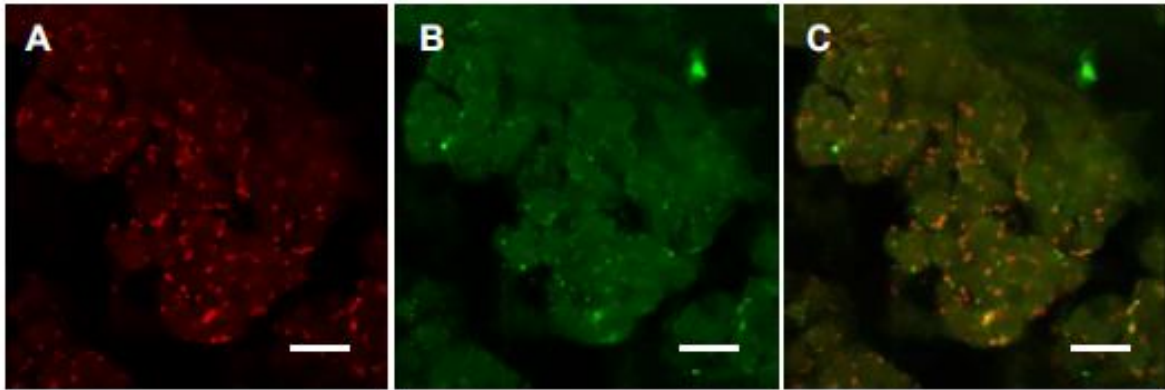


Figura I29. Colocalización de HMGR endógena y GFP-HDEL, en plantas transgénicas de *A. thaliana* GFP-HDEL. **A.** El color rojo corresponde a la fluorescencia de la HMGR. **B.** El verde corresponde a la GFP-HDEL. **C.** La colocalización se observa en color naranja por superposición de ambos canales. Las barras indican 10 μm . (Extraído de Ferrero, 2010).

2.3.2 Función y contenido.

Los *ER bodies* son abundantes en células epidérmicas de cotiledón, hipocótilo y raíz, las cuales constituyen una primera barrera física frente posibles agresiones (Hayashi *et al.*, 2001). La presencia de *ER bodies* está regulada durante el desarrollo de la planta. Los *ER bodies* aparecen después de la germinación, están presentes durante las primeras etapas del crecimiento de la planta y desaparecen de los tejidos en la senescencia (Matsushima *et al.*, 2002). El análisis ultraestructural indica que las semillas maduras no tienen *ER bodies* (Matsushima *et al.*, 2003a). La distribución anatómica de los *ER bodies* y su presencia en fases del desarrollo particularmente vulnerables, sugiere que pueden desempeñar importantes funciones en defensa (Hayashi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001).

Los *ER bodies* están presentes en planta joven de *A. thaliana* de manera constitutiva y desaparecen durante el desarrollo. En hojas de roseta de plantas de 28 días ya no se observan *ER bodies*. Sin embargo, cuando estas hojas son sometidas a herida, estructuras similares vuelven a reaparecer en un plazo de 44 a 66 h. A estos orgánulos se les denomina *ER bodies* inducidos (*i-ER bodies*). Los *i-ER bodies* se desarrollan principalmente en las regiones periféricas a la herida. De nuevo, estas observaciones sugieren que los *ER bodies* juegan un papel en defensa (Matsushima *et al.*, 2002).

El metil-jasmonato (MeJA) es una fitohormona activada por lesiones accidentales o ataque de herbívoros, que induce respuestas de defensa contra microorganismos patógenos o insectos (Farmer and Ryan, 1990; McConn *et al.*, 1997; Wasternack and Parthier, 1997; Stotz *et al.*, 1999). De forma consistente con su papel en defensa, el

MeJA se acumula en hojas sometidas a herida (Reymond *et al.*, 2000). La formación de *i-ER bodies* fue detectada en hojas de roseta de plantas transgénicas de *A. thaliana* GFP-HDEL 37 h después de administrar MeJA (Matsushima *et al.*, 2002). El etileno también media la respuesta de plantas frente a herbívoros (O'Donnel *et al.*, Onkokesung *et al.*, 2010), pero tiene funciones antagónicas a MeJA (Xu *et al.*, 1994). El etileno no induce la formación de *ER bodies* en hojas de roseta (Matsushima *et al.*, 2002). La administración de MeJA en una atmósfera de etileno no da lugar a formación de *i-ER bodies*, lo cual confirma su implicación antagónica en el control de la biogénesis de estos orgánulos (Matsushima *et al.*, 2002). Cuando plantas de *A. thaliana* son sometidas a estrés salino (100 mM de NaCl), se observa fusión entre *ER bodies* y de éstos con la vacuola (Figura I30). Este proceso deviene en muerte celular (Hayashi *et al.*, 2001).

Los *ER bodies* almacenan componentes precursores inactivos de β -glucosidasas y proteasas, que están así dispuestas para su activación en el interior de la vacuola (Hayashi *et al.*, 2001; Hara-Nishimura *et al.*, 2004). La movilización de *ER bodies* a vacuola constituye una vía directa de transporte a este orgánulo sin pasar por el aparato de Golgi. El tránsito de RE a vacuola a través del aparato de Golgi es la ruta convencional para muchas otras proteínas (Hara-Nishimura *et al.*, 2004). Los *ER bodies* forman parte de un sistema de defensa que activa diversas enzimas hidrolíticas de manera rápida, en respuesta a determinadas agresiones, como estrés salino o herida, y que puede desencadenar muerte celular (Hayashi *et al.*, 2001). También se ha propuesto la participación de los *ER bodies* en muerte celular programada, que es fundamental para el desarrollo normal de la planta (Rojo *et al.*, 2003; Hatsugai *et al.*, 2006).

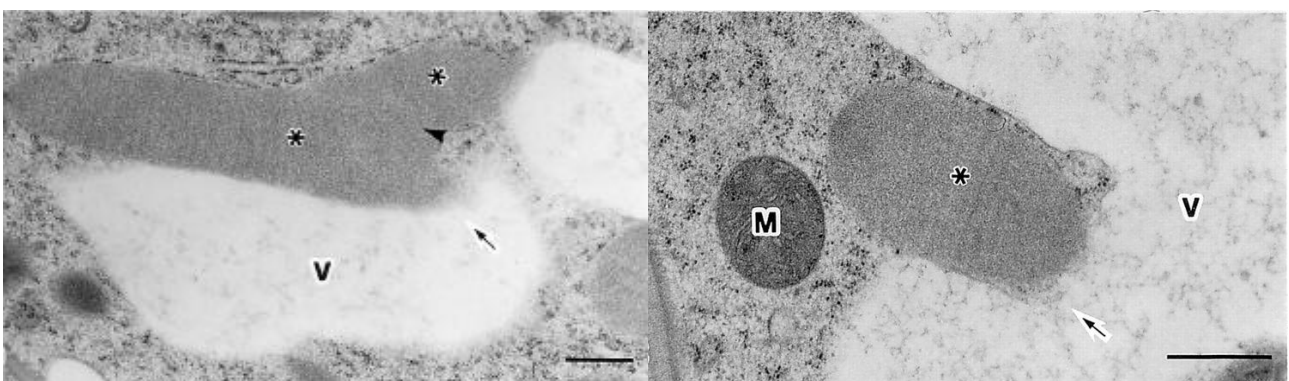


Figura I30. Ultraestructura de *ER bodies* en célula epidérmica de cotiledón de *A. thaliana* silvestre no transformada, de 5 días, de ecotipo Columbia, fueron preparadas para microscopía electrónica mediante criofijación, deshidratación con acetona y tinción con tetroxido de osmio. **A.** Fusión de dos *ER bodies* entre sí y, simultáneamente, con la vacuola. **B.** Fusión de un *ER body* con la vacuola. La región de contacto entre los *ER bodies* y la vacuola está señalada por una flecha. Los asteriscos indican los *ER bodies*. La cabeza de flecha indica la región de contacto entre *ER bodies*. V: Vacuola, M: Mitochondria. Las barras indican: 500 nm. (Extraído de Hayashi *et al.*, 2001).

El componente mayoritario de los *ER bodies* constitutivos en *A. thaliana* es una β -glucosidasa denominada BLU23 o PYK10 (Matsushima *et al.*, 2003). PYK10 se encuentra en el lumen del orgánulo (Figura I31) y presenta la señal KDEL C-terminal de retención a lumen de RE, lo cual define molecularmente a los *ER bodies* como parte integral del RE.

PYK10 hidroliza específicamente la escopolina. Esta cumarina y su glucósido están de forma constitutiva en raíz de *A. thaliana* (Kai *et al.*, 2006). Estos compuestos también se acumulan en órganos aéreos de *A. thaliana* tras inducción con MeJA y en cultivo celular de yemas infectadas con *Fusarium oxysporum* (Kai *et al.*, 2006). Esto indica que PYK10 está implicado en defensa mediante la liberación del aglicón escopoletina a partir de escopolina. Sin embargo, también se ha descrito que PYK10 es necesaria para la interacción benéfica entre *A. thaliana* y el hongo *Piriformospora indica* (Sherameti *et al.*, 2008).

Se ha postulado que la biogénesis de *ER bodies* constitutivos se debe en gran medida al acúmulo de PYK10 en el lumen del RE (Matsushima *et al.*, 2003b). Según este modelo, la agregación de PYK10 en cisternas del RE provocaría su dilatación progresiva, lo cual sería un factor determinante para su conversión en *ER bodies* (Matsushima *et al.*, 2003b).

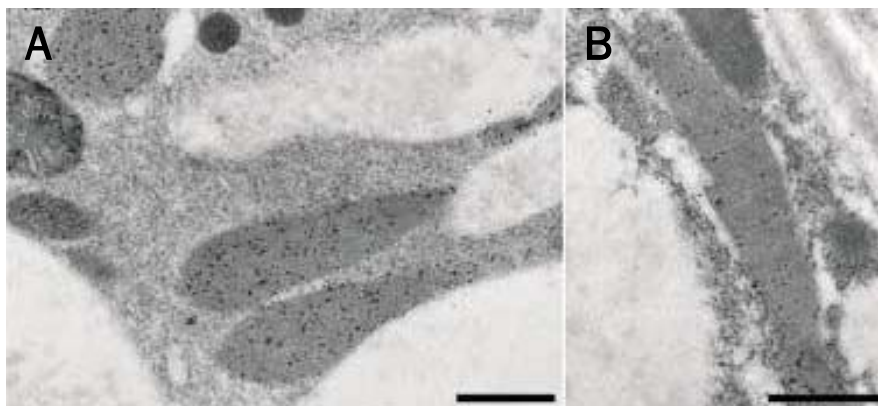


Figura I31. Inmunocitoquímica de células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* silvestre. **A.** Anticuerpo anti-PYK10(CM). **B.** Anticuerpo anti-PYK10(IM). PYK10 se localiza en el lumen de *ER bodies*. Las barras indican: 1 μ m. (Extraído de Matsushima *et al.*, 2003b).

BGL1 es otra β -glucosidasa de los *ER bodies* de *A. thaliana*, que comparte un 70 % de identidad con PYK10. Su extremo C-terminal es REEL, el cual presumiblemente actúa como señal de retención a lumen de RE. Los niveles de BGL1 aumentan 10 veces en hoja de roseta en respuesta a MeJA, lo cual sugiere que es un componente mayoritario de *ER bodies* inducidos (*i-ER bodies*). BGL1 podría tener una acción catalítica similar a la de PYK10 y la función biológica de los *i-ER bodies* podría ser similar a la de los *ER bodies* constitutivos, aunque sus componentes sean distintos (Matsushima *et al.*, 2003). La β -glucosidasa BGLU18 también es homóloga a PYK10 y se acumula específicamente en *i-ER*

bodies (Figura I32). En el mutante de *A. thaliana* *bglu18*, el tratamiento por herida no induce la aparición de *i-ER bodies*, lo que sugiere que la BGLU18 podría estar implicada en la vía de señalización que conduce a la formación de dichos orgánulos (Ogasawara *et al.*, 2009). Los estudios anteriores indican que los *ER bodies* constitutivos e inducidos, acumulan distintos tipos de β -glucosidasas y que pueden tener diferentes funciones en la defensa contra distintas condiciones de estrés (Ogasawara *et al.*, 2009).

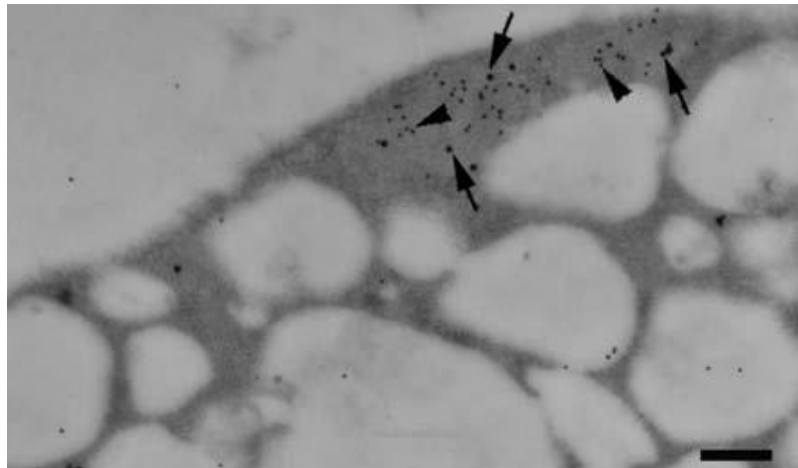


Figura I32. Inmunocitoquímica de cotiledón de *A. thaliana* línea mutante *nai1* sometida a herida. Después de 66 h de la herida, el tejido fue inmunomarcado con anticuerpo contra BGLU18. Se observa que la BGLU18 se localiza en *ER bodies* inducidos por el tratamiento (*i-ER bodies*). La barra indica 500 nm. (Extraído de Ogasawara *et al.*, 2009).

Las formas proenzimáticas de cisteín-proteasas RD21 y γ VPE han sido localizadas en *ER bodies* (Figura I33), aunque carecen de señal de retención a lumen de RE. Estos precursores son vertidos a vacuola en respuesta a estrés. RD21 es un miembro de la familia de la papaína y es inducido por desecación o estrés hídrico (Koizumi *et al.*, 1993). γ VPE es un homólogo de las enzimas procesadoras vacuolares responsables de la maduración de proenzimas y se acumula en el interior de este orgánulo en condiciones de estrés (Hara-Nishimura, 1998a,b; Kinoshita *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1999). Análisis inmunocitoquímico con anticuerpos contra glicanos complejos, demostró que los componentes proteicos de *ER bodies* no pasan por el aparato de Golgi en su tránsito hacia la vacuola (Hayashi *et al.*, 2001). Esto indica que los *ER bodies* actúan como mediadores del transporte directo de RD21 y γ VPE desde el RE hacia la vacuola.

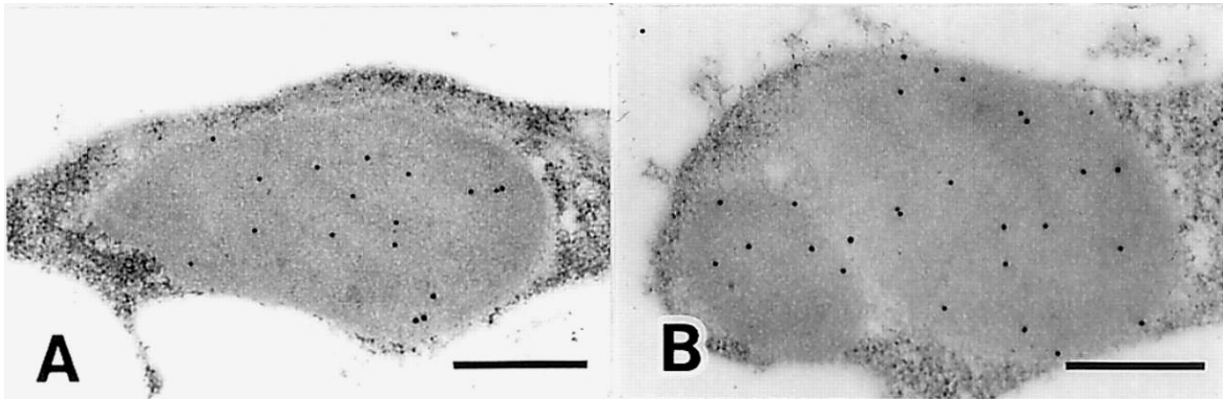


Figura I33. Inmunomarcaje de cisteín-proteasas en *ER bodies* inducidos por el estrés. **A.** Marcaje de cisteín-proteasa RD21. **B.** Marcaje de enzima de procesamiento vacuolar γ VPE. Ambas proteínas se localizan en el lumen de *ER bodies*. Las barras indican: 0.5 μ m. (Extraído de Hayashi *et al.*, 2001).

Los *ER bodies* no sólo almacenan precursores de β -glucosidasas y proteasas, sino también otras hidrolasas como las invertasas. Una de ellas es At β fruct4, cuya presencia en *ER bodies* de *A.thaliana* fue demostrada mediante inmunocitoquímica (Figura I34). Ésta se almacena en *ER bodies* como proenzima. Su activación es dependiente de γ VPE y se produce en vacuola durante la senescencia. Esto apoya un modelo de activación de proenzimas vacuolares mediante liberación de γ VPE almacenada en *ER bodies* e implica a estos orgánulos en procesos de desarrollo de la planta distintos a los de respuesta a estrés (Rojo *et al.*, 2003).

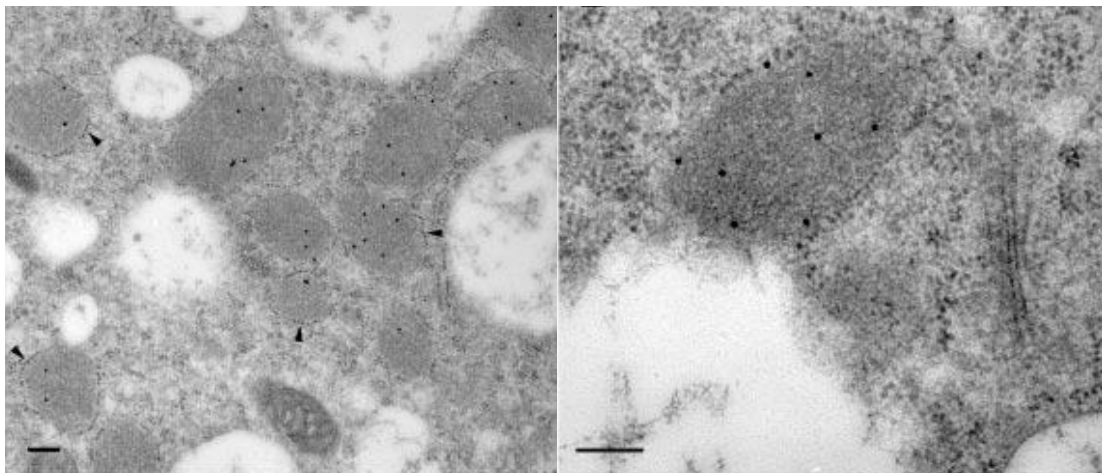


Figura I34. Inmunomarcaje de invertasa AtFruct4 en *ER bodies*. **A y B.** *ER bodies* en células de raíz de *A.thaliana*. Las barras indican: 200 nm. (Extraído de Rojo *et al.*, 2003).

2.3.3 Biogénesis.

La biogénesis de *ER bodies* está controlada por el gen *NAI1* que codifica para un factor de transcripción de 320 aminoácidos con un motivo "basic-helix-loop-helix" (bHLH). *NAI1* es un activador transcripcional de *PYK10*, que es el componente mayoritario de *ER bodies* constitutivos (Matsushima *et al.*, 2003a,b). Los niveles de *PYK10* son muy bajos en el mutante *nai1-1* de *A. thaliana* (Matsushima *et al.*, 2004). La desaparición de *ER bodies* en dicho mutante podría explicarse, por tanto, por la reducción severa en los niveles de *PYK10*, cuyo acúmulo y expresión se ha propuesto como fundamental para la biogénesis de estos orgánulos (Matsushima *et al.*, 2003b).

Las proteínas bHLH forman parte de una gran familia de factores de transcripción que actúan como dímeros uniendo regiones específicas de DNA (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003) y que reconocen el hexanucleótido consenso CANNTG, denominado E-box (Ferre-Damare and Burley, 1995). En mamíferos, las proteínas bHLH tienen un residuo de Glu que es crítico para su unión con E-box y que también se encuentra conservado en *NAI1* (Glu-137). El promotor del gen *PYK10* contiene 5 secuencias E-box mientras que el del gen de la proteína de unión a mirosinasa (BMP) tiene 3. Esto es consistente con el control de dichos promotores por *NAI1*. La ausencia de *ER bodies* en plantas mutantes *nai1-1* es, por tanto, atribuible a la pérdida del factor de transcripción *NAI1*, que es un activador de la síntesis de *PYK10*, que es a su vez uno de los principales componentes de los *ER bodies* (Matsushima *et al.*, 2004).

El MeJA induce la formación de *i-ER bodies* en hojas de roseta que normalmente no presentan estos orgánulos de forma previa al tratamiento de estrés. Los *ER bodies* inducidos (*i-ER bodies*) tienen morfología y dimensiones muy similares a los de *ER bodies* constitutivos (Matsushima *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando plantas mutantes *nai1-1* son tratadas con MeJA, los *i-ER bodies* generados presentan estructura y forma bastante alteradas (Figura I35) (Matsushima *et al.*, 2004).

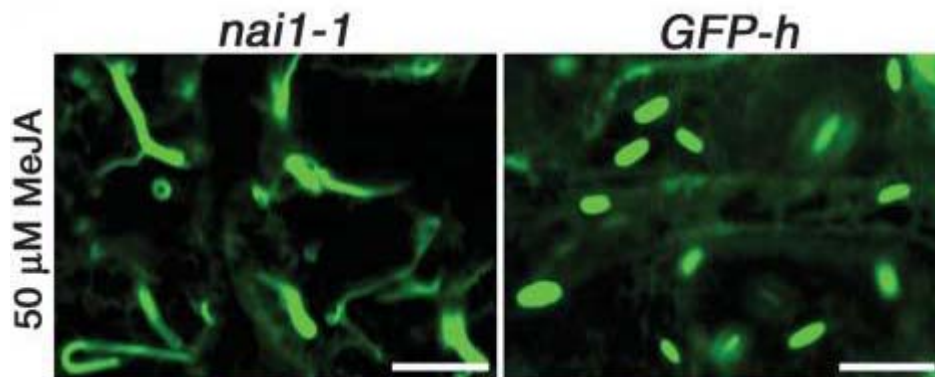


Figura I35. Efecto de la mutación *nai1-1* sobre la morfología de *i-ER bodies*. Hojas de roseta de plantas transgénicas de *A. thaliana* GFP-HDEL, fueron tratadas con una solución 50 μ M de MeJA. Células epidérmicas fueron observadas al microscopio confocal 36 h después del tratamiento. Los *ER bodies* tienen apariencia normal en la línea transgénica de genotipo silvestre para NAI1 (GFP-h), pero están alterados en la línea mutante *nai1-1*. Las barras indican: 10 μ m. (Extraído de Matsushima *et al.*, 2004).

EL gen *NAI2* codifica una proteína de 772 aminoácidos que contiene 10 repeticiones de la secuencia Glu-Phe-Glu, denominado motivo EFE, en su región N-terminal y un dominio C-terminal exclusivo, denominado dominio NAI2 (Suzuki *et al.*, 2005). Esta proteína pertenece a una familia que sólo está presente en *Brassicaceae*. Análisis inmunocitoquímicos con anticuerpos contra el péptido señal y contra la región C-terminal específica indican que NAI2 se localiza en *ER bodies* (Yamada *et al.*, 2008). El gen *NAI2* está regulado por NAI1 que es su activador transcripcional. El mutante *nai2-1* de *A. thaliana* es *knock-out* para dicho gen, es defectivo en *ER bodies* y tiene niveles reducidos de proteína PYK10. Al igual que NAI1, NAI2 es también un factor clave para el acúmulo de PYK10 y la formación de *ER bodies*.

La formación de *ER bodies* es inducida por herida y por la hormona MeJA, lo que sugiere que participan en defensa contra el ataque de patógenos o insectos (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). Puesto que el gen *NAI2* sólo está representado en *Brassicaceae* y no en otras familias de plantas, animales, hongos u organismos unicelulares, parece probable que este gen haya evolucionado rápidamente en dicha familia, para la formación de *ER bodies* (Yamada *et al.*, 2008).

Objetivos

OBJETIVOS

La enzima HMG-CoA reductasa (HMGR) cataliza el primer paso de la vía del mevalonato para síntesis de isoprenoides, de la que derivan compuestos esenciales para la célula eucariota y, en el caso de plantas, multitud de productos con importantes aplicaciones agronómicas, biomédicas o industriales. La HMGR ejerce un papel clave en el control de la vía y aunque los mecanismos para dicho control son importantes desde un punto de vista conceptual y aplicado, estamos lejos de su comprensión. Uno de los aspectos relacionados con dicho control es el de la localización subcelular. Esta enzima se inserta co-traduccionalmente en la membrana del retículo endoplasmático, pero podría tener distintas ubicaciones en el sistema de endomembranas. En el caso particular de la planta *A. thaliana*, la enzima ha sido detectada por microscopía confocal, con anticuerpos específicos, en unas estructuras esféricas del citosol denominadas *vesículas de HMGR*.

El estudio de la localización subcelular de la enzima también ha sido abordado mediante fusión traduccional del dominio de membrana de la isoforma HMGR1S de *A. thaliana* y la proteína marcadora GFP. La expresión de esta quimera, denominada 1S:GFP, en diversos tipos celulares de plantas da lugar a la aparición de unas vesículas fluorescentes, vesículas de 1S:GFP, que parecen conectadas con el retículo endoplasmático y que parecen coincidir físicamente con las *vesículas de HMGR*. Estas observaciones son interesantes pues hay estudios que demuestran que la expresión del dominio de membrana de la HMGR humana o de levadura induce hipertrófia y morfogénesis del retículo endoplasmático, si bien el mecanismo implicado es desconocido. Sería oportuno identificar factores que intervengan en dicho proceso.

Otros resultados sugieren que las *vesículas de HMGR* de *A. thaliana* pueden coincidir físicamente con *ER bodies*. Estos últimos son vesículas fusiformes derivadas del retículo endoplasmático que cumplen un rol importante en defensa frente a estrés. Estos estudios, al igual que los anteriores de *A. thaliana* han sido realizados únicamente por microscopía confocal y sería oportuno complementarlos con análisis de microscopía electrónica. Con estos antecedentes, se proponen los siguientes objetivos:

- Estudio del papel del dominio de membrana de HMGR1S en la morfogénesis del retículo endoplasmático en *A. thaliana* y otros sistemas vegetales.
- Caracterización ultraestructural de *ER bodies* en distintos tejidos y tipos celulares de *A. thaliana*, y análisis de su coincidencia física con *vesículas de HMGR*.
- Estudio de la implicación de HMGR de *A. thaliana* en respuesta a estrés.
- Identificación de posibles interactores moleculares del dominio de membrana de HMGR1S.

Resultados

1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1 Líneas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*.

La generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el dominio de membrana de la HMGR1S unido a GFP (quimera 1S:GFP) (Figura R1) fue una parte fundamental en la presente tesis. Dichas líneas transgénicas permitieron la caracterización del efecto de 1S:GFP sobre la estructura del retículo endoplasmático (Sección 2), el estudio de la respuesta de 1S:GFP a estrés (Sección 4) y la purificación de 1S:GFP para el análisis proteómico (Sección 5). Aunque en trabajos anteriores se desarrollaron otras líneas transgénicas 1S:GFP (Ferrero, 2010), estas no poseían un nivel de expresión suficiente, lo que dificultaba no sólo los estudios microscópicos, sino también los ensayos de purificación. Por tanto, para obtener nuevas líneas de *A. thaliana* transgénicas homocigotas para 1S:GFP y con niveles de expresión más elevados, se siguió el siguiente esquema de trabajo señalado en la Figura R2.

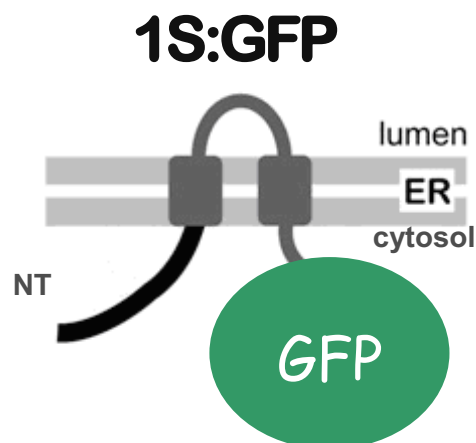


Figura R1. Topología de la proteína quimérica 1S:GFP en la membrana del retículo endoplasmático. La GFP sustituye el dominio catalítico de HMGR1S. La quimera tiene dos segmentos transmembrana. La región N-terminal (NT) y la GFP se encuentran en el citosol.

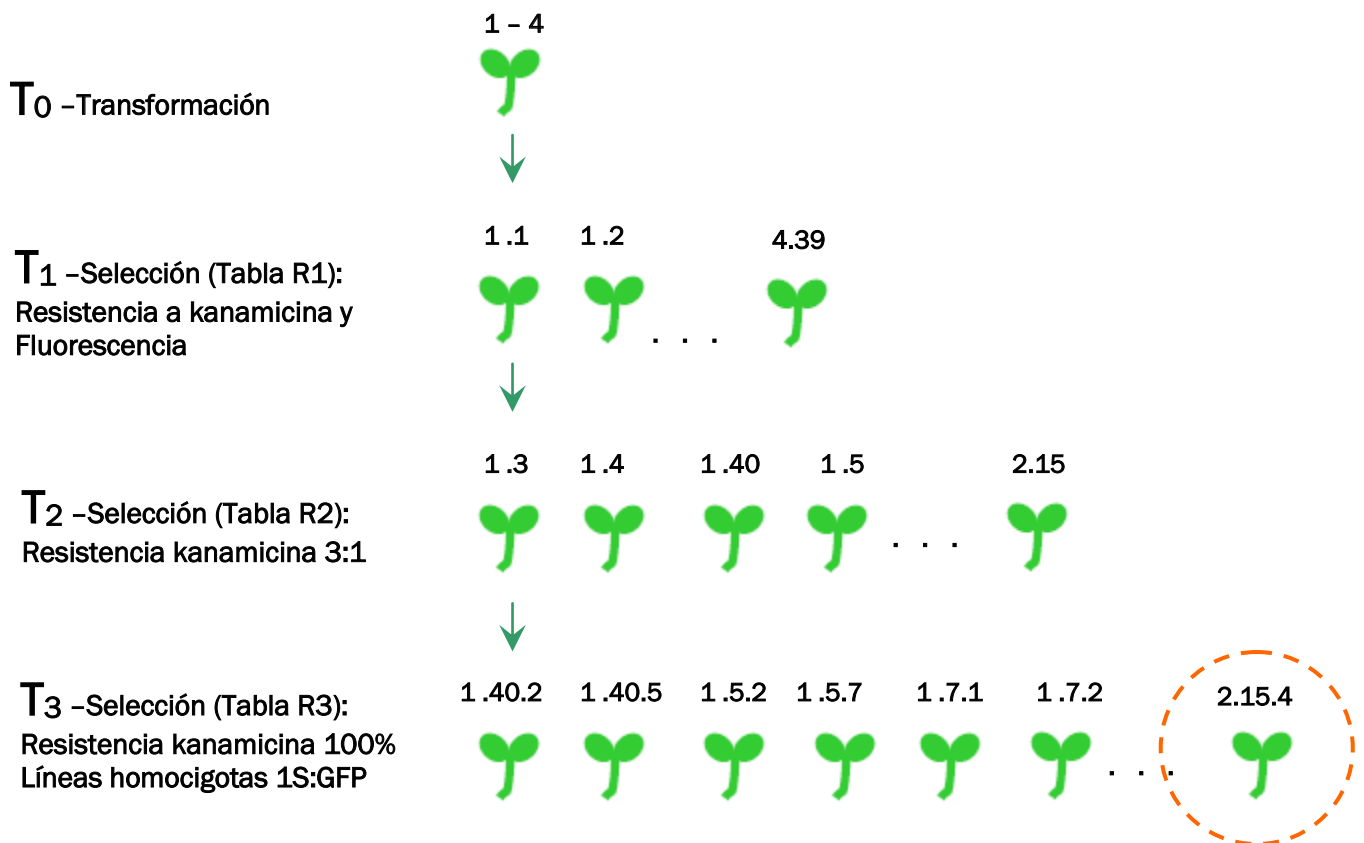


Figura R2. Representación esquemática de las diferentes generaciones de plantas transgénicas 1S:GFP. Se indican los criterios de selección utilizados en cada generación para la obtención de líneas transgénicas homocigotas y la numeración de las líneas obtenidas en cada una de ellas.

Las plantas de la generación T₀ fueron infiltradas con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 Pmp90RK (Koncz and Shell, 1986) portadora de la construcción 1S:GFP, las semillas obtenidas a partir de dichas plantas, constituyeron la generación T₁ en la que se realizó una primera selección utilizando como criterios la resistencia a kanamicina y la expresión de 1S:GFP, esta selección permitió además la clasificación de las plantas de acuerdo a su patrón de expresión y a los niveles de fluorescencia observados. Se seleccionaron, por tanto, aquellas plantas resistentes a kanamicina que además expresaban 1S:GFP, obteniendo cuarenta líneas distintas (Tabla R1).

Para poder realizar ensayos microscópicos e inmunocitoquímicos en células de raíz y parte aérea, se seleccionaron líneas que expresasen 1S:GFP en nivel elevado en toda la planta. Concretamente se escogieron siete líneas que aparecen marcadas con un asterisco en la tabla R1. En la generación T₂ se seleccionaron aquellas líneas que mostraron un 75% (3/4) de resistencia a kanamicina, lo cual era indicativo de la presencia de un solo transgen que segregó mendelianamente en proporción 3:1 (Tabla R1). Para obtener la generación T₃, se crecieron ocho individuos resistentes a kanamicina

de cada una de las cinco líneas elegidas en T_2 . Las semillas T_3 fueron testadas en placa con kanamicina para seleccionar aquellas que presentaban un 100% de resistencia. Esto indicaba que todas las semillas T_3 portaban la construcción 1S:GFP y que su progenitor T_2 era homocigoto para dicha mutación. El pool de semillas T_3 descendientes del individuo T_2 homocigoto constituyó el reservorio de semillas utilizadas en este trabajo (Tabla R2).

Tabla R1. Clasificación de plantas transgénicas 1S:GFP resistentes a kanamicina en T1 y T2.

Individuos T ₁	Fluorescencia en T ₁		(+) Resistencia a kanamicina en T ₂
	Patrón	Intensidad	
1.1	R	+	n.d.
1.2	R	+	n.d.
*1.3	R	++	15/16
*1.4	R	++	15/16
*1.40	T	++	3/4
*1.5	T	++++	3/4
1.6	R	+	n.d.
*1.7	T	+	3/4
1.8	R	++	n.d.
*1.9	T	++++	15/16
2.10	R	+	n.d.
2.11	R	++	n.d.
2.12	R	++	n.d.
2.13	R	++	n.d.
*2.14	T	+++	3/4
*2.15	T	++++	3/4
3.16	R	++	n.d.
3.17	T	++++	n.d.
3.18	R	++	n.d.
4.19	R	+	n.d.
4.20	R	++	n.d.
4.21	R	++	n.d.
4.22	T	++++	n.d.
4.23	R	+	n.d.
4.24	R	+	n.d.
4.25	R	+	n.d.
4.26	R	++	n.d.
4.27	R	++	n.d.
4.28	R	+++	n.d.
4.29	R	+++	n.d.
4.30	T	+	n.d.
4.31	T	+++	n.d.
4.32	R	++	n.d.
4.33	R	++	n.d.
4.34	R	++	n.d.
4.35	R	++	n.d.
4.36	T	+	n.d.
4.37	T	++	n.d.
4.38	R	+	n.d.
4.39	R	++	n.d.

R: Fluorescencia sólo en raíz.

T: Fluorescencia en toda la planta (parte aérea y raíz).

+: Intensidad de fluorescencia.

*: Semillas seleccionadas para propagar plantas T2.

n.d: no determinado

(+): La resistencia a kanamicina 3/4 (75%) corresponde a la segregación de un solo transgen.

La resistencia a kanamicina 15/16 (93.75%) corresponde a la segregación de dos transgenes.

Tabla R2. Selección de líneas transgénicas 1S:GFP homocigotas en T2 y T3.

Individuos T ₂	Patrón e intensidad de fluorescencia	(+) Resistencia a Kanamicina en T ₃
1.40.1	-	3/4
*1.40.2	T++	1
1.40.3	-	3/4
1.40.4	-	3/4
*1.40.5	T++	1
1.40.6	-	3/4
1.40.7	-	3/4
1.40.8	-	3/4
1.5.1	-	3/4
*1.5.2	T++++	1
1.5.3	-	3/4
1.5.4	-	3/4
1.5.5	-	3/4
1.5.6	-	3/4
*1.5.7	T++++	1
1.5.8	-	3/4
*1.7.1	T+	1
1.7.2	-	3/4
*1.7.3	T+	1
1.7.4	-	3/4
*1.7.5	T+	1
1.7.6	-	3/4
*1.7.7	T+	1
1.7.8	-	3/4
2.14.1	-	3/4
2.14.2	-	3/4
2.14.3	-	3/4
2.14.4	-	3/4
*2.14.5	T+++	1
2.14.6	-	3/4
*2.14.7	T+++	1
2.14.8	-	3/4
2.15.1	-	3/4
2.15.2	-	3/4
2.15.3	-	3/4
*2.15.4	T++++	1
2.15.5	-	3/4
2.15.6	-	3/4
2.15.7	-	3/4
2.15.8	-	3/4

T: Fluorescencia en toda la planta (parte aérea y raíz).

+: Intensidad de fluorescencia.

*: Líneas homocigotas.

(+): La resistencia a kanamicina 3/4 (75%) indica que el individuo T2 es heterocigoto. La resistencia a kanamicina 1 (100%) indica que el individuo T2 y su descendencia T3 son homocigotos.

De un total de once sublíneas homocigotas, que presentaban unos niveles de expresión de 1S:GFP óptimos y generalizados en toda la planta (Tabla R2), se eligió trabajar con la línea 2.15.4, cuyo patrón de expresión se observa en la Figura R3. Ocasionalmente también se realizaron ensayos con la línea 1S3.11 obtenida en un trabajo anterior (Ferrero, 2010).

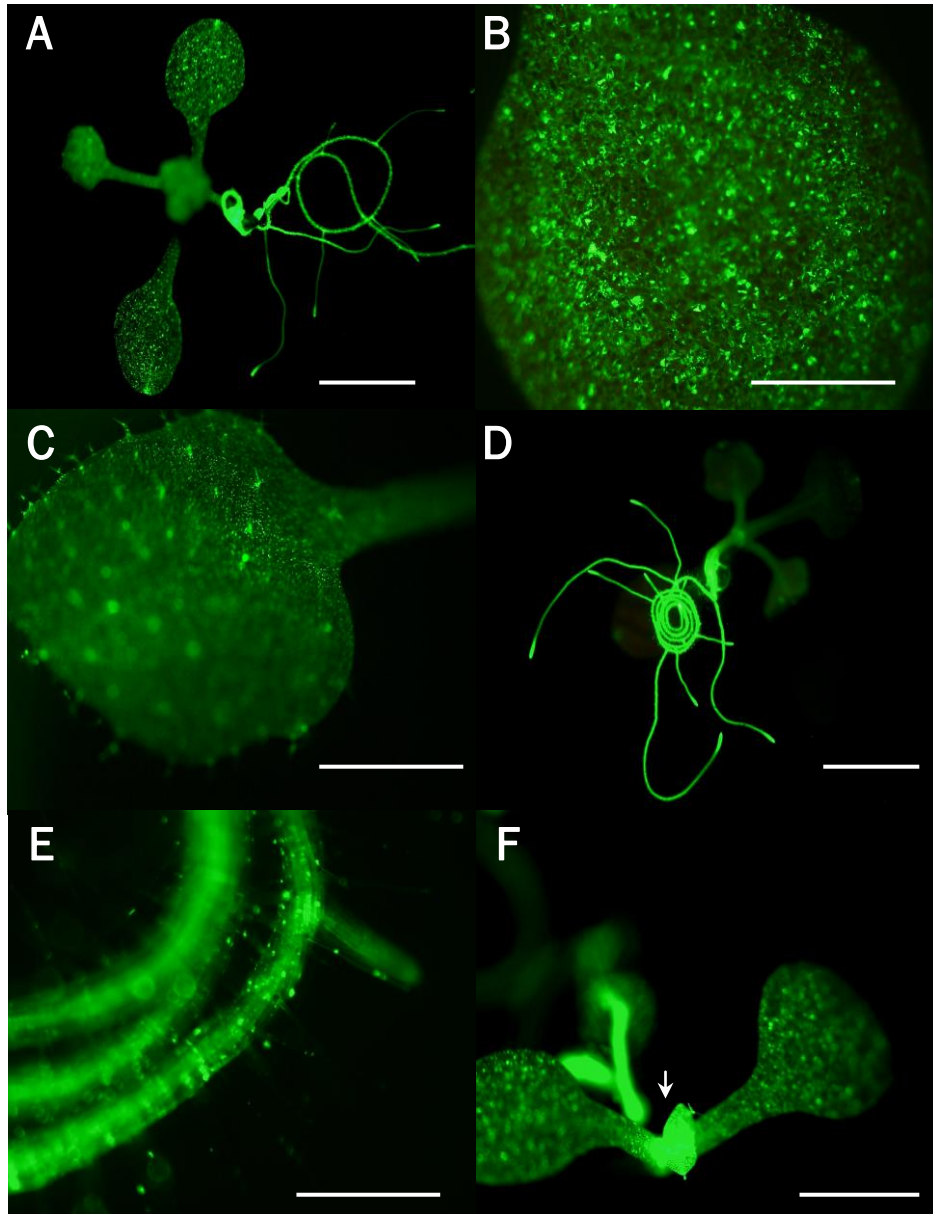


Figura R3. Patrón de expresión de 1S:GFP en la línea transgénica 2.15.4 de *A. thaliana*. Se observa una expresión generalizada durante las primeras etapas de desarrollo. **A.** Planta entera. **B.** Cotiledón. **C.** Hoja verdadera. **D y E.** Raíz. **F.** Hojas verdaderas emergentes (señalada por una flecha blanca). A – E: Plantas de 10 días; F: Planta de 7 días. Las barras indican: A y D, 3 mm; B, 1 mm; C y E, 0.5 mm; F, 2 mm.

La expresión de 1S:GFP en la línea 2.15.4 es abundante en toda la planta (Figura R3A), tanto en los órganos aéreos (Figuras R3B y R3C) como en la raíz (Figuras R3D y R3E). También se observa que en las primeras etapas de desarrollo de las hojas verdaderas existe un nivel de expresión de 1S:GFP más elevado (Figura R3F). La expresión de 1S:GFP es estable en toda la planta desde el comienzo de su desarrollo. Sin embargo, se observó que a partir de los 23 días de crecimiento, la expresión de 1S:GFP desaparece progresivamente, comenzando desde la parte proximal de la hoja extendiéndose hacia la parte distal, sobre todo en las hojas más desarrolladas (Figura R4) reapareciendo nuevamente en la generación siguiente (T_4). Este fenómeno también fue señalado en otras líneas transgénicas descritas anteriormente (Ferrero, 2010) y puede ser debido al silenciamiento génico por metilación del promotor, o a otro tipo de control post-traducciona

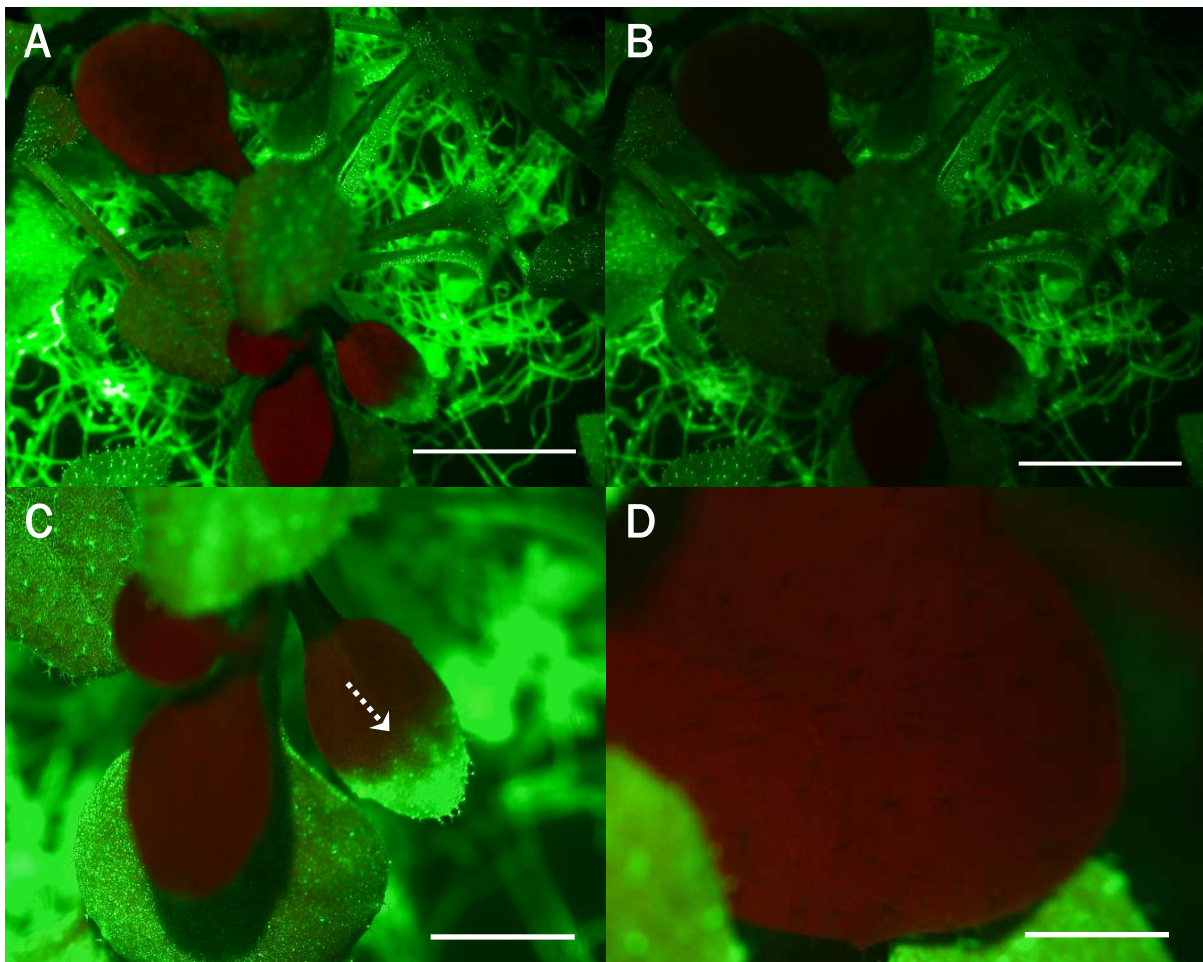


Figura R4. Desaparición de 1S:GFP en hojas de *A. thaliana*. Después de 23 días, plantas de la línea 2.15.4 de *A. thaliana* fueron observadas al microscopio de fluorescencia. **A.** El color verde corresponde a la fluorescencia de 1S:GFP y el rojo a la auto-fluorescencia de la clorofila. **B.** Plantas observadas sólo a través del canal verde. **C.** Se observa la desaparición progresiva de 1S:GFP en algunas hojas (señalada por una flecha blanca). **D.** La fluorescencia roja de la clorofila en las células de la hoja es más intensa a causa de la desaparición de 1S:GFP. Las barras indican: A y B, 5 mm; C, 2 mm y D, 1 mm.

1.2 Mutantes *hmg1* de *A. thaliana*.

En un estudio anterior se identificó y caracterizó la línea mutante *hmg1-3* de *A. thaliana* perteneciente a la colección salk (Antolín-Llovera, 2006). Este mutante tiene una inserción de un T-DNA en el exón 1 del gen de *HMG1* (Figura R5), y es *knock-out* para la expresión de dicho gen. En condiciones de día largo, estas plantas mutantes manifestaban un fenotipo muy marcado de enanismo, con tallos de diámetro reducido, hojas de pequeño tamaño, densas inflorescencias y silicuas muy pequeñas con un contenido bajo o nulo de semillas fértiles.

En el presente trabajo se utilizó también la línea mutante salk125435 denominada como *hmg1-4*, cuyo T-DNA está insertado en una posición muy próxima al del mutante *hmg1-3* (Figura R5). Las líneas *hmg1-3* y *hmg1-4* son por tanto mutantes independientes, pero muy similares en cuanto a la disrupción del gen *HMG1*.

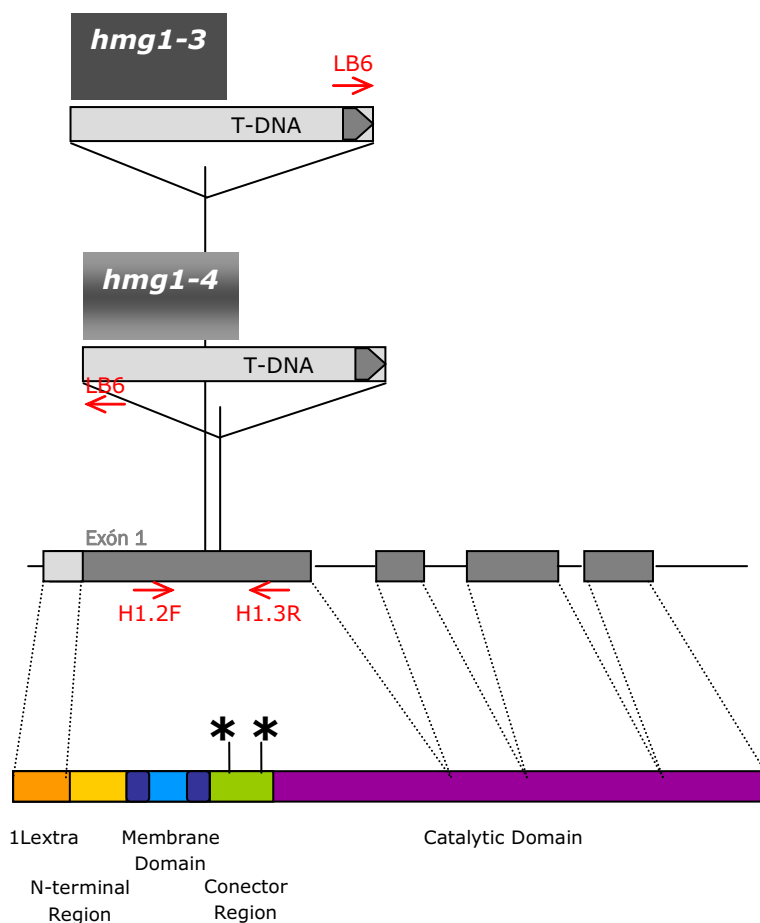


Figura R5. Representación esquemática de la disrupción del gen *HMG1* en las líneas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*. El T-DNA en ambas líneas está insertado en el exón 1 del gen, en puntos separados por 40 residuos. Los cebadores utilizados para el genotipado fueron: H1.2F y H1.3R para el alelo silvestre en ambas líneas, LB6 y H1.3R para el alelo mutante de la línea *hmg1-3* y H2.1F y LB6 para el alelo mutante de la línea *hmg1-4*.

Para caracterizar los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*, individuos homocigotos de los mismos fueron crecidos en condiciones estériles en medio *Murashige and Skoog* (MS), y posteriormente transferidos a tierra, siempre en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 de oscuridad). Se hicieron dos experimentos por separado. Durante los primeros 10 días de crecimiento en el medio estéril, no se apreciaron diferencias entre las plantas mutantes *hmg1-3*, *hmg1-4* y las plantas *col0* no portadoras de estas mutaciones (Figura R6A). Tanto su tamaño como su aspecto y coloración eran normales. Sin embargo, pasado un periodo de 11 días de crecimiento en tierra, se empezaron a observar las alteraciones fenotípicas en el desarrollo de las plantas de ambas líneas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*, la mayoría de las cuales presentaban una coloración más pálida y hojas secas. Dichas plantas terminaron muriendo sin completar las dos semanas de crecimiento en tierra. En la tabla R3 se muestra que las plantas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4* tienen unos porcentajes de supervivencia muy bajos (30 %), en comparación con las plantas *col0* (100 %). Las pocas plantas supervivientes en ambas líneas mutantes mostraron un desarrollo bastante reducido, con hojas pequeñas y rosetas de menor tamaño en comparación con las plantas *col0* (Figura R6B).

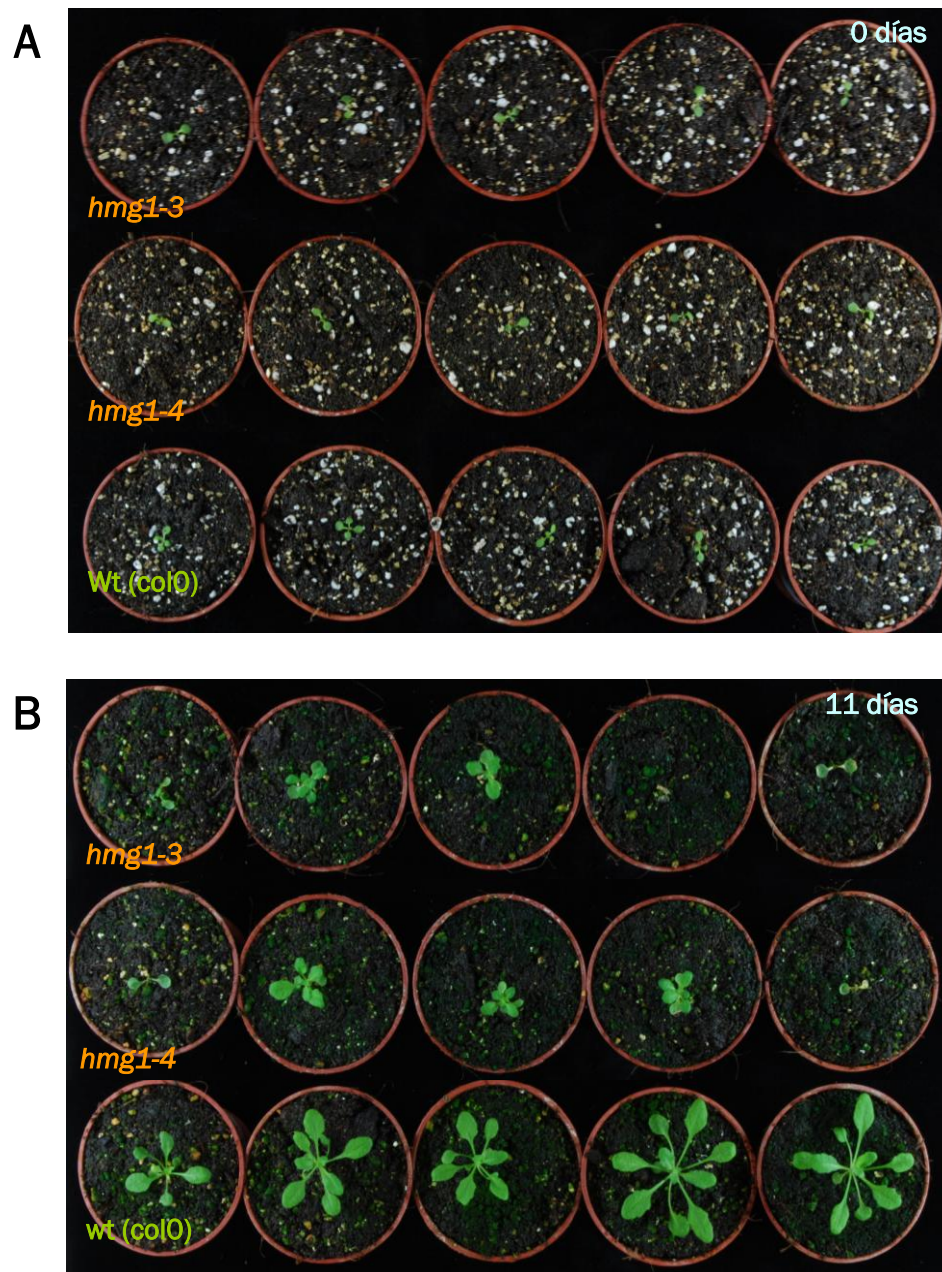
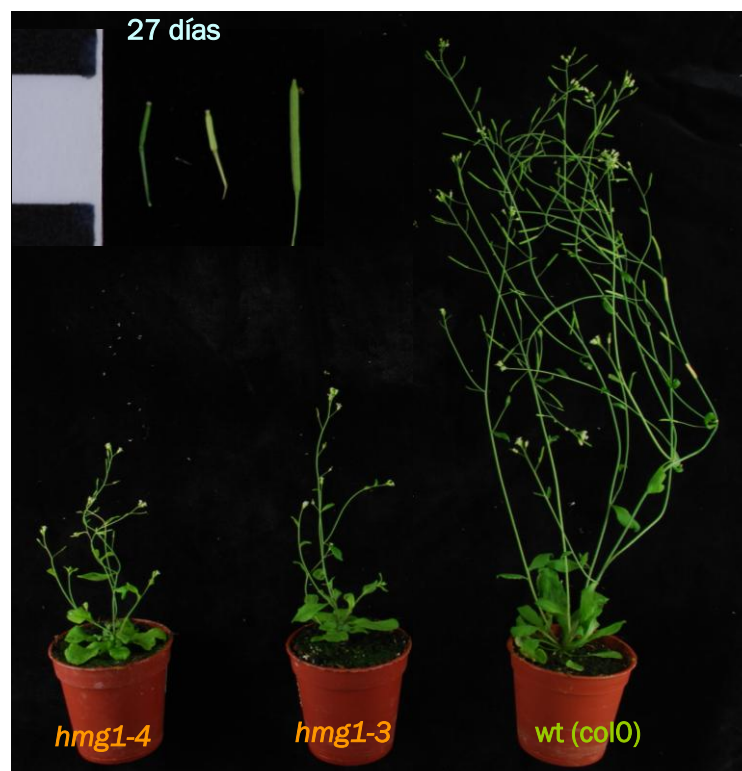


Figura R6. Fenotipo de las plantas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*. **A.** Plantas transferidas a tierra después de 10 días de crecimiento en placa en condiciones estériles. **B.** Plantas observadas tras 11 días de crecimiento en tierra. En las líneas mutantes *hmg1* se observa un fenotipo alterado.

Tabla R3. Análisis de supervivencia de mutantes *hmg1*, después de su transferencia a tierra.

Línea	Experimento 1		Experimento 2		% Global de Supervivencia
	Total	Supervivientes	Total	Supervivientes	
wt	5	5	5	5	100
<i>hmg1-4</i>	5	3	5	0	30
<i>hmg1-3</i>	5	2	5	1	30
<i>hmg1-3/1S:GFPm(43)</i>	3	3	-	-	100
<i>hmg1-3/1S:GFPm(54)</i>	5	5	5	5	100
<i>hmg1-3/1S:GFPm(61)</i>	5	4	5	4	80
<i>hmg1-3/1S:GFPm(80)</i>	5	5	5	5	100
<i>hmg1-3/1S:GFPm(93)</i>	5	3	5	3	60
<i>hmg1-3/1S:GFPm(107)</i>	5	3	5	4	70

Tras 27 días de crecimiento en tierra, las pocas plantas mutantes supervivientes presentaban un fenotipo muy marcado de enanismo, con tallos y hojas de menor longitud y tamaño, además de unas silicuas mucho más pequeñas en comparación con las plantas *col0* (Figura R7). Estas características fenotípicas fueron semejantes tanto en la línea *hmg1-3* como en *hmg1-4* y coincidieron también con los descritos anteriormente para la línea *hmg1-3* (Antolin-Llovera, 2006). Se puede concluir que la disrupción del gen *HMG1* de *A. thaliana* afecta severamente la viabilidad, crecimiento y fertilidad de la planta.

Figura R7. Fenotipo de los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*, tras 27 días de crecimiento en tierra.

1.3 Líneas transgénicas 1S:GFPm en fondo mutante *hmg1-3*.

Para caracterizar la función biológica del dominio de membrana de la HMGR1S, el mutante *hmg1-3* fue transformado con la construcción 1S:GFPm. Esta quimera es portadora de una variante monomérica de GFP y está descrita con mayor detalle en la Sección 2.3. Dado que el mutante *hmg1-3* tiene una viabilidad y fertilidad muy reducidas, la transformación con la construcción 1S:GFPm fue realizada sobre el hemicingoto portador de una sola copia del alelo mutado (genotipo *wt/hmg1-3*). Los individuos transformantes eran por tanto segregantes para la mutación. En la generación T₁ se seleccionaron 133 plantas que presentaban fluorescencia y que por tanto expresaban 1S:GFPm. No se realizó selección con el antibiótico kanamicina cuya resistencia estaba asociada a la construcción 1S:GFPm, pues dicha resistencia también está asociada a la mutación *hmg1-3*, la cual impedía distinguir los transgénicos de los no transgénicos. Los 133 transformantes fueron genotipados para determinar su genotipo con relación al alelo *hmg1-3*. En total se identificaron 25 individuos portadores de la construcción 1S:GFPm que eran homocigotos para *hmg1-3*, los cuales produjeron semillas en grado variable. De entre éstos se eligieron seis transformantes 1S:GFPm (*hmg1-3/hmg1-3*) que produjeron suficiente cantidad de semillas para proseguir con la experimentación (Tabla R4).

Tabla R4. Caracterización de los transformantes 1S:GFPm homocigotos para *hmg1-3*.

Líneas	Fluorescencia		
	Raíz	Cotiledón	Hoja verdadera
<i>hmg1-3/1S:GFPm(43)</i>	++	++	+
<i>hmg1-3/1S:GFPm(54)</i>	++	+	+
<i>hmg1-3/1S:GFPm(61)</i>	++	-	+
<i>hmg1-3/1S:GFPm(80)</i>	++	-	+
<i>hmg1-3/1S:GFPm(93)</i>	++	-	-
<i>hmg1-3/1S:GFPm(107)</i>	++	-	-

+ : Intensidad de fluorescencia

- : Sin fluorescencia

Como se observa en la tabla R4, las seis líneas *hmg1-3/1S:GFPm* (43, 54, 61, 80, 93, 107), expresan distintos niveles de 1S:GFPm y tienen distintos patrones de fluorescencia. Si bien estas seis líneas son fluorescentes, no se llegó a determinar si eran homocigotos o hemicingotos para el transgen 1S:GFPm.

Con el fin de caracterizar fenotípicamente los transformantes *hmg1-3/1S:GFPm*, las semillas obtenidas a partir de las seis líneas seleccionadas fueron sembradas en paralelo

con las líneas *hmg1-3*, *hmg1-4* y la línea *col0*, en placas con medio MS estéril y en condiciones de día largo. Se realizaron así dos experimentos independientes. Tras 10 días de crecimiento en estas condiciones, las plantas *col0*, *hmg1-3*, *hmg1-4* y las plantas de las seis líneas *hmg1-3/1S:GFPm* no mostraron diferencias en su desarrollo (Figura R6). Pasado este tiempo, se trasladaron a tierra cinco plantas de cada línea. Se observó que las seis líneas *hmg1-3/1S:GFP* (43, 54, 61, 80, 93, 107) presentaron menos anomalías y retraso en el desarrollo que los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*, con una recuperación marcada en la estructura, aspecto y tamaño de tallos, rosetas, hojas y silicuas (Figura R8). En la Figura R9 se observa el estado de crecimiento en tierra a 34 y 60 días respectivamente. En la Figura R10 se observa el estado de las silicuas extraídas tras 48 días de crecimiento en tierra. Además se advirtió una recuperación en su capacidad de adaptación y supervivencia en tierra, que se veía bastante alterada en las líneas *hmg1-3* y *hmg1-4* (Tabla R3).

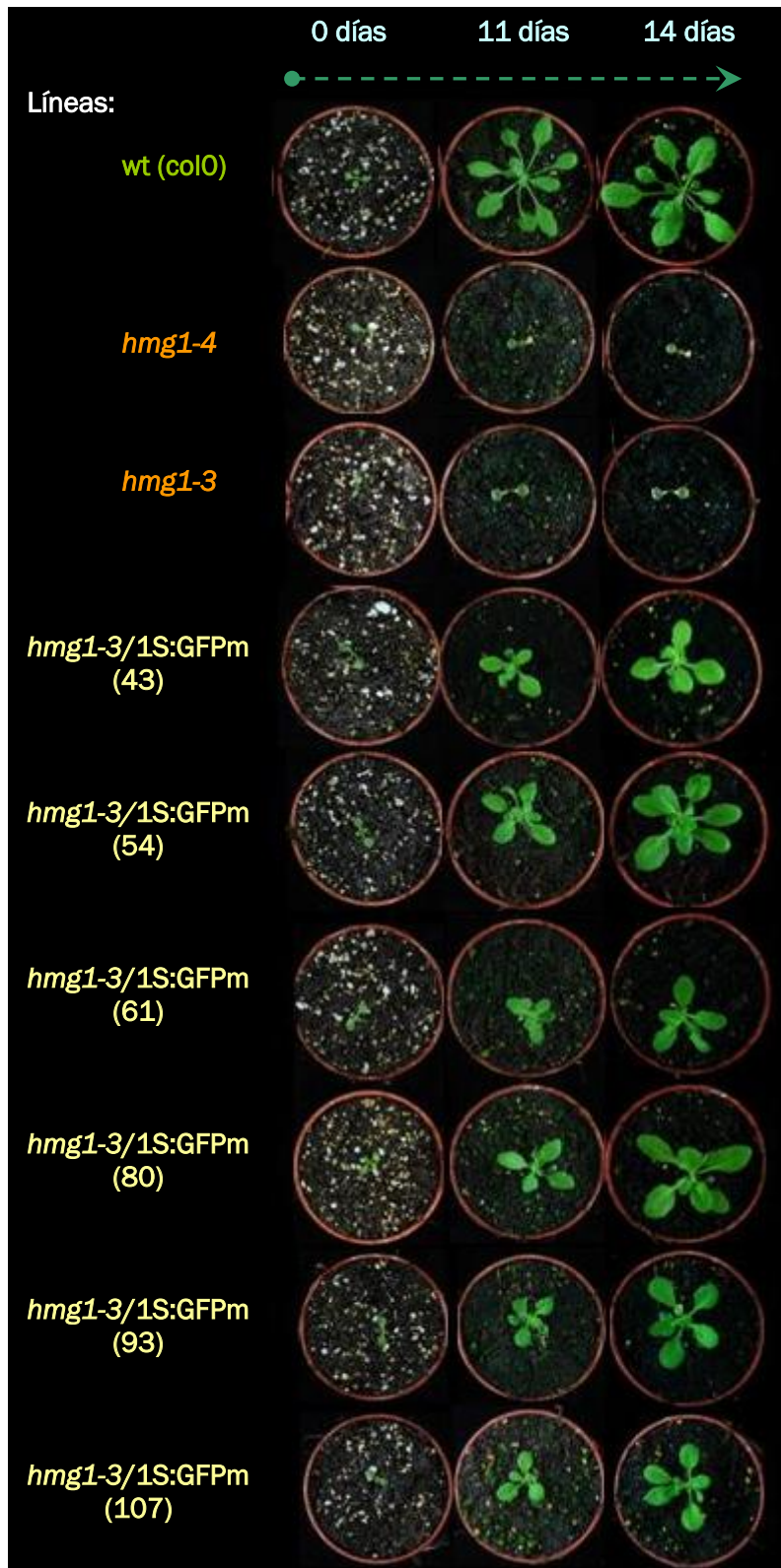


Figura R8. Fenotipo de las líneas *hmg1-3/1S:GFPm*. Se muestra el estado de plantas representativas, tras 11 y 14 días de crecimiento en tierra. Se observa que las seis líneas *hmg1-3/1S:GFPm* (43, 54, 61, 80, 93, 107) muestran una recuperación en su desarrollo.

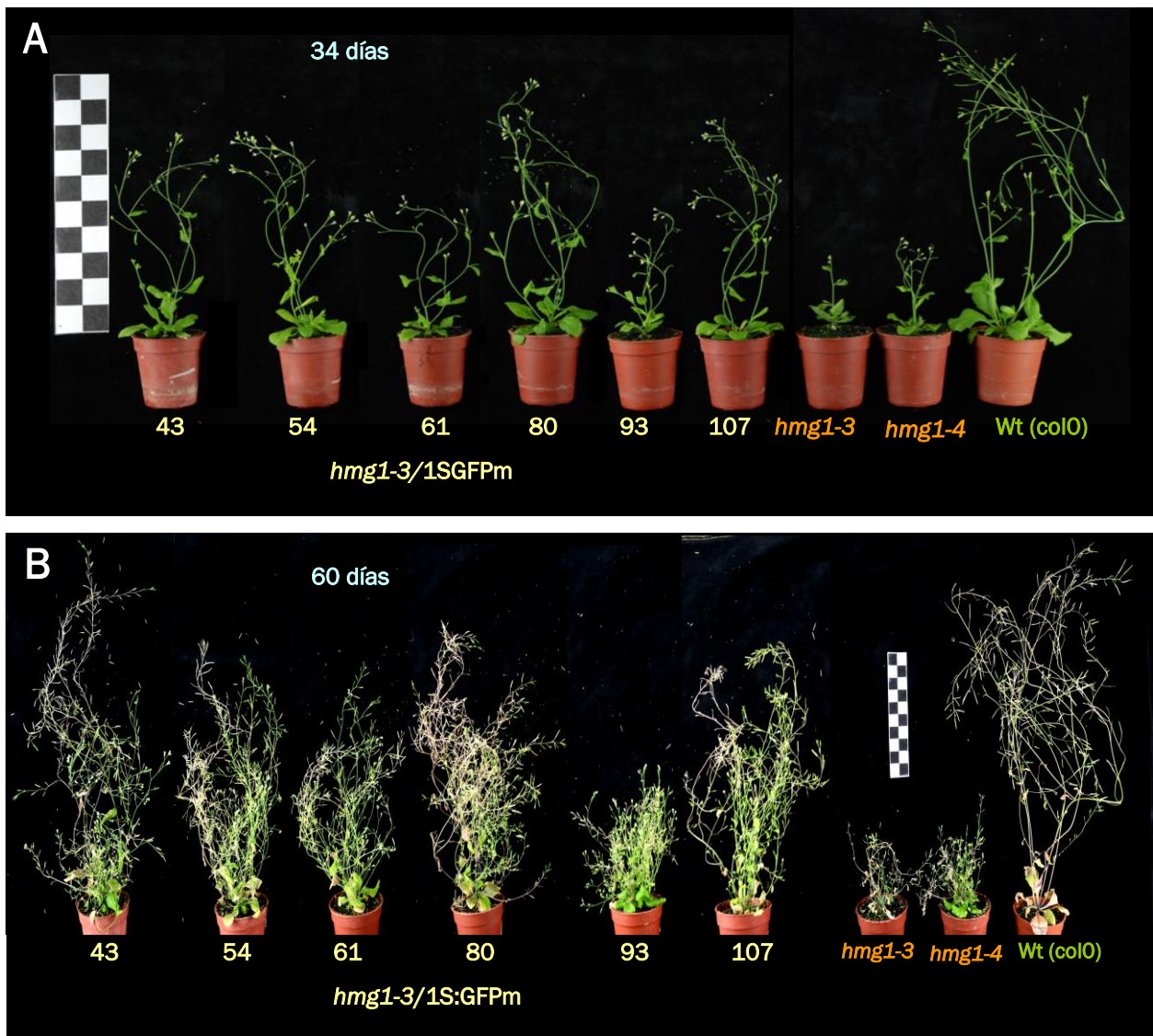


Figura R9. Fenotipo del desarrollo de las líneas *hmg1-3/1S:GFPm*. Las plantas *hmg1-3/1S:GFPm* son comparadas con las plantas mutantes *hmg1* y plantas *col0* no transformadas, después de (A) 34 días y (B) 60 días de crecimiento en tierra. Se muestra una planta representativa de cada una de las estirpes.

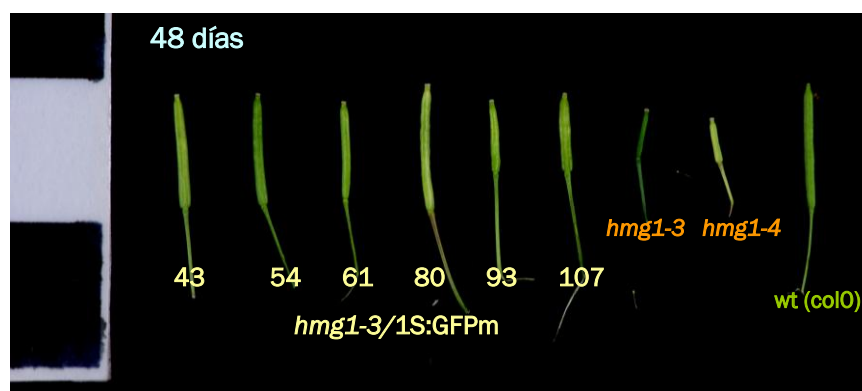


Figura R10. Desarrollo de las silicuas en las líneas *hmg1-3/1S:GFPm*. Las silicuas de las líneas *hmg1-3/1S:GFPm* son comparadas con las silicuas de los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4* y de *col0* no transformada. Se muestra una silicua representativa de cada una de las estirpes, extraída de una planta de 48 días de crecimiento en tierra.

Todos estos resultados, indican que las seis distintas líneas mutantes de *hmg1-3* transformadas con la 1S:GFPm sufren un proceso de recuperación fenotípica, revirtiendo muchas de las características relacionadas con la disrupción e inactivación del gen *HMG1*. Las líneas transformadas con 1S:GFPm restablecen su capacidad de adaptación en tierra principalmente en los primeros días de desarrollo que son claves para su supervivencia. Pasado este periodo de adaptación y ya en fase adulta, se observó en estas líneas una recuperación en la longitud y tamaño de los tallos, hojas y silicuas que eran portadoras de un mayor número de semillas que los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*. Estas observaciones sugieren que el dominio de membrana de la HMGR1S de *A. thaliana* cumple un rol biológico importante relacionado con el desarrollo de la planta y su adaptación al medio.

2. LA 1S:GFP ALTERA LA MORFOLOGÍA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN PLANTAS.

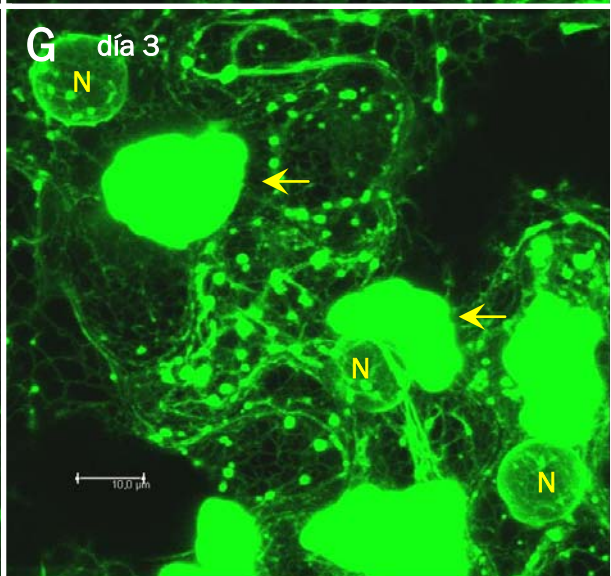
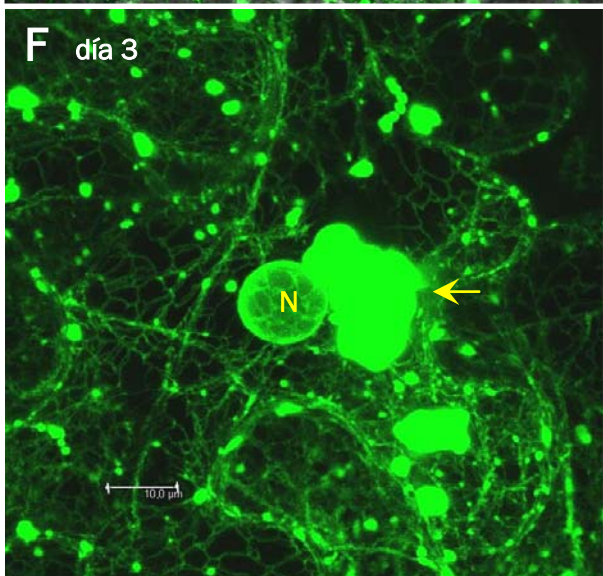
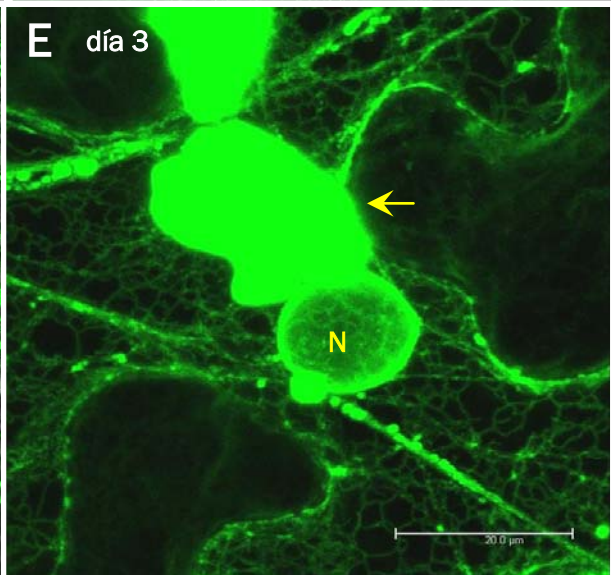
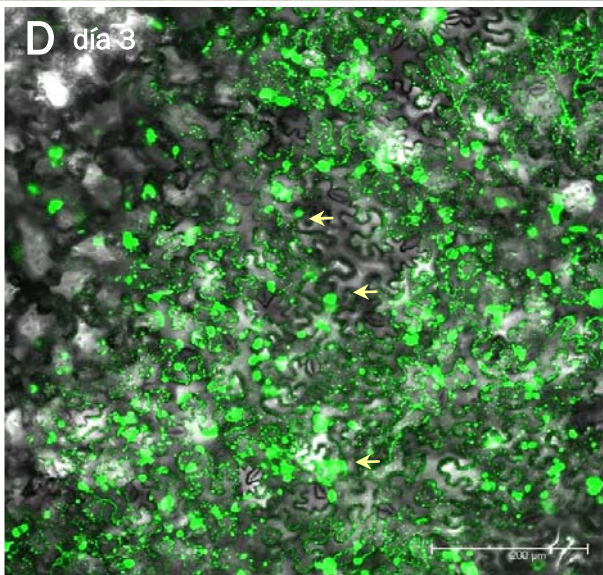
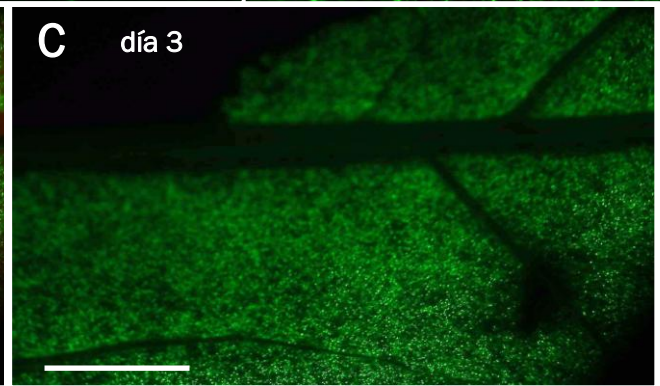
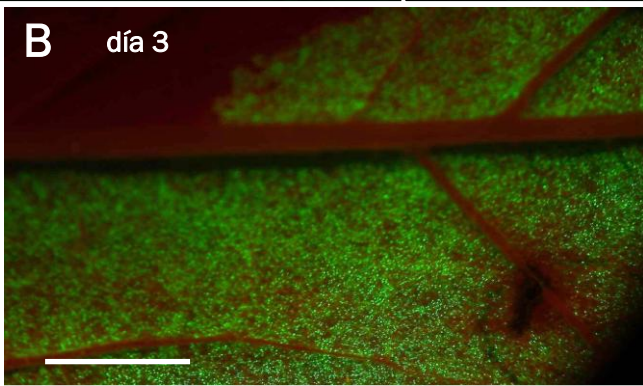
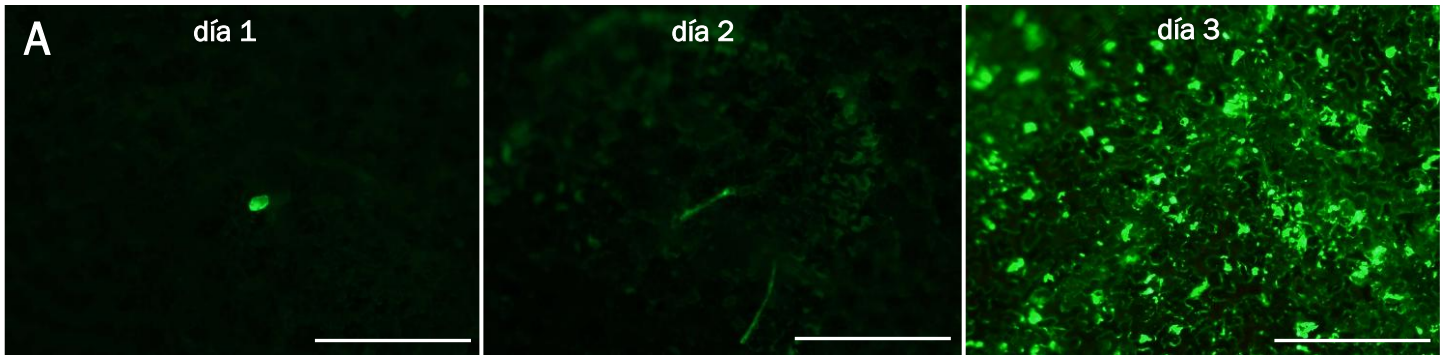
Ensayos previos de expresión transitoria por bombardeo de partículas en células epidérmicas de *A. thaliana* y cebolla demostraron que la 1S:GFP se localiza en el retículo endoplasmático y en unas estructuras vesiculares de tamaño variable (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010). La transfección en paralelo de 1S:GFP y el marcador de lumen de retículo T3RE, desveló que las estructuras vesiculares no son propias del retículo endoplasmático nativo, sino que son inducidas por 1S:GFP. Estos ensayos de co-transfección revelaron también que las vesículas de 1S:GFP son parte del retículo endoplasmático. Tomando en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis se utilizó la agroinfiltración como una técnica alternativa para realizar estudios de expresión transitoria de 1S:GFP en hojas de *N. benthamiana*, con la intención de realizar además un análisis ultraestructural de la morfología del retículo endoplasmático en estas células agroinfiltradas.

2.1 Expresión transitoria en hoja de *N. benthamiana*.

Una de las principales limitaciones de la técnica de bombardeo de partículas en tejidos, es la baja proporción de células que incorporan la información genética transferida, que en nuestro caso es el plásmido (p1S:GFP) que codifica la 1S:GFP. Para realizar estudios ultraestructurales era necesario un alto porcentaje de transfección que fue alcanzado mediante la técnica de agroinfiltración con *A. tumefaciens*.

2.1.1 Organización general del retículo endoplasmático.

Tal como se observa en la Figura R11A, la agroinfiltración con *A. tumefaciens* permitió un alto porcentaje de transfección y un elevado nivel de expresión transitoria, que fue observado el tercer día en células epidérmicas de hoja de *N. benthamiana*. El análisis de estas células por microscopio de fluorescencia (Figuras R11B y R11C) y microscopía confocal (Figura R11 D – G) mostró que la 1S:GFP se localiza en la trama de retículo endoplasmático, pero sobre todo en estructuras de agregación con una localización generalmente peri-nuclear. El tamaño de los agregados varió entre 10 y 20 μm de diámetro. Adicionalmente, durante la expresión de 1S:GFP se observó fluorescencia en los contornos que rodean al núcleo, lo que sugirió que esta quimera estaría localizada también en la membrana nuclear.



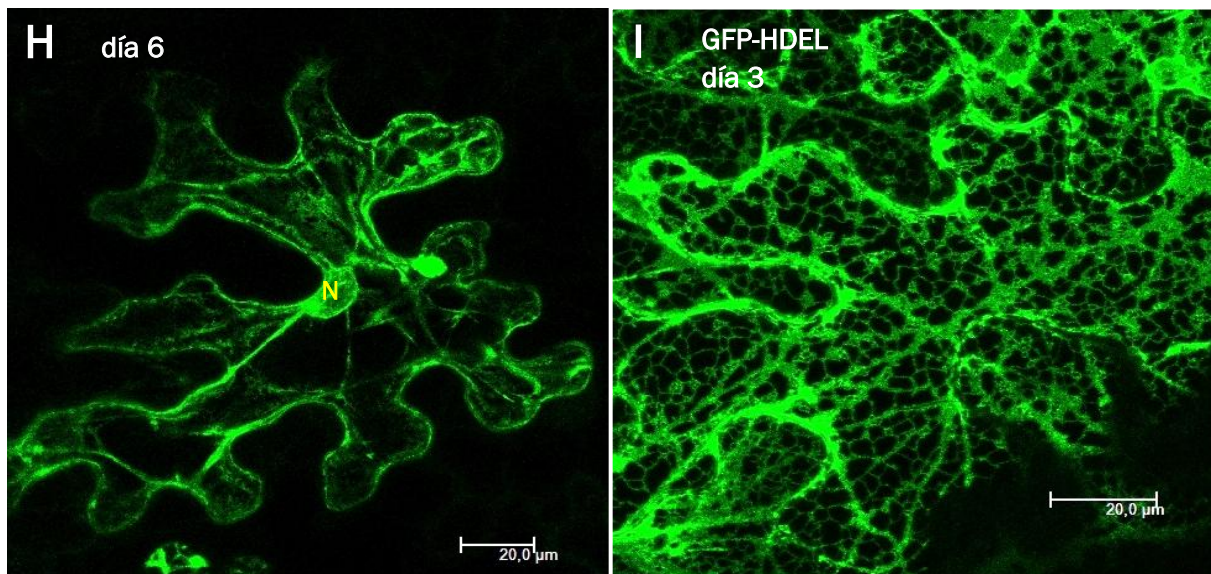


Figura R11. Expresión transitoria de 1S:GFP en células epidérmicas de hoja de *N. benthamiana*. Las hojas fueron observadas a los 3 días de la agroinfiltración al microscopio de fluorescencia (B y C) y al microscopio confocal (D – G). **A.** Elevado porcentaje de transfección y alto nivel de expresión de 1S:GFP observado tras el tercer día de la agroinfiltración. **B.** Región de la hoja perteneciente a la zona agroinfiltrada, el color verde corresponde a la fluorescencia de 1S:GFP y el rojo a la auto-fluorescencia de la clorofila. **C.** Imagen del canal de fluorescencia verde. **D.** Vista panorámica de células epidérmicas. **E, F y G.** Localización subcelular de la 1S:GFP en células epidérmicas tras el tercer día de la agroinfiltración. **H.** Tras el sexto día. **I.** Expresión transitoria del marcador de lumen de retículo endoplasmático GFP-HDEL. Las imágenes de los paneles E – I corresponden a proyecciones de 50 planos. Las flechas indican las estructuras fluorescentes de agregación. N: Núcleo. Las barras indican: B y C, 5 mm; A y D, 200 µm; E, H e I, 20 µm; F y G, 10 µm.

El sexto día tras la agroinfiltración, se comenzó a distinguir un cierto deterioro en los contornos celulares de la mayoría de las células epidérmicas, de las cuales sólo una minoría aún mostraba cierto grado de fluorescencia (Figura R11H), en estas células se apreció la presencia de estructuras de agregación de menor tamaño ($\sim 8 \mu\text{m}$), con fibras fluorescentes alargadas y regiones de trama reticular. La expresión del marcador de lumen de retículo endoplasmático GFP-HDEL no dio lugar a la formación de agregados reticulares (Figura R11I).

Para confirmar la naturaleza de las estructuras de agregación, se realizaron ensayos de colocalización con el marcador fluorescente rojo T3RE. Dicho marcaje fue desarrollado anteriormente (Ferrero, 2010) y está constituido por la proteína fluorescente roja DsREDT3 unida a un péptido de tránsito N-terminal de la quitinasa y a una señal C-terminal de retención para lumen de retículo endoplasmático (KDEL). La proteína 1S:GFP y el marcador T3RE fueron co-expresados en hojas de *N. benthamiana* transfectadas por agroinfiltración (Figura R12).

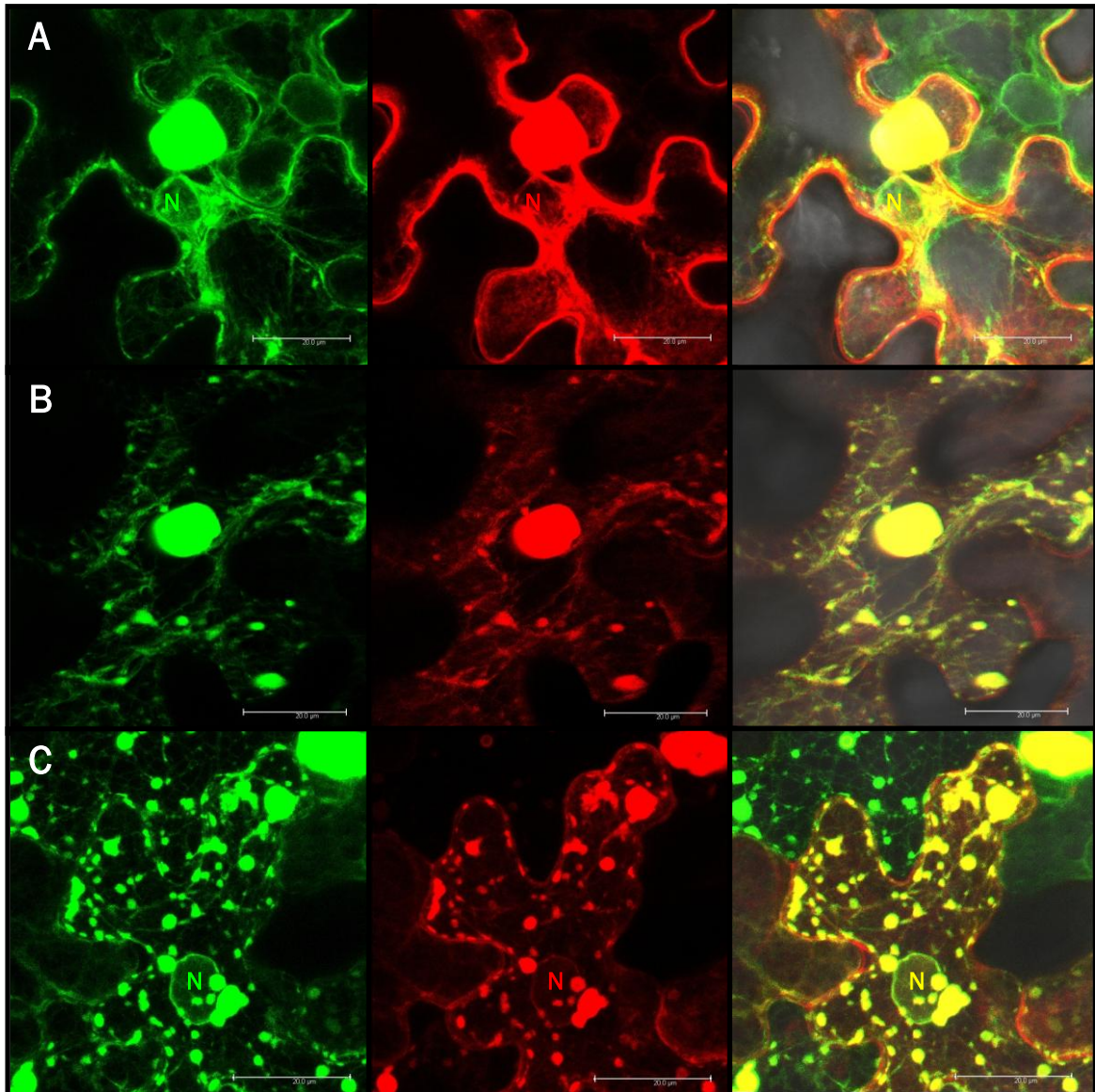
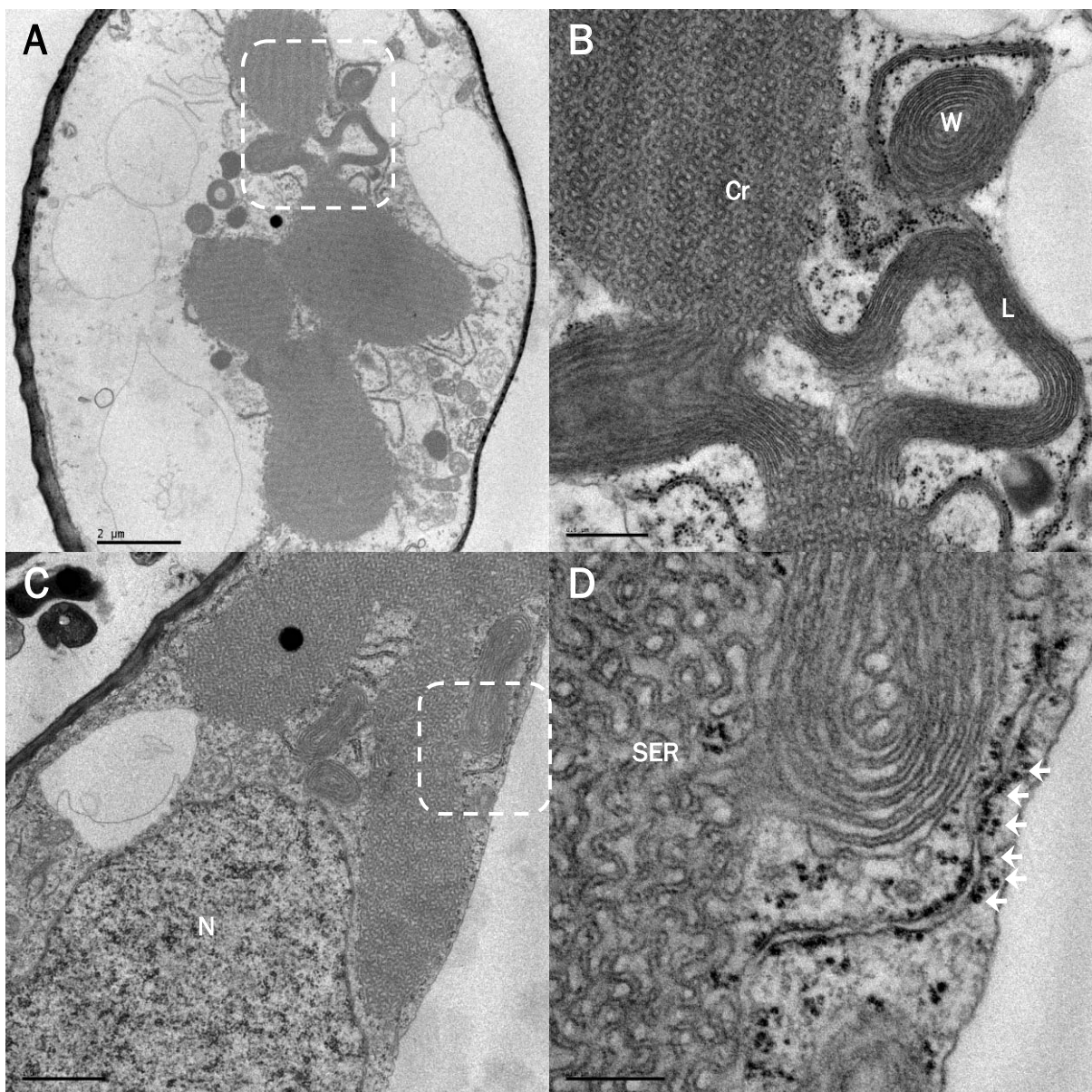


Figura R12. Colocalización de 1S:GFP con el marcador de retículo T3RE en células epidérmicas de *N. benthamiana*. Las hojas fueron observadas al microscopio confocal a los 3 días de la agroinfiltración. El color verde corresponde a la fluorescencia de 1S:GFP y el color rojo a la fluorescencia del marcador T3RE. La colocalización de ambas proteínas se representa en color amarillo que corresponde a la superposición de ambos canales. **A y B.** Proyección de 10 planos; **C.** Proyección de 20 planos; además de la colocalización, en la superposición se observa una célula verde que sólo expresa 1S:GFP. N: Núcleo. Todas las barras indican: 20 μ m.

La Figura R12 muestra que 1S:GFP y T3RE colocalizan en la trama de retículo endoplasmático y en los agregados de este orgánulo inducidos por 1S:GFP. Dado que el marcador T3RE tiene una señal de retención funcional, estos resultados indican que los agregados de 1S:GFP están constituidos por retículo endoplasmático.

2.1.2 Ultraestructura de los agregados de retículo endoplasmático-1S:GFP (ER-1S:GFP).

La alta eficiencia de transfección y el elevado nivel de expresión de 1S:GFP alcanzados en el sistema de *N. benthamiana*, permitió realizar un análisis ultraestructural de los agregados de retículo endoplasmático. Después de 3 días de la transfección con 1S:GFP, las hojas de *N. benthamiana* fueron sometidas a fijación química con glutaraldehído y para-formaldehído (Figura R13) o a criofijación (Figura R14). Las muestras fueron observadas al microscopio electrónico (ME).



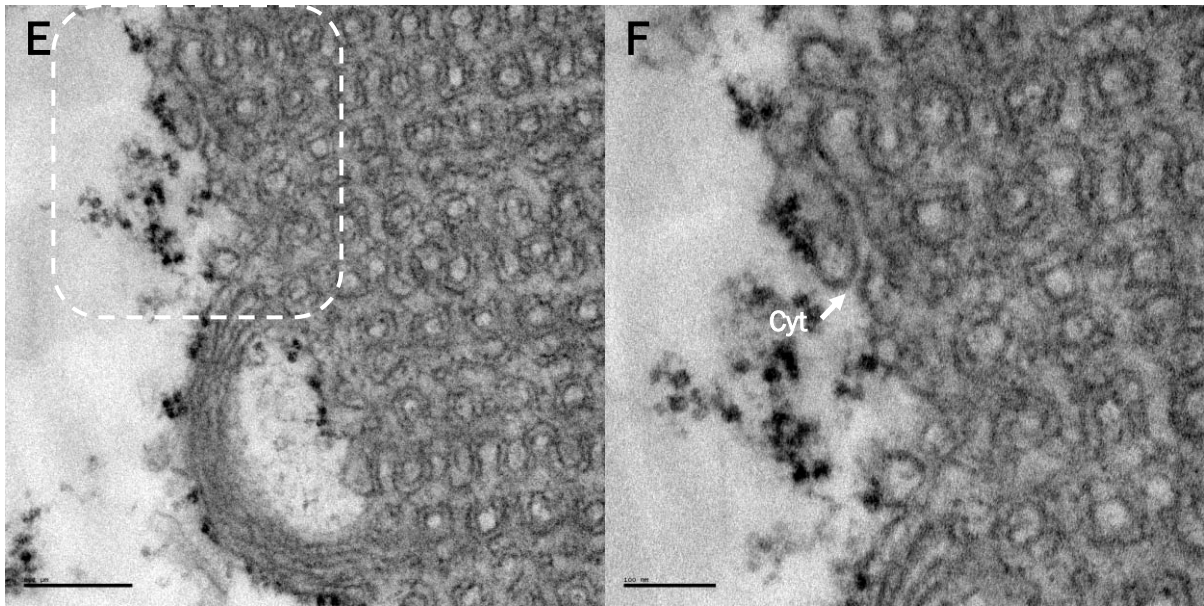


Figura R13. Microscopía electrónica de transmisión de células epidérmicas de *N. benthamiana* transfectadas con 1S:GFP y fijadas químicamente. Después de 3 días de la agroinfiltración, las hojas fueron fijadas con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v y preparadas para su observación al ME. **A.** Imagen panorámica de una célula epidérmica con grandes agregados de retículo endoplasmático inducidos por 1S:GFP. **B.** Región aumentada, se distinguen distintos patrones de organización reticular, clasificados como: Cr, estructura cristaloides; W, estructura en espiral (del inglés: whorl); L, estructura lamelar. **C.** Imagen panorámica de agregados de RE peri-nucleares; N: núcleo. **D.** Región aumentada, se observa que los agregados están constituidos por RE liso (SER), los ribosomas señalados por flechas quedan excluidos del agregado. **E.** Estructura cristaloides. **F.** Región aumentada, se distingue la compactación de las membranas reticulares que dejan entre sí un espacio citoplasmático (Cyt) de unos 10 a 15 μm . Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, 2 μm ; B, 0.5 μm ; C, 1 μm ; D y E, 0.2 μm ; F, 100 nm.

El análisis en células epidérmicas de *N. benthamiana* fijadas químicamente, reveló que los agregados de retículo endoplasmático están constituidos por membranas con distintos patrones de organización (Figura R13). La mayoría de estructuras observadas presentan patrones de membranas sinusoidales, denominadas como estructuras cristaloides por su aspecto rígido y compacto (Figura R13A y R13B). También se pudieron observar otros patrones, como estructuras en espiral, constituidas por membranas concéntricas, y estructuras lamelares cuyas membranas se encuentran distribuidas paralelamente (Figura R13B). Los agregados de retículo endoplasmático poseen una localización peri-nuclear (Figura R13C) y están formados exclusivamente por retículo endoplasmático liso. Adicionalmente se observó que los ribosomas quedan excluidos del interior de los agregados acumulándose en sus bordes (Figura R13D). Las membranas reticulares quedan unidas y plegadas unas con otras dejando entre sí un espacio citoplasmático relativamente estrecho de 10 y 15 nm de grosor (Figura R13F); mientras que los espacios más amplios en los agregados corresponden a lumen de retículo endoplasmático.

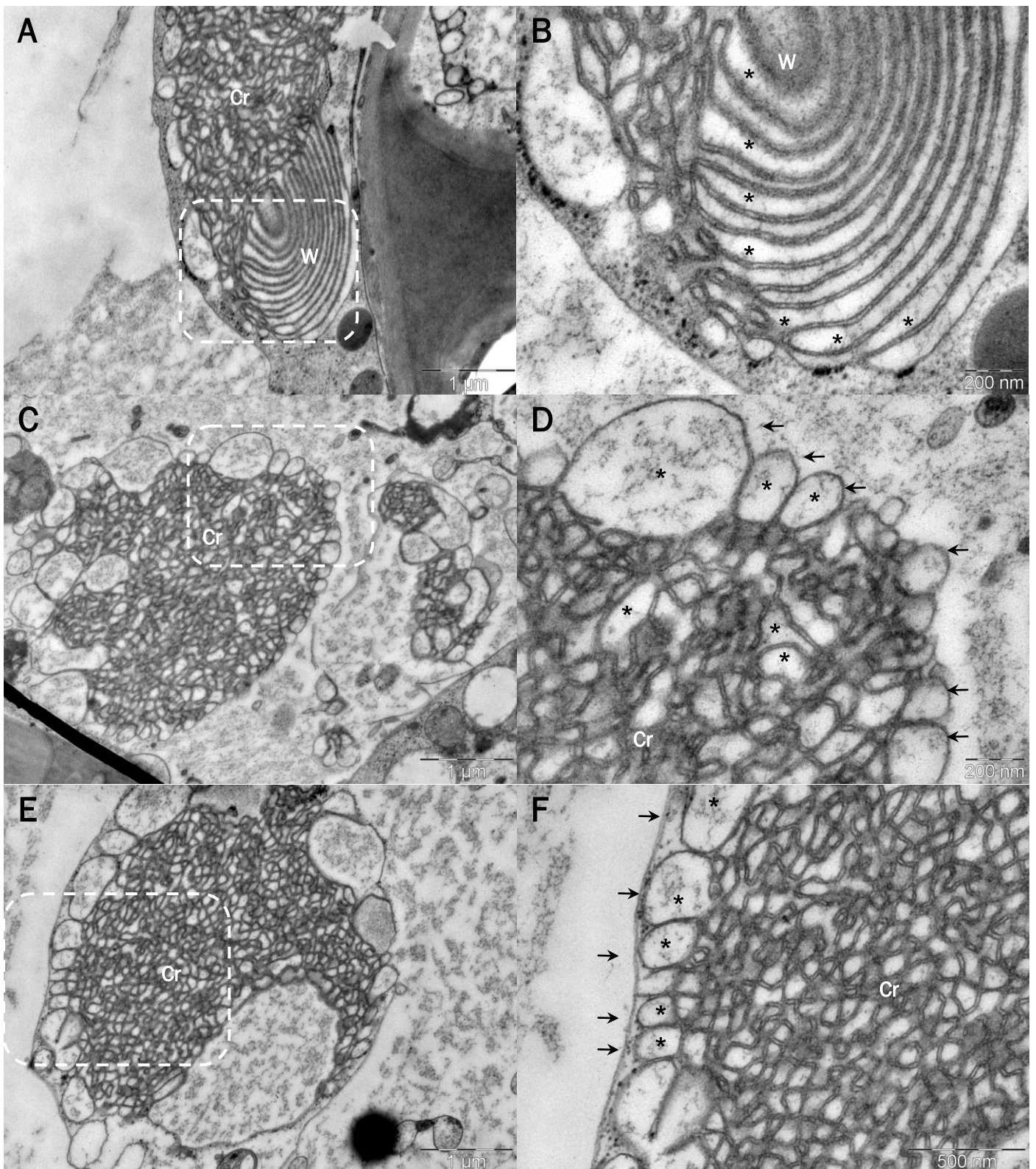


Figura R14. Microscopía electrónica de transmisión de células epidérmicas de *N. benthamiana* transfectadas con 1S:GFP. A los 3 días de la agroinfiltración, las hojas fueron procesadas por criofijación y preparadas para su observación al ME. **A.** Imagen panorámica de un agregado de retículo endoplasmático en el que se observa una sección sagital con estructura cristalóide (Cr) y otra transversal con estructuras en espiral (W). **B.** Región aumentada, se distingue dobles membranas de conformación en espiral. **C y E.** Imágenes panorámicas de agregados con estructura cristalóide rodeados por membranas en forma de bucles o lazos. **D y F.** Regiones aumentadas, se observan estructuras cristaloides y los bucles que las rodean están señaladas por flechas. Los asteriscos en los paneles B, D y F indican las regiones amplias de lumen. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, C y E, 1 μm ; B y D, 200 nm; F, 500 nm.

En células epidérmicas de *N. benthamiana* procesadas por criofijación, se observan las mismas estructuras que las de fijación química, pero con patrones algo distintos. Tras la criofijación, tanto las estructuras cristaloides (Figuras R14A, R14C y R14E) como las estructuras en espiral (Figura R14B) tienen un aspecto más distendido que las de fijación química (Figura R13B). El patrón reticular de los agregados se observa más desordenado y heterogéneo, con la presencia de bucles más distendidos en la zona exterior de los mismos (Figuras R14D y R14F). Los bucles circundantes de los agregados parecen ir plegándose entre sí y compactándose, para integrarse en el interior del agregado incrementando su tamaño. Al igual que en la fijación química, en la criofijación las membranas de retículo endoplasmático dejan un espacio citoplasmático muy estrecho de entre 10 y 15 nm (Figura R14B), en tanto que los espacios de lumen son más amplios y variables en cuanto a forma y tamaño (Figura R14D). Los cortes sagital y transversal de algunos agregados, muestran que las regiones de aspecto cristaloides o espiral están conectados entre sí (Figuras R14A y R14B), exhibiendo zonas de transición entre las mismas. Esto se observa también en las Figuras R13B y R13D correspondientes a fijación química. Estos resultados sugieren que el aspecto cristaloides, espiral o lamelar del agregado depende principalmente de la orientación del corte.

En general, con la fijación química se observaron agregados de retículo endoplasmático más compactos que en muestras procesadas por criofijación. Esto podría ser debido a la compactación de membranas celulares en los pasos de deshidratación que siguen a la fijación propiamente dicha. Por el contrario, en la criofijación los espacios de las estructuras celulares que contienen agua podrían quedar preservados por la rigidez de la membrana, reflejando mejor su estructura nativa.

2.1.3 Efecto de la GFP.

Estudios previos ponen de manifiesto que la expresión de GFP unida a secuencias proteicas transmembrana puede conducir a la desestructuración del sistema de endomembranas, dando lugar a la formación de agregados (Snapp *et al.*, 2003). Se ha propuesto que ello es debido a la tendencia de dimerización de la GFP nativa, que permitiría la asociación de membranas adyacentes. También se ha descrito que la mutación de un único residuo en la GFP (A206K) es suficiente para prevenir su dimerización sin alterar sus propiedades fluorescentes (Zacharias *et al.*, 2002).

Con el fin de determinar si la formación de agregados de 1S:GFP en el sistema de *N. benthamiana* era debida al dominio de membrana de HMGR o a la GFP, se realizaron ensayos en los que la GFP de la quimera fue sustituida por su variante monomérica. A la

nueva quimera se la denominó 1S:GFPm. Tras expresión transitoria en células epidérmicas de hoja de *N. benthamiana* (Figura R15), la quimera 1S:GFPm se localizó en grandes agregados peri-nucleares de tamaño similar a los observados con 1S:GFP (compárese Figuras R11 y R15). Además se encontró que algunas de las fibras marcadas con 1S:GFPm que emergen de los agregados peri-nucleares, aparecen claramente engrosadas (Figura R15). Dichas fibras podrían estar constituidas por membranas de retículo endoplasmático en formación lamelar.

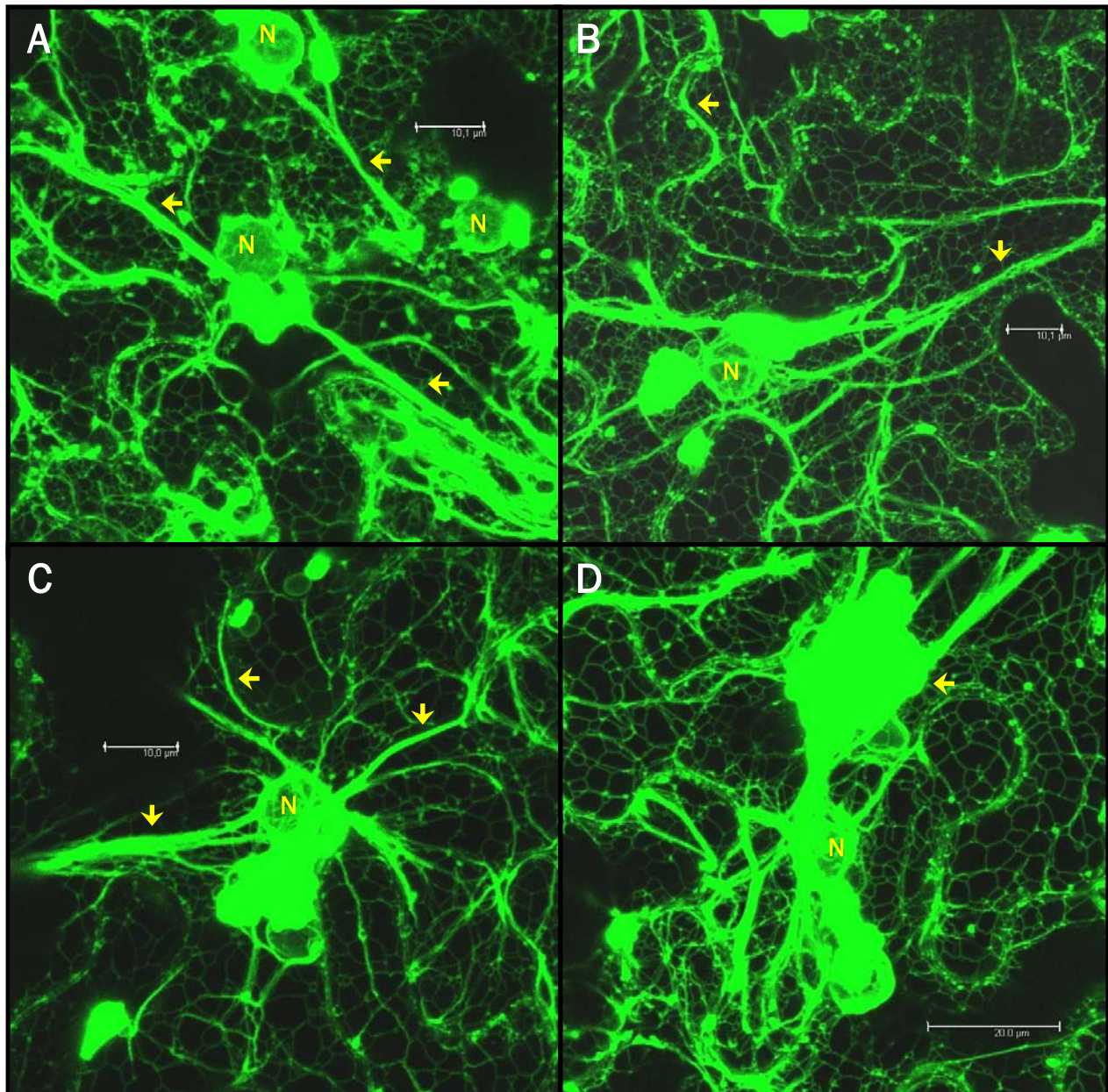


Figura R15. Expresión transitoria de 1S:GFPm en células epidérmicas de *N. benthamiana*. Las hojas fueron observadas al microscopio confocal a los 3 días de la agroinfiltración. **A – D.** Localización subcelular de 1S:GFPm en células epidérmicas, se observa la formación de agregados y fibras de retículo endoplasmático engrosadas (señaladas por flechas). Las imágenes corresponden a la proyección de 30 planos. N: Núcleo. Las barras indican: A, B y C. 10 µm; D. 20 µm.

Un análisis ultraestructural más detallado de las células transfectadas fijadas químicamente, reveló que los agregados de membranas 1S:GFPm presentan la misma distribución que los agregados 1S:GFP (compárese Figuras R13 y R16). Las membranas de retículo endoplasmático también dejan un espacio citoplasmático estrecho entre sí y las regiones cristaloides y en espiral aparecen conectadas (Figura R16C). Sin embargo, los agregados formados por 1S:GFPm presentan una región interna de membranas sinusoidales algo distendidas, con espacios de lumen más amplios con respecto a las membranas circundantes, también sinusoidales pero más compactas (Figuras R16B y R16D).

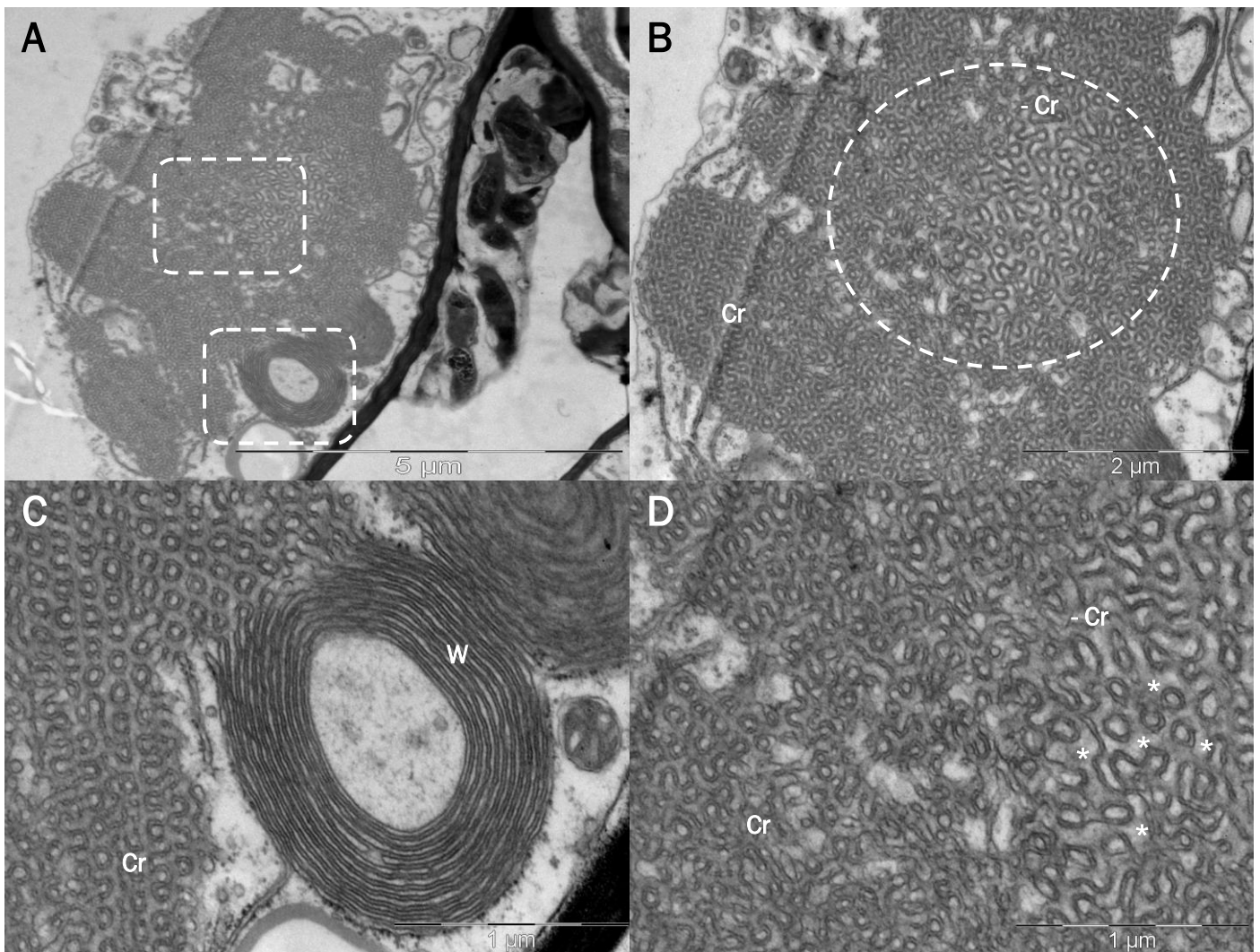


Figura R16. Microscopía electrónica de transmisión de células epidérmicas de *N. benthamiana* transfectadas con 1S:GFPm y fijadas químicamente. Después de 3 días de la agroinfiltración, las hojas fueron fijadas con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v y preparadas para su observación al ME. **A.** Imagen panorámica de un agregado de retículo endoplasmático en una célula epidérmica. **B.** Imagen aumentada, en el círculo que se observa una región cristaloides interior menos compacta (-Cr). **C.** Imagen aumentada de una estructura cristaloides (Cr) y en espiral (W) conectados entre sí. **D.** Detalle en el que se observa la transición de las membranas desde un patrón cristaloides compacto (Cr) a otro más distendido (-Cr) situado a su derecha (los asteriscos indican las regiones más amplias de lumen). Los paneles C y D corresponden a las zonas en recuadro de A. Las barras indican: A, 5 µm; B, 2 µm; C y D, 1 µm.

Estos resultados indican que los agregados de membranas en las células que sobreexpresan 1S:GFP se forman por acción del dominio de membrana de la HMGR1S y no por la de GFP. La proliferación de las membranas y la morfogénesis del retículo endoplasmático se produce en la misma medida y con los mismos patrones estructurales tras la expresión de 1S:GFP o 1S:GFPm. La capacidad de dimerización de la GFP afecta a la compactación de las membranas que es menor en algunas regiones de los agregados de 1S:GFPm, pero los espacios citoplasmáticos entre las membranas tienen aproximadamente la misma anchura (10 – 15 nm) en los dos casos.

2.1.4 Efecto de la región N-terminal de HMGR1.

Estudios previos (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010) indicaron la importancia de la región N-terminal de HMGR en la localización subcelular de esta proteína y en su capacidad morfogenética en el retículo endoplasmático. En *A. thaliana*, las isoformas HMGR1S y HMGR1L derivan de un mismo gen, siendo la única diferencia entre ambas la presencia de una región adicional de 50 residuos aminoacídicos (región 1L-Extra) en la región N-terminal de HMGR1L. La región N-terminal de la quimera 1S:GFP derivada de HMGR1S, da lugar a la formación de agregados de retículo endoplasmático en diversos tipos celulares de *A. thaliana*, tal como se documenta en la presente tesis (Sección 2.2.1) y en estudios anteriores (Leivar *et al.*, 2005; Antolín-Llovera, 2006; Ferrero, 2010). Sin embargo, la quimera 1L:GFP derivada de HMGR1L se localiza únicamente en la trama de retículo endoplasmático y no da lugar a la formación de agregados (Leivar, 2003). Por otra parte, el motivo conservado de argininas presente en la región N-terminal de 1S:GFP, es necesario para la capacidad morfogenética de esta quimera (Leivar, 2003).

Hasta la fecha estos dos elementos, región 1L-Extra y motivo conservado de argininas, han sido estudiados únicamente en *A. thaliana*, siendo conveniente su caracterización también en otros sistemas. Con el objeto de realizar estos estudios se utilizó el sistema de expresión transitoria en *N. benthamiana*. Las construcciones ensayadas fueron: La quimera 1L:GFP, portadora del dominio N-terminal de HMGR1L, la cual incluye la región 1L-Extra; la quimera Δ R1S:GFP en la que el motivo conservado de argininas (posiciones 4-6 respecto al extremo N-terminal) fueron sustituidos por tres alaninas. Tal como se observa en la Figura R17A, la quimera 1L:GFP se localiza exclusivamente en la trama de retículo endoplasmático y su sobreexpresión no induce la proliferación ni agregación del mismo. De modo similar, la quimera Δ R1S:GFP también se encuentra exclusivamente en el retículo endoplasmático y no da lugar a agregados (Figura R17B). La sobreexpresión de 1S:GFP si conduce a la formación de agregados de retículo endoplasmático (Figura R17C), tal como se ha descrito en la Sección 2.1.1 de la presente tesis. Estas

observaciones subrayan la importancia de la región 1L-Extra y del motivo conservado de argininas en la morfogénesis del retículo endoplasmático desencadenado por 1S:GFP en sistemas de plantas distintos a los de *A. thaliana*.

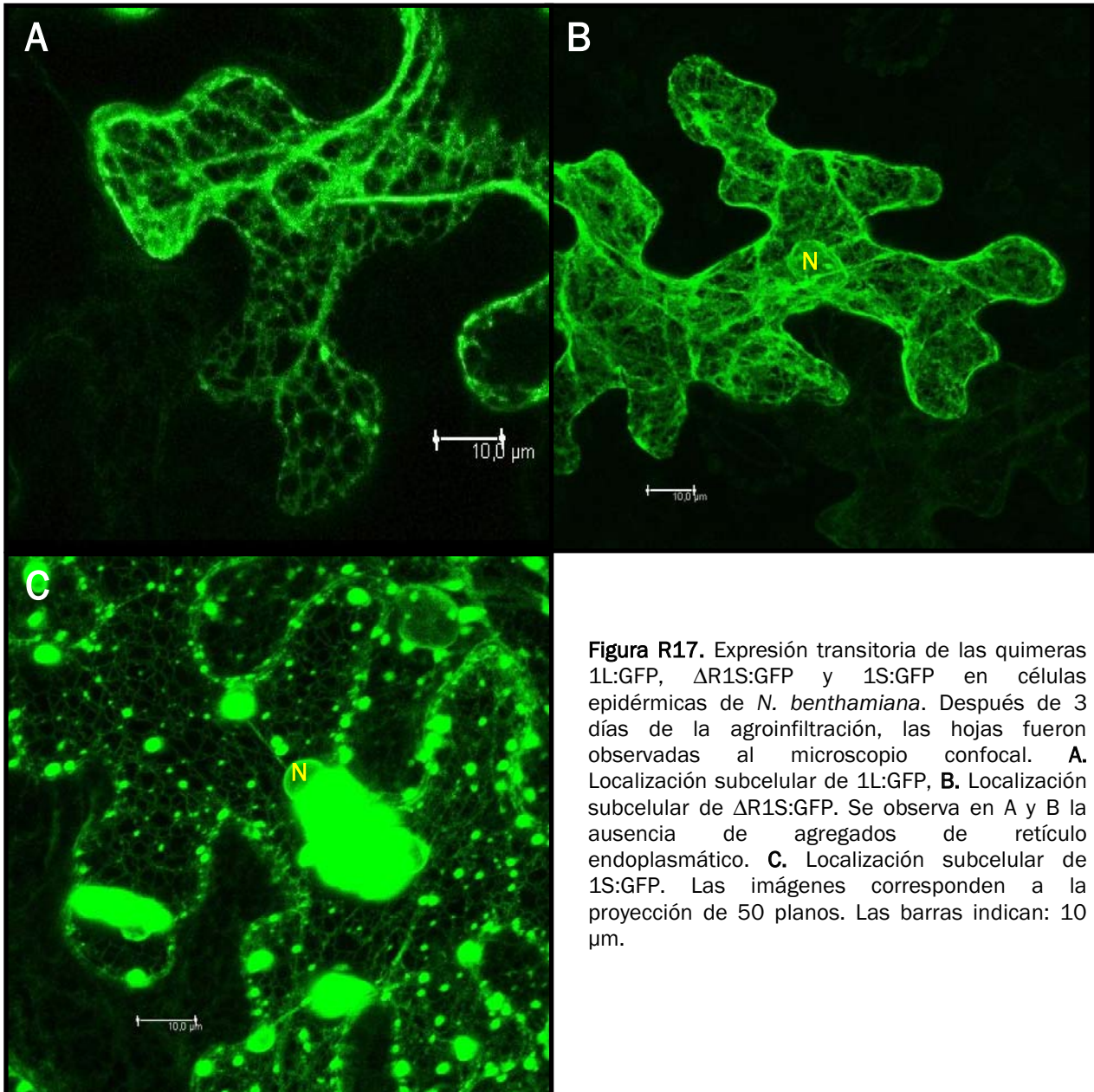


Figura R17. Expresión transitoria de las quimeras 1L:GFP, Δ R1S:GFP y 1S:GFP en células epidérmicas de *N. benthamiana*. Después de 3 días de la agroinfiltración, las hojas fueron observadas al microscopio confocal. **A.** Localización subcelular de 1L:GFP, **B.** Localización subcelular de Δ R1S:GFP. Se observa en A y B la ausencia de agregados de retículo endoplasmático. **C.** Localización subcelular de 1S:GFP. Las imágenes corresponden a la proyección de 50 planos. Las barras indican: 10 μ m.

2.2 Transformación estable de 1S:GFP en plantas de *A. thaliana*.

La caracterización de plantas transgénicas que expresan la quimera 1S:GFP fue abordado en un trabajo anterior (Ferrero, 2010). En este trabajo se estudió la expresión de la quimera en la planta y su efecto sobre los patrones de retículo endoplasmático. Sin embargo, dicho trabajo se realizó en una sola línea transgénica que fue estudiada por microscopía confocal. En la presente tesis se han ampliado estos estudios a otras líneas transgénicas y distintos tipos celulares, que han sido analizados además por microscopía electrónica.

2.2.1 Alteración del retículo endoplasmático en distintos tipos celulares.

Con el propósito de caracterizar el efecto de la expresión de 1S:GFP sobre la estructura del retículo endoplasmático en distintos tipos celulares de *A. thaliana*, se utilizó la línea transgénica 2.15.4 que presenta niveles de expresión de 1S:GFP elevados en toda la planta. El análisis por microscopía confocal permitió determinar el estado general del retículo endoplasmático en algunos tipos celulares en plantas de 10 días (Figura R18). Se observó que la 1S:GFP se expresa abundantemente en células epidérmicas de cotiledón (Figuras R18A y R18B), células de raíz (Figuras R18C y R18D), pelos radiculares (Figuras R18E y R18F) y células guarda de los estomas (Figuras R18G y R18H). En todos los casos se distinguieron masas fluorescentes de 1S:GFP que corresponden a agregados de retículo endoplasmático. Estos resultados indican que los niveles de expresión de 1S:GFP en la línea transgénica 2.15.4 de *A. thaliana* son suficientes para inducir la formación de agregados de retículo endoplasmático en distintos tipos celulares, por lo que dicha línea es también un material idóneo para estudios ultraestructurales que serán comentados a continuación.

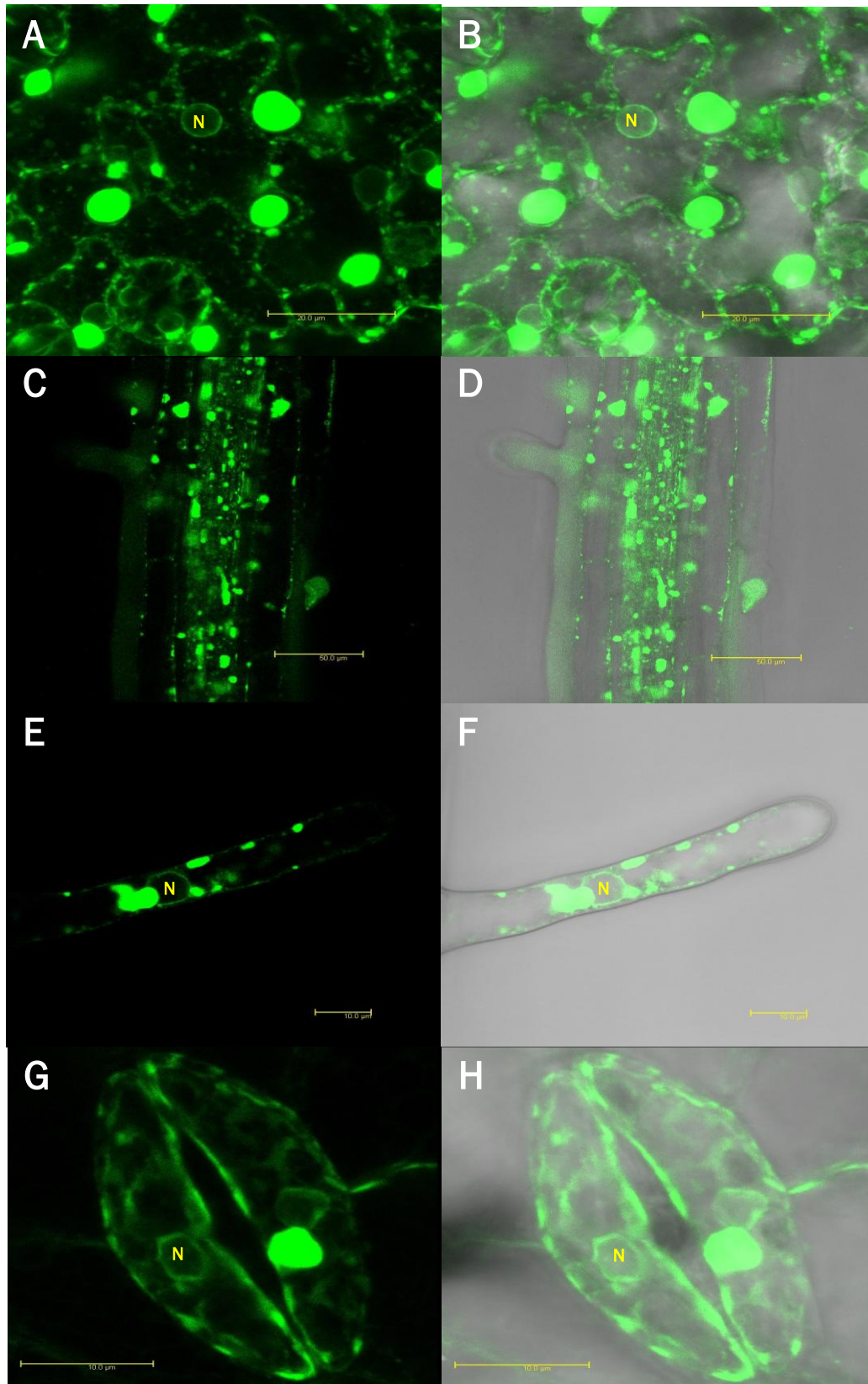


Figura R18. Localización subcelular de 1S:GFP en la línea transgénica 2.15.4 de *A. thaliana*. **A y B.** Células epidérmicas de cotiledón. **C y D.** Células de raíz. **E y F.** Pelo radicular. **G y H.** Célula guarda de estoma. En todos los casos se observa la formación de agregados de retículo endoplasmático. Las imágenes en campo claro muestran además los contornos celulares. N: Núcleo. Las barras indican: A y B. 20 μm ; C y D. 50 μm ; E, F, G y H. 10 μm .

El análisis ultraestructural de los agregados de *ER-1S:GFP* fue realizado en células epidérmicas de cotiledón (Figura R19) y raíz (Figura R20), en plantas de 10 días procesadas por fijación química y observadas al microscopio electrónico. Al igual que en *N. benthamiana* (compárese Figuras R13 y R19), en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* se observan grandes agregados de retículo endoplasmático constituidos por la asociación de membranas con una organización extraordinariamente regular. La mayoría de los agregados presentan una localización peri-nuclear (Figuras R19D y R19E), pero algunos se encontraron también en el interior de la vacuola (Figuras R19A y R19C). En la Figura R19C se observa que varias membranas distendidas y sin ninguna organización aparente, se desprenden del agregado vacuolar. Por otro lado, en el borde de los agregados se distinguen pequeñas regiones de membranas concéntricas conectadas con amplias zonas de membranas sinusoidales (Figuras R19E y R19F). En células de raíz se observan igualmente agregados de retículo endoplasmático con patrones cristaloides (Figura R20B), lamelares (Figura R20D) y en espiral (Figuras R20E y R20F). La gran proliferación de membranas y la formación de estos grandes agregados están en concordancia con los altos niveles de expresión de 1S:GFP observados en la línea 2.15.4. Esto confirma que la alteración generalizada del retículo endoplasmático es inducido por 1S:GFP.

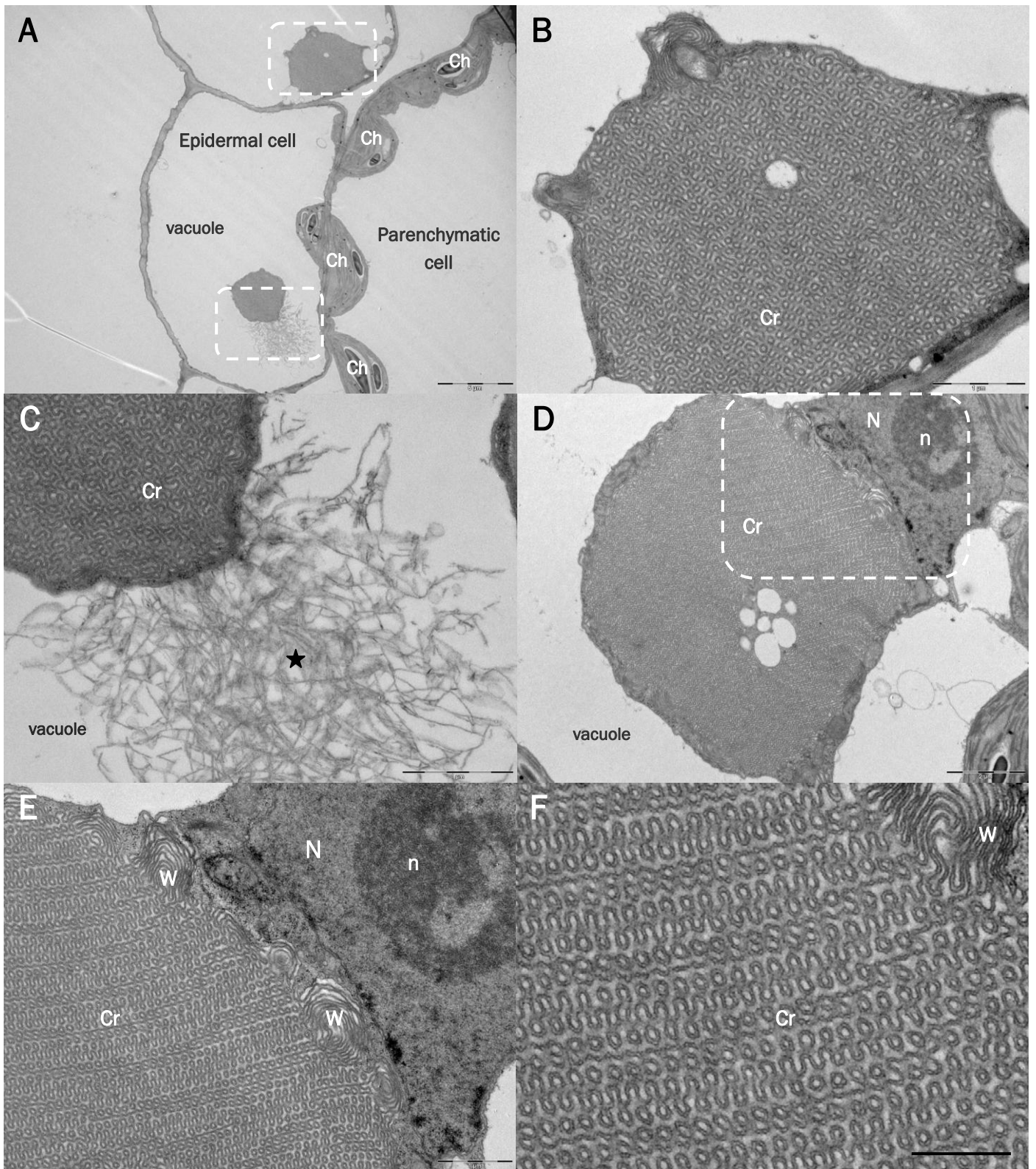


Figura R19. Microscopía electrónica de transmisión de células epidérmicas de cotiledón de plantas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*. Plantas de la línea 2.15.4 de 10 días fueron fijadas con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v y preparadas para su observación al ME. **A.** Imagen panorámica de células epidérmicas. **B.** Agregado con patrón cristalino regular. **C.** Agregado en vacuola, se distingue el desprendimiento de membranas distendidas sin estructura definida (señalado por una estrella). **D.** Agregado peri-nuclear. **E y F.** Se observan estructuras cristaloides (Cr) y espirales (W) conectados entre sí. Los paneles B y C corresponden a las zonas en recuadro de A; los paneles E y F corresponden a la zona en recuadro de D. Las barras indican: A, 5 μ m; B, C y E, 1 μ m; D, 2 μ m y F, 500 nm.

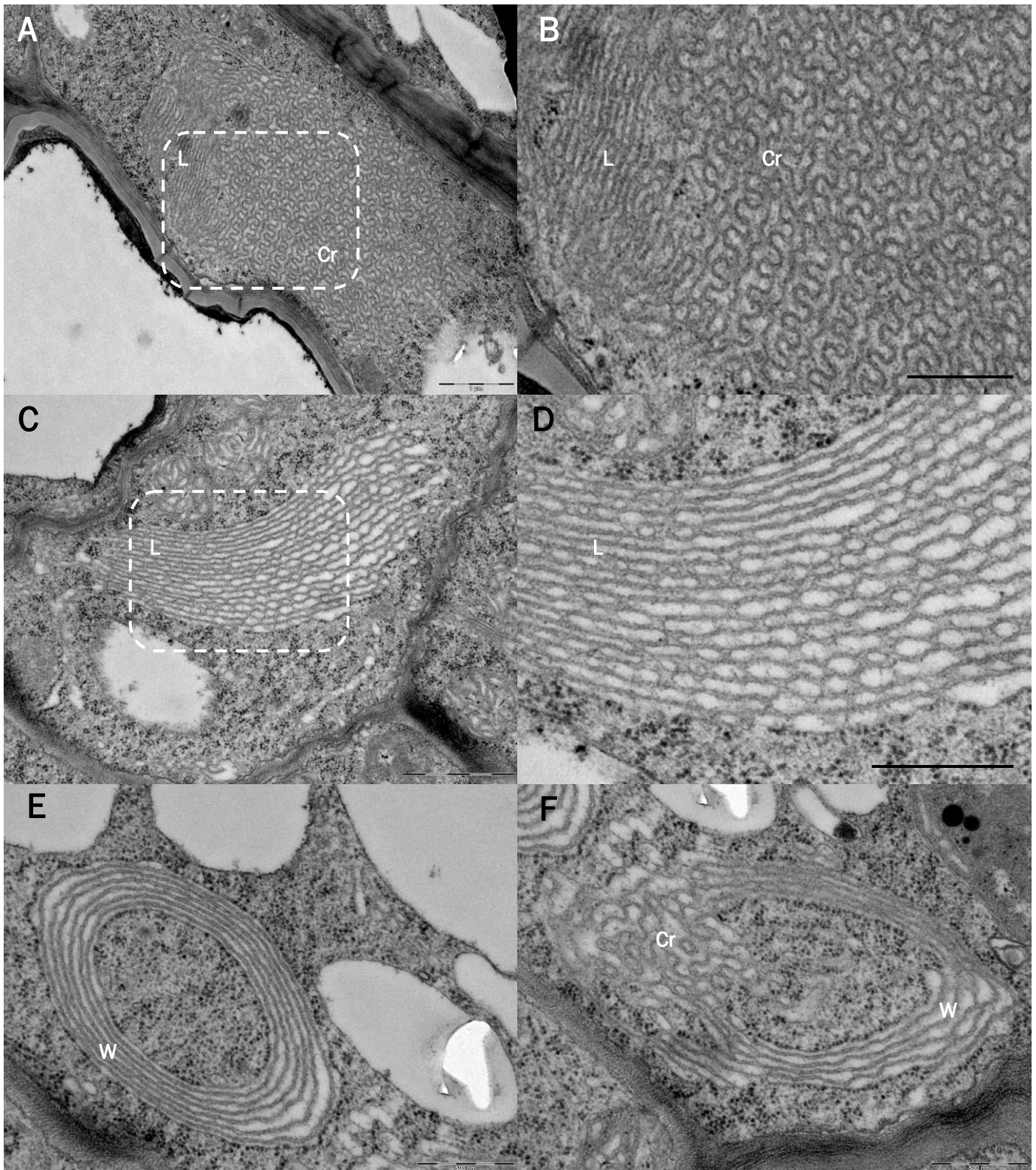
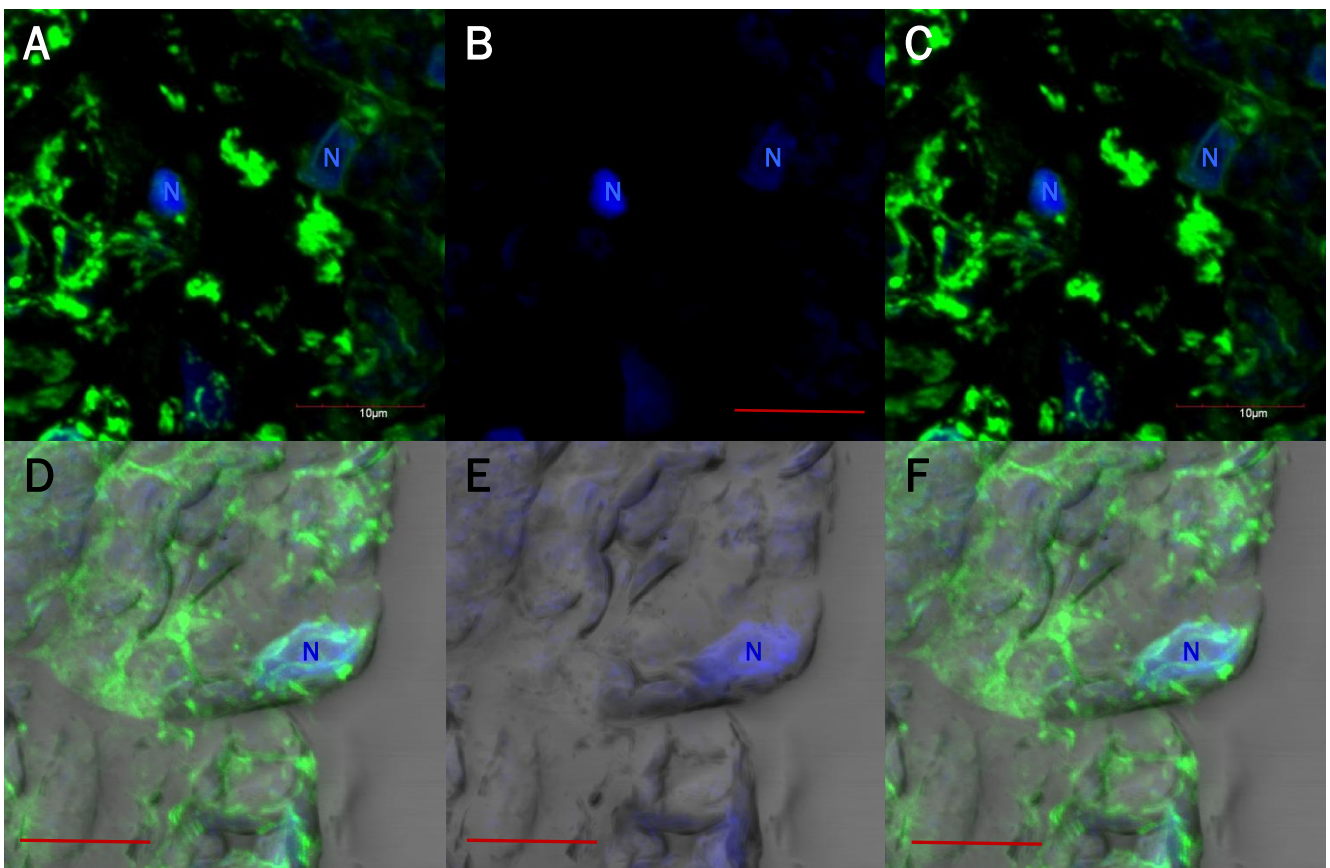


Figura R20. Microscopía electrónica de transmisión de células de raíz en plantas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*. Plantas de la línea 2.15.4 de 10 días fueron fijadas con glutaraldehído 1,5 % v/v y paraformaldehído 1,5 % v/v y preparadas para su observación al ME. **A.** Imagen panorámica de un agregado de retículo endoplasmático. **B.** Se observa estructura cristalóide (Cr) y lamelar (L) conectados entre sí. **C y D.** Agregado con estructura lamelar (L). **E.** Estructura de membranas en espiral (W). **F.** Se observa estructura cristalóide (Cr) y espiral (W) conectados entre sí. Los paneles B y D corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A y C. Las barras indican: A y C, 1 μ m; B, D, E y F, 500 nm.

2.2.2 Identificación del *dominio ER-HMGR*.

Estudios anteriores de inmunocitoquímica *in-situ* en planta entera (*whole mount*) en *A. thaliana*, señalaron que HMGR y 1S:GFP colocalizan a nivel subcelular en estructuras vesiculares (Leivar, 2003 y Ferrero, 2010). Dado que la expresión de 1S:GFP en la línea transgénica 2.15.4 es elevado e induce la formación de agregados de retículo endoplasmático, se consideró oportuno realizar estudios de colocalización de HMGR y 1S:GFP en sus células. Como control sin HMGR1 endógena, se utilizaron plantas de la línea mutante *hmg1-4* (*knock-out* para la expresión del gen *HMG1*) transformadas con 1S:GFPm. Con este propósito, se utilizaron conjuntamente los anticuerpos policlonales Ab-26.8, dirigido contra dominio catalítico de HMGR1, y Ab-5450, dirigido contra GFP para ensayos de *whole mount*. Con esta técnica se obtuvo una imagen panorámica de la célula. Se pudo examinar la distribución de los agregados de 1S:GFP, así como la coincidencia espacial de HMGR y 1S:GFP (Figura R21).



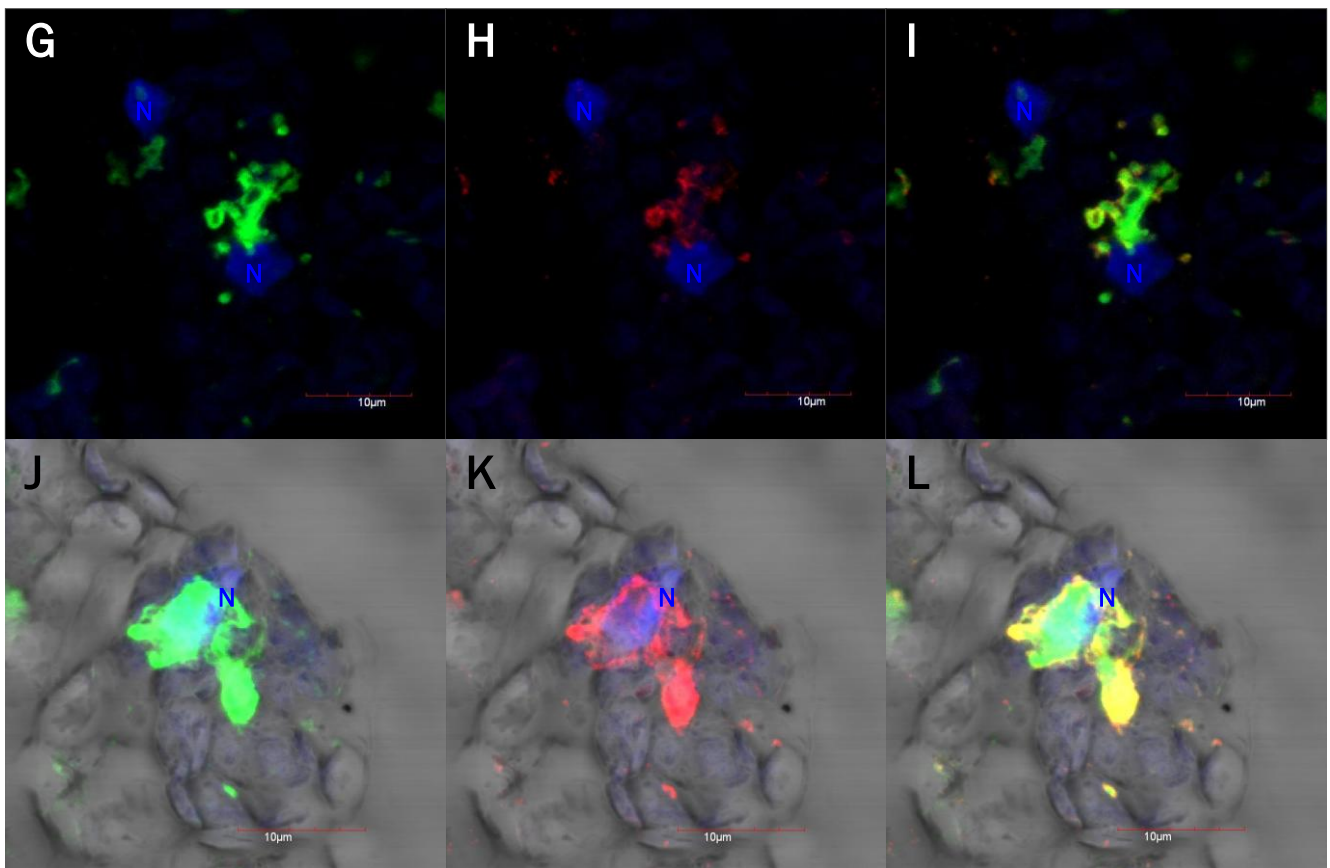


Figura R21. Colocalización de 1S:GFP y HMGR en células parenquimáticas de plantas *hmg1-4/1S:GFPm* (A – F), y plantas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana* línea 2.15.4 (G – L). Cotiledones de 6 días de ambas líneas fueron inmunomarcados con los anticuerpos Ab-5450 y Ab-26.8, detectados con anticuerpo secundario AlexaFluor 488 y 594 respectivamente, y observados al microscopio confocal. El color verde corresponde a la fluorescencia de 1S:GFP y el rojo corresponde a HMGR. La colocalización de ambas proteínas se representa por la superposición de los dos canales. **A – C y G – I.** Imágenes en campo oscuro, **D – F y J – L.** Imágenes en campo claro para mostrar los contornos celulares. El núcleo (N) y los cloroplastos fueron marcados con DAPI (Azul). Las imágenes corresponden a la proyección de 10 planos. Las barras indican: 10 μm .

Los resultados de la línea *hmg1-4* transformada con 1S:GFPm muestran la señal fluorescente verde de 1S:GFPm distribuida en agregados citosólicos de retículo endoplasmático (Figura R21A) y en regiones algo difusas que podrían corresponder a trama reticular (Figura R21D). No se observa señal fluorescente roja de HMGR endógena en estas células (Figuras R21B y R21E). Por tanto, el efecto desestructurador de 1S:GFPm sobre el retículo endoplasmático, se produce sin la participación de la HMGR1 endógena.

Los resultados de la línea transgénica 2.15.4 muestran la coincidencia de la señal fluorescente verde de 1S:GFP con la señal fluorescente roja de HMGR endógena en los agregados de retículo endoplasmático que se encuentran distribuidos en el citosol, entre los cloroplastos y en la región peri-nuclear (Figuras R21I y R21L). La señal verde de 1S:GFP se observó distribuida de manera regular y uniforme en todo el agregado

(Figuras R21G y R21J), mientras que la señal roja de HMGR es más intensa en las regiones periféricas de los agregados (Figuras R21I y R21L). Esto sugirió en un principio que los dos antígenos no colocalizan totalmente, sino que presentan heterogeneidad y se distribuyen de manera distinta en el agregado. Para confirmar esto, se realizó un análisis inmunocitoquímico ultraestructural. Cortes ultra-finos de hojas verdaderas de 10 días procesadas por criofijación, fueron inmunomarcadas con el anticuerpo policlonal Ab-5450 contra GFP y observadas al ME (Figura R22). Los resultados muestran que la 1S:GFP se encuentra distribuida de forma regular y homogénea sobre las membranas de los agregados de retículo endoplasmático (Figura R22A). Las membranas en forma de bucles distendidos de los bordes de los agregados también aparecen inmunomarcadas (Figuras R22B y R22C). La 1S:GFP no sólo se localiza en los agregados de retículo endoplasmático, sino también en la membrana nuclear (Figura R22 D – F).

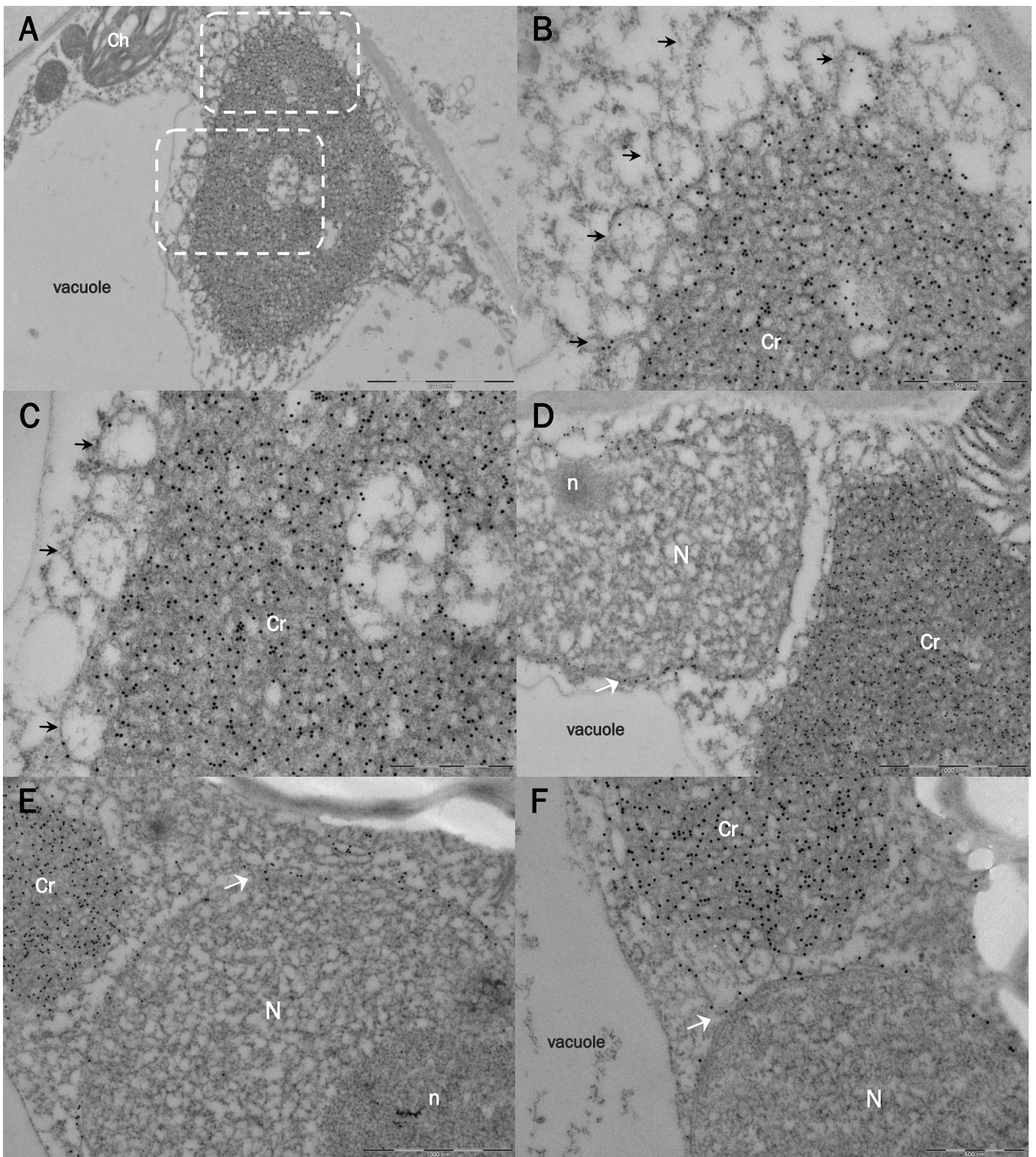


Figura R22. Inmunocitoquímica de 1S:GFP en células epidérmicas de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas y sometidas a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-5450 y anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (partícula de oro de 18nm) y observados al ME. **A.** Imagen panorámica de una célula epidérmica. **B y C.** Imágenes aumentadas de regiones cristaloides (Cr) rodeados por bucles (señalados por flechas). **D, E y F.** Agregados de retículo endoplasmático perinucleares. N: Núcleo, n: nucleolo. La envoltura nuclear está señalada por una flecha blanca. Los paneles B y C corresponden a las zonas en recuadro de A. Las barras indican: A, 2 μ m; B, C y F, 500 nm; D y E, 1 μ m.

Para relacionar HMGR y 1S:GFP a nivel ultraestructural en los agregados, se realizaron dobles inmunocitoquímicas sobre cortes de hoja verdadera de plantas transgénicas 1S:GFP de 10 días. Dichos cortes fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-5450 que detecta la quimera 1S:GFP y el anticuerpo Ab-26.8 que detecta la HMGR endógena, y observados al microscopio electrónico (Figura R23). La elevada densidad de marcaje obtenido con ambos anticuerpos primarios a dilución 1:1000, indicó que HMGR y 1S:GFP son muy abundantes en los agregados de retículo endoplasmático. El inmunomarcaje con ambos anticuerpos está distribuido de forma generalizada y homogénea en el interior de los agregados de células epidérmicas (Figura R23 A – C). Las partículas de oro asociadas a los anticuerpos se visualizaron sobre las líneas de membrana y no en espacios citosólicos o de lumen entre membranas (Figuras R23B y R23C). Asimismo, hay marcaje sobre la membrana nuclear (Figura R23E).

Los resultados expuestos indican que HMGR y 1S:GFP colocalizan en los agregados de retículo endoplasmático, sin que se visualicen diferencias de distribución en su interior. Esto no corresponde con la heterogeneidad de localización de HMGR y 1S:GFP observado en la técnica de *whole mount* (Figura R21), cuyas diferencias de marcaje son más fácilmente atribuibles a la distinta dificultad en la penetración de los anticuerpos. La coincidencia espacial de 1S:GFP y HMGR también indica que la localización subcelular de esta última depende enteramente de su dominio de membrana. La presencia del dominio catalítico de HMGR no afecta en su localización subcelular. El dominio de membrana de HMGR1S no sólo determina su localización subcelular, sino que induce la proliferación de membranas de retículo endoplasmático, donde se acumula la proteína. A este dominio de retículo endoplasmático que contiene HMGR y/o 1S:GFP se lo denominó como *dominio ER-HMGR*.

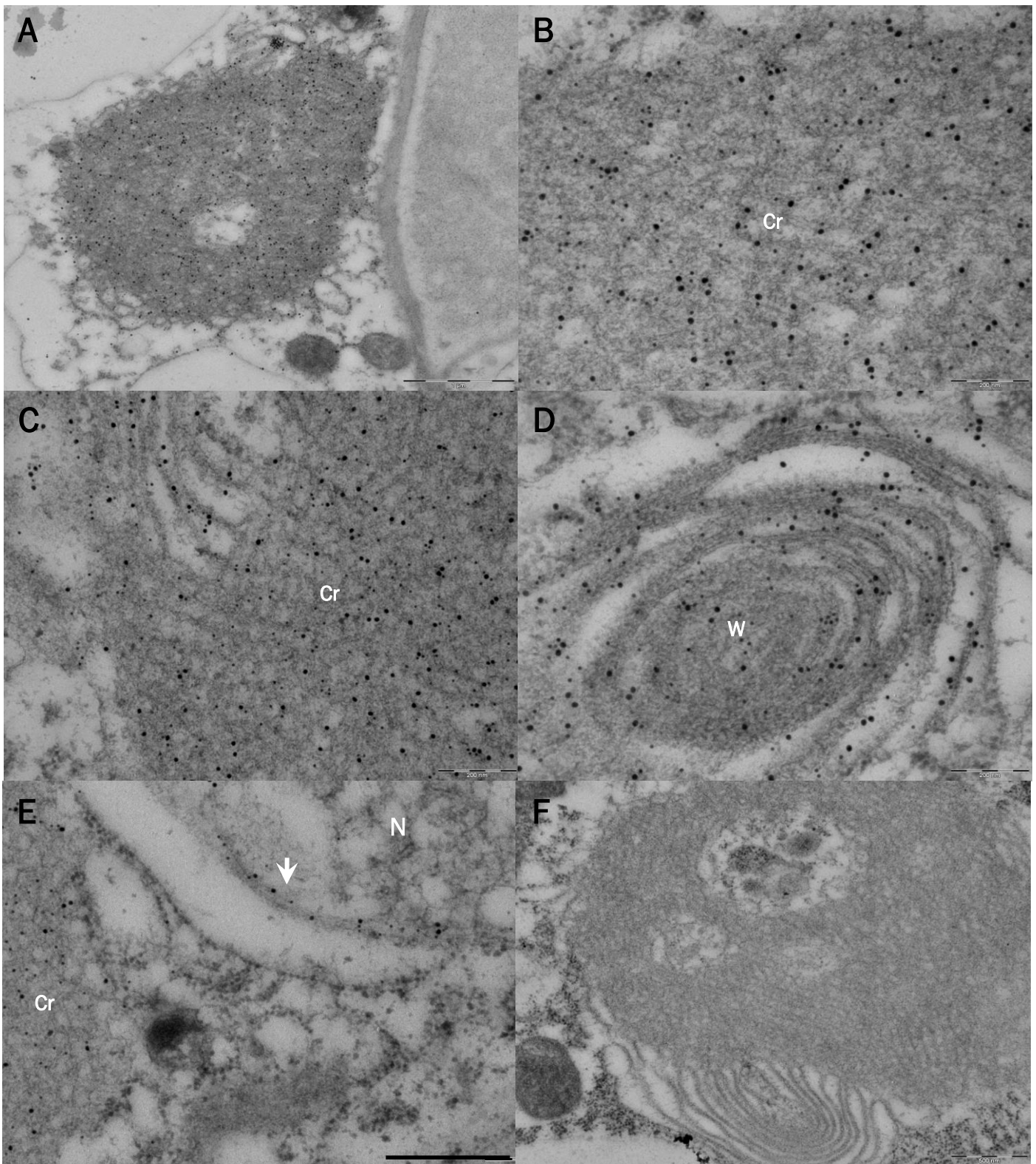


Figura R23. Colocalización de HMGR con 1S:GFP en células epidérmicas de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas y sometidas a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con los anticuerpos primarios Ab-5450 y Ab-26.8 y anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra y conejo (partículas de oro de 18nm y 12 respectivamente), y observados al ME. **A.** Imagen panorámica de un agregado de retículo endoplasmático. **B y C.** Imágenes aumentadas de regiones cristaloides (Cr). **D.** Membranas en espiral (W). **E.** Agregado peri-nuclear, la flecha indica la envoltura nuclear. N: Núcleo. **F.** Control negativo sin anticuerpos primarios. Las barras indican: A, 1 μ m; B, C y D, 200 nm; E y F, 500 nm.

2.2.3 Efecto del silenciamiento de 1S:GFP.

En la línea transgénica 1S:GFP de *A. thaliana* descrita anteriormente, se observó que la quimera fluorescente se expresa únicamente durante las dos o tres primeras semanas de desarrollo y desaparece posteriormente. Sin embargo, la expresión de 1S:GFP reaparece con un ciclo temporal similar en generaciones sucesivas. El mecanismo implicado en el silenciamiento cíclico no ha sido objeto de estudio en la presente tesis. Por otro lado, las hojas silenciadas en cuanto a expresión de 1S:GFP de las plantas transgénicas, constituyeron un magnífico sistema para determinar como afecta esta desaparición a la estructura del retículo endoplasmático. Tras 23 días de desarrollo, se observó la desaparición progresiva de 1S:GFP en algunas hojas en plantas de la generación T₃ de la línea 2.15.4, estas hojas fueron sometidas a microbombardeo con dos distintos marcadores de lumen de retículo endoplasmático, GFP-KDEL (verde) y T3RE (rojo) para observar la estructura del mismo al microscopio confocal. Como control, se analizaron las hojas que aún mostraban fluorescencia en estas mismas plantas (Figura R24).

Los resultados muestran que las células epidérmicas observadas después de la desaparición de 1S:GFP presentan una trama reticular normal con ausencia de agregados (Figuras R24C y R24D). Por el contrario las células epidérmicas de hojas aún fluorescentes presentan agregados de retículo endoplasmático con 1S:GFP. Por tanto, la desaparición de expresión de 1S:GFP durante el desarrollo de la planta, permite que el retículo endoplasmático se reorganice y recupere su estructura reticular normal. La formación de agregados de membranas 1S:GFP en el retículo endoplasmático constituye un proceso celular reversible.

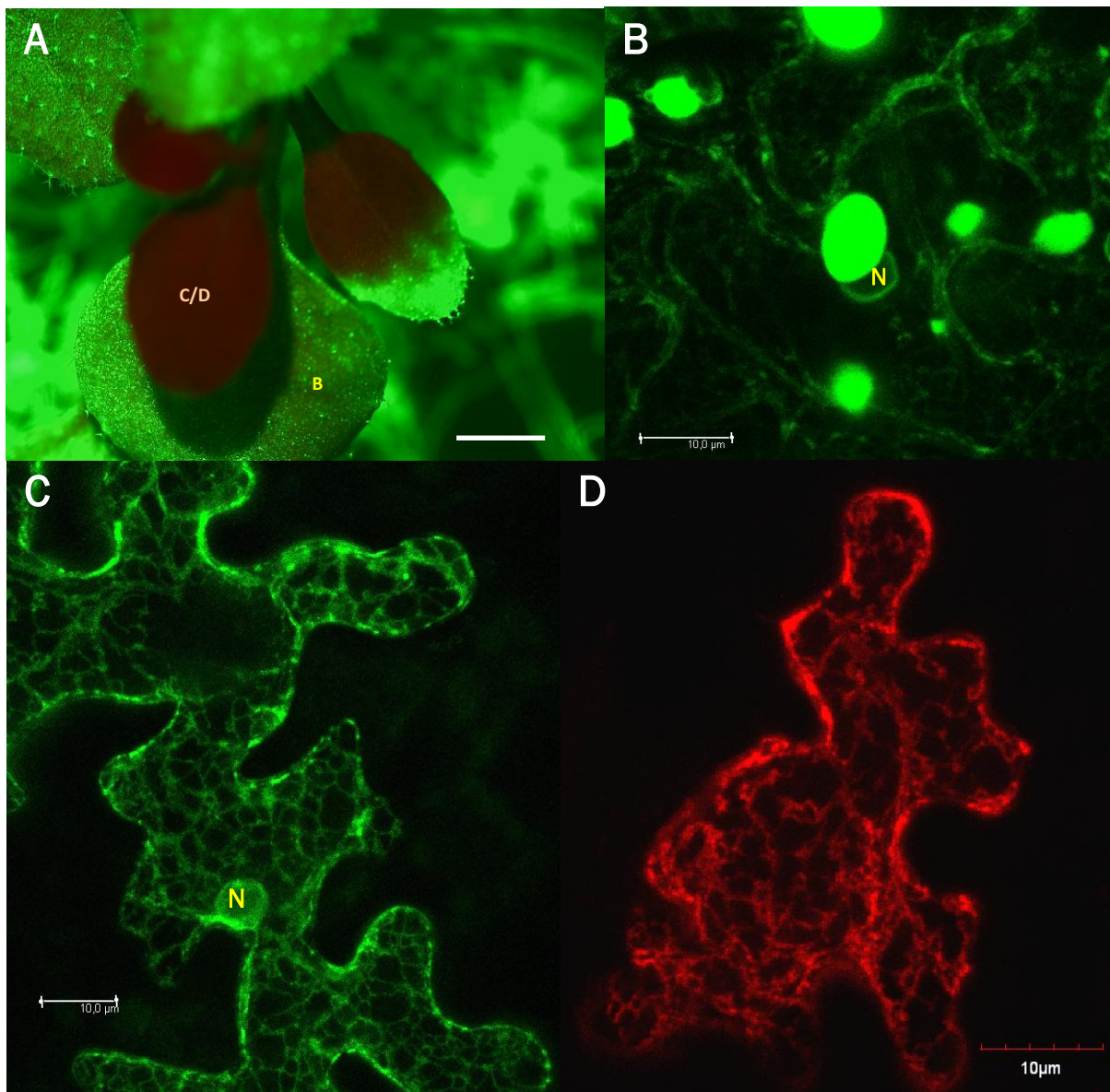


Figura R24. Expresión transitoria de marcadores de lumen de retículo endoplasmático en células epidérmicas de *A. thaliana* en ausencia de 1S:GFP. **A.** Tras 23 días, se observa la desaparición de 1S:GFP en algunas hojas. **B.** Células epidérmicas de hojas fluorescentes. **C y D.** Células epidérmicas de hojas en ausencia de 1S:GFP sometidas a microbombardeo con los marcadores de lumen de retículo endoplasmático GFP-KDEL (verde) y T3RE (rojo) respectivamente. N: Núcleo. Las imágenes de los paneles B, C y D corresponden a la proyección de 15 planos. Las barras indican: A, 2 mm; B, C y D, 10 µm.

3. CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS DE HMGR Y ER BODIES EN *A. thaliana*.

Los *ER bodies* fueron identificados en líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el marcador de lumen de retículo endoplasmático GFP-HDEL. En dicho sistema estos orgánulos fueron visualizados como vesículas fusiformes de 1 μm de diámetro máximo y de 5 a 10 μm de longitud, que se desplazan por la trama de retículo endoplasmático. Al microscopio electrónico, los *ER bodies* presentan una membrana simple derivada del retículo endoplasmático y tienen un contenido granular (Hayashi *et al.*, 2001). Ensayos de hibridación *in-situ* en planta entera (*whole mount*) sugirieron que la HMGR de *A. thaliana* colocaliza con el marcador GFP-HDEL en *ER bodies* (Ferrero, 2010). Debido a que esta conclusión estaba basada únicamente en observaciones al microscopio confocal, en la presente tesis se realizó un estudio más detallado mediante microscopía electrónica. Se realizó un estudio ultraestructural e inmunocitoquímico con distintas técnicas preparativas.

3.1 Identidad de las vesículas de HMGR.

En trabajos anteriores, ensayos de *whole mount* con plantas de *A. thaliana* col3, mostraron que la HMGR se acumula en unas estructuras globulares de 0,2 a 2 μm de diámetro en células parenquimáticas de cotiledón, denominadas *vesículas de HMGR* (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010). Como primer paso en la caracterización de *vesículas de HMGR*, en la presente tesis se realizaron ensayos de *whole mount* sobre plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días, con el anticuerpo policlonal Ab-26.8, que es específico para dicha proteína (Figura R25). Los resultados muestran que la HMGR endógena de células parenquimáticas, se encuentra localizada mayoritariamente en estructuras vesiculares de tamaño variable de entre 0,2 y 2 μm de diámetro (Figura R25A) y distribuidas en los espacios libres de citosol adyacentes a los cloroplastos (Figuras R25B y R25C), de modo similar a lo reportado anteriormente (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010).

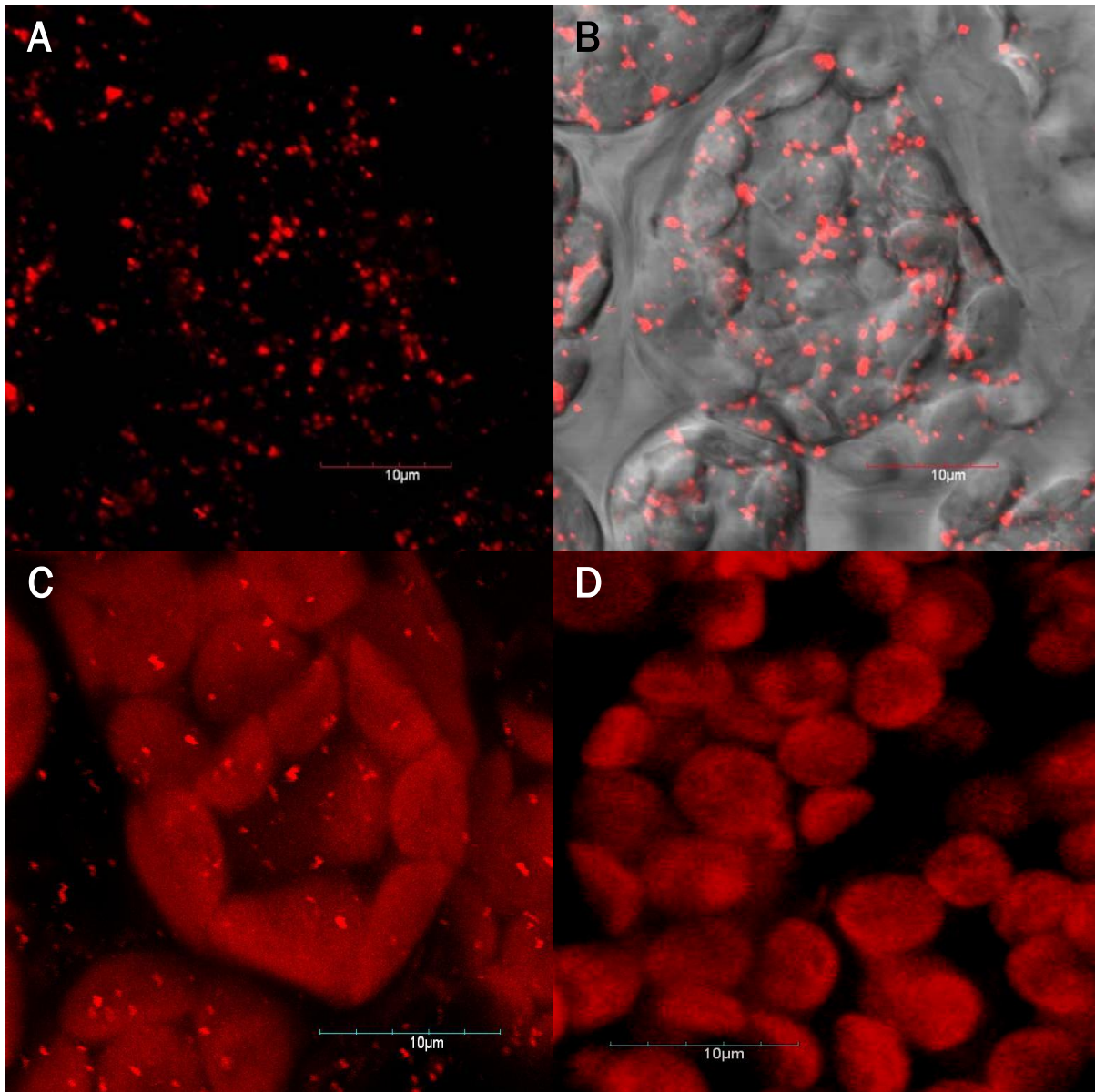


Figura R25. Inmunolocalización *in-situ* en *whole mount* de HMGR en células parenquimáticas de cotiledón de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-26.8 y un anticuerpo secundario Anti Ig-G de conejo portador de fluoróforo AlexaFluor 555, y observados al microscopio confocal. **A.** Imagen en campo oscuro del canal correspondiente a HMGR (emisión 555 nm). **B.** Imagen en campo claro donde se distinguen además los contornos celulares. **C.** Superposición de los canales de HMGR y de clorofila (emisión a 680 nm). **D.** Control negativo sin anticuerpo primario Ab-26.8. Los corpúsculos rojos de 0,2 a 2 μm de diámetro y forma irregular, corresponden a las vesículas de HMGR. Los cuerpos elípticos aplanados de color rojo más pálido de 6 a 8 μm de diámetro, corresponde a los cloroplastos. Las imágenes corresponden a la proyección de 10 planos. Las barras indican: 10 μm .

Para caracterizar las *vesículas de HMGR* identificadas en los ensayos de *whole mount*, se realizó un estudio ultraestructural e inmunocitoquímico. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días fueron procesados por criofijación y cortes ultra-finos de los mismos fueron inmunomarcados con Ab-26.8. En las Figuras R26 y R27 se muestran, respectivamente, imágenes de células parenquimáticas y epidérmicas en estos cotiledones.

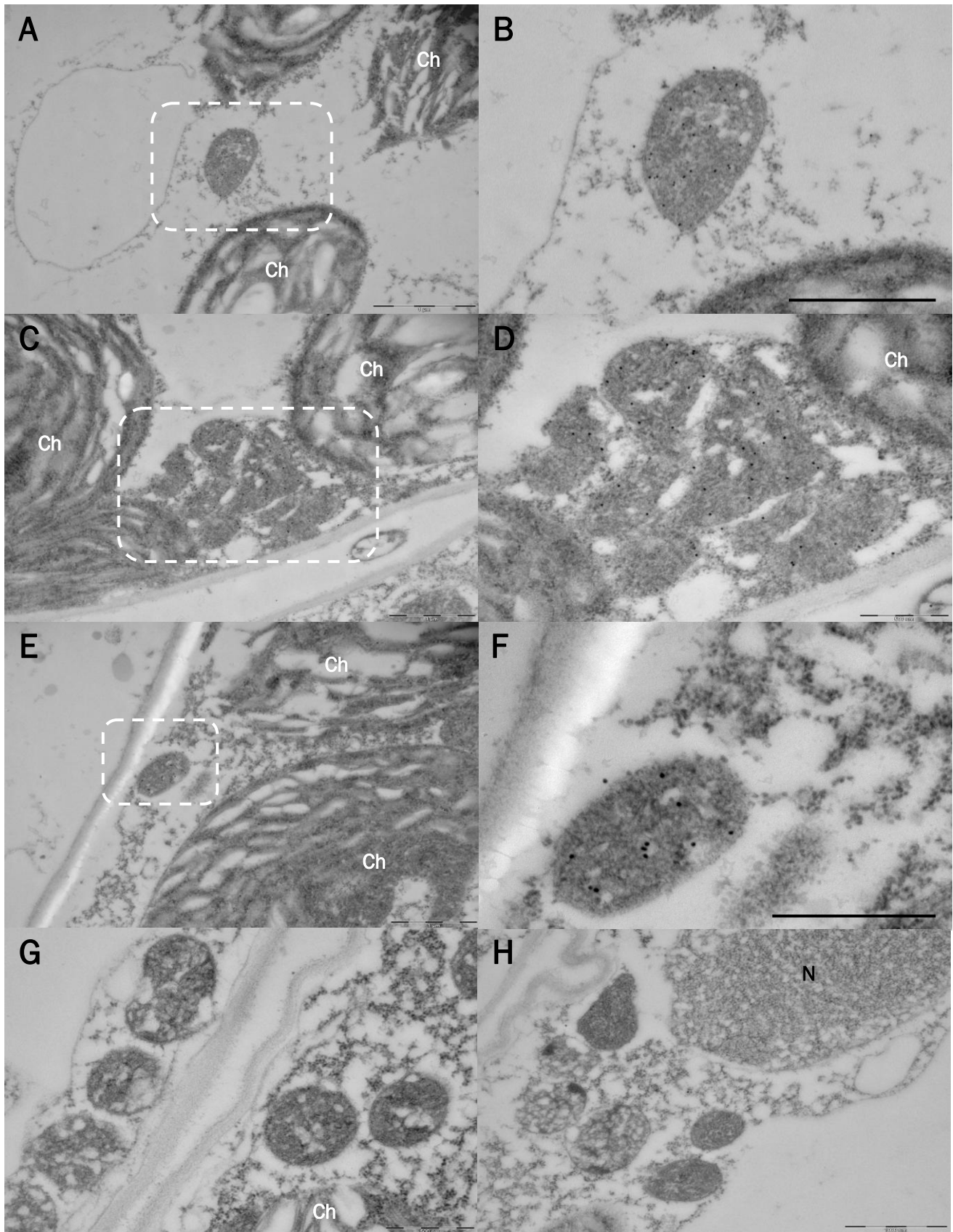


Figura R26. Inmunolocalización de HMGR en células parenquimáticas de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron criofijados y sometidos a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-26.8 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18 nm) y observados al ME. **A - F.** Se observa inmunomarcaje sobre vesículas de HMGR de sección elíptica o circular y estructura interna membranosa. **G y H.** Control negativo sin anticuerpo primario. Ch: Cloroplasto; N: Núcleo. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, C, E y H, 1 μ m; B, D, F y G, 500 nm.

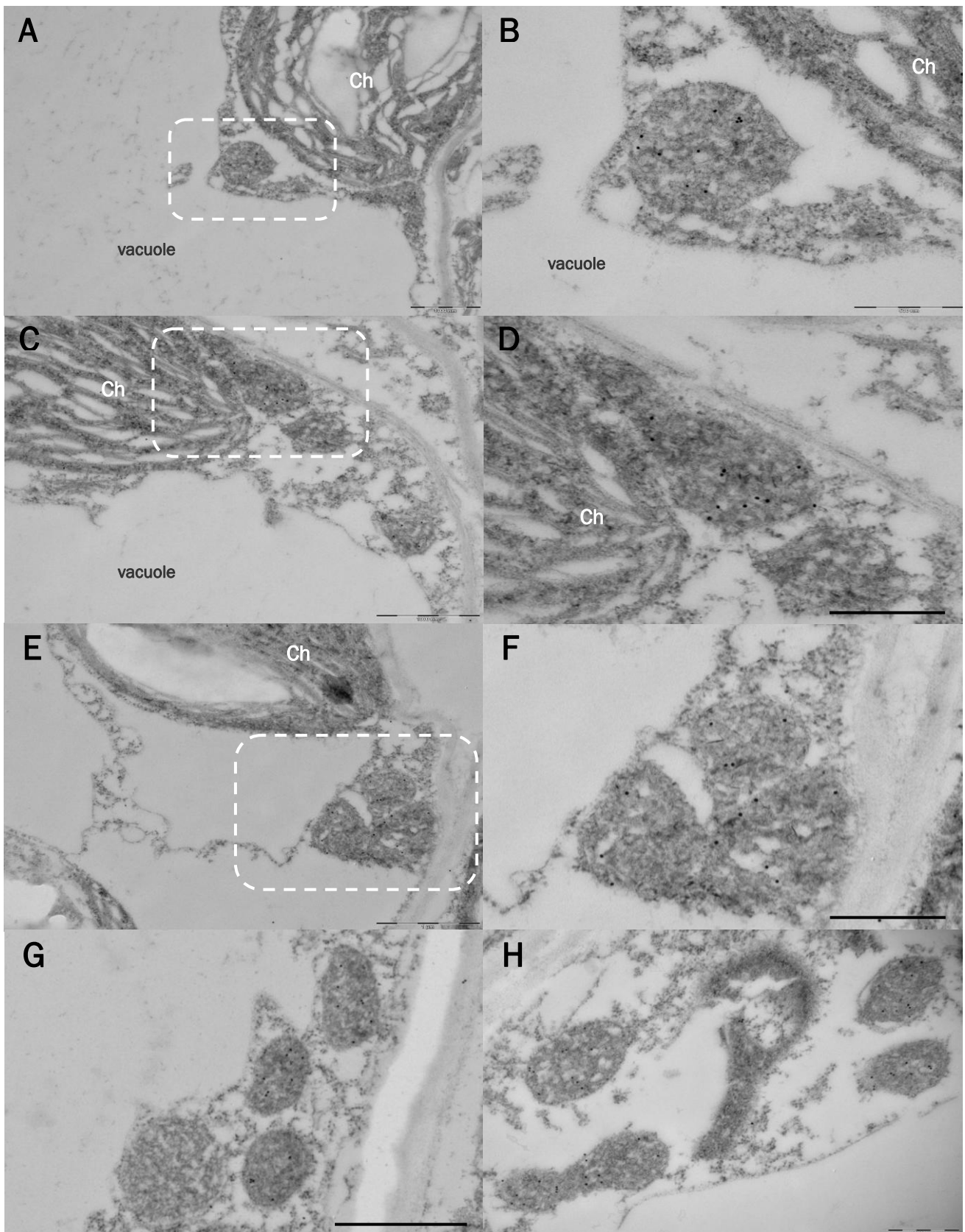


Figura R27. Inmunolocalización de HMGR en células epidérmicas de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron criofijados y sometidos a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-26.8 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18 nm) y observados al ME. A - H. Se observa inmunomarcaje sobre *vesículas de HMGR* de sección elíptica o circular y estructura interna membranosa. Ch: Cloroplasto. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, C, E y G, 1 μ m; B, D, F y H, 500 nm.

Tanto en células parenquimáticas como epidérmicas (Figuras R26 y R27 respectivamente), la HMGR se encuentra localizada en el interior de estructuras vesiculares de aspecto membranoso y tamaño variable, de entre 0,5 y 2 μm de diámetro. En ambos tipos celulares se encontraron *vesículas de HMGR* aisladas (Figuras R26B y R27B) o asociadas en pequeños grupos (Figuras R26D y R27F). Las estructuras circulares o elípticas o grupos de ellas, observadas en células parenquimáticas al microscopio electrónico, corresponden a las *vesículas de HMGR* observadas al microscopio confocal (Figura R25), dado que están distribuidas de modo similar en la célula, tienen dimensiones parecidas (de 0,2 a 2 μm de diámetro) y son reconocidas por el anticuerpo Ab-26.8.

Para caracterizar las *vesículas de HMGR* en plantas transgénicas de *A. thaliana* 1S:GFP, se realizó un estudio ultraestructural e inmunocitoquímico sobre cortes ultra-finos de hoja verdadera de 10 días. Cortes de la línea transgénica 2.15.4 fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-26.8 que detecta la HMGR endógena y el anticuerpo Ab-5450 que detecta la quimera 1S:GFP (Figura R28). En células parenquimáticas, además de agregados de membrana que corresponden a *dominios ER-HMGR* descritos en la Sección 2.2.2, también se observan estructuras vesiculares inmunomarcadas, que corresponden a *vesículas de HMGR*. Al igual que en plantas *col0*, dichas estructuras se encuentran en regiones citoplasmáticas adyacentes a los cloroplastos, con un diámetro aproximado de 0,5 μm . En su interior se localiza también 1S:GFP (Figuras R28B y R28D). Tanto en *col0* como en la línea transgénica 1S:GFP, el interior de las *vesículas de HMGR* tiene aspecto membranoso. Por otra parte, la HMGR se localiza en la membrana de retículo endoplasmático (Campos and Boronat, 1995) y este destino subcelular se debe a su dominio de membrana, el cual está presente en la quimera 1S:GFP. Todo ello indica que las *vesículas de HMGR* están formadas por la asociación y compactación de membranas de retículo endoplasmático.

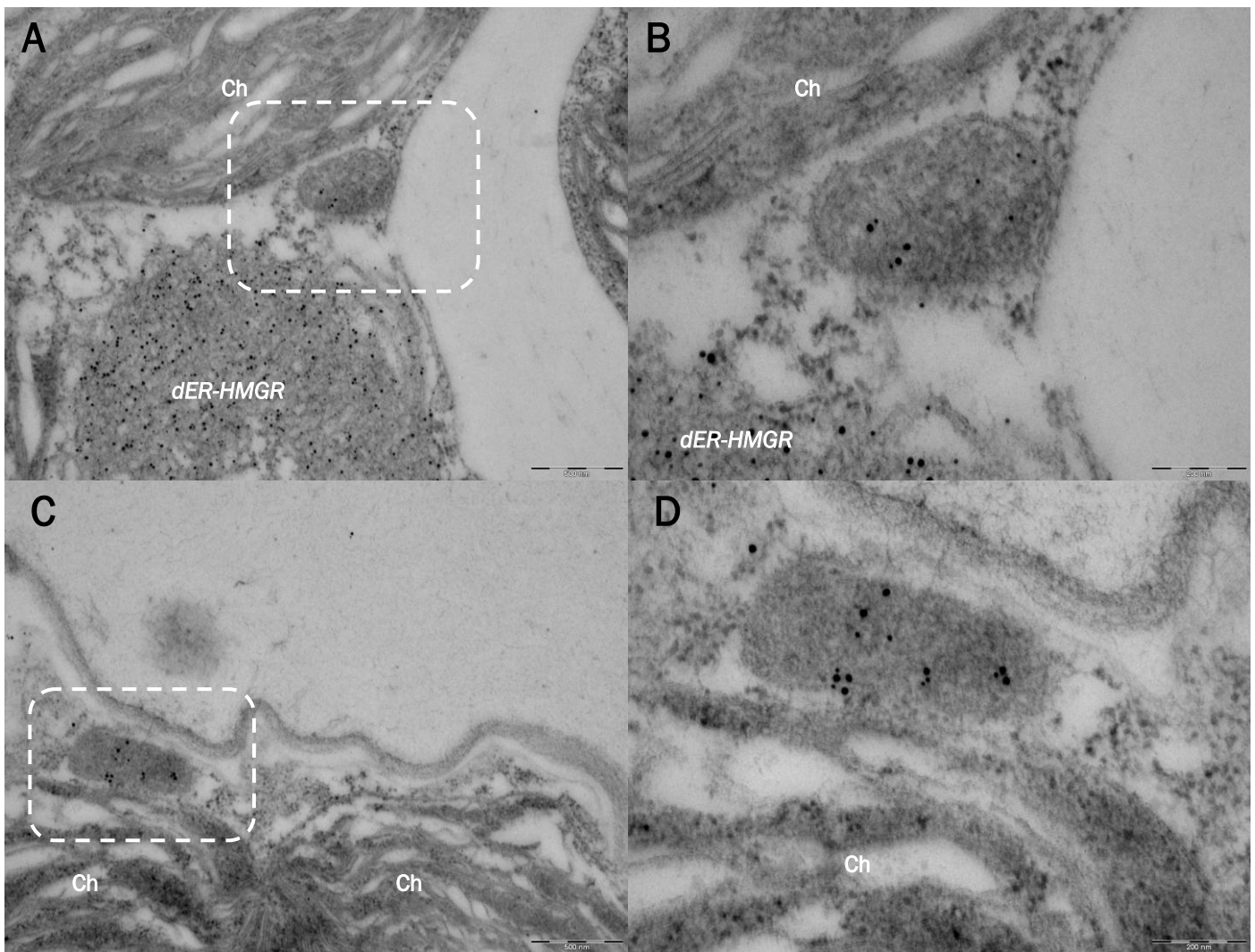


Figura R28. Colocalización de HMGR y 1S:GFP en vesículas de células parenquimáticas de plantas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas y sometidas a inclusión para inmunocitoquímica. Cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con los anticuerpos primarios Ab-5450 y Ab-26.8 y anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra y conejo, respectivamente (partículas de oro de 18 y 12 nm, respectivamente). **A - D.** Imágenes de microscopía electrónica con HMGR (12 nm) y 1S:GFP (18 nm) localizadas en estructuras vesiculares. *dER-HMGR*: dominio ER-HMGR, Ch: Cloroplasto. Las barras indican: A y C, 500 nm; B y D, 200 nm.

3.2 Análisis de los *ER bodies*.

En un trabajo anterior del mismo laboratorio (Ferrero, 2010) se sugirió que las *vesículas de HMGR* coinciden físicamente con los *ER bodies*. Los *ER bodies* de *A. thaliana* fueron descritos como cisternas dilatadas del retículo endoplasmático, de forma fusiforme. Dichas cisternas están delimitadas por membranas reticulares, frecuentemente con ribosomas unidos, y su contenido es denso y granulado (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003b; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Yamada *et al.*, 2011). Esta descripción contrasta con la de las *vesículas de HMGR* descrita en la presente tesis (Sección 3.1), cuyo contenido es membranoso. Para confirmar la coincidencia de *vesículas de HMGR* e *ER bodies* y dilucidar la aparente contradicción entre sus descripciones, se realizó un estudio ultraestructural e inmunocitoquímico detallado de *ER bodies* de *A. thaliana* que se presenta a continuación.

3.2.1 Ultraestructura.

Todas las imágenes publicadas sobre *ER bodies* en *A. thaliana* han sido obtenidas tras fijación química (Hayashi *et al.*, 2001), pero en la presente tesis se pretendía realizar análisis inmunocitoquímico que normalmente requiere criofijación. Para poder identificar los *ER bodies* correctamente en las imágenes de inmunocitoquímica, se decidió comparar su estructura tras fijación química o criofijación. Los primeros análisis se realizaron en células epidérmicas de raíz (Figura R29) o cotiledón (Figuras R30 y R31), donde habían sido identificadas inicialmente (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003b; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Yamada *et al.*, 2011).

En células epidérmicas de raíz procesadas por criofijación (Figura R29) y en células epidérmicas de cotiledón fijadas químicamente (Figura R30), se observaron estructuras vesiculares de 0,5 a 2 μm de diámetro con un contenido granular denso, localizadas en regiones de citoplasma próximas a los cloroplastos en el caso de cotiledón (Figura R30 A – F) y claramente distinguibles de otros orgánulos como el retículo endoplasmático (Figura R29C), el aparato de Golgi (Figuras R29D, R30C y R30D) y las mitocondrias (Figuras R30A, R30B, R30E y R30F). Estos cuerpos vesiculares de células epidérmicas tienen características ultraestructurales muy similares a las reportadas para los *ER bodies* en estudios previos (Hayashi *et al.*, 2011). El análisis ultraestructural en células epidérmicas de cotiledón procesadas por criofijación, reveló la presencia de estructuras vesiculares de un tamaño similar (0,5 – 2 μm de diámetro), pero con un patrón interno claramente membranoso (Figura R31 A – F), con un contenido menos denso y compacto que las vesículas de células epidérmicas de cotiledón preparadas por fijación química

(Figura R30 A - F). Aunque las células epidérmicas de cotiledón sufrieron un deterioro notable durante la criofijación (Figura R31 A - F), fue posible establecer que las estructuras vesiculares membranosas se encuentran en la proximidad de los cloroplastos (Figura R31 A - F) y vacuola (Figuras R31A, R31C, R31E y R31F). Dichas estructuras se asemejan a las *vesículas de HMGR*, en lo que respecta a dimensiones y contenido membranoso (Figura R27 A - H). Las estructuras vesiculares membranosas, tienen además una distribución celular y abundancia similares a las vesículas con patrón granulado y denso observadas tras fijación química. Estudios inmunocitoquímicos que se presentan posteriormente (Sección 3.2.3) confirmaron la identidad de estas estructuras vesiculares membranosas como *ER bodies*.

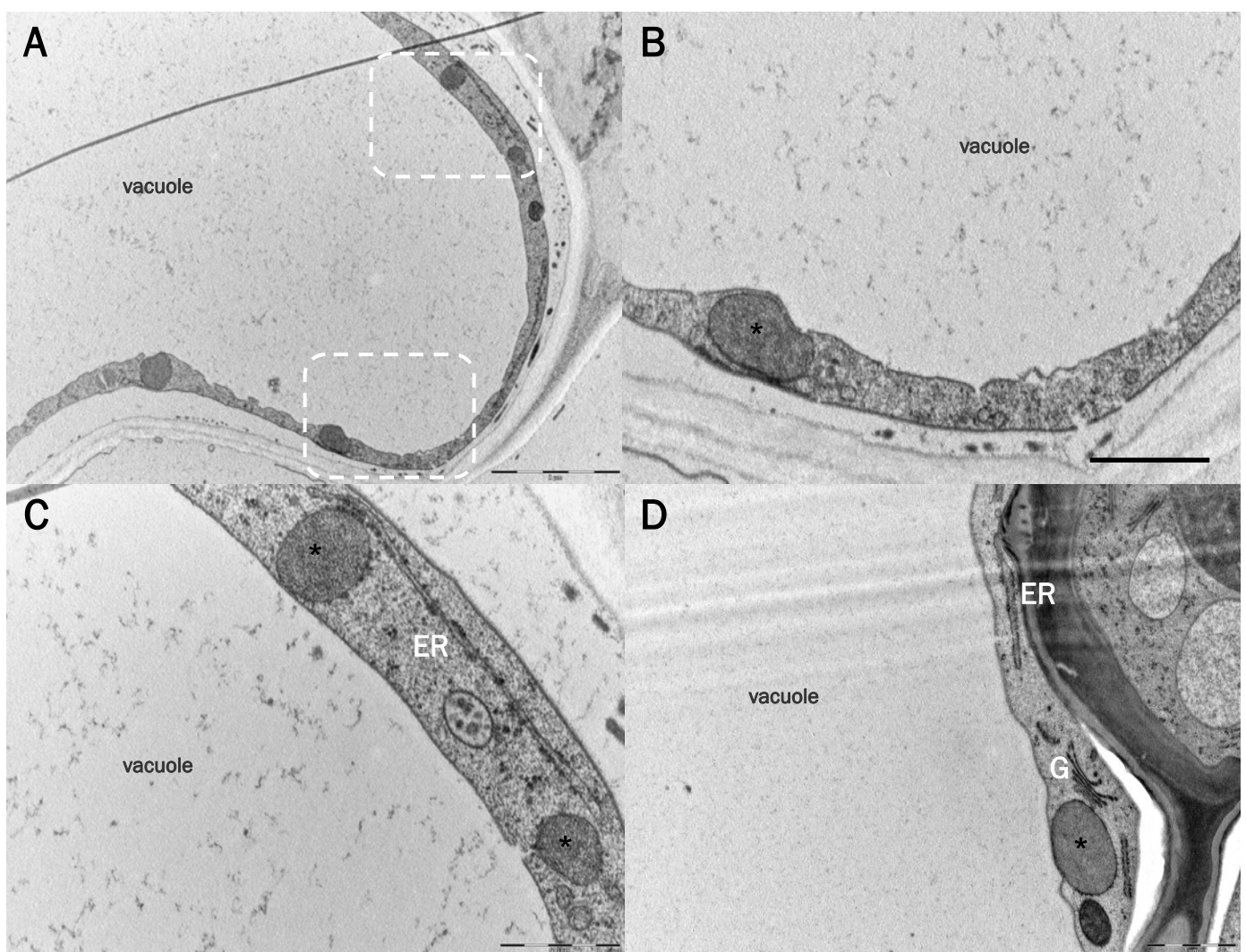


Figura R29. *ER bodies* en células epidérmicas de raíz de *A. thaliana col0* procesadas por criofijación. Plantas de 6 días fueron sometidas a criofijación y preparadas para su observación al ME. **A - D.** Se observan *ER bodies* (señalados por asteriscos) con ribosomas en su membrana y un contenido granulado más denso a los electrones que el citosol. ER: Retículo endoplasmático; G: Aparato de Golgi. Los paneles B y C corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A. Las barras indican: A y D, 1 μ m; B y C, 500 nm.

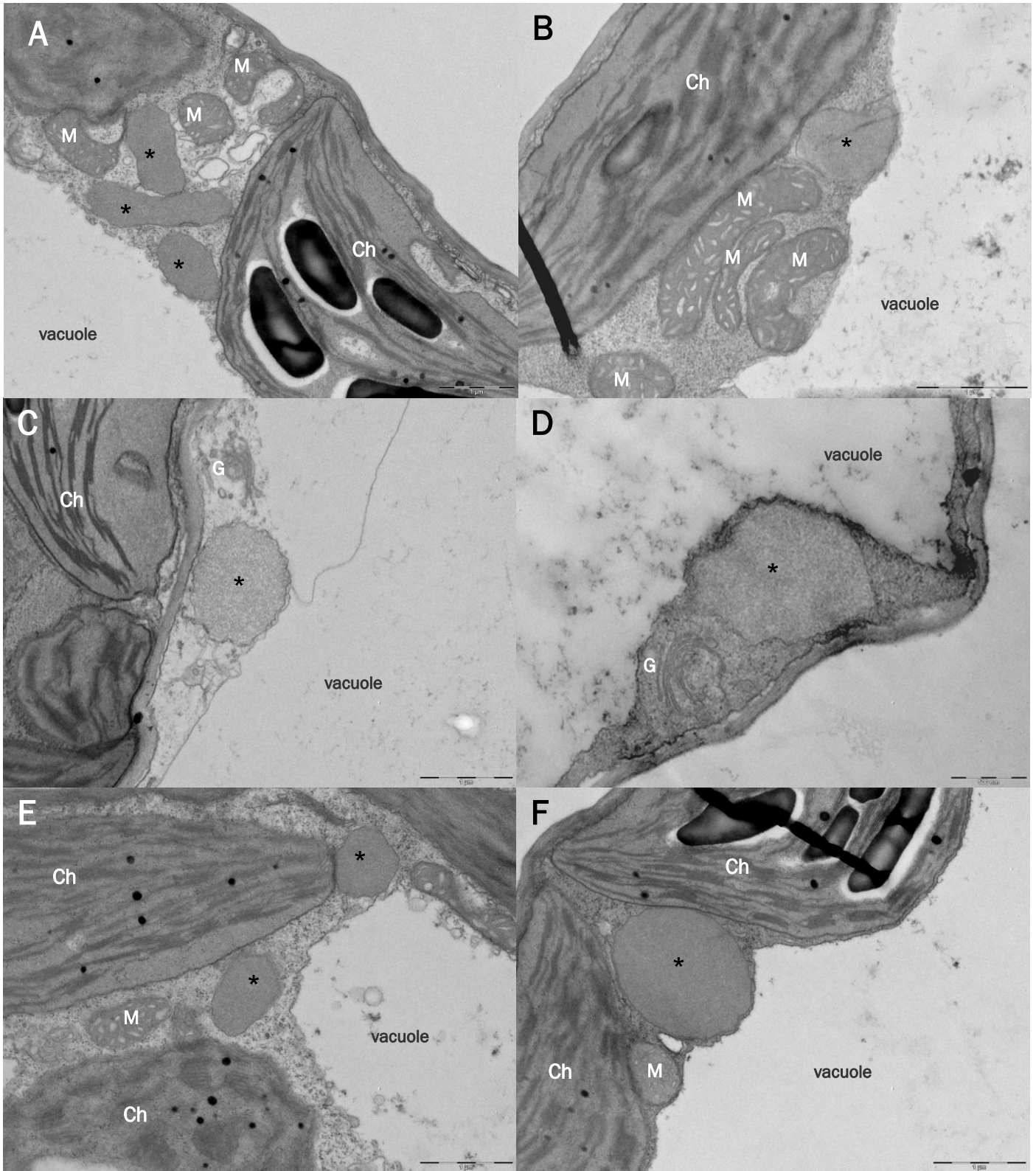


Figura R30. ER bodies en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* col0 fijadas químicamente. Plantas de 6 días fueron fijadas con glutaraldehído 1.5 % v/v y para-formaldehído 1.5 % v/v, y preparadas para su observación al ME. A - F. Se observan ER bodies de sección circular o elíptica y un contenido granuloso (señalados por asteriscos). Ch: Cloroplasto; M: Mitocondria; G: Aparato de Golgi. Las barras indican: A, B, C, E y F. 1 μm; D. 500 nm.

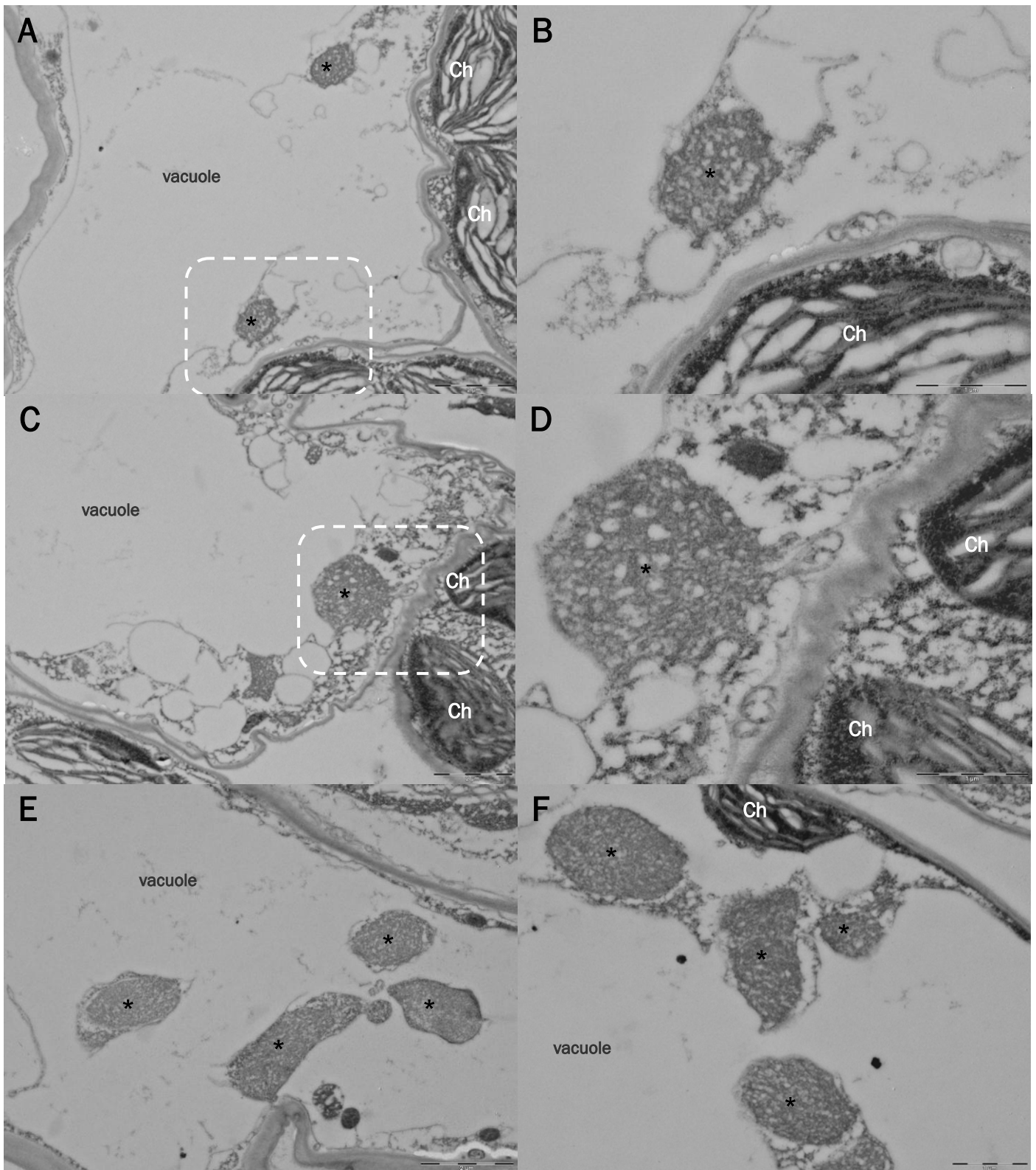


Figura R31. ER bodies en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* col0, procesadas por criofijación. Plantas de 6 días fueron criofijadas y preparadas para su observación al ME. **A - F.** Se observan estructuras de sección circular o elíptica (señaladas por asteriscos) con un patrón interior membranoso. **A y C.** Imágenes panorámicas de células epidérmicas. Ch: Cloroplasto. Los paneles B y D corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro en A y C. Las barras indican: A, C y E. 2 μ m; B, D y F. 1 μ m.

3.2.2 Distribución en la planta.

En *A. thaliana*, los *ER bodies* pueden estar presentes de modo constitutivo en determinados tipos celulares o acumularse en respuesta a estrés (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). En estudios anteriores, los *ER bodies* constitutivos fueron identificados únicamente en células epidérmicas de cotiledón, raíz e hipocótilo de plántula de *A. thaliana* (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003b; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Yamada *et al.*, 2011). En el transcurso de la tesis, se observaron *ER bodies* constitutivos en estas localizaciones, pero también en tipos celulares distintos a los reportados anteriormente. En células endodérmicas de raíz procesadas por criofijación (Figura R32), se observan *ER bodies* con contenido granular denso, y ribosomas en su membrana (Figura R32B), distribuidos en los espacios citoplasmáticos que en algunos casos están próximos al núcleo (Figuras R32D y R32F). En células parenquimáticas de cotiledón fijadas químicamente (Figura R33), se observan también *ER bodies* con las mismas características estructurales que las descritas en células epidérmicas, localizadas principalmente en los espacios citoplasmáticos cercanos a los cloroplastos (Figuras R33B y R33D). Los resultados indican que los *ER bodies* están presentes de modo abundante en toda la planta durante las primeras etapas de su desarrollo, y que además de encontrarse en células epidérmicas, también se encuentran de forma constitutiva en diferentes tipos celulares que no han sido reportados hasta ahora, como son, las células de la endodermis de raíz y las células parenquimáticas de cotiledón.

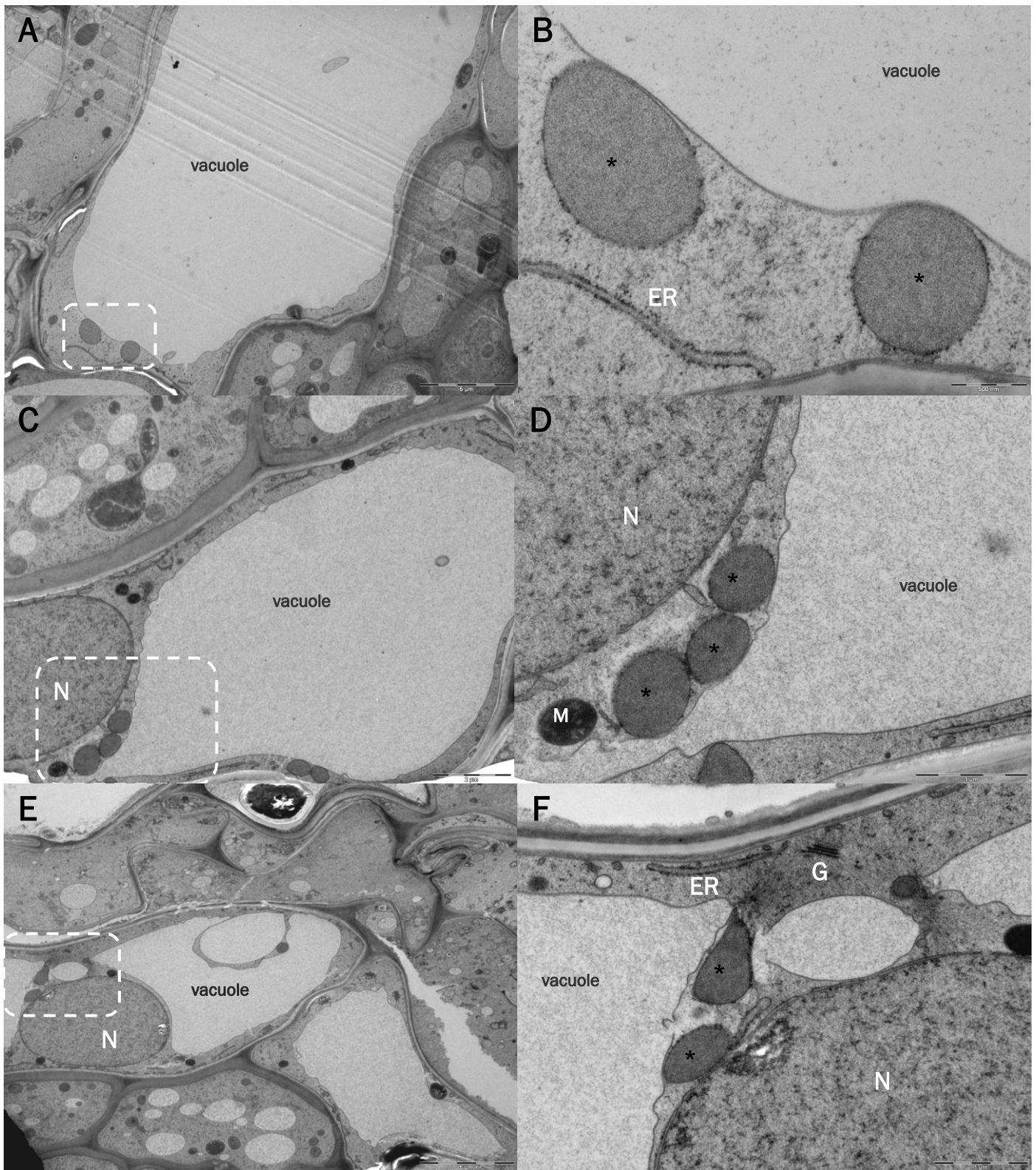


Figura R32. ER bodies en células endodérmicas de raíz de *A. thaliana* col0 procesadas por criofijación. Plantas de 6 días fueron sometidas a criofijación y preparadas para su observación al ME. A - F. Se observan ER bodies (señalados por asteriscos) con ribosomas en su membrana y un contenido granulado más denso a los electrones que el citosol. N: Núcleo; M: Mitocondria; ER: Retículo endoplasmático; G: Aparato de Golgi. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A y E. 5 μm; B. 500 nm; C. 2 μm; D y F. 1 μm.

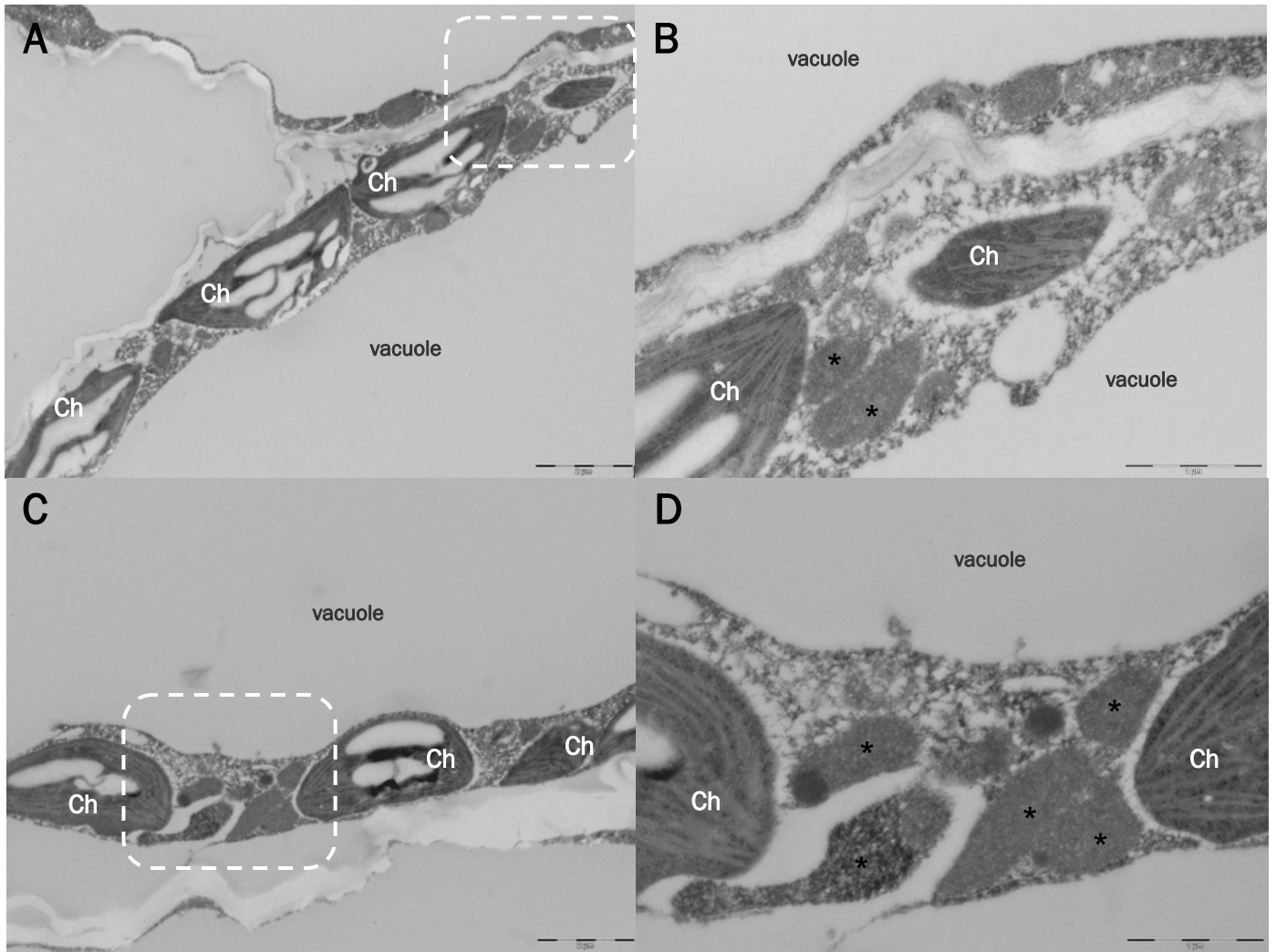


Figura R33. *ER bodies* en células parenquimáticas de cotiledón de *A. thaliana* col0 fijadas químicamente. Plantas de 6 días fueron fijadas con glutaraldehído y para-formaldehído 1.5, y procesadas por criosustitución para su observación al ME. **A - D.** Se observan *ER bodies* (señalados por asteriscos) con un contenido granulado más denso a los electrones que el citosol. Ch: Cloroplasto. Los paneles B y D corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro en A y C. Las barras indican: A y C, 2 μ m; B y D, 1 μ m.

3.2.3 Inmunocitoquímica.

La invertasa At β fruct4 (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998) y la β -glucosidasa PYK10 (Matsushima *et al.*, 2002) se acumulan específicamente en *ER bodies* y pueden ser utilizados como marcadores de los mismos. Para confirmar la identidad de los *ER bodies* observados al ME tras fijación química o criofijación, cortes ultra-finos de raíz, cotiledón u hoja verdadera de *A. thaliana* col0, fueron sometidos a inmunocitoquímica con el anticuerpo Ab-NR8 dirigido contra At β fruct4, y los anticuerpos Ab-PYK10-IM y Ab-PYK10-CM que reconocen respectivamente, las regiones N-terminal y C-terminal de PYK10. Como primer paso se observaron células epidérmicas de raíz, preparadas por fijación química, sistema en el que los *ER bodies* fueron caracterizados inicialmente (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003b; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Yamada *et al.*, 2011) y en el que también se han observado en la presente tesis (Sección 3.2.1). Los bloques obtenidos tras fijación química e inclusión con resina epon, fueron criosustituidos en lowycryl para posibilitar el inmunomarcaje. Los resultados correspondientes son mostrados en la Figura 34. Los *ER bodies* observados tras fijación química y criosustitución en lowycryl (Figuras R34B y R34D) tienen las mismas dimensiones y aspecto que los obtenidos tras fijación química e inclusión con resina epon (Figuras R29 y R32). Tras criosustitución, los *ER bodies* son inmunomarcados con el anticuerpo Ab-NR8, lo cual indica la presencia de At β fruct4 en dichas estructuras. Estos resultados confirman la identidad de los *ER bodies* en las preparaciones de raíz por fijación química y valida también el anticuerpo Ab-NR8 para reconocer dichas estructuras.

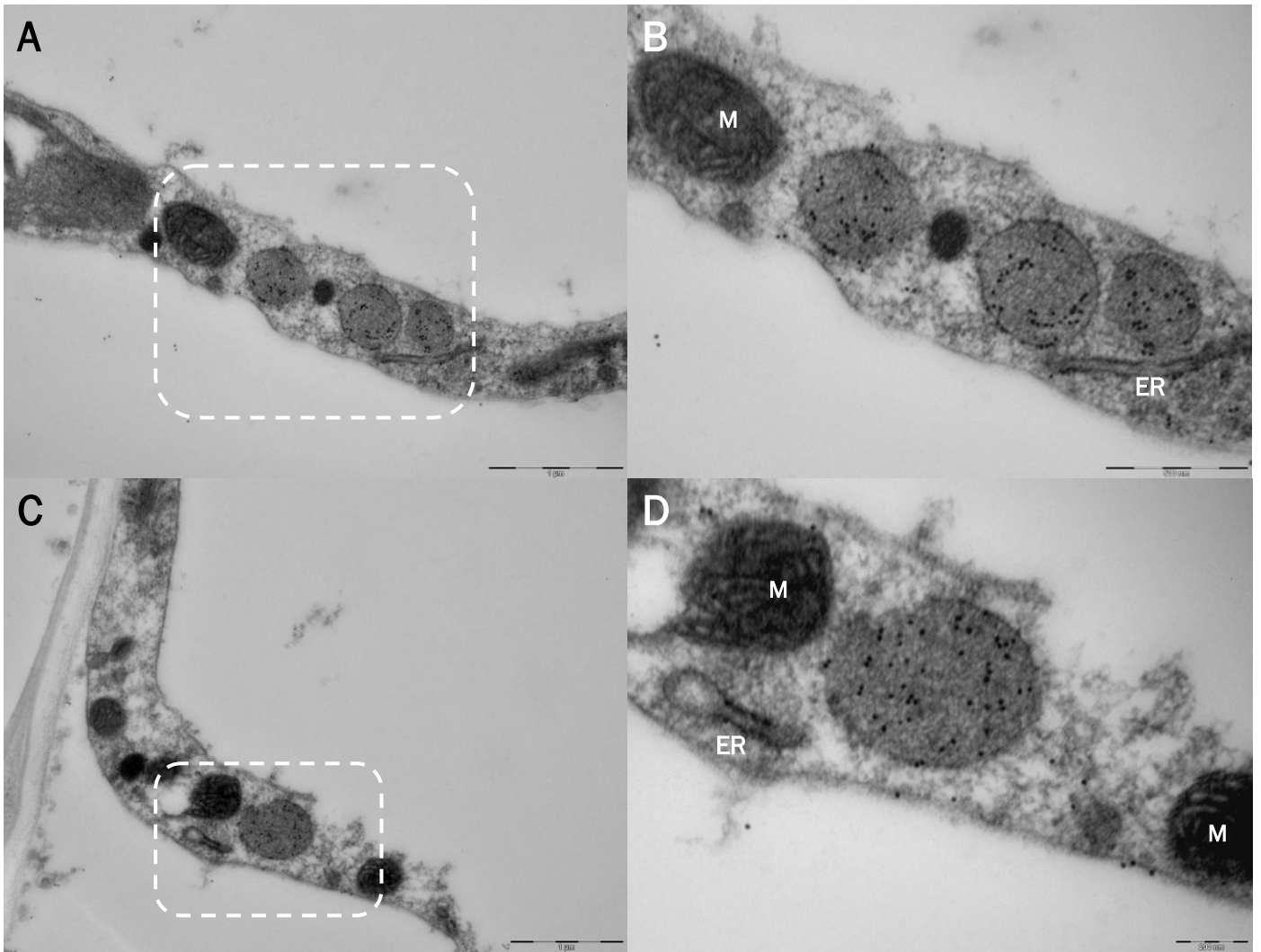
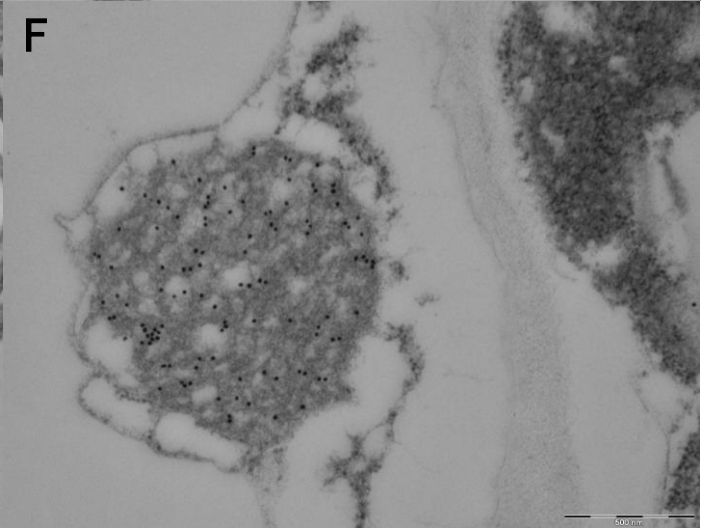
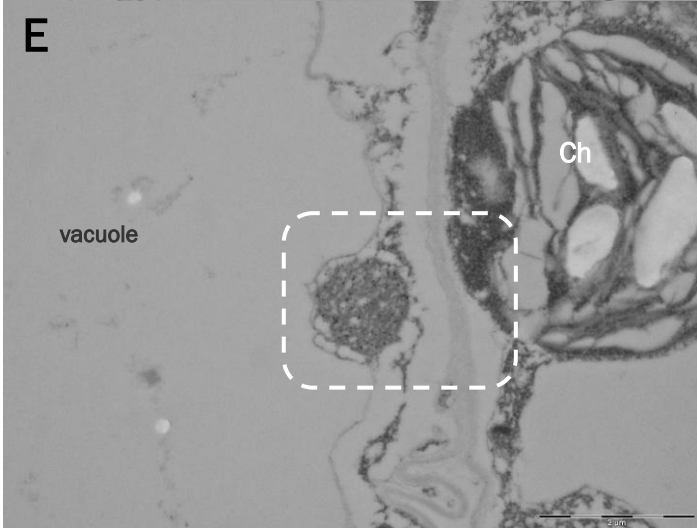
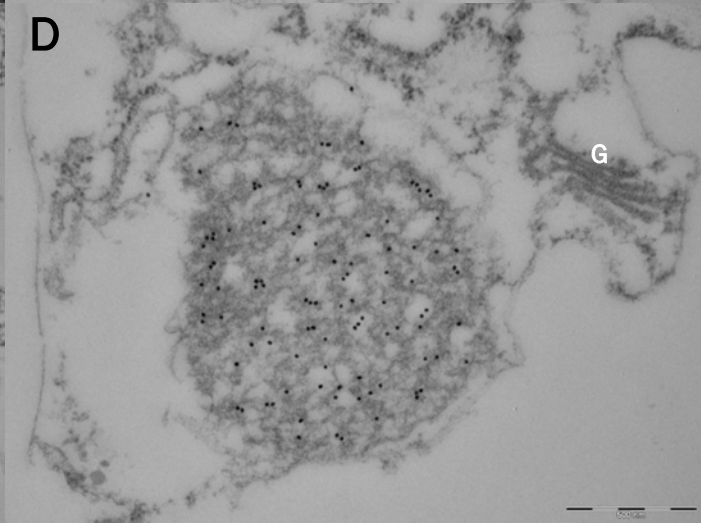
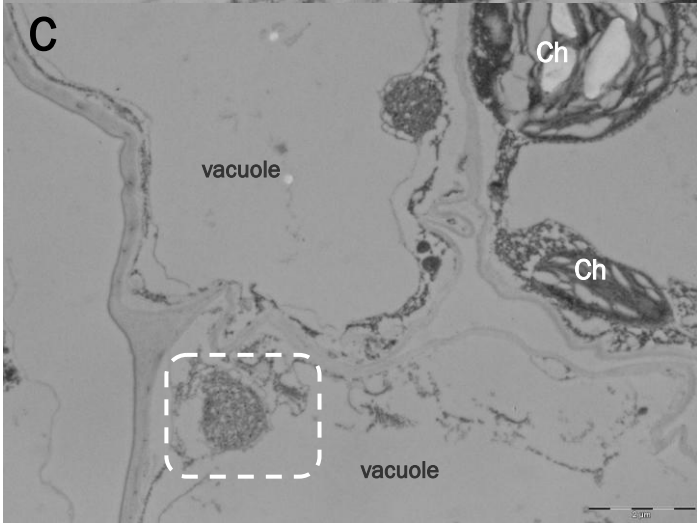
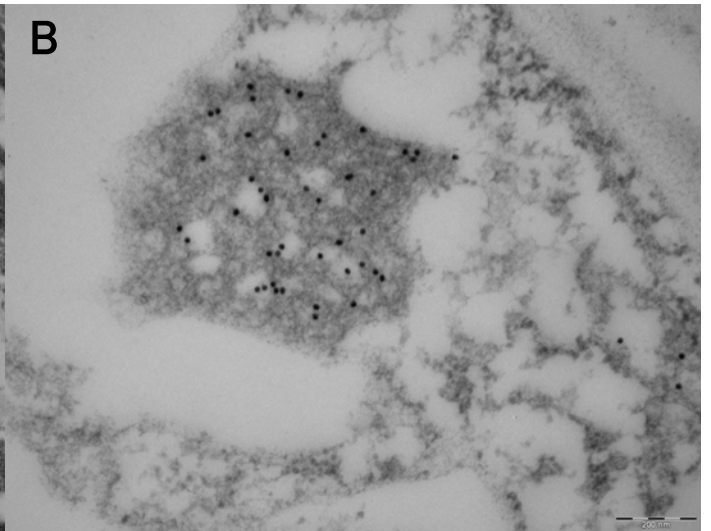
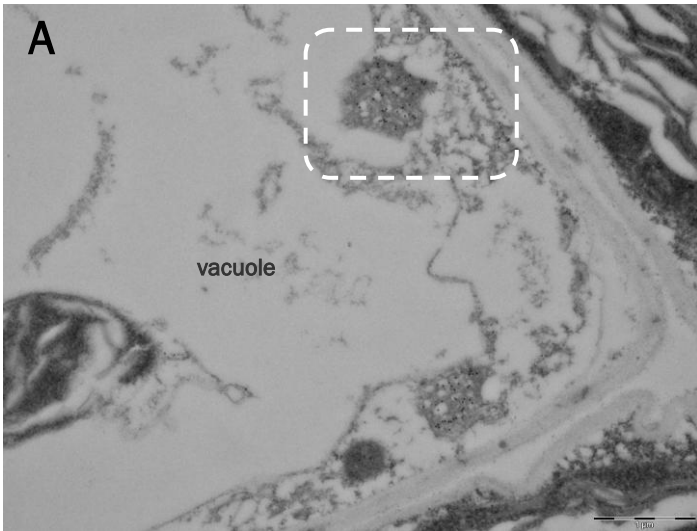


Figura R34. Inmunolocalización de Invertasa At β fruct4 en células epidérmicas de raíz de *A. thaliana* col0. Raíces de 6 días fueron fijadas con glutaraldehído y para-formaldehído, y procesadas por criosustitución. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-NR8 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18 nm) y observados al ME. **A - D.** Se observan *ER bodies* inmunomarcados con Ab-NR8. ER: Retículo endoplasmático; M: Mitocondria. Los paneles B y D corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A y C. Las barras indican: A y C. 1 μ m; B. 500 nm; D. 200 nm.

Para confirmar la identidad de *ER bodies* en células epidérmicas de cotiledón, plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días fueron sometidas a criofijación e inmunomarcaje con el anticuerpo Ab-NR8 dirigido contra At β fruct4 y los anticuerpos Ab-PYK10-IM y Ab-PYK10-CM dirigidos contra PYK10. Los resultados indican que At β fruct4 (Figura R35) y PYK10 (Figuras R36 y R37), se localizan en el interior de vesículas de aspecto membranoso, con formas circulares (Figuras R35D y R35L) o elípticas (Figuras R35H y R37B), que muestran en su interior membranas con distintos grados de compactación, desde tramas relativamente distendidas (Figuras R35B y R36F) hasta estructuras más compactas (Figuras R35I y R36D). El elevado número de imágenes obtenidas, de las que se muestran sólo una parte, indicó que este tipo de estructuras son muy abundantes en células epidérmicas de cotiledón de planta de 6 días. El tamaño de estas estructuras varía entre 1 y 2 μ m de longitud y 0,5 a 1.5 μ m de ancho. En contraposición con los *ER bodies* caracterizados previamente (Hayashi *et al.*, 2001) y en la presente tesis (Figura R34), estas estructuras muestran diversidad de formas, tamaños y textura interna, pero todos ellos acumulan proteínas típicas de *ER bodies*. Estos resultados indican que las estructuras membranosas de células epidérmicas de cotiledón identificadas en esta tesis podrían corresponder a formas inmaduras de *ER bodies*.



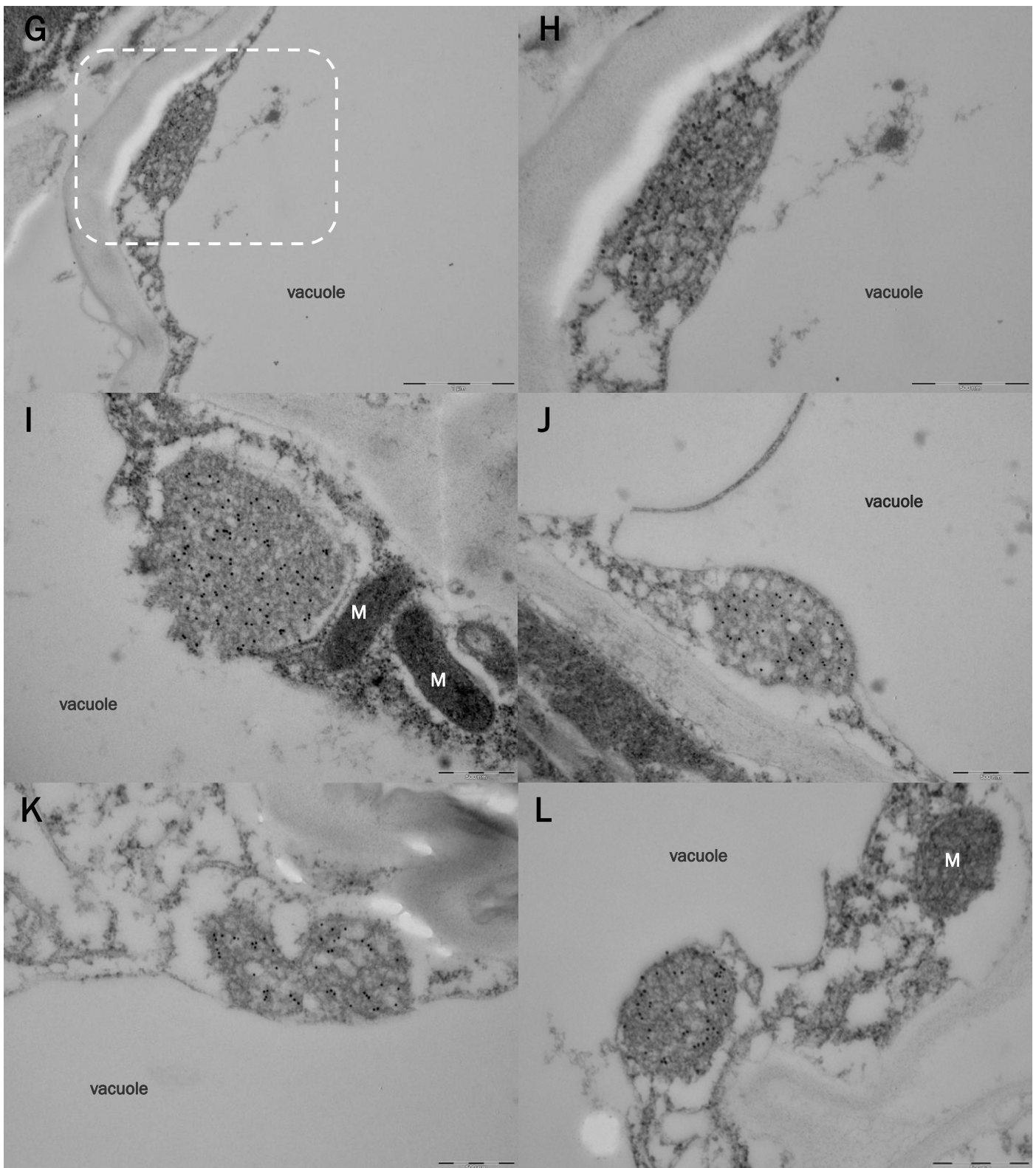


Figura R35. Inmunolocalización de Invertasa At β fruct4 en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron criofijados y sometidos a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-NR8 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18 nm) y observados al ME. **A - L.** Se observan ER bodies inmunomarcados presentes como vesículas circulares con estructura membranosa interna. Ch: Cloroplasto, M: Mitochondria, G: Aparato de Golgi. Los paneles B, D, F y H corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C, E y G. Las barras indican: A y G. 1 μ m; B. 200 nm; C y E. 2 μ m; D, F, H, I, J, K y L. 500 nm.

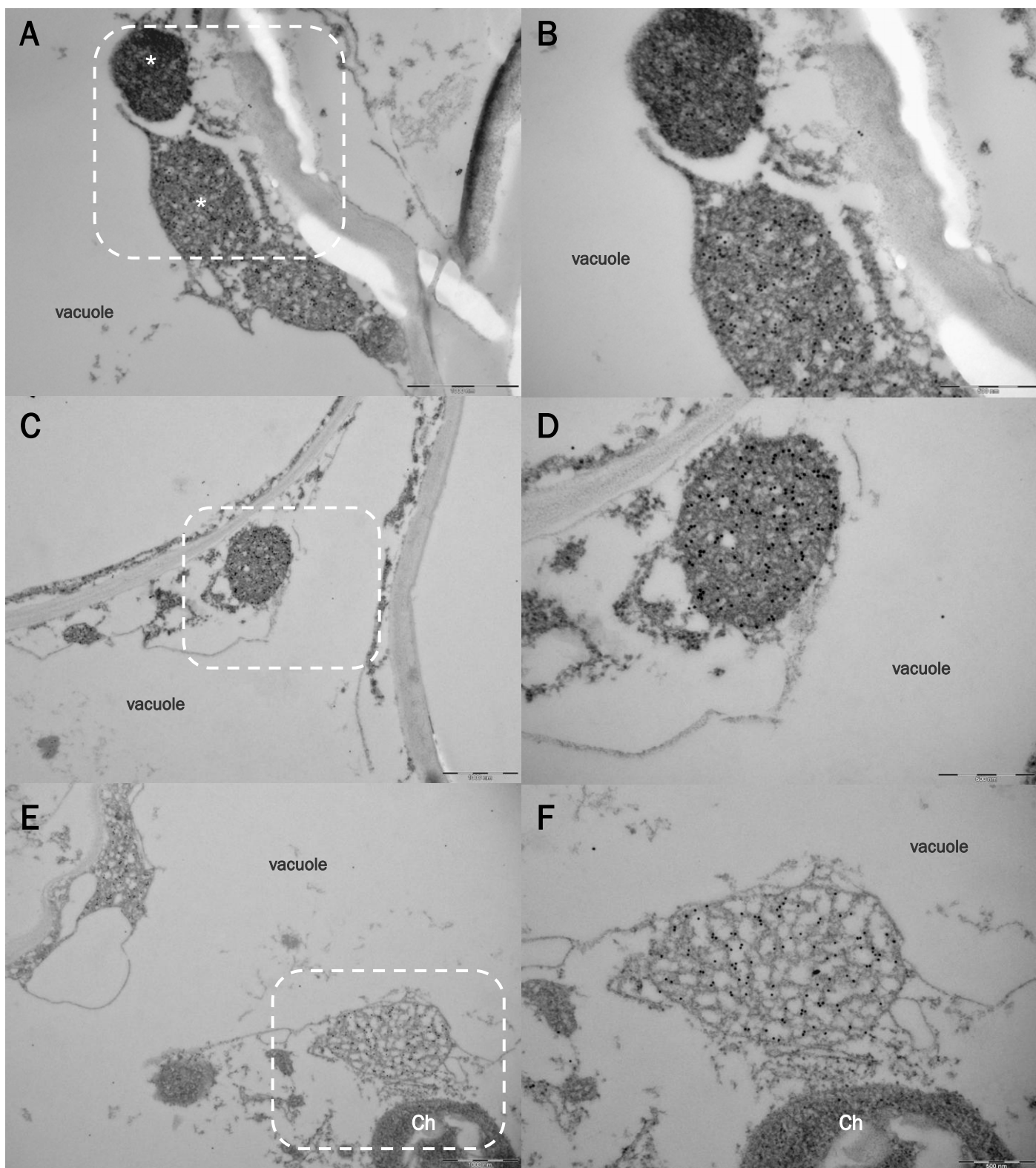


Figura R36. Inmunolocalización de PYK10 en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron criofijados y sometidos a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultrafinos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-PYK10-IM y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18 nm) y observados al ME. **A - F.** Se observan *ER bodies* inmunomarcados presentes como vesículas circulares con estructura membranosa interna. **A.** Se distinguen dos *ER bodies* en una misma célula con distinta densidad interna (señalados por asteriscos). Ch: Cloroplasto. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, C y E. 1 μm; B, D y F. 500 nm.

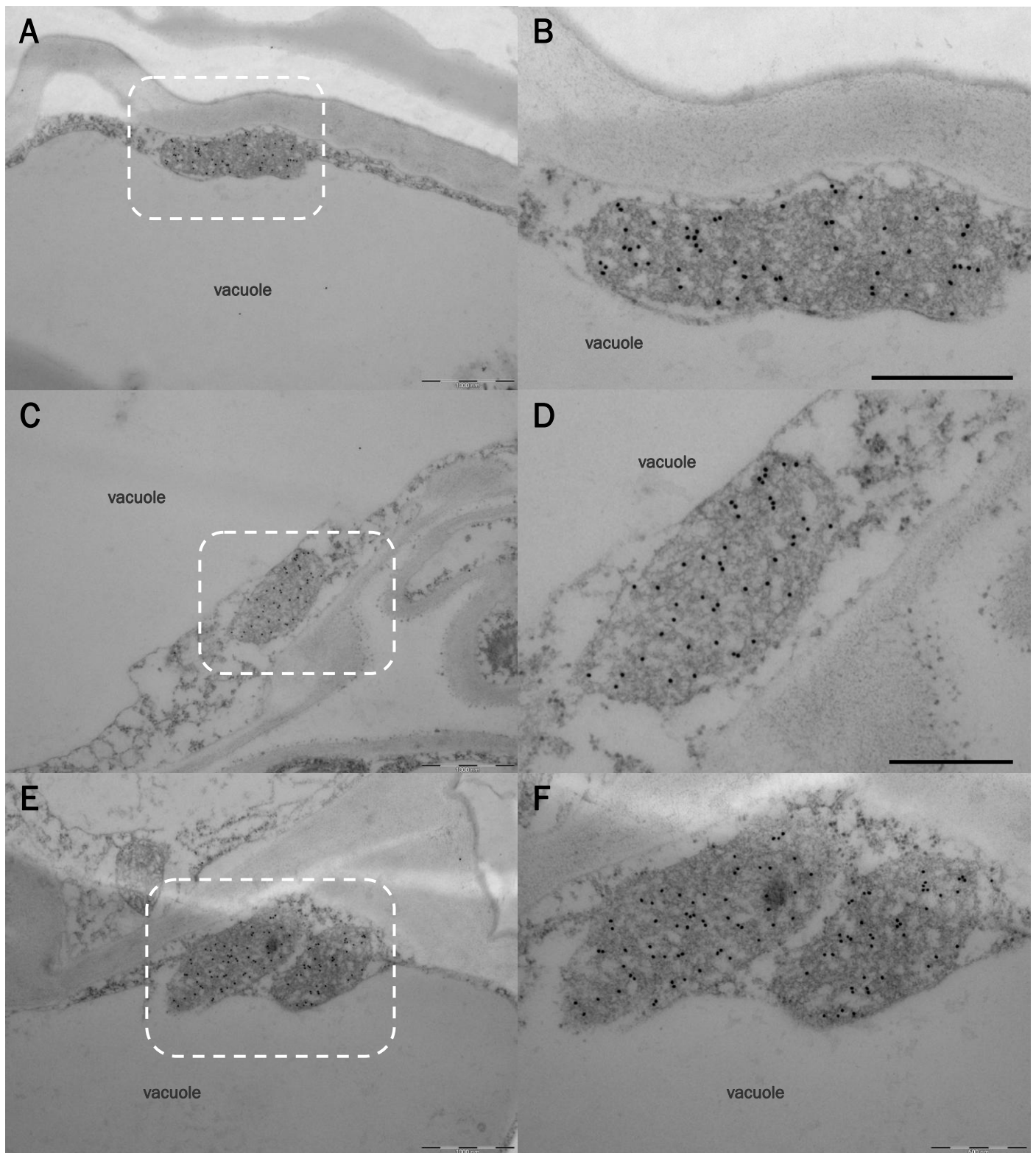
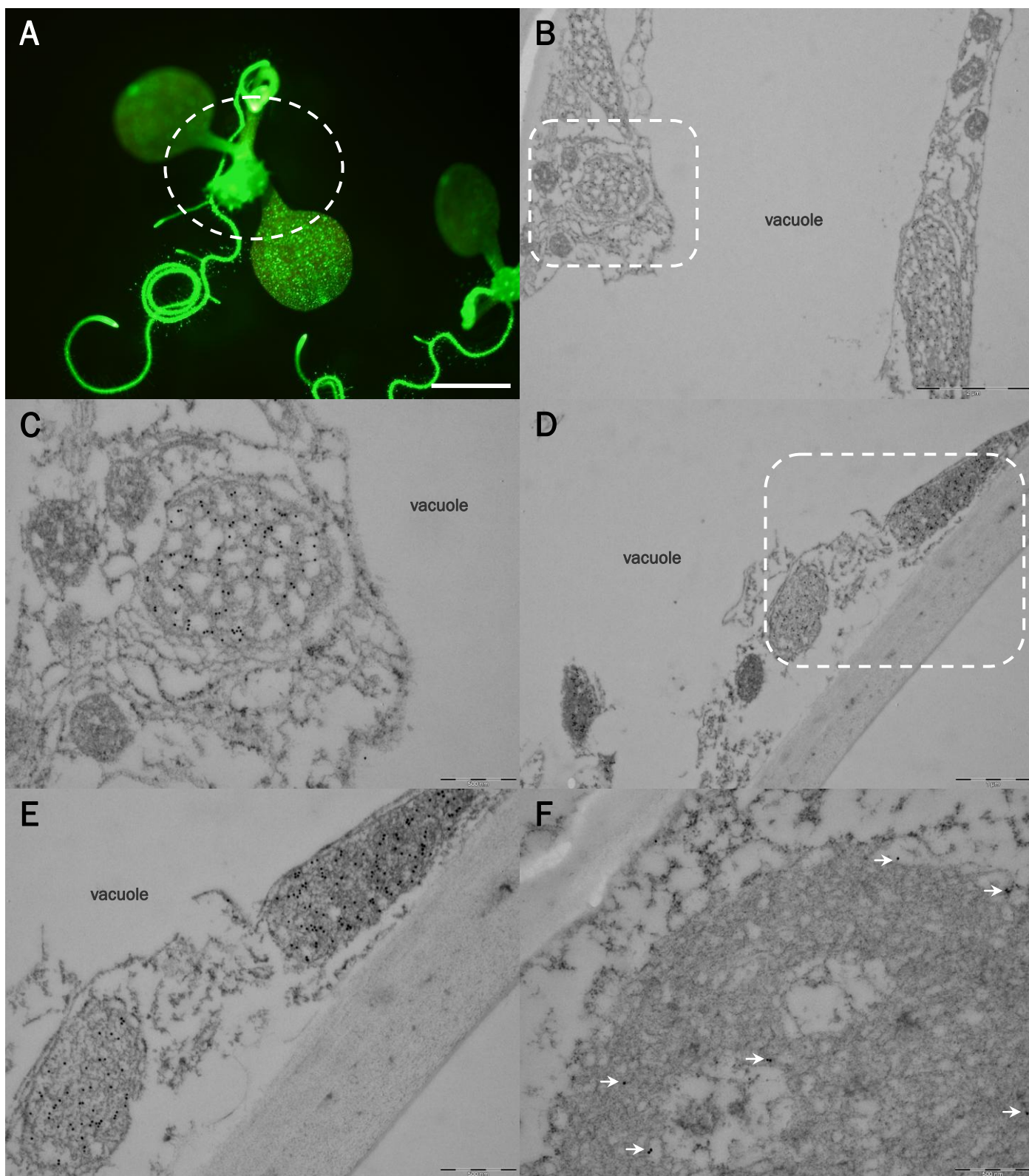


Figura R37. Inmunolocalización de PYK10 en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron criofijados y sometidos a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultrafinos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-PYK10-CM y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18 nm) y observados al ME. **A - F.** Se observan *ER bodies* inmunomarcados presentes como vesículas circulares con estructura membranosa interna. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, C y E. 1 µm; B, D y F. 500 nm.

Para indagar sobre la biogénesis de los *ER bodies*, se realizaron estudios inmunocitoquímicos en órganos aéreos de *A. thaliana*, en sus primeras fases de desarrollo. Concretamente, se partió de plantas transgénicas 1S:GFP de 10 días en las que se analizó el primer par de hojas verdaderas emergente, cuando apenas tenían 3 o 4 mm de longitud (Figura R38A). Hojas verdaderas emergentes de la línea 1S:GFP 2.15.4 fueron procesadas por criofijación e inmunomarcadas con el anticuerpo Ab-NR8 para detectar At β fruct4 (Figura R38) o Ab-PYK10-IM para detectar PYK10 (Figura R39). Al igual que en cotiledón, en hoja verdadera también se identificaron abundantes estructuras membranosas en célula epidérmica, con un alto contenido de At β fruct4 (Figura R38) y PYK10 (Figura R39). Estas estructuras tenían un diámetro aproximado de 0,5 a 2 μ m y distintos grados de compactación (compárese los paneles C y E en la Figura R38 y los paneles B y D en la Figura R39). El tamaño y la diversidad estructural de las vesículas membranosas enriquecidas en At β fruct4 y PYK10 de las plantas transgénicas 1S:GFP (Figuras R38 B – E y R39 A – D) fueron similares a las de plantas col0 (Figuras R35, R36 y R37). No se observa por tanto, que la hipertrofia de membranas de retículo endoplasmático de las líneas transgénicas 1S:GFP afecte al número, estructura o tamaño de las vesículas membranosas precursoras de *ER bodies*.

En las células epidérmicas de hoja verdadera emergente también se identificaron algunos agregados membranosos de tamaño similar a los *dominios ER-HMGR* descritos en la Sección 2.2.2. En dichos dominios, el marcaje de At β fruct4 o PYK10 fue muy escaso (Figuras R38F, R38G, R39E y R39F) o inexistente (Figura R38 H – L). De forma notoria, sin embargo, se observó una estrecha relación estructural entre las estructuras vesiculares membranosas con elevado contenido en At β fruct4 y los *dominios ER-HMGR* (Figura R38 I – L). Estas estructuras membranosas están claramente conectadas con el *dominio ER-HMGR* adyacente por haces de membranas más distendidos (Figura R38 I – L), lo que sugiere su origen a partir de las mismas. También se observaron regiones membranosas enriquecidas en At β fruct4, todavía englobadas por el *dominio ER-HMGR* (Figura R38L), cuyo diámetro es menor que el de las vesículas membranosas aisladas (0,2 μ m para las primeras y de 0,5 a 2 μ m para las segundas). Estas zonas de concentración de At β fruct4 podrían constituir primordios de *ER bodies*. El conjunto de estas observaciones indica que los *ER bodies* se originan a partir de *dominios ER-HMGR*, mediante la concentración y segregación de membranas y constituyentes proteicos.



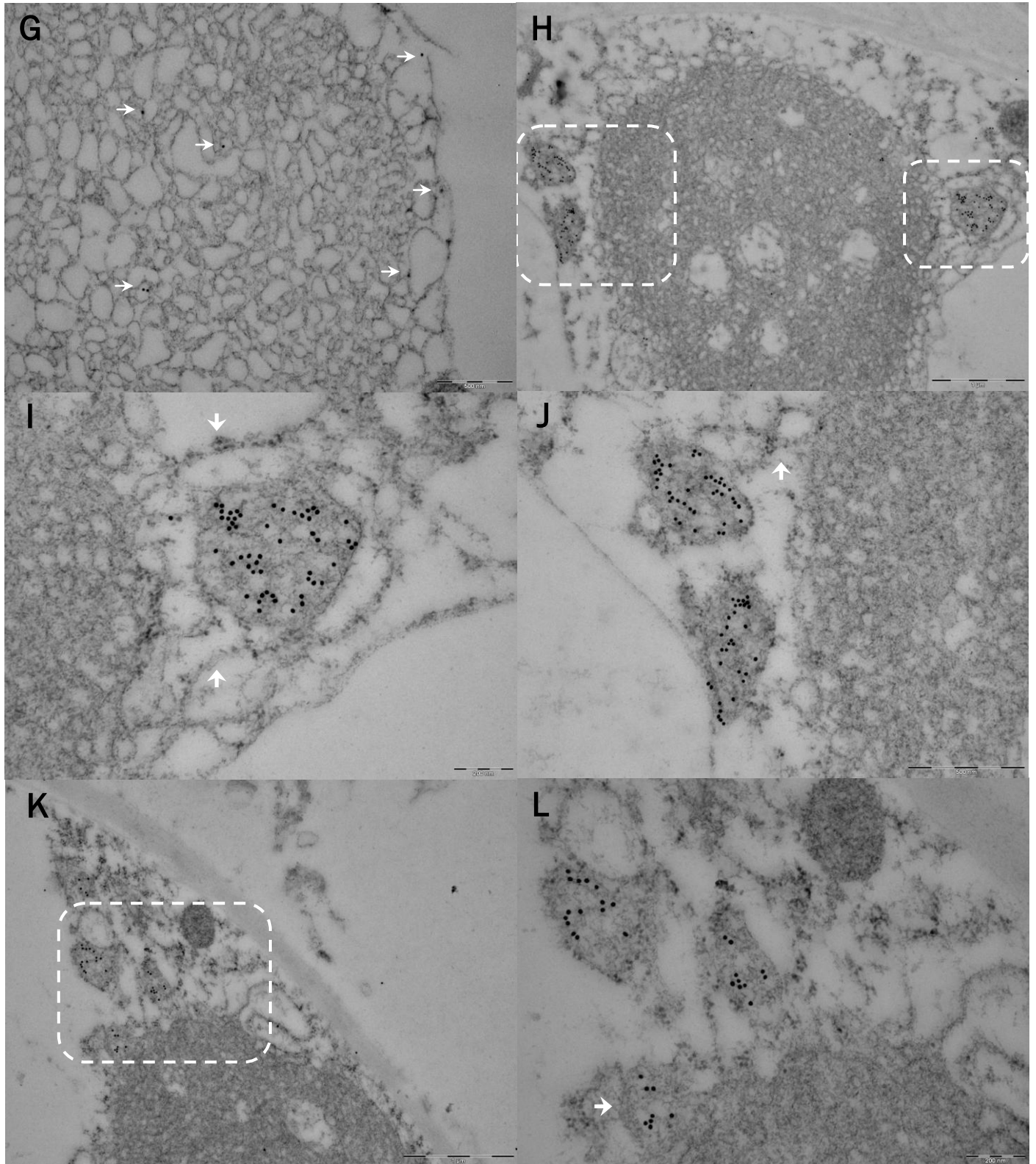


Figura R38. Inmunolocalización de la Invertasa At β fruct4 en células epidérmicas de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-NR8 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de 18 nm) y observados al ME. **A.** Imagen al microscopio de fluorescencia de las hojas verdaderas en desarrollo utilizadas en estos ensayos. **B - E.** Se observan ER bodies inmunomarcados, con estructura interna membranosa y en distinto grado de compactación. **F y G.** Agregados de retículo endoplasmático inmunomarcados de forma dispersa (flechas blancas). **H y K.** ER bodies emergentes a partir de los agregados de RE. **I, J y L.** Se observan membranas de retículo endoplasmático (flechas blancas) que conectan y rodean a los ER bodies. Los paneles C, E, I, J y L corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de B, D, H y K. Las barras indican: A, 5 mm; B, 2 μ m; C, E, F, G, y J, 500 nm; D, H y K, 1 μ m; I y L, 200 nm.

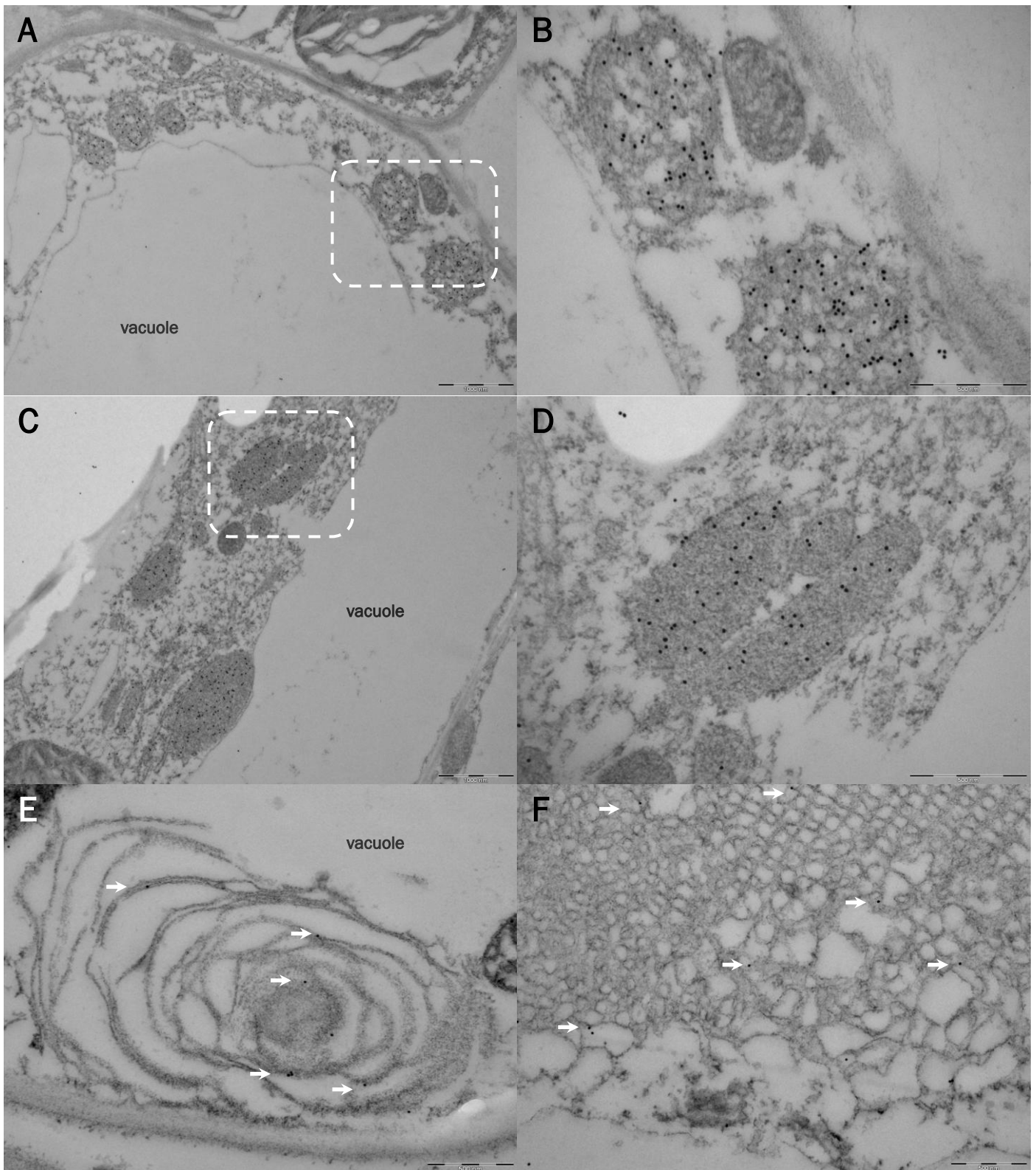


Figura R39. Inmunolocalización de PYK10 en células epidérmicas de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas. Los cortes ultrafinos fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario Ab-PYK10-IM y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de 18 nm) y observados al ME. **A - D.** Se observan *ER bodies* inmunomarcados, con estructura interna membranosa y distinto grado de compactación. **E y F.** Agregados de retículo endoplasmático inmunomarcados de forma dispersa (flechas blancas). Los paneles B y D corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A y C. Las barras indican: A y C, 1 μ m; B, D, E y F, 500 nm.

3.3 Coincidencia física y funcional entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies*.

Los análisis ultraestructural e inmunocitoquímico de las *vesículas de HMGR* y *ER bodies* (Secciones 3.1 y 3.2 respectivamente) indican que ambas estructuras tienen un aspecto membranoso y una gran similitud en cuanto a tamaño, forma y distribución en la célula, tal como se refleja de nuevo en la Figura R40. En esta figura se compara un *ER body* inmunomarcado con Ab-NR8, que detecta At β fruct4 (Figura R40A), y de una *vesícula de HMGR* inmunomarcada con Ab-26.8, que detecta HMGR (Figura R40B). Ambas estructuras pertenecen a célula epidérmica de cotiledón de *A. thaliana* col0, y son formaciones membranosas y densas, muy similares entre sí también en cuanto forma y tamaño. Probablemente son formas inmaduras de *ER bodies*. Estas observaciones sugieren identidad entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies*.

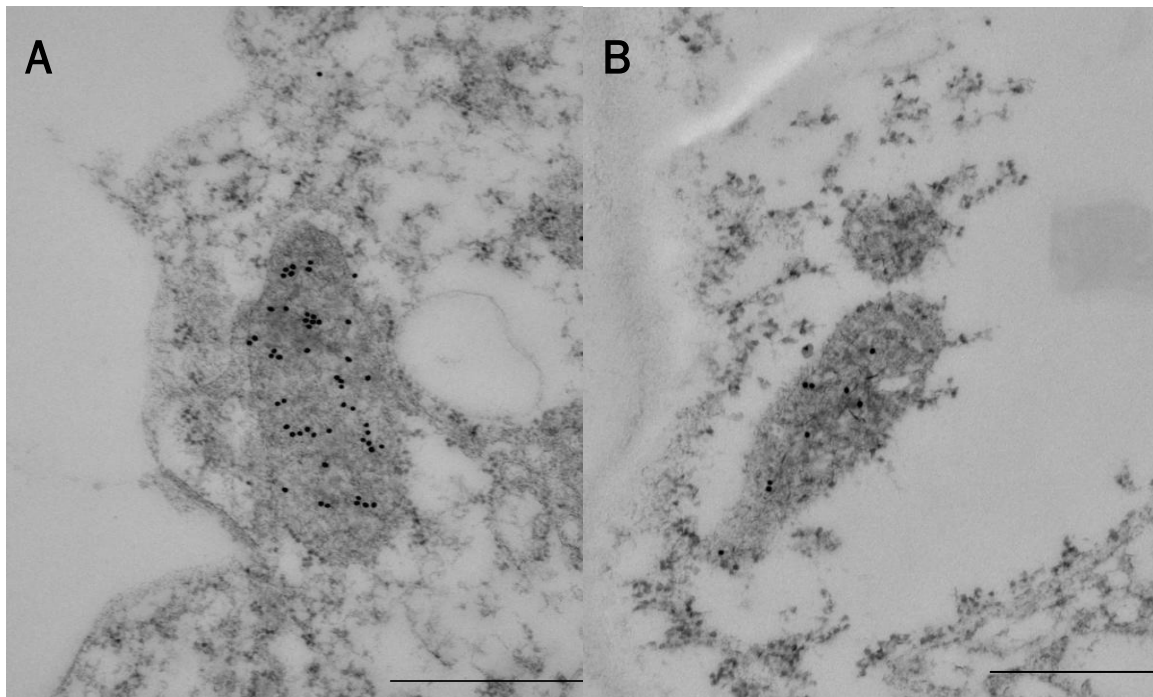


Figura R40. Análisis comparativo de un *ER body* y una *vesícula de HMGR* en citosol de células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* col0. Cotiledones de 6 días fueron criofijados y sometidos a inclusión para inmunocitoquímica. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados separadamente con los anticuerpos primarios Ab-NR8 y Ab-26.8 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de 18 nm) y observados al ME. **A.** *ER-body* inmunomarcado con Ab-NR8. **B.** *Vesícula de HMGR* inmunomarcada con Ab-26.8. Se observa la gran similitud entre ambas estructuras vesiculares. Las barras indican: A, 1 μ m y B, 500 nm.

Para confirmar la coincidencia física entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies*, se realizaron ensayos de colocalización por inmunomarcaje de los mismos. Dado que todos los anticuerpos disponibles contra proteínas de *ER bodies* o contra HMGR habían sido generados en conejo, no fue posible combinarlos en estos ensayos. Como alternativa para detectar HMGR, se recurrió al anticuerpo Ab-5450 que detecta la quimera 1S:GFP portadora del dominio de membrana de dicha proteína. Esta decisión estaba justificada pues 1S:GFP colocaliza con HMGR endógena en *vesículas de HMGR* en las plantas transgénicas 1S:GFP (Sección 3.1, Figura R28). Por otra parte, las características estructurales de los *ER bodies* no se ven afectadas en plantas transgénicas 1S:GFP con respecto a plantas col0 (Sección 3.2.3). Concretamente, se combinaron los anticuerpos Ab-5450 contra GFP y Ab-NR8 contra At β fruct4 y se realizaron ensayos sobre cortes ultra-finos del primer par de hojas verdaderas en sus primeras etapas de desarrollo, tomadas a partir de plantas 1S:GFP de 10 días. Los resultados se muestran en la Figura R41. En célula epidérmica de hoja verdadera, At β fruct4 y 1S:GFP colocalizan en el interior de los *ER bodies*, los cuales tienen estructura interna diversa, algunos con membranas relativamente distendidas (Figura R41B) y otros con contenido más compacto (Figuras R41D y R41F). La 1S:GFP se localiza tanto en *vesículas de HMGR* (Figura R28) como en *ER bodies* (Figura R41). Considerando además que ambas estructuras son muy similares en cuanto a tamaño, distribución en la célula y aspecto al microscopio electrónico, se puede concluir que, en plantas de *A. thaliana*, las *vesículas de HMGR* y los *ER bodies* coinciden físicamente.

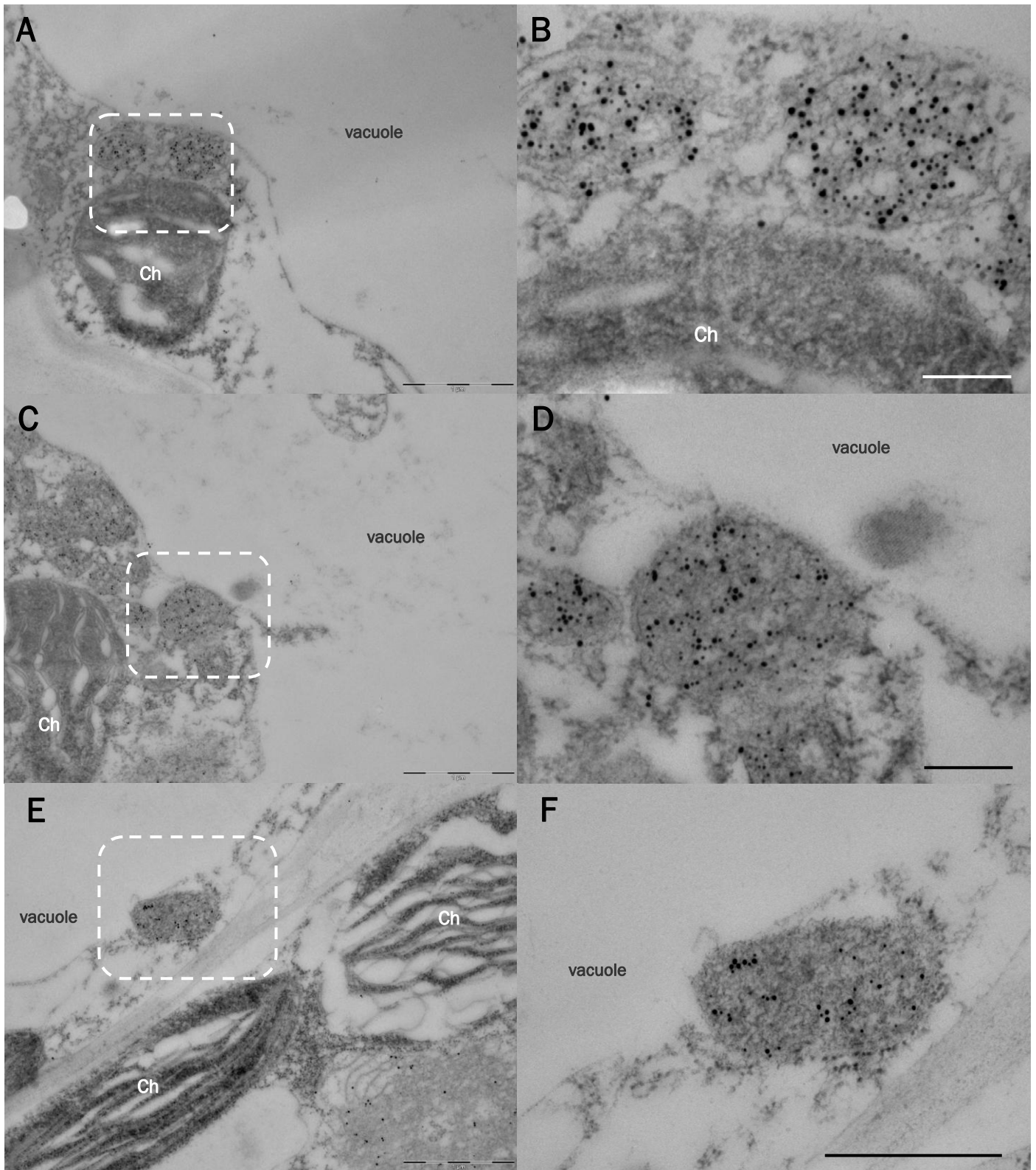


Figura R41. Colocalización de Invertasa At β fruct4 y 1S:GFP en células epidérmicas de plantas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con los anticuerpos primarios Ab-NR8 y Ab-5450 y anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y cabra, respectivamente (partículas de oro de 12 y 18 nm respectivamente), y observados al ME. **A y B.** ER bodies con estructura membranosa distendida. **C – F.** ER bodies con patrón de membranas más compacto y contenido denso. Ch: Cloroplasto. Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las regiones en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, C y E. 1 μ m; B, D y F. 500 nm.

Una vez constatada la identidad física entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies* en citosol, se quiso comprobar también la coincidencia funcional de dichas estructuras en los procesos de biogénesis de *ER bodies* y su vertido a vacuola. Para examinar la biogénesis de los *ER bodies*, de nuevo se combinaron los anticuerpos Ab-5450 y Ab-NR8 en inmunomarcaje sobre cortes de primordios del primer par de hojas verdaderas de planta transgénica 1S:GFP. En células epidérmicas, se observó que 1S:GFP y At β fruct4 se localizan tanto en *ER bodies* (Figuras R42B y R42E) como en grandes agregados de retículo endoplasmático que corresponden a *dominios ER-HMGR* (Figuras R42C y R42F). Sin embargo, las densidades del marcaje obtenido con ambos anticuerpos primarios a dilución 1:1000, indican la existencia de diferencias en la distribución y el número de partículas de oro asociadas a los mismos. Se observa un notorio incremento en la concentración y número de partículas de 12 nm asociadas a At β fruct4 en el interior de los *ER bodies* (Figuras R42B y R42E), mientras que su distribución es más dispersa y escasa en los agregados de retículo endoplasmático (Figuras R42C y R42F). Lo contrario ocurre con las partículas de 18 nm asociadas a 1S:GFP, que se encuentran distribuidas de forma homogénea en los agregados de retículo endoplasmático (Figuras R42C y R42F), pero que son menos abundantes en el interior de los *ER bodies* (Figuras R42B y R42E). Estos resultados indican que los *ER bodies* se forman a partir de la asociación de membranas de retículo endoplasmático que corresponden específicamente a *dominios ER-HMGR* (Figuras R42A y R42D). Además, las diferencias en el inmunomarcaje con ambos anticuerpos ponen de manifiesto que durante el proceso de formación, diferenciación y maduración, las membranas de retículo endoplasmático en el interior de los *ER bodies* se compactan acumulando una mayor cantidad de invertasa At β fruct4 en su interior y dando lugar a *ER bodies* maduros con un aspecto más denso. Durante este proceso, la presencia de 1S:GFP y presumiblemente también, HMGR van disminuyendo.

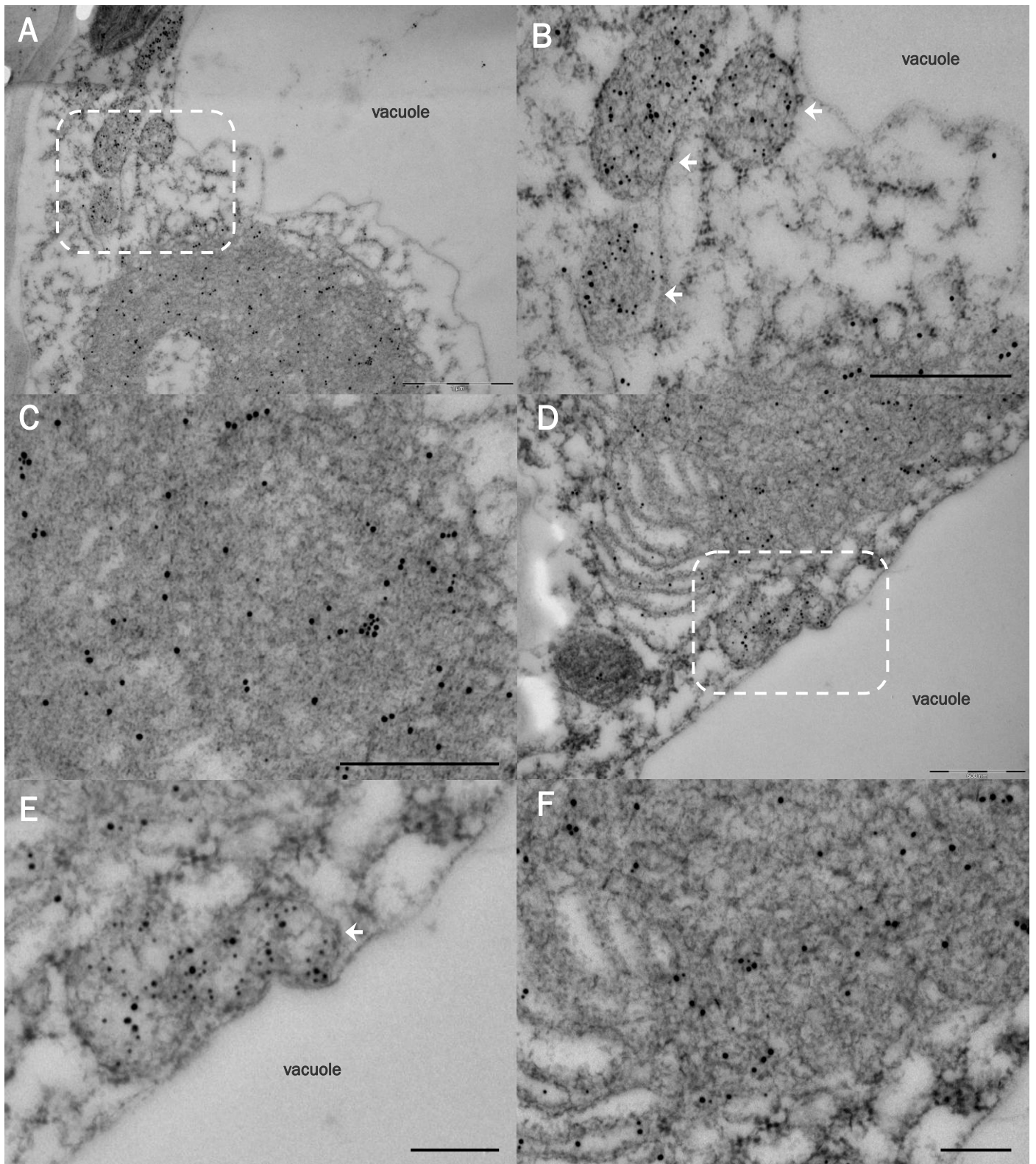


Figura R42. Colocalización de la Invertasa At β fruct4 con 1S:GFP en células epidérmicas de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijadas. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con los anticuerpos primarios Ab-NR8 y Ab-5450 y anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y cabra (partículas de oro de 12 y 18 nm respectivamente), y observados al ME. **A y D.** ER bodies emergentes a partir de dominios ER-HMGR inmunomarcados. **B y E.** Imágenes aumentadas de los ER bodies; se observa que At β fruct4 (12 nm) y 1S:GFP (18 nm) colocalizan. **C y F.** Imágenes aumentadas, se observa colocalización en las zonas de los agregados de RE. Las barras indican: A, 1 μ m; B, C y D, 500 nm; E y F, 200 nm.

En *A. thaliana*, los *ER bodies* han sido implicados en la respuesta celular a estrés. Se ha demostrado que estos orgánulos son vertidos a vacuola en respuesta a estrés salino (Hayashi *et al.*, 2001) y se ha propuesto que dicho vertido también se podría producir en respuesta a herida (Matsushima *et al.*, 2003b; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). Para examinar la presencia de HMGR en *ER bodies* durante su vertido a vacuola, cotiledones de plantas transgénicas 1S:GFP de 10 días fueron seccionados de la planta y criofijados 1 hora más tarde. Cortes ultra-finos de la muestra fueron inmunomarcados con anticuerpos Ab-26.8 y Ab-5450, para detectar HMGR y 1S:GFP, respectivamente, en célula epidérmica. Los resultados se muestran en la Figura R43. Los *ER bodies* de estas células son fácilmente reconocibles por su sección elíptica, su cubierta de membrana simple y su contenido granuloso denso a los electrones (Figura R43). En la Figura R43A puede observarse un grupo de *ER bodies* en el interior de la vacuola. HMGR y 1S:GFP colocalizan en la membrana que rodea los *ER bodies*, quedando excluidas de su interior (Figura R43 B – D). Es notoria la ausencia de membranas, marcadas por HMGR y 1S:GFP, en el interior del orgánulo, a diferencia de lo que ocurría en *ER bodies* inmaduros (Figura R42).

El conjunto de evidencias presentadas en esta sección sugiere que los *ER bodies* se forman a partir de la proliferación y acúmulo de membranas de retículo endoplasmático que constituyen los *dominios ER-HMGR*. La formación y crecimiento del *ER body* sería concomitante con el acúmulo de proteínas propias de este orgánulo (At β fruct4, PYK10). Posteriormente, tendría lugar un proceso de maduración en el que el *ER body* adquiere un aspecto más compacto y denso en su interior y en el que progresivamente desaparecen las membranas internas. Consecuentemente, HMGR queda relegada a la membrana externa del orgánulo, desapareciendo del interior.

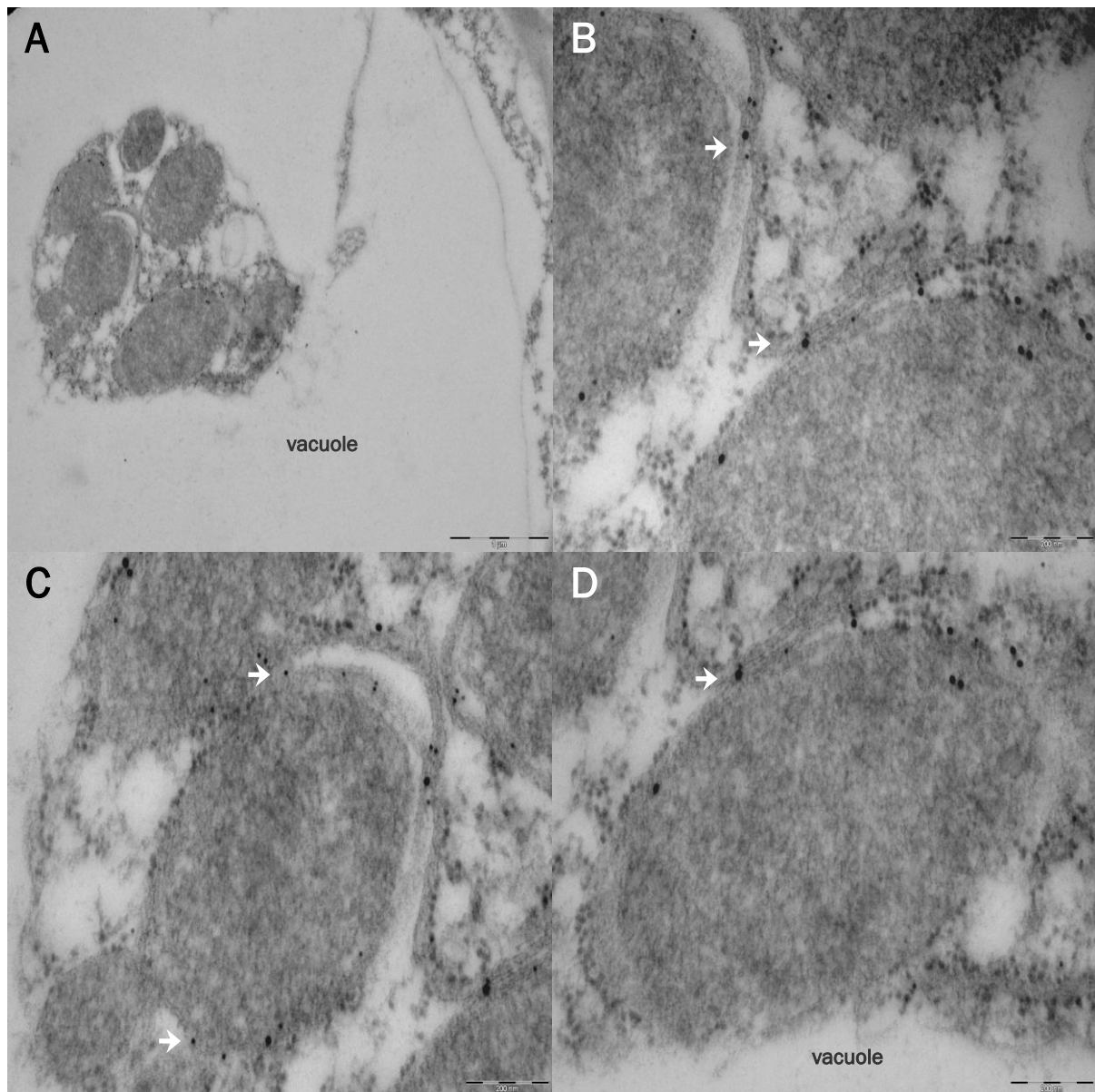


Figura R43. Colocalización de 1S:GFP con HMGR en células epidérmicas de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Cotiledones de 10 días de la línea transgénica 2.15.4 fueron criofijados. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con los anticuerpos primarios Ab-5450 y Ab-26.8 y anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra y conejo (partículas de oro de 18 y 12 nm respectivamente), y observados al ME. **A.** Imagen panorámica de un grupo de *ER bodies* en vacuola. **B, C y D.** Imágenes aumentadas, se distingue que 1S:GFP y HMGR se encuentran ambas localizadas en las membranas que rodean a los *ER bodies* (señaladas por flechas). Las barras indican: A. 1 µm; B, C y D. 200 nm.

4. VERTIDO VACUOLAR DE *DOMINIOS ER-HMGR* EN RESPUESTA A ESTRÉS.

En la Sección 3.1 se ha analizado la localización subcelular de HMGR mediante inmunocitoquímica *in-situ* de planta entera (*whole mount*). En células parenquimáticas de cotiledón de plántulas de *A. thaliana*, la HMGR fue localizada en unos corpúsculos citosólicos situados entre cloroplastos, que fueron denominados *vesículas de HMGR*. Sin embargo, se advirtió que el rendimiento del inmunomarcaje en estos experimentos era variable, y que las *vesículas de HMGR* desaparecen al prolongar el tiempo de tratamiento con driselasa, que es una mezcla de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular. Tras 60 min de digestión con driselasa 2 % p/v, se observó una cierta disminución en el número de *vesículas de HMGR* y en la intensidad de su marcaje, con respecto a la incubación de 30 min (Figura R44). A los 90 min de digestión, la desaparición de las *vesículas de HMGR* fue todavía más evidente y casi completa a los 120 min (Figura R44).

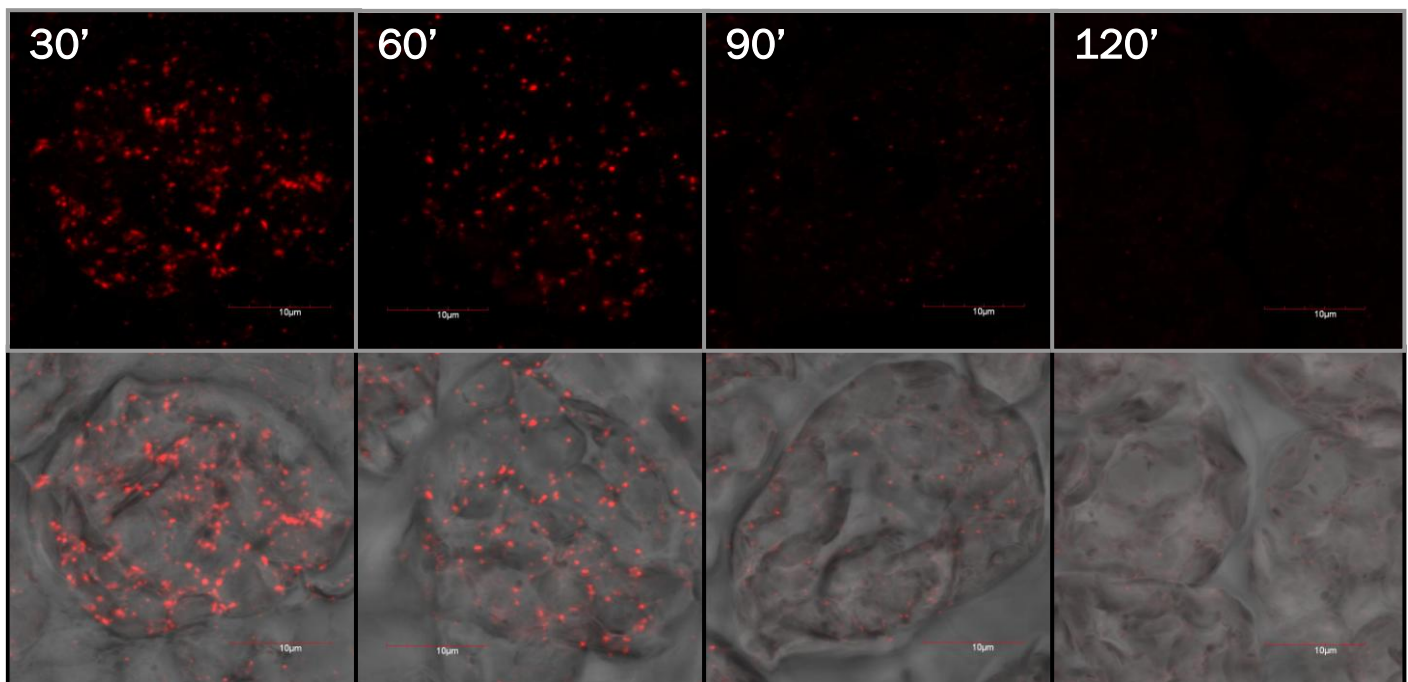


Figura R44. Desaparición de las *vesículas de HMGR* en célula parenquimática de cotiledón durante tratamiento con driselasa. Plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días fueron tratadas con driselasa al 2 % p/v durante 30, 90, 60 ó 120 min y procesadas a continuación, por *whole mount*. Las plantas fueron inmunomarcadas con el anticuerpo Ab-26.8 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo portador de fluoróforo AlexaFluor 555 y observadas al microscopio confocal. En la fila superior de las imágenes se observa la desaparición progresiva de las *vesículas de HMGR* de color rojo en células parenquimáticas de cotiledón. En las imágenes en campo claro (fila inferior), se distinguen los contornos celulares. Las barras indican: 10 µm.

Los procedimientos de la técnica de *whole mount* (Sauer *et al.*, 2006) suponen un estrés muy severo para la planta, como la manipulación física de la misma que puede dar lugar a respuesta a herida, la digestión con driselasa que degrada las paredes celulares, varios lavados con soluciones de etanol, metanol y xileno, y la fijación con glutaraldehído y para-formaldehído, que implica estrés de tipo químico. Era presumible por tanto, que la desaparición progresiva de las *vesículas de HMGR* fuera debida a una reacción frente a estrés, aunque no se podía concluir sobre el estímulo concreto que estaba desencadenando dicha respuesta. En los apartados siguientes se examina la posibilidad de que la desaparición de *vesículas de HMGR* sea debida a estrés por herida (Sección 4.1) o a estrés químico (Sección 4.2).

4.1 Estrés por herida.

Para determinar si el estrés por herida podía desencadenar la desaparición de *vesículas de HMGR* en células parenquimáticas de cotiledón, plantas col0 de *A. thaliana* fueron lesionadas y, posteriormente a distintos tiempos, preparadas para inmunitoquímica *whole mount*. El tratamiento de herida consistió en el seccionamiento del hipocótilo con un bisturí, tras lo cual los cotiledones fueron incubados sobre medio MS con agar durante 15, 30, 60 ó 90 min. El tratamiento con driselasa se prologó durante un tiempo de 45 min, que era adecuado para el inmunomarcaje y observación de *vesículas de HMGR*, tal como se ha expuesto en la sección anterior. La HMGR fue detectada con el anticuerpo policlonal Ab-26.8, según se muestra en la Figura R45. Como control se procesaron cotiledones no sometidos a herida que corresponden al tiempo 0 min. Los resultados muestran la desaparición progresiva de las *vesículas de HMGR* en células parenquimáticas de cotiledón (Figura R45). La respuesta es general y muy rápida, pues 30 min después de la herida la cantidad de marca se ha reducido en un 70 ó 80 % (Figura R45).

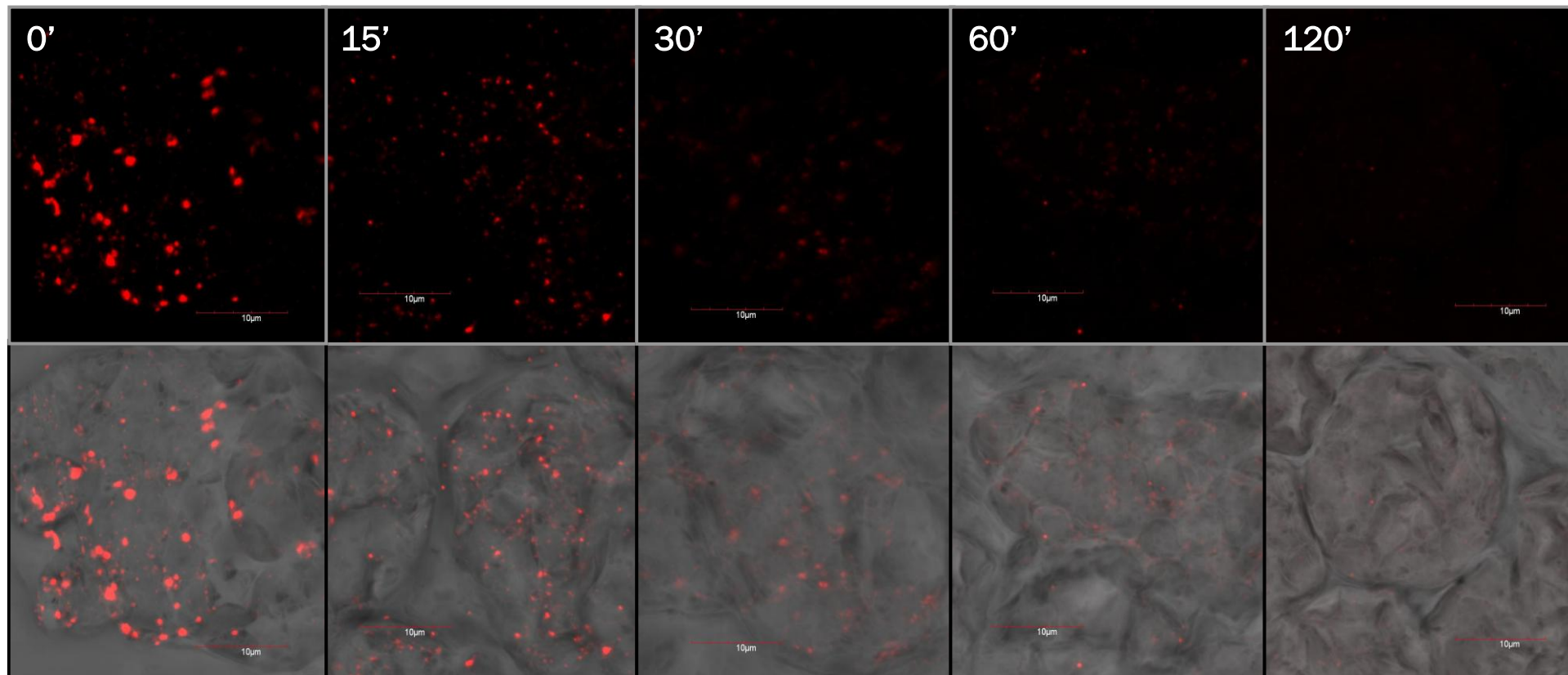


Figura R45. Desaparición de las vesículas de HMGR en célula parenquimática de cotiledón, en respuesta a herida. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días fueron seccionados de la raíz con bisturí y procesados por *whole mount* 15, 30, 60 ó 120 min después del corte. Los cotiledones fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-26.8 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo portador de fluoróforo AlexaFluor 555 y observados al microscopio confocal. En la fila superior de las imágenes se observa la desaparición gradual de las vesículas de HMGR de color rojo en células parenquimáticas. En las imágenes en campo claro (fila inferior), se distinguen los contornos celulares. Las barras indican: 10 μm.

4.1.1 Vertido vacuolar de HMGR y vesículas en células epidérmicas y parenquimáticas de cotiledón y hoja verdadera.

En *A. thaliana*, las vesículas de HMGR corresponden a ER bodies (Sección 3.3) y estos orgánulos son vertidos a vacuola en respuesta a estrés salino (Hayashi *et al.*, 2001). Se consideró posible, por tanto, que la desaparición de vesículas de HMGR en respuesta a herida observada en la presente tesis, fuera debida a su vertido a vacuola y subsiguiente degradación. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un estudio de microscopía electrónica con marcaje inmunocitoquímico. En un primer análisis, se utilizaron plantas silvestres col0 de *A thaliana* de 6 días, que fueron seccionadas en la zona del hipocótilo con un bisturí. Una hora después del corte, los cotiledones fueron sometidos a criofijación, iniciando así su preparación para el estudio ultraestructural. Los cortes ultrafinos fueron inmunomarcados con el anticuerpo policlonal Ab-26.8, que detecta HMGR, y observados al microscopio electrónico. Como control, se procesaron cotiledones no sometidos a herida (Figura R46). Las células parenquimáticas de los cotiledones control no presentaron vesículas ni marcaje de HMGR en vacuola (Figuras R46A y R46B). En ellas, la HMGR apareció únicamente en citosol, concretamente en unas vesículas próximas a cloroplastos y a vacuola (Figuras R46A y R46B). Estas estructuras corresponden a las vesículas de HMGR descritas en la Sección 3.1. En el caso de los cotiledones sometidos a herida, no se observaron vesículas de HMGR en citosol, pero sí en vacuola, aunque sólo ocasionalmente (Figuras R46C y R46D). Probablemente, la incorporación a vacuola implica la rápida degradación de las vesículas de HMGR, por lo que son difíciles de observar en esta situación.

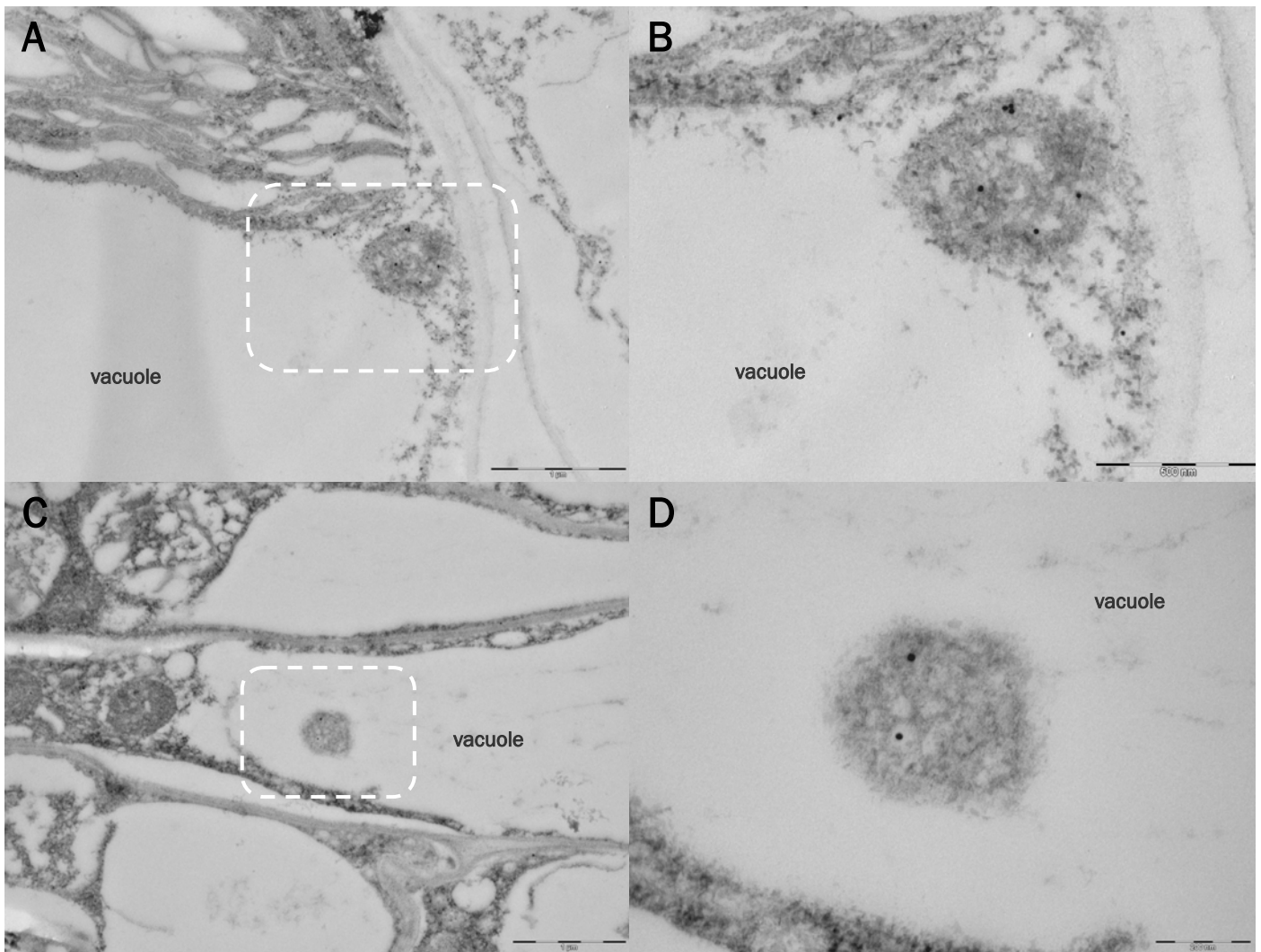
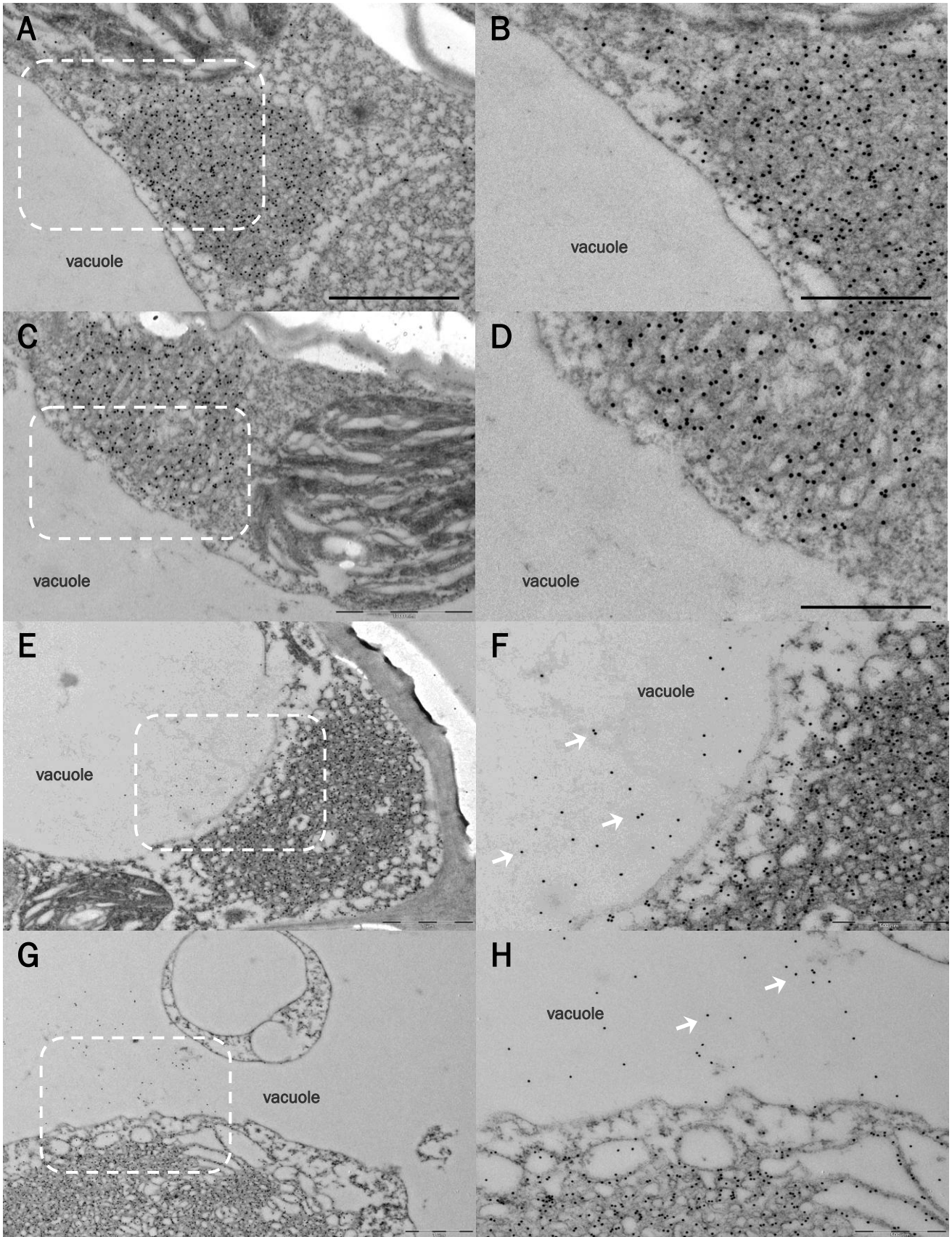
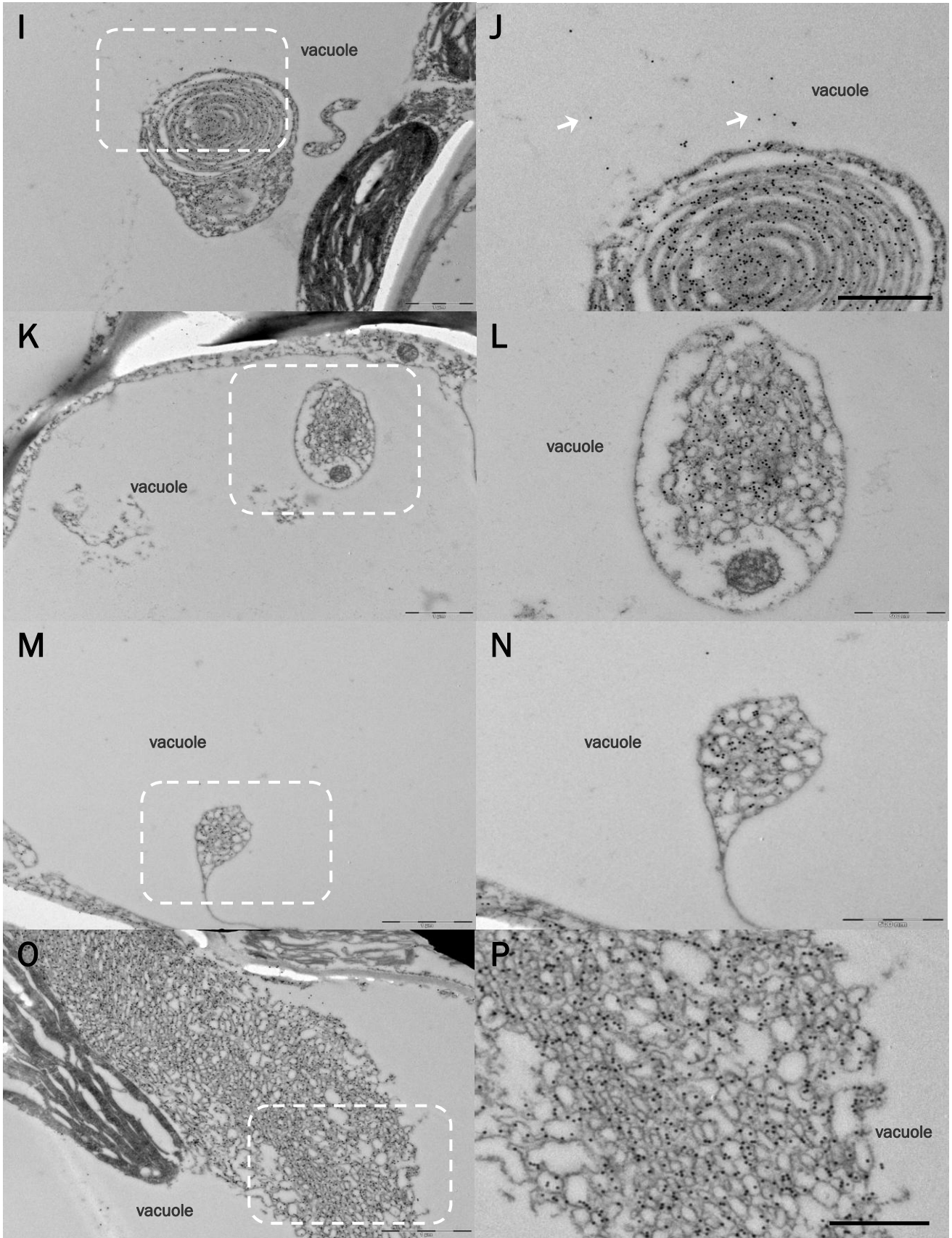


Figura R46. Inmunocitoquímica de células parenquimáticas de cotiledón sometido a herida. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días, fueron seccionados de la planta, recolectados tras una hora y procesados por criofijación. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-26.8 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18nm), y observados al ME. **A y B.** Células control no sometidas a herida, se observa una vesícula inmunomarcada y localizada en el citosol. **C y D.** Tras el estrés por herida, se observa una estructura vesicular inmunomarcada y localizada en vacuola. Las barras indican: A y C, 1 µm; B, 500 nm y D, 200 nm.

Para documentar el proceso de vertido a vacuola más claramente, se recurrió a las líneas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*, habida cuenta del elevado nivel de expresión de 1S:GFP y HMGR observado en dichas líneas (Sección 2.2.2). Hojas verdaderas de plantas de 10 días de la línea 1S:GFP 2.15.4 fueron seccionadas con bisturí y, 1 ó 3 horas más tarde, fueron procesadas por criofijación. Cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo policlonal Ab-5450, para detectar 1S:GFP, y observados al microscopio electrónico (Figuras R47 y R48). En células epidérmicas de hojas verdaderas no sometidas a herida, se observa la presencia de agregados de retículo endoplasmático inmunomarcados en el citosol (Figura R47 A – D). Sin embargo, una hora después de la

lesión, en estas células se evidencia un proceso de desprendimiento de pequeños fragmentos de membrana inmunomarcados y dirigidos hacia el interior de la vacuola, a partir de los agregados citosólicos de retículo endoplasmático (Figuras R47F y R47H) o a partir de agregados de membrana en vacuola previamente desprendidos (Figura R47J). En el interior de la vacuola, también se observaron agregados de retículo endoplasmático, relativamente grandes, en degradación (Figuras R47L y R47N) y, al borde del espacio vacuolar, *dominios ER-HMGR* cuyo costado está directamente embebido en la vacuola (Figuras R47O y R47P), sin la separación del tonoplasto. Todo ello sugiere un rápido proceso degradativo. En las Figuras R47Q y R47R puede observarse el vertido a vacuola desde un *dominio ER-HMGR* en las proximidades del núcleo, con su membrana bien poblada de 1S:GFP. Aunque la membrana nuclear es continuación del retículo endoplasmático, no parece sufrir descomposición o vertido a vacuola en respuesta a herida. También se observan estructuras vesiculares de contenido poco denso y marcadas únicamente en su membrana exterior, que están siendo vertidas a vacuola (Figuras R47S y R47T). Dichas estructuras se asemejan a *ER bodies* inmaduros descritos en las Secciones 3.2.1 (Figura R31) y 3.2.3 (Figuras R35, R36 y R37). En resumen, el estrés por herida desencadena un rápido vertido de *dominios ER-HMGR* a vacuola en célula epidérmica de hoja, que puede tener distintas formas, como el desprendimiento de pequeños fragmentos de membrana, el vertido de agregados de retículo endoplasmático en forma vesicular, la exposición de grandes porciones de retículo endoplasmático al espacio vacuolar o el vertido de *ER bodies*, aún antes de que alcancen su madurez. Se trata de un proceso de degradación masivo de los *dominios ER-HMGR*, que adopta distintas formas.





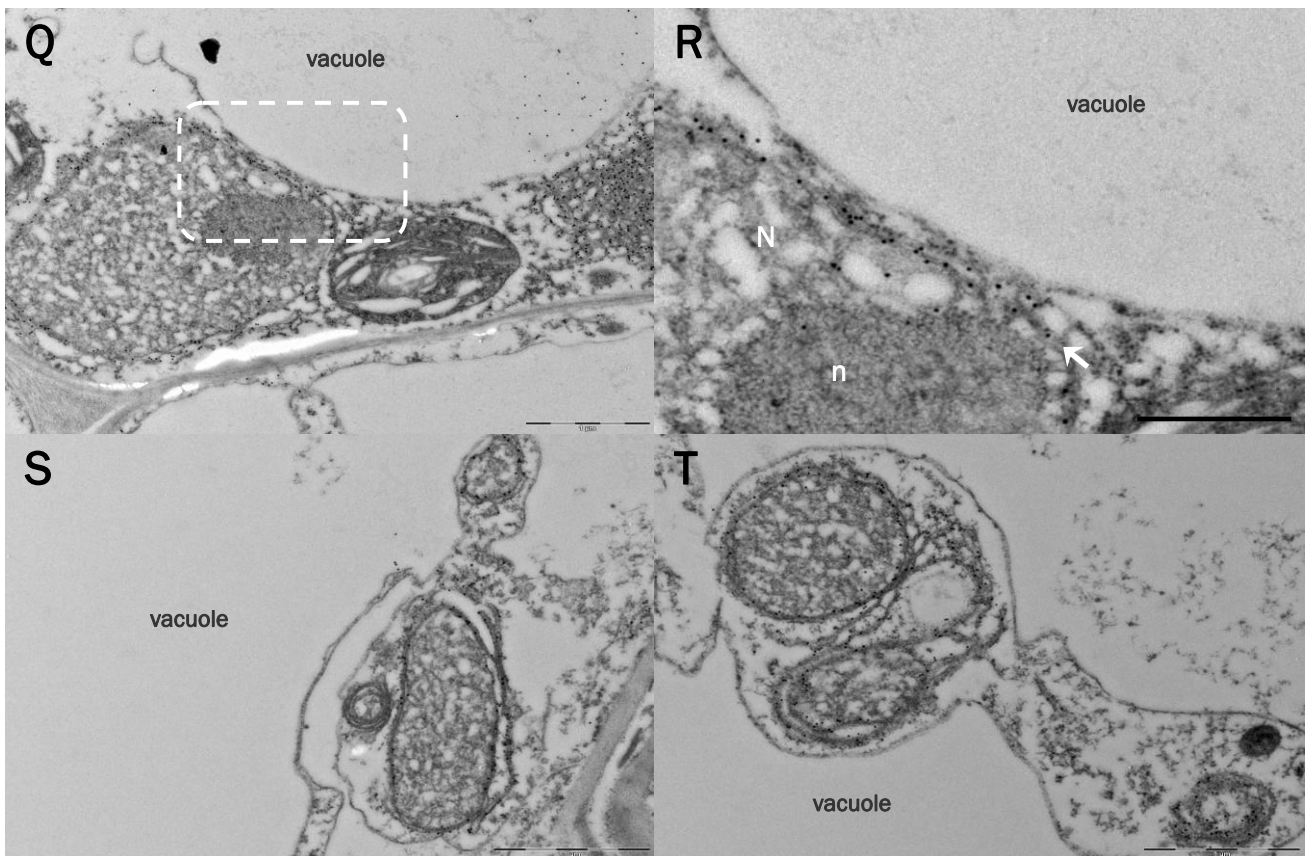


Figura R47. Inmunocitoquímica de células epidérmicas de hoja verdadera sometida a herida. Hojas verdaderas de plantas de *A. thaliana* transgénicas 1S:GFP de la línea 2.15.4, de 10 días, fueron seccionadas de la planta, recolectadas tras 1 h y procesadas por criofijación. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-5450 y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (partícula de oro de 18nm), y observados al ME. **A - D.** *Dominios ER-HMGR* en células epidérmicas de hojas no sometidas a herida. Tras 1 h de herida: **E - J.** Desprendimiento hacia la vacuola de pequeños fragmentos de membrana a partir de agregados de RE citosólicos. **K - N.** Desprendimiento de agregados de RE hacia la vacuola. **O - P.** *Dominio ER-HMGR* embebido directamente en vacuola. **Q - R.** La membrana nuclear con 1S:GFP (señalada con una flecha blanca), no parece sufrir degradación vacuolar. N: Núcleo, n: nucléolo. **S - T.** Estructuras vesiculares similares a *ER bodiës* inmaduros derivados hacia vacuola. Los paneles B, D, F, H, J, L, N, P y R corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C, E, G, I, K, M, O y Q. Las barras indican; A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S y T, 1 μ m; B, D, F, H, J, L, N, P y R, 500 nm.

Tres horas después de la lesión, ya no se detectó desprendimiento de membranas, ni grandes agregados de retículo endoplasmático en vacuola (Figura R48). En lugar de ello, en el citosol se observó un remanente de vesículas de sección circular o elíptica asociadas en grupos (Figura R48 A - D). La presencia de 1S:GFP en las estructuras reticulares, detectada con Ab-5450, denota que son *dominios ER-HMGR* que no han sido movilizados a vacuola.

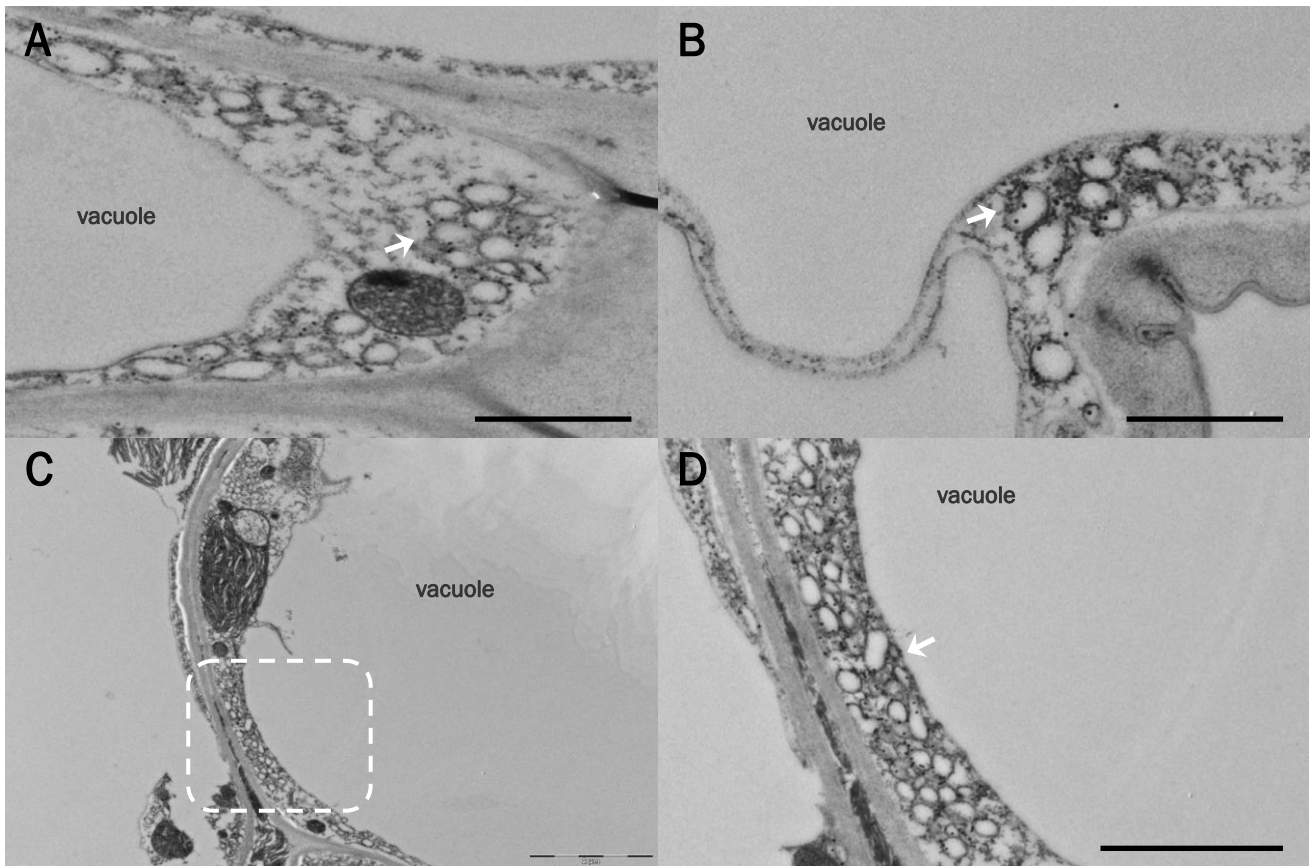
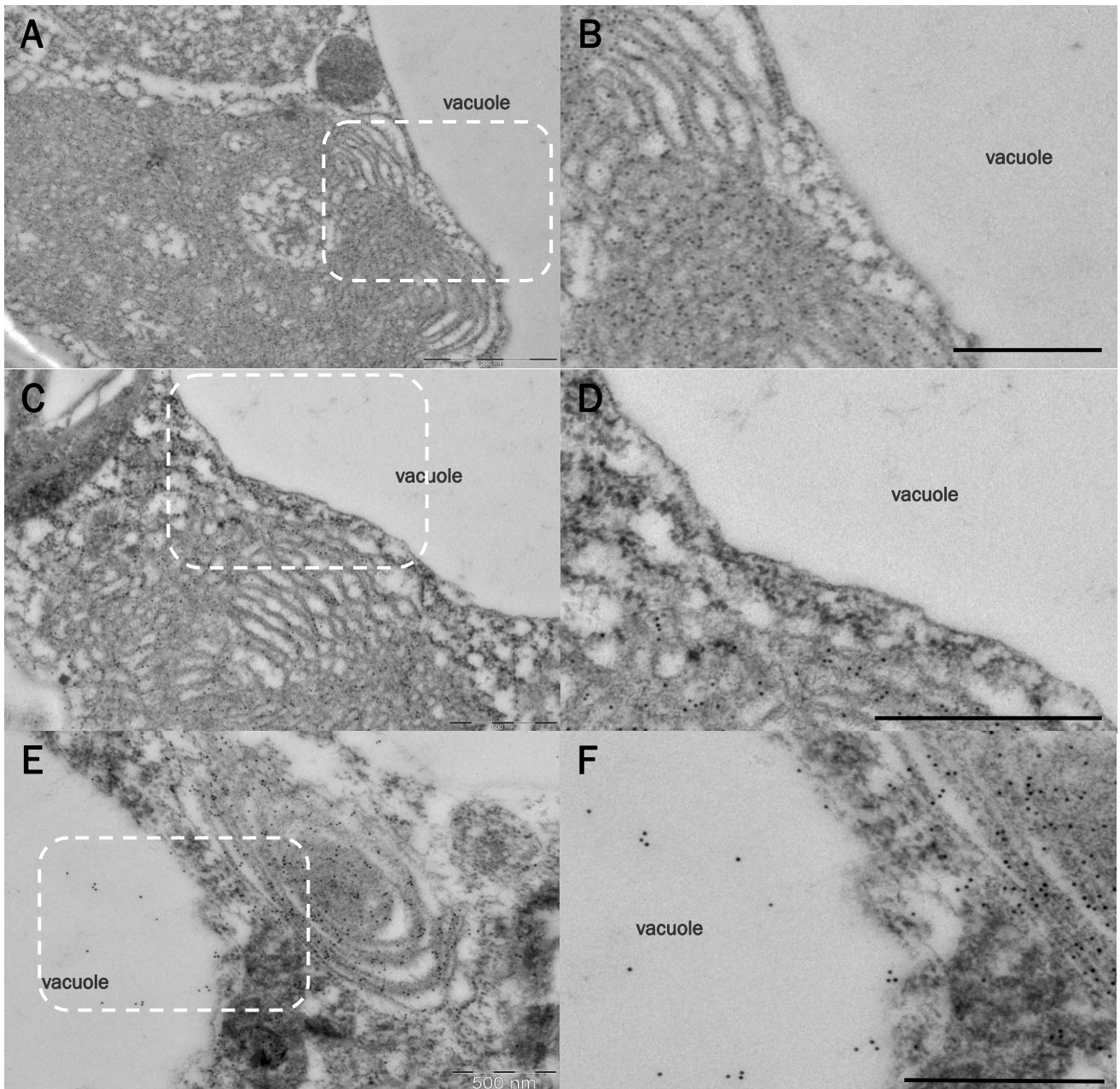


Figura R48. Inmunocitoquímica de células epidérmicas de hoja verdadera sometida a herida. Hojas verdaderas de plantas de *A. thaliana* transgénicas 1S:GFP de la línea 2.15.4, de 10 días, fueron seccionadas de la planta, recolectadas tras 3 h y procesadas por criofijación. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-5450 y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (partícula de oro de 18nm), y observados al ME. **A – D.** Después de 3 h de herida, se observan en el citosol, estructuras remanentes de *dominios ER-HMGR*. El panel D corresponde, respectivamente, a la zona en recuadro de C. Las barras indican: C, 1 μ m; A, B y D, 500 nm.

El vertido de membranas de retículo endoplasmático hacia vacuola, también fue documentado mediante inmunomarcaje con el anticuerpo Ab-26.8 que detecta HMGR endógena. Tal como se observa en la Figura R49 paneles A – D, los *dominios ER-HMGR* con abundante contenido en HMGR permanecen en el citosol en las células epidérmicas de hoja verdadera de planta no estresada. Una hora después de la lesión, se observa la movilización hacia vacuola de membranas que contienen HMGR. Al igual que 1S:GFP, HMGR aparece en vacuola en pequeños fragmentos de retículo endoplasmático (Figura R49 E – H) o en otros mayores en los que se distingue la trama reticular (Figuras R49I y R49J). El doble marcaje con anticuerpos Ab-5450 y Ab-26.8 (Figuras R49K y R49L) puso de manifiesto que HMGR y 1S:GFP colocalizan en las estructuras membranosas movilizadas a vacuola, de nuevo confirmando que derivan de *dominios ER-HMGR*.

Los resultados indican que en condiciones de herida, HMGR y 1S:GFP localizadas en dominios específicos de retículo endoplasmático, son liberadas a vacuola en pequeños

fragmentos de membrana o en grandes vesículas que contienen cantidades notables de este orgánulo (agregados de membranas). Muy probablemente, ello conlleva su degradación en el interior de la vacuola, mientras que estos procesos de movilización y degradación están ausentes en células no sometidas a herida. De modo general se puede concluir que los *dominios ER-HMGR*, definidos por la presencia de HMGR y 1S:GFP, sufren un proceso de vertido a vacuola y degradación en respuesta a herida.



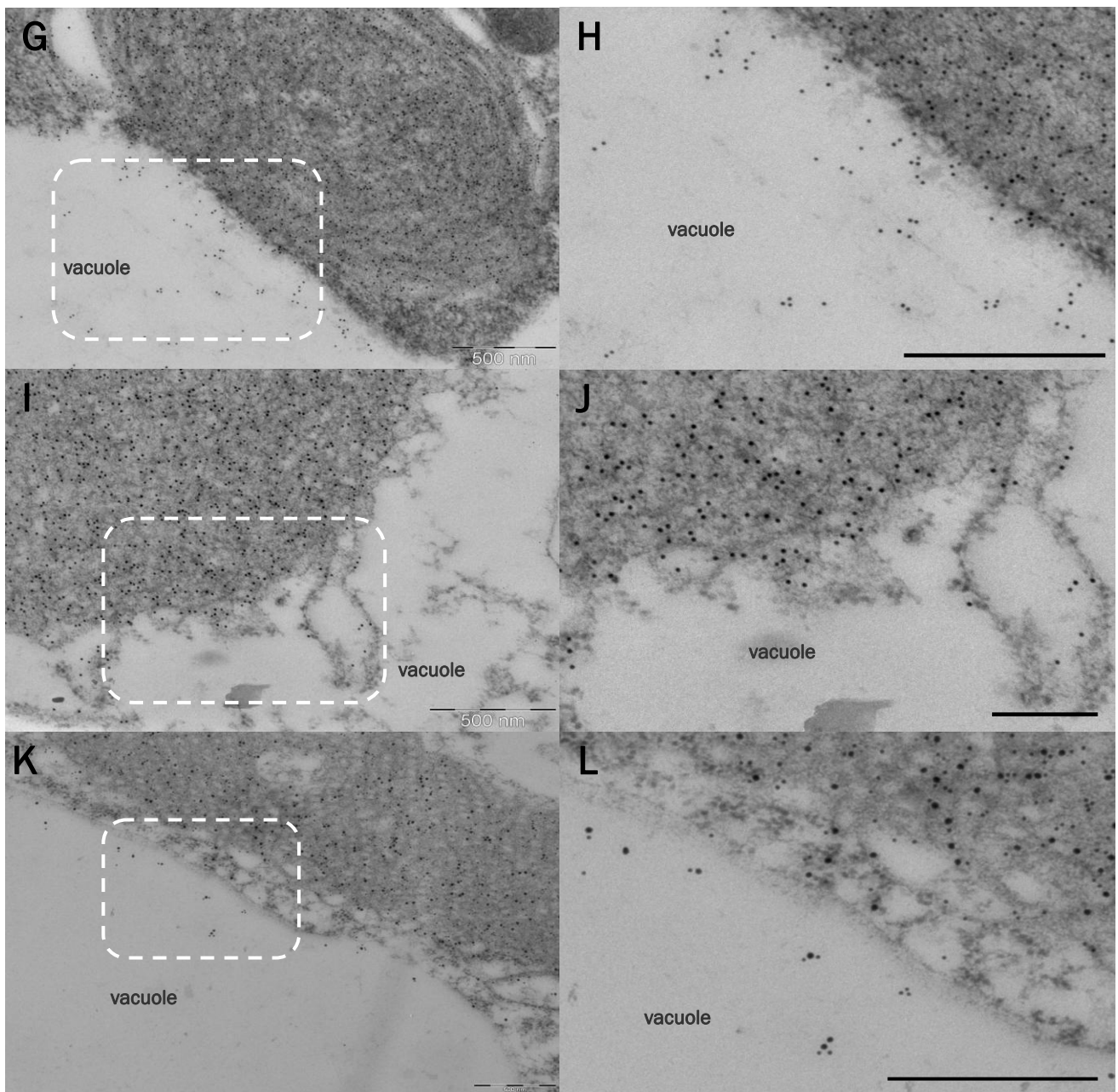


Figura R49. Inmunocitoquímica de células epidérmicas de hoja verdadera sometida a herida. Hojas verdaderas de plantas de *A. thaliana* transgénicas 1S:GFP de la línea 2.15.4, de 10 días, fueron seccionadas de la planta, recolectadas tras 1 h y procesadas por criofijación. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-26.8 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (partícula de oro de 18nm), y observados al ME. **A – D.** Dominios ER-HMGR en células epidérmicas de hojas no sometidas a herida. **E – H.** Desprendimiento hacia la vacuola de pequeños fragmentos de membrana a partir de agregados de RE citosólicos. **I y J.** Desprendimiento hacia vacuola de fragmentos de membrana de mayor tamaño a partir de agregados de RE citosólicos. **K y L.** Cortes ultra-finos inmunomarcados con Ab-26.8 y Ab-5450, y anticuerpos secundarios de conejo (partícula de oro de 12 nm) y cabra (18 nm), respectivamente. HMGR y 1S:GFP colocalizan en el espacio vacuolar, en fragmentos de membrana desprendidos hacia vacuola a partir de agregados citosólicos. Los paneles B, D, F, H, J y L corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C, E, G, I y K. Las barras indican: A, 1 μm; B, C, D, E, F, H, I, K y L 500 nm; J, 200 nm.

4.1.2 Vertido vacuolar de vesículas en célula endodérmica de raíz.

Los resultados anteriores (Sección 4.1.1) reflejan un proceso muy activo de vertido de retículo endoplasmático a vacuola en respuesta a herida en varios tipos celulares de órganos aéreos de *A. thaliana*. Cabía preguntarse si en raíz también se produce este tipo de respuesta. Para analizarlo, se realizó un estudio ultraestructural en plantas silvestres col0 de *A. thaliana*, las raíces analizadas fueron criofijadas 4 h después de su seccionamiento. Desafortunadamente, la alta presión ejercida en la criofijación colapsa o arranca, con suma facilidad, las capas celulares más externas de la raíz y no fue posible estudiar las células epidérmicas. En contraposición, las células endodérmicas quedan intactas y en ellas se pudo observar gran abundancia de vesículas vacuolares que aparecen en respuesta a herida (Figura R50). Sin agresión por herida, la vacuola de las células endodérmicas no presenta ningún contenido vesicular (Figuras R50A y R50B). Cuatro horas después de la agresión, las vacuolas de célula endodérmica presentaron un elevado número de vesículas (Figuras R50C y R50E), algunas de las cuales todavía se encontraban emergiendo del tonoplasto (Figuras R50D, R50F, R50G y R50H). Estas vesículas están delimitadas por una membrana y presentan heterogeneidades en su interior, con algunos corpúsculos más densos (Figuras R50D, R50F y R50H). Su aspecto es distinto al de las vesículas vacuolares observadas en célula parenquimática de cotiledón (Sección 4.1.1) y podrían contener estructuras citosólicas distintas a las de dominios ER-HMGR. Otra peculiaridad de este tipo de vesículas es su fusión o separación en otras más pequeñas, según reflejan frecuentemente las imágenes (Figura R50 F – H). El vertido de estructuras celulares a vacuola en respuesta a herida no se circunscribe a la parte aérea de *A. thaliana*, ni a células epidérmicas o parenquimáticas comentadas en la sección anterior, lo cual sugiere que la endodermis de raíz también contribuye activamente a la defensa de la planta.

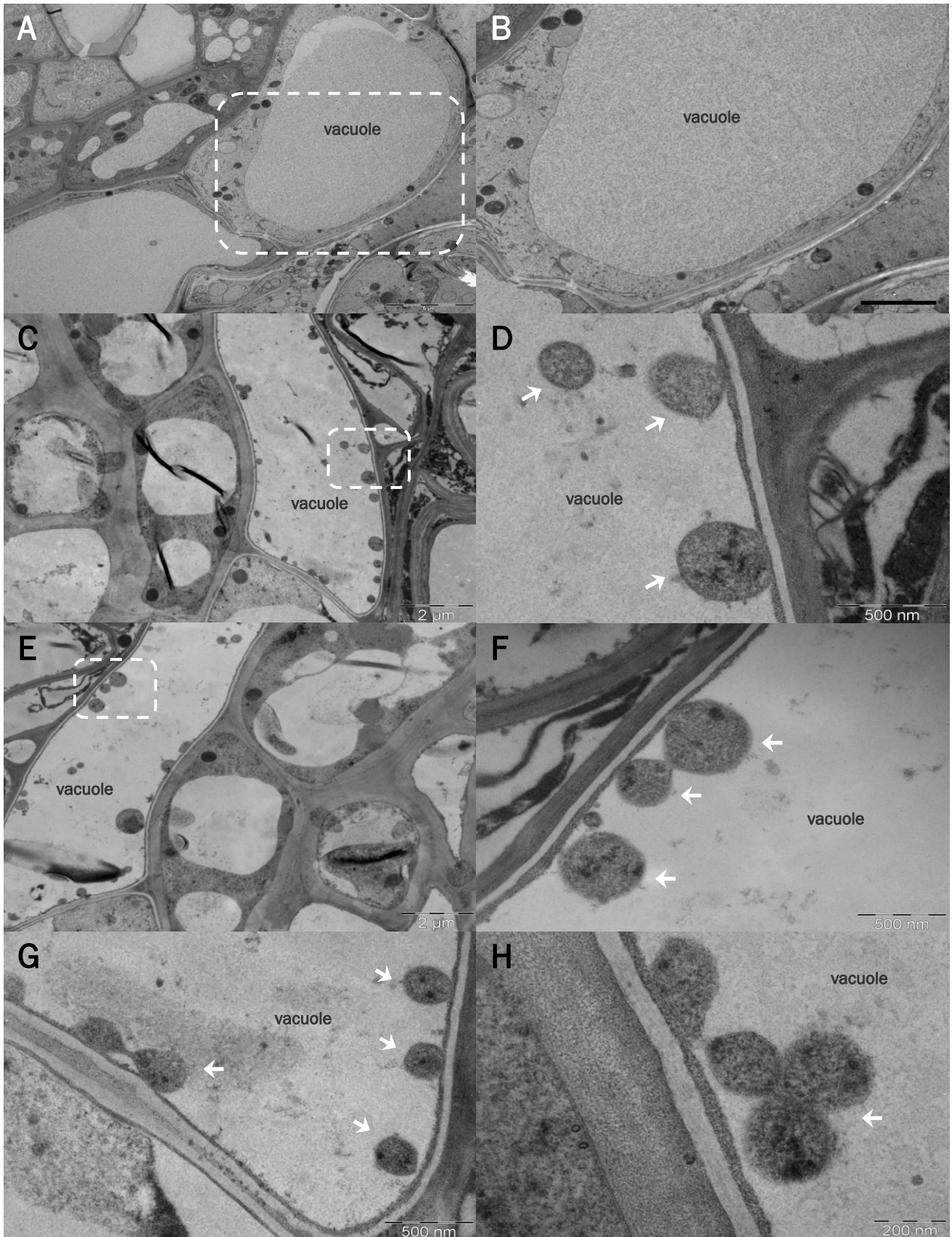


Figura R50. Vertido vesicular a vacuola, en respuesta a herida, en célula endodérmica de raíz. Raíces de plantas col0 de *A. thaliana* de 10 días, fueron seccionadas y mantenidas en su medio original de agar-MS. 4 hrs más tarde, las raíces fueron procesadas por criofijación. Cortes ultra-finos fueron observados al ME. **A y B.** Control, células de raíces no sometidas a herida. **C - H.** Se observa la presencia de estructuras vesiculares de contenido denso en el interior de la vacuola (señaladas por flechas blancas). Los paneles B, D y F corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C y E. Las barras indican: A, 5 μm ; B, C y E, 2 μm ; D, F y G, 500 nm; H, 200 nm.

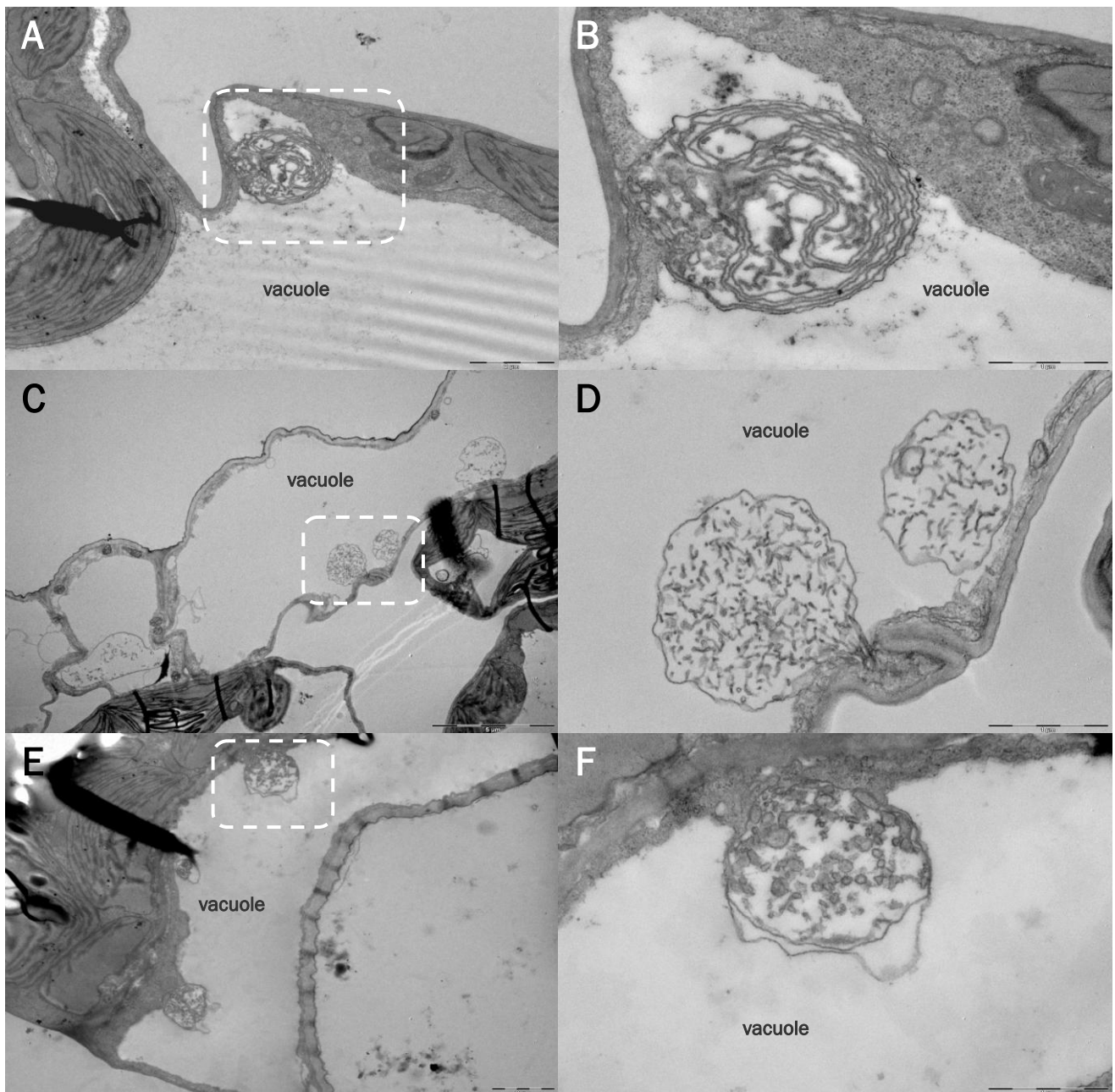
4.2 Estrés químico.

4.2.1 Vertido vacuolar de vesículas en célula epidérmica y parenquimática de cotiledón e hipocótilo.

Los estudios de microscopía electrónica realizados a partir de criofijación en la presente tesis (Secciones 4.1.1 y 4.1.2) pusieron de manifiesto que la vacuola central de las células de *A. thaliana* no sometida a estrés tiene un contenido uniforme, aparentemente libre de estructuras visibles al microscopio electrónico. Dicho espacio vacuolar es poco denso a los electrones y está normalmente exento de vesículas u otras estructuras membranosas. Estas estructuras aparecen en vacuola poco tiempo después de lesionar la planta (menos de una hora en la presente tesis). De manera algo sorprendente, la fijación química con glutaraldehído y para-formaldehído, realizada como técnica preparativa para microscopía electrónica, también desencadenó la aparición de abundantes vesículas vacuolares en célula epidérmica de cotiledón de *A. thaliana*, tanto en plantas silvestres de la variedad col0 (Figura R51) como en plantas transgénicas 1S:GFP (Figura R52). Las vesículas vacuolares inducidas por fijación química derivan del citosol, pues en muchos casos se observan emergiendo del tonoplasto (Figuras R51 A – L y R52G y R52H). En células epidérmicas de col0, algunas vesículas contienen membranas organizadas concéntricamente, que probablemente derivan del retículo endoplasmático, (Figura R51B), mientras que en otras ya sólo aparecen pequeños fragmentos de las mismas (Figuras R51D, R51F y R51H). En la Figura R51J puede observarse una vesícula emergiendo del tonoplasto, en cuyo interior mantiene continuidad con retículo endoplasmático de citosol (Figura R51L) y que contiene además pequeñas vesículas seccionadas transversalmente, que podrían derivar de retículo endoplasmático, o de fragmentos de este orgánulo ya en proceso de degradación.

Un fenómeno similar de respuesta a estrés químico causado por glutaraldehído y para-formaldehído fue observado en plantas transgénicas 1S:GFP (Figura R52 A – H). En este caso, las vesículas vacuolares tienen un mayor acúmulo y densidad de membranas internas (Figuras R52B y R52D), por lo que su procedencia de retículo endoplasmático es más evidente. Probablemente, estas membranas derivan de *dominios ER-HMGR* densamente poblados de retículo endoplasmático liso, (Figuras R19 y R23 de las Secciones 2.2.1 y 2.2.2) aunque en el interior de las vesículas vacuolares adquieren un aspecto más laxo que el que tenían en el citosol. También en el caso de las plantas transgénicas 1S:GFP, aparecen numerosas vesículas con membranas muy fragmentadas (Figuras R52C, R52 F – H), de nuevo reflejando su rápida degradación. Se puede concluir que la exposición de las células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* a glutaraldehído

y para-formaldehído desencadena el vertido a vacuola de vesículas con membranas de retículo endoplasmático. Se trata de una respuesta muy rápida que se anticipa a la fijación de las estructuras, el cual era el propósito inicial de la exposición a los agentes químicos. El mayor contenido de membranas de las vesículas en las plantas transgénicas 1S:GFP indica que dichas membranas proceden de *dominios ER-HMGR*.



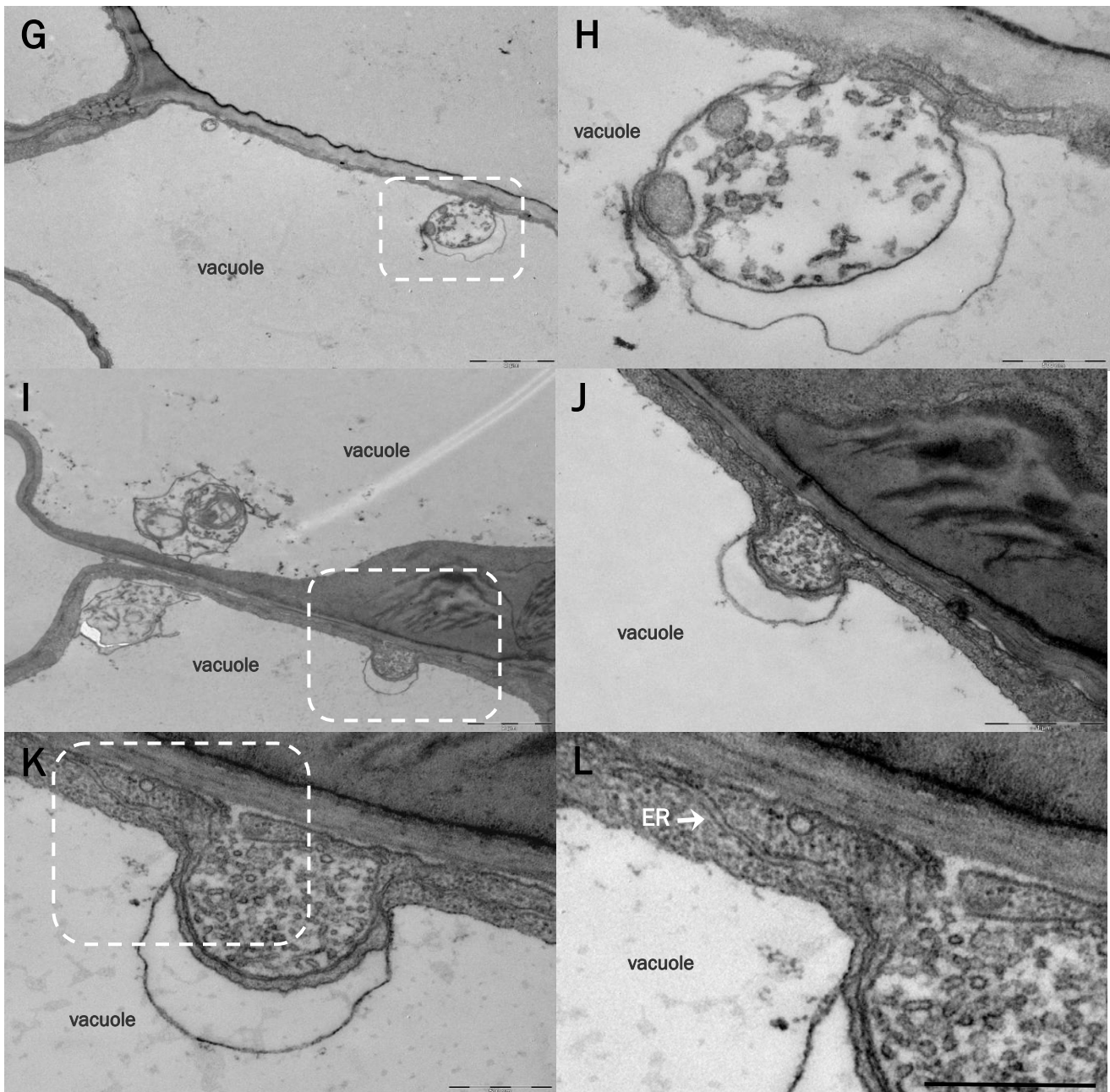


Figura R51. Vertido vesicular a vacuola de célula epidérmica y parenquimática, en cotiledón de *A. thaliana* silvestre, en respuesta a estrés químico. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días, fueron fijados químicamente con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v. Los cortes ultra-finos fueron observados al ME. **A y B.** Vesícula en vacuola central de célula parenquimática, con acúmulo de membranas concéntricas en su interior. **C - H.** Vesículas en vacuola central de célula epidérmica, con membranas fragmentadas. **I - L.** En célula epidérmica, vesícula emergiendo del tonoplasto hacia vacuola, en continuidad con el retículo endoplasmático (ER). Los paneles B, D, F, H, J y L corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C, E, G, I y K. Las barras indican: A, E, G y I, 2 μ m; B, D, F y J, 1 μ m; C, 5 μ m; H, K y L, 500 nm.

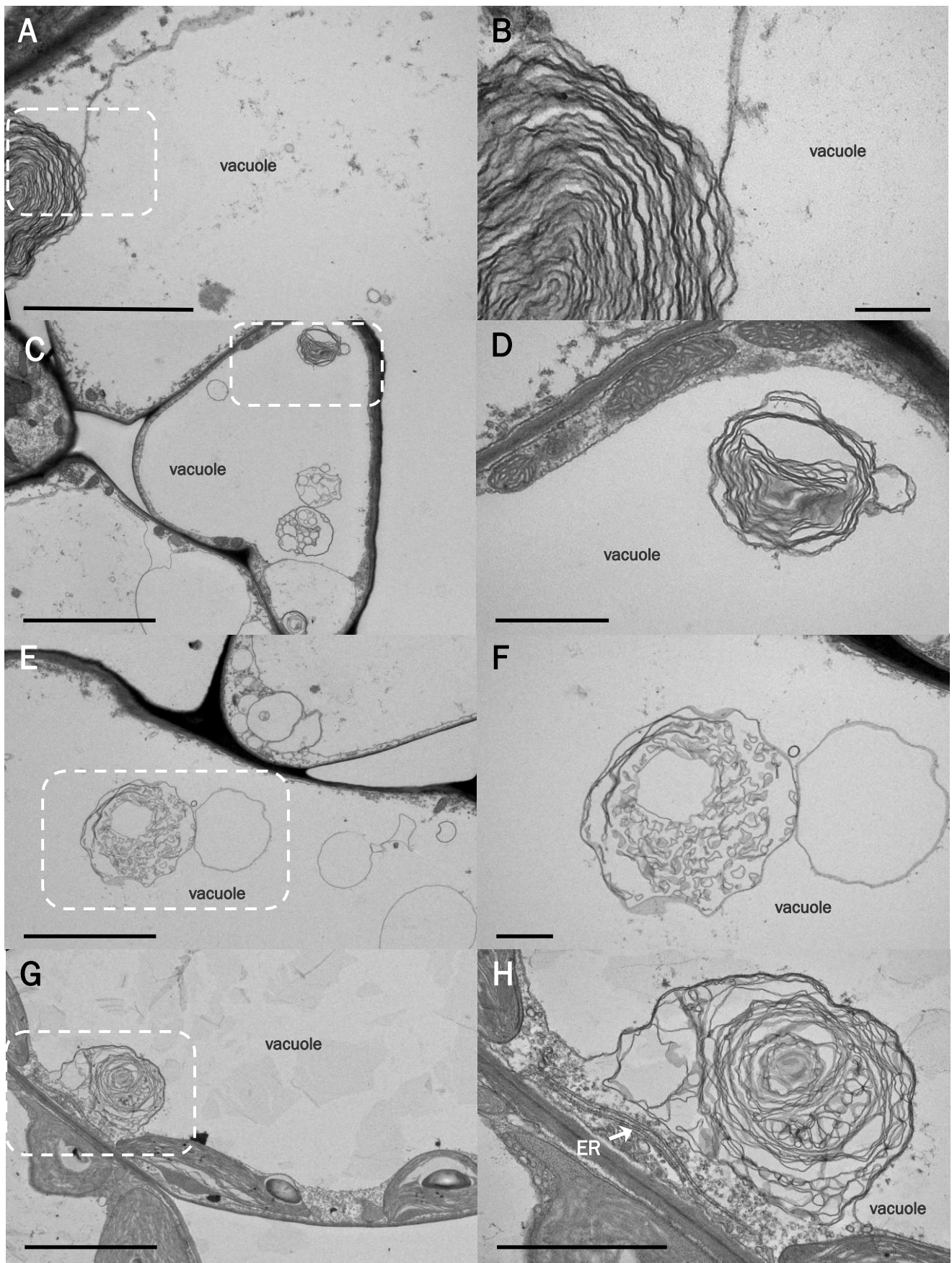
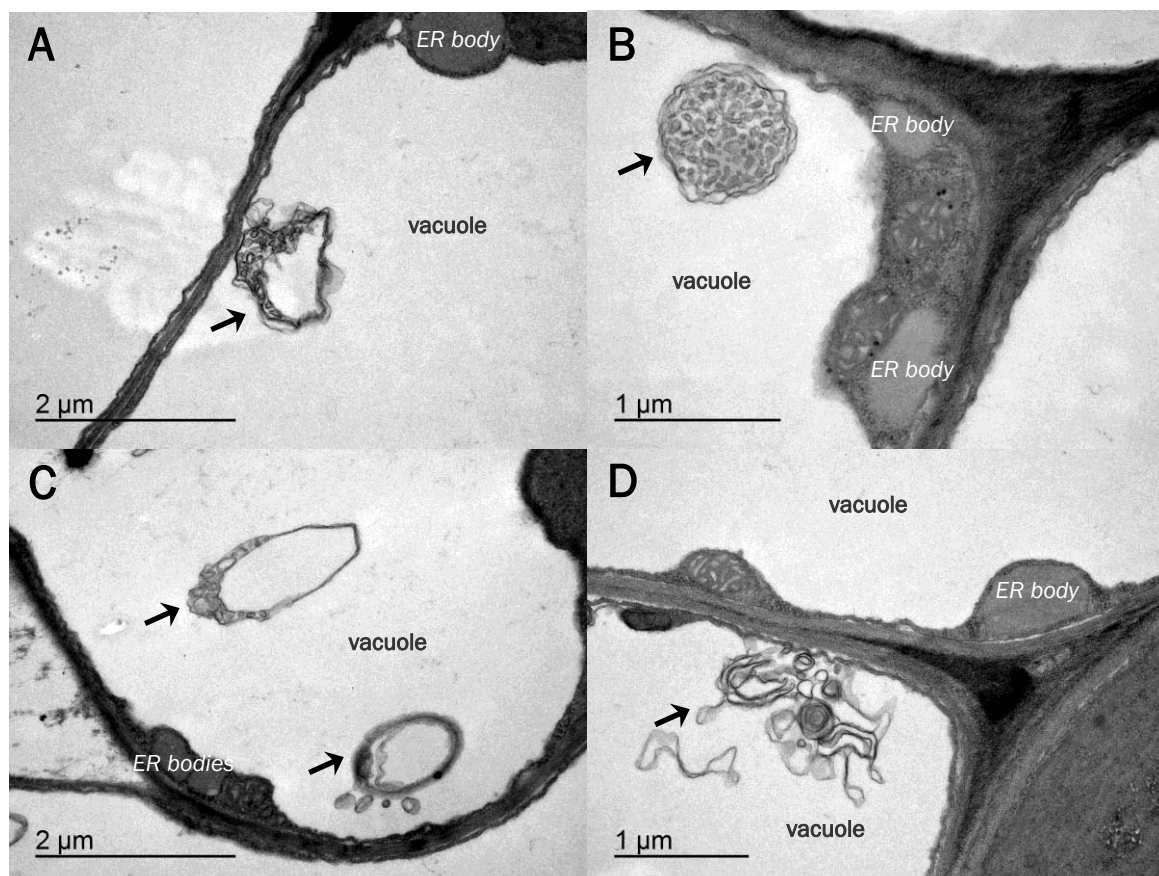


Figura R52. Vertido vesicular a vacuola de célula epidérmica y parenquimática, en cotiledón transgénico 1S:GFP de *A. thaliana*, en respuesta a estrés químico. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* de la línea 1S3.11 de 6 días, fueron fijados químicamente con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v. Los cortes ultra-finos fueron observados al ME. A - D. Vesículas en vacuola central de célula

epidérmica de cotiledón, con elevado acúmulo de membranas en su interior. Las membranas están arrolladas en espiral. **E - F.** Vesículas en vacuola central de célula epidérmica con membranas fragmentadas. **G y H.** En célula parenquimática, vesícula emergiendo del tonoplasto hacia vacuola en proximidad con el retículo endoplasmático (ER). Se observan membranas en el interior con estructura distendida. Los paneles B, D, F y H corresponden, respectivamente, a las zonas en recuadro de A, C, E y G. Las barras indican: A y H, 2 μm ; B, 200 nm; C, E y G, 5 μm ; D y F, 1 μm .

Frecuentemente se observó que las vesículas de membranas emergen del tonoplasto en zonas del citosol próximas a *ER bodies* (Figura R53 A - D). También se pudo evidenciar que las vesículas con contenido de retículo endoplasmático liso se generan y vierten a vacuola en el borde de *ER bodies* (Figuras R53E y R53F) o directamente a partir de este orgánulo (Figuras R53G y R53H). Existe por tanto, una relación muy íntima entre vesículas membranosas y *ER bodies* en lo que respecta a su vertido a vacuola. Su derivación al espacio vacuolar se produce en respuesta a estrés químico y hay coincidencia física en los lugares de salida hacia dicho orgánulo.



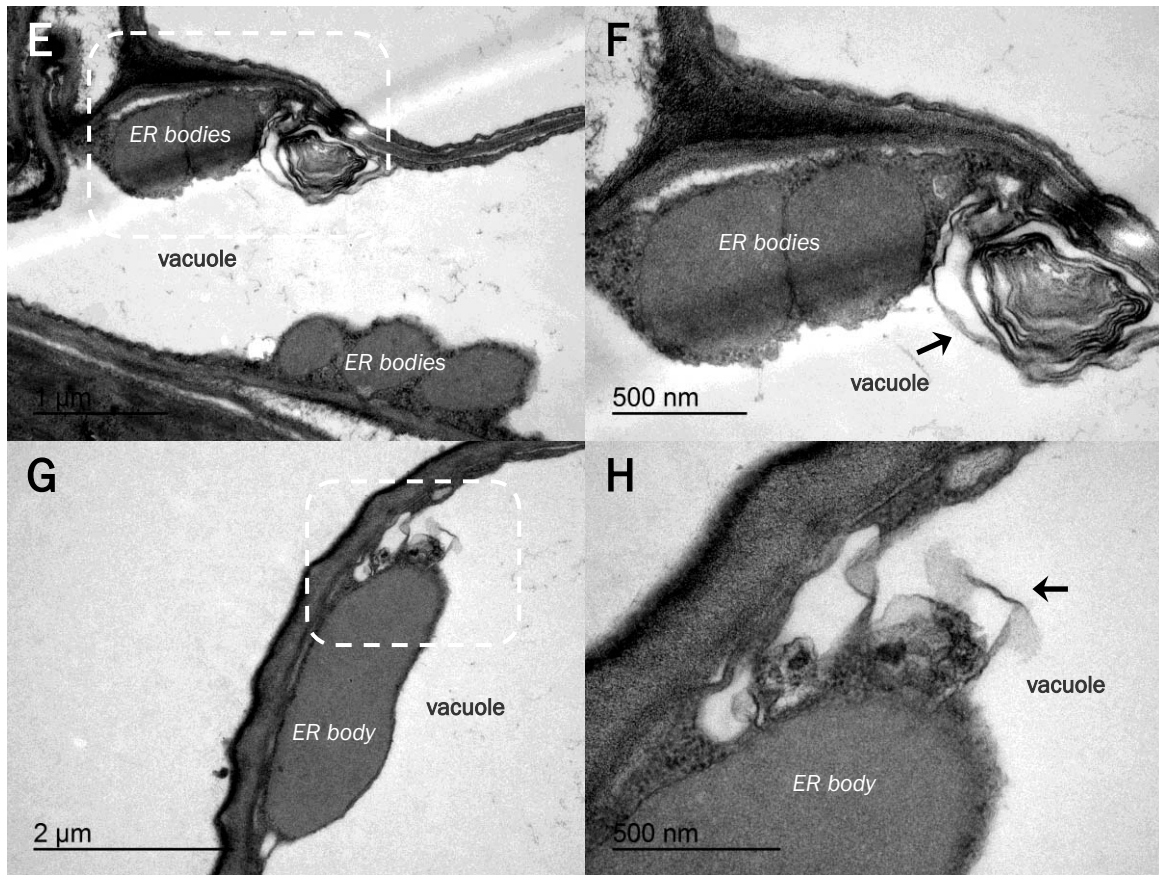
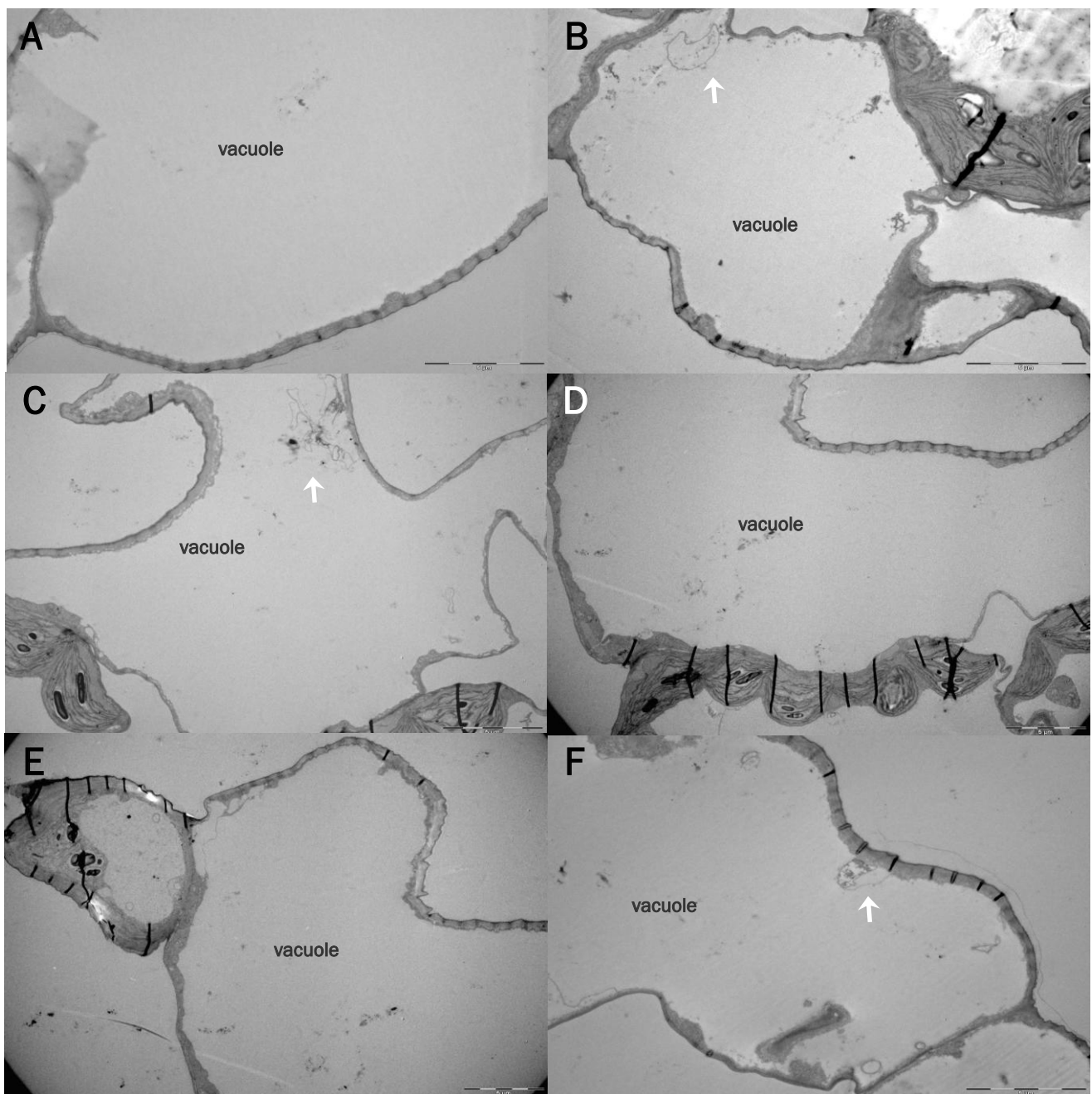


Figura R53. El vertido vesicular a vacuola de célula epidérmica de raíz sometida a estrés químico ocurre en regiones próximas a *ER bodies*. Raíces de plantas de 6 días de *A. thaliana* transgénicas 1S:GFP de la línea 1S3.11 fueron fijados químicamente con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v. Los cortes ultra-finos fueron observados al ME. **A – D.** Vesículas con contenido de membranas de retículo endoplasmático, que emergen del tonoplasto hacia vacuola, en regiones próximas a *ER bodies*. **E y F.** Membranas de retículo endoplasmático liso vertidas a vacuola en el borde de *ER bodies*. **G y H.** Membranas que son vertidas a vacuola directamente a partir de *ER bodies*. Las vesículas y membranas de retículo endoplasmático liso derivadas hacia vacuola, están señaladas por flechas. Las barras indican: A, C y G, 2 μ m; B, D y E, 1 μ m; F y H, 500 nm.

4.2.2 Papel del gen *HMG1* de *A. thaliana*.

Los resultados de la Sección 4.2.1 indican que las vesículas vacuolares inducidas por estrés químico contienen membranas de retículo endoplasmático liso y, concretamente, derivan de *dominios ER-HMGR*. Dado que la expresión de 1S:GFP (dominio de membrana de HMGR) induce la proliferación de retículo endoplasmático y la formación de estos dominios en células de *A. thaliana* (Sección 2.2.2), cabía preguntarse si HMGR podía tener un papel en el vertido de vesículas a vacuola central, en respuesta a estrés químico. Para examinar esta hipótesis, se estudió el fenómeno de vertido vesicular a vacuola en el mutante *hmg1-4* de *A. thaliana* que es *knock-out* para *HMG1* y no expresa HMGR1S y HMGR1L, las cuales constituyen la mayor parte (90 – 95 %) del contenido de HMGR en la planta (Sección 1.2). Cotiledones de plantas homocigotas *hmg1-4* de 6 días

fueron sometidos a fijación química con glutaraldehído y para-formaldehído y observados al microscopio electrónico (Figura R54). El examen de células epidérmicas de cotiledón de este mutante desveló que la mayor parte de ellas carecían de vesículas en su vacuola central (Figuras R54A, R54D, R54E, R54H), a pesar de haber sido sometidas a fijación química, y que las que presentaban vesículas tenían sólo una o dos de dichas estructuras (Figuras R54B, R54C, R54F, R54G). Esto sugería que la HMGR1 de *A. thaliana* es requerida para el vertido de vesículas a vacuola central, en respuesta a estrés químico.



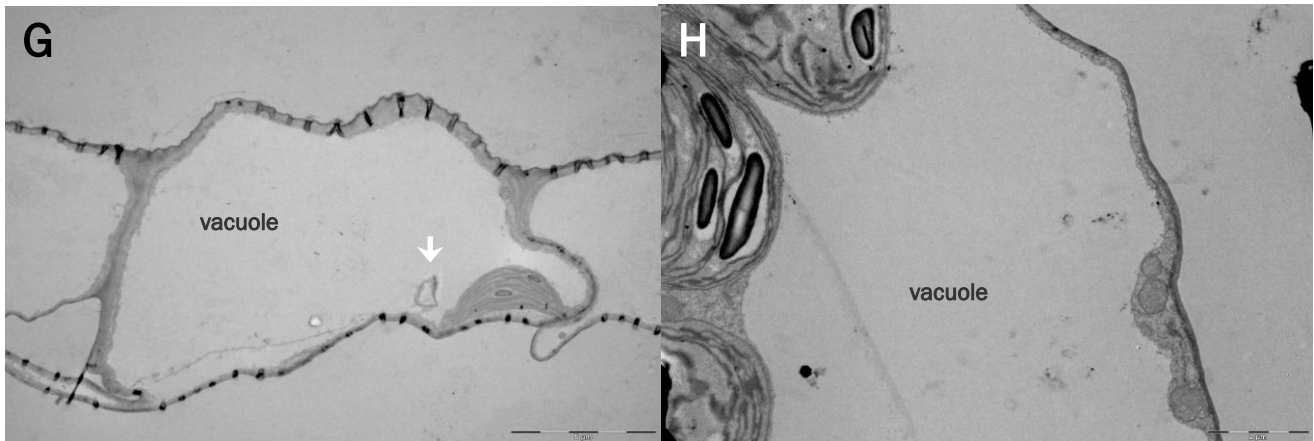


Figura R54. Ultraestructura de células epidérmicas de cotiledón sometidas a estrés químico. Cotiledones de plantas de *A. thaliana hmg1-4* de 6 días, fueron fijados químicamente. Los cortes ultra-finos fueron observados al ME. **B, C, F y G.** Vesículas pequeñas en vacuola con poco o ningún contenido de membranas (señalado por flechas blancas). **A, D, E y H.** Células epidérmicas con ausencia total de vesículas en vacuola. Las barras indican: A - G, 5 μ m; H, 2 μ m.

Para evaluar la participación del gen *HMG1* en el proceso de vertido vesicular con datos más objetivos, se cuantificó el número de vesículas en vacuola, comparando células epidérmicas de cotiledón de plantas silvestres *col0* y de plantas mutantes homocigotas *hmg1-4*, tras someter ambas a fijación química con glutaraldehído y para-formaldehído. Las observaciones al microscopio electrónico fueron realizadas siempre a 6000 aumentos, en todas las rejillas y campos de observación. Las hileras de células epidérmicas fueron fácilmente reconocidas por la presencia de cutícula engrosada en uno de sus lados (Figuras R55A y R55B). Las vesículas vacuolares incluidas en la cuantificación, fueron aquellas que tuvieran un diámetro de 1 μ m o superior, con membranas interiores o fragmentos de las mismas (Figura R55A), descartando así, cualquier otra vesícula o membrana de menor tamaño o sin contenido (Figura R55B). De esta forma, se determinó el número de vesículas vacuolares en más de 200 células epidérmicas y en más de 260 campos observados en ambas líneas (Tabla R5). El análisis muestra una media de 1,82 vesículas vacuolares por célula epidérmica de cotiledón en la variedad silvestre *col0* y 0,37 vesículas por célula en el mutante *hmg1-4* (Tabla R6). Los datos siguen una distribución de Poisson y, según el teorema de Wilks, el estadístico obtenido de los mismos se asimila a una distribución ji-cuadrado. Este análisis permitió obtener un valor estadístico de 225,02 que es mucho mayor que el valor consultado en la tabla ji-cuadrado de 10.828, con 1 grado de libertad y una probabilidad 0,001. Esto confirma que la diferencia en el número de vesículas vacuolares entre las líneas *hmg1-4* y silvestre, es estadísticamente significativa y permite concluir que el vertido de vesículas a vacuola inducido por estrés químico con glutaraldehído y para-formaldehído, se halla severamente comprometido en el mutante *hmg1-4*. El gen *HMG1* es por tanto necesario

para el proceso de vertido vacuolar, lo cual de nuevo confirma que las vesículas vacuolares observadas derivan de *dominios ER-HMGR*.

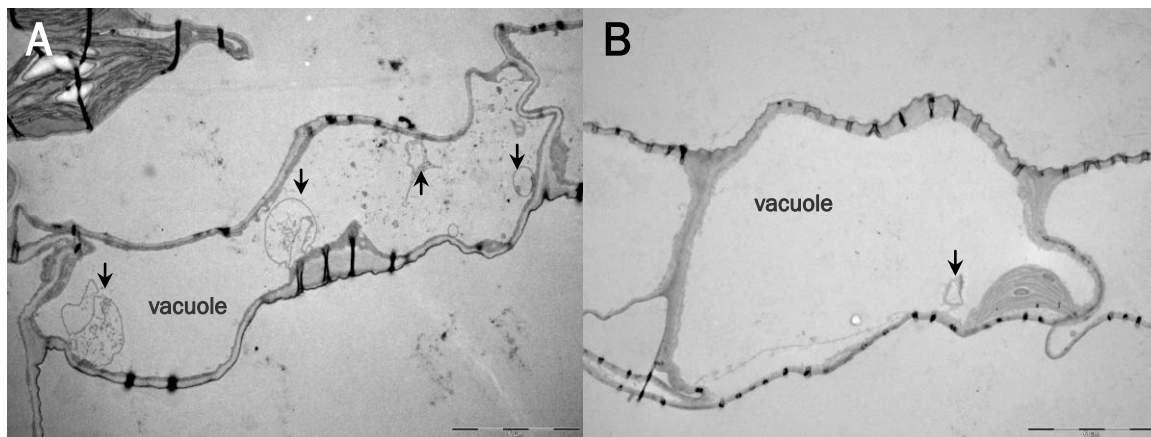


Figura R55. Establecimiento de las condiciones de observación para cuantificación de vesículas vacuolares. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* de 6 días fueron fijados químicamente con 1,5 % v/v glutaraldehído y 1,5 % v/v para-formaldehído y observados al ME, a 6000 aumentos. Las hileras de células epidérmicas fueron identificadas por la cutícula engrosada en uno de sus bordes. Para la cuantificación, se consideraron sólo aquellas vesículas con un diámetro igual o superior a 1 μm , que presentaban contenido de membranas. **A.** Células epidérmicas de cotiledón de la variedad silvestre col0; las flechas indican algunas vesículas contabilizadas. **B.** Células epidérmicas de cotiledón del mutante homocigoto *hmg1-4*; La flecha indica una vesícula no considerada en la cuantificación, debido a su reducido tamaño y ausencia de contenido membranoso. Las barras indican: 5 μm .

Tabla R5. Cuantificación de células epidérmicas con vesículas membranosas en vacuola. Se compara el mutante homocigoto *hmg1-4* con su estirpe silvestre col0. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* de 6 días fueron fijados con 1,5 % v/v glutaraldehído y 1,5 % v/v para-formaldehído y observados al ME a 6000 aumentos.

Nº vesículas en vacuola	Nº de células		
	wt	<i>hmg1-4</i>	Total
0	51	145	196
1	62	54	116
2	48	9	57
3	39	2	41
4	14	0	14
5	7	0	7
6	4	0	4
7	2	0	2
10	1	0	1
Total	228	210	438

Tabla R6. Cuantificación de vesículas con contenido de membranas en vacuola de célula epidérmica de cotiledón de *A. thaliana*. Los cotiledones fueron fijados con 1,5 % v/v glutaraldehído y 1,5 % v/v paraformaldehído y observados al ME, a 6000 aumentos. Se compara el mutante homocigoto *hmg1-4* con su estirpe silvestre col0.

Nº de vesículas en vacuola			
	wt	<i>hmg1-4</i>	Total
Total	414	78	492
Promedio	1,82	0,37	1,12

5. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE INTERACTORES DE 1S:GFP.

Los resultados presentados (Secciones 2 y 4) indican que el dominio de membrana de HMGR1S está implicado en la proliferación y morfogénesis del retículo endoplasmático y en la organización de los *dominios ER-HMGR*, de los que derivan las estructuras de retículo endoplasmático liso que son vertidas a vacuola en respuesta a estrés. Por otra parte, con frecuencia los *ER bodies* se visualizan próximos a *dominios ER-HMGR* (Sección 4.2.1), pudiendo existir una relación entre ambas estructuras, que tienen un mismo destino subcelular (vertido a vacuola) en respuesta a estrés. Para examinar estos aspectos desde un punto de vista molecular, se diseñó una estrategia de purificación y análisis proteómico de los posibles interactores de 1S:GFP, que contiene el dominio de membrana de HMGR1S. Concretamente, se partió de extractos de la línea transgénica 2.15.4 de *A. thaliana* que expresa altos niveles de 1S:GFP (Sección 1.1). La quimera fue purificada de los extractos mediante dos cromatografías de afinidad consecutivas.

La primera cromatografía se basó en la interacción específica entre la proteína AtB'' α y la región N-terminal de HMGR1S presente en 1S:GFP. Por tanto, se realizó sobreexpresión en *E. coli* de la proteína quimérica GST-AtB'' α , y su extracción y purificación utilizando resina GSH-Sepharose4B que contiene glutatión (GSH) como interactor específico. La proteína quimérica GST-AtB'' α fue eluída de esta resina con glutatión y, tras diálisis, fue añadida al extracto de *A. thaliana* 2.15.4 para que interaccionara específicamente con 1S:GFP. El complejo de unión formado, GST-AtB'' α - 1S:GFP, fue retenido en resina GSH-Sepharose4B y eluído con un tampón que contenía glutatión. Para confirmar la presencia de 1S:GFP en la fracción eluída, ésta fue analizada mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes, *western blot* e inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-GFP.

Para afrontar la segunda cromatografía, una suspensión de micro-esferas paramagnéticas con anticuerpos anti-GFP fue añadida al eluído de la primera. La 1S:GFP unida a estas esferas paramagnéticas fue retenida en la columna correspondiente mediante atracción con un soporte generador de un elevado campo magnético. La fracción retenida en esta segunda columna, fue liberada con tampón de electroforesis desnaturizante suplementado con EDTA precalentado a 95 °C, y analizada por electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie (véase Materiales y métodos, Sección 8). En la Figura R56A se muestra el patrón electroforético correspondiente, en el que se distinguen 9 bandas con unas masas moleculares aparentes de 90, 65, 48, 45, 40, 33, 30, 26 y 23 kDa. La muestra también fue analizada mediante *western blot* e inmunodetección con anticuerpos

policlonales anti-GFP. En el patrón correspondiente (Figura R56B) se observaron dos bandas electroforéticas, una con una masa molecular aparente de ~48 kDa que corresponde a 1S:GFP (masa real de 47.464 Da, banda 3) y otra minoritaria de menor masa, posiblemente originada por degradación parcial.

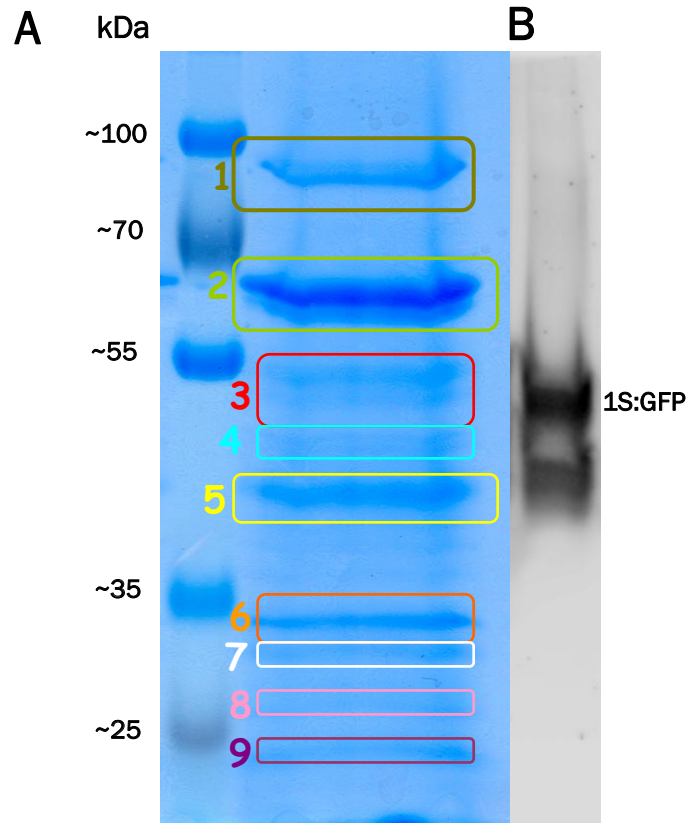


Figura R56. Análisis electroforético de la fracción purificada de 1S:GFP. **A.** Gel de poliacrilamida al 8,5 % (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. **B.** Inmunodetección de 1S:GFP. Tras la transferencia por *western-blot* la membrana de PVDF fue incubada con el anticuerpo policlonal anti-GFP dilución 1:2000 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano dilución 1:5000. La señal del anticuerpo fue detectada por quimioluminiscencia con reactivos ECL+Plus con el equipo *LAS 4000 luminescent image analyser*, durante un tiempo de exposición de 10 min.

Para identificar las proteínas presentes en las nueve bandas electroforéticas, éstas fueron analizadas por espectrometría de masas. En la Tabla R7 se muestra un resumen de los resultados más significativos. Para cada proteína se indica las bandas electroforéticas donde se detectó, la banda de máxima puntuación (*score*), el valor de la misma y el número de péptidos de la proteína identificada en dicha banda. Es notorio que algunas de la proteínas (β -Glucosidasa-21, β -Glucosidasa-23, Dinamina 2A y Dinamina 2B) se detectan en todas o casi todas las bandas, otras (BGL18, Mirosinasa 2, Mirosinasa 4, *Mirosinase binding protein* de At3g16470, Dinamina 1A, Dinamina 1C) en bastantes de ellas (de 3 a 6 bandas) y otras sólo en una o dos bandas, pero pertenecen a las mismas familias proteicas (β -Glucosidasas, β -fructofuranosidasas, *myrosinase binding proteins*, dinaminas y reticulones), todo lo cual refuerza la autenticidad de su asociación directa o indirecta con 1S:GFP.

Tabla R7. Proteoma de interactores de 1S:GFP. La quimera 1S:GFP fue purificada a partir de plantas transgénicas de la línea 2.15.4 de *A. thaliana*, mediante dos cromatografías de afinidad consecutivas, utilizando AtB^α y anticuerpo anti-GFP como sondas específicas de 1S:GFP. Las proteínas obtenidas tras la purificación (interactores de 1S:GFP) fueron resueltas por SDS-PAGE (Figura R54) en 9 bandas electroforéticas y analizadas por espectrometría de masas. El análisis reveló la co-purificación de 1S:GFP con componentes de *ER bodies* o proteínas implicadas en morfogénesis del RE. ***a** : Bandas electroforéticas donde apareció la proteína. ***** : Banda electroforética con la máxima puntuación (score); ***b** : Puntuación correspondiente; ***c** : Número de péptidos de la proteína detectados dicha banda.

Protein	Accession	Electrophoretic Bands ^{*a}	Maximum Score ^{*b}	Number of Peptides ^{*c}
Present in ER bodies				
β-D-glucopyranosyl abscisate β-glucosidase (BGL18)	BGL18_ARATH	1, 2*, 4, 6	980	22
β-glucosidase 20	BGL20_ARATH	2*	96	3
β-glucosidase 21	BGL21_ARATH	1, 2*, 3-9	1783	36
β-glucosidase 22	BGL22_ARATH	2*	1854	36
β-glucosidase 23 (PYK10)	BGL23_ARATH	1, 2*, 3-9	1788	38
β-glucosidase 24	BGL24_ARATH	2*	196	7
Probable inactive β-glucosidase 25	BGL25_ARATH	3*	59	1
Myrosinase 4	BGL34_ARATH	1, 2*, 4	414	9
Myrosinase 2	BGL37_ARATH	2*-4, 6	1018	22
β-glucosidase 46	BGL46_ARATH	2*	38	1
β-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1	INV1_ARATH	1*, 5	39	1
Acid β-fructofuranosidase 3, vacuolar (AtFruct3)	INVA3_ARATH	3*	132	3
Myrosinase-binding protein-like At1g52030	MB11_ARATH	1, 3*	140	3
Myrosinase-binding protein-like At1g52040	MB12_ARATH	3*	364	9
Myrosinase-binding protein-like At2g25980	MB21_ARATH	2*	195	5
Myrosinase-binding protein-like At2g39310	MB22_ARATH	7*	69	2
Myrosinase-binding protein-like At3g16470	MB31_ARATH	3, 4*, 6-8	847	15
Myrosinase-binding protein-like At3g16440	MB32_ARATH	6*	135	4
Cysteine proteinase RD21a	RD21A_ARATH	5*	73	2
Involved in ER morphogenesis				
Dynamamin-like protein ARC5	ARC5_ARATH	1*	88	3
Dynamamin-related protein 1A	DRP1A_ARATH	1, 2*, 4-6	2761	56
Dynamamin-related protein 1B	DRP1B_ARATH	2*	447	11
Dynamamin-related protein 1C	DRP1C_ARATH	1-5*, 8	1088	26
Dynamamin-related protein 1E	DRP1E_ARATH	2, 3*	785	18
Dynamamin-2A	DRP2A_ARATH	1, 2*, 3-5, 7-9	1744	33
Dynamamin-2B	DRP2B_ARATH	1, 2*, 3-9	2072	38
Probable exocyst complex component 4	EXOC4_ARATH	1*	116	3
Exocyst complex component 5	EXOC5_ARATH	1*	61	2
Reticulon-like protein B1	RTNLA_ARATH	7*	57	2
Reticulon-like protein B3	RTNLC_ARATH	8*	52	2
Reticulon-like protein B5	RTNLE_ARATH	8*	33	1

Entre las proteínas co-purificadas con 1S:GFP se encontraron diversas enzimas hidrolíticas (Tabla R7). Se puede destacar las del tipo β -glucosidasa, entre ellas PYK10, también denominada BGL23, que se acumula en *ER bodies* de cotiledón y raíz de plántulas de *A. thaliana* y es la proteína mayoritaria de este orgánulo (Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). También se identificó BGL18 que es inducida en respuesta a herida y al tratamiento con MeJA, y acumulada en *ER bodies* de cotiledón (Stotz *et al.*, 2000; Ogasawara *et al.*, 2009), BGLU21 y BGLU22 que se acumulan en *ER bodies* y cuya expresión se ve aumentada en raíz y hoja verdadera tratada con MeJA, las proteínas BGLU19, BGLU20 y BGLU24 que tienen un péptido N-terminal de tránsito a retículo endoplasmático y una señal C-terminal de retención en el lumen de dicho orgánulo.

Otras enzimas del proteoma fueron las mirosinasas BGL34 y BGL37 (Tabla R7), que son β -tioglucosidasas ya que hidrolizan glucosinolatos. Estas enzimas son características de la familia *Brassicaceae*, y están implicadas en la defensa contra insectos (Burmeister *et al.*, 1997). A diferencia de las β -glucosidasas, estas mirosinasas no tienen señal de retención a retículo endoplasmático, y no han sido encontradas en el proteoma de los *ER bodies* (Yamada *et al.*, 2011). Las β -glucosidasas y β -tioglucosidasas mencionadas participan en la defensa de *A. thaliana* contra los patógenos produciendo compuestos tóxicos en vacuola (Hara-Nishimura and Matsushima, 2003, Yamada *et al.*, 2011). Por otro lado, se encontraron también, hasta 6 variantes de proteínas de unión a mirosinasa, MB11, MB12, MB21, MB22, MB31 y MB32 (Tabla R7).

Se identificó la proteína RD21 (Tabla R7) que es una cisteín-proteasa inducida por estrés y desecación, y miembro de la familia de la papaína. Estudios previos demostraron que los *ER bodies* actúan como mediadores en el transporte de RD21 hacia la vacuola (Hayashi *et al.*, 2001).

Otra enzima identificada en el proteoma de interactores de 1S:GFP es AtFruct3 (Tabla R7), que es una invertasa. En *A. thaliana* hay cuatro genes que codifican para este tipo de enzima. AtFruc3 y la AtFruc4 fueron reportadas como enzimas vacuolares que se expresan en cotiledones y hojas de plantas muy jóvenes, y no así en hojas maduras de plantas adultas (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998). AtFruc4 está presente en *ER-bodies* (Rojo *et al.*, 2003), pero todavía no hay evidencia del destino subcelular primario de AtFruc3, que podría ser también el *ER body*, dado que su destino final es la vacuola. Por tanto, las proteínas co-purificadas con 1S:GFP son β -glucosidasas, β -tioglucosidasas, proteasas o invertasas, que desempeñan distintas funciones en la vacuola relacionadas con la defensa celular en respuesta a estrés y la senescencia de la planta. Además, la mayoría de estas proteínas se acumulan transitoriamente en *ER bodies*.

En el proteoma de interactores de 1S:GFP también se encontraron proteínas implicadas en la morfogénesis del retículo endoplasmático, como diversas variantes de dinaminas y reticulones, las cuales han sido apenas estudiadas en plantas. En el genoma de *A. thaliana* se encuentran codificadas, al menos 19 variantes de reticulón, que tienen gran variabilidad en su dominio N-terminal, el cual estaría involucrado en distintas interacciones moleculares (Tolley *et al.*, 2008). Aunque la información acerca del rol de los reticulones en plantas es escasa, se conoce que en mamíferos los reticulones participan en la formación de túbulos de retículo endoplasmático cortical, induciendo su curvatura por medio de su doble segmento transmembrana (Barlowe, 2009). Las dinaminas, son proteínas integrales de membrana con actividad GTPasa que median la fusión y fisión de membranas de retículo endoplasmático, para formar su característica estructura ramificada (Barlowe, 2009). Las dinaminas no actúan de modo independiente, sino que sus interactores también deben estar involucrados en la asociación y mantenimiento de la estructura del retículo endoplasmático en la célula eucariota (Chen *et al.*, 2011).

En su conjunto, los resultados del análisis proteómico parecen consistentes. La fracción examinada fue obtenida mediante dos cromatografías de afinidad realizadas secuencialmente, en las que 1S:GFP fue aislada por su interacción con AtB¹α (une la región N-terminal de la quimera) y con anticuerpos anti-GFP (reconocen su dominio C-terminal). La reiteración de las familias proteicas identificadas sugiere que 1S:GFP (dominio de membrana de HMGR1S) se halla próxima o interacciona con componentes de *ER bodies* y con proteínas involucradas en la morfogénesis y estructuración del retículo endoplasmático.

Discusión

1. DISECCIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA HMGR DE *A. thaliana*.

1.1 Dominios funcionales de HMGR.

El conjunto de resultados de la presente tesis confirma que la HMGR está dividida en dos dominios funcionales: el dominio catalítico y el dominio N-terminal. Este último determina la localización subcelular de la enzima y está formado por la región N-terminal citosólica, que contiene el motivo conservado de argininas, dos segmentos transmembrana (H1 y H2) necesarios para la inserción de HMGR en la membrana del RE y un pequeño segmento que se encuentra en el lumen (Campos and Boronat, 1994). La división de la HMGR en dos dominios funcionales también ha sido propuesta en HMGR de mamíferos y de levaduras, donde el dominio N-terminal, que incluye siete u ocho segmentos transmembrana, está implicado en la localización subcelular y regulación de la enzima (Olender and Simoni, 1992; Hampton *et al.*, 1996; Hampton, 2002).

La implicación del dominio de membrana de HMGR en localización subcelular ha sido demostrada mediante fusión a GFP de las dos isoformas de HMGR de levadura. Se ha determinado que éstas se localizan en diferentes subdominios del RE (Hampton *et al.*, 1996; Koning *et al.*, 1996). En el caso de *A. thaliana*, la fusión traduccional del dominio de membrana de HMGR1S y HMGR2 a GFP, permitió determinar que éste es suficiente para dirigir las proteínas quiméricas a estructuras vesiculares de entre 0,5 y 2 μm y de forma minoritaria a la trama reticular (Leivar, 2003).

Tal como se ha mencionado en la introducción, la isoforma HMGR1L es idéntica a HMGR1S, pero presenta una región adicional de 50 aminoácidos en el extremo N-terminal (región 1-Lextra) (véase Introducción, Sección 1.2.1). Estudios anteriores indican que, a diferencia de la localización vesicular preferencial de la quimera 1S:GFP, 1L:GFP se localiza exclusivamente en la trama de RE, tanto en células epidérmicas de hoja de *A. thaliana* como en células de la línea T87 (Leivar, 2003). Estas diferencias son consistentes con los experimentos de localización subcelular de la quimera 1L:GFP realizados en la presente tesis mediante expresión transitoria en hoja de *N. benthamiana* (Figura R17). En estos experimentos, se observa que la quimera 1L:GFP se localiza en la trama de RE, sin la formación de agregados ni vesículas. La quimera 1S:GFP induce la proliferación de membranas donde se acumula. Por el contrario, la quimera 1L:GFP no da lugar a la proliferación de membranas y por ello no se forman agregados de RE, ni se acumula en gran cantidad.

La mayoría de isoformas de HMGR de plantas presentan un motivo N-terminal de residuos de arginina (véase Introducción, Sección 1.5.1; Figura I12). Un estudio anterior (Leivar, 2003) indica que este motivo está implicado en la interacción específica de las isoformas HMGR1S y HMGR1L con la proteína AtB'' α , (denominada PR2A1 en el trabajo citado), que corresponde a la subunidad reguladora de PP2A (Figura I14). Para determinar el rol de los residuos conservados de arginina, en un trabajo anterior se substituyeron los mismos por residuos de alanina. Esta sustitución fue realizada directamente sobre la secuencia codificante de 1S:GFP, generando una nueva quimera denominada Δ R1S:GFP (Leivar, 2003). Los ensayos de expresión transitoria por microbombardeo en hojas de *A. thaliana* mostraron que, a diferencia de 1S:GFP, la variante Δ R1S:GFP se encuentra únicamente en la trama de RE (Leivar, 2003) (Figura I10). Los resultados de la presente tesis corroboran los obtenidos previamente, puesto que en la expresión transitoria de la quimera Δ R1S:GFP en hojas de *N. benthamiana* se observa que ésta se localiza exclusivamente en la trama de RE (Figura R17). Estas observaciones indican que los residuos de arginina conservados en la región N-terminal de la HMGR de plantas, median su capacidad de inducir proliferación y agregación de membranas reticulares.

1.2 Generación de líneas transgénicas 1S:GFP.

Para estudiar más detalladamente el efecto de 1S:GFP en la estructura general del retículo endoplasmático y en la formación de estructuras vesiculares y agregados en este orgánulo, se procedió a la generación de varias líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan esta quimera. Para seleccionar las plantas transgénicas, se utilizó el antibiótico kanamicina. Las plantas resistentes a kanamicina de la generación T₁, fueron observadas al microscopio de fluorescencia para determinar de manera cualitativa los niveles de fluorescencia que reflejan la expresión de 1S:GFP. Se efectuó, por tanto, una clasificación en base a estos dos parámetros: resistencia a kanamicina y nivel de fluorescencia.

En un trabajo anterior se obtuvieron tres líneas transgénicas de *A. thaliana* 1S:GFP que presentaban niveles de fluorescencia bastante reducidos (Ferrero, 2010). En el presente trabajo se obtuvieron 40 líneas transgénicas en la generación T₁ con niveles de fluorescencia y patrones de expresión variados, desde líneas que expresaban 1S:GFP sólo en raíz, hasta líneas que presentaban un patrón de expresión más uniforme y generalizado (Tabla R1). El elevado número de líneas transgénicas 1S:GFP permitió realizar una segunda selección, eligiendo especialmente aquellas líneas que presentaban niveles relativamente elevados de fluorescencia y además con un patrón de expresión de 1S:GFP uniforme en toda la planta.

A partir de las 40 líneas transgénicas T_1 , se eligieron ocho que cumplían los requisitos mencionados. Las semillas T_2 obtenidas a partir de estas 8 líneas transgénicas, fueron utilizadas para una segunda selección que se basó en el porcentaje de resistencia a kanamicina. De las 8 líneas transgénicas, se seleccionaron 5 líneas que presentaban un 75 % de resistencia a kanamicina, lo que confirmó la presencia de un solo transgen que segrega mendelianamente en una proporción 3:1. De cada una de las 5 líneas, se eligieron 8 plantas resistentes, obteniéndose un total de 40 sublíneas T_2 . Las semillas T_3 provenientes de estas plantas fueron sembradas en placas con kanamicina. Las líneas que presentaron una resistencia del 100 % correspondían a homocigotos para el transgén de 1S:GFP. Se obtuvieron un total de 11 sublíneas T_3 homocigotas, correspondientes a los 5 transformantes independientes seleccionados en T_2 (Tabla R2), todas ellas con niveles de fluorescencia elevados y con patrones de expresión de 1S:GFP uniformes y generalizados en todas las partes de la planta, incluyendo raíz, hipocótilo, cotiledones y hojas verdaderas (Figura R3). Estas características permitieron abordar con fiabilidad el estudio ultraestructural.

Particularmente, se trabajó con la línea transgénica 2.15.4 de *A. thaliana*, que es homocigota para 1S:GFP. Esta línea presenta niveles de fluorescencia elevados y un patrón de expresión de 1S:GFP en todas las partes de la planta desde el inicio de su desarrollo, con niveles de fluorescencia especialmente incrementados en los tejidos más jóvenes. La expresión de 1S:GFP en la generación T_3 de esta línea fue estable hasta los 23 días de crecimiento, momento en el que se observó una disminución progresiva de la fluorescencia, que desapareció por completo especialmente en las hojas más adultas (Figura R4). La fluorescencia reaparece y se vuelve a silenciar en generaciones siguientes. Este mismo fenómeno de silenciamiento reiterado fue observado en la línea transgénica 1S3.11, en la que la desaparición de la fluorescencia en la generación T_3 fue observada a partir de los 15 días de crecimiento (Ferrero, 2010).

El silenciamiento de la expresión en las líneas transgénicas 2.15.4 y 1S3.11 es notorio, pues la construcción 1S:GFP se halla bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Puesto que este promotor determina la transcripción constitutiva sin modulación espacio-temporal, estas observaciones sugieren que se produce una regulación en la expresión de 1S:GFP, que podría ser a nivel post-transcripcional (degradación del transcrito de 1S:GFP) o bien, a nivel post-traducciona (degradación de la proteína 1S:GFP), aunque tampoco se descarta un posible silenciamiento génico por metilación del promotor. Por otro lado, se ha sugerido que las plantas transgénicas que sobreviven, son aquellas que a pesar de ser resistentes a kanamicina, no tienen una excesiva acumulación de la quimera 1S:GFP o bien aquellas capaces de regular esta expresión (Ferrero, 2010). Los resultados

indican que las líneas transgénicas obtenidas, que presentan unos niveles elevados de expresión de 1S:GFP determinados por la intensidad de fluorescencia, no muestran alteraciones relacionadas con su viabilidad o desarrollo. Sin embargo, este hecho puede estar relacionado con el silenciamiento, sobreviviendo las plantas o partes de la planta en las que desaparece la expresión de 1S:GFP.

Estudios de plantas transgénicas de *A. thaliana* 1S:GFP, señalan que el periodo de expresión disminuye a lo largo de las generaciones (Ferrero, 2010). Las plantas de la generación T₂ presentan una expresión de 1S:GFP hasta los 20 días después de la germinación, mientras que las plantas de las generaciones T₃ y T₄ sólo hasta los 15 días (Ferrero, 2010). Si bien, el momento del silenciamiento no ha sido precisado en las líneas transgénicas de esta tesis, se puede concluir que dichas líneas son más estables, manteniendo un nivel de fluorescencia elevado en plantas T₃ al menos hasta los 23 días después de la germinación, produciéndose entonces la desaparición de 1S:GFP sólo en las hojas más desarrolladas. Aun así, cabe mencionar que los mecanismos que regulan la expresión de 1S:GFP todavía quedan pendientes de ser investigados.

1.3 Efecto proliferativo y morfogenético de 1S:GFP en el retículo endoplasmático.

En la presente tesis, los ensayos de expresión transitoria de 1S:GFP fueron realizados mediante agroinfiltración en hoja de *N. benthamiana*. Tras agroinfiltración, las hojas fueron observadas a la lupa de fluorescencia durante los siguientes 7 días. Durante los primeros dos días, no se detectó fluorescencia, salvo en algunas células epidérmicas aisladas y en pequeñas regiones. Sin embargo, al tercer día se observó un incremento notable en la expresión de 1S:GFP, principalmente en la capa externa de las hojas (células epidérmicas) (Figura R11A). Es destacable que en la agroinfiltración, los niveles de expresión de 1S:GFP y el número de células transformadas aparecieron notablemente elevados en comparación de lo observado en los ensayos de expresión transitoria por microbombardeo, en los que se obtiene generalmente un número reducido de células transformadas y en algunos casos, con un nivel de expresión también bajo.

El análisis de las células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana* por microscopía confocal a partir del tercer día tras la agroinfiltración, mostró que parte de la quimera 1S:GFP se localiza en la trama de RE, pero principalmente en unas estructuras de agregación que se observan como unos corpúsculos fluorescentes de entre 10 y 20 µm de diámetro, ubicados generalmente en zonas cercanas al núcleo (Figura R11 E - G). La expresión del marcador de lumen de retículo endoplasmático GFP-HDEL no dio lugar a la

formación de agregados (Figura R11I). Por tanto, la formación de estas estructuras de agregación fue inducida específicamente por la expresión de la quimera 1S:GFP.

Tras 4 y 5 días de la agroinfiltración, se evidenció que las células aún presentaban agregados fluorescentes. La región de trama reticular donde se localizaba parte de la 1S:GFP al tercer día de agroinfiltración fue desapareciendo durante el cuarto y quinto día. Con el tiempo, la 1S:GFP localizada en trama reticular parece integrarse en los agregados para formar estructuras más compactas y de mayor tamaño. Tras 6 días de la agroinfiltración, se comenzó a distinguir un cierto deterioro en los contornos celulares de la mayoría de las células epidérmicas, de las cuales sólo una minoría aún mostraba cierto grado de fluorescencia (Figura R11H). En estas células se observaron estructuras de agregación de menor tamaño ($\sim 8 \mu\text{m}$), con fibras fluorescentes alargadas y se observaron nuevamente regiones de trama reticular, posiblemente debido al conjunto de procesos celulares relacionados con la disminución de los niveles de expresión de 1S:GFP.

La HMGR de plantas se inserta co-traduccionalmente en la membrana de RE (Campos and Boronat, 1995). Para determinar si las estructuras en agregación inducidas por la expresión de 1S:GFP derivan del RE, se utilizó el marcador de lumen de retículo endoplasmático T3RE desarrollado en un trabajo anterior (Ferrero, 2010). Los ensayos de co-expresión de ambas proteínas quiméricas (1S:GFP y T3RE) en hojas de *N. benthamiana*, muestran que las estructuras de agregación fluorescentes, también contienen T3RE. El hecho de que la proteína quimérica T3RE portadora de una señal funcional de retención a lumen del RE, se encuentre también en los agregados 1S:GFP, constituye una prueba molecular de que éstos no sólo derivan del RE, sino que todavía son parte de él.

Las observaciones de microscopía confocal de la línea transgénica de *A. thaliana* (Resultados, Sección 2.2.1) permitieron determinar el estado general del RE de varios tipos celulares en el sistema homólogo de expresión. En casi todos los tipos celulares de las plantas de 10 días se observaron agregados 1S:GFP, como por ejemplo, en células epidérmicas de cotiledón, células de raíz, pelos radiculares y células guarda de los estomas (Figura R18). Se puede concluir que la expresión de 1S:GFP produce agregados de RE de forma generalizada en toda la planta, afectando a todos sus tipos celulares.

1.3.1 Análisis ultraestructural de los agregados de retículo endoplasmático.

La elevada eficiencia de transfección de 1S:GFP y su alto nivel de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, así como los niveles elevados y generalizados de expresión estable en plantas transgénicas de *A. thaliana*, permitieron un análisis ultraestructural de los agregados de RE inducidos por dicha construcción en ambos sistemas. En *N. benthamiana* el estudio ultraestructural fue abordado en células epidérmicas de hoja, y en *A. thaliana* principalmente en células epidérmicas de cotiledón y de raíz, pero también en otros tipos celulares como células parenquimáticas.

El análisis ultraestructural de muestras fijadas químicamente reveló que los agregados 1S:GFP están constituidos por la asociación de membranas de RE, con distintos patrones de organización (Figuras R13, R19 y R20). En su mayoría, se observan formaciones sinusoidales, denominadas como cristaloides debido a su aspecto compacto y ordenado. Adicionalmente, se observaron asociaciones concéntricas o en espiral de las membranas, así como asociaciones de estas dispuestas paralelamente, que son denominadas como estructuras lamelares (Snapp *et al.*, 2003). En las células epidérmicas de *N. benthamiana* y *A. thaliana*, los agregados 1S:GFP normalmente se localizan próximos al núcleo o en contacto directo con él. Dichos agregados están formados exclusivamente por RE liso. Se observan ribosomas en los bordes o en zonas circundantes, pero no así en el interior de los agregados. Durante la formación de estas estructuras, las membranas de RE quedan unidas y plegadas unas con otras, dejando entre sí un espacio citoplasmático estrecho (de ~10 nm). En algunos casos, en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* 1S:GFP, se detectaron agregados de membrana en el interior de la vacuola (Figura R19C), que presentaban además una cierta desestructuración, mostrando filamentos membranosos alargados y desprendidos, muy probablemente debido al proceso de degradación al que estaban sometidos. Como se discute más adelante, este hecho constituyó una primera evidencia de que los agregados 1S:GFP podrían ser degradados específicamente en el interior de la vacuola. En células de raíz se observaron agregados con las mismas características ultraestructurales ya mencionadas. Esto confirma que la alteración del RE inducida por 1S:GFP es generalizada.

El análisis ultraestructural de las muestras obtenidas por criofijación reveló algunas peculiaridades y características adicionales en los agregados 1S:GFP, en comparación con lo determinado en los estudios realizados mediante fijación química (Figura R14). Se observó un aspecto más distendido en las membranas de RE que forman las estructuras de agregación, con patrones también desordenados y heterogéneos. Se identificaron nuevas características como la presencia de bucles o lazos de membranas, circundantes

a los agregados, que dan la impresión de irse plegando e integrando hacia el interior, a medida que éstos van adquiriendo mayor tamaño. Aunque cada una de las imágenes de microscopía electrónica corresponde a una sola sección, la comparación de todas ellas sugiere que los agregados *ER-1S:GFP* (*Endoplasmic Reticulum-1S:GFP*) podrían constituir masas aproximadamente esféricas. Si bien las membranas de retículo endoplasmático se asocian dejando entre sí un espacio citoplasmático estrecho, los espacios de lumen aparecen como regiones más amplias y variables. Por otro lado, se observaron regiones de transición entre estructuras cristaloides, espirales y lamelares, al igual que tras fijación química, indicando que todas estas estructuras de la célula estarían conectadas entre sí, formando parte de un mismo agregado. Las características ultraestructurales evidenciadas tras la criofijación, sugieren que los agregados *ER-1S:GFP* son de naturaleza mucho más dinámica que lo deducido a partir de fijación química.

La sobreexpresión del dominio de membrana de citocromo b oxidasa en levadura o células de mamífero, induce la formación de estructuras reticulares derivadas del RE liso denominadas como estructuras OSER (*organized smooth endoplasmic reticulum*) (Snapp *et al.*, 2003). La formación de estructuras OSER puede ser inducida por el dominio de membrana de distintas proteínas entre las que se encuentran la HMGR humana (Anderson *et al.*, 1983) y la HMGR de levadura (Wright *et al.*, 1988). En todos estos casos los dominios OSER tienen características estructurales similares a los observados para 1S:GFP, con la alternancia de regiones cristaloides, lamelares y de membranas en anillo, y un espacio muy uniforme de 11 ó 15 nm entre las caras citosólicas de dichas membranas (Snapp *et al.*, 2003). La presente tesis supone la primera descripción de estructuras OSER derivadas de la expresión de HMGR en células vegetales, confirmando que el proceso morfogénico de RE es general para la HMGR eucariota. Por otra parte, la descripción de estructuras OSER de la presente tesis también es la primera realizada a partir de criofijación.

En este trabajo se han ensayado dos métodos preparativos de microscopía electrónica de transmisión: la fijación química y la criofijación. Tomando en cuenta su amplia utilización para estudios ultraestructurales, se empleó inicialmente el método de fijación química. Como solución fijadora se utilizó una mezcla de glutaraldehído y para-formaldehído, ambos al 1,5 %. Estos reaccionan con los grupos amino de las proteínas y amino-lípidos uniéndolos e inmovilizándolos. La fijación se produce a medida que la solución fijadora penetra en la muestra o tejido (Griffiths, 1993). Esto conduce a una discontinuidad en el tiempo de la fijación. Se forma un gradiente durante la penetración del fijador en el volumen de la muestra, que inactiva primero la región más exterior, mientras que el interior permanece sin fijar. La reacción de los aldehídos con los lípidos es limitada y,

aunque los lípidos están todavía en su lugar original después de la fijación química, pueden ser extraídos en los siguientes pasos. Para estabilizar los lípidos, se utiliza tetróxido de osmio (OsO_4), que reacciona principalmente con los lípidos insaturados y también con aminoácidos. Una incubación prolongada a temperatura ambiente con OsO_4 puede conducir a la escisión de las proteínas y alteraciones en su estructura (Baschong *et al.*, 1984). Para lograr una estabilidad suficiente para el seccionamiento fino, la muestra es incluida en una resina plástica, o bien un epoxi o un metacrilato. La mayoría de las resinas son hidrofóbicas e inmiscibles con agua. Por tanto, la muestra debe ser primero deshidratada para su inclusión en la resina, sustituyendo gradualmente el agua de la muestra por un disolvente orgánico como el etanol o la acetona. Ambos disolventes pueden precipitar el DNA o las proteínas formando agregados (Hobot *et al.*, 1985). La fijación química antes de la deshidratación previene los principales efectos de deterioro que puede ocasionar el disolvente orgánico, debido a que las proteínas entrecruzadas son insensibles a la agregación. Sin embargo, no todos los componentes de la muestra se inmovilizan por la fijación química, los lípidos pueden conservar cierta movilidad y ser extraídos no sólo por el disolvente orgánico, sino también por la resina plástica durante la inclusión (Paul and Beveridge, 1992). Después de la inclusión, la resina es polimerizada ya sea por calor (resina epoxi), o por luz UV (resina de metacrilato).

Otro método preparativo para la observación y el análisis ultraestructural de muestras biológicas al microscopio electrónico, muy utilizado en los últimos años, es la criofijación. El propósito de un congelamiento rápido es inmovilizar la muestra sin alterar su morfología. Dado que los cristales en formación excluyen los solutos y que ello segregaría el contenido celular en cristales de hielo y zonas de soluto concentrado, la formación de dichos cristales debe ser suprimida (Dubochet *et al.*, 1988). El agua en las células tiene que ser vitrificada para inmovilizar todos los solutos. Una técnica adecuada es la de congelación a alta presión (HPF: *high pressure freezing*) (Riehle and Hoechli, 1973). En esta técnica, la muestra es congelada muy rápidamente (en milisegundos) a alta presión (2100 bar). Posteriormente, la muestra es deshidratada a baja temperatura ($-90\text{ }^\circ\text{C}$) con un disolvente orgánico como el metanol o la acetona. Se cuestionó si la deshidratación de la muestra sin ser fijada químicamente podría alterar la estructura de los lípidos o promover la agregación de proteínas. Sin embargo, las interacciones entre el disolvente y la muestra biológica son dependientes de la temperatura. La viscosidad del disolvente es muy alta a la temperatura utilizada ($-90\text{ }^\circ\text{C}$) y estabiliza la muestra puesto que limita la movilidad de proteínas y su capacidad de formar agregados (Kellenberger, 1991). Finalmente las muestras son fijadas químicamente. La actividad de los fijadores también es dependiente de la temperatura: OsO_4 comienza a reaccionar a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ y el glutaraldehído comienza a formar enlaces cruzados con las macromoléculas a $-50\text{ }^\circ\text{C}$

(White *et al.*, 1976; Humbel and Müller, 1985). Por tanto, el fijador que penetra en la muestra, se encuentra inactivo durante la sustitución a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, y puede reaccionar de forma simultánea tan pronto como se eleva la temperatura. De esta manera, se evita el gradiente de fijación formado durante la preparación convencional por fijación química (Hurbain *et al.*, 2011). Las muestras criofijadas son también incluidas en resinas epoxi o de metacrilato. La primera proporciona una buena preservación estructural y es más estable bajo el haz de electrones, mientras que la segunda es más adecuada para experimentos de inmunocitoquímica, puesto que la inclusión y la polimerización pueden ser realizadas a bajas temperaturas (Schwarz and Humbel, 1989; Monaghan *et al.*, 1998). Como consecuencia, las estructuras quedan mejor preservadas que en fijación química, y en particular, los espacios de las estructuras celulares que contienen agua podrían quedar mejor preservados reflejando mejor su estructura nativa. La criofijación presenta una serie de ventajas, permitiendo una mejor conservación de los tejidos y muestras biológicas, y manteniendo sus estructuras internas menos alteradas. En la criofijación los procesos bioquímicos y fisiológicos celulares se paralizan casi de manera instantánea, por lo que las estructuras celulares se conservan prácticamente inalteradas (Hurbain *et al.*, 2011). En la presente tesis, la criofijación ha permitido la observación de agregados de RE más distendidos que los de fijación química, puesto que están rodeados por vesículas de mayor tamaño. Presumiblemente, las imágenes de criofijación reflejan más fielmente la situación *in vivo*.

En general, con la fijación química se observaron agregados de RE más compactos que en muestras procesadas por criofijación. Esto podría ser debido a la compactación de membranas celulares en los pasos de deshidratación que siguen a la fijación propiamente dicha. Por el contrario, en la criofijación los espacios celulares con contenido acuoso podrían quedar preservados por la rigidez de la estructura, reflejando mejor su estado nativo. Aunque estas técnicas sólo permiten obtener imágenes fijas, las obtenidas tras criofijación dan la impresión de cierta flexibilidad y dinamismo en las estructuras. Los agregados son heterogéneos y siempre están rodeados por grandes vesículas, independientemente del tamaño del conjunto. El agregado podría crecer de modo continuo con la adición de nuevas membranas en su parte externa. Posiblemente el dinamismo de los agregados 1S:GFP permite que su formación sea compatible con la viabilidad celular en plantas transgénicas de *A. thaliana*.

1.3.2 Papel del dominio de membrana y de la GFP.

Modelos previos de la biogénesis de las estructuras OSER sugirieron que las unidades de dominio citoplasmático de las proteínas sobreexpresadas, interaccionan entre sí dando

lugar al agrupamiento de las membranas de RE y formando estructuras compactas que se agrupan en regiones discretas. Las moléculas de dominio citoplasmático actuarían como eslabones de una cremallera, que podría cerrarse progresivamente (Snapp *et al.*, 2003). Según este modelo la movilidad de las proteínas involucradas en la interacción se encontraría significativamente restringida (Takei *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 2001) (Figura D1A). Ensayos de *photobleaching* sobre estructuras OSER formadas por sobreexpresión de citocromo b oxidasa unida a GFP (quimera GFP-b), mostraron una recuperación rápida de la fluorescencia, indicando que las proteínas de membrana (GFP-b en este caso) no se encuentran inmovilizadas dentro de las estructuras OSER. Por el contrario, son capaces de desplazarse lateralmente en la membrana pasando desde las estructuras OSER a la trama reticular y viceversa (Figura D1B).

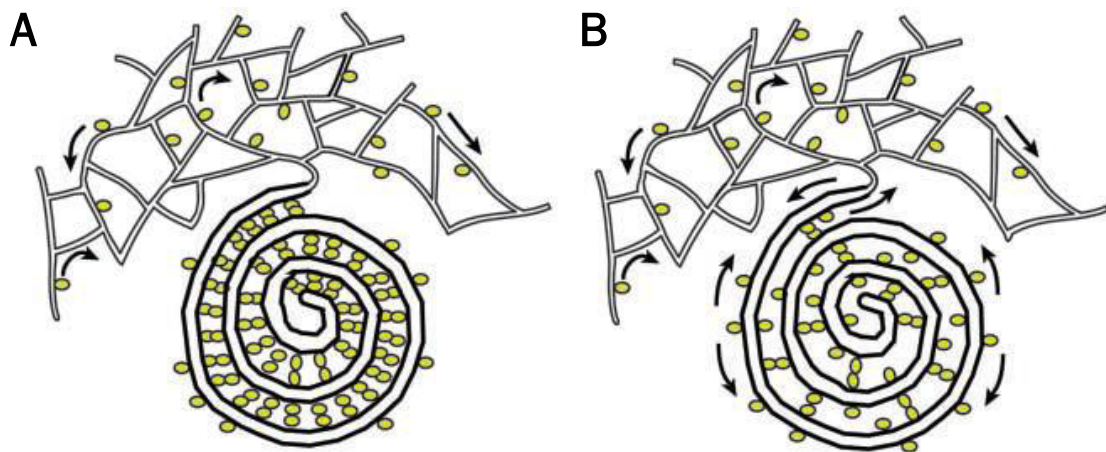


Figura D1. Modelos propuestos en la formación de estructuras OSER. **A.** Las proteínas se unen estrechamente entre sí, a través de interacciones con el dominio citoplasmático y se mantienen estáticas, restringidas y acumuladas en regiones discretas del RE. **B.** Modelo alternativo, las proteínas se mantienen móviles (como se indica con las flechas), y son capaces de intercambiarse entre la estructura OSER y la trama reticular (Extraído de Snapp *et al.*, 2003).

Uno de los posibles riesgos en el uso de quimeras de proteínas de membrana fusionadas a GFP, es la formación de agregados intracelulares. Estudios cristalográficos de la estructura de la GFP, revelaron que ésta puede dimerizar con una orientación antiparalela (Yang *et al.*, 1996; Zacharias *et al.*, 2002). Si la GFP es parte del dominio citosólico de la quimera sobreexpresada, su oligomerización puede producir fenómenos de agregación de membranas, probablemente debido a la suma de interacciones débiles. La capacidad de dimerización de la GFP puede ser suprimida sustituyendo cualquiera de los tres aminoácidos Alanina 206, Leucina 221 y Fenilalanina 223 presentes en la región de dimerización de la misma, por un aminoácido de carga positiva, dichas mutaciones dan lugar a variantes monoméricas de GFP (GFPm), sin alteración de sus propiedades

fluorescentes (Zacharias *et al.*, 2002). Para suprimir la capacidad de dimerización de 1S:GFP, se sustituyó el residuo hidrofóbico de Alanina 206 implicado en la dimerización de la GFP por un residuo de Lisina (sustitución A206K) (Ferrero, 2010). Esta es la variante de GFP con menor capacidad de dimerización de entre las ensayadas. Tiene una K_d 650 veces superior a la GFP original, que hace que el dímero sea esencialmente indetectable (Zacharias *et al.*, 2002). La construcción resultante de este cambio, fue denominada p1S:GFPmonomérica (p1S:GFPm).

Tras expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, la variante monomérica 1S:GFPm se localiza en la trama de RE, pero sobre todo en grandes agregados peri-nucleares de tamaño y forma similar a los observados tras la expresión de 1S:GFP (Figura R15). Estas estructuras inducidas por 1S:GFPm presentan además fibras engrosadas que parecen estar conectadas con los agregados. Estas fibras podrían estar constituidas por la asociación de membranas de RE dispuestas paralelamente en estructura lamelar. Los resultados de la presente tesis confirman estudios previos de microscopía confocal del mismo laboratorio, en los que se demostró que la quimera 1S:GFPm (denominada 1S:GFPmono en dicho trabajo) generaba agregados de RE similares a los inducidos por 1S:GFP en células de *A. thaliana* (Ferrero, 2010).

La fijación química y el análisis ultraestructural de los agregados inducidos por 1S:GFPm en hojas de *N. benthamiana*, reveló que éstos presentaban la misma distribución de membranas que los agregados de 1S:GFP. Sin embargo, se evidenció que los agregados de 1S:GFPm presentaban membranas sinusoidales más distendidas y separadas, con espacios de lumen más amplios. Estas zonas menos compactas se localizaban generalmente en la parte más interna y central de los agregados (Figura R16). Posiblemente la capacidad de dimerización de 1S:GFP afectaba en cierto grado a la compactación de las membranas durante el proceso de fijación química. En los agregados 1S:GFPm, en los que la quimera no dimeriza, la compactación puede ser menor en algunas regiones. Sin embargo, los espacios citoplasmáticos entre las membranas de los agregados de 1S:GFPm no se vieron afectados, y presentaron una misma amplitud (de ~ 10 nm) que en el caso de la quimera 1S:GFP.

En un trabajo previo, la utilización de variantes monoméricas de GFP en las quimeras GFP-sec61 y GFP-P450 previno la formación de estructuras OSER en células COS en las que sí se originaban agregados con la GFP original (Snapp *et al.*, 2003). En este trabajo se concluyó que la formación de estructuras OSER era debido a la dimerización de la GFP. Los resultados de la presente tesis son opuestos a éstos, en tanto que la utilización de una variante monomérica de GFP fusionada al dominio de membrana de la HMGR1S

también condujo a la formación de agregados de RE. En los sistemas de *A. thaliana* (Ferrero, 2010) y de *N. benthamiana* (presente tesis) la formación de estructuras OSER está inducido exclusivamente por el dominio de membrana de HMGR. Estas discrepancias pueden deberse a una mayor capacidad proliferativa y morfogenética del dominio de membrana de la HMGR1S de *A. thaliana* o el distinto sistema biológico donde se expresa la proteína.

En la presente tesis se ha observado que la formación de agregados *ER-1S:GFP* depende solamente del dominio de membrana de HMGR1S y no de la dimerización de GFP. La GFP puede ayudar a compactar membranas, pero no parece ser la fuerza motriz que induce la formación de agregados de retículo endoplasmático, al menos en plantas. Por otra parte los resultados de la presente tesis ponen de manifiesto que la compactación final de las membranas puede estar influenciado por la capacidad de dimerización de la GFP. Tras fijación química, los agregados de membranas 1S:GFP son más compactos que los de 1S:GFPm (Figura R16). Cabría preguntarse si esto ocurre *in vivo* o ha sido provocado por el tratamiento de fijación.

1.4 Caracterización de las vesículas de HMGR.

Estudios anteriores de *whole mount* señalan que, en células parenquimáticas de cotiledón de *A. thaliana*, la HMGR se acumula en unas estructuras vesiculares de 0,2 a 2 μm de diámetro, denominadas *vesículas de HMGR* (Leivar *et al.*, 2005; Ferrero, 2010). Estas estructuras no corresponden ni a los cloroplastos ni a los peroxisomas puesto que no colocalizan con clorofila ni con catalasa (Leivar *et al.*, 2005). Los ensayos de *whole mount* realizados en la presente tesis en plantas de *A. thaliana* de 6 días, con el anticuerpo policlonal Ab-26.8 contra el dominio catalítico de HMGR (CD1) confirman que la HMGR endógena se encuentra en estructuras vesiculares, con un tamaño similar (0,2 – 2 μm), distribuidas en el citosol de células parenquimáticas, entre cloroplastos (Figura R25).

Los ensayos de inmunocitoquímica *in-situ whole mount* se basan en la inmunolocalización de proteínas con anticuerpos específicos, en planta entera no seccionada, permitiendo la detección de proteínas en las células con una elevada resolución y especificidad. Un aspecto importante relacionado con esta técnica, es que los anticuerpos deben acceder al interior de las células, para lo cual las paredes y membranas celulares deben ser sometidas a un proceso previo de permeabilización. Esto se consigue mediante la digestión enzimática de los constituyentes de las paredes celulares como celulosa y pectinas, y el subsecuente tratamiento con un detergente, que dará lugar a la formación

de poros en las membranas. Para la digestión enzimática se utilizó driselasa, que es una mezcla de enzimas derivadas de un basidiomiceto, e IGEPAL CA-630 como detergente no desnaturizante no iónico. Para el tratamiento de hipocótilo, cotiledones y hojas, es también necesario en algunos casos eliminar los pigmentos como la clorofila, el cual tiene una fuerte auto-fluorescencia en el espectro del rojo, utilizando metanol y xileno como disolventes orgánicos. Estos disolventes han sido adecuados en el caso de HMGR, aunque pueden dificultar la detección de algunos antígenos, presumiblemente debido a su desnaturalización (Sauer *et al.*, 2006).

Los ensayos de *whole mount* permitieron una visión panorámica de la distribución de las *vesículas de HMGR* en la célula. En la presente tesis, esta información fue suplementada con el análisis por microscopía electrónica para determinar su ultraestructura. Cortes ultra-finos de cotiledón de planta col0 de 6 días fueron criofijados e inmunomarcados con el anticuerpo Ab-26.8, que también había sido utilizado en los ensayos de *whole mount* (Figuras R26 y R27). Al microscopio electrónico, las *vesículas de HMGR* presentan una estructura interna membranosa y tamaño variable (0,5 – 2 μm). Mediante esta técnica, la presencia de *vesículas de HMGR* fue confirmada no sólo en células parenquimáticas, sino también en células epidérmicas. Ello indica que las *vesículas de HMGR* están distribuidas ampliamente en planta joven de *A. thaliana* y no se encuentran restringidas a un solo tipo celular. Un análisis similar ultraestructural e inmunocitoquímico fue realizado en plantas de 10 días de la línea transgénica 1S:GFP de *A. thaliana*. Cortes ultra-finos de hoja verdadera fueron inmunomarcados con los anticuerpos Ab-26.8 (anti-CD1) y Ab-5450 (contra GFP). Los resultados señalan colocalización de HMGR y 1S:GFP en el interior de estructuras vesiculares de aspecto membranoso similares a las observadas en plantas silvestres (Figura R28). Esto indica que 1S:GFP, también se encuentra localizada en las *vesículas de HMGR* y sugieren que dichas vesículas pueden derivar directamente de *dominios ER-HMGR* (véase Discusión, Sección 2.1).

1.5 Caracterización fenotípica de mutantes *hmg1*.

En estudios anteriores se identificaron y caracterizaron dos mutantes insercionales independientes de *A. thaliana*: *hmg1-1* (Suzuki *et al.*, 2004) y *hmg1-3* (Antolín-Llovera, 2006). Ambas líneas tienen una inserción de T-DNA en el exón I del gen *HMG1*, en un punto muy próximo al de inserción del T-DNA del mutante *hmg1-4* (salk125435), el cual ha sido estudiado junto con *hmg1-3* en la presente tesis (Figura R5). Tanto *hmg1-3* (Antolín-Llovera, 2006) como *hmg1-4* (salk125435) (Kim *et al.*, 2014) son mutantes *knock-out* para el gen *HMG1*.

Las tres líneas mutantes *hmg1-1*, *hmg1-3* y *hmg1-4* presentan un fenotipo muy similar en condiciones de día largo (Suzuki *et al.*, 2004; Antolín-Llovera, 2006; Resultados, Sección 1.2). La caracterización fenotípica de líneas homocigotas *hmg1-3* y *hmg1-4* realizada en la presente tesis, indica que no tienen diferencias macroscópicas en relación a la línea parental de *A. thaliana* col0 durante las primeras semanas de crecimiento en placa con agar-MS. Sin embargo, durante la primera semana después de transferencia a tierra, se hicieron más evidentes las alteraciones relacionadas con la falta de expresión del gen *HMG1*, que dio lugar a plantas de un color más pálido y con hojas místicas (Figura R6). La mayoría de las plantas mutantes terminó muriendo durante los primeros 11 días de crecimiento en tierra, observándose un porcentaje global de supervivencia del 30 % (Tabla R3). Al cabo de 27 días de crecimiento, el pequeño grupo de plantas *hmg1-3* y *hmg1-4* supervivientes mostró anomalías fenotípicas en su desarrollo. Ambas líneas mutantes, presentaron un marcado enanismo, con hojas, tallos, silicuas y rosetas mucho más pequeñas (Figura R7), con la consecuente disminución en la producción de semillas fértiles, en comparación con la línea parental col0. Estas alteraciones probablemente fueron provocadas por el estrés generado en su transferencia a tierra, que podría haber afectado en mayor grado a ambas líneas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*, debido a que su capacidad de adaptación a condiciones adversas está disminuida con respecto a la línea silvestre col0.

Estudios anteriores señalan que el mutante *hmg1-1* presenta una disminución en el contenido de esteroides de un 47 % en plántulas y de un 25 % en inflorescencias (Suzuki *et al.*, 2004). Por el contrario, en plantas que sobreexpresan la isoforma HMGR1S de *A. thaliana*, se observó un incremento en los niveles de esteroides como el campesterol, sitoesterol y estigmasterol. Estas observaciones indican que la isoforma HMGR1S de *A. thaliana* cataliza un paso limitante en la síntesis de esteroides (González, 2002; Hey *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque los mutantes *hmg1-1*, *hmg1-3* y *hmg1-4* presentan algunas características fenotípicas propias de los mutantes defectivos en la síntesis de esteroides como el fenotipo de enanismo y baja fertilidad (Clouse, 2002; Schaller, 2003, 2004), se desconoce si todos estos defectos son debidos a la disminución de los compuestos isoprenoides.

Suzuki y colaboradores (2004) propusieron que el fenotipo de enanismo observado en el mutante *hmg1-1*, se debe a defectos en la elongación celular y no a una menor tasa de división celular. Esta propuesta, contrasta con los resultados obtenidos en otros sistemas como en el fruto de advocado donde los inhibidores de la actividad HMGR provocan una disminución en el número de células (Cowan *et al.*, 1997). También se observó en *hmg1-1* que la senescencia prematura no es debida a una disminución en el nivel de

citoquininas (hormonas antagonistas de la secescencia) (Suzuki *et al.*, 2004). La baja fertilidad observada en esta línea es debida a que no se produce la elongación del tubo polínico. Este hecho puede estar relacionado con la expresión de los genes *HMG1* y *HMG2* en estambres, donde los productos de estos genes podrían realizar funciones específicas (Suzuki *et al.*, 2004).

Estudios realizados con mevinolina (inhibidor de HMGR), indican que la enzima es esencial para la planta. Además, ensayos de *northern blot* demostraron que la expresión del gen *HMG1* es muy superior a la del gen *HMG2* en todos los tejidos de *A. thaliana* (Enjuto *et al.*, 1994). Sin embargo, ambos mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4* no mostraron alteraciones fenotípicas en las primeras etapas del desarrollo, lo cual sugiere que HMGR1S y HMGR1L son dispensables al menos durante esta fase. Estudios realizados con la línea *hmg1-3* indican que la falta de transcrito del gen *HMG1* no es compensado por un aumento en los niveles de transcrito del gen *HMG2* (Antolín-Llovera, 2006). Además, las medidas de la actividad específica de HMGR confirman que la actividad HMGR en la línea *hmg1-3* es mucho más reducida en comparación con la línea parental col0 (Antolín-Llovera, 2006). Estos estudios, descartan la posibilidad de que algún mecanismo de regulación post-transcripcional en las líneas mutantes diera lugar a una mayor actividad HMGR derivada del gen *HMG2*. Así, la HMGR2 no compensa los defectos de *hmg1-3* y *hmg1-4* aportando una mayor actividad HMGR. La actividad HMGR residual de los mutantes deriva de *HMG2* y es suficiente para el desarrollo normal de la planta, al menos durante los primeros días de crecimiento *in vitro*.

Parte del sustrato necesario para la síntesis de isoprenoides citosólicos podría proceder de la vía del MEP, que tiene lugar en los plastos. De hecho, en estudios previos se observó que el mutante *hmg1-3* presenta mayor sensibilidad a la fosmidomicina, un inhibidor de la vía del MEP, que la línea parental (Antolín-Llovera, 2006). Estas observaciones sugieren que parte de los isoprenoides sintetizados en las líneas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4* podrían provenir a partir del IPP u otro precursor de la vía plastídica. Sin embargo, estudios realizados en un mutante alélico *hmg1-1* por medio del análisis de RT-PCR cuantitativa, señalaron que los niveles de transcrito de enzimas de la vía del MEP no se ven incrementados (Suzuki *et al.*, 2004). Aunque la vía del MEP podría colaborar aportando algunos precursores para la síntesis de isoprenoides en el citosol o en las mitocondrias, la actividad HMGR residual en las líneas mutantes, probablemente, fue suficiente para generar una gran mayoría de compuestos. Así, los altos niveles de expresión del gen *HMG1* y la elevada actividad HMGR detectada en plantas silvestres col0, durante las primeras etapas del desarrollo, no necesariamente podrían responder a

un mayor requerimiento de mevalonato, lo que sugiere que la HMGR podría tener alguna otra función en la planta.

1.6 Complementación del mutante *hmg1-3*.

Para ahondar en el papel biológico del dominio de membrana de HMGR1S, se estudió si éste podía rescatar total o parcialmente los defectos provocados por la disrupción del gen *HMG1*. El mutante *hmg1-3* fue transformado con la construcción 1S:GFPm, portadora del dominio de membrana de HMGR1S unido a una forma monomérica de GFP. Durante los primeros días de crecimiento en medio estéril, seis líneas transgénicas *hmg1-3/1S:GFPm* presentaron un desarrollo muy similar a la línea silvestre *col0* y a los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*. Sin embargo, una semana después de la transferencia a tierra, si bien se observó que las líneas transgénicas presentaban un ligero retraso en su desarrollo en comparación con la línea silvestre *col0*, estas no mostraron alteraciones tan evidentes como los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4* (Figura R8). Se observó además, un incremento en los porcentajes de supervivencia y viabilidad en tierra en las 6 líneas *hmg1-3/1S:GFPm* en comparación con los mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4*, alcanzando en algunos casos valores similares a la línea parental *col0* (Tabla R3), lo que indica una recuperación en la capacidad de adaptación y supervivencia en tierra. Al cabo de 34 días de crecimiento en tierra, se observó que las 6 líneas *hmg1-3/1S:GFPm* presentaron menos anomalías en su desarrollo, con una recuperación fenotípica marcada en cuanto a morfología y aspecto general, tamaño de tallos, hojas, rosetas y silicuas en comparación con las líneas mutantes *hmg1-3* y *hmg1-4* (Figura R9). Por otro lado, también se constató una mejora en el desarrollo y tamaño de las silicuas y por consiguiente una recuperación en la fertilidad y la producción de semillas. Por tanto, la proteína quimérica 1S:GFPm que contiene el dominio de membrana de la HMGR1S, pero no el dominio catalítico, media la recuperación del fenotipo defectivo de los mutantes *hmg1*.

Se ha observado que el dominio N-terminal de la HMGR1S induce la proliferación de membranas reticulares y la formación de *dominios ER-HMGR* implicados en el vertido vacuolar de vesículas de retículo endoplasmático en respuesta a estrés (Resultados, Sección 4). Puesto que el mutante *hmg1-4* tiene severamente comprometido el vertido de vesículas de RE a vacuola en respuesta a estrés (Resultados, Sección 4.2.2), es posible que los defectos fenotípicos y dificultades de adaptación al medio del mutante *hmg1-3* pudieran deberse en parte a esta circunstancia. La expresión de la quimera 1S:GFPm (que contiene el dominio N-terminal de HMGR1S) restablece el fenotipo mutante, revirtiendo muchas de las características relacionadas con la disrupción e inactivación del gen *HMG1*. Ensayos inmunocitoquímicos de *whole mount* con el

anticuerpo policlonal Ab5450 contra GFP, realizados en la línea mutante *hmg1-4* transformada con p1S:GFPm (*hmg1-4/1S:GFPm*), mostraron que en células parenquimáticas de cotiledón se produce la formación de agregados de RE (Figura R21). Todo ello indica que el dominio de membrana HMGR1S restablece la capacidad de formar agregados y es importante para la defensa de la planta frente a condiciones adversas.

PP2A es necesaria para la formación de agregados mediada por 1S:GFP (Antolín-Llovera, 2006). El inhibidor de PP2A, cantaridina, produce el mismo efecto que los mutantes de PP2A, lo que indica que la acción catalítica de PP2A y no su sola interacción física participa en dicho proceso. Por otra parte, PP2A es un regulador negativo de HMGR de *A. thaliana*, produciendo cambios en el estado de fosforilación en dicha proteína (Leivar *et al.*, 2011). Un modelo hipotético para relacionar estas observaciones consistiría en que la desfosforilación de HMGR por PP2A inactiva HMGR y, de manera concomitante, induce la formación de agregados de RE mediada por su dominio de membrana. En consecuencia, la abundante HMGR endógena detectada por inmunocitoquímica en los agregados de RE (Resultados, Sección 2.2.2) podría ser catalíticamente inactiva. Esta misma situación se daría en las líneas *hmg1-3/1S:GFPm*, que son *knock-out* para *HMG1*, en las que la posible HMGR endógena presente en los agregados debe derivar necesariamente del gen *HMG2*. La HMGR2 de los agregados de líneas *hmg1-3/1S:GFPm* también podría ser inactiva, pues dicha proteína tiene el motivo conservado de argininas e induce la formación de agregados de RE, de modo similar a HMGR1S. La recuperación fenotípica observada en estas líneas (*hmg1-3/1S:GFPm*) podría deberse al rol del dominio N-terminal de la HMGR1S sobre la morfogénesis de membranas y no a la inducción de actividad HMGR. De todas maneras, todavía no se ha determinado el nivel de proteína ni actividad HMGR en las líneas *hmg1-3/1S:GFPm*, ni se han medido niveles de transcrito *HMG2*. Estos ensayos quedan como aspectos pendientes para futuros trabajos. Aún en el caso de que la recuperación fenotípica observada en las líneas *hmg1-3/1S:GFPm* sea debida a una mayor actividad catalítica HMGR, cabe destacar la importancia biológica del dominio de membrana de HMGR1S. En definitiva, la recuperación fenotípica de las líneas transgénicas *hmg1-3/1S:GFPm* se debería a la sobreexpresión del dominio de membrana de HMGR1S, ya sea porque restablece el dominio de retículo endoplasmático *ER-HMGR* o por incrementar la actividad HMGR.

2. IDENTIDAD FÍSICA Y FUNCIONAL DE DOMINIOS ER-HMGR.

2.1 Identificación de los dominios ER-HMGR.

Para estudiar la localización subcelular de 1S:GFP en plantas transgénicas que expresan esta quimera, se realizó inmunocitoquímica sobre preparaciones de microscopía electrónica. La quimera se encuentra distribuida de forma regular y homogénea en el interior de agregados de RE (Figura R22), así como en los bucles de membranas que los rodean e incluso en la envoltura nuclear. Estas observaciones indican que la 1S:GFP se encuentra distribuida ampliamente en todo el RE de la célula. La 1S:GFP es por tanto, un marcador general del RE.

Estudios anteriores de inmunocitoquímica *in-situ* en planta entera (*whole mount*) en *A. thaliana*, señalaron que HMGR y 1S:GFP colocalizan a nivel subcelular en *vesículas de HMGR* (Leivar, 2003; Ferrero, 2010). Para confirmar y extender estos resultados, en la tesis se realizaron ensayos de inmunocitoquímica *in-situ* (*whole mount*) y también inmunocitoquímica al microscopio electrónico. En los dos casos se utilizaron los mismos anticuerpos primarios: Ab-26.8 contra HMGR y Ab-5450 contra GFP. Los ensayos de *whole mount* (Figura R21) mostraron una coincidencia parcial entre 1S:GFP y HMGR, puesto que estos antígenos no colocalizaban totalmente, sino que presentaban heterogeneidad y una distribución distinta en el interior del agregado. Sin embargo, el análisis de microscopía electrónica (Figura R23), reveló que tanto 1S:GFP como HMGR se encuentran distribuidos de forma homogénea en las *vesículas de HMGR* y los agregados de los distintos tipos celulares, sugiriendo que la heterogeneidad en la colocalización observada en ensayos de *whole mount* podría deberse principalmente a una diferencia en la penetrabilidad de los anticuerpos. Las partículas de oro asociadas a los anticuerpos, se visualizaron en el microscopio electrónico sobre membranas reticulares, y no así en los espacios citoplasmáticos o de lumen entre las membranas. También se observó colocalización de HMGR endógena y 1S:GFP en la membrana nuclear. Estos resultados indican que la localización subcelular de la HMGR de *A. thaliana* está determinada exclusivamente por su dominio de membrana N-terminal y no por su dominio catalítico.

Tanto HMGR endógena como 1S:GFP parecen muy abundantes en los agregados de RE, a juzgar por la alta densidad de inmunomarcaje. La HMGR endógena es apenas detectable en *A. thaliana* silvestre, en los mismos tejidos y condiciones de inmunomarcaje. Esto está motivado en parte por la dificultad en visualizar campos con RE, pero también de modo evidente por el menor nivel de HMGR en dichas membranas. Estas observaciones

sugieren que la proliferación de membranas inducida por expresión de 1S:GFP, podría estimular la síntesis o estabilización de HMGR endógena.

En esta tesis, se ha determinado que los agregados *ER-1S:GFP* están formados por asociación y compactación de membranas de retículo endoplasmático liso. La presencia de HMGR endógena en estas estructuras podría influir en la disposición de las membranas y la compactación final de los agregados, debido a la capacidad de oligomerización del dominio catalítico de la HMGR, como ocurre con la HMGR humana (Itsvan *et al.*, 2000) y de plantas (Kondo and Oba, 1986; Bach, 1987; Wititsuwannakul *et al.*, 1990; Antolín-Llovera, 2006) que forma tetrámeros. Sin embargo, ensayos de purificación de 1S:GFP realizados en la tesis mediante la doble cromatografía de afinidad desvelaron que esta construcción está asociada a proteínas, dinaminas y reticulones, implicadas en la morfogénesis del RE (Tabla R7). Estas proteínas, podrían participar en la organización y estructuración de agregados *ER-1S:GFP*.

Durante el desarrollo de plantas de la línea transgénica 2.15.4 de *A. thaliana*, aproximadamente hacia el día 23 desde la germinación, se produce silenciamiento en la expresión de 1S:GFP principalmente en las hojas más desarrolladas (Figura R24). Para determinar el efecto de la desaparición de 1S:GFP en la estructura del retículo endoplasmático de las células, las hojas recién silenciadas fueron sometidas a microbombardeo con dos marcadores distintos de lumen de retículo endoplasmático, GFP-KDEL (verde) y T3RE (rojo). En ambos casos se observó que el silenciamiento de 1S:GFP produce la recuperación de una estructura normal en el RE. Estos resultados indican que la formación de agregados de RE liso inducida por la expresión de 1S:GFP, es reversible. Presumiblemente, el restablecimiento del patrón normal de RE se debe a la degradación de 1S:GFP asociada al silenciamiento de su expresión. Según esta hipótesis, la formación de agregados en el RE de las plantas transgénicas 1S:GFP está vinculada a la presencia física de la quimera.

Los resultados presentados indican que el dominio N-terminal de la HMGR1S, no solamente determina su destino subcelular primario, sino que también influye en la estructura del RE induciendo la proliferación de membranas y la formación de agregados. Ensayos de colocalización con el marcador de lumen de retículo endoplasmático T3RE indican que los agregados están formados por membranas de retículo endoplasmático. Los ensayos ultraestructurales en *A. thaliana* y *N. benthamiana* demuestran que los agregados de 1S:GFP están constituidos por la asociación y plegamiento de membranas de retículo liso. Ensayos inmunocitoquímicos en cortes ultra-finos, demuestran que la quimera 1S:GFP y la HMGR endógena colocalizan en las membranas de los agregados

con una distribución homogénea. Por tanto la ausencia del dominio catalítico de la HMGR1S en la quimera 1S:GFP no condiciona su localización subcelular. De esta forma, el dominio de membrana de HMGR1S no sólo determina su localización subcelular, sino que induce la proliferación de membranas de RE, donde se acumula esta proteína. Para las regiones de retículo endoplasmático liso que contienen HMGR y 1S:GFP se propone la denominación de *dominios ER-HMGR (Endoplasmic Reticulum-HMGR)*. Esto sería compatible con la concepción del retículo endoplasmático como un sistema dinámico formado por múltiples subdominios especializados con diferentes funciones (Staehelein, 1997).

2.2 Vertido a vacuola en respuesta a herida.

Debido a su importante rol en la regulación de la ruta del mevalonato para la síntesis de isoprenoides, la HMGR está sujeta a diversas señales y estímulos externos. En plantas se ha propuesto que la actividad HMGR está mayormente determinada por control transcripcional, en tanto que los mecanismos pos-transcripcionales permitirían un ajuste más fino y rápido (Chappell, 1995a; Antolín-Llovera, 2006). Estudios previos de niveles de transcrito y actividad HMGR en plántulas de *A. thaliana* silvestre, indican que pocos minutos después de la agresión por herida, estos parámetros varían de manera opuesta. La actividad HMGR disminuye y parece responder a un mecanismo post-traduccional, mientras que el aumento de los niveles de transcrito servirían para compensar dicha disminución (Ribeiro, 2009). Estas observaciones son consistentes con la degradación selectiva de proteína HMGR en condiciones de estrés.

Estudios realizados con líneas mutantes *aos*, deficientes en la biosíntesis de jasmonatos biológicamente activos (Park *et al.*, 2002), y líneas mutantes *coil-1* insensibles a esta hormona (Feys *et al.*, 1994), indican que en ambas líneas mutantes la actividad HMGR se mantiene inalterada después del estrés por herida, lo cual contrasta con lo que ocurre en *A. thaliana* silvestre en la que la actividad HMGR disminuye hasta un 50 % 20 min después de la herida (Ribeiro, 2009). Estos estudios sugieren el MeJA también actuaría en todo este proceso como un mediador (Ribeiro, 2009).

En los ensayos de *whole mount* en plantas de *A. thaliana* col0 realizados en la presente tesis, el rendimiento del inmunomarcaje con el anticuerpo Ab-26.8 y la intensidad de la señal fluorescente correspondiente a las *vesículas de HMGR* fueron variables. Esto podría deberse principalmente a variaciones en la permeabilidad de las células después del tratamiento con driselasa, lo que condicionaría la penetrabilidad de los anticuerpos. Para determinar el efecto de la driselasa en la permeabilidad de las células y en el

inmunomarcaje de las *vesículas de HMGR*, se realizaron ensayos de *whole mount* prolongando el tiempo de tratamiento con driselasa (Figura R44). Ello comportó una disminución en el número de *vesículas de HMGR* y en la intensidad de su marcaje. Esta disminución se hizo más evidente tras 90 min de digestión, desapareciendo casi por completo después de 120 min. Diversos factores de estrés son generados en la técnica de *whole mount*, desde la manipulación física de las plantas hasta su tratamiento con enzimas, detergentes y disolventes orgánicos (Sauer *et al.*, 2006). El tratamiento prolongado con enzimas hidrolíticas de pared celular altera la estructura y morfología de las células. Esto también comporta estrés a nivel celular que podría inducir la desaparición de *vesículas de HMGR*.

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta también estudios previos que indican que la actividad HMGR disminuye en condiciones de estrés por herida (Ribeiro, 2009), se realizaron ensayos de *whole mount* para determinar si este tipo de estímulo podría desencadenar la desaparición de las *vesículas de HMGR* en células parenquimáticas de cotiledón. Para este propósito, plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días cultivadas *in vitro* fueron seccionadas con un bisturí en la región del hipocótilo, separando la parte aérea de la raíz. Los cotiledones separados fueron incubados en el mismo medio de cultivo por distintos tiempos y, a continuación, se realizó digestión con driselasa durante un tiempo adecuado para el inmunomarcaje y observación de *vesículas de HMGR*. Los resultados (Figura R45) señalan que las *vesículas de HMGR* desaparecen progresivamente como consecuencia del estrés por herida. Esta respuesta es muy rápida, pues 30 min después de la herida la cantidad de inmunomarcaje en las células de cotiledón había disminuido en un 70 – 80 %. Además, es sistémica pues afecta a células que no se encuentran en las inmediaciones de la lesión.

Para determinar el destino subcelular de las *vesículas de HMGR* en respuesta a herida, se realizó un estudio de microscopía electrónica con marcaje inmunocitoquímico. Un primer análisis fue realizado en plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días, seccionadas con bisturí y criofijadas una hora más tarde. Cortes ultra-finos de cotiledón fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-26.8 dirigido contra dominio catalítico de HMGR. Las observaciones realizadas al microscopio electrónico en células parenquimáticas de cotiledón en plantas control no estresadas indican la presencia de estructuras vesiculares inmunomarcadas que corresponden a *vesículas de HMGR* localizadas en el citosol. Sin embargo, en las células parenquimáticas de cotiledón sometidas a herida se observa ocasionalmente vesículas inmunomarcadas en el interior de la vacuola (Figura R46).

Aunque en estudios previos ya se había determinado que la actividad HMGR se ve afectada en plantas sometidas a herida o tratadas con MeJA (Ribeiro, 2009), los resultados presentados en esta tesis constituyen una primera evidencia del proceso de degradación vacuolar que sufre la HMGR bajo estas condiciones. Ello indica que, en condiciones de estrés por herida, las *vesículas de HMGR* desaparecen debido a un proceso de degradación que tendría lugar en el interior de la vacuola. Este proceso está en concordancia con los estudios previos que reportan una disminución de la actividad específica de HMGR en plantas sometidas a herida (Ribeiro *et al.*, 2009) (Figura D2).

Wounding treatment *A. thaliana* wild type

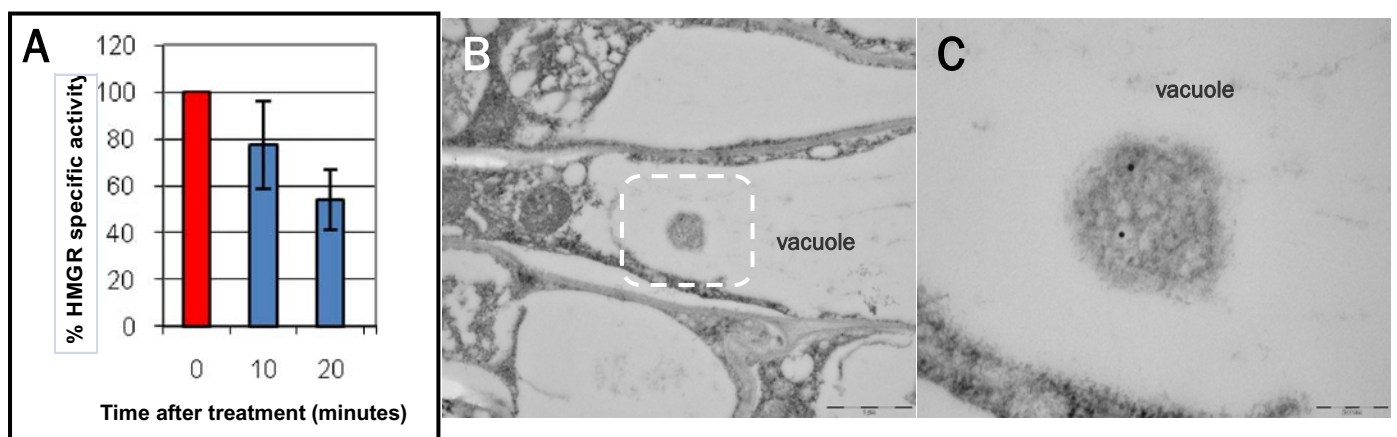


Figura D2. Respuesta de HMGR al tratamiento de herida en *A. thaliana* silvestre. **A.** La actividad específica de HMGR disminuye hasta un 50 % 20 min después de la herida (Extraído de Ribeiro, 2009). **B y C.** Inmunocitoquímica en cortes ultra-finos de cotiledón de plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días, criofijados tras 1 h de tratamiento de herida. La HMGR endógena (partículas de 18 nm) se encuentra localizada en estructuras vesiculares derivadas hacia el espacio vacuolar. Las barras indican: B, 1 μ m; C, 200 nm.

La rápida degradación de las *vesículas de HMGR* en respuesta a herida dificultó su observación al microscopio electrónico. El inmunomarcaje sólo permitió detectar unas pocas *vesículas de HMGR* en vacuola (Figura D2C). Por este motivo y para realizar un estudio más amplio, se utilizó la línea transgénica de *A. thaliana* 2.15.4 que tienen un elevado nivel de expresión tanto de 1S:GFP como de HMGR endógena (Resultados, Sección 2.2.2). Hojas verdaderas de plantas 2.15.4 de 10 días fueron seccionadas con bisturí e incubadas en agar-MS. Las hojas fueron procesadas por criofijación 1 ó 3 horas más tarde. Los cortes ultra-finos fueron inmunomarcados con el anticuerpo Ab-5450 contra GFP y observados al microscopio electrónico (Figura R47). Como control, se procesaron hojas verdaderas no sometidas a herida, en cuyas células epidérmicas se observan *dominios ER-HMGR* localizados exclusivamente en el citosol. Una hora después de la herida, se observan *dominios ER-HMGR* citosólicos, pero también porciones de éstos desprendidos y localizados en el interior de la vacuola. Adicionalmente, se evidencia un fenómeno general de desprendimiento de pequeños fragmentos de

membrana inmunomarcados, dirigidos también hacia el interior de la vacuola. En algunos casos *dominios ER-HMGR* completos se encuentran directamente embebidos en el espacio vacuolar sin que exista separación por el tonoplasto. Es posible, por tanto, que se viertan directamente en la vacuola grandes regiones de retículo endoplasmático, lo que sugiere que la degradación de los *dominios ER-HMGR* en respuesta a herida puede ser un proceso muy rápido que se consuma en cuestión de minutos.

El proceso de degradación de los *dominios ER-HMGR* en respuesta a herida, también fue descrito mediante inmunomarcaje con el anticuerpo Ab-26.8 que detecta HMGR (Figura R49). Al igual que 1S:GFP, la abundante HMGR endógena presente en los *dominios ER-HMGR* permanece en el citosol en células epidérmicas de hojas verdaderas no sometidas a herida, mientras que se produce el desprendimiento hacia vacuola, de pequeños fragmentos de membrana con HMGR endógena después de la lesión. Ensayos inmunocitoquímicos con ambos anticuerpos (Ab-5450 y Ab-26.8) indican que HMGR y 1S:GFP colocalizan en los fragmentos de membrana desprendidos y dirigidos hacia el interior de la vacuola, confirmando que éstos derivan directamente de *dominios ER-HMGR*. Tres horas después de la agresión (Figura R48), ya no se observa desprendimiento de membranas ni *dominios ER-HMGR* en vacuola, sino un remanente citosólico de membranas de retículo endoplasmático inmunomarcadas con Ab-5450 y, por tanto, correspondientes a estructuras residuales de *dominios ER-HMGR* que no han sido derivados hacia vacuola. El grupo de membranas residual tiene estructura anastomótica y se asemeja a formaciones de retículo endoplasmático liso descritas en células animales (Fawcett, 1981) y vegetales (Gunning and Steer, 1975).

De forma general, se puede concluir que los *dominios ER-HMGR*, definidos por la presencia de HMGR y 1S:GFP, sufren un proceso de vertido a vacuola y degradación en respuesta a herida. Este proceso es masivo y adopta distintas formas, desde el desprendimiento de pequeños fragmentos de membrana, hasta la exposición al espacio vacuolar de grandes porciones de *dominios ER-HMGR*. Si bien los *dominios ER-HMGR* peri-nucleares sufren un proceso de degradación y vertido vacuolar en condiciones de herida, el análisis inmunocitoquímico reveló que la membrana nuclear que forma parte de y es continuación del retículo endoplasmático, no sufre descomposición o vertido vacuolar en estas condiciones. Por tanto, los *dominios ER-HMGR* tienen una identidad definida y son funcionalmente distintos a otros dominios del retículo endoplasmático.

Estudios ultraestructurales en raíces de plantas de *A. thaliana* col0, criofijadas 4 horas después de su seccionamiento y observadas al microscopio electrónico (Figura R50), indican que las células endodérmicas de raíz presentan en el interior de la vacuola un

elevado número de estructuras vesiculares de $\sim 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro, con una estructura interna heterogénea y delimitadas por una membrana. Las vacuolas de células endodérmicas de raíces no sometidas a herida, aparecen libres de vesículas u otras estructuras membranosas. El aspecto de las vesículas vacuolares de células endodérmicas es distinto al de las *vesículas de HMGR* de célula epidérmica y parenquimática por lo que no parecen ser las mismas estructuras. Incluso si estas estructuras son distintas a las *vesículas de HMGR*, su degradación vacuolar podría corresponder a un fenómeno similar al de vertido de *dominios ER-HMGR*, que ocurre de manera paralela.

Las observaciones realizadas señalan que el vertido de estructuras celulares al interior de la vacuola en condiciones de estrés por herida, no está restringido sólo a tipos celulares específicos, sino que ocurre en todas las partes de las plántulas de *A. thaliana* (raíz, cotiledones y hojas verdaderas), incluyendo células parenquimáticas y epidérmicas de cotiledón y hoja verdadera, y células endodérmicas de raíz. Así, esta respuesta celular a herida no sólo afecta a la zona de corte, sino que es general en toda la planta. Las observaciones al microscopio electrónico indican que las vesículas en vacuola se encuentran en todas las células de plántula, independientemente de su proximidad física con el sitio de corte. Se trata por tanto, de un tipo de respuesta rápida y sistémica, lo cual indica que es sumamente importante para la defensa y supervivencia de la planta.

2.3 Vertido a vacuola en respuesta a estrés químico.

La fijación química para estudios ultraestructurales implica la exposición de los tejidos a glutaraldehído y para-formaldehído por periodos de tiempo prolongados (Sauer *et al.*, 2006). Este tratamiento fija las macromoléculas y estructuras, pero no de manera inmediata, sino que puede precisar de algunos minutos u horas dependiendo del tejido para que el fijador difunda y penetre en toda la muestra formando un gradiente (Griffiths, 1993). Durante la exposición a glutaraldehído y para-formaldehído, las células sufren un tipo de estrés, que podemos denominar químico, y al que pueden responder mientras la fijación no es completa.

En células epidérmicas y parenquimáticas de cotiledón de *A. thaliana* silvestre procesadas por fijación química para su análisis al microscopio electrónico (Figura R51), se observan estructuras membranosas con forma de vesículas que son derivadas desde el citosol hacia el interior de la vacuola. Estas vesículas contienen un cúmulo de membranas muy probablemente procedentes del retículo endoplasmático, puesto que en algunos casos se observa continuidad con dicho orgánulo. Adicionalmente, se observan vesículas vertidas

a vacuola, que se encuentran emergiendo desde el tonoplasto. Estas vesículas contienen en su interior pequeños fragmentos de membranas probablemente en proceso de degradación. Esto sugiere que la degradación de las membranas de retículo RE en el interior de las estructuras vesiculares, se inicia antes de que éstas se escindan completamente del tonoplasto. Esta observación conduce a plantear la hipótesis de que las estructuras membranosas derivadas a vacuola podrían contener enzimas hidrolíticas propias, que median la degradación de su contenido, aún antes de que la vesícula sea liberada por completo a la vacuola. Las enzimas hidrolíticas de la vacuola participarían en la degradación de estas estructuras membranosas, pero desde su parte externa (Figura D3). Por tanto, los dominios de membranas reticulares derivados hacia vacuola en condiciones de estrés químico, podrían ser degradados por enzimas hidrolíticas internas y externas, todas ellas involucradas en la respuesta al estrés celular. En la observación al microscopio electrónico también se detectan vesículas reducidas a su membrana exterior, sin apenas contenido.

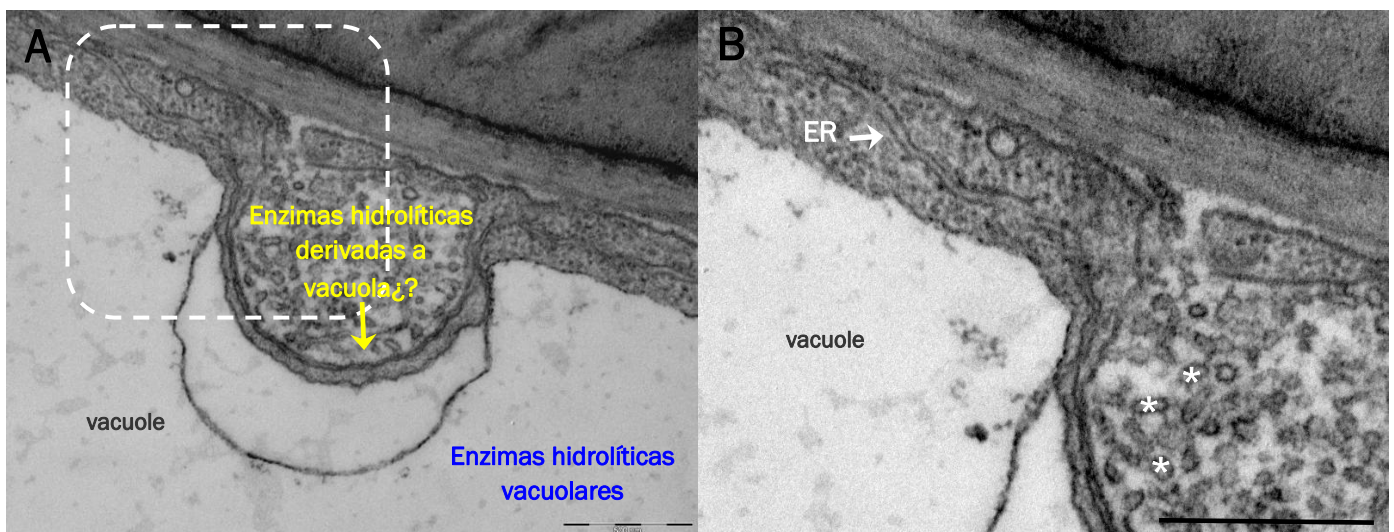


Figura D3. Vertido vesicular a vacuola de célula epidérmica. Cotiledones de plantas de *A. thaliana* col0 de 6 días, fueron fijados químicamente con glutaraldehído 1,5 % v/v y para-formaldehído 1,5 % v/v. Los cortes ultra-finos fueron observados al ME. **A y B.** Vesícula emergiendo del tonoplasto hacia vacuola, en continuidad con el retículo endoplasmático (ER). La degradación del contenido vesicular podría estar gestionada por enzimas presentes en dicho orgánulo y no sólo por enzimas vacuolares que actuarían desde el exterior. Las pequeñas vesículas de membranas en degradación están señaladas por asteriscos blancos. Las barras indican: 500 nm.

De modo similar se produce vertido de vesículas a vacuola en respuesta a estrés químico en plantas transgénicas 1S:GFP (Figura R52). En células epidérmicas y parenquimáticas de cotiledón de estas plantas se observan estructuras vesiculares en el interior de la vacuola, pero que tienen un mayor número de membranas densamente agrupadas. Estos agregados de membranas son semejantes a los *dominios ER-HMGR* característicos de plantas transgénicas 1S:GFP, lo cual confirma su procedencia a partir de retículo endoplasmático.

Se puede concluir que la exposición de las células de cotiledón de *A. thaliana* a glutaraldehído y para-formaldehído desencadena el vertido a vacuola de vesículas con membranas de retículo endoplasmático que proceden de dominios *ER-HMGR*. Esta respuesta se produce en todas las células. Aunque en el estudio sólo se analizaron células epidérmicas y parenquimáticas, el mismo fenómeno podría ocurrir de forma generalizada en la planta, en los distintos tipos celulares. Por otro lado, este proceso también se activa y ejecuta de manera muy rápida, puesto que se anticipa a la fijación de las estructuras con glutaraldehído y para-formaldehído.

Los datos anteriores plantean la posibilidad de que HMGR tenga algún rol en el vertido de vesículas membranosas a vacuola en respuesta a estrés. Para responder a ello, se analizó el proceso de vertido de estructuras vesiculares a vacuola en la línea mutante *hmg1-4* de *A. thaliana*, en condiciones de fijación química. Esta línea es *knock-out* para la expresión del gen *HMG1* que codifica para las isoformas HMGR1S y HMGR1L (Kim *et al.*, 2014), las cuales constituyen el 90 – 95 % del contenido total de HMGR en esta planta (Enjuto *et al.*, 1994). En la línea *hmg1-4* el número de vesículas vertidas a vacuola en respuesta a estrés químico se ve notoriamente reducido, en comparación con la línea silvestre. Los datos estadísticos se asimilan a una distribución de Poisson, e indican que esta diferencia es significativa con un valor $p < 0.001$, lo cual confirma que el gen *HMG1* es necesario para el proceso de vertido vacuolar. Por tanto, la HMGR cumple un rol importante en la formación de dominios de membrana *ER-HMGR*, que en condiciones de estrés son derivados directamente al interior de la vacuola. La ausencia de estos dominios en el mutante *hmg1-4* compromete el proceso de vertido de membranas. El remanente de estructuras vesiculares en vacuola observadas en la línea mutante, podría deberse a la expresión del gen *HMG2*.

Como ya se ha mencionado (Discusión, Sección 1.5), las líneas mutantes de *A. thaliana* *hmg1-3* y *hmg1-4*, están severamente afectadas en su viabilidad, crecimiento y fertilidad. Las alteraciones fenotípicas se hacen mucho más evidentes cuando las plantas son transferidas a tierra, lo que involucra algún tipo de estrés que afecta en gran medida a su porcentaje de supervivencia, puesto que muchas de estas plantas terminan muriendo. Sin embargo, líneas mutantes *hmg1-3* transformadas con 1S:GFPm, no sólo muestran una recuperación en la mayoría de defectos relacionados con la disrupción del gen *HMG1*, sino que también presentan un incremento del porcentaje de supervivencia, ya que no se ven tan afectadas tras su transferencia a tierra. Esto indica que los mutantes transformados con 1S:GFPm tienen una mejor adaptación a las condiciones ambientales y una mejor respuesta al estrés, presumiblemente, debido a que son capaces de formar dominios de membrana *ER-HMGR* (Figura R21). La inexistencia de

estos dominios en el mutante *hmg1* impediría el transporte de vesículas de retículo endoplasmático a vacuola, función que es recuperada mediante transformación con 1S:GFPm. Las observaciones de esta tesis son consistentes con un papel activo de HMGR en la constitución o gestión de los *dominios ER-HMGR* y no con su mera presencia como marcador de los mismos. La capacidad morfogénica del dominio de membrana de HMGR1S, observada en las construcciones 1S:GFP y 1S:GFPm, indica que HMGR está implicada en la formación y función de los *dominios ER-HMGR*. Cabe especular que la HMGR podría participar también en el proceso de vertido propiamente dicho, dado que es un marcador de las membranas derivadas a vacuola.

Los *dominios ER-HMGR* podrían contener enzimas hidrolíticas capaces de desencadenar respuestas de defensa, al ser liberadas a vacuola. La purificación de 1S:GFP mediante dos cromatografías de afinidad distintas y consecutivas desveló que esta construcción está asociada a gran variedad de enzimas hidrolíticas implicadas en procesos biológicos relacionados con el estrés celular en plantas. Las más significativas son: β -glucosidasas como PYK10 (BGL23) que es el constituyente mayoritario de los *ER bodies* de cotiledón y raíz de plántulas de *A. thaliana* (Hara-Nishimura and Matsushima, 2003); mirosinasas (BGL34 y BGL37) que son β -tioglucosidasas de la familia *Brassicaceae* involucradas en la defensa contra insectos ya que hidrolizan glucosinolatos (Burmeister *et al.*, 1997); la cisteín-proteasa RD21 que se localiza en los *ER bodies* y se expresa y es derivada hacia vacuola en respuesta a estrés; invertasas del tipo AtFruct3 y AtFruct4 reportadas como enzimas vacuolares expresadas en cotiledón y hoja verdadera de planta joven (Tymowska-Lalanne y Martin Kreis, 1998) (Tabla R7).

El análisis inmunocitoquímico de la presente tesis ha puesto de manifiesto que PYK10 y AtFruct4 colocalizan con HMGR en *ER bodies* (Resultados, Sección 3.2.3). El análisis proteómico señala la presencia adicional de otras enzimas hidrolíticas y también de proteínas relacionadas con morfogénesis de retículo endoplasmático. Esto último concuerda con las observaciones de ultraestructura, que sugieren una naturaleza dinámica en estos dominios. Las enzimas hidrolíticas deben ser movilizadas a vacuola en condiciones de estrés y su asociación con el dominio de membrana de HMGR resulta muy sugerente en este contexto. La HMGR de plantas está presumiblemente implicada en la constitución de dominios específicos de retículo endoplasmático (*dominios ER-HMGR*) que son la puerta de salida hacia vacuola en respuesta a estrés. El transporte de retículo endoplasmático a vacuola es un proceso directo y rápido que garantizaría la activación inmediata de toda una batería de enzimas hidrolíticas. Este podría ser un mecanismo de defensa general en plantas, pues los datos de la presente tesis y de tesis anteriores del

mismo grupo (Leivar, 2003; Antolín-Llovera, 2006; Ferrero, 2010) indican que la capacidad morfogenética de HMGR está conservada en todo el reino vegetal.

Recientemente, se han realizado estudios de la actividad enzimática de citóchromo C reductasa (marcador general del RE) en plantas de *A. thaliana* sometidas a herida. Los resultados indican que tras 90 min, la actividad citóchromo C reductasa se mantiene relativamente constante en comparación con la actividad HMGR, la cual disminuye un ~70 % en las mismas condiciones de estrés (N. Campos y M. Arró, *Resultados no publicados*). En plantas de *A. thaliana* 1S:GFP sometidas a herida, el vertido a vacuola ocurre en los *dominios ER-HMGR* y no en la membrana nuclear que forma parte y es continuación del retículo endoplasmático (Figura R47R). Durante el silenciamiento de 1S:GFP en hojas adultas, los *dominios ER-HMGR* desaparecen de las células, mientras que estas recuperan su estructura reticular normal que no se ve alterada por la degradación de 1S:GFP (Figura R24). Estas evidencias indican que sólo los subdominios específicos de retículo endoplasmático que contienen HMGR, son rápida y directamente derivados a vacuola en respuesta a estrés o durante procesos de desarrollo, manteniendo el resto de la estructura reticular intacta.

3. CARACTERIZACIÓN DE *ER BODIES* EN *A. thaliana*.

Los *ER bodies* son orgánulos especializados en defensa (Hayashi *et al.*, 2001), comunes en los miembros de la familia *Brassicaceae* y de los *Capparales*, que están estrechamente relacionados con las crucíferas (Iversen, 1970; Behnke and Eschlbeck, 1978). Se encuentran de forma constitutiva en células de tejido joven, y su biogénesis es inducida en tejidos adultos en condiciones de estrés, por herida o exposición a metil-jasmonato (MeJA) (Matsushima *et al.*, 2002). En ellos se acumulan específicamente proteínas implicadas en la defensa y presentan un contenido diferencial si son constitutivos (β -Glucosidasa PYK10) (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura, 2003) o inducidos (β -Glucosidasa BGLU18) (Ogasawara *et al.*, 2009). Se ha propuesto que los *ER bodies* constitutivos están especializados en la defensa de la planta en las primeras etapas de desarrollo que son más sensibles a estrés biótico o abiótico (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura *et al.*, 2004).

3.1 Análisis ultraestructural e inmunocitoquímico.

El análisis ultraestructural de *ER bodies* en células epidérmicas de cotiledón de líneas de *A. thaliana* GFP-HDEL reportado en trabajos anteriores, indica que éstos son estructuras alargadas con un contenido granular denso y están rodeados por una membrana reticular con ribosomas (Gunning, 1998; Hayashi *et al.*, 2001). Cabe señalar, no obstante que en *Raphanus sativus* el contenido de los *ER bodies* visualizados al microscopio electrónico, fue descrito inicialmente como granular o fibroso (Bonnet and Newcomb, 1965). Otros estudios ultraestructurales de *ER bodies* en distintas especies y tipos celulares, reveló que éstos podían presentar diferentes estructuras internas, como estructuras tubulares (*Sisymbrium officinate*), filamentosas o granulares (*Lunaria redivivas*) (Behnke and Eschlbeck, 1978).

El análisis ultraestructural de *ER bodies* en la presente tesis, se inició en células epidérmicas de raíz ó cotiledón de plantas de *A. thaliana* silvestres de 6 días, sistema en el que fueron identificados anteriormente (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003; Hara-Nishimura *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2011). En células epidérmicas de raíz procesadas por criofijación y en células epidérmicas de cotiledón fijadas químicamente (Figuras R29 y R30), se observaron *ER bodies* de 0,5 a 2 μm de diámetro, con una ultraestructura típica y claramente diferenciada de otros orgánulos, con un contenido granular denso, rodeados por una membrana reticular y algunos ribosomas (Figuras D4A y D4D). Los *ER bodies* se encontraron en el espacio citoplasmático en regiones próximas a los cloroplastos y en algunos casos en zonas cercanas al núcleo. Todas estas

características son muy similares y concuerdan con las reportadas en estudios anteriores (Hayashi *et al.*, 2001). Sin embargo, en el análisis ultraestructural en células epidérmicas de cotiledón procesadas por criofijación, se observaron estructuras vesiculares con un tamaño similar (0,5 a 2 μm), pero con una estructura interna membranosa (Figura R31), menos densa y compacta. Estas vesículas son similares a los *ER bodies* en cuanto a tamaño, distribución y abundancia en las células, pero también se asemejan a las *vesículas de HMGR* en lo que respecta a su estructura membranosa interna (Figuras D4B y D4F). Con el fin de confirmar la identidad de estas estructuras vesiculares membranosas se realizó un análisis inmunocitoquímico. Para este análisis se utilizaron anticuerpos policlonales contra enzimas hidrolíticas que se acumulan específicamente en los *ER bodies* y que por tanto son empleados como marcadores de los mismos. Ese es el caso de la enzima invertasa At β Fruct4 (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998), contra la que se dispone del anticuerpo denominado Ab-NR8, y la β -glucosidasa PYK10 (Matsushima *et al.*, 2002), reconocida por los anticuerpos Ab-PYK10-IM y Ab-PYK10-CM. El análisis inmunocitoquímico fue realizado en células epidérmicas de raíz y cotiledón, en plantas de *A. thaliana* silvestres (Figuras R34 - 37). En células epidérmicas de raíz, se observaron *ER bodies* con una estructura interna granular densa (Figura D4E), mientras que en células epidérmicas de cotiledón se observaron *ER bodies* con contenido membranoso (Figura D4C). El inmunomarcaje confirmó la identidad de ambos como *ER bodies*, si bien en el segundo caso también puede tratarse de derivados o formas inmaduras de los mismos.

Los *ER bodies* con contenido membranoso son similares a las *vesículas de HMGR*. Su semejanza se extiende a su morfología fusiforme de 1 - 2 μm de longitud y 0,5 - 1,5 μm de diámetro, que da secciones circulares o elípticas al microscopio electrónico, y estructura interna fibrosa o membranosa (Compárese Figura D4C con Figura D4F). Estos resultados confirman la semejanza entre *vesículas de HMGR* y *ER bodies*. Además de su coincidencia morfológica (Figura D4), las *vesículas de HMGR* y *ER bodies* tienen muchas características comunes que son resumidas en la tabla D1.

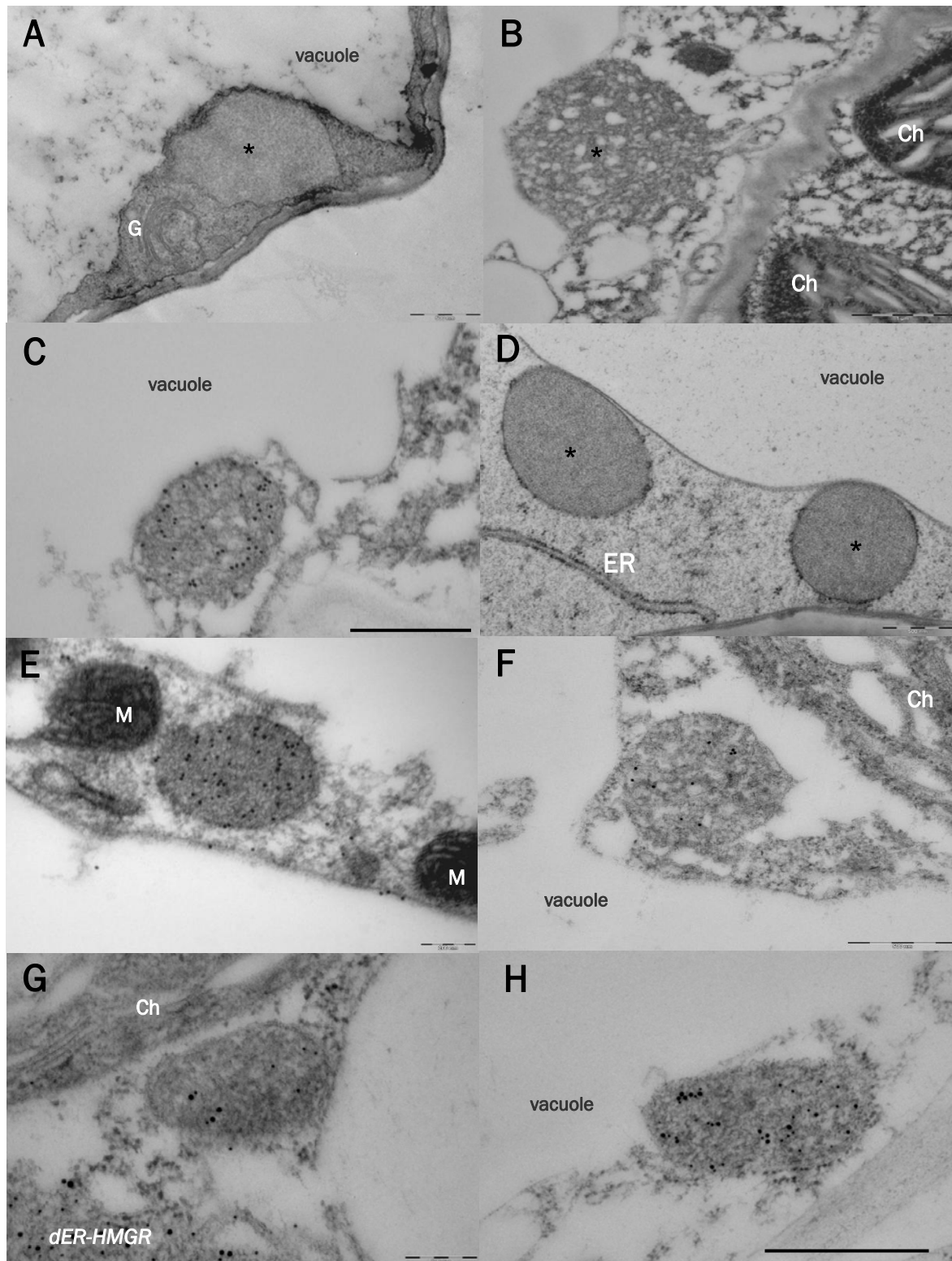


Figura D4. Análisis comparativo de la morfología de *ER bodies* y *vesículas de HMGR*. Ultraestructura de *ER bodies* en célula epidérmica de cotiledón de *A. thaliana* col0: **A.** Fijación química. **B.** Criofijación. **C.** Inmunomarcaje con Ab-NR8. Ultraestructura de *ER bodies* en raíz de *A. thaliana* col0: **D.** Célula endodérmica tras fijación química. **E.** Célula epidérmica tras fijación química, criosustitución e inmunomarcaje con Ab-NR8. Ultraestructura de *vesículas de HMGR*: **F.** Célula epidérmica de cotiledón de *A. thaliana* col0 tras criofijación e inmunomarcaje con Ab-26.8. **G.** Célula parenquimática de hoja verdadera de *A. thaliana* 1S:GFP tras criofijación e inmunomarcaje con Ab-26.8 (12 nm) y Ab-5450 (18 nm). **H.** Célula epidérmica de hoja verdadera de *A. thaliana* 1S:GFP 2.15.4 tras criofijación e inmunomarcaje con Ab-NR8 (12 nm) y Ab-5450 (18 nm). En A, B y D, los *ER bodies* están señalados por asteriscos. Ch: Cloroplasto, G: Aparato de Golgi, M: Mitocondria, ER: Retículo endoplasmático, *dER-HMGR*: *Dominio ER-HMGR*. Las barras indican: A, D, F y H, 500 nm; E y G, 200 nm; B, 1 μ m.

Tabla D1. Comparación entre *ER bodies* y *vesículas de HMGR* de *A. thaliana* silvestre.

	<i>ER bodies</i>	<i>Vesículas de HMGR</i>
Distribución	Células epidérmicas de raíz ¹ Células endodérmicas de raíz Células epidérmicas de cotiledón ² Células parenquimáticas de cotiledón	Células epidérmicas de cotiledón Células parenquimáticas de cotiledón ³
Localización subcelular	Espacio citoplasmático, en regiones próximas a cloroplastos	
Morfología global	Vesículas esféricas alargadas, variables en tamaño y forma	
Tamaño	0,5 - 2 µm de diámetro ³	
Contenido	Vesículas con estructura interna membranosa	
Naturaleza	Estructuras derivadas del retículo endoplasmático ^{3,6}	
Función	Defensa contra agentes bióticos y abióticos ^{2,4,5}	Defensa frente a estrés
Derivación a vacuola?	Si, en respuesta a estrés salino ⁴	Si, en respuesta a estrés por herida y fijación química

Referencias: 1. Rojo *et al.*, 2003; 2. Matsushima *et al.*, 2002; 3. Ferrero, 2010; 4. Hayashi *et al.*, 2001; 5. Yamada *et al.*, 2011; 6. Behnke and Eschlbech, 1978. Cuando no se indica referencia bibliográfica, la observación se ha realizado por primera vez en la presente tesis. En los otros casos, los resultados de la tesis confirman las observaciones anteriores.

Adicionalmente, el análisis inmunocitoquímico realizado en células epidérmicas de cotiledón de *A. thaliana* silvestre, indica que los *ER bodies* tienen contenido diverso, con varios tamaños, formas y texturas, desde estructuras fibrosas o membranosas distendidas, hasta tramas todavía fibrosas o membranosas pero más densas y compactas (Figura D5). Estas observaciones contrastan con las características ultraestructurales reportadas anteriormente para *ER bodies* de *A. thaliana* cuyo contenido fue definido como granular (Hayashi *et al.*, 2001). Los resultados también sugieren que los *ER bodies* al igual que las *vesículas de HMGR*, se forman a partir de la asociación y compactación de membranas de retículo endoplasmático. Por tanto, los *ER bodies* con estructuras internas membranosas podrían corresponder a formas inmaduras de dicho orgánulo.

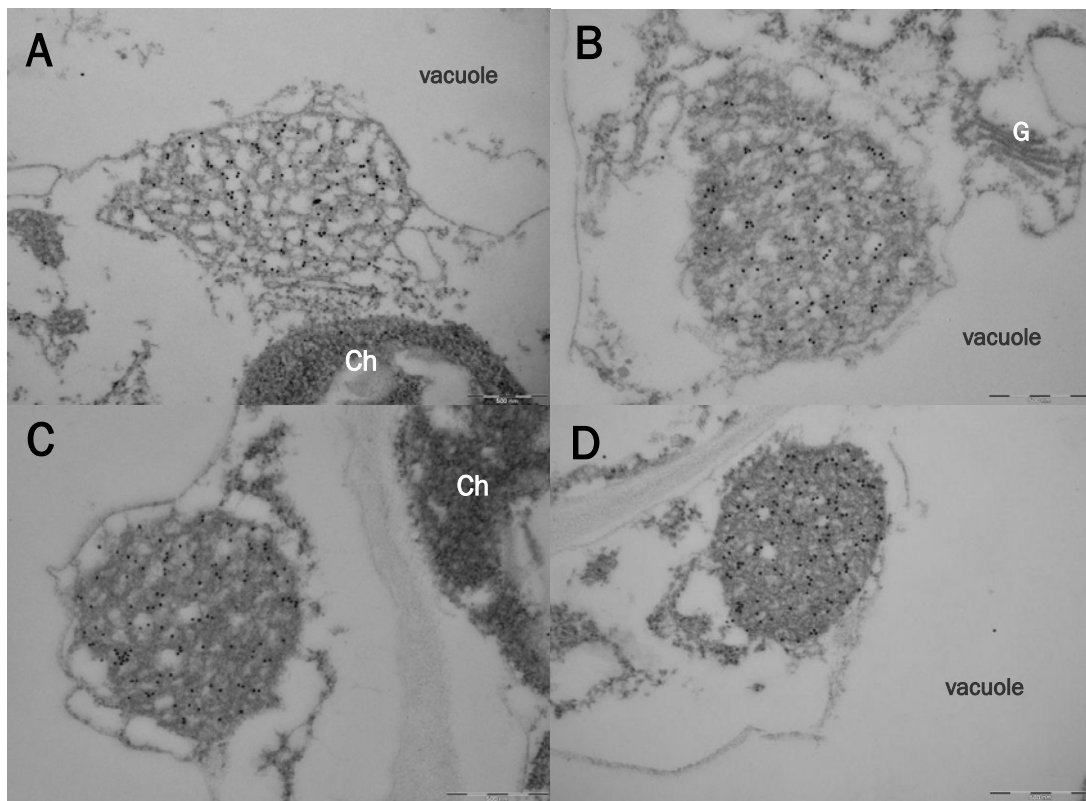


Figura D5. Inmunocitoquímica de *ER bodies* en cortes ultra-finos de cotiledón de *A. thaliana* col0. Se observan *ER bodies* de célula epidérmica, con contenido membranoso, inmunomarcados. **A y D.** Ab-PYK10-IM. **B y C.** Ab-NR8. Se evidencian estructuras internas membranosas en distintos grados de compactación. Ch: Cloroplasto; G: Aparato de Golgi. Las barras indican: 500 nm.

El análisis ultraestructural e inmunocitoquímico de células epidérmicas de cotiledón de plantas transgénicas de 10 días sometidas a herida, mostró la presencia de *ER bodies* en el espacio vacuolar con forma elíptica, contenido granulado denso y rodeados por una membrana reticular. No se observaron membranas internas en estas estructuras, puesto que el inmunomarcaje con Ab-26.8 y Ab-5450 se localizó exclusivamente sobre la membrana externa de dichos orgánulos y no en su interior. La ultraestructura y el inmunomarcaje en estos *ER bodies* con contenido granular son distintos a los descritos en tejidos más jóvenes no sometidos a estrés, en los que se observaron *ER bodies* con estructura membranosa reticular interna distendida. Estas diferencias sugieren que los *ER bodies* de órganos más desarrollados adquieren un aspecto granular más denso a los electrones, debido quizás a la gran acumulación de enzimas hidrolíticas en su interior, lo que conlleva a que las membranas reticulares internas se compacten mucho más, posiblemente hasta fusionarse entre sí y desaparecer, quedando simplemente la membrana exterior que rodea a esta cisterna cargada de enzimas. De esta manera, el inmunomarcaje correspondiente a 1S:GFP, observado en el interior de los *ER bodies* inmaduros también desaparece, quedando desplazado hacia la única membrana reticular circundante. La doble inmunodetección de HMGR y 1S:GFP en la periferia de *ER-bodies*

observada al microscopio electrónico coincide con lo detectado también en plantas transgénicas 1S:GFP con la técnica de *whole mount* (Ferrero, 2010) (Figura D6).

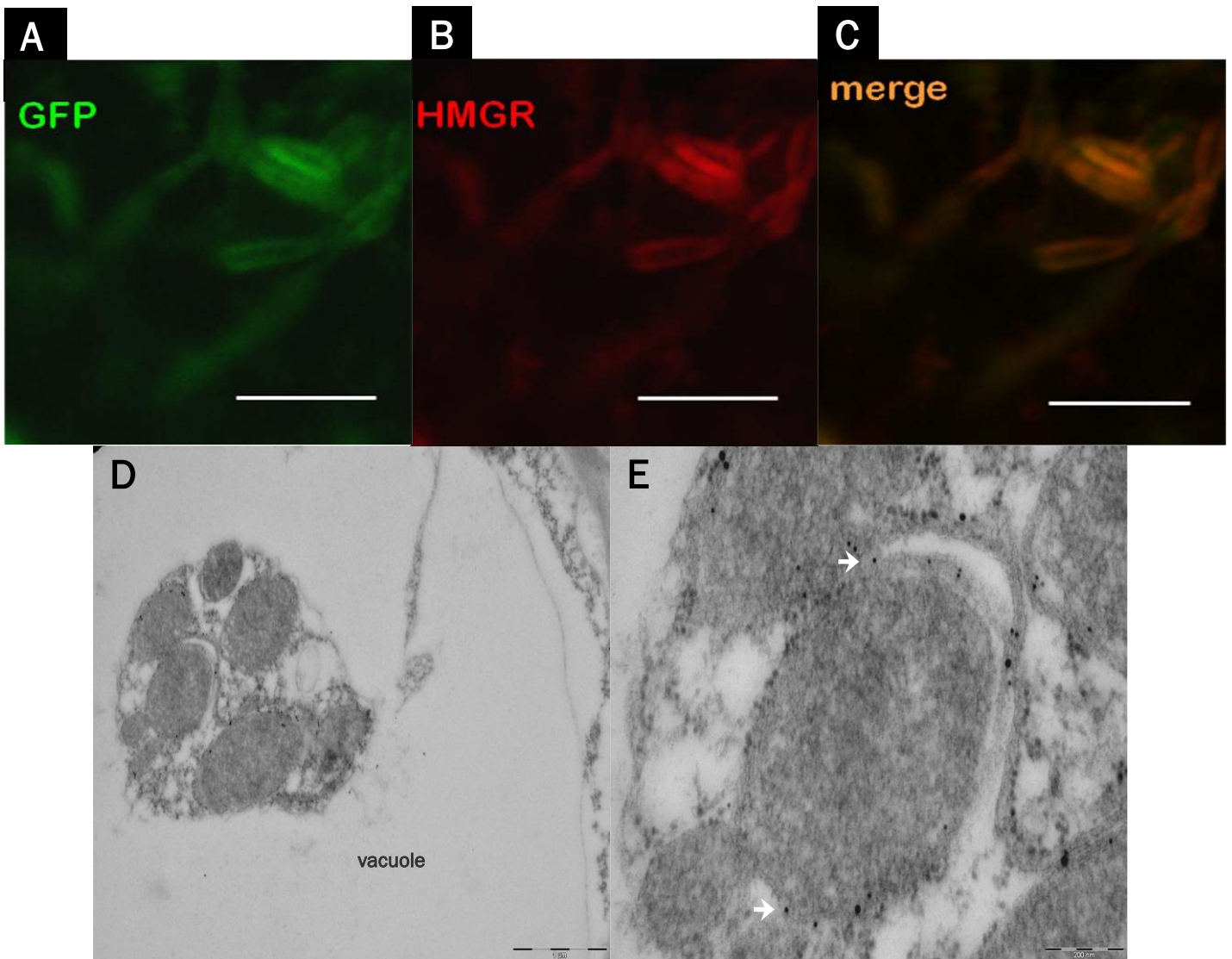


Figura D6. Colocalización de HMGR endógena y quimera 1S:GFP en plantas transgénicas de *A. thaliana*. **A – C.** Doble inmunocitoquímica *in-situ* (*whole mount*) en plantas de 6 días de la línea 1S3.11 de *A. thaliana*. Las imágenes corresponden a célula epidérmica de cotiledón. El color rojo a fluorescencia de HMGR, mientras que el verde a 1S:GFP. La colocalización de ambas proteínas en la membrana externa de estructuras vesiculares, se observa en color naranja. Las barras indican 10 μm . (Extraído de Ferrero, 2010). **D y E.** Doble inmunocitoquímica al microscopio electrónico, en cortes ultra-finos de cotiledón de plantas de 10 días de la línea 2.15.4 criofijados tras 1 h de tratamiento de herida. Tanto 1S:GFP (partículas de 18 nm), como HMGR (partículas de 12 nm) (señaladas por flechas) se localizan en la membrana exterior de *ER bodies* que se hallan en el interior de la vacuola. Las barras indican: A, B y C, 10 μm ; D, 1 μm ; E, 200 nm.

Las observaciones anteriores permiten plantear la hipótesis de que los *ER bodies* se generan a partir de estructuras membranosas laxas que se van compactando progresivamente en su maduración. Un proceso de desarrollo estructural común a todos los *ER bodies* podría implicar distintas posibilidades de diferenciación en las que se

podieran reclutar distintos contenidos proteicos, explicando así las diferencias propuestas entre *ER bodies* de tipo constitutivo o inducido.

Los *ER bodies* actúan como mediadores en el transporte de proteasas y enzimas hidrolíticas desde el RE al espacio vacuolar. Esta ruta difiere de la movilización de proteasas desde el RE, al aparato de Golgi y, de allí, a la vacuola, con la participación de la maquinaria de transporte vesicular (Hayashi, *et al.*, 2002). De esta manera, los *ER bodies* almacenan precursores inactivos de enzimas hidrolíticas que son derivados de modo directo y rápido hacia la vacuola en condiciones de estrés.

Estudios previos señalan que en plántulas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino, los *ER bodies* se fusionan unos con otros y finalmente con la vacuola (Hayashi *et al.*, 2001). Sin embargo, estos estudios fueron realizados en tejidos muy afectados por la exposición directa a una concentración salina relativamente elevada (100 mM de NaCl) por un tiempo muy largo (24 h). Por tanto, este proceso podría desencadenarse más bien por degeneración del tejido. Sin embargo, los *ER bodies* de célula epidérmica de cotiledón sometido a herida, reportados en la presente tesis, constituyen una primera evidencia de que los mismos son derivados hacia vacuola en un tiempo más corto, cuando los órganos afectados todavía son perfectamente viables. Por tanto, el proceso de derivación vacuolar de *ER bodies* en respuesta a herida es bastante rápido, puesto que los cotiledones de 10 días fueron procesados por criofijación tan sólo una hora después de su seccionamiento con bisturí.

Se ha reportado que los *ER bodies* constitutivos se encuentran localizados únicamente en células epidérmicas de cotiledón y raíz de *A. thaliana*, especialmente en plantas jóvenes (Hayashi *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003; Hara-Nishimura *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2011). A lo largo del análisis ultraestructural de los *ER bodies* en *A. thaliana* silvestre realizado en la presente tesis, se evidenció la presencia de *ER bodies* no sólo en células epidérmicas, sino también en células endodérmicas de raíces criofijadas (Figura R32) y en células parenquimáticas de cotiledones fijados químicamente (Figura R33). En todos los casos se observan *ER bodies* con un contenido granular denso y con ribosomas en su membrana, localizados en los espacios citoplasmáticos y algunas veces próximos al núcleo. Por tanto, durante las primeras etapas de desarrollo de la planta, los *ER bodies* son abundantes y se encuentran ampliamente distribuidos, localizándose de forma constitutiva no sólo en células epidérmicas, sino también en diferentes tipos celulares como células endodérmicas de raíz y células parenquimáticas de cotiledón, en los que no habían sido reportados hasta el momento.

3.2 Relación física y funcional entre *ER bodies* y dominios *ER-HMGR*.

Un estudio anterior de *whole mount* en plantas transgénicas de *A. thaliana* GFP-HDEL, sugiere que las *vesículas de HMGR* coinciden físicamente con los *ER bodies* (Ferrero, 2010). Sin embargo, uno de los inconvenientes técnicos reportados durante la realización de esta técnica, fue la poca eficiencia del inmunomarcaje. El anticuerpo anti-CD1 (Ab-26.8) que es altamente específico para la detección de HMGR, presentó problemas de inmunomarcaje cuando fue combinado con un anticuerpo anti-GFP. Para diferenciar ambas señales, la concentración de ambos anticuerpos tuvo que ser incrementada un orden de magnitud y, como consecuencia, provocó un aumento en la señal de fondo (Ferrero, 2010).

Para determinar la relación física entre *ER bodies*, *vesículas de HMGR* y dominios *ER-HMGR*, se realizaron dobles inmunocitoquímicas con anticuerpos Ab-5450 contra GFP y Ab-NR8 contra AtFruct4, sobre secciones de cotiledón de plantas transgénicas 1S:GFP. Los ensayos de colocalización indicaron que la enzima invertasa At β Fruct4 (marcador de *ER bodies*) y la quimera 1S:GFP (marcador de *vesículas de HMGR*) colocalizan en estructuras vesiculares membranosas (Figura R41). La presencia de 1S:GFP sobre las membranas internas de los *ER bodies* confirma su naturaleza reticular y sugiere que estas podrían derivar de dominios *ER-HMGR*. Estas observaciones concuerdan con los resultados de ensayos de purificación de 1S:GFP y el posterior análisis proteómico, en los que se observa co-purificación con enzimas hidrolíticas propias de *ER bodies* (Tabla R7). Estos resultados constituyen una prueba de coincidencia física entre *ER bodies* y *vesículas de HMGR*. Dado que la mayor parte de 1S:GFP se encuentra en dominios *ER-HMGR* también es posible que las enzimas hidrolíticas purificadas con ella estén en este dominio, del cual se originan los *ER bodies*.

Los *ER bodies* se encuentran de forma constitutiva en células de cotiledón y tejidos jóvenes en desarrollo, pero en hojas de roseta se forman *de novo* en respuesta a estrés (Yamada *et al.*, 2011). Los *ER bodies* constitutivos o inducidos tienen distinto contenido de enzimas hidrolíticas (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-Nishimura, 2003; Ogasawara *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2011). El análisis ultraestructural de los *ER bodies* en la presente tesis, fue realizado en distintos tipos celulares de tejidos jóvenes provenientes de plántulas de *A. thaliana* de 6 y 10 días. El análisis inmunocitoquímico fue realizado en plantas procesadas por criofijación de tal forma que las plantas fueron congeladas de manera rápida, sin que pudieran responder a estrés, ni pudieran generar *ER bodies* inducidos. Por tanto, los *ER bodies* estudiados hasta el momento eran del tipo constitutivo.

Aunque la presencia de HMGR en los *ER bodies inducidos* no ha sido demostrada en la presente tesis, no se puede descartar que los *ER bodies* observados previamente en células parenquimáticas, mediante ensayos de *whole mount* (Ferrero, 2010), sean *ER bodies inducidos*. La fijación química, el tratamiento enzimático y la exposición a disolventes orgánicos necesarios para llevar a cabo la técnica, podrían haber actuado como factores de estrés, desencadenando la formación de estas estructuras.

Para estudiar la formación de *ER bodies* constitutivos, se muestreó el primer par de hojas verdaderas de plántulas de 10 días de *A. thaliana* 1S:GFP (línea 2.15.4). Estas hojas procesadas por criofijación, constituyeron un material idóneo, puesto que se encontraban aún en las primeras etapas de desarrollo, lo que aumentaba las posibilidades de encontrar *ER bodies* en estadios iniciales de formación. Los ensayos inmunocitoquímicos realizados empleando los anticuerpos Ab-NR8 y Ab-PYK10-IM contra At β Fruct4 (invertasa) y PYK10 (β -glucosidasa), que son enzimas hidrolíticas almacenadas en *ER bodies*, y el anticuerpo Ab-5450, que reconoce a la 1S:GFP localizada en los dominios *ER-HMGR*, indican que los *ER bodies* se forman a partir de la proliferación y acumulación de membranas de retículo endoplasmático provenientes específicamente de dominios *ER-HMGR* (Figuras R38 y R42). Aunque los procesos moleculares relacionados con la diferenciación de los *ER bodies* a partir de estos dominios no han sido determinados, la heterogeneidad observada en la distribución y densidad del inmunomarcaje, indica que durante su formación se produce un fenómeno de reclutamiento y concentración de At β Fruct4 (invertasa) y PYK10 (β -glucosidasa) en estas estructuras (Figura R42). La densidad de inmunomarcaje correspondiente a At β Fruct4 y PYK10, es menor en los dominios *ER-HMGR* (Figura R38) que en las vesículas que se están diferenciando a *ER bodies* (Figura R42), sugiriendo que las enzimas hidrolíticas son movilizadas a través de los dominios *ER-HMGR*, hasta concentrarse en regiones o subdominios de membranas específicos que darán origen a los *ER bodies*.

Se ha observado que la expresión de 1S:GFP en plantas transgénicas induce la proliferación de membranas y la formación de grandes agregados de retículo endoplasmático en las células. El tamaño de los *ER bodies* que se forman en los dominios *ER-HMGR/1S:GFP* no se ve incrementado en plantas transgénicas. En plantas silvestres no transformadas, los *ER bodies* se deben generar a partir de dominios *ER-HMGR* definidos, aunque el tamaño de los mismos sea muy reducido con respecto al de los dominios *ER-HMGR/1S:GFP* de las plantas transgénicas. Los mecanismos moleculares de biogénesis y diferenciación de *ER bodies* no se ven afectados por la hipertrofia del dominio *ER-HMGR*. El mayor desarrollo de las regiones de retículo endoplasmático ricas

en HMGR permite visualizar mejor la biogénesis de *ER bodies*, pero no parece alterar dicho proceso.

La sobreexpresión de 1S:GFP en plantas transgénicas de *A. thaliana*, da lugar a hipertrofia de retículo endoplasmático en zonas de la célula que también contienen *ER bodies*. Tal como ya se ha comentado, los *ER bodies* se originan a partir de acúmulos de retículo endoplasmático liso que constituyen *dominios ER-HMGR*. En hojas de *N. benthamiana* transfectada con 1S:GFP también se produce hipertrofia de membranas de retículo endoplasmático liso, con orgánulos similares a *ER bodies* adyacentes. La forma, tamaño, envoltura de membrana y textura interior granular densa de estos orgánulos y su ubicación también próxima a la vacuola son características similares a los *ER bodies* maduros de *A. thaliana* (Figura D7). Esta es la primera descripción de *ER bodies* al microscopio electrónico en *Nicotiana*, que sólo ocasionalmente habían sido observados al microscopio confocal utilizando GFP como marcador de lumen de retículo endoplasmático (Hawes *et al.*, 2001).

La agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* supone un estrés de tipo mecánico, puesto que se produce lesión en las zonas de tejido infiltradas, y también un estrés de tipo biótico debido a que las células son infectadas por *Agrobacterium*. La ultraestructura de estas células fue analizada tres días después de la agroinfiltración. Estudios previos realizados en plantas transgénicas de *A. thaliana* GFP-HDEL indican que la formación de *ER bodies* es inducida por herida en hojas de roseta. Estos *ER bodies inducidos* fueron observados tras 48 y 66 h de la agresión (Matsushima *et al.*, 2002). Por tanto, es bastante probable que las estructuras vesiculares observadas en *N. benthamiana* adyacentes a acúmulos de retículo endoplasmático liso y a vacuola correspondan a *ER bodies inducidos* (Figura D7).

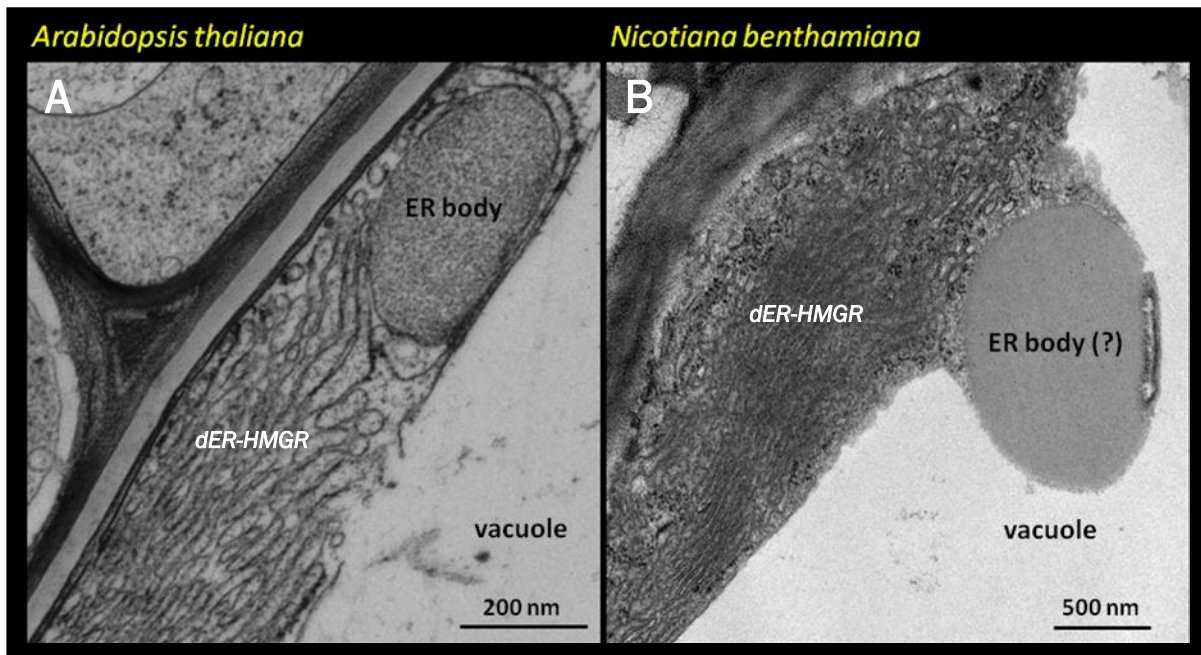


Figura D7. Ultraestructura de *ER bodies* en tejidos procesados por fijación química. **A.** Célula epidérmica de raíz de *A. thaliana* 1S:GFP 2.15.4 de 10 días. **B.** Célula epidérmica de hoja de *N. benthamiana* observada al tercer día de la agroinfiltración. En ambos sistemas la expresión de 1S:GFP fue constatada por microscopio de fluorescencia. Se observan *dominios ER-HMGR* (*dER-HMGR*) adyacentes a estructuras vesiculares reconocidas como *ER bodies*. Las barras indican: A, 200 nm; B, 500 nm.

Se ha propuesto que los *ER bodies* juegan un papel fundamental en la muerte celular programada y en la defensa contra agentes bióticos y abióticos (Hayashi, *et al.*, 2001; 2001; Yamada *et al.*, 2011). En dichos trabajos se observó que son derivados a vacuola tras 24 h de exposición a una solución salina (100 mM de NaCl). En la presente tesis, se muestra que acúmulos de retículo endoplasmático liso con abundante HMGR son derivadas a vacuola en respuesta a herida o estrés químico. Este es un proceso rápido, que ocurre en un tiempo mucho más corto que la derivación de *ER bodies* a vacuola descrito en trabajos previos (Hayashi *et al.*, 2001).

El dominio N-terminal de HMGR1S induce la proliferación y acúmulo de membranas de retículo endoplasmático liso que constituyen *dominios ER-HMGR*, a partir de los cuales se diferencian *ER bodies*. Los *dominios ER-HMGR* son vertidos a vacuola en respuesta a estrés y el gen *HMG1* de *A. thaliana* es necesario para dicha respuesta. Dado que los *ER bodies* emanan físicamente de *dominios ER-HMGR* y también son vertidos a vacuola en respuesta a estrés, es muy probable que la HMGR presente en estos orgánulos tenga un papel en su biogénesis y derivación vacuolar. En plantas transgénicas 1S:GFP, la quimera colocaliza con la HMGR endógena. La presencia de 1S:GFP en los *ER bodies*, sugiere que el dominio N-terminal de HMGR1S podría tener alguna función en los mismos. El análisis proteómico a partir de la purificación de 1S:GFP de plantas transgénicas, sugiere la implicación de diversas proteínas en la biogénesis y diferenciación de *ER bodies*. Éstas

podrían interaccionar de forma directa o indirecta con la HMGR de los *ER bodies* y cumplir funciones específicas. Este podría ser el caso de las dinaminas y reticulones. Aunque la información acerca del rol de los reticulones en plantas es escasa, se conoce que en el genoma de *A. thaliana* se encuentran codificadas al menos 19 variantes de reticulón (Tolley *et al.*, 2008). Los reticulones inducen la curvatura en las membranas de retículo endoplasmático gracias a su doble segmento transmembrana (Barlowe, 2009). Podrían participar en la diferenciación de las estructuras vesiculares de *ER bodies* en formación. Las dinaminas son proteínas integrales de membrana con actividad GTPasa (G proteínas) que median la fusión y fisión de membranas de retículo endoplasmático (Barlowe, 2009). Podrían participar en la fusión de las membranas reticulares internas de los *ER bodies* en formación, para dar lugar a *ER bodies* maduros con un elevado contenido de enzimas hidrolíticas, e incluso también en la fusión de los *ER bodies* entre sí, y de éstos con la vacuola en condiciones de estrés. Por tanto, el dominio de membrana de HMGR1S podría actuar como un mediador importante en todos estos procesos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- I. Se ha expresado la quimera 1S:GFP formada por el dominio de membrana de HMGR1S unido a GFP en hoja de *N. benthamiana*. En célula epidérmica, esta construcción se localiza en la trama de retículo endoplasmático (RE) pero se acumula principalmente en unos agregados de dicho orgánulo de 10 a 20 μm de diámetro, cuya ubicación habitual es peri-nuclear. Las células no transfectadas carecen de agregados de RE. Su formación es inducida por expresión de la quimera 1S:GFP, la cual tiene, por tanto, un efecto morfogenético. Los agregados son parte intrínseca del retículo endoplasmático, pues contienen marcadores específicos del mismo, pero su aparición comporta la desestructuración generalizada de este orgánulo.
- II. La expresión de la quimera 1S:GFPm formada por el dominio de membrana de HMGR1S unida a una variante monomérica de GFP, en hoja de *N. benthamiana*, induce la formación de agregados peri-nucleares de tamaño y forma similar a los observados tras la expresión de 1S:GFP. El análisis ultraestructural de los agregados de 1S:GFPm tras fijación química reveló que éstos presentan la misma distribución de membranas de RE liso que los agregados de 1S:GFP. El efecto morfogenético de la quimera 1S:GFP se debe al dominio de membrana de HMGR1S y no a la GFP. La dimerización de la GFP no influye en el espaciado entre membranas, que es similar en agregados 1S:GFP y agregados 1S:GFPm, pero podría contribuir a la compactación de éstos durante la fijación química con glutaraldehído y para-formaldehído.
- III. En el sistema de expresión de hoja de *N. benthamiana*, la quimera Δ R1S:GFP, carente del motivo conservado de argininas, y la quimera 1L:GFP, portadora de la región 1L-extra de HMGR1L, se localizan exclusivamente en la trama de RE y no dan lugar a la formación de agregados. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente con las mismas construcciones en el sistema homólogo de *A. thaliana*, lo cual reafirma el papel de la región N-terminal de la HMGR de plantas en su localización subcelular y en la capacidad morfogenética de la proteína.
- IV. Se han generado cinco líneas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*, homocigotas para una sola copia de transgén, que fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina y por su nivel y patrón de fluorescencia. Estas líneas tienen un patrón de expresión de 1S:GFP elevado y generalizado en la planta. En el estado de plántula, las líneas transgénicas presentan agregados de RE en todos sus tipos celulares. La expresión de 1S:GFP desaparece a las 3 ó 4 semanas de desarrollo y

reaparece en sucesivas generaciones. El silenciamiento de 1S:GFP está asociado con el restablecimiento de un patrón normal de RE.

- V. Los agregados de RE inducidos por 1S:GFP en células de *A. thaliana* y *N. benthamiana* están constituidos por asociación y compactación de membranas de RE liso, que presentan distintos patrones de organización con membranas sinusoidales, lamelares y concéntricas. A diferencia de lo observado al microscopio electrónico tras fijación química, los agregados obtenidos tras criofijación tienen patrones de membranas más desordenadas, heterogéneas y distendidas. Aunque las membranas dejan un espacio citoplasmático estrecho, de ~10 nm, las zonas de lumen son relativamente amplias y tienen forma y tamaño variable. Los agregados observados tras criofijación están rodeados por bucles periféricos que parecen cerrarse sobre una estructura interna más compacta. Posiblemente, este aspecto refleja más fielmente la estructura nativa de los agregados de RE *in vivo*, lo cual sería consistente con una naturaleza dinámica de los mismos.
- VI. Los agregados de RE inducidos por 1S:GFP son similares a estructuras OSER inducidas por HMGR u otras proteínas de membrana, en células animales y levadura, pero descritas ahora por primera vez en plantas. La capacidad morfogénica del dominio de membrana de HMGR se ha mantenido en la evolución en los tres reinos eucariotas, hongos animales y plantas, a pesar de que ni su estructura ni su secuencia están conservadas.
- VII. Estudios inmunocitoquímicos en microscopía confocal y electrónica demuestran que la quimera 1S:GFP colocaliza con HMGR endógena en retículo endoplasmático, *vesículas de HMGR*, *ER bodies* y membrana nuclear, en diversos tipos celulares de plantas transgénicas 1S:GFP de *A. thaliana*. La ausencia del dominio catalítico de HMGR en la quimera 1S:GFP no afecta a su localización subcelular ni a su capacidad morfogénica, que depende enteramente del dominio de membrana. En los agregados de retículo endoplasmático, HMGR y 1S:GFP tienen una distribución homogénea sobre las estructuras membranosas. Estos agregados constituyen, por tanto, un dominio específico caracterizado por la presencia de HMGR, para el que se propone la denominación de *dominio ER-HMGR*.
- VIII. Se han caracterizado las *vesículas de HMGR* de *A. thaliana*, identificadas previamente mediante ensayos de inmunocitoquímica *whole mount*. El análisis ultraestructural e inmunocitoquímico, indica que las *vesículas de HMGR* presentan una estructura interna membranosa y tamaño variable de 0,5 a 2 μm de diámetro. Estas estructuras no se encuentran únicamente en células parenquimáticas de cotiledón, tal como se reportó anteriormente, sino también en

- células epidérmicas, lo cual indica su amplia distribución en los órganos aéreos de la planta, durante las primeras fases de desarrollo.
- IX. Se ha caracterizado el mutante *hmg1-4* de *A. thaliana*, que es *knock-out* para el gen *HMG1*. Al igual que el mutante *hmg1-3* anteriormente descrito, éste se desarrolla normalmente en condiciones estériles de cultivo *in vitro*, pero muestra una viabilidad muy reducida, enanismo y muy baja fertilidad al ser transferido a tierra, lo cual denota sus dificultades en la adaptación a condiciones adversas. Si el mutante *hmg1-3* es transformado con la quimera 1S:GFPm se forman de nuevo dominios ER-HMGR en las células y se recupera en gran medida un fenotipo normal. Estas observaciones ponen de manifiesto la importancia biológica del dominio de membrana de la HMGR de plantas.
- X. Se han caracterizado funcionalmente los dominios ER-HMGR en células epidérmicas y parenquimáticas de cotiledón y hoja verdadera de plántulas de *A. thaliana*. Estudios ultraestructurales e inmunocitoquímicos demuestran que el estrés químico causado por exposición a glutaraldehído y para-formaldehído o el estrés de herida desencadenan el vertido a vacuola de vesículas con contenido de membranas o membranas libres, derivadas de dominios ER-HMGR. Este transporte de retículo endoplasmático a vacuola es directo, pues no implica paso a través del aparato de Golgi, y sumamente rápido, pues se inicia y ejecuta en pocos minutos. Esto conduce a la degradación completa de las vesículas membranosas en menos de tres horas tras el estímulo de estrés inicial. La respuesta es más evidente en plantas transgénicas 1S:GFP, por la hipertrofia de los dominios ER-HMGR, pero se da también en plantas silvestres. Se produce de manera sistémica en la planta, aun cuando la agresión sea localizada. La rapidez del proceso y su naturaleza sistémica ponen de manifiesto su importancia para la supervivencia de la planta en condiciones de estrés.
- XI. La HMGR es un marcador proteico de los dominios ER-HMGR y es vertida a vacuola en respuesta a estrés. La cuantificación del número de vesículas en vacuola de célula epidérmica de cotiledón, comparando plantas silvestres y mutantes *hmg1-4* de *A. thaliana* fijadas con glutaraldehído y para-formaldehído, demuestra que el proceso de vertido se halla severamente comprometido en la línea mutante *hmg1-4*. El gen *HMG1* es, por tanto, necesario para dicho proceso. La proteína HMGR1S podría ser requerida por su papel esencial en la formación de dominios ER-HMGR o incluso por su participación directa en el proceso de derivación y vertido a vacuola.

- XII. Los *ER bodies* se encuentran ampliamente distribuidos, de forma constitutiva, en la planta de *A. thaliana* durante las primeras etapas de desarrollo. Además de su localización ya descrita en células epidérmicas de cotiledón, hipocótilo y raíz, en la presente tesis se han identificado *ER bodies* en estructuras más internas como células endodérmicas de raíz y células parenquimáticas de cotiledón.
- XIII. Los *ER bodies* de plántulas de *A. thaliana* silvestres y transgénicas 1S:GFP se visualizan al microscopio electrónico como orgánulos de sección circular o elíptica, de 1 a 2 μm de largo y de 0,5 a 1,5 μm de ancho, que corresponden a los cuerpos fusiformes descritos previamente. La textura interna de los *ER bodies* varía en función del tipo celular y de la técnica preparativa utilizada. En células epidérmicas, endodérmicas y parenquimáticas de raíz o cotiledón fijadas químicamente, los *ER bodies* son visualizadas con un contenido granulado. En células epidérmicas de raíz, cotiledón o primordio de hoja verdadera, los *ER bodies* tienen un contenido membranoso con distintos grados de compactación. Se observa una progresión de estructuras laxas en las que los espacios intermembranosos ocupan la mayor parte del orgánulo, hasta estructuras membranosas densas de espacios más cerrados, en las que la textura se aproxima a la de un contenido granular.
- XIV. Las *vesículas de HMGR* y los *ER bodies* coinciden en tamaño, distribución en la célula, morfología al microscopio electrónico, estructura interna membranosa, origen a partir de *dominios ER-HMGR* y derivación a vacuola en condiciones de estrés y son, por tanto, estructural y funcionalmente muy similares. Asimismo, el análisis inmunocitoquímico en cotiledón y hoja verdadera de plantas transgénicas de *A. thaliana* 1S:GFP, con anticuerpos específicos demuestra coincidencia física entre dichos orgánulos. Se puede concluir que *vesículas de HMGR* y *ER bodies* corresponden a una misma estructura.
- XV. Se propone un modelo para la biogénesis de *ER bodies* apoyado en datos ultraestructurales e inmunocitoquímicos de plantas de *A. thaliana* silvestres y transgénicas 1S:GFP. Los *ER bodies* se originan a partir de *dominios ER-HMGR* como unos cuerpos o vesículas membranosas de retículo endoplasmático liso, de aproximadamente 0.2 a 0,5 μm de diámetro, delimitados por una membrana externa que define su forma global esférica o elíptica. Estas estructuras son primordios de *ER body*, que contienen HMGR y sobre los que se movilizan y concentran enzimas hidrolíticas propias de este orgánulo, tales como la invertasa At β Fruct4 y β -glucosidasa PYK10. Durante el proceso de diferenciación y maduración, las membranas internas de los primordios de *ER body* se compactan y llegan a desaparecer, y éstos devienen en cisternas dilatadas de RE con

ultraestructura interna granulada, lo que corresponde a la descripción previa de *ER bodies*. Concomitantemente, la HMGR desaparece del interior del orgánulo, quedando relegada a su membrana externa.

- XVI. El análisis de la fracción proteica co-purificada con 1S:GFP por doble cromatografía de afinidad a partir de las plántulas transgénicas de *A. thaliana* desvela la asociación de la quimera con componentes de *ER bodies* o de vacuola implicadas en respuesta a estrés (β -glucosidasas, β -tioglucosidasas, proteasas e invertasas) y de proteínas implicadas en morfogénesis de retículo endoplasmático (dinaminas y reticulones). El análisis proteómico confirma, por tanto, que en *A. thaliana* existe una relación funcional entre HMGR, respuesta a estrés y biogénesis de *ER bodies*.

Materiales y métodos

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1 Cepas bacterianas.

Cepas bacterianas utilizadas para la expresión de proteínas:

Escherichia coli BL21 (-DE3 -pLys).

Agrobacterium tumefaciens GV3101 Pmp90RK (Koncz and Shell, 1986).

1.2 *Arabidopsis thaliana*.

Se emplearon diferentes líneas silvestres, transgénicas y mutantes de la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* descritas a continuación.

- Línea silvestre Columbia 0 (Col0) obtenida de Lehle Seeds, EEUU.
- Líneas transgénicas 1S:GFP 3S11.8 (Ferrero, 2010) y obtenidas en la presente tesis (Resultados, Sección 1.1). Estas plantas expresan la quimera formada por el dominio N-terminal de la HMGR1S unida a GFP fue bajo el control del promotor CaMV35S en fondo genético Col0.
- Líneas mutantes insercionales *hmg1-3* (SALK_061790) (Antolín-Llovera, 2006) y *hmg1-4* (SALK_125435) en fondo genético Col0. El T-DNA en ambas líneas se localiza en el exón 1 del gen *HMG1* (Resultados, Sección 1.2).

2. PLÁSMIDOS.

Para expresión transitoria en *N. benthamiana* las distintas construcciones fueron clonadas en el plásmido binario pPCV002 (Koncz and Shell, 1986; Leivar, 2003). Estas construcciones expresaban las siguientes proteínas.

- 1S:GFP: Codifica la proteína quimérica formada por el dominio N-terminal (1-178 aa) de la isoforma HMGR1S de *A. thaliana*, unido a N-terminal de GFP.
- 1S:GFPm: Codifica la proteína quimérica formada por el dominio N-terminal (1-178 aa) de la isoforma HMGR1S de *A. thaliana*, unido a N-terminal de una variante monomérica de GFP, la cual fue generada mediante mutagénesis dirigida reemplazando el residuo de Ala 206 por Lys (Ferrero, 2010).
- 1L:GFP: Codifica la proteína quimérica formada por el dominio N-terminal (1-228 aa) de la isoforma HMGR1L de *A. thaliana*, unido a N-terminal de GFP.
- Δ R1S:GFP: Codifica la proteína quimérica formada por el dominio N-terminal (1-178 aa) de la isoforma HMGR1S de *A. thaliana* en el cual los 3 residuos de

argininas en las posiciones 4, 5 y 6, fueron reemplazadas por residuos de alanina mediante de mutagénesis dirigida, y unido a N-terminal de GFP.

- pT3RE: Codifica la proteína quimérica formada por la proteína fluorescente roja DsRedT3 con péptido de tránsito N-terminal de la quitinasa, y la señal de retención a lumen de retículo endoplasmático HDEL C-terminal (Ferrero, 2010).
- pKar6-GFP: Codifica una proteína quimérica control localizada en el lumen del retículo endoplasmático. Este plásmido fue cedido por la Dra. Margarita Torrent.
- pGA3: Vector de clonación que lleva incorporado el gen que codifica la proteína quimérica GST-β''a regulada por el promotor *tac* inducible por IPTG.

3. OLIGONUCLEÓTIDOS.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Longitud	Temperatura de hibridación (°C)
35sF2	ATCCTTCgCAAgACCCTTCCTC	22	63
GFP5R2	AgggTCAgCTTgCCgTAggTg	21	63
GFP1F	ggCCACAAGTTCAgCgTgTCC	21	61
pRTL2-R1	gCAAgACCggCAACAggATTC	21	61
GAm1	CggATCTgATCgAAggTCgTggggAAATCgATTCgg ATCCTCgAgATTTACCC	53	84
GAm2	gggTAAATCTCgAggATCCgAATCgATTTCCCCACg ACCTTCgATCAgATCCg	53	84
GAscr	ATCgAAggTCgTggggAAATCg	22	63
α-DR	AggTgTATTCCTCAggAATTCC	22	59
α-DR2	gAAACTCAggTgTATTCCTCAgg	23	63
GST-5	CAATgTgCCTggATgCgTTCCC	22	65
H1.2F	CAGCCTCgCACTTCCgATgAC	21	66
H1.3R	gCAACgCCTCACgACgAATCgA	22	65
LB6	gCTgTTgCCCgTCTCACTggTg	22	67

4. ANTICUERPOS.

4.1 Anticuerpos primarios.

- α -GFP: Anticuerpos policlonales generados en conejo, contra GFP. Se utilizaron a dilución 1:2000 para ensayos de *western blot*. Cedidos por la Dra. Dolors Ludevid (CRAG).
- Ab-5450: Anticuerpos policlonales generados en cabra, contra GFP (proteína completa). Estos anticuerpos son de la casa comercial Abcam. Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos de *whole mount* y microscopía electrónica.
- Ab-26.8: Anticuerpos policlonales antiCD1-623 inmunosustraídos generados en conejo, contra el dominio catalítico de HMGR1 (α -CD1) (Nieto *et al.*, 2009). El suero crudo fue inmunosustraído con proteína de *E. coli* (Ferrero, 2010) para obtener el suero Ab-26.8. Se utilizaron a dilución 1:500 para ensayos de *whole mount* y a 1:1000 para microscopía electrónica.
- Ab-290: Anticuerpos policlonales generados en conejo, contra GFP. Estos anticuerpos son de la casa comercial Abcam. Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica.
- Ab-NR8: Anticuerpos policlonales generados en conejo, contra invertasa AtFruct4 (Rojo *et al.*, 2003). Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica. Cedidos por el Dr. Enrique Rojo (CNB).
- Ab-PYK10-IM: Anticuerpos policlonales generados en conejo, contra el péptido de la región N-terminal de β -glucosidasa PYK10 SNHLEKPDPSKPRWMODS (Matsushima *et al.*, 2003b). Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica. Cedidos por Ikuko Hara-Nishimura (Universidad de Kyoto).
- Ab-PYK10-CM: Anticuerpos policlonales generados en conejo, contra el péptido de la región C-terminal de β -glucosidasa PYK10 DGYKNRFGLYYVDFKNNL (Matsushima *et al.*, 2003b). Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica. Cedidos por Ikuko Hara-Nishimura (Universidad de Kyoto).

4.2 Anticuerpos secundarios.

- ECL- α -IgG: Anticuerpos policlonales generados en burro, contra IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano. Se utilizaron a dilución 1:5000 para ensayos de *western blot*. Estos anticuerpos son de la casa comercial GE Healthcare UK Limited (Ref. NA934V).
- α -IgG-Alexa Fluor 555: Anticuerpos policlonales generados en burro, contra IgG de conejo conjugados con el fluoróforo Alexa Fluor 555 que emite en la longitud de onda del rojo. Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos de *whole mount*. Estos anticuerpos son de la casa comercial Abcam (Ref. ab150066).
- α -IgG-Alexa Fluor 594: Anticuerpos policlonales generados en burro, contra IgG de conejo conjugados con el fluoróforo Alexa Fluor 594 que emite en la longitud de onda del rojo. Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos de *whole mount*. Estos anticuerpos son de la casa comercial Abcam (Ref. ab150068).
- α -IgG-Alexa Fluor 488: Anticuerpos policlonales generados en burro, contra IgG de conejo, conjugados con el fluoróforo Alexa Fluor 488 que emite en la longitud de onda del verde. Se utilizaron a dilución 1:1000 para ensayos de *whole mount*. Estos anticuerpos son de la casa comercial Abcam (Ref. ab150133).
- α -IgG 18nm: Anticuerpos policlonales generados en burro, contra IgG de cabra conjugados a partículas de oro de 18 nm de diámetro. Se utilizaron a dilución 1:15 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica. Estos anticuerpos son de la casa comercial Jackson ImmunoResearch (Ref. 705-215-147).
- α -IgG 18nm: Anticuerpos policlonales generados en cabra, contra IgG de conejo conjugados a partículas de oro de 18 nm de diámetro. Se utilizaron a dilución 1:30 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica. Estos anticuerpos son de la casa comercial Jackson ImmunoResearch (Ref. 111-215-144).
- α -IgG 12nm: Anticuerpos policlonales generados en cabra, contra IgG de conejo conjugados a partículas de oro de 12 nm de diámetro. Se utilizaron a dilución 1:30 para ensayos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica. Estos anticuerpos son de la casa comercial Jackson ImmunoResearch (Ref. 111-205-144).

5. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

5.1 Métodos de trabajo con *E. coli*.

El mantenimiento y manipulación de las cepas de *E. coli* fueron realizados según los manuales de protocolos Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1989) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, 1989).

5.2 Medio de cultivo de bacterias.

Los medios de cultivo bacterianos se prepararon con agua destilada y se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 121 °C. Los antibióticos o suplementos requeridos en cada ocasión fueron añadidos después de atemperar el medio a 50 °C. Se utilizaron los mismos medios para cultivo líquido que para cultivo sólido en placa petri, pero añadiendo en este último caso, agar al 1.5 %.

Generalmente, se utilizaron medio LB para el crecimiento de *E. coli*, mientras que el medio YEB se utilizó para el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Medio LB :

NaCl 0,5 % p/v
Bactotripton 1 % p/v
Extracto de levadura 0,5 % p/v

Medio YEB :

Extracto de levadura 0,1 % p/v
Extracto de carne 0,5 % p/v
Peptona 0,5 % p/v
Sacarosa 0,5 % p/v
MgSO₄.7H₂O 0,005 % p/v
Equilibrar a pH 7 con NaOH.

Según las condiciones de cultivo, los medios fueron suplementados con:

Carbenicilina 50 µg/mL
Rifampicina 100 µg/mL
Kanamicina 100 µg/mL

5.3 Métodos de trabajo con *Arabidopsis thaliana*.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se cultivaron en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) sólido o en tierra, en el interior de cámaras de cultivos especiales a una temperatura entre 22 y 24 °C y una intensidad de luz de 100 μ Einstein.

Crecimiento en tierra:

Después de transferir las plantas del medio MS a tierra, se recubren con film de plástico para mantener unas condiciones de humedad elevada durante 3 o 4 días. El sustrato sólido consta de una mezcla de perlita:vermiculita:abono orgánico en unas proporciones de 1:1:3.

Crecimiento en condiciones estériles en medio sólido:

Las semillas esterilizadas se siembran en medio MS en una cabina de flujo laminar. La placa es sellada con un esparadrapo transpirable (Leukopor). Las placas se recubren con papel de aluminio y se dejan 2 días a 4 °C (estratificación) para sincronizar el momento de germinación de las semillas. Posteriormente, se dejan en las cámaras de cultivo.

Medio MS sólido:

Murashige y Skoog (MS)..... 4,41 g/L

Tampón MES 0,5 g/L

Se ajusta el pH a 5,7 con KOH.

Se añade agar (8 g/L) y se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C.

Se reparte el medio en placas Petri.

Según las condiciones de cultivo, el medio MS fue suplementado con Kanamicina 50 μ g/mL a partir de una solución de Kanamicina 100 mg/mL, el cual se prepara disolviendo la cantidad requerida y pesada en H₂O desionizada. Posteriormente se esteriliza mediante filtración a través de filtros con un diámetro de poro de 0,2 μ m.

En la presente tesis se siguieron generalmente 2 regímenes de iluminación:

- Día corto: Fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. La planta permanecen en fase vegetativa por más tiempo y retrasa su floración de manera que se incrementa la biomasa vegetal correspondiente a las hojas de la roseta basal.
- Día largo: Fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. En estas condiciones se acelera la entrada de la planta en fase reproductiva.

5.3.1 Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

- Se separan 50-100 mg de semillas en tubos de microcentrífuga.
- Las semillas son sumergidas con 1 mL de una solución de etanol 70 %. Se retira el etanol y se repite el proceso 4 veces.
- Las semillas son lavadas después con etanol absoluto, repitiendo el proceso por 4 veces más.
- Se dejan las semillas en una campana de flujo laminar, para evaporar los restos de etanol.
- Una vez secas, las semillas estériles son guardadas en recipientes herméticos y en lo posible con un desecador a 4°C.

6. GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS 1S:GFP DE *A. thaliana*.

La generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* se realizó mediante la infección de la cepa *GV3101 Pmp90RK* de *A. tumefaciens*, portador del plásmido pPCV002 NT1S/LK-GFP (Leivar, 2003) que contiene la secuencia codificante de 1S:GFP, en plantas col0 utilizando la técnica de infiltración denominada *floral dip* (Clough and Bent, 1998). El vector pPCV002 es portador del gen NptII que confiere resistencia a kanamicina, el cual está bajo el control del promotor CaMV35S. Otras dos copias del promotor CaMV35S en tándem permiten la expresión fuerte y constitutiva del cDNA clonado en el vector, que en la presente tesis corresponde a la secuencia codificante de 1S:GFP.

6.1 Preparación de células competentes.

El siguiente protocolo permite obtener células competente de choque térmico con una eficiencia de transformación óptima para DNA plasmídico. Esta técnica se ha utilizado para obtener células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* *GV3101 Pmp90RK* (Koncz and Shell, 1986).

Materiales:

- Centrífuga *Beckman coulter avanti J-E* y rotor JA-10.
- Placa de cultivo con colonias aisladas de la cepa de interés.
- Medio YEB.
- Rifampicina (50 mg/mL disuelto con DMSO).
- Kanamicina (25 mg/mL).
- Solución de NaCl 0,15 M.

- Solución de CaCl₂ 0,2 M.
- Nitrógeno líquido.

Procedimiento:

- Inocular a partir de una colonia aislada, en 10 mL de medio YEB suplementado con rifampicina (resistencia cromosómica *GV3101*) y kanamicina (resistencia codificada por el plásmido *helper*) a una concentración final de 100 µg/mL.
- Incubar en agitación (180 rpm) a 28 °C durante 24 h.
- Realizar una dilución 1:200 del precultivo con medio YEB R⁺ K⁺ para un volumen final de 10 mL.
- Incubar a 28 °C en agitación (180 rpm), hasta que el cultivo alcance una DO₆₀₀ de 0,5 (18-20 h).
- Sedimentar las células a 6000 rpm durante 5 min a 4 °C. Todas las manipulaciones a partir de este punto, serán realizadas a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células suavemente en 10 mL de una solución de NaCl 0,15 M, atemperado a 4 °C.
- Sedimentar las células a 6000 rpm durante 5 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 1 mL de CaCl₂ 0,2 M, atemperado a 4 °C.
- Repartir en alícuotas de 100 µL, congelar en nitrógeno líquido y almacenarlas a -80 °C.

6.2 Transformación de células competentes de *Agrobacterium GV3101 Pmp90RK*.

Para expresar 1S:GFP en planta, se transformó con el plásmido pPCV002 NT1S/LK-GFP.

- Añadir 0,5 µg de DNA plasmídico con la construcción deseada, a una alícuota de 100 µL de células competentes previamente descongeladas en hielo.
- Mezclar suavemente e incubar 30 min en hielo.
- Congelar en nitrógeno líquido. Mantener en este durante 1 min.
- Descongelar mediante incubación a 37 °C en un baño durante 1 min.
- Añadir 1 mL de medio YEB. Este medio puede estar suplementado con kanamicina y rifampicina para disminuir la probabilidad de contaminación.
- Incubar a 28 °C por 3 h en agitación suave (120 rpm).

- Sembrar 200 µL en placa petri con agar-YEB suplementado con kanamicina, rifampicina y carbenicilina (100 µg/mL). Sembrar en placa un control negativo de células competentes sin transformar.
- Incubar las placas a 28 °C por 24 – 48 h en oscuridad.
- Seleccionar las colonias aisladas y transformadas.
- Realizar ensayos de genotipado por PCR con cebadores específicos, para confirmar las colonias transformadas.

6.3 Extracción de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* y genotipado por PCR.

De las colonias de *A. tumefaciens* transformadas, se obtuvo el DNA plasmídico utilizando el kit comercial QIAPREP spin miniprep kit (QIAGEN). Este DNA fue analizado por PCR con cebadores específicos para confirmar que las colonias hayan incorporado el plásmido pPCV002 NT1S/LK-GFP (Leivar, 2003).

Reacción de PCR:

GoTaq® Green Master Mix x2 (Promega)	7,5 µL
Cebador 1 (forward) 10 µM	1,5 µL
Cebador 2 (reverse) 10 µM	1,5 µL
DNA (genómico)	0,45 µL
H ₂ O miliQ	4,05 µL
Volumen final de reacción	15 µL

Cebadores utilizados:

35sF2 / GFP5R2; amplicón de 885 pb; temperatura de hibridación 63 °C.

35sF2 / Oligo1; amplicón de 355 pb; temperatura de hibridación 63 °C.

35sF2 / Oligo3; amplicón de 484 pb; temperatura de hibridación 63 °C.

Ciclos de PCR:

Desnaturalización	2 min a 94 °C
35 ciclos	30 seg a 94 °C
	45 seg a 63 °C
	1 min a 72 °C
Extensión final	3 min a 72 °C

La temperatura de hibridación (T_h) se calcula para cada cebador en particular, es preferible trabajar con pares de cebadores que tengan la misma temperatura de hibridación, pero si no es el caso se utiliza en la reacción de PCR, la temperatura de hibridación menor de entre ambos cebadores.

$$T_h = 4 \times (\text{número de pares GC}) + 2 \times (\text{número de pares AT}) - 5$$

6.4 Transformación de *A. thaliana*.

Para la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* se utilizó el método de *floral dip* (Clough and Bent, 1998). Esta técnica se basa en la inmersión de las plantas en una suspensión de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés, con la intención de infectar las células germinales, a partir de las cuales se generan posteriormente semillas portadoras del transgen. La adición de un agente tensioactivo a la suspensión bacteriana, facilita el contacto entre esta solución y los tejidos vegetales. El estado de desarrollo de las plantas resulta fundamental para el rendimiento del proceso de transformación. Es necesario que las plantas se hayan desarrollado lo suficiente para resistir las lesiones provocadas por el proceso de infiltración. Además, se tiene que elegir un estadio en el que la planta tenga un mayor número de botones florales y de esta manera incrementar el rendimiento de la transformación.

Materiales:

- Semillas estériles de *A. thaliana* col0.
- *A. tumefaciens* GV3101 portador del plásmido pPCV002 NT1S/LK-GFP.
- Medio de cultivo YEB.
- Centrífuga *Beckman coulter avanti J-E* y rotor JA-10.
- Rifampicina (50 mg/mL disuelto con DMSO).
- Kanamicina (25 mg/mL).
- Carbenicilina (100 mg/mL).
- Medio MS.
- Sucrosa.
- Silwett L-77 surfactante tensioactivo.
- Cámara de germinación y crecimiento.
- Papel filtro.

Procedimiento:

Crecimiento de plantas.

- Semillas estériles de *A. thaliana* col0 fueron dispersadas en placas Petri con agar MS 0,5x, y puestas a hibernar por 3 días a 4 °C y en condiciones de oscuridad.
- Las placas fueron transferidas a una cámara de día corto (fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad) a 22 °C.
- Al cabo de 10 días de crecimiento en estas condiciones, las plántulas de *A. thaliana* col0 fueron transferidas a tierra. Para la transformación se necesitan al menos 10 plantas por cada construcción.
- Las plantas en tierra fueron crecidas en una cámara de día corto a 22 °C durante al menos 5 semanas para permitir que en estas condiciones, la planta desarrolle una roseta basal lo suficientemente grande antes de la fase de floración.
- Después de este tiempo, las plantas que desarrollaron sus primeros tallos fueron transferidas a una cámara de día largo (fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad) a 22 °C, para sincronizar e inducir el desarrollo de múltiples tallos laterales y por tanto incrementar el número de inflorescencias susceptibles a ser infectadas después por el *Agrobacterium*.
- Cuando las plantas hubieron desarrollado un número suficiente de inflorescencias (2 o 3 semanas después del crecimiento en día largo), la planta se encuentra en un estado de desarrollo adecuado y óptimo para ser infectada por *Agrobacterium*. En esta etapa, es necesario remover antes las silicuas con semillas ya formadas y todas las flores abiertas puesto que ya se han autofecundado.

Crecimiento de *Agrobacterium*.

- A partir de un cultivo stock con glicerol almacenado a -80 °C, sembrar la cepa de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido de interés, en una placa Petri con agar-YEB suplementado con los antibióticos kanamicina, rifampicina y carbenicilina, todos a una concentración final de 100 µg/mL.
- Para el crecimiento de *A. tumefaciens*, incubar la placa Petri a 28 °C (protegiéndola de la luz debido a que la rifampicina es fotosensible) durante 24 a 48 h, hasta obtener colonias aisladas.
- Inocular el *A. tumefaciens* en 5 mL de medio YEB con kanamicina, rifampicina y carbenicilina (100 µg/mL), a partir de una colonia aislada.
- Incubar el cultivo por 24-48 h a 28 °C en un agitador a 150 rpm en condiciones de oscuridad.

- Inocular 2 mL del cultivo anterior en un matraz Erlenmeyer de 2 L con 500 mL de medio YEB con kanamicina, rifampicina y carbenicilina (100 µg/mL).
- Incubar el cultivo por 16-24 h a 28 °C en un agitador a 150 rpm, en oscuridad.
- Una vez el cultivo haya alcanzado una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) igual a 1.5, centrifugar a 4000 g y temperatura ambiente por 10 min en un rotor JA-10.
- Descartar el sobrenadante y resuspender con 400 mL de una solución compuesta por 5 % p/v de sucrosa y 0,002 % v/v de Silwett L-77.
- Sumergir las plantas por 1 min en la suspensión bacteriana.
- Dejar las plantas echadas sobre una bandeja cubierta con papel filtro.
- Cubrir las plantas con film y dejarlas en oscuridad a 22 °C por 24 h.
- Retirar el film, colocar las plantas en posición vertical, regarlas y dejarlas crecer en una cámara de día largo.
- OPCIONAL: Se puede repetir este proceso de transformación sobre las mismas plantas 1 semana después, lo que ayuda en algunos casos a incrementar el rendimiento en la transformación.
- Cuando las nuevas silicuas formadas comiencen a cambiar de color (café), colocar las plantas en el interior de un sobre, detener el regado para favorecer el secado y deshidratación de las plantas, con el objetivo posterior de recolectar las semillas transgénicas.

Selección y propagación de plantas transgénicas.

De todas las semillas recolectadas de la generación T₁, sólo unas pocas habrán incorporado el transgen, para seleccionarlas se utilizó la kanamicina como marcador de selección.

- Las semillas T₁ de 4 plantas transformadas fueron esterilizadas y sembradas en placa con agar-MS 0,5x suplementado con kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL.
- Las placas fueron transferidas a una cámara de día largo a 22 °C.
- Después de 10 días de crecimiento, las plántulas resistentes a kanamicina (K+) fueron observados al microscopio de fluorescencia Olympus DP71, para determinar y seleccionar las que expresen 1S:GFP. Así, los distintos patrones y niveles de expresión de 1S:GFP en plántulas K+ fueron determinados y clasificados.
- Las plántulas T₁ fluorescentes y resistentes a kanamicina, fueron transferidos a tierra e incubados en una cámara de día largo a 22 °C.

- Una vez completado el ciclo biológico de las plantas T_1 resistentes, sus semillas resultado de autofecundación (generación T_2) fueron recolectadas.
- Las semillas T_2 fueron utilizadas para determinar el número de copias de TDNA incorporado en el genoma. Para este análisis se eligieron las semillas T_2 provenientes de plantas que tuvieran altos niveles de expresión de 1S:GFP.
- Semillas T_2 estériles fueron sembradas en agar-MS 0,5x con kanamicina a una concentración final de 50 $\mu\text{g/mL}$, y puestas a crecer en una cámara de día largo a 22 $^{\circ}\text{C}$.
- Las semillas T_2 que mostraran una proporción de resistencia:sensibilidad de 3:1, serán aquellas cuyo progenitor T_1 tenga el marcador de resistencia posicionado en un solo *locus* dentro de genoma. Así, 5 líneas T_1 cuya progenie presentaba este patrón de resistencia fueron seleccionadas.
- 8 plántulas T_2 de cada línea T_1 seleccionada, fueron transferidas a tierra para su crecimiento en una cámara de día corto a 22 $^{\circ}\text{C}$, para mejorar la producción de semillas.
- Una vez completado el ciclo biológico de las plantas T_2 , sus semillas resultado de autofecundación (generación T_3) fueron recolectadas, sembradas en agar-MS 0,5x con kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas en cámara de día largo a 22 $^{\circ}\text{C}$. Se seleccionaron aquellas semillas que mostraron un 100 % de resistencia a kanamicina, que corresponden a líneas homocigotas transgénicas 1S:GFP.
- Las plantas T_3 homocigotas fueron propagadas para obtener un mayor número de semillas homocigotas (generación T_4). Plantas homocigotas 1S:GFP de la generación T_4 fueron utilizadas en la presente tesis para ensayos de microscopía confocal, microscopía electrónica e inmunocitoquímica, y ensayos de purificación de 1S:GFP.
- Así, las líneas homocigotas transgénicas, deberían ser aquellas líneas resistentes a kanamicina, genéticamente uniformes y con expresión de 1S:GFP.

7. AGROINFILTRACIÓN.

Por medio de esta técnica se consiguió la incorporación y expresión transitoria en células de hoja de *N. benthamiana* de diferentes construcciones plasmídicas que portaban secuencias codificantes para distintas proteínas quiméricas:

Derivado de pPCV002	Construcción
pPCV002 NT1S/LK-GFP	1S:GFP
1S:GFPm	1S:GFPm
pPCV002 M ₅₁ A _{0K} /LK-GFP	1L:GFP

- A partir de un cultivo stock con glicerol almacenado a -80 °C, sembrar la cepa de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido de interés, en una placa Petri con agar-YEB suplementado con los antibióticos kanamicina, rifampicina y carbenicilina, todos a una concentración final de 100 µg/mL.
- Para el crecimiento de *A. tumefaciens*, incubar la placa Petri a 28 °C (protegiéndola de la luz debido a que la rifampicina es fotosensible) durante 24 a 48 h, hasta obtener colonias aisladas.
- Inocular el *A. tumefaciens* en 5 mL de medio YEB con kanamicina, rifampicina y carbenicilina (100 µg/mL), a partir de una colonia aislada.
- Incubar el cultivo por 24 h a 28 °C en un agitador a 200 rpm en condiciones de oscuridad.
- Inocular 1 mL el cultivo anterior en un matraz Erlenmeyer de 200 mL con 30 – 50 mL de medio YEB con kanamicina, rifampicina y carbenicilina (100 µg/mL). Incubar el cultivo toda la noche a 28 °C en un agitador a 200 rpm en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 – 1.
- Sedimentar a 3500 g a temperatura ambiente por 15 min. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender en un volumen adecuado de tampón de inducción para *Agrobacterium*, para tener una DO₆₀₀ de 1:

MES pH 5,7 (KOH) 10 mM.
MgCl₂ 10mM.
Acetosiringona 0,2 mM.

$$V(\text{mL}) = X(\text{mL}) \text{ DO}_i / \text{DO}_f$$

V(mL): Volumen de resuspensión.

X(mL): Volumen de cultivo sedimentado.

DO_i: Densidad óptica inicial del cultivo.

DO_f: Densidad óptica final.

- Incubar el cultivo resuspendido a temperatura ambiente durante 3 – 5 horas, agitando ocasionalmente por inversión.
- Mezclar el cultivo de *Agrobacterium* con un volumen igual de cultivo HC-Pro (supresor del silenciamiento) procesado bajo las mismas condiciones y con una DO₆₀₀ igual a 1.

- NOTA: El cultivo HC-Pro fue utilizado para ensayos de expresión transitoria de 1L:GFP, Δ R1S:GFP y T3RE.
- Para la infiltración, elegir hojas de *N. benthamiana* jóvenes pero bien desarrolladas. Transferir el cultivo a una jeringa de 1 mL (sin aguja). Infiltrar el cultivo por la cara inferior de la hoja, entre las nervaduras principales. Se pueden infiltrar varias regiones en una misma hoja.
- Transferir las plantas en una cabina de cultivo.
- Monitorizar la expresión de la proteína quimérica cada día durante una semana, a través de la observación de las regiones infiltradas por el microscopio de fluorescencia (Los máximos niveles de expresión fueron observados generalmente al tercer día tras la agroinfiltración).
- Los cultivos de *Agrobacterium* infiltrados con las construcciones utilizadas fueron:

1S:GFP DO₆₀₀=1

1S:GFPm DO₆₀₀=1

1L:GFP DO₆₀₀=1 + HC-Pro DO₆₀₀=1

Δ R1S:GFP DO₆₀₀=1 + HC-Pro DO₆₀₀=1

1S:GFP DO₆₀₀=1 + T3RE DO₆₀₀=1 + HC-Pro DO₆₀₀=1

8. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE 1S:GFP A PARTIR DE PLÁNTULAS DE *A. thaliana* 2.15.4.

Los altos niveles de expresión de 1S:GFP observados en la línea transgénica de *A. thaliana* 2.15.4, permitió la extracción y purificación de 1S:GFP, mediante dos cromatografías de afinidad realizados secuencialmente. En la primera cromatografía se utilizó la proteína quimérica GST- $\beta''\alpha$ como interactor de 1S:GFP, sobre una resina de glutathione sepharose 4B (GSH-Sepharose4B). la subunidad $\beta''\alpha$ reconoce el dominio N-terminal de la HMGR1S que corresponde al fragmento 1S de la 1S:GFP. En la segunda cromatografía se utilizaron microesferas magnéticas unidas a un anticuerpo contra GFP. El uso de dos columnas de afinidad sirvió para mejorar la purificación y el rendimiento en la recuperación de la proteína 1S:GFP a partir de los agregados de RE, durante el proceso de extracción. Previo a esto, se realizó la expresión y purificación de la proteína quimérica GST- $\beta''\alpha$ que se explica a continuación.

8.1 Transformación de células competentes BL21 con pGA3.

EL vector pEGX-5x2 para la expresión de proteínas de fusión con glutathione S-transferase (GST), fue utilizado. El vector de clonación, el cual llevaba incorporado el gen que codifica la proteína quimérica GST-β''α regulada por el promotor inducible *tac*, fue denominado pGA3 (Leivar, 2011).

Procedimiento:

- 1,2 μL de DNA plasmídico (pGA3) 125 ng/μL fueron añadidos a una alícuota de 200 μL de células competentes BL21. Las células y el DNA fueron mezclados suavemente.
- La mezcla fue incubada por 30 min a 4 °C en una cámara fría.
- Se añadió 1 mL de medio LB suplementado con glucosa al 0,2 % p/v y se incubó a 37 °C por 1 h en un agitador a 160 rpm.
- 5 alícuotas de 200 μL fueron sembradas en placas de agar-LB suplementado con carbenicilina a 100 μg/mL.
- Las placas de agar fueron incubadas a 37 °C por 18-24 h para obtener colonias transformadas aisladas.
- NOTA. Se realizó la transformación en paralelo de células competentes BL21 con el plásmido pEGX-5x2 sin el inserto correspondiente a Atβ''α. Las colonias transformadas, fueron utilizadas después como controles negativos para la expresión de GST-Atβ''α.

8.2 Sobreexpresión y purificación de GST-Atβ''α.

Materiales:

- Centrífuga *Beckman coulter avanti J-E* y rotor JA-10 y JA-20.
- Placa de cultivo con colonias aisladas de la cepa de interés.
- Medio LB.
- Nitrógeno líquido.
- Rotor orbital.
- Carbenicilina (100 mg/mL).
- IPTG (0,1 M).
- CaCl₂ (5 M).
- Tritón x-100 (20 % v/v).
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL y 2 L.

- Sonificador BRANSON Digital Sonifier.

Tampones y soluciones:

Tampón TNE

Tris-HCl pH 7,4	20 mM.
NaCl	150 mM.
EDTA	2 mM.

Añadir inhibidores de proteasas justo antes de usar a las concentraciones finales indicadas en la **Nota 1.**

Tampón TNE-T

Tris-HCl pH 7,4	20 mM.
NaCl	150 mM.
EDTA	2 mM.
Tritón x-100	1 % v/v

Tampón de elución

Tris-base pH 8,5	100 mM.
EDTA pH 8,19	1 mM.
Tritón x-100	1 % v/v.
GSH (reducido)	20 mM

Mezclar Tris, EDTA y Tritón. Disolver el GSH y ajustar el pH a 8,5 con NaOH 1M, filtrar el tampón (filtro 0,22 µm). Alicuotar en tubos Falcon de 15 mL. Congelar en nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C. Añadir inhibidores de proteasas y un agente reductor justo antes de usar a las concentraciones finales indicadas en la **Nota 1.**

Tampón de diálisis

Tris-HCl pH 8,5	50 mM.
Tritón x-100	0,5 % v/v
EDTA	1 mM.

Solución de proteínas RG1

En 290 mL de una solución de:

Tris-HCl pH 7,4	20 mM.
EDTA	1 mM.
Tritón x-100	1 % v/v (añadido al final)

Se disuelven 29 g de Bactopeptona.

Se autoclava 30 min a 120 °C y se disuelven 290 mg c/u de:

Albúmina de huevo de gallin, albúmina bovina, lisozyrna, inhibidor de tripsina y hemoglobina.

Esta mezcla es centrifugada a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C en un rotor JA-14, filtrada (0,22 µm), y alicuotada en tubos Falcon de 50 mL.

Antes de utilizar se deben añadir inhibidores de proteasas.

NOTA 1.

	Concentración final
DTT	10 mM.
Aprotinina	15 µg/mL.
Leupeptina	20 µg/mL.
E64	4,2 µg/mL.
Pepstatina	1,5 µg/mL.
PMSF	100 µg/mL.

Procedimiento:

- 4 inóculos provenientes de una colonia BL21 aislada y transformada con pGA3, fueron sembrados por separado en 1 mL de LB suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL.
- Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 5 h en un agitador a 220 rpm.
- Cada cultivo de 1 mL fue inoculado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con 50 mL de LB suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL, y se incubó a 37 °C toda la noche en un agitador a 220 rpm.
- Al día siguiente, los 4 cultivos de 50 mL fueron inoculados en 4 matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad, con 500 mL de LB (dilución 1:11) suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 1h en un agitador a 220 rpm.
- Pasado este periodo, a cada cultivo se añadieron 2,2 mL de IPTG a partir de una solución stock de 0,1 M, para tener una concentración final de IPTG de 0,4 mM, y 0,55 mL de CaCl₂ a partir de una solución stock de 5 M, para tener una concentración final de CaCl₂ de 5 mM.
- Los cultivos se incubaron después a 28 °C por 4 h en un agitador a 220 rpm.
- Las células de cada cultivo fueron sedimentadas a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C (rotor JA-10).
- El sedimento de los 4 cultivos fue resuspendido cada uno con 10 mL de tampón TNE suplementado con inhibidores de proteasas.

- Las soluciones obtenidas fueron sonicadas (amplitud 14 %) cada una por 5 veces en ciclos de 1 min de sonicación y 1 min de reposo en hielo.
- Se añadió Tritón x-100 para una concentración final de 1 % v/v, a partir de una solución stock al 20 % v/v.
- Las soluciones fueron centrifugadas a 20000 rpm durante 10 min a 4 °C (rotor JA-20). El sobrenadante de cada solución haciendo un volumen total de ~40 mL, fue recolectado. Este paso puede ser repetido una vez más, para eliminar bien los residuos y detritos celulares en el sedimento.
- Se lavó y equilibró 2 mL de resina GSH-Sepharose4B con tampón TNE-T. A esta resina, se le añadieron los ~40 mL de sobrenadante obtenido en el anterior paso.
- La mezcla fue incubada a 4 °C durante 30 min en agitación orbital. La resina fue sedimentada durante 5 min a 300xg, y el sobrenadante fue retirado.
- A la resina sedimentada se le añadieron 50 mL de la *solución de proteínas RG1*. Esta mezcla fue incubada a 4 °C durante 15 min en agitación orbital.
- La resina fue sedimentada durante 5 min a 300 xg. NOTA: La solución de proteínas es bastante densa, así que este paso puede demorar un poco más.
- El sobrenadante fue retirado y la resina sedimentada fue lavada 4 veces con tampón TNE-T.
- La proteína GST-Atβ''α sobre-expresada y unida a la resina GSH-Sepharose4B, fue eluída resuspendiendo la resina con 4 volúmenes (al menos) de tampón de elución que equivalen a 8 mL.
- La resina fue sedimentada durante 5 min a 300xg.
- El sobrenadante con la proteína GST-Atβ''α eluída, fue transferido a una membrana de diálisis (poro 5 kDa).
- La diálisis para eliminar el tampón de elución, fue realizada a 4 °C en un recipiente con 1 L de tampón de diálisis en agitación durante toda la noche, realizando un cambio de tampón al día siguiente para que la diálisis continúe el resto del día.
- Los 8-9 mL de solución dializada con la proteína GST-Atβ''α purificada fueron alicuotados en volúmenes de 1 mL, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C.

8.3 Extracción y purificación de 1S:GFP.

Materiales:

- Mortero.
- Miracloth.

- Sonicador BRANSON Digital Sonifier.
- Rotor.
- Soportes de metal.
- Columnas con filtro.
- Soporte magnético.
- Columnas empaquetadas con esferas de metal (μ MACS columns).
- Suspensión de micro-esferas anti-GFP (μ MACS MicroBeads).
- EDTA pH 8.19 (0,5 M).
- EGTA pH 8.5 (5 M).
- Tris-base pH 8.5 (1M).
- Nitrógeno líquido.
- Tritón x-100 (20 % v/v).

Tampones y soluciones:

Tampón de lisis.

HEPES KOH pH 7,5 50 mM.

Tritón x-100 1 % v/v.

KCl 50 mM.

Añadir inhibidores de proteasas y un agente reductor justo antes de usar a las concentraciones finales indicadas en la **Nota 1.**

Tampón TNE-T

Tris-HCl pH 7,4 20 mM.

NaCl 150 mM.

EDTA 2 mM.

Tritón x-100 1 % v/v

Tampón de elución

Tris-base pH 8,5 100 mM.

EDTA pH 8,19 1 mM.

Tritón x-100 1 % v/v.

GSH (reducido) 20 Mm

Mezclar Tris, EDTA y Tritón a partir de soluciones stock, añadir GSH en polvo, disolver y ajustar el pH a 8.5 con NaOH 1M. Filtrar la solución (filtro 0,22 μ m). Alicuotar en tubos Falcon de 15 mL. Congelar en nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C. Añadir inhibidores de proteasas y un agente reductor justo antes de usar a las concentraciones finales indicadas en la **Nota 1.**

Tampón de Lämmlli x2

Tris-HCl pH 6,8	100 mM.
Glicerol	10 % v/v.
SDS	4 % v/v.
β -mercaptoetanol	40 % v/v.
DTT	200 mM.
Azul de bromofenol	10 % v/v

NOTA1

	Concentración final
DTT	10 mM.
Aprotinina	15 μ g/mL.
Leupeptina	20 μ g/mL.
E64	4,2 μ g/mL.
Pepstatina	1,5 μ g/mL.
PMSF	100 μ g/mL.

Procedimiento:

- Triturar en un mortero 20 g de plántulas de *A. thaliana* 2.15.4 de 10 días crecidas en placas de agar-MS 0.5x en una cámara de día largo a 22 °C (Figura M1), que previamente fueron recolectadas y congeladas con nitrógeno líquido.

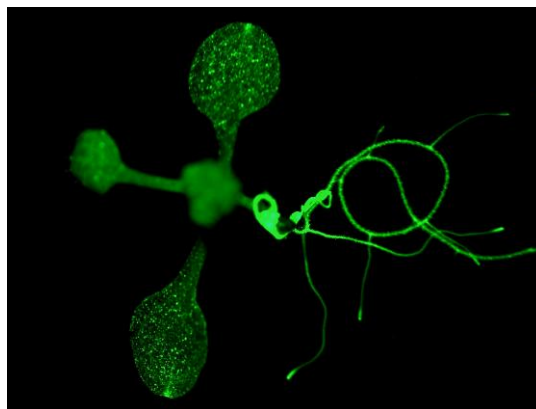


Figura M1. Planta de *A. thaliana* 2.15.4 de 10 días. Se observa expresión abundante de 1S:GFP en toda la planta.

- Añadir al tejido vegetal triturado ~65 mL de *tampón de lisis* suplementado con EGTA a una concentración final de 5 mM.
- Incubar la mezcla en hielo por 15 min y filtrarla con una membrana de miracloth.
- Recolectar la solución filtrada y sonicarla (amplitud 14 %) 5 veces en ciclos de 1 min de sonicación y 1 min de reposo en hielo.

- Añadir 2 mL de proteína GST-Atβ''α previamente purificada (Sección 8.2).
- Incubar la mezcla a 4 °C durante 30 min en agitación orbital.
- Añadir 1 mL de resina GSH-Sepharose4B previamente lavada y equilibrada con tampón TNE-T.
- Incubar la mezcla a 4 °C durante 1 h en agitación orbital.
- Preparar un soporte y una columna con filtro. Se deja pasar la mezcla paulatinamente a través de esta columna que con su filtro, retendrá la resina. A partir de aquí, los siguientes pasos se realizaron en una cámara de 4 °C.
- Lavar 3 veces la resina retenida en la columna con 1.5 mL de tampón TNE-T.
- Eluir las proteínas unidas a la resina que corresponden a GST-Atβ''α-1S:GFP con 5 volúmenes (5 mL) de *tampón de elución* suplementado con EGTA a 10 mM.
- Añadir a los 5 mL de solución eluída 250 µL de una suspensión de microesferas (paramagnéticas) de 50 nm de diámetro unidas con anti-GFP (Figura M2A).
- Incubar la mezcla a 4 °C durante 1 h en agitación orbital.



Figura M2. Sistema de purificación de proteínas μMACS™ Anti-GFP Microbeads. **A.** Suspensión de microesferas paramagnéticas unidas con anticuerpo anti-GFP. **B.** Columna empaquetada con esferas de metal. **C.** Soporte de metal generador de un elevado campo magnético.

- Trasladar una columna empaquetada con esferas de metal (Figura M2B) a un soporte que genere un elevado campo magnético (Figura M2C). Equilibrar esta columna con 200 µL de *tampón de lisis*.
- Pasar 2 veces los 5 mL de la mezcla con microesferas a través de la columna magnética.
- Lavar la columna magnética con 200 µL de *tampón de lisis*.
- Trasladar todo el soporte magnético a una campana de gases a temperatura ambiente.
- Añadir a la columna 15 µL de tampón de Lämmli x2 suplementado con EDTA a 5 mM y precalentado a 95 °C. Incubar la columna durante 10 min a temperatura ambiente.

- Eluir la proteína 1S:GFP unida a la columna añadiendo 50 μ L de tampón de Lämmli x2 suplementado con EDTA a 5 mM y precalentado a 95 °C. Repetir este paso 3 veces.
- Recolectar las 3 fracciones eluidas y analizarlas por SDS-PAGE y *western-blot*.

9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.

La electroforesis en geles de poli-acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), permite la separación sencilla y efectiva de las proteínas de una muestra. La porosidad del gel, las propiedades del tampón de migración y los parámetros de electroforesis, permiten afinar las condiciones para mejorar la resolución en la separación. La técnica de *western blot* permite detectar la proteína de interés o en estudio a partir de todas las proteínas separadas por SDS-PAGE presentes en las diferentes muestras, utilizando anticuerpos específicos. Para realizarlo, es necesario transferir todas las proteínas presentes en el gel de acrilamida a una membrana de PVDF. Esta membrana se deja reaccionar con el anticuerpo primario (anti-GFP). La posterior incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano, permite la detección quimioluminiscente de la proteína en estudio (1S:GFP).

Materiales:

- Fuente de electroforesis.
- Equipo de electroforesis.
- Tampón de electroforesis 1x.
- Tampón de Lämmli 2x.
- Isopropanol.
- Marcador de pesos moleculares de proteínas: Protein ladder (Thermo Scientific). PAGE ruler plus prestained No. 26619.
- Acrilamida/N,N'-metilen-bis-acrilamida 30 %.
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.
- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.
- Persulfato de amonio.
- TEMED.
- Solución de tinción y destinción.
- Metanol.
- Membranas de PVDF (*Hybond-P, Amersham-Pharmacia Biotech*).
- Papel *Whatmann 3MM*.

- Sistema de transferencia proteica sobre membranas de PVDF (*Mini Trans-Blot, Biorad*).
- Solución de bloqueo.
- PBST 1x.
- Tampón de transferencia.
- Agitador.
- Anticuerpos anti-IgG de conejo unido a peroxidasa.
- Sistema de detección quimioluminiscente (LAS 4000).

Tampones y soluciones:

Tampón de Electroforesis x10.

Trizma base	0,25 M.
Tris HCl pH 6,8	100 mM.
Glicina	1,92 M.
SDS	1 %.
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L.

Tris HCl 0,5 M pH 6,8.

Trizma base	60,5 g.
H ₂ O miliQ q.s.p.	1 L.

Ajustar el pH a 6,8 con HCl.

Tris HCl 1,5 M pH 8,8.

Trizma base	181,5 g.
H ₂ O miliQ q.s.p.	1 L.

Ajustar el pH a 8,8 con HCl.

Gel Separador (Acrilamida 8,5%)

Acrilamida/Bis-acrilamida 30 %	2.83 mL.
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL.
SDS 10 %w/v	50 µL.
APS 10 %w/v	33,33 µL.
TEMED	6,67 µL.
H ₂ O miliQ q.s.p.	10 mL.

Gel Apilador.

Acrilamida/Bis-acrilamida 30 %	390 µL.
--------------------------------------	---------

Tris HCl 0,5 M pH 6,8	750 μ L.
SDS 10 %w/v	15 μ L.
APS 10 %w/v	15 μ L.
TEMED	3 μ L.
H ₂ O miliQ q.s.p.	3 mL.

La acrilamida es neurotóxica por lo tanto se debe tener precaución en su manipulación, utilizando guantes en todo momento. El persulfato de amonio (APS) se prepara en el momento con H₂O miliQ o bien, se pueden hacer alícuotas para almacenarlas a -20 °C.

Tampón de Lämmli x2

Tris-HCl pH 6,8	100 mM.
Glicerol	10 % v/v.
SDS	4 % v/v.
β -mercaptoetanol	40 % v/v.
DTT	200 mM.
Azul de bromofenol	10 % v/v

Solución de Tinción

Azul brillante de Comassie	0,6 %.
Metanol	100 mL.
Ácido acético glacial	25 mL.
H ₂ O destilada q.s.p.	250 mL.

Solución de Destinción.

Ácido acético glacial	10 %.
Metanol	40 %.

Tampón de Transferencia.

Trizma base	3 g.
Glicina	14 g.
Metanol	200 mL.
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L.

PBST x10 pH 7,6

Na ₂ HPO ₄	0,8 M.
NaH ₂ PO ₄	0,2 M.
NaCl	0,1 M.
Tween 20	5 % v/v.

Solución de Bloqueo.

PBST 1x pH 7,6

Leche desnatada en polvo 5 % p/v.

REACTIVOS PARA EL SISTEMA DE DETECCIÓN ECL:

ECL1

Tris HCl 1M pH 8,5 1 mL.

Luminol 0,5 M 50 µL.

Ácido p-cumárico 79,2 mM 50 µL.

H₂O miliQ q.s.p. 10 mL.

ECL2

Tris HCl 1M pH 8,5 1 mL.

Peróxido de hidrógeno 8,8 M 6,4 µL.

H₂O miliQ q.s.p. 10 mL.

Estos reactivos se almacenan en oscuridad a 4 °C y una vez preparados tienen un tiempo de caducidad de aproximadamente 1 semana.

Para revelar las membranas por quimioluminiscencia, se prepara en el momento, una solución mezclando volúmenes iguales de ECL1 y ECL2.

Procedimiento:

SDS-PAGE

- Montar el sistema de preparación de geles.
- Colocar el gel separador hasta una altura de 5 cm.
- Añadir unas gotas de isopropanol para que cubra la superficie expuesta al oxígeno atmosférico que inhibiría la polimerización.
- Dejar polimerizar el gel por unos 20 – 30 min. No prologar este paso por más de 1 h, debido a que el isopropanol terminaría deshidratando del gel.
- Eliminar el isopropanol y limpiar la superficie del gel con agua.
- Añadir el gel apilador hasta el extremo superior de los vidrios.
- Encajar inmediatamente el peine correspondiente con el número de pozos adecuado al número y volumen de las muestras que se quieran cargar.
- Dejar polimerizar durante 20 – 30 min.

- Se han utilizado generalmente vidrios de 8 cm de alto y 10 cm de ancho, que permiten polimerizar geles de 0,75 mm de espesor.
- Situar el gel en el soporte correspondiente, y este en el interior de la cubeta de electroforesis.
- Añadir tampón de electroforesis 1x hasta sobrepasar los pozos.
- Las muestras utilizadas para electroforesis ya contenían tampón de Lämmli 2x a 95 °C. En caso contrario, se añaden a las muestras un volumen adecuado de tampón de Lämmli 2x y se calientan a 100 °C durante 5 min para desnaturalizarlas.
- Se cargan las muestras y el marcador de peso molecular en cada pozo con una micropipeta.
- Aplicar el voltaje adecuado para separar las proteínas contenidas en la muestra. Se establecieron amperajes de 20 y 40 mA, según el número de geles que se estén utilizando simultáneamente en el sistema (1 o 2).
- Una vez que el frente de migración, marcado por el colorante del tampón de Lämmli, haya llegado al extremo inferior del gel, se detiene la electroforesis.
- A partir de aquí, el gel puede ser revelado directamente colocándola en una solución de tinción durante 5 – 10 min a temperatura ambiente y con agitación; seguido de un proceso de destinción hasta que la relación entre la intensidad de las bandas y el color del fondo sea óptimo. O bien, el gel puede ser utilizado para inmunodetección por *western blot* como se detalla a continuación.

Western blot

- Una vez terminada la electroforesis, se descarta el gel apilador con un bisturí.
- Sumergir la membrana de PVDF en metanol absoluto durante unos segundos y lavarla con la solución de transferencia.
- Realizar la transferencia utilizando el sistema de *BioRad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*. Este sistema consta de un casset donde se mantiene la membrana de PVDF íntimamente en contacto con el gel, estando cubierto por ambos lados con 3 hojas de papel *Whatmann 3MM* y una esponja.
- Una armadura diseñada para este efecto, mantiene hasta dos cassetts entre electrodos paralelos que promueven la transferencia.
- Esta armadura se coloca en una cubeta donde se añade un rack con hielo que evitará la excesiva subida de temperatura que tiene lugar que tiene lugar durante el proceso de transferencia como consecuencia del voltaje aplicado.

- En el momento de poner en contacto el gel con la membrana, se ha de evitar en lo posible la formación de burbujas de aire que interfieren la transferencia de proteínas.
- La transferencia dura un periodo de al menos 1 h (dependiendo del espesor del gel) aplicando un voltaje constante de 100 V. Para mantener una temperatura homogénea en el sistema, se mantiene la solución de transferencia en constante agitación en una cámara de 4 °C.
- Una vez finalizado este proceso, se recupera la membrana. Un corte en una esquina puede servir de ayuda para orientar la cara de la membrana que ha estado en contacto con el gel durante la transferencia, y así poder identificar las bandas detectadas. Durante los siguientes pasos se debe mantener la membrana siempre húmeda.
- Colocar la membrana en una cubeta con ~5 mL de solución de bloqueo durante 1 h a temperatura constante y agitación suave. La cara de la membrana que estuvo en contacto con el gel debe ir hacia arriba.
- OPCIONAL: Realizar 3 lavados de 5 min cada uno con ~5 mL de PBST 1X a temperatura ambiente.
- Realizar una dilución 1:2000 con el anticuerpo primario anti-GFP en 5 mL de solución de bloqueo. Incubar la membrana con esta solución de 3 – 4 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con agitación suave.
- Realizar 3 lavados de 5 min cada uno con ~5 mL de PBST 1X a temperatura ambiente.
- Realizar una dilución 1:5000 con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano en 5 mL de solución de bloqueo. Incubar la membrana con esta solución durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
- Realizar 3 lavados de 5 min cada uno con ~5 mL de PBST 1X a temperatura ambiente.
- Para el proceso de detección, incubar la membrana por 5 min en un volumen suficiente de los reactivos del sistema de detección ECL+Plus.
- Visualizar la quimioluminiscencia con el equipo *LAS 4000 luminescent image analyser* a diferentes tiempos (generalmente entre periodos de 1 min hasta obtener una imagen con resolución y contraste óptimos). El sustrato quimioluminiscente puede ser estable aproximadamente 1 h.

10. GENOTIPADO DE LA LÍNEA MUTANTE *hmg1-3*.

10.1 Extracción de DNA genómico y PCR.

Se pesa la masa de una muestra de tejido de la planta a analizar (2 – 50 mg) en un tubo de 1,5 mL previamente tarado. También se puede extraer DNA genómico a partir de plántulas enteras de 6 días crecidas en placa de agar-MS. Las muestras son congeladas en N₂ líquido y pueden ser almacenadas a -80 °C.

Extracción:

- Triturar las muestras congeladas en N₂ líquido utilizando un Tissue-lyser.
- Añadir 400 µL de tampón TENS y mezclar en vortex.
- Centrifugar la muestra a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo. Evitar llevar los detritos celulares.
- Añadir al sobrenadante obtenido 1 volumen de isopropanol (o 2 volúmenes de etanol absoluto). Dejar reposar 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante sin desechar el sedimento que en muchos casos es imperceptible.
- Lavar el sedimento con 400 µL de etanol 70 % (colocar y retirar).
- Evaporar los restos de etanol del sedimento. Puede realizarse a temperatura ambiente o en un baño a 37 °C. Evitar calentar la muestra por mucho tiempo, para prevenir que el sedimento con el DNA quede pegado en el tubo, lo que ocasionaría problemas en la posterior resuspensión y en el rendimiento final.
- Resuspender el sedimento con 50 µL de Tris 40 mM pH 8 (tampón de baja fuerza iónica).

Reacción de PCR:

GoTaq® Green Master Mix x2 (Promega)	5 µL
Cebador 1 (forward) 10 µM	1 µL
Cebador 2 (reverse) 10 µM	1 µL
DNA (genómico)	3 µL
Volumen final de reacción	10 µL

Cebadores utilizados:

Alelo silvestre H1.2F / H1.3R amplicón de 547 pb.

Alelo mutante LB6 / H1.3R amplicón de 358 pb.

Ciclos de PCR:

Desnaturalización	1 min a 94 °C
35 ciclos	10 seg a 94 °C
	15 seg a 63 °C
	40 seg a 72 °C
Extensión final	3 min a 72 °C

La temperatura de hibridación (T_h) se calcula para cada cebador en particular, es preferible trabajar con pares de cebadores que tengan la misma temperatura de hibridación, pero si no es el caso se utiliza en la reacción de PCR, la temperatura de hibridación menor de entre ambos cebadores. La T_h de cada cebador utilizado se encuentra especificado en la Sección 3.

$$T_h = 4 \times (\text{número de pares GC}) + 2 \times (\text{número de pares AT}) - 5$$

11. MICROBOMBARDEO DE HOJAS DE *A. THALIANA* 2.15.4.

Tras 23 días de desarrollo, se observó la desaparición progresiva de 1S:GFP en algunas hojas en plantas de *A. thaliana* de la línea 2.15.4, estas hojas fueron sometidas a microbombardeo con dos distintos marcadores de lumen de retículo endoplasmático, GFP-KDEL (verde) y T3RE (rojo) para observar la estructura del RE al microscopio confocal, tal y como se detalla a continuación. En esta técnica, el DNA de la construcción es unida a partículas de tungsteno, las cuales son proyectadas por medio de un sistema de presión de Helio sobre el tejido vegetal. Las partículas con DNA penetran en las células donde se lleva a cabo su expresión transitoria.

Precipitación de DNA sobre micro-partículas.

pKar6-GFP (0.5ug/uL)	2uL	-
pT3RE (1ug/uL)		1uL
Tungsten particles 60ug/uL	20uL	21uL
CaCl ₂ 2.5M	20uL	20uL
Spermidine 0.1M	8uL	8uL

- Colocar 20 µL de micro-partículas resuspendidas en un tubo de 1,5 mL.
- Añadir el DNA (pKar6-GFP o pT3RE) y mezclar en vortex.
- Adicionar 20 µL de CaCl₂ 2,5 M. Mezclar en vortex.
- Añadir 8 µL de espermidina 0,1 M y mantener en agitación constante en un agitador durante 5 min a temperatura ambiente.
- Dejar sedimentar por 1 min.
- Centrifugar 5 seg y remover el sobrenadante cuidadosamente.
- Lavar el sedimento con 200 µL de etanol 70 %. Remover el sobrenadante cuidadosamente.
- Lavar el sedimento con 200 µL de etanol absoluto. Remover el sobrenadante cuidadosamente.
- Resuspender con 16 µL de etanol absoluto.
- Para cada bombardeo es necesario un volumen de 8 µL.

Bombardeo de micro-partículas.

- Esterilizar las membranas portadoras o macro-carriers sumergiéndolas en etanol absoluto y dejándolas secar en una campana de flujo laminar.
- Transferir 8 µL de micro-partículas que están cubiertas con el DNA, sobre la membrana portadora.
- Mientras se evapora el etanol de las micro-partículas sobre la membrana portadora, ajustar el contenedor de helio hasta una presión mayor que 1100 PSI.
- Ajustar la rejilla de retención en el soporte.
- Esterilizar los discos de ruptura de 1100 PSI con isopropanol. Ajustarlos también en el soporte.
- Colocar la membrana portadora con la rejilla de retención.
- Colocar las hojas de *A. thaliana* con la cara posterior hacia arriba, sobre placas con agar-MS 0,5x.
- Sujetar las placas con las muestras en el segundo nivel desde la parte inferior.

- Cerrar la cámara de microbombardeo y aplicar vacío hasta que la presión alcance 0,06 atm (27-29 mmHg) (Figura M3A).
- Mantener las condiciones de vacío, y accionar el disparador hasta que el disco de ruptura de 1100 PSI se rompa (Figura M3B).
- Desactivar el vacío y retirar la placa con la muestra, cerrarla y sellarla con Leukopore.
- Incubar las placas que contienen las hojas bombardeadas durante 18-24 h a 22 °C en una cámara de día largo.

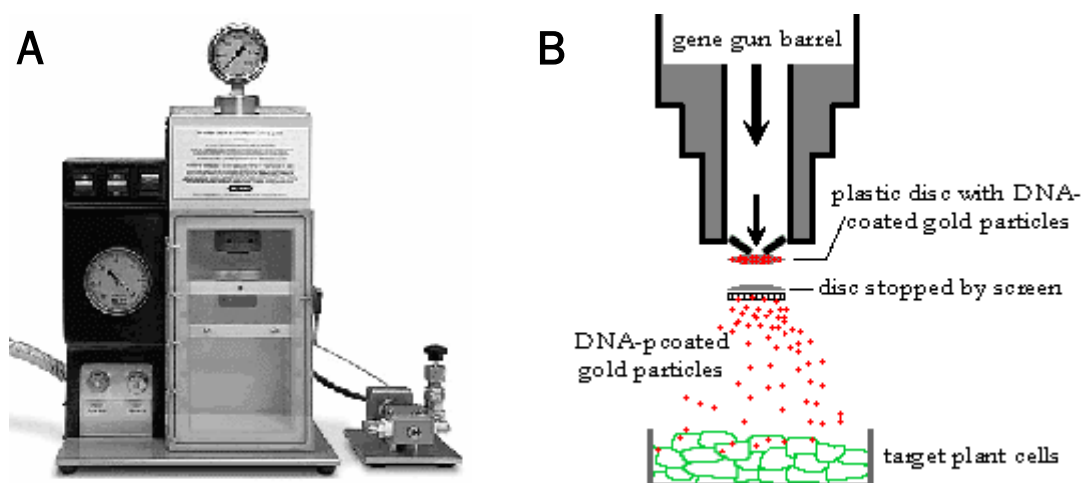


Figura M3. A. Equipo de microbombardeo. B. Representación esquemática del sistema de microbombardeo después de aplicar la presión de helio.

- Las hojas bombardeadas son colocadas sobre portaobjetos con una gota de agua y cubiertos con cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
- Las hojas son observadas al microscopio confocal Olympus FV1000-ASW (Servicio Microscópico del CRAG).

12. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE HMGR.

12.1 Inmunocitoquímica *in-situ whole mount*.

Tampones y soluciones.

PBS 10x

KCl.....	2 g
NaCl.....	80 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O.....	17.8 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

H₂O destilada q.s.p. 1 L.

Ajustar el pH a 7.4 con KOH después de la dilución con agua para PBS 1x.

Solución de fijación

Para-formaldehído..... 4 % p/v.

Tritón x-100..... 0,1 % v/v.

Para disolver en PBS x1 es necesario incrementar el pH con KOH 10 N. Después se ajusta el pH finalmente a 7,4 con HCl. El tritón es añadido al final.

Solución de digestión

Driselasa..... 2 % p/v

Disolver en PBS 1x.

La driselasa no se disolverá, sino que formará una solución coloidal. Centrifugar brevemente y utilizar sólo el sobrenadante.

Solución de permeabilización

IGEPAL..... 3 % v/v.

DMSO..... 10 % v/v.

En PBS x1.

Procedimiento.

Plántulas de *A. thaliana* col0 de 6 días crecidas a 22 °C en una cámara de día largo, constituidas principalmente por cotiledones, fueron el material de partida. En este estado de crecimiento se observan niveles de expresión de HMGR adecuados para ensayos de inmunolocalización.

1. Un número adecuado de plántulas fueron recogidas con pinzas y transferidas cuidadosamente a un tubo Falcon de 50 mL con una *solución de fijación*.
2. Incubar el tubo Falcon al vacío por 1 h a temperatura ambiente (~23 °C), para asegurar que la *solución de fijación* penetre adecuadamente en todo el tejido.
3. Retirar la *solución de fijación* y lavar el material 2 veces durante 5 – 10 min con PBS x1 a temperatura ambiente. Para ver la clorofila auto-fluorescente en las células ir directamente al paso 4.
 - a) Retirar el PBS x1, añadir metanol absoluto e incubar por 10 min a 37 °C en un agitador a 80 rpm; repetir este paso 2 veces más hasta que la clorofila haya desaparecido. Para reducir la manipulación y posible daño al tejido, las

- muestras fueron colocadas en rejillas y los lavados fueron realizados en placas de 6 pozos.
- b) Retirar el metanol, añadir una mezcla de etanol/xilol 1:1 e incubar por 10 min a 37 °C en un agitador a 80 rpm; repetir este paso 2 veces más.
 - c) Retirar el etanol/xilol 1:1, añadir xilol al 98 % e incubar por 10 min a 37 °C en un agitador a 80 rpm; repetir este paso 2 veces más.
 - d) Retirar el xilol, añadir etanol/xilol 1:1 e incubar por 10 min a temperatura ambiente en un agitador a 80 rpm; repetir este paso 1 vez más.
 - e) Retirar el etanol/xilol 1:1, añadir etanol al 99 % e incubar por 10 min a temperatura ambiente en un agitador a 80 rpm; repetir este paso 1 vez más.
 - f) Retirar el etanol al 99 %, añadir etanol al 90 % e incubar por 5 min a temperatura ambiente en un agitador a 80 rpm.
 - g) Retirar el etanol al 90 %, añadir etanol al 75 % e incubar por 5 min a temperatura ambiente en un agitador a 80 rpm.
 - h) Retirar el etanol al 75 %, añadir etanol al 50 % e incubar por 5 min a temperatura ambiente en un agitador a 80 rpm.
 - i) Retirar el etanol al 50 %, añadir etanol al 25 % e incubar por 5 min a temperatura ambiente en un agitador a 80 rpm.
4. Retirar el líquido, lavar el material con H₂O miliQ durante 5 min 2 veces.
 5. Transferir el material vegetal cuidadosamente a un portaobjetos de vidrio.
 - a) Colocar una gota de agua sobre el portaobjetos.
 - b) Colocar el material sobre el portaobjetos y cubrirlo con un cubreobjetos de vidrio.
 - c) Presionar suavemente sobre las muestras para mejorar la adherencia del material y la penetración de agua en el tejido. Luego, colocar los portaobjetos con las muestras en nitrógeno líquido durante aproximadamente 10 seg. Dejar las muestras descongelar a temperatura ambiente y congelarlas nuevamente en nitrógeno líquido.
 - d) Repetir este paso (congelación/descongelación) 5 veces. Esto mejora la permeabilidad de las células creando pequeñas fracturas en el tejido.
 - e) Retirar el cubreobjetos cuidadosamente antes de que la muestra se descongele completamente con la ayuda de un bisturí. Dejar que las muestras sobre los portaobjetos se sequen completamente durante 1 h o toda la noche a temperatura ambiente.
 6. Rehidratar el material colocando unas gotas de PBS x1 sobre los portaobjetos e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
 7. Retirar el PBS x1 y llevar los portaobjetos a una cámara húmeda.

8. Cubrir la muestra añadiendo $\sim 200 \mu\text{L}$ de una *solución de digestión* (Driselasa 2 % p/v disuelto en PBS x1) sobre los portaobjetos. Incubar por 45 min a 37 °C.
9. Retirar la Driselasa y lavar las muestras colocando los portaobjetos en contenedores con $\sim 100 \text{ mL}$ de PBS x1. Sumergir los portaobjetos en PBS 1x por 5 min 3 veces.
10. Cubrir las muestras que están en los portaobjetos con $\sim 200 \mu\text{L}$ de una *solución de permeabilización*.
11. Retirar la *solución de permeabilización* y lavar el material utilizando los contenedores de portaobjetos con $\sim 100 \text{ mL}$ de PBS x1. Sumergir los portaobjetos en PBS 1x por 5 min 3 veces.
12. Cubrir las muestras con $\sim 200 \mu\text{L}$ de una solución de BSA 3 % p/v (disuelto en PBS x1). Incubar por 1 h a temperatura ambiente.
13. Retirar la solución de BSA. Cubrir las muestras con $\sim 200 \mu\text{L}$ de la solución del anticuerpo primario, cubrir los portaobjetos cuidadosamente con tiras de parafilm (esto evita que la solución del anticuerpo primario se evapore) y llevar los portaobjetos a una cámara húmeda; incubar al menos durante 3 h a 37 °C, aunque la incubación puede continuar durante toda la noche a 4 °C. Las soluciones de anticuerpo primario utilizadas fueron:
 - Anticuerpo Ab-26.8 (contra CD1 de HMGR) dilución 1:500 con solución de BSA 3 % p/v.
 - Anticuerpo Ab-5450 (contra GFP) dilución 1:1000 con solución de BSA 3 % p/v.
14. Retirar la solución del anticuerpo primario y lavar el material utilizando los contenedores de portaobjetos con $\sim 100 \text{ mL}$ de PBS x1. Sumergir los portaobjetos en PBS 1x por 5 min 3 veces.
15. Retirar el PBS x1. Cubrir las muestras con $\sim 200 \mu\text{L}$ de la solución del anticuerpo secundario, cubrir los portaobjetos cuidadosamente con tiras de parafilm y llevar los portaobjetos a una cámara húmeda; incubar al menos durante 3 h a 37 °C. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:
 - Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo portador de fluoróforo AlexaFluor 594, dilución 1:1000 con solución de BSA 3 % p/v.
 - Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo portador de fluoróforo AlexaFluor 555, dilución 1:1000 con solución de BSA 3 % p/v.
 - Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo AlexaFluor 488, dilución 1:1000 con solución de BSA 3 % p/v.
16. Retirar la solución del anticuerpo secundario y lavar el material utilizando los contenedores de portaobjetos con $\sim 100 \text{ mL}$ de PBS x1. Sumergir los portaobjetos en PBS 1x por 5 min 3 veces.

17. OPCIONAL: A partir de una solución stock de DAPI 1 mg/mL (disuelto en PBS x1) realizar una dilución 1:1000 con agua. Cubrir las muestras con ~200 µL de esta solución para visualizar los núcleos. Incubar por 30 min a temperatura ambiente.
18. Retirar la solución de DAPI, lavar las muestras colocando H2O miliQ e incubando por 10 min a temperatura ambiente. Repetir este paso 3 veces más.
19. Retirar el agua, añadir una gota de n-propyl gallate (NPG) y cubrir las muestras con un cubreobjetos.
20. Analizar las muestras directamente en un microscopio confocal (Olympus FV1000-ASW o Leica SP5) o almacenarlas a 4 °C en oscuridad para preservar la fluorescencia que es estable sólo por algunos días.

13. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Todos los procedimientos preparativos y de observación de muestras fueron realizados en el servicio de Microscopía Electrónica del Parc Cientific de Barcelona.

13.1 Fijación química para ultraestructura.

- Fijar químicamente las muestras por inmersión en una solución de glutaraldehído/para-formaldehído ambos al 1,5 % v/v y CaCl₂ 2 mM en tampón cacodilato pH 7.4, durante 24 h al vacío y a 4 °C.
- Lavar con tamón cacodilato pH 7.4 a 4°C.
- Realizar una post-fijación con una solución de OsO₄ 1 % y K₃Fe(CN)₆ 0.8 % en tampón cacodilato, durante 3 h a 4 °C.
- Retirar la solución de post-fijación y deshidratar la muestra realizando lavados con acetona a 4 °C y en agitación:

% Acetona	Lavados	Tiempo (min)
50	1	15
70	2	15
90	2	15
96	1	30
96	1	20
96	1	15
100	2	30

- Infiltrar las muestras con resina suprr durante 2 días. Incluir en la misma resina orientada para cortes transversales y polimerizar a 60 °C durante 2 días.

- Realizar cortes semifinos, para su observación al microscopio de luz normal para determinar el estado de las muestras e identificar los tipos celulares.
- Realizar cortes ultra-finos utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut UC6 (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Montar los cortes en rejillas de cobre cubiertas de Formvar.
- Teñir las rejillas montadas con acetato de uranilo 2% en agua y citrato de plomo.
- Observar las rejillas al microscopio electrónico JEM-1010 (Jeol, Japan) equipada con una cámara CCD SIS Megaview III y el software AnalySIS.

13.2 Criosustitución de muestras fijadas químicamente.

- Fijar químicamente las muestras por inmersión en una solución de paraformaldehído 4 % y glutaraldehído 0.1 % en 0.1 M de PB 0.1 M.
- Lavar con una solución de glicina 0.15 M en PB 0.1 M a 4 °C, una vez por 10 min, otra por 20 min y dos veces más por 10 min.
- Incubar las muestras en una solución de glicerol (crioprotector) con Tampón fosfato (PB) 0.1 M gradualmente, hasta alcanzar una concentración final de glicerol de 30 %.

% Glicerol	Lavados	Tiempo (hrs)
10	1	2
20	1	3
30	1	O.N.

- Congelar las muestras en propano líquido a -188 °C (Leica EM CPC, Leica Microsystems, Vienna) y guardarlas en nitrógeno líquido a -196 °C.
- Realizar la criosustitución en un sistema de criosustitución automática (AFS; Leica Microsystems, Vienna) utilizando metanol con acetato de uranilo 0.5 % durante 3 días a -90 °C.
- Subir la temperatura gradualmente durante el cuarto día 5 °C por cada hora, hasta alcanzar una temperatura de -50 °C.
- Lavar las muestras a -50 °C con metanol.
- Incluir las muestras en resina lowicryl HM20 durante 10 días.
- Realizar cortes ultra-finos utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut UC6 (Leica Microsystems, Vienna), y fueron montados en rejillas de oro cubiertas de Formvar.
- El inmunomarcaje de las rejillas se detalla más adelante (véase *Inmunomarcaje*).

13.3 High pressure freezing (HPF) para ultraestructura.

- Transferir las muestras a planchettes de 1.5 mm de diámetro y 200 µm de profundidad llenas de dextrano 10 % o pasta de levadura.
- Crioinmovilizar inmediatamente utilizando un congelador de alta presión Leica EMPact (Leica, Vienna, Austria) y almacenar en nitrógeno líquido.
- Realizar la criosustitución durante 3 días a -90 °C en acetona anhidra con tetróxido de osmio 2 % y acetato de uranilo 0,1 %.
- Elevar la temperatura de las muestras 5 °C por hora hasta alcanzar temperatura ambiente (EM AFS, Leica, Vienna, Austria).
- Después de varios lavados con acetona, infiltrar las muestras con resina Epon durante 2 días e incluirlas en una delgada capa de la misma.
- Polimerizar la resina a 60 °C durante 48 h.
- Realizar cortes semifinos, para su observación al microscopio de luz normal para determinar el estado de las muestras e identificar los tipos celulares.
- Realizar cortes ultra-finos utilizando un Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Montar los cortes en rejillas de cobre cubiertas de Formvar.
- Teñir las rejillas montadas con acetato de uranilo 2% en agua y citrato de plomo.
- Observar las rejillas al microscopio electrónico JEM-1010 (Jeol, Japan) equipada con una cámara CCD SIS Megaview III y el software AnalySIS.

13.4 High pressure freezing (HPF) para inmunocitoquímica.

- Transferir las muestras a planchettes de 1.5 mm de diámetro y 200 µm de profundidad llenas de pasta de levadura 10%.
- Crioinmovilizar inmediatamente utilizando un congelador de alta presión Leica EMPact (Leica, Vienna, Austria) y almacenar en nitrógeno líquido.
- Realizar la criosustitución durante 3 días a -90 °C en metanol anhidro con acetato de uranilo 0,5 %.
- Elevar la temperatura de las muestras 5 °C por hora hasta alcanzar temperatura de -50 °C (EM AFS, Leica, Vienna, Austria).
- Después de varios lavados con metanol, las muestras fueron infiltradas con resina Lowicryl HM20 durante 4 días.
- Realizar la inclusión y polimerización a -50 °C durante 48 h con lámparas de luz UV.
- Realizar cortes semifinos, para su observación al microscopio de luz normal para determinar el estado de las muestras e identificar los tipos celulares.

- Realizar cortes ultra-finos utilizando un Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Montar los cortes en rejillas de oro cubiertas de Formvar.

Inmunomarcaje.

- Incubar las rejillas a temperatura ambiente sobre gotas de BSA 5 % disuelto en PBS por 20 min.
- Incubar con el anticuerpo primario a una dilución adecuada (véase Sección 4) con BSA por 2 h.
- Lavar 3 veces con gotas de Tween20 0.25 % en PBS por 30 min.
- Incubar las rejillas con el anticuerpo secundario unido a partículas coloidales de oro de 12 o 18 nm a una dilución adecuada (véase Sección 4) con PBS.
- Lavar 3 veces con gotas de PBS por 5 min y dos veces más con agua destilada. Secar con aire.
- Como control para uniones no específicas del anticuerpo secundario, el anticuerpo primario fue omitido.
- Teñir las rejillas montadas con acetato de uranilo 2% en metanol y citrato de plomo.
- Observar las rejillas al microscopio electrónico JEM-1010 (Jeol, Japan) equipada con una cámara CCD SIS Megaview III y el software AnalySIS.

14. ANÁLISIS PROTEÓMICO.

El análisis proteómico fue realizado en el laboratorio de Proteómica del Instituto de Oncología de Vall d'Hebron (VHIO).

14.1 Digestión de proteínas en gel de SDS-PAGE.

Soluciones de destinción.

30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$

$K_3[Fe(CN)_6]$	0.395 g
Cantidad.....	40 mL
Concentración.....	30 mM

Proteger de la luz con papel aluminio.

100 mM Tiosulfato sódico

Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O.....	0.992 g
Cantidad.....	40 mL
Concentración.....	100 mM

Soluciones de digestión.

Tampón 25 mM bicarbonato amónico

NH ₄ HCO ₃	0.20 g
Cantidad.....	100 mL
Concentración.....	25 mM

Tampón 25 mM bicarbonato amonico/50 % acetonitrilo

NH ₄ HCO ₃	0.20 g
Acetonitrilo.....	50 mL
Cantidad.....	100 mL

0.2 % Ácido trifluoroacético (TFA)

TFA.....	200 µL
Cantidad.....	100 mL
Concentración.....	0.2 % v/v

0.1 % TFA/ 50 % ACN

TFA.....	100 µL
Acetonitrilo.....	50 mL
Cantidad.....	100 mL

Solución stock Tripsina

Tripsina.....	100 µg
HCl 1 mM.....	500 µL

**Tripsina: Promega Trypsin Gold (V5280). Vial de 100 µg.

Una vez resuspendido, alicuotar y guardar a -80 °C. Justo antes de la digestión, diluir la solución de tripsina con bicarbonato amónico 25 mM, en hielo.

Procedimiento.

Lavado y destinción de la banda.

- Recortar en la campana de flujo horizontal, con un bisturí y sobre cristal limpio la banda a digerir. Dividirla en pequeños trozos de aproximadamente 1 – 2 mm y depositarlos en un tubo eppendorf de 0.5 mL.
- Cubrir la banda con la solución de bicarbonato amónico 25mM (100 – 200 µL), incubar 20 min.
- Retirar esta solución con la pipeta y añadir 200 µL de bicarbonato amónico 25 mM/ acetonitrilo 50 %, incubar 20 min. Repetir este paso una vez.
- Para tinción de coomassie, repetir este último paso si es necesario hasta que la banda esté lo más desteñida posible. Puede agitarse el tubo en vortex lento.

Digestión.

- Retirar la solución anterior, añadir 200 µL de acetonitrilo 100 % para deshidratar el gel, e incubar 10 min.
- Retirar el acetonitrilo y dejar evaporar los restos que queden durante 5 min al aire o en un desecador al vacío.
- Preparar la solución de tripsina, 0.013 µL tripsina (stock 0.2 µg/µL en HCl 1mM)/ µL bicarbonato amónico 25 mM, y mantenerla en hielo.
- Añadir solución de tripsina hasta cubrir la banda para rehidratar los trozos de acrilamida, pero procurando que no quede mucho líquido en exceso, 60 µL aproximadamente de la solución anterior (~0.16 µg de tripsina).
- Incubar a 37 °C 3h o a 30 °C toda la noche.

Extracción de los péptidos.

- Añadir 25 µL de acetonitrilo sin retirar la solución de tripsina, incubar 15 min a 37 °C.
- Recoger el sobrenadante y depositarlo en otro tubo eppendorf.
- Añadir 130 µL de *solución de extracción*, 0.2 % de ácido trifluoroacético (TFA) en agua. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Recoger el sobrenadante y mezclarlo con el anterior. Esta solución de péptidos puede guardarse congelada hasta su análisis por MS.

14.2 Análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LCMS: *Liquid chromatography-Mass spectrometric*)

Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro Maxis Impact Q-TOF (Bruker, Bremen) acoplado a un sistema nano-HPLC (Proxeon, Denmark).

- Evaporar la muestra en un *speed Vac* a sequedad por 1 h aproximadamente.
- Disolver con una solución acuosa de acetonitrilo 5 % y ácido fórmico 0.1 %.
- Concentrar la muestra utilizando una columna de nanocaptura Proxeon (ID 100 μm).
- Cargar la muestra en una columna de nanoseparación de 15 cm Aclaim PrepMad (Dionex) (ID 75 μm).
- Ejecutar la cromatografía utilizando un gradiente de acetonitrilo en ácido fórmico 0.1 %, de 5 a 35 % en 60 min, con una velocidad de flujo de 300 nL/min. Acoplar la columna a la entrada de un espectrómetro de masas, a través de una fuente de ionización spray de captura (Broker).
- Realizar la espectrometría de masas (MS) en ciclos de 1 Hz, seguido de MS/MS (0.5 – 2 Hz) de los 8 iones precursores más intensos con un umbral de intensidad para la fragmentación de 5000 cuentas y usando un tiempo de exclusión dinámica de 0.5 min. Todos los espectros fueron obtenidos en el rango de 100 a 2200 Da. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software de análisis de datos (Data Análisis 4.0) (Bruker).
- Las proteínas fueron identificadas utilizando Mascot (Matrix Science, London UK) buscando en la base de datos SwissProt restringiendo a la taxonomía de *A. thaliana* (11247 secuencias), el espectro MS/MS fue examinado con una tolerancia de precursor de masa de 10 ppm, y una tolerancia de fragmento de 0.05 Da, especificidad de tripsina con un máximo de dos errores en el corte, carbamidometilación de cisteína establecido como modificación fija, y oxidación de metionina como modificación variable. El umbral significativo para las identificaciones fue establecido con un valor $p < 0.05$, puntuación mínima de iones 20.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, R.G., Orci, L., Brown, M.S., Garcia-Segura, L.M., and Goldstein, J.L. (1983). Ultrastructural analysis of crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells and its disappearance in response to cholesterol. *J Cell Sci* **63**: 1–20.

Antolín-Llovera, M. (2005). Paper de les proteïnes AtKLC1 i AtB" en la regulació de l'HMG-CoA reductasa d'*Arabidopsis thaliana*. In Department de Bioquímica i Biologia Molecular (Barcelona: Universitat de Barcelona), pp. 206

Aoyagi, K., Beyou, A., Moon, K., Fang, L., and Ulrich, T. (1993). Isolation and characterization of cDNAs encoding wheat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiol* **102**: 623–628.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.

Bach, T. J., Rogers, D. H., and Rudney, H. (1986). Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase from radish seedlings. *Eur J Biochem* **154**: 103–111.

Bach, T. J. (1987). Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. *Plant Physiol Biochem* **25**: 163–178.

Barlowe, Ch. (2009). Atlastin GTPases shape up ER networks. *Developmental Cell*.

Baschong, W., Baschong-Prescianott, C., Wurtz, M., Carlemalm, E. and Kellenberger, E. (1984). Preservation of protein structures for electron microscopy by fixation with aldehydes and/or OsO₄. *Eur J Cell Biol* **35**: 21–26.

Basson, M.E., Thorsness, M., Rine, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5563–5567.

Basson, M., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R., and Rine, J. (1988). Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase, the rate limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Biol Cell* **10**: 3797–3808.

Behnke, H. D., and Eschlbeck, G. (1978). Dilated cisternae in *Capparales*-an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum. *Protoplasma* **97**: 351–363.

Bochar, D.A., Stauffacher, C.V., and Rodwell, V.W. (1991). Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab* **66**: 122–127.

Bones, A.M. and Rossiter, J.T. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol Plant* **97**: 194–208.

- Bonnett, H. T. Jr., Newcomb, E. H. (1965). Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. *J Cell Biol* **27**:423-432.
- Bramley, P. (1997). Isoprenoid Metabolism. In *Plant Biochemistry* (Academic Press Ltd), pp. 417-434.
- Braun, M. (2001). Association of spectrin-like proteins with the actinorganized aggregate of endoplasmic reticulum in the *Spitzenkorper* of gravitropically tip-growing plant cells. *Plant Physiol* **125**: 1611-1619.
- Brown, D.A., and Simoni, R.D. (1984). Biogenesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, an integral glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1674-1678.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. and Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**: 1051-1054.
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S. and Henrissat, B. (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* **5**: 663-675.
- Burnett, R.J., Maldonado-Mendoza, I.E., Mcknight, T.D., and Nessler, C.L. (1993). Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coszyme-A reductase gene from *Camptotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **103**: 41-48.
- Caelles, C., Ferrer, A., Balcells, L., Hegardt, F. G. and Boronat, A. (1989). Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol* **13**(6): 627-38.
- Campos, N. and Boronat, A. (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**(12): 2163-74.
- Campos, N., Arró, M., Ferrer, A., and Boronat, A. (2014) Determination of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in plants. *Plant Isoprenoids: Methods and protocols* (ed. M. Rodríguez-Concepción). Serie: Methods in Molecular Biology **1153**. Springer Science+Business Media. New York. DOI 10.1007/978-1-4939-0606-2_3.
- Chapman, A., and Hill, B. (2000). Dictionary of Natural Products on CD-ROM (version 9.1.) (London, New York: CRC Press).
- Chappell, J. (1995a). The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol* **107**(1): 1-6.
- Chappell, J. (1995b). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 521-47.

- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., and Saunders, C. (1995c). Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants?. *Plant Physiol* **109**: 1337-1343.
- Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr Opin Plant Biol* **5**(2): 151-7.
- Chen, S., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2011). ER network formation requires a balance of the dynamin-like GTPase Sey1p and the Lunapark family member Lnp1p. *Nature Cell Biology* **14**(7): 707-716.
- Chin, D.J., Luskey, K.L., Anderson, R.G.W., Faust, J.R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1982). Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold elevation in 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1185-1189.
- Choi, D., Ward, B. L. and Bostock, R. M. (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4**(10): 1333-44.
- Choi, S. B., Wang, C., Muench, D. G., Ozawa, K., Franceschi, V. R., Wu, Y., Okita, T. W. (2000). Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* **407**: 765-767.
- Chrispeels, M. J., and Herman, E. M. (2000). Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar modeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles. *Plant Physiol* **123**: 1227-1234.
- Chye, M.L., Kush, A., Tan, C.T., and Chua, N.-H. (1991). Characterization of cDNA and genomic clones encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Hevea brasiliensis*. *Plant MOI Biol* **16**: 567-577.
- Chye, M.L., Tan, C.T., and Chua, N.H. (1992). Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol Biol* **19**: 473-484.
- Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743.
- Clouse, S.D. (2002). *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell* **14**: 1995-2000.
- Cowan, A.K., Moore-Gordon, C.S., Bertling, I., and Wolstenholme, B.N. (1997). Metabolic Control of Avocado Fruit Growth (Isoprenoid Growth Regulators and the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase). *Plant Physiol* **114**: 511-518.
- Cramer, C.L., Cottingham, C.K., Denbow, C.J., Eisenback, J.D., Radin, D.N., and Weissenborn, D.L. (1993). Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* **25**: 507-518.

- Cunillera, N., Boronat, A., and Ferrer, A. (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* **272**: 15381-15388.
- Denbow, C. J., Lang, S. and Cramer, C. L. (1996). The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem* **271**(16): 9710-5.
- Deruère, J., Jackson, K., Garbers, C., Söll, D., and DeLong, A. (1999). The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity *in vivo*. *The Plant Journal* **20**: 389-399.
- Dey, P. M., and del Campillo, E. (1984). Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. *Advances in Enzymology* **56**: 141-249.
- Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E. and Carlson, J. E. (1995). A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* **107**: 331-339.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W. and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* **21**: 129-228.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**: 78-84.
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arró, M. and Boronat, A. (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(3): 927-31.
- Esau, K. (1975). Dilated endoplasmic reticulum cisternae in differentiating xylem of minor veins of *Mimosa pudica*. *L leaf Ann Bot* **39**: 167-174.
- Esen, A. (1993). β -Glucosidases: overview. In *β -Glucosidases, Biochemistry and Molecular Biology*. (Esen, A., ed.). Washington, DC: American Chemical Society, pp. 1-14.
- Farmer, E. E., Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7713-7716.
- Fawcett, D. W. (1981). *The cell*, Philadelphia: W. B. Saunders, 301-368.
- Ferre-D'Amare, A. R., and Burley, S. K. (1995). DNA recognition by helix-loop-helix proteins. In *Nucleic Acids and Molecular Biology*, F. Eckstein and D.M.J. Lilley, eds (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 285-298.

- Ferrer, A., Aparicio, C., Nogues, N., Wettstein, A., Bach, T.J., and Boronat, A. (1990). Expression of catalytically active radish 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **266**: 67-71.
- Ferrero, S. (2010). Anàlisi de l'HMG-CoA reductasa d'*Arabidopsis thaliana*: implicació en la morfogènesi del reticle endoplasmàtic. In Department de Bioquímica i Biologia Molecular (Barcelona: Universitat de Barcelona), pp. 205.
- Feys, B. J. F., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., Turner, J. G. (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- Friesen, J. A., and Rodwell, V. W. (2004). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biology* **5**: 248.
- Fukuda, M., A. Yamamoto, and K. Mikoshiba. (2001). Formation of crystalloid endoplasmic reticulum induced by expression of synaptotagmin lacking the conserved WHXL motif in the C terminus. *J Biol Chem* **276**: 41112-41119.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y. (1999a). A highly conserved signal controls degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase in eukaryotes. *J Biol Chem* **274**: 31671-31678.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y. (1999b). A 'distributed degron' allows regulated entry into the ER degradation pathway. *Embo J* **18**: 5994-6004.
- Gauger, A.K., i Goldstein, L.S. (1993). The Drosophila kinesin light chain. Primary structure and interaction with kinesin heavy chain. *J Biol Chem* **268**: 13657-13666.
- Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Marbach, J., A., D., Fleck, J., and Jamet, E. (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol Biol* **20**: 337-341.
- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J., and Brown, A. (1985). Membrane-bound domain of HMG-CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* **41**: 249-258.
- Gill, J. L., Beach, M. J., and Rodwell, V. W. (1985). Mevalonate utilization in *Pseudomonas* sp. M. Purification and characterization of an inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **260**: 9393-9398.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**(6257): 425-30.
- Goldstein, L. S. (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol* **11**(12): 477-82.
- Gong, F.C., T.H. Giddings, J.B. Meehl, and L.A. Staehelin. (1996). Z-membranes: artificial organelles for overexpressing recombinant integral membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2219-2223.

- González, V. (2002). Caracterización funcional de la 3-hidroxi-3-metilmetilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. In Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-División III (Barcelona: *Universitat de Barcelona*).
- Griffiths, G. (1993). *Fine Structure Immunocytochemistry*. Springer, Berlin and Heidelberg.
- Gunning, B. E. S., and Steer, M. W. (1975). *Ultrastructure and the Biology of Plant Cells*. London: Edward Arnold.
- Gunning, B. E. S. (1998). The mystery organelles in *Arabidopsis* expressing GFP. *Trends Plant Sci* **3**: 417.
- Halford, N.G., and Hardie, D.G. (1998). SNF1-related protein kinase: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* **37**: 735-748.
- Hamada, S., Ishiyama, K., Sakulsingharoj, C., Choi, S. B., Wu, Y., Wang, C., Singh, S., Kawai, N., Messing, J., Okita, T. W. (2003). Dual regulated RNA transport pathways to the cortical region in developing rice endosperm. *Plant Cell* **15**: 2265-2272.
- Hampton, R. Y., Koning, A., Wright, R. and Rine, J. (1996). In vivo examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2): 828-33.
- Hampton, R. Y. (2002). Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 345-78.
- Hara-Nishimura, I., Kinoshita, T., Hiraiwa, N. and Nishimura, M. (1998a) Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *J Plant Physiol* **152**: 668-674.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., Nishimura, M. (1998b). Transport of storage proteins to protein-storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**: 825-836.
- Hara-Nishimura, I., and Matsushima, R. (2003). A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses?. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 583-588.
- Hara-Nishimura, I., Matsushima, R., Shimada, T., and Nishimura, M. (2004). Diversity and formation of endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. Are these compartments specific to plant cells?. *Plant Physiology* **136**: 3435-3439.
- Hara-Nishimura, I., and Hatsugai, N. (2011). The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1298:1304.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., and Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2122-2127.

- Haseloff, J., and Siemering, K. R. (1998). The Uses of GFP in Plants. GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications. Division of Cell Biology MRC Laboratory of Molecular Biology Hills Road. Cambridge. England.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2006). A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis* **11**: 905-911.
- Hawes, C., Saint-Jore, C., Martin, B. and Zheng, H. Q. (2001). ER confirmed as the location of mystery organelles in Arabidopsis plants expressing GFP!. *Trends Plant Sci.* **6**: 245–246.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N. K., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2001). A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **42**: 894-899.
- Havelange, A., Courtoy, R. (1974). Description et essais de caractérisation cytochimique d'un composant cytoplasmique inconnu dans les cellules meristematiques de *Sinapis alba* L. (Crucifères). *C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D* **278**: 1191-1193.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P. C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* **20**: 735–747.
- Hemmerlin, A., and Bach, T.J. (2000). Farnesol-Induced Cell Death and Stimulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Activity in Tobacco cv Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol* **123**: 1257-1268.
- Herman, E. M., Larkins, B. A. (1999). Protein storage bodies. *Plant Cell* **11**: 601-661.
- Herman, E. M., Schmidt, M. A. (2004). Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol* **136**: 3440-3446.
- Hey, S. J., Powers, S. J., Beale, M. H., Hawkins, N. D., Ward, J. L., and Halford, N. G. (2006). Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase. *Plant Biotechnology Journal* **4(2)**: 219-229.
- Hobot, J.A., Villinger, W., Escaig, J., Maeder, M., Ryter, A. and Kellenberger, E. (1985). Shape and fine structure of nucleoids observed on sections of ultrarapidly frozen and cryosubstituted bacteria. *J Bacteriol* **162**: 960–972.
- Hoefert, L. L. (1975). Tubules in dilated cisternae of endoplasmic reticulum of *Thlaspi arvense* (Cruciferae). *Amer J Bot* **62**: 756-760.
- Humbel, B. and Müller, M. (1985). Freeze substitution and low temperature embedding. In *The Science of Biological Specimen Preparation for Microscopy and Microanalysis* (Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A. and Wolosewick, J.J., eds), pp. 175–183, Scanning Electron Microscopy Inc., AMF O'Hare, IL

- Hurbain, I., and Sachse, M. (2011). The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biol Cell* **103**: 405-420.
- Istvan, E. S., Palnitkar, M., Buchanan, S. K. and Deisenhofer, J. (2000). Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *Embo J* **19(5)**: 819-30.
- Iversen, T. H., and Flood, P. R. (1969). Rod-shaped accumulations in cisternae of the endoplasmic reticulum in root cells of *Lepidium sativum* seedlings. *Planta (Berl.)* **86**: 295-298.
- Iversen, T. H. (1970a). Cytochemical localization of myrosinase (b-thioglucosidase) in root tips of *Sinapis alba*. *Protoplasma* **71**: 451-466.
- Iversen, T. H. (1970b). The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the Cruciferae. *Protoplasma* **71**: 467-477.
- Iversen, T. H. *et al.* (1983). Morphology and myrosinase activity in root protoplasts of Brassicaceae. *Z. Pflanzenphysiol.* **112**: 391-401.
- Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*.
- Jingami, H., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., and Luskey, K.L. (1987). Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **104**: 1693-1704.
- Kai, K., Shimizu, B., Mizutani, M., Watanabe, K., and Sakata, K. (2006). Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **67(4)**: 379-386.
- Kay, B. K., Williamson, M. P. and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14**: 231-41.
- Kellenberger, E. (1991). The potential of cryofixation and freeze substitution: observations and theoretical considerations. *J Microsc* **161**: 183-203.
- Kim, Y. J., Lee, O. R., Oh, J. Y., Jang, M. G., and Yang D. C. (2014). Functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase encoding genes in triterpene saponin-producing Gingseng. *Plant Physiology* **165**: 373-387.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (1995). The sequence and expression of the γ -VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **36**: 1555-1562.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* **19**: 43-53.

- Kochevar, D., and Anderson, R.G.W. (1987). Purified crystalloid endoplasmic reticulum from UT-1 cells contains multiple proteins in addition to 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *J Biol Chem* **262**: 10321–10326.
- Köhler, R. H. (1998). GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells. *Trends Plant Sci* **3**:317-320.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**: 175-182.
- Kondo, K. and Oba, K. (1986). Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from potato tubers. *J Biochem* **100**(4): 967-74.
- Koning, A. J., Roberts, Ch. J., and Wright, R. L. (1996). Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *MBC J* **7**: 769-789.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-96.
- Korth, K.L., Jaggard, D.A., and Dixon, R.A. (2000). Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J* **23**: 507-516.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13172-13177.
- Lange, B. M. and Ghassemian, M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* **51**(6): 925-48.
- Lawrence, C. J., Malmberg, R. L., Muszynski, M. G. and Dawe, R. K. (2002). Maximum likelihood methods reveal conservation of function among closely related Kinesin families. *J Mol Evol* **54**,(1): 42-53.
- Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I. and Mundy, J. (1995) Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *J Biol Chem* **270**: 15789–15797.
- Learned, R.M. (1996). Light suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**: 645-655.
- Learned, R.M., and Connolly, E.L. (1997). Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**(3): 499-511.

Leckie, B. M., and Stewart, C. N. Jr. (2011). Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Rep* **30**: 325–334.

Leivar, P. (2003). Anàlisi funcional de la regió N-terminal de l'HMG-CoA Reductasa d'*Arabidopsis*. In Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Barcelona: Universitat de Barcelona), pp. 148.

Leivar, P., González, V., Castel, S., Trelease, R.N., López-Iglesias, C., Arró, M., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., and Fernández-Busquets, X. (2005). Subcellular Localization of *Arabidopsis* 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. *Plant Physiology* **137**: 57-69.

Leivar, P., Antolín-Llovera, M., Ferrero, S., Closa, M., Arró, M., Ferrer, A., Boronat, A., and Campos, N. (2011). Multilevel control of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *The Plant Cell* **23**: 1494-1511.

Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., and Schwender, J. (1997a). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia plantarum* **101**: 643-652.

Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997b). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271-274.

Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65.

Liu, Y., Soto Burgos, J., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S. H., and Basshama, D. C. (2012). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 4635–4651.

Lumbreras, V., Campos, N. and Boronat, A. (1995). The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant J* **8**(4): 541-9.

Maldonado-Mendoza, I.E., Burnett, R.J., and Nessler, C.L. (1992). Nucleotide sequence of cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **100**: 1613-1614.

Maldonado-Mendoza, I.E., Vincent, R.M., and Nessler, C.L. (1997). Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. *Plant Mol Biol* **34**: 781-790.

Manning, B. D. and Snyder, M. (2000). Drivers and passengers wanted! the role of kinesin-associated proteins. *Trends Cell Biol* **10**(7): 281-9.

- Manzano, D., Fernández-Busquets, X., Schaller, H., González, V., Boronat, A., Arró, M., and Ferrer, A. (2004). The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* **219**: 982-992.
- Marín, C. (2003). Regulació de l'expressió del gen HMG1 d'*Arabidopsis thaliana*: paper de la regió 5'-transcrita no traduïda. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Divisió III*, pp 233.
- 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.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, N., and Hara-Nishimura, I. (2003a). The *ER body*, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **44(7)**: 661-666.
- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2003b). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**: 493-502.
- Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *The Plant Cell* **16**: 1536-1549.
- McCaskill, D., Croteau, R. (1998). Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *TIBTECH* **16**: 349-55.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., Browse, J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5473-5477.
- McGarvey, D. J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1015-26.
- Monfar, M. (1990). Anàlisi molecular de l'HMG-COA reductasa de peso1 (*Pisum sativum*). PhD Dissertation (Barcelona, Spain: Universitat de Barcelona).
- Monaghan, P., Perushige, N. and Müller, M. (1998). High-pressure freezing for immunocytochemistry. *J. Microsc.* **192**: 248-258.
- Mullen, R. T., Lisenbee, C.S., Miernyk, J.A., Trelease, R.N. (1999). Peroxisomal membrane ascorbate peroxidase is sorted to a membranous network that resembles a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **11**: 2167-85.
- Mullen, R. T., Lisenbee, C.S., Flynn, C. R., and Trelease, R. N. (2001). Stable and transient expression of chimeric peroxisomal membrane proteins induces an independent "zippering" of peroxisomes and an endoplasmic reticulum subdomain. *Planta* **213**: 849-863.

- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-97.
- Naested, H., Frandsen, G. I., Jauh, G. Y., Hernandez-Pinzon, I., Nielsen, H. B., Murphy, D. J., Rogers, J. C., Mundy, J. (2000). Caleosins: Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol Biol* **44**: 463-476.
- Nakano, R. T., Yamada, K., Bednarek, P., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2014). ER bodies in plants of the *Brassicales* order: biogenesis and association with innate immunity. *Front Plant Sci* 5(73): 1-17.
- Narita, J. O., and Gruissem, W. (1989). Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* **1**: 181-190.
- Nelson, A. J., Doerner, P. W., Zhu, O., and Lamb, C. J. (1994). Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene that is elicitor inducible. *Plant Mol Biol* **25**: 401-412.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., and Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**: 1914-1917.
- Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J. T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2009). Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases. *Plant Cell Physiol.* **50**(3): 480-488.
- Okita, T.W., and Rogers, J.C. (1996). Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 327-350.
- Olender, E.H., and Simoni, R.D. (1992). The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **267**: 4223-4235.
- Onkokesung, N., Galis, I., von Dahl, C. C., Matsuoka, K., Saluz, H. P., and Baldwin, I. T. (2010). Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant Physiol.* **153**: 785-798.
- Orci, L., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Garcia-Segura, L.M., and Anderson, R.G. (1984). Increase in membrane cholesterol: a possible trigger for degradation of HMG CoA reductase and crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells. *Cell* **36**: 835-845.
- Park, H., Denbow, C.J., and Cramer, C.L. (1992). Structure and nucleotide sequence of tomato HMG2 encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol* **20**: 327-331.
- Park, J., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A., and Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal*, 1-12.

- Parrish, M. L., Sengstag, C., Rine, J. D., and Wright, R. L. (1995). Identification of the sequences in HMG-CoA reductase required for karmellae assembly. *Mol Biol Cell* **6**: 1535-1547.
- Pathak, R.K., Luskey, K.L., and Anderson, R.G. (1986). Biogenesis of the crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells: evidence that newly formed endoplasmic reticulum emerges from the nuclear envelope. *J Cell Biol* **102**: 2158-2168.
- Paul, T.R. and Beveridge, T.J. (1992). Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *J. Bacteriol.* **174**: 6508-17.
- Pena-Diaz, J., Montalvetti, A., Camacho, A., Gallego, C., Ruiz-Perez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D. (1997). A soluble 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **324**(2): 619-626.
- Poulton, J. E. (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol* **94**: 401-405.
- Profant, D. A., Roberts, Ch. J., Koning, A. J., and Wright, R. L. (1999). The role of the 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase cytosolic domain in karmellae biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **10**: 3409-3423.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707-720.
- Ribeiro, M. A. R. (2009). Analysis of the control of HMG-CoA reductase by wounding and methyl Jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa, pp. 79.
- Ridge, R. W., Uozumi, Y., Plazinski, J., Hurley, U. A., Williamson, R. E. (1999). Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of Arabidopsis cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol* **40**: 1253-1261.
- Riehle, U. and Hoechli, M. (1973). The theory and technique of high pressure freezing. In *Freeze-Etching Technique and Application* (Benedetti, E.L. and Favard, P., eds), pp. 31-60, Société Française de microscopie Électronique, Paris
- Rodríguez-Concepción, M. and Gruissem, W. (1999). Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol* **119**(1): 41-8.
- Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A. (2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiol* **130**(3): 1079-89.
- Rodríguez-Concepción, M., Fores, O., Martinez-Garcia, J.F., Gonzalez, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., and Boronat, A. (2004). Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. *Plant Cell* **16**: 144-156.

- Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., Ferrer, A., and Boronat, A. (2013). Biosynthesis of isoprenoid precursors in *Arabidopsis*. *Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms* **30**: 439-456.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16**(5): 565-574.
- Rojo, E., Zouhar, J., Carter, C., Kovaleva, V., and Raikhel, N. V. (2003). A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **100**(12): 7389-7394.
- Rose, J. K., and Doms, R. W. (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Ann Rev Cell Biol* **4**:257-288.
- Russell, D., Knight, J.S., and Wilson, T.M. (1985). Pea seedling HMG-CoA reductases: regulation of activity *in vitro* by phosphorylation and calcium, and posttranslational control *in vivo* by phytochrome and isoprenoid hormones. In *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, T. Kagawa, ed (Missouri: The Interdisciplinary Plant Biochemistry and Physiology Program).
- Sambrook, R., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (N.Y.: Cold Spring Harbor).
- Sami-Subbu, R., Choi, S. B., Wu, Y., Wang, C., Okita, T. W. (2001). Identification of a cytoskeleton-associated 120 kDa RNA-binding protein in developing rice seeds. *Plant Mol Biol* **46**: 79-88.
- Sauer, M., Paciorek, T., Benková, E., and Friml, J. (2006). Immunocytochemical techniques for whole-mount *in situ* protein localization in plants. *Nature Protocols* **1**(1): 98-103.
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res* **42**: 163-175.
- Schaller, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 456-476.
- Schwarz, H. and Humbel, B.M. (1989). Influence of fixatives and embedding media on immunolabelling of freeze-substituted cells. *Scanning Microsc Suppl* **3**: 57-64.
- Shaner, N. C., Patterson, G. H., and Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**: 4247-4260.
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V. M., Nitz, I. et al. (2008). PYK10, a b-glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J* **54**: 428-439.
- Schliemann, W. (1984). Hydrolysis of conjugated gibberellins by β -glucosidases from dwarf rice (*Oryza sativa* L. cv. Tan-ginbozu). *J Plant Physiol* **116**: 123-132.

- 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, D. J., 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. J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., and Gietl, C. (2001). The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5353-5358.
- Schutze, M.P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **13**: 1696-1705.
- Sita, R., and Meldolesi, J. (1992). Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell* **3**: 1067–1072.
- Skalnik, D. G., Narita, H., Kent, C., and Simoni, R. D. (1988). The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto b-galactosidase. *J Biol Chem* **263**: 6836-6841.
- Smith, A. R. and van Staden, J. (1978). Changes in endogenous cytokinin levels in kernels of *Zea mays* L. during imbibition and germination. *J Exp Bot* **29**: 1067–1075.
- Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol* **163**: 257-269.
- Staehelein, L.A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**: 1151-1165.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M., Korth, K.L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* **35**(7): 1133-1140.
- Stotz, H. U., Kroymann, J., Mitchell-Olds, T. (1999). Plant–insect interactions. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 268-272.
- Stotz, H. U., Pittendrigh, B. R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A. and Mitchell-Olds, T. (2000). Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against cotton wormbut not diamondback moth. *Plant Physiol* **124**: 1007–1017.
- Suzuki, M., Kamide, Y., Nagata, N., Seki, H., Ohyama, K., Kato, H., Masuda, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yoshida, N., and Muranaka, T. (2004). Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (*HMG1*) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *The Plant Journal* **37**: 750-761.

- Suzuki, T., Nakajima, S., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005). An *Arabidopsis* protein with a novel calcium-binding repeat sequence interacts with TONSOKU/MGOUN3/BRUSHY1 involved in meristem maintenance. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1452–1461.
- Takei, K., G. A. Mignery, E. Mugnaini, T. C. Sudhof, and P. De Camilli. (1994). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **12**: 327–342.
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* **141**: 399–436.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P. H. (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**: 1749–1770.
- Tolley, N., Sparkes, I. A., Hunter, P. R., Craddock, P. Ch., Nuttall, J., Roberts, L. M., Hawes, Ch., Pedrazzini, E., and Frigerio, L. (2008). Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. *Traffic* **9**: 94-102.
- 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. *J Cell Biol* **148**: 453–463.
- Tymowska-Lalanne, Z., and Kreis, M. (1998). Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* **207**: 259-265.
- Vale, R. D., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**(1): 39-50.
- Vale, R.D., and Fletterick, R.J. (1997). The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 745-777.
- Verhey, K. J. and Rapoport, T. A. (2001). Kinesin carries the signal. *Trends Biochem Sci* **26**(9): 545-50.
- Vertel, B. M., Velasco, A., LaFrance S., Walters, L., and Kaczman-Daniel, K. (1989). Precursors of chondroitin sulfate proteoglycan are segregated within a subcompartment of the chondrocyte endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**(4): 1827-1836.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., and Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *J Cell Biology* **124**: 573-586.
- Vollack, K.U., Dittrich, B., Ferrer, A., Boronat, A., and Bach, T. J. (1994). Two radish genes for 3-hydroxy-3-methylglutaryl COA reductase isozymes complement mevalonate auxotrophy in a yeast mutant and yield membrane bound active enzyme. *J Plant Physiol* **143**: 479-487.

- Wasternack, C., Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* **2**: 302-307.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., and Voeltz, G. K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biology* **193**(2): 333-346.
- White, D.L., Andrews, S.B., Faller, J.W. and Barnett, R.J. (1976). The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by x-ray photoelectron spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **436**: 577-592.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Suwanmanee, P. (1990). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **29**: 1401-1403.
- Wright, R., Basson, M., D'Ari, L., and Rine, J. (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**: 101-114.
- Xu, Y., Chang, P. F. L., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**: 1077-1085.
- Yamada, K., Nagano, A. J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2008). NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 2529-2540.
- Yamada, K., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2011). Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant Cell Physiol* **52**(12): 2039-2049.
- Yamamoto, A., R. Masaki, and Y. Tashiro. (1996). Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *J Cell Sci* **109**: 1727-1738.
- Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**: 1246-1251.
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**: 913-916.

