



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN DEL INTERACTOMA DE PROTEÍNAS ROP DURANTE EL
REARREGLO DEL CITOESQUELETO EN *LOTUS JAPONICUS* ANTE LA
ENDOSIMBIOSIS BACTERIANA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
IVETTE GARCÍA SOTO

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alexandre Tromas, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Mario Serrano, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM
Dr. Omar Pantoja, Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Mor, junio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

| | |
|---|----|
| I Introducción..... | 1 |
| II Antecedentes..... | 2 |
| 2.1 Uso de fertilizantes nitrogenados y sus consecuencias | 2 |
| 2.2 Alternativas ecológicamente sustentables..... | 3 |
| 2.3 La simbiosis fijadora de nitrógeno en las leguminosas | 4 |
| 2.4 Etapas del establecimiento de la simbiosis leguminosas-rhizobios..... | 5 |
| 2.5 Funciones de las proteínas ROP en plantas | 7 |
| 2.6 Aspectos estructurales de las proteínas ROP | 7 |
| 2.7 Reguladores de proteínas ROP..... | 9 |
| 2.7.1 Proteínas reguladoras GEF..... | 10 |
| 2.7.2 Proteínas reguladoras GAP | 11 |
| 2.7.3 Proteínas reguladoras GDI..... | 12 |
| 2.8 Posibles activadores de la señalización mediada por ROPs..... | 13 |
| 2.9 Expresión de proteínas ROPs..... | 14 |
| 2.10 Proteínas ROP en <i>Lotus japonicus</i> | 14 |
| 2.11 Posibles efectores de ROP..... | 15 |
| III Hipótesis..... | 16 |
| IV Objetivos..... | 17 |
| V Metodologías..... | 18 |
| 5.1 Evaluación del impacto de la fusión con la etiqueta FLAG en la estructura tridimensional de la proteína ROP6..... | 18 |
| 5.2 Ensamblaje de las construcciones genéticas en un vector binario | 18 |
| 5.3 Transformación de las plantas de <i>Lotus japonicus</i> con las construcciones genéticas..... | 19 |
| 5.4 Expresión de la proteína ROP6 en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> | 20 |
| 5.5 Inmunodetección con anti-FLAG..... | 20 |
| 5.6 Identificación de las proteínas GEF, GAP y GDI..... | 21 |
| 5.7 Predicción de las interacciones ROP6 con los miembros GEF, GAP y GDI | 22 |
| VI Resultados y discusión..... | 23 |
| 6.1 Alineamiento de las estructuras de ROP6 etiquetadas con FLAG..... | 23 |
| 6.2. Expresión e inmunodetección de la proteína ROP6 etiquetada..... | 24 |
| 6.2.1 Transformación de raíces de plantas de <i>Lotus japonicus</i> | 24 |

| | |
|---|----|
| 6.2.2 Inmunodetección de la proteína ROP6NB en raíces de <i>Lotus japonicus</i> | 25 |
| 6.2.3 Expresión de la proteína ROP6NB en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> | 28 |
| 6.3 Identificación de proteínas reguladoras de proteínas ROP en <i>Lotus japonicus</i> | 30 |
| 6.3.1 Identificación de genes codificantes para proteínas GEFs | 30 |
| 6.3.2 Identificación de genes codificantes para proteínas GAPs | 35 |
| 6.3.3 Identificación de genes codificantes para proteínas GDIs | 38 |
| 6.4 Predicción de las interacciones de ROP6 con los miembros identificados de las familias GEF, GAP y GDI | 40 |
| 6.4.1 Interacciones ROP6-GEFs | 40 |
| 6.4.2 Interacciones ROP6-GAPs | 44 |
| 6.4.3 Interacciones ROP6-GDIs | 47 |
| VII Conclusiones | 51 |
| VIII Perspectivas | 51 |
| IX Bibliografía | 52 |
| Anexos | 55 |

Resumen:

Las leguminosas han desarrollado la capacidad de establecer interacciones simbióticas con bacterias diazotróficas del suelo. Los rizobios endosimbiontes, fijan el dinitrógeno de la atmósfera y lo proporcionan en forma asimilable a la planta a cambio de fotosintatos. Se ha establecido que la acomodación de micro-endosimbiontes dentro de la célula de la planta es un proceso activo que requiere un reordenamiento adecuado del citoesqueleto. Las Rho-GTPasas (llamadas ROP en plantas), consideradas como "interruptores moleculares", activan el reordenamiento de los filamentos de actina durante el crecimiento del tubo polínico y en la entrada de bacterias simbióticas. Las proteínas ROP interactúan con varios socios, como activadores, desactivadores o efectores. La modificación del interactoma de ROPs en respuesta a bacterias simbióticas aún debe investigarse para identificar los módulos de señalización involucrados en este proceso. Con este objetivo se empleó el modelo de leguminosa, *Lotus japonicus* para determinar los cambios en los interactores de la proteína ROP6 antes y después de la interacción con las bacterias simbióticas. Se eligió la técnica de "Pull-down assay" para aislar las proteínas que interactúan con ROP6. Para ello se generó una versión de la proteína ROP6 etiquetada con FLAG (ROP6NB). La secuencia codificante de la proteína etiquetada fue clonada en un vector binario pGW mcherry_3XVenus_Prom-Rop. El vector binario fue empleado para transformar raíces de *L. japonicus* vía *Agrobacterium rhizogenes* AR10. Las raíces transformadas se emplearon para extraer proteínas totales y los extractos proteicos fueron utilizados para realizar Western blot para detectar la proteína ROP6 etiquetada. Con el objetivo de predecir *in silico* las proteínas reguladoras que interactúan con ROP6, se determinó mediante BLAST el número de miembros de las familias GEF, GAP y GDI presentes en *L. japonicus*. Posteriormente se realizaron acoplamientos proteína-proteína de ROP6 con cada uno de los miembros de la familia GEF, GAP y GDI para determinar qué miembros formaban los complejos más estables con ROP6. La proteína ROP6 no fue detectable en los ensayos de Western blot realizados, probablemente debido a la poca abundancia de ésta. Para abordar este problema es necesario la generación de diversos controles y estrategias experimentales. Respecto a las proteínas GEF, GAP y GDI, se observó que en *L. japonicus* existen 11 proteínas GEF, 10 proteínas GAP y 4 proteínas GDI. De estos miembros, la proteína ROP6 puede formar los complejos más estables con tres miembros de la subfamilia GEF (GEF5.1, GEF7 y GEF9), con dos miembros de la subfamilia GAP (GAP2 y GAP5) y con 1 miembro de la subfamilia GDI (GDI2). Estos interactores deben ser confirmados *in vitro* para tener un acercamiento a la regulación de ROP6.

I Introducción

Una de las vías mediante la cual las plantas suplen la limitación de macronutrientes en el suelo es por el establecimiento de interacciones endosimbióticas con microorganismos (Rivero *et al.*, 2017). Específicamente la limitación de nitrógeno asimilable es suplida por la interacción simbiótica que ocurre entre un número limitado de plantas mayormente agrupadas en la familia de las leguminosas, y bacterias diazotróficas del suelo llamadas rizobios (Zipfel y Oldroyd, 2017). Teniendo en cuenta que esta interacción es muy específica y solo algunas plantas pueden llevarla a cabo, los científicos han planteado la posibilidad de transferir a los cultivos la capacidad de fijación de nitrógeno. Esto representaría una ventaja para las técnicas de cultivo ya que se requiere el uso de gran cantidad de fertilizantes minerales para mantener la alta productividad, lo cual implica costos que son poco sustentables económicamente. Además del impacto ambiental que presupone el uso de fertilizantes derivados de la industria, los que contribuyen a la contaminación de las aguas, su producción depende de procesos que contribuyen al calentamiento global. Todo esto ha conducido a la comunidad científica a proponer una nueva revolución verde (Oldroyd y Dixon, 2014). Sin embargo, para llevar a cabo estas ideas, es necesario conocer cada paso e identificar cada gen involucrado en el establecimiento de la simbiosis.

Durante el establecimiento de la simbiosis se requiere una serie de cambios coordinados a nivel morfológico y molecular en los pelos radicales para formar una estructura en forma tubular conocida como hilo de infección (IT, del inglés *infection thread*). El hilo de infección conduce a la bacteria al interior del tejido de la raíz donde permanecerán internalizadas en el nódulo, que constituye la estructura en el interior de la cual se lleva a cabo la fijación simbiótica de nitrógeno (Timmers, 2008).

Se ha establecido que el acomodo de endosimbiontes dentro de las células de la planta requiere el correcto rearrreglo del citoesqueleto. Durante este último, ocurren varios procesos que permiten a las células de la raíz dirigir su crecimiento hacia una o varias direcciones, lo cual es importante para la formación del rizo que permite la entrada de los microorganismos. Este rearrreglo es posible por el complejo de proteínas ARP2/3 que constituye el principal regulador de la ramificación de los filamentos de actina y es activado por el

complejo SCAR/WAVE en levaduras y mamíferos, el cual a su vez es activado por GTPasas tipo Rho (Yang, 2002). En plantas existen Rho GTPasas denominadas ROP (Rho GTPasas of plants), las cuales están involucradas en varias funciones como: la organización de la actina, el control de los niveles de calcio y en el tráfico vesicular, entre otros (Rivero *et al.*, 2017).

Se han realizado algunos estudios en *Lotus japonicus* acerca de la función de proteínas ROPs durante la simbiosis. Dichas investigaciones indican que ROP6 regula positivamente la deformación de los pelos radicales, inducida por los factores de nodulación, en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis (Ke *et al* 2016). No obstante a los avances obtenidos en este campo aún quedan muchas incertidumbres acerca de este tema que necesitan ser esclarecidas.

II Antecedentes

2.1 Uso de fertilizantes nitrogenados y sus consecuencias

La incorporación de nutrientes como nitrógeno y fósforo en el suelo, juega un papel esencial en el mantenimiento de la productividad agrícola. El impacto global de los ciclos biogeoquímicos de estos nutrientes es diferente en las distintas regiones, por lo que en algunos países los suelos son pobres en nutrientes, lo que afecta la productividad de los cultivos. Por ello durante muchos años se han empleado fertilizantes químicos para aumentar el rendimiento agrícola (Oldroyd y Dixon, 2014).

Entre los fertilizantes más empleados están los fertilizantes nitrogenados. Anualmente se utilizan alrededor de 500 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados producidos a partir de amonio. Para la producción de estos fertilizantes se utiliza aproximadamente el 1% de la energía mundial y se emiten grandes cantidades de CO₂ a la atmósfera. Los fertilizantes nitrogenados son ampliamente utilizados en países como China, India, USA y en Europa Occidental (Dent y Cocking 2017). Aproximadamente la mitad de los fertilizantes nitrogenados empleados son utilizados por la planta, mientras que el resto es perdido en el ambiente, donde causa efectos negativos como la contaminación de las aguas y la producción de óxido nitroso que contribuye al efecto invernadero (Udvardi *et al.*, 2015). En este sentido, el uso de fertilizantes nitrogenados aporta el 66% de la emisión de óxido nitroso a la atmósfera tan solo

en el Reino Unido, y al menos el 5% de la población en Europa está expuesta a la toma de agua contaminada con fertilizantes nitrogenados (Dent y Cocking 2017). Aproximadamente las dos terceras partes de las costas de USA están de moderada a severamente impactadas por la descarga de fertilizantes nitrogenados, con alrededor de 300 zonas hipóxicas, además se ha planteado que el río Mississippi descarga al golfo de México aproximadamente 1.5 millones de toneladas métricas de nitrógeno por año (Dent y Cocking 2017).

Desde el punto de vista económico, el uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura tampoco es sustentable. Se calcula que en Europa los costos de los daños causados por su uso están entre los 60-80 billones de euros por año. Esto representa más del doble de las ganancias generadas por el uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura (Dent y Cocking 2017).

2.2 Alternativas ecológicamente sustentables

Las leguminosas juegan un papel esencial en la agricultura sostenible debido a su participación en la fijación simbiótica de nitrógeno, lo que permite la entrada de 40 millones de toneladas de nitrógeno a los sistemas agrícolas cada año. De esta forma, la fijación simbiótica de nitrógeno por rhizobios en los nódulos de las raíces de las leguminosas tiene enormes beneficios económicos y ambientales (Verdier *et al.*, 2013). Pero el empleo de estas plantas en los sistemas agrícolas se ha extendido más allá de su uso en el aporte de nitrógeno al suelo.

El descubrimiento de la simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas leguminosas despertó en la comunidad científica la pregunta si era posible transferir estas características a plantas no leguminosas. Con base en este supuesto, se han desarrollado varias estrategias para transferir estas características a otras plantas de interés económico. Entre las tres alternativas más estudiadas se encuentran, en primer lugar, el desarrollo de nódulos en cereales para llevar a cabo la simbiosis. Esta estrategia implica modificar bacterias que reconozcan e infecten células de las raíces de los cereales, así como desarrollar plantas que puedan formar nódulos o estructuras con bajas tensiones de oxígeno donde la enzima nitrogenasa podrá funcionar óptimamente. Otra estrategia planteada se ha centrado en la búsqueda de bacterias endófitas que fijan nitrógeno dentro de las células de las plantas sin la

necesidad de la formación de nódulos, como ocurre de forma natural, por ejemplo, en plantas de caña de azúcar. Una tercera estrategia que ha sido ampliamente estudiada es la introducción de los genes bacterianos, que codifican para la nitrogenasa, a plantas para que fijen su propio nitrógeno (Beatty y Good, 2017). Aunque varios investigadores han trabajado en estas estrategias, aun no existen soluciones completamente desarrolladas debido a diversos problemas (Dent y Cocking 2017).

2.3 La simbiosis fijadora de nitrógeno en las leguminosas

El éxito evolutivo de la familia de las leguminosas se debió al establecimiento de la simbiosis con bacterias de la familia Rhizobiaceae. Esto permitió a las leguminosas utilizar nitrógeno atmosférico (N_2) como fuente de nitrógeno cuando colonizaban suelos carentes de formas biológicamente utilizables (Desbrosses *et al.*, 2005).

La fijación simbiótica de nitrógeno ocurre en los nódulos, los que se forman a partir de las células corticales de la raíz, luego de una serie de pasos posteriores al contacto de las raíces con los rhizobios del suelo. El nódulo maduro consiste en diferentes capas de células no infectadas, que rodean una zona central de células, algunas de las cuales están infectadas y otras no. Las células infectadas generalmente contienen miles de bacterias fijadoras de nitrógeno diferenciadas llamadas bacteroides. Los bacteroides son aislados del citoplasma de manera individual o por grupos, por una única membrana de la planta llamada peribacteroide o membrana del simbiosoma. Dentro de las células infectadas, los bacteroides llevan a cabo la fijación simbiótica del nitrógeno por la actividad del complejo enzimático nitrogenasa (Desbrosses *et al.*, 2005). Debido a la estabilidad del triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, la ruptura de este enlace requiere mucha energía y capacidades biológicas especiales, que sólo pueden llevarla a cabo algunas bacterias y arqueas vía la nitrogenasa. Esta enzima convierte el N_2 gaseoso a amonio y requiere altas cantidades de ATP y poder reductor. Esta enzima es irreversiblemente inactivada por oxígeno, por lo que necesita condiciones de microaerobiosis para su funcionamiento (Oldroyd y Dixon, 2014). Estas condiciones son generadas dentro del nódulo debido a que las capas de células que lo forman disminuyen el influjo de oxígeno hacia el nódulo. Otro aspecto que contribuye a las condiciones de microaerobiosis es el

transporte de oxígeno por la leghemoglobina en el citoplasma de las células de la planta, así como las altas tasas de respiración de los bacteroides y de las mitocondrias de la célula de la planta. La simbiosis fijadora de nitrógeno involucra intercambios de metabolitos entre la planta y el rizobio. De esta forma la planta le brinda fotosintatos a las bacterias, las que a cambio aportan amoníaco para el desarrollo de la planta (Desbrosses *et al.*, 2005).

2.4 Etapas del establecimiento de la simbiosis leguminosas-rhizobios

El establecimiento de la simbiosis comienza por el intercambio de señales entre las plantas y las bacterias. Las raíces de las plantas secretan flavonoides y betaínas que inducen la expresión de los genes *nod* en las bacterias. Estos genes codifican para enzimas responsables de la producción de los factores de nodulación (Nod), que consisten en lipoquitosacáridos que disparan respuestas en las leguminosas, tales como la despolarización de la membrana del pelo radical, oscilaciones en la concentración intracelular de Ca^{++} , deformación de los pelos radicales y la iniciación de la división celular en las células de la corteza de la raíz (Rivero *et al.*, 2017).

La señalización simbiótica inducida por los factores de nodulación en *Medicago truncatula* depende de los receptores de dichos factores, llamados NFP y LYK3. Estos receptores tienen un dominio extracelular y un dominio intracelular. LYK3 tiene actividad de cinasa y permite desencadenar cascadas de señalización mediante fosforilación, en cambio NFP carece de actividad de cinasa. Corriente abajo de la vía de señalización inducida por los factores de nodulación, se inducen factores como DMI2, que es un receptor con actividad de cinasa rico en repeticiones de leucinas, DMI1 un canal de potasio, NENA un componente de poro nuclear, CCaMK/DMI3 una proteína con actividad de cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina y factores de regulación tales como NSP1, NSP2, ERN1 y NIN, así como ENDO11, un gen involucrado en los eventos tempranos de nodulación (Lei *et al.*, 2015).

El proceso de infección del pelo radical está íntimamente asociado con la reorientación del crecimiento polarizado de la punta del pelo radical, en la zona susceptible cercana a la punta del pelo. Los pelos radicales de la zona de infección muestran un crecimiento alterado en forma de rizo para aislar a las

bacterias del ambiente. La deformación de los pelos radicales es resultado del crecimiento isotrópico por el cual las células se hinchan y luego crecen en una dirección alterada. Para la entrada de las bacterias, el crecimiento de los pelos radicales es constantemente redirigido hacia las bacterias, las cuales secretan los factores de nodulación (Lei *et al.*, 2015).

En el rizo se forma un sitio de infección por la degradación local de la pared celular, lo que permite que las bacterias accedan al interior celular a través del hilo de infección. El hilo de infección se forma a partir de la invaginación de la membrana. La progresión del hilo de infección es dirigida por la división bacteriana y por la pared celular local, así como por la deposición de matriz extracelular. Durante la formación y progresión del hilo de infección ocurren varios eventos celulares como la remodelación de la membrana celular local y la relocalización del núcleo (Timmers, 2008). Por otro lado, en las células del periciclo y en las células internas de la corteza ocurre la dediferenciación, seguida por la división celular, lo que resulta en una masa de células que constituye el primordio del nódulo, donde las bacterias serán depositadas (Timmers, 2008).

Durante las etapas tempranas del proceso de infección ocurre la reorganización de los filamentos de actina y los microtúbulos. Evidencias experimentales demuestran que al poner en contacto factores de nodulación con pelos radicales ocurre la ramificación de los filamentos de actina, lo cual es necesario para el acomodamiento de las bacterias en el interior de los pelos radicales (Lei *et al.*, 2015). En estos procesos se ha demostrado el requerimiento de GTPasas que actúan en la deformación de los pelos radicales inducidos por los rizobios por la secreción de factores de nodulación. Trabajos realizados en frijol (Blanco *et al.*, 2009) indican que las pequeñas GTPasas participan en el tráfico de vesículas hasta donde la membrana y la pared están siendo degradadas y nuevamente sintetizadas para sustentar el crecimiento polar del pelo radical a través del transporte de enzimas y precursores de membrana y pared celular, además proponen que estas GTPasas pueden estar involucradas en la formación y mantenimiento del hilo de infección. Basado en la aparente interacción entre proteínas ROPs y receptores de factores de nodulación en *Medicago* y *Lotus*, se ha planteado la posible participación de ROPs en vías de transducción de

señales tal y como ocurre en sistemas animales, en la vía de señalización mediada por GTPasas, de esta manera se conectaría la percepción de los rizobios (por los factores de nodulación) con los cambios del citoesqueleto requeridos para el inicio de la infección. (Rivero 2017)

2.5 Funciones de las proteínas ROP en plantas

Evidencias indican que algunas ROPs participan en etapas muy tempranas de la formación del nódulo, modulando cambios fisiológicos que permiten la penetración bacteriana. Estas proteínas también se han asociado a otras funciones como endocitosis, exocitosis, respuesta y transporte de auxina, formación de la pared celular secundaria, respuesta ante el estrés oxidativo y en respuesta a patógenos bacterianos y fúngicos (Rivero., *et al.* 2017).

2.6 Aspectos estructurales de las proteínas ROP

La superfamilia Rho ha sido dividida en cuatro subfamilias: Rho, Rac, Cdc42 y ROP (Rho en plantas). Análisis filogenéticos sugieren que las ROPs evolucionaron antes de la divergencia de la superfamilias de Rac y Cdc42. Las proteínas ROP pueden ser encontradas en todos los linajes de plantas, desde algas verdes hasta musgos tales como *Physcomitrella patens*, así como en angiospermas incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas (Yalovsky, 2015).

Las proteínas ROP pertenecen a una familia multigénica altamente conservada e interactúan con el mismo conjunto de proteínas, así como con efectores moleculares. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares, ya que se encuentran inactivas cuando unen GDP y en respuesta a señales específicas se unen a GTP, cambiando a un estado activo. Se plantea que el estado activo conduce a la relocalización e interacción con sus efectores e inician así cascadas de señalización (Bishop y Hall, 2000).

Las proteínas ROPs han sido divididas en dos grupos en función de la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal, estos grupos se han designado como ROP tipo I y ROP tipo II. Las ROPs tipo II surgieron a partir de las tipo I por la inserción de un intrón adicional en el extremo 3' terminal (Feiguelman *et al.*, 2017).

Estas proteínas presentan un peso molecular entre 21-24 KDa. Estructuralmente las proteínas ROPs están compuestas por un dominio N terminal catalítico (dominio G) donde se unen los efectores y nucleótidos que consiste en cinco secuencias conservadas conocidas como caja G (G1-G5), las cuales son responsables de la unión GTP/GDP y Mg^{++} así como de la actividad hidrolítica GTPasa. También poseen un dominio C-terminal hipervariable que es responsable de la localización subcelular (Feiguelman *et al.*, 2017).

Los dominios G2 y G3 son también conocidos como regiones "switch" I y II respectivamente y son las que contactan con el fosfato gama en la forma que une GTP. Esto conduce a cambios conformacionales que alteran la afinidad por proteínas regulatorias y efectores moleculares. Existen diferencias particulares de ROPs en comparación con los miembros de la familia de Rho. Una de ellas consiste en la conservación de una arginina corriente abajo de la región switch II que está involucrada en el posible sitio de reconocimiento SYR para cinasas que fosforilan a serina/treonina, lo cual nunca ha sido encontrado en Rho GTPasas que no sean de plantas. En este contexto se ha sugerido la asociación de ROPs con receptores tipo cinasas en complejos de alto peso molecular en la membrana plasmática. Tal es el caso de la interacción entre ROP10 en *Medicago truncatula* con el receptor cinasa de factores de nodulación (Lei *et al.*, 2015).

La asociación de ROPs con la membrana plasmática depende de una modificación lipídica post transcripcional que ocurre en la región hipervariable del C-terminal. Esta región está compuesta de dominios ricos en arginina y lisina, conocida como región polibásica. Esta secuencia puede encontrarse prenilada o S-aciladas. La prenilación consiste en la unión covalente por enlace tioéster irreversible entre el carbono 15 del farnesil o al carbono 20 del geranylgeranyl y el grupo tiol de residuos de cisteína que son parte de los motivos CaaX o CaaL (C-Cys: a, residuo alifático; X, cualquier aminoácido; L, Leu). La S acilación consiste en la unión covalente del C 16 del palmitato o el carbono 18 del estearato al grupo tiol libre de la cisteína mediante un enlace tioéster reversible (Yalovsky y Hall, 2015). Todas las ROPs tipo I terminan con una caja CaaL geranylgeraniladas, mientras que todas las ROPs tipo II terminan con un motivo designado GC-CG en el cual dos residuos de cisteína S acilados están adyacentes a la glicina y separados por cinco o seis residuos no polares. La

acilación de ROP estabiliza su interacción con la membrana plasmática y se requiere para la señalización en la polaridad de la célula. (Yalovsky y Hall, 2015). Las ROP tipo II al parecer no están reguladas por GDI (ROP GDP Dissociation Inhibitors) debido a que no tienen geranilgeranilación, lo que es requerido para la interacción entre ROP y GDI (Feiguelman *et al.*, 2017).

En adición a la modificación lipídica en el dominio hipervariable, al menos las ROP de tipo I están sometidas a activación dependiente de una S acilación temporal en residuos de cisteína del dominio G. Esta S acilación temporal estabiliza la interacción de ROP a la membrana plasmática y es requerida para la señalización en la polaridad de la célula. En la proteína ROP6 de *Arabidopsis thaliana* (AtROP6) la S acilación temporal tiene lugar en la C156 y en menor medida en C21, estas cisteínas son conservadas en las ROP de tipo II (Yalovsky y Hall, 2015)

Basado en la conservación estructural se ha predicho que mutaciones puntuales en la lisina 1 (equivalente a G15 para las AtROPs1-7 y 9; G17 en AtROP10 y 11; G27 en AtROP8) o glutamina 3 (equivalente a Q64 para AtROPs1-7 y 9; Q66 en AtROP10 y 11; Q76 en AtROP8) resultan en la generación de mutantes constitutivamente activos, ya que la mutación en estas posiciones evita la hidrólisis de GTP. Mutaciones en Treonina 1 (equivalente a T20 para las AtROPs1-7 y 9; T22 en AtROP10 y 11; T32 en AtROP8) genera mutantes dominantes negativos, pues se reduce la afinidad por nucleótidos y estabiliza la interacción con proteínas GEF que previenen la activación de ROPs (Feiguelman *et al.*, 2017). En *Medicago truncatula*, cambios de la glicina 1 por valina en la secuencia GAVGKT, genera mutantes constitutivamente activos y cambios de aspártico por alanina en la secuencia KLD del dominio G4 genera mutantes dominantes negativos (Lei *et al.*, 2015). Estas versiones constitutivamente activas y dominantes negativas de las ROPs han sido ampliamente generadas para estudiar las funciones de estas proteínas. (Lei *et al.*, 2015).

2.7 Reguladores de proteínas ROP

Las proteínas ROP presentan dos características fundamentales en su funcionamiento. En primer lugar, debido a su ineficiente hidrólisis de GTP, mantienen su forma activa unida a GTP por largos períodos de tiempo. En

segundo lugar, la liberación de GDP es ineficiente y depende de actividad enzimática. Debido a estas características los ciclos de activación/inactivación dependientes de la unión GTP/GDP están regulados en tiempo y espacio por factores intercambiadores de nucleótidos (GDP/GTP Exchange Factors: GEFs) que facilitan la liberación de GDP y por proteínas activadoras de GTPasa (GTPase Activating Proteins: GAPs) que potencian la hidrólisis de GTP (Berken 2006).

2.7.1 Proteínas reguladoras GEF

Las proteínas GEFs constituyen una familia de proteínas con diferente número de miembros en las diferentes especies (dos en *Selaginella moellendorffii* y 14 en *Arabidopsis*) y con redundancia funcional. Son proteínas solubles que también se han observado en la membrana plasmática, lo que sugiere que interactúan con componentes de ésta. Las plantas tienen mayoritariamente dos tipos de ROPGEFs: una familia única de plantas, conocidas como ROPGEFs, que contienen un dominio catalítico PRONE (Plant specific ROP Nucleotide Exchanger) y otros homólogos relacionados con RhoGEFs de animales conocidos como SPK (Feiguelman *et al.*, 2017).

Las proteínas ROPGEF se expresan principalmente en el tubo polínico y en el pelo radical de *Arabidopsis thaliana* y al parecer su función está relacionada con el crecimiento polarizado.

Estudios estructurales demostraron que las GEFs funcionan como dímeros e interactúan con dos moléculas de ROP. El dominio catalítico PRONE de las GEFs es constitutivamente activo y su función es regulada por el dominio C-terminal que provoca autoinhibición. Estudios realizados en el tubo polínico en *Arabidopsis* sugieren que las GEFs interactúan con receptores similares a cinasas asociados a la membrana plasmática, los que fosforilan el dominio C-terminal y atenúa la autoinhibición del dominio PRONE lo que provoca la activación de GEFs (Feiguelman *et al.*, 2017). Dicho dominio C-terminal está altamente conservado y presenta sitios diana para fosforilación (Eklund *et al.*, 2010).

Se ha descubierto que algunas proteínas, al parecer, pudieran funcionar como GEF, una de ellas es SPK1 (un ROPGEF homólogo a RhoGEF CZH de animales) (Feiguelman *et al.*, 2017). SPK1 se describió en un análisis de genómica reversa en mutantes de *Arabidopsis* que presentaron desarrollo alterado de tricomas, crecimiento atrofiado, características anormales en cotiledones y organización del citoesqueleto. Al realizar un ensayo del tipo pulldown se observó que SPK1 interactúa con ROPs GTPasas tipo I y tipo II tanto con la forma unida a GDP como con la forma libre de nucleótido. Ensayos de co-inmunoprecipitación indican que SPK1 se asocia con el complejo SCAR/WAVE el cual activa la nucleación y ramificación de la actina mediante interacción con el complejo ARP2/3 del complejo de reorganización de la actina. (Feiguelman *et al.*, 2017)

Al realizar mutantes de SPK1, SRA1 y ARP2/3 se observó que ellos funcionan en la misma vía. Estas evidencias sugieren que SPK1, ROPs tipo 1 probablemente ROP 2 y ROP 4, SCAR/WAVE y ARP 2/3 regulan en conjunto la nucleación de la actina (Feiguelman *et al.*, 2017).

En *L. japonicus* no se conoce el número de miembros de la familia GEF, por lo que es necesario identificarlos mediante análisis de BLAST.

2.7.2 Proteínas reguladoras GAP

En plantas hay dos tipos de proteínas GAPs, las ROPGAPs y las RENGAPs (ROP Enhancer GAPs). Estas proteínas presentan varios dominios, el dominio catalítico GAP y el dominio CRIB (Cdc42 RAC Interacting Binding), presente únicamente en las GAPs pero no en las REN, que es requerido para la actividad y especificidad de las GAPs, así como para potenciar su unión a las ROPs y para su localización subcelular. Este dominio no ha sido encontrado en otros miembros de la familia RhoGAPs que no sean de plantas. Las proteínas GAPs también presentan una región rica en prolina (PRR), que constituye una región consenso PXXP (P: prolina, X: cualquier aminoácido), que está involucrada en la concentración local de proteínas, en la localización subcelular y media el ensamblaje de complejos multiproteicos (Feiguelman *et al.*, 2017).

Las proteínas GAP's funcionan como dímeros con una estequiometría 2:2 con ROP's. Al parecer las funciones de GAP's están reguladas por fosforilación. Las proteínas GAP's interactúan con la forma activa de ROP's unidas a GTP mediante la región switch de ROP's y promueven la hidrólisis de GTP con un incremento de cinco ordenes *in vitro*. El mecanismo de reacción involucra residuos llamados dedos de arginina que son insertados dentro del sitio activo de las proteínas ROP's y estabilizan el estado de transición durante la hidrólisis de GTP (Berken 2006).

En *L. japonicus* no se conoce el número de miembros de la familia GAP, por lo que es necesario identificarlos mediante análisis de BLAST.

2.7.3 Proteínas reguladoras GDI

Las ROPs también se encuentran reguladas por su asociación/disociación a la membrana plasmática, esta regulación es llevada a cabo por proteínas de la familia de inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI guanine nucleotide dissociation inhibitors). La función de estas proteínas está relacionada con la activación y localización subcelular de proteínas ROPs, así como en la protección para evitar la degradación. Las GDI's forman complejos de alta afinidad con pequeñas proteínas G con modificaciones lipídicas y aísla a los lípidos del ambiente. De esta forma las GDI secuestran a las proteínas ROP's en el citosol y regulan negativamente su activación por unión a la membrana plasmática (Berken, 2006).

La interacción de GDI's con ROP's depende de la geranilgeranilación de ROP's y de un bolsillo hidrofóbico presente en GDIs. En las plantas las ROP tipo I están geranilgeraniladas, pero las tipo II están S-aciladas por lo que sugiere que probablemente las ROPs tipo II no se encuentren reguladas por GDIs (Feiguelman *et al.*, 2017).

Las proteínas GDI pueden unirse tanto a las proteínas ROP en forma activa o inactiva con diferente afinidad. Estas proteínas tienen dos dominios funcionales conservados. Uno de los dominios es el C-terminal tipo inmunoglobulina, que contiene un bolsillo hidrofóbico en el cual se unen los grupos prenilos de las ROP GTPasas. El otro dominio funcional consiste en un brazo regulador presente en

la región N-terminal, que interactúa con los dominios switch I y switch II de las proteínas ROP e inhibe el intercambio de nucleótidos y la hidrólisis de GTP (Yalovsky y Hall, 2015).

En *L. japonicus* no se conoce el número de miembros de la familia GEF, por lo que es necesario identificarlos mediante análisis de BLAST.

2.8 Posibles activadores de la señalización mediada por ROPs

En levaduras y animales, las GTPasas están involucradas en diferentes vías de señalización a través de efectores con actividad cinasa y regulan varios procesos como la reorganización del citoesqueleto. La actividad cinasa de estos efectores está directamente regulada por las proteínas G y están involucrados en la regulación de procesos celulares básicos, incluyendo la morfología celular, la división y el tráfico vesicular. Ninguna de estas familias de receptores con actividad cinasa están presentes en plantas, ni tampoco sus mecanismos de acción. Por ello se ha planteado la posibilidad de que en plantas la recepción de señales extracelulares sea percibida por receptores similares a cinasas. Estos receptores presentan una región rica en leucinas, un dominio transmembrana y un dominio con actividad cinasa citosólico. Aunque aún no se ha demostrado la señalización mediada por receptores con actividad de cinasa, se sospecha que estos receptores pueden desencadenar la activación y señalización mediada por ROPs. Empleando el modelo de doble híbrido de levaduras se determinó la unión de receptores específicos de plantas con actividad cinasa, con la forma constitutivamente activa de proteínas ROP en modelos experimentales como *Arabidopsis* y *Medicago*. Estos receptores con actividad de cinasas pertenecen a la familia de receptores específicos de plantas parecidos a cinasas citoplasmáticas (plant-specific receptor-like cytoplasmic kinases RLCKs). Los receptores RLCKs están agrupados en 10 clases diferentes. Se ha encontrado que los miembros de la clase RLCKs VI se unen a ROP y tienen actividad cinasa ROP dependiente (Leijok 2018). Estudios realizados en *Solanum lycopersicum* (tomate) determinaron la interacción entre receptores parecidos a cinasas-ROPGEFs-ROP. También se ha planteado la posibilidad de interacción entre ROPs y Proteínas G heterotriméricas (Berken, 2006).

2.9 Expresión de proteínas ROPs

Los patrones de expresión de las proteínas ROPs fueron determinados en *Medicago truncatula* por Liu *et al.* (2010). Los niveles transcripcionales relativos fueron determinados en varios órganos y observaron que los genes de ROPs pueden ser expresados en todos los órganos a excepción de MtROP9 que no se expresa en hojas. MtROP3, MtROP8 y MtROP10 se expresan constitutivamente en todos los tejidos evaluados, mientras que MtROP5 tiene mayores niveles de expresión en el vástago. MtROP6 se expresa preferencialmente en vástago, flores y nódulos y en menor medida en raíces y hojas. MtROP9 se expresa preferencialmente en raíz y flores. Todas las ROPs de *Medicago* se expresan en nódulos, pero MtROP3 y MtROP6 muestran los mayores niveles de expresión en nódulos. En el contexto de la simbiosis de *Medicago* con *S. meliloti* MtROP3, MtROP5, MtROP6 y MtROP10 son las que más se expresan durante las 72 hpi (horas post inoculación) (Liu *et al.*, 2010).

Los patrones de expresión de proteínas ROPs en raíces de *Lotus japonicus* fueron determinados por RNAseq por Kelly *et al.*, (2018). De los 9 miembros de la familia ROP en *L. japonicus* los que tienen una mayor expresión en raíces son LjROP6, LjROP7 y LjROP5, de los cuales al parecer no hay inducción ante la presencia de *Mesorhizobium loti*. De estas proteínas solo ha sido estudiada LjROP6 por Ke *et al.*, (2012) y Ke *et al.*, (2016). Estos investigadores sugieren que LjROP6 tiene un papel en el crecimiento polar y desarrollo de los pelos radicales, así como que esta proteína interactúa con un dominio del receptor de factores de nodulación NFR5.

2.10 Proteínas ROP en *Lotus japonicus*

En *L. japonicus* se han identificado 9 proteínas ROP, de las cuales ROPx, LjROP2, LjRAC1, LjROP6, LjROP3, LjROP6bis, LjRAC2 se clasifican como ROP tipo I mientras que LjROP9 y LjROP10 se clasifican como ROP tipo II.

Las proteínas LjRAC 1, LjROP6, LjRO3, LjROP6bis y LjRAC2 al parecer incrementan su expresión en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis con *Mesorhizobium loti*, sin embargo LjROP2, LjROP9 y LjROP10 disminuyen su expresión ante la inoculación con bacterias. Específicamente se ha propuesto que la proteína ROP6 está involucrada en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis al interactuar con receptores de factores de

nodulación (Ke *et al.*, 2016). Dicha proteína es una ROPGTPasa tipo I que contiene 193 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25KDa (Ke *et al.*, 2012).

2.11 Posibles efectores de ROP

Se han planteado posibles efectores de ROP que están involucrados en la dinámica de los filamentos de actina, entre ellos se encuentra la subunidad PIR del complejo homólogo en plantas al complejo WAVE de levaduras y animales cuya interacción con ROP induce la polimerización del filamento de actina. Diferentes estudios sugieren que el mecanismo por el cual las ROPs regulan la organización de la actina es mediante la fosforilación y supresión del factor ADF (Actin Depolymerizing Factor) que participa en la despolimerización de la actina (Feiguelman *et al.*, 2017). Otros posibles efectores pueden ser las forminas en plantas las cuales en levaduras y animales inducen la polimerización de la actina. También se han sugerido como posibles efectores de ROPs a la enzima fosfatidil inositol monofosfato cinasa que está involucrada en la señalización dependiente de Ca^{++} y la fosfolipasa D. Por otro lado, se ha planteado la posible interacción de ROP's con la subunidad UDP-glucosa transferasa del complejo enzimático calosa sintasa, así como con las MAP cinasas (Berken, 2006). También se han estudiado los efectores de las proteínas reguladoras de ROPs como la interacción de SPK1 (un ROPGEF homólogo a RhoGEF CZH de animales) con proteínas ROPs y el complejo SCAR/WAVE y la consecuente regulación de la ramificación de la actina en *Arabidopsis* (Feiguelman *et al.*, 2017). Al parecer SPK1 es responsable de la activación de ROP2, ROP6 y ROP4, esto fue propuesto por Ren *et al.*, (2017) ya que en plantas de *A. thaliana* mutantes negativas de SPK1 los niveles de AtROP2, AtROP6 y AtROP4 activas son inferiores comparados con los de la planta silvestre.

Al parecer las proteínas ROPs interactúan con proteínas RIC (Rop-interacting CRIB-motif containing proteins) (Lajkó *et al.*, 2018). Estas proteínas están involucradas en varias funciones celulares ya que son proteínas de unión a elementos del citoesqueleto como los microtúbulos (Feiguelman *et al.*, 2017). Las proteínas RIC3 y RIC4 de *A. thaliana* se han propuesto como efectores de ROP y se ha visto que median la regulación de los filamentos de actina en el tubo polínico. Se ha planteado que ROP6 interactúa con RIC1, que a su vez interactúa con KTN1, una proteína involucrada en el corte de los microtúbulos y

que permite el ordenamiento de los microtúbulos corticales y la expansión celular. En *A. thaliana* la auxina regula corriente arriba de AtROP6 y AtROP2 para controlar este proceso (Han *et al.*, 2018).

Las proteínas ROPs también interactúan con las proteínas RIP (ROP Interacting Partner), las cuales se asocian con cinesinas involucradas en la desestabilización de los microtúbulos. La proteína RIP, ICR1 interactúa con el componente exocítico SEC3 y parece ser un vínculo entre la activación de ROP y la fusión de vesículas con la membrana plasmática (Stephan *et al.*, 2014). Estos investigadores también propusieron que las proteínas RISAP se asocian con RAC5 (ROP) en *Nicotiana benthamiana* mediante ensayos de pull down y ensayo de doble híbrido en levaduras. Dichas proteínas presentan un dominio DUF593 (dominio de función desconocida) que se une al dominio GTD (globular tail domain) de la miosina XI (Stephan *et al.*, 2014).

En *Oryza sativa* la proteína RAC1 (una proteína ROP) activa a la NADPH oxidasa en una ruta que es iniciada por la detección de quitina. En la ruta propuesta, la quitina es detectada por OsCERK1, que es un receptor similar a receptores con actividad cinasa que forma un complejo con la proteína OsCEBiP (una proteína que une quitina). En presencia de quitina OsCERK1 fosforila y activa a OsRACGEF, que a su vez activa a OsRAC1 quien activa a NADPH y participa en la biosíntesis de lignina y en la producción de Especies reactivas del oxígeno.

La mayoría de estos posibles efectores necesitan ser esclarecidos ya que los procedimientos experimentales no son lo suficientemente contundentes y se basan en los efectores de Rho GTPasas en los modelos animales y fúngicos.

III Hipótesis

La comparación del interactoma de proteínas ROP antes y después de la infección de rizobios permitirá identificar a las proteínas involucradas en la reorganización del citoesqueleto durante el acomodamiento de bacterias simbióticas.

IV Objetivos

Identificar el interactoma de la proteína LjROP6 durante el rearrreglo del citoesqueleto en *Lotus japonicus* ante la endosimbiosis bacteriana.

Objetivos específicos:

- Identificar mediante BLAST las proteínas GEF, GAP y GDI presentes en *Lotus japonicus*
- Diseñar las construcciones de ROP6 etiquetadas con FLAG.
- Clonar las construcciones sintéticas de ROPs en el vector binario pC Gw m-Cherry 3xVeus.
- Transformar plantas mutantes simples de *Lotus japonicus* ecotipo Gifu.
- Detectar mediante western blot la proteína ROP6 etiquetada a partir de la extracción de proteínas totales de raíces transformadas de *Lotus japonicus*.
- Predecir mediante análisis computacional los interactores de ROP6 dentro de los miembros de GEF, GAP y GDI.

V Metodologías

Se eligió la técnica de “Pull-down assay” para aislar las proteínas que interactúan con ROP6. Es necesario generar las ROPs cebo fusionando su secuencia codificante con la de una etiqueta, antígeno específico de anticuerpos comerciales. Se escogió la etiqueta FLAG-Tag, por su pequeño tamaño, solo 8 aminoácidos. Después de aislar las proteínas que interactúan con ROP6, será necesario identificarlas, comparando las secuencias con la base de datos de proteínas de *L. japonicus*. Con este propósito, adelantamos el estudio genómico de las proteínas conocidas como interactores de las ROPs.

5.1 Evaluación del impacto de la fusión con la etiqueta FLAG en la estructura tridimensional de la proteína ROP6

Para usar ROP6 como proteína cebo, se diseñaron tres construcciones genéticas que consisten en la adición de una etiqueta FLAG con secuencia: DYKDDDDK, en el sitio C-terminal y en el sitio N-terminal, además de un sitio ubicado entre el aminoácido 151 y 161 en el cual según los trabajos propuestos por Dvorsky y Ahamaid, (2004) no hay interacción de las ROPs con efectores o reguladores. Este sitio fue nombrado como bucle o sitio de no interacción.

Para determinar cuál de las tres versiones de etiquetado era la más adecuada se compararon las diferentes estructuras etiquetadas, respecto a la estructura nativa de ROP6. En primer lugar, se validó la estructura nativa de ROP6 respecto a la estructura cristalizada de AtROP9 (Sormo *et al.*, 2006). Para ello se realizó el modelado de ambas estructuras en el servidor de I-TASSER (Zhang, 2008), seguido del alineamiento de las estructuras empleando Pymol. Luego se evaluaron las construcciones etiquetadas respecto a la nativa teniendo en cuenta los valores rmsd (root mean-square deviation) de los alineamientos estructurales. Se seleccionó como el modelo más adecuado, el que tiene una mayor similitud con la estructura nativa, es decir menor valor de rmsd.

5.2 Ensamblaje de las construcciones genéticas en un vector binario

Estas secuencias etiquetadas de ROP6 se sintetizaron por la compañía GenScript. La secuencia sintetizada de ROP6 etiquetada en el bucle (ROP6NB) fue clonada corriente abajo de los promotores 35S para obtener una expresión fuerte y constitutiva, y el promotor endógeno de ROP6 (nombrado aquí como

pLjROP6) previamente amplificados y clonados en el laboratorio. Estos promotores se encontraban clonados en el vector binario pGW mcherry_3XVenus_Prom-Rop (derivado del PC GW mCherry, Dalal *et al.*, 2015) El vector pGW mcherry_3XVenus_Prom-Rop, fue digerido con las enzimas AatII y XbaI al igual que cada una de las construcciones genéticas empleadas y luego ligados los productos de digestión. Una vez obtenidos los vectores ensamblados, fueron nombrados como pGW mcherry_p35sROP6NB (ver anexo) para el vector con el promotor 35S y la secuencia codificante de ROP6 etiquetada en el bucle; y pGW mcherry_pLjROP6ROP6NB (ver anexo) para el vector con el promotor endógeno de ROP6 en *L. japonicus* (pLjROP6) y la secuencia codificante de ROP6 etiquetada en el bucle. Los plásmidos ensamblados se transformaron primeramente en la cepa de *E. coli* JM110 mediante choque térmico. Luego se inocularon las bacterias en medio LB suplementado con kanamicina y se incubaron a 37°C por 24h, tras lo cual se prosiguió a la realización de PCR de colonias con cebadores específicos (LjROP3 coding F2: ATG TCG GCA TCGAGGTTTCATC y LjROP3 coding R2: TCAAAGAATACTACAGGCCTTTTGTG) para la secuencia codificante de ROP6 para verificar las colonias transformada. Una vez que se identificaron las colonias positivas se realizó extracción y purificación de DNA plasmídico, con el kit GeneJET Plasmid miniprep Kit Thermo Scientific, para secuenciar los plásmidos y transformar *Agrobacterium rhizogenes* AR10.

5.3 Transformación de las plantas de *Lotus japonicus* con las construcciones genéticas

Agrobacterium rhizogenes AR10 se transformó con el vector binario por electroporación y se empleó para transformar las raíces de *L. japonicus* ecotipo Gifu. Para la transformación de las plantas se pusieron a germinar semillas de *L. japonicus* en medio B&D (Broughton y Dilworth, 1971) con 1.2% de agar, la germinación se realizó en condiciones de oscuridad para alargar el hipocótilo de las plantas. Luego de dos días de germinación se realizó la punción del hipocótilo con una aguja embebida en la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* AR10 transformada. Las plantas se transfirieron a cajas nuevas con medio B&D sólido y se dejaron otro día en la oscuridad, posteriormente se transfirieron a condiciones de iluminación (28% humedad, T=22°C, fotoperiodo de 16 horas luz

y 8 horas oscuridad, intensidad luminosa 700 Lux) durante dos semanas. Tras dos semanas se verificó la presencia de raíces pilosas. Las raíces transformadas se seleccionaron verificando la emisión de fluorescencia de la proteína mCherry. Las raíces no transformadas se cortaron y luego las plantas fueron transferidas a vermiculita. Para evaluar la funcionalidad de las ROPs construidas, se emplearon plantas mutantes *knock out* de ROP6.

5.4 Expresión de la proteína ROP6 en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Para expresar la proteína ROP6NB, en hojas de *N. benthamiana* se llevó a cabo una agroinfiltración con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 transformada con el plásmido pGW mcherry_p35sROP6NB. Para llevar a cabo la agroinfiltración, las células de *A. tumefaciens* se crecieron en 30 ml de medio LB a 28°C conteniendo kanamicina (100 µg/ml) y rifampicina (12.5 µg/ml) con una agitación de 300 rpm por alrededor de 20 h, o hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.5. A continuación, las células se centrifugaron a 4,000 g por 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 1 ml de buffer de infiltración (100 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaH₂PO₄, 250 mg de glucosa, 100 µM acetosiringona, para un volumen total de 50 ml). Posterior a esto, se re-centrifugaron y resuspendieron en 1 ml de buffer de infiltración. La densidad óptica a 600nm de la mezcla de bacterias para infiltrar las plantas se ajustó a 0.3 o 0.1 con buffer de infiltración. Las bacterias fueron inyectadas en la lámina de hojas de *N. benthamiana* usando una jeringa de 1 ml sin aguja. A los dos días de agroinfiltración se verificó la transformación de las hojas de *N. benthamiana* mediante la observación de la emisión de fluorescencia de mCherry empleando microscopía confocal de fluorescencia ($\lambda=580\text{nm}$).

5.5 Inmunodetección con anti-FLAG

La inmunodetección se realizó tanto en raíces transformadas de *Lotus japonicus* como en hojas transformadas de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Las raíces de *Lotus japonicus* o las hojas de *N. benthamiana* se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron en presencia de nitrógeno líquido. El tejido molido se incubó por 10 minutos a 4°C con un volumen de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3) más inhibidor de proteasas. Las muestras se centrifugaron 5 min a 13,200 rpm y los sobrenadantes se mezclaron

con un volumen de solución de Laemmli 2X y se hirvieron por 5 minutos. Las muestras de proteínas se corrieron en un gel al 12% de acrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-N+). La membrana se bloqueó por una hora a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% diluida en TBST [30 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100] y posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal anti-FLAG (SIGMA A3562) diluido 1:2000 en TBST. La membrana se lavó tres veces por 15 minutos cada una con TBST y se incubó por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a la peroxidasa diluido 1:3000 en TBST. La membrana se volvió a lavar tres veces por 15 minutos cada una con TBST y se reveló con los reactivos Lumi-Light. (Roche 12015200001), luego se visualizó mediante la detección de quimioluminiscencia empleando un equipo Microchemi 4.2

5.6 Identificación de las proteínas GEF, GAP y GDI

Para conocer cuántos miembros hay dentro de cada una de las familias de proteínas reguladoras de las ROPs se llevaron a cabo varios alineamientos de secuencia. Para la identificación de las proteínas GEF se empleó como secuencia de referencia, la secuencia proteica de MtROPGEF5 propuesta por Riely *et al.* (2010). En el caso de las proteínas GDI se empleó como secuencia de referencia la secuencia proteica de AtGDI2 propuesta por Ueda *et al.* (1998). Para la identificación de las proteínas GAPs se empleó como secuencia de referencia la secuencia de la proteína AtGAP1 propuesta por Wu *et al.*, (2000). En todos los casos, las secuencias de referencia fueron empleadas para realizar un análisis tipo BLASTP en el sitio de Lotus Base para las secuencias de *L. japonicus* (<https://lotus.au.dk/>) y el sitio Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) para las secuencias de *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris* y *Physcomitrella patens*. De los resultados de BLASTP, solo se conservaron las proteínas conteniendo los dominios específicos a cada familia de proteína reportados por Eklund *et al.*, (2010).

5.7 Predicción de las interacciones ROP6 con los miembros GEF, GAP y GDI

Para determinar los potenciales interactores de ROP6, primero se modelaron las estructuras tridimensionales. Para ello se generaron 1000 modelos de ROP6 en unión con GDP y un análogo a GTP (GNP); así como, de los miembros de la familia GEF, GAP y GDI. El modelado se realizó con Modeller 9.20 y el criterio de selección del modelo se basó en las puntuaciones de menor energía según el puntaje SOAP (statistically optimized atomic potentials). Los mejores modelos fueron minimizados energéticamente, sin criterio de convergencia de energía mediante el algoritmo de *steepest descent*, utilizando Gromacs 5.1.4. Las estructuras minimizadas fueron analizadas mediante Molprobitry con el objetivo de revisar la calidad de los modelos. Los acoplamientos de ROP6 con los diferentes reguladores fueron realizados en el servidor de Cluspro y la selección de los modos de unión se basó en la semejanza con estructuras previamente cristalizadas con miembros de la superfamilia Rac. Los complejos seleccionados fueron empleados para calcular la energía libre de Gibbs (ΔG) y la constante de disociación (K_d) utilizando Prodigy. Luego se analizaron los datos de ΔG y K_d mediante un análisis de conglomerado (técnica estadística empleada para agrupar datos con la mayor homogeneidad dentro de los grupos y la mayor variabilidad entre los grupos) y factorial discriminante para ver el agrupamiento de los complejos según su estabilidad.

El análisis de conglomerados se realizó a partir de una matriz de distancias euclidianas y el método de promedios no ponderados de grupos de pares (Unweighted pair-group average), para la construcción de los dendogramas; lo que permitió la selección de grupos de complejos agrupados según su estabilidad tomando en consideración el 70% de similitud. Además, se realizó el método de agrupamiento de K-medias para determinar cuáles eran las variables que más contribuían a la formación de los grupos. Posteriormente, se realizaron análisis factoriales discriminantes con el propósito de corroborar dichos grupos y detectar las variables que permiten la diferenciación de los mismos.

VI Resultados y discusión

6.1 Alineamiento de las estructuras de ROP6 etiquetadas con FLAG

Para rastrear una proteína o determinar las proteínas con las cuales puede unirse, es necesario fusionar la proteína con un reportero o una etiqueta. La mayoría de los trabajos que utilizan proteínas etiquetadas, colocan las etiquetas en los extremos amino o carboxilo. El problema de las ROPs es que tienen interacciones con varias proteínas en diferentes zonas, incluyendo los extremos amino y carboxilo (Dvorsky y Ahmadian 2004). Por ello se propuso un tercer sitio para etiquetar a ROP6 al cual denominamos como bucle o sitio de no interacción. Con el objetivo de determinar el lugar donde la etiqueta no estorbara a la estructura de la proteína, se realizaron modelos tridimensionales de la estructura de ROP6 nativa y la estructura de ROP6 sin etiquetar. Luego se alinearon las estructuras nativas y las estructuras etiquetadas empleando Pymol, para ver cuánto se desviaba la estructura etiquetada de la nativa. La estructura que mostró menor valor de rmsd fue ROP6NB, es decir la versión de ROP etiquetada en el bucle o sitio de no interacción. De manera general, las construcciones etiquetadas en el bucle fueron las estructuras de menor rmsd, seguidas de las estructuras etiquetadas en el C-terminal, y por último, las estructuras etiquetadas en la N-terminal (fig. 1). Teniendo en cuenta que la mayoría de los efectores pudieran interactuar con el sitio N-terminal (Lei *et al.*, 2015), es posible que exista impedimento estérico entre los efectores unidos a las ROP etiquetadas en el N terminal y el anticuerpo anti FLAG. Por lo que continuaremos todos los análisis con la versión de la proteína etiquetada en el bucle.

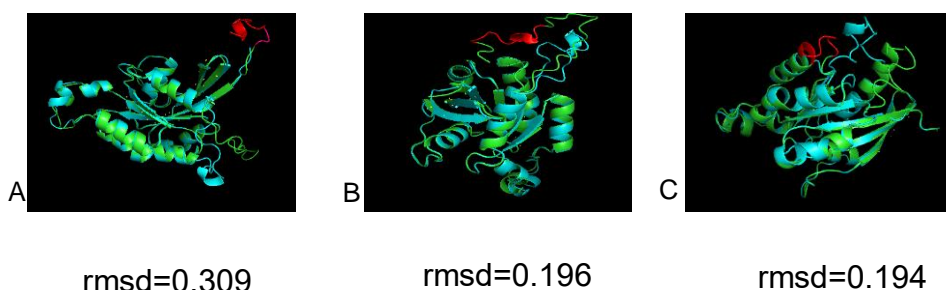


Figura 1: Modelado de las estructuras de ROP6 etiquetadas con FLAG. El etiquetado se realizó en el sitio N-terminal (A), C-terminal (B) o en el bucle o sitio de no interacción (ROP6NB) (C). Las estructuras en verde representan las diferentes versiones de ROP6, mientras que las estructuras en azul representan la proteína ROP6 nativa. La etiqueta FLAG está resaltada en rojo y en magenta los tres aminoácidos espaciadores del N terminal.

6.2. Expresión e inmunodetección de la proteína ROP6 etiquetada

6.2.1 Transformación de raíces de plantas de *Lotus japonicus*

Para precipitar la proteína ROP6 etiquetada interactuando con sus efectores y reguladores, se transformaron raíces de *Lotus japonicus*. Para llevar a cabo dicho objetivo primero se comprobó la expresión de la proteína etiquetada mediante Western blot. La transformación de las raíces de plantas de *Lotus japonicus* se realizó con *Agrobacterium rhizogenes* cepa AR10 transformadas con el plásmido binario pGW mCherry_35spROP6NB y pGW mCherry_LjROP6pROP6NB respectivamente. Como control se empleó el plásmido PC GW mCherry vacío. Después de dos semanas se observó la presencia de raíces pilosas (*hairy roots*) (fig. 2A) y al observarlas bajo una lámpara con luz verde y filtro rojo, se observó la excitación de la proteína fluorescente mCherry (fig. 2B), lo que indicaba la presencia de raíces transformadas. Luego se cortó la raíz principal silvestre por debajo del sitio de transformación y las plantas se transplantaron a vermiculita con solución B&D (Broughton y Dilworth, 1971). Las plantas se mantuvieron en este sustrato durante varias semanas para obtener mayor biomasa de raíces transformadas con el objetivo de emplearlas para la extracción de proteínas.

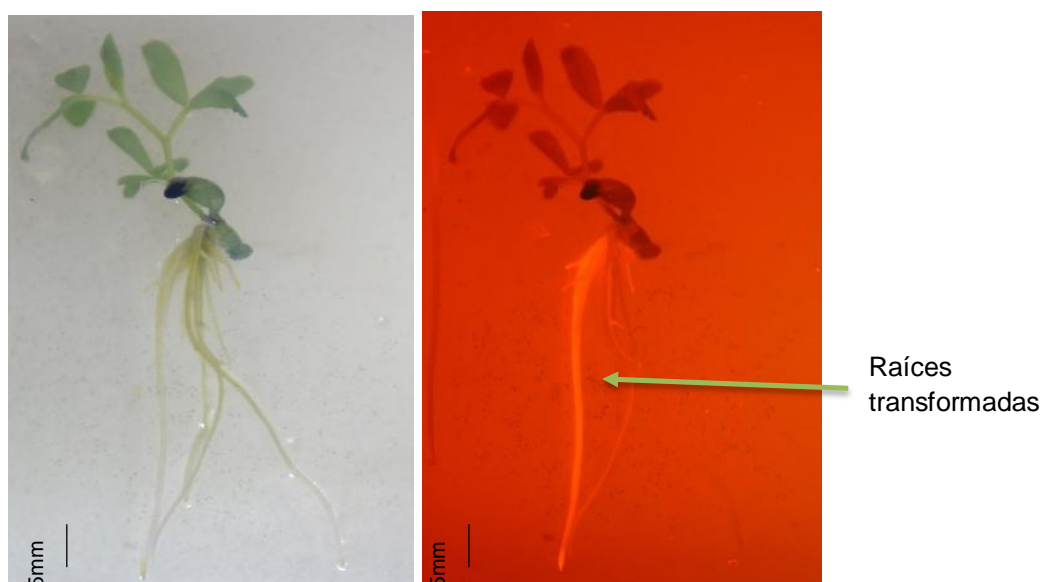


Figura 2. Ensayo de transformación en plantas de *Lotus japonicus*. A: Raíces pilosas en *Lotus japonicus* luego de la transformación con *A. rhizogenes* AR10. B: Raíces transformadas con la proteína mCherry.

6.2.2 Inmunodetección de la proteína ROP6NB en raíces de *Lotus japonicus*

Las raíces transformadas fueron cortadas de la planta y congeladas con nitrógeno líquido. Luego se extrajeron las proteínas y se cargaron las proteínas totales en un gel de acrilamida al 12%. En la figura 3 se puede observar la presencia de bandas que corresponden a las proteínas totales extraídas de raíces transformadas de *Lotus japonicus* (carriles 2-4), esto nos permitió comprobar que nuestro protocolo de extracción nos permitía extraer proteínas, lo cual es muy importante teniendo en cuenta que todos los protocolos para el manejo de proteínas fueron estandarizados para esta investigación.

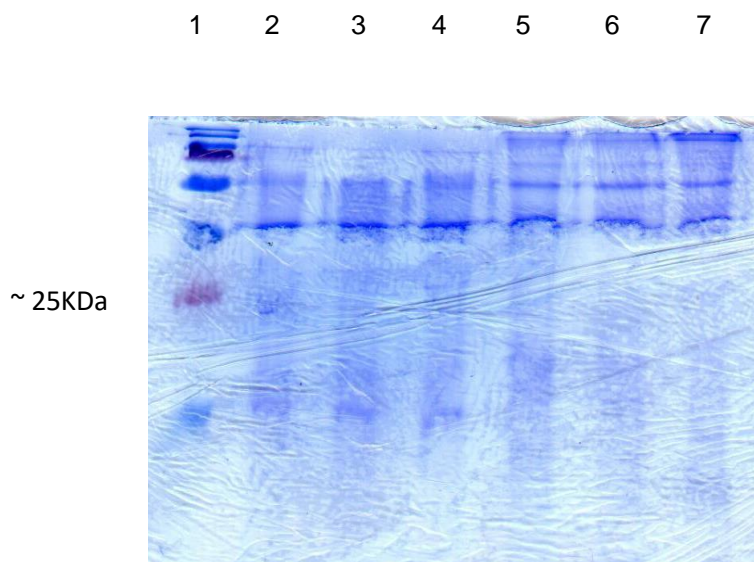


Figura 3: Expresión de proteína ROP6NB en raíces de *Lotus japonicus* y hojas de *N. benthamiana*. (A) Gel teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: raíces de *L. japonicus* transformadas con el vector PGW mCherry_LjROP6pROP6NB carril 3: raíces de *L. japonicus* sin transformar, carril 4: raíces de *L. japonicus* transformadas con el vector PGW mCerry, carril 5: hojas de *N. benthamiana* transformadas con el vector PGW mCherry_35spROP6NB, carril 6: hojas de *N. benthamiana* sin transformar, carril 7 hojas de *N. benthamiana* transformadas con el vector PGW mCerry.

A continuación, comprobamos si bajo nuestras condiciones podíamos detectar proteínas, para ello realizamos un ensayo de Western blot para identificar la proteína CIF (CFTR inhibitory factor) etiquetada con seis histidinas. En este caso pudimos detectar la proteína utilizando un anticuerpo anti-Histidinas (fig 4). Este

experimento nos ayudó a confirmar que nuestras condiciones eran adecuadas para realizar análisis por Western blot.

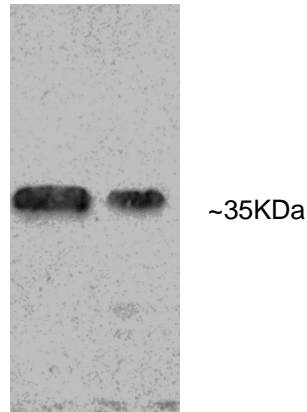


Figura 4: Western blot para detectar la proteína CIF con anticuerpo anti-Histidina. Las bandas corresponden a diferentes diluciones de la proteína purificada, carril 1: proteína concentrada, carril 2: proteína diluida 1:2.

Posteriormente pasamos a la detección de la proteína ROP6 etiquetada con FLAG (ROP6NB) empleando un anticuerpo anti-FLAG. En esta ocasión se pudo observar una banda de aproximadamente 25 kDa, que de acuerdo al tamaño estimado para las proteínas ROPs que se encuentra entre 21-25 kDa, concluimos que esta banda correspondía a la proteína ROP6 etiquetada en el bucle (fig. 5). Este experimento permitió confirmar que la proteína ROP6 se expresa en raíces de *Lotus japonicus* como plantearon Kelly *et al.*, (2018). Otra conclusión que se puede señalar es que el hecho de poder detectar la proteína etiquetada indica que la etiqueta colocada en el bucle o sitio de no interacción se expone en la estructura terciaria de ROP6 como se predijo con los ensayos de alineamiento de estructura.

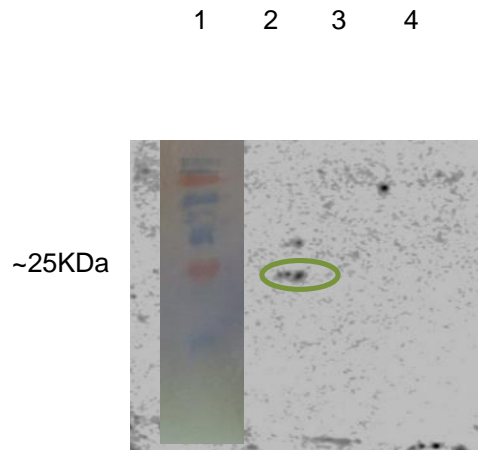


Figura 5: Western blot para detectar ROP6 etiquetada con FLAG (ROP6NB). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: raíces de *L. japonicus* transformadas con el vector PGW mCherry_LjROP6pROP6NB carril 3: raíces de *L. japonicus* sin transformar, carril 4: raíces de *L. japonicus* transformadas con el vector PGW mCherry.

Cuando intentamos replicar estos resultados tuvimos problemas en la detección de la proteína ROP6NB. Esto nos condujo a dudar si lo que habíamos detectado al inicio solo era un artefacto; unido al hecho de que al evaluar la actividad del promotor de ROP6 (mediante la fusión transcripcional del promotor de ROP6 con tres copias de la proteína Venus) no se detectó fluorescencia al observar las raíces transformadas mediante microscopía confocal de fluorescencia (Tesis de maestría en curso, Marlene Cruz Farfán). Esto puede ser debido a que las proteínas ROPs son proteínas reguladoras que se encuentran muy arriba en las cascadas de señalización, por lo que son proteínas con baja expresión, pues su función es activar efectores que amplifican la señal. Previendo que la fuerza del promotor no fuera suficiente para que se exprese la proteína en una cantidad suficiente para ser detectada por Western blot, clonamos la secuencia de la proteína ROP6NB bajo el promotor 35S. En este caso, tampoco pudimos detectar a ROP6NB. Una posible causa es que por la función biológica que realizan estas proteínas no son necesarias en gran abundancia por lo que es probable que ante un exceso de proteína o transcrito se degrade.

Existen otras dificultades técnicas que pudieran ser la causa de la no detección de la proteína ROP6NB, como son la no exposición de la etiqueta en la estructura tridimensional de la proteína, que el anticuerpo anti-FLAG no funcione porque esté dañado, o que la cantidad de proteína expresada no sea suficiente para ser detectada por Western blot debido a la regulación de la proteína o su transcrito

como se explicó anteriormente. Para resolver todas estas dificultades es necesario la generación de controles positivos de proteínas etiquetadas con FLAG. Una posibilidad para determinar si el anticuerpo puede detectar la etiqueta es generar un péptido con 3 copias de FLAG que luego pudiera ser clonado en el vector pET28a (+) y expresado en *E. coli* BL21 (DE3). Dicho péptido quedaría etiquetado con histidinas para poder utilizar también un anticuerpo anti-Histidina para detectar el péptido y de esta manera poder discernir si el problema es del anticuerpo anti-FLAG. Una vez que se compruebe que el anticuerpo funciona adecuadamente, quedaría por resolver la exposición o no de la etiqueta, para ello una posible solución es expresar diferentes versiones de la proteína ROP6 (etiquetada en el extremo amino, otra etiquetada en el extremo carboxilo y otra etiquetada en el bucle) empleando el sistema pET28a (+)/*E. coli* BL21 (DE3). Esta alternativa también resolvería el problema de la cantidad de proteína que se expresa en la planta ya que *E. coli* BL21 ha sido muy empleada como sistema de expresión con altos rendimientos de proteína heteróloga.

6.2.3 Expresión de la proteína ROP6NB en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Al no poder detectar la proteína ROP6NB a partir de extracciones de proteínas de raíces de plantas de *Lotus japonicus*, se intentó expresar la proteína en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello usamos el plásmido pGW mCherry_35spROP6NB, el cual tiene el promotor 35S río arriba de la secuencia codificante de ROP6NB, además de un *cassette* de selección con la proteína mCherry. Las hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 transformada con el plásmido pGW mCherry_35Sp-ROP6NB. Después de dos días de la transformación, se observaron células de la epidermis empleando microscopía confocal de fluorescencia, donde se percibió la presencia de fluorescencia correspondiente a la transformación con mCherry (fig. 6). Lo que permitió determinar que las hojas se transformaron.

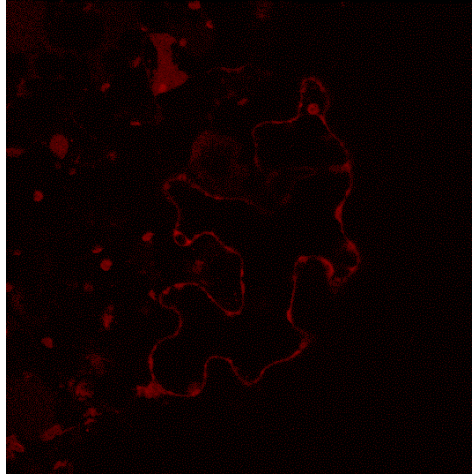


Figura 6: Hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas con el plásmido pGWmCherry_35SpROP6NB.

Se observó muy baja intensidad de la señal, lo que puede estar relacionado con bajos niveles de expresión de la proteína. Al parecer la proteína mCherry se distribuye por todo el citoplasma de la célula lo que es de esperar teniendo en cuenta que no tiene ningún péptido señal fusionado. Con base en estos resultados, se procedió a la extracción de las proteínas de las hojas de *N. benthamiana*. Se cuantificó proteína total y se obtuvieron valores de 1.80 mg/mL, sin embargo cuando se determinó la presencia de la proteína ROP6NB mediante Western blot empleando el anticuerpo anti-FLAG no se detectó la proteína por lo que al parecer esta no se expresó correctamente en el sistema. Es importante destacar que la proteína mCherry no está traduccionalmente fusionada a la proteína ROP6NB, sino que ambas se transcriben como unidades independientes (ver mapa del plásmido en anexos) por lo que el hecho de poder observar la fluorescencia de la proteína mCherry solo indica que las hojas de las plantas están transformadas.

Nuevamente una explicación puede ser la regulación de estas proteínas ROP, ya que en hojas de *N. benthamiana* también hay proteínas ROPs endógenas y como son una familia proteica muy conservada entre todas las plantas, es posible que al detectar un exceso de transcrito o proteína se degrada y no sea posible su detección.

Esto confirma que es muy importante la generación de los controles anteriormente mencionados para futuros experimentos.

6.3 Identificación de proteínas reguladoras de proteínas ROP en *Lotus japonicus*

Las proteínas GEF, GAP y GDI son esenciales en la regulación de la actividad de proteínas ROPs. En *Lotus japonicus* se identificaron nueve genes que codifican para proteínas GEF. Respecto a las proteínas GAPs se identificaron ocho genes. Mientras que de las proteínas GDI solo se identificaron cuatro genes. De manera general se observó que entre todas las especies analizadas existe un número similar de genes codificantes para cada una de estas proteínas (Tabla 1).

En *Arabidopsis thaliana* se reportaron 14 genes codificantes para proteínas GEFs, cinco genes codificantes para GAP y tres genes codificantes para GDI (Eklund *et al.*, 2010). Estos resultados coinciden con los resultados de BLAST obtenidos para la planta modelo *Arabidopsis thaliana* utilizando las secuencias de AtRopGEF1, AtGAP1, NtRhoGDI1 como búsqueda, lo que nos permite asumir que las secuencias seleccionadas son buenos candidatos para la búsqueda de los miembros de GEF, GAP y GDI en el genoma de *Lotus japonicus*.

Tabla 1: Número de genes que codifican para proteínas GEF, GAP y GDI en las especies *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris* y *Physcomitrella patens*

| Especie | GEF | GAP | GDI |
|------------------------------|-----|-----|-----|
| <i>Lotus japonicus</i> | 9 | 8 | 4 |
| <i>Medicago truncatula</i> | 10 | 6 | 2 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 14 | 5 | 3 |
| <i>Glycine max</i> | 25 | 10 | 4 |
| <i>Oryza sativa</i> | 11 | 6 | 4 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | 13 | 6 | 2 |
| <i>Physcomitrella patens</i> | 6 | 5 | 2 |

6.3.1 Identificación de genes codificantes para proteínas GEFs

En *Lotus japonicus* se identificaron nueve *loci* codificantes para proteínas GEF, que dan como resultado 13 proteínas. De las 13 proteínas, las codificadas por

Lj0g3v0349149.1 y Lj0g3v0349149.2 dan lugar a la misma proteína al igual que los *loci* Lj3g3v3553920.1 y Lj3g3v3553920.2, por lo que realmente se codifican 11 proteínas diferentes. Las proteínas identificadas fueron nombradas según el orden de aparición en el genoma (Tabla 2).

Tabla 2: Nombres asignados a las proteínas GEFs encontradas mediante BLAST

| Números de acceso | Nombre asignado |
|-------------------|-----------------|
| Lj0g3v0306579.1 | GEF1 |
| Lj0g3v0349149.1 | GEF2 |
| Lj1g3v2659360.1 | GEF3.1 |
| Lj1g3v2659360.2 | GEF3.2 |
| Lj1g3v3442650.1 | GEF4 |
| Lj2g3v1550280.1 | GEF5.1 |
| Lj2g3v1550280.2 | GEF5.2 |
| Lj2g3v2673920.1 | GEF6 |
| Lj3g3v0237250.1 | GEF7 |
| Lj3g3v2330830.2 | GEF8 |
| Lj3g3v3553920.1 | GEF9 |

Las proteínas GEFs se caracterizan por la presencia de un dominio denominado PRONE (Plant specific ROP Nucleotide Exchanger), y es el dominio mediante el cual dichas proteínas interactúan con las ROPs y facilitan el intercambio GDP/GTP (Feiguelman, 2017). En las proteínas ROPGEFs identificadas mediante BLAST en *Lotus japonicus* se identificó la presencia de dicho dominio (fig 7). Las proteínas GEFs tienen una amplia diversidad de secuencia en los dominios N-terminal y C-terminal, incluso el dominio PRONE tiene diferentes longitudes, lo que se cree que puede tener un impacto en la especificidad de la proteína ROP con la que va a interactuar (Thomas y Berken 2010).

GEF1 1 MLLIRKRLTCCARETKISIDYDEPDRI¹MTYNGLEGCILDNQSYEDSRTSRGDGCITDS¹F
 GEF2 1 -----
 GEF3.1 1 -----MKKLSNFDEISDVGYDHPSPS¹MDHSAPNTPAFSPMSRDSLAYCRAWTSSEASNS
 GEF3.2 1 -----MKKLSNFDEISDVGYDHPSPS¹MDHSAPNTPAFSPMSRDSLAYCRAWTSSEASNS
 GEF4 1 -----MEVVGMIEKNEVTEENKECESGCHDDNFS-----ELVEEKSLSSSE
 GEF5.1 1 MLTMRKRLACCTRERTISIDFD¹QQQGI¹MTYNGLESCILNNQSYEEESRTSRGDGCITDS¹F
 GEF5.2 1 -----MTYNGLESCILNNQSYEEESRTSRGDGCITDS¹F
 GEF6 1 -----METLSNKSDVSO¹KKRD¹GVQSC¹VTDSSA-----DSRGTSFSGSSS
 GEF7 1 -----MVRAVEQDQENPRSKLFNFRG¹MFENTG-----RHAKSLSVDTG
 GEF8 1 -----
 GEF9 1 -----

Dominio PRONE

GEF1 61 NDDSSC¹SSSKDAFD¹SFSSK¹CLPMKRDEHGLEDWELSESPQH¹FYMKEK-PASTVQYSD¹VE
 GEF2 1 -----
 GEF3.1 55 NFSE¹IVDDSSYSSEPS¹PCRWTAVKASPM¹KLRKHS¹LDDK¹LDDSD¹LLDSD-----EFO
 GEF3.2 55 NFSE¹IVDDSSYSSEPS¹PCRWTAVKASPM¹KLRKHS¹LDDK¹LDDSD¹LLDSD-----EFO
 GEF4 42 D-----SSSP¹SSMGWP¹QEV¹SASNS¹SSH¹SSAEKLSNENIEK¹QVSVLP¹GGP-L¹EIE
 GEF5.1 61 DEDSSC¹SSSKDASG¹SFSSN¹CLRMKRDE¹KGLEEW¹KVSQ¹SPQ¹RFYAKE¹KPAYVM¹QHS¹DI¹E
 GEF5.2 34 DEDSSC¹SSSKDASG¹SFSSN¹CLRMKRDE¹KGLEEW¹KVSQ¹SPQ¹RFYAKE¹KPAYVM¹QHS¹DI¹E
 GEF6 40 SASSEEVK¹VKGSSSPAPL¹GWPI¹LKASV¹SKRLNS¹DDKEN¹QHESH¹LED¹SKFTS¹IGLQ¹ISD¹VD
 GEF7 39 TRLD¹PTAEDGAASSR¹SQ¹GSRP¹INDL¹DKVP¹KARI¹ISK¹EIIAA¹KEAKE¹KLLQ-----EME
 GEF8 1 -----MK¹QRKHS¹LDDK¹SDDL¹NLLES-----ELE
 GEF9 1 -----MLP¹VIG¹GKDV¹VVDH¹KRDL¹DL¹LSG-----VE

Dominio PRONE

GEF1 120 AMKE¹KFAK¹LLLG¹ED¹VTGG¹TGK¹SN¹TAL¹ALS¹NAIT¹NL¹AG¹TVFG¹EL¹WKLE¹PL¹SE¹ER¹KN¹KW¹RR¹E
 GEF2 1 -----
 GEF3.1 106 MMKER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹CTAV¹TIS¹NAIT¹NL¹YA¹TVFG¹QNL¹KLE¹PL¹KPE¹KKAM¹W¹KRE
 GEF3.2 106 MMKER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹CTAV¹TIS¹NAIT¹NL¹YA¹TVFG¹QNL¹KLE¹PL¹KPE¹KKAM¹W¹KRE
 GEF4 91 MMKER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹TAL¹ALS¹NAIT¹NL¹CG¹TLFG¹QL¹WR¹LE¹PL¹AP¹KKAM¹W¹QRE
 GEF5.1 121 AMKE¹KFS¹KLLLG¹ED¹VTGG¹TGK¹SN¹TAL¹ALS¹NAIT¹NL¹AV¹TVFG¹EL¹WKLE¹PL¹CE¹ER¹KN¹KW¹RR¹E
 GEF5.2 94 AMKE¹KFS¹KLLLG¹ED¹VTGG¹TGK¹SN¹TAL¹ALS¹NAIT¹NL¹AV¹TVFG¹EL¹WKLE¹PL¹CE¹ER¹KN¹KW¹RR¹E
 GEF6 100 MMKER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹CTAL¹ALS¹NAIT¹NL¹CAT¹AFG¹QL¹WR¹LE¹PL¹SE¹KKEM¹W¹RR¹E
 GEF7 92 QM¹RER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹SSAL¹ALS¹NAIT¹NL¹AA¹SVY¹GE¹QKR¹LE¹PM¹PA¹ER¹KA¹KW¹RR¹E
 GEF8 24 MMKER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹STAV¹TIS¹NAIT¹NL¹YA¹TVFG¹QNL¹KLE¹PL¹KPE¹KKAM¹W¹RR¹E
 GEF9 26 MMKER¹FAK¹LLLG¹ED¹MSGG¹GK¹GV¹CTAL¹ALS¹NAIT¹NL¹SG¹TVFG¹EL¹WR¹LE¹PL¹AP¹OK¹KAM¹W¹RR¹E

Dominio PRONE

GEF1 180 MDW¹FL¹SP¹TNYM¹VEL¹VPAK¹QNGANG¹G-¹IFEV¹MT¹PKAR¹ADI¹GMN¹LPA¹H¹KLDS¹ML¹IEAL¹DSM
 GEF2 1 -----MLLD¹ILDS¹
 GEF3.1 166 MKV¹LLSV¹CDYI¹QEFAP¹TAQYLEDGT-¹IVEM¹MKS¹RR¹PS¹DL¹YIN¹LPAL¹OKLD¹TML¹ME¹ILD¹TF
 GEF3.2 166 MKV¹LLSV¹CDYI¹QEFAP¹TAQYLEDGT-¹IVEM¹MKS¹RR¹PS¹DL¹YIN¹LPAL¹OKLD¹TML¹ME¹ILD¹TF
 GEF4 151 MEW¹LLCV¹SDHIV¹ELKPT¹WTFPDGR-¹KVEV¹MT¹CR¹PR¹SD¹LYV¹NLPAL¹OKLD¹NML¹LEV¹LD¹SF
 GEF5.1 181 MEW¹LLSPT¹NYM¹VEL¹VPAK¹QISANG¹GRIFE¹IMTP¹PKAR¹ADI¹HMN¹LPA¹OKLDS¹ML¹MEAL¹DSM
 GEF5.2 154 MEW¹LLSPT¹NYM¹VEL¹VPAK¹QISANG¹GRIFE¹IMTP¹PKAR¹ADI¹HMN¹LPA¹OKLDS¹ML¹MEAL¹DSM
 GEF6 160 MEW¹LVSV¹SDHIV¹EL¹IPSW¹OTFPDGS-¹KLEV¹MT¹CR¹PR¹KDI¹FIN¹LPAL¹OKLD¹NML¹LE¹ILD¹SF
 GEF7 152 IDW¹LLSV¹TDYV¹VE¹MP¹TQ¹OKSK¹DGS-¹OME¹IMT¹TR¹Q¹AD¹LHM¹N¹LPA¹OKLD¹AML¹LE¹CLD¹NF
 GEF8 84 MNCL¹LSV¹CEYI¹VE¹FAP¹TAQYLEDGT-¹IVEM¹MT¹SR¹PR¹SD¹IYV¹NLPAL¹OKLD¹TML¹ME¹ILD¹SF
 GEF9 86 MEW¹LLCV¹SDSIV¹EL¹VPSV¹QFP¹GGG-¹TYEV¹MAT¹RR¹PS¹DL¹YIN¹LPAL¹OKLD¹GML¹LSM¹LEGF

Dominio PRONE

GEF1 239 VHT-¹EF¹CYAK¹GA¹SQA¹EGR¹NTS-----G¹KQ¹SK¹R¹WW¹LP¹SP¹QV¹PAT¹GL¹SD¹TE¹R¹KL¹LH
 GEF2 10 KAK-¹EF¹WY¹VD¹Q¹GIV¹SQ¹DAD¹GS---A¹SFR¹K¹R¹I¹Q¹RE¹E¹K¹W¹LP¹V¹P¹QV¹PPA¹GL¹SD¹NS¹R¹K¹LN¹H
 GEF3.1 225 EDT-¹EF¹WYA¹EN--¹IP¹GN¹STR¹SPRAA¹SFR¹K¹I¹V¹PR¹K¹DE¹K¹W¹LP¹V¹P¹CV¹LP¹GG¹LS¹DK¹SR¹KL¹IE
 GEF3.2 225 EDT-¹EF¹WYA¹EN--¹IP¹GN¹STR¹SPRAA¹SFR¹K¹I¹V¹PR¹K¹DE¹K¹W¹LP¹V¹P¹CV¹LP¹GG¹LS¹DK¹SR¹KL¹IE
 GEF4 210 VNT-¹EF¹RY¹VD¹Q¹GIL¹AP¹DGD¹GS---S¹SFR¹AL¹Q¹RE¹DK¹W¹LP¹V¹P¹QV¹PPC¹GL¹HENS¹RR¹LO¹H
 GEF5.1 241 VDT-¹EF¹WYA¹E¹GG¹SRA¹EGR¹NS---A¹RS¹Q¹R¹WW¹LP¹SP¹QV¹PK¹NGL¹SD¹TER¹LR¹LL¹H
 GEF5.2 214 VDT-¹EF¹WYA¹E¹GG¹SRA¹EGR¹NS---A¹RS¹Q¹R¹WW¹LP¹SP¹QV¹PK¹NGL¹SD¹TER¹LR¹LL¹H
 GEF6 219 TAT-¹EF¹WY¹VD¹Q¹GIVA¹QDAD¹GS---A¹SFR¹K¹T¹I¹Q¹RE¹E¹K¹W¹LP¹V¹P¹QV¹PPA¹GL¹SE¹DS¹R¹K¹LN¹H
 GEF7 211 KDQ¹NE¹F¹Y¹ISK¹DAD¹SD¹SD¹SG---K¹KN¹DD¹K¹W¹LP¹V¹P¹K¹VE¹AE¹GL¹SDA¹ARK¹F¹LO¹Y
 GEF8 143 QDT-¹EF¹WYA¹E¹H¹GS¹IS¹GN¹STR¹SPRAA¹SFR¹K¹I¹V¹Q¹R¹K¹DE¹K¹W¹LP¹V¹P¹CV¹NP¹GG¹LE¹SE¹K¹SR¹HL¹RK
 GEF9 145 HDT-¹Q¹FWY¹V¹DR¹GI¹IL¹GDS¹KDC---D¹EY¹GR¹PS¹VR¹Q¹E¹K¹W¹LP¹SP¹KL¹PPN¹GL¹CE¹DDR¹KL¹QO

Dominio PRONE

```

GEF1 288 QGRIVHQVFKAAKAINDNVLLEMPVSIIKDALL-----
GEF2 66  TRECASQILKAAMSINGNALAEMVPESYLEALP-----
GEF3.1 282 KRDCANQIHKAAMAINSNVLAEIDIPETYIDDLP-----
GEF3.2 282 KRDCANQIHKAAMAINSNVLAEIDIPETYIDDLP<LTFY<CQ<VIED<SIT<CD<PI<QMS<WN<F<S
GEF4 266 KRDCTNOVLKAAMAMNSITLSEMEVPDTYLESLP-----
GEF5.1 290 QRRVVRQIFKAAKSINENVLLEMPVPAIKDALA-----
GEF5.2 263 QRRVVRQIFKAAKSINENVLLEMPVPAIKDALA-----
GEF6 275 SRECANQILKAAMAINSTALAEMVPESYLEVLP-----
GEF7 262 QKDSVNOVLKAAMAINAQVLTEMETPESYIESLP-----
GEF8 201 KRDCANQIHKAAMAINSSVLAEMETPETYTANLP-----
GEF9 201 CRDCTNQILKAAMAINSSVLAEMETPGAYVESLP-----

```

Dominio PRONE

```

GEF1 322 -----KAGKATLGEQLHKVL-MAESNSGEFTELESNLKLS
GEF2 100 -----KNGRTCLGDFIYRYI-TSEQFSSECLLDCLDLSS
GEF3.1 316 -----KSGRASLGDSIYHYMNTADKFSPDHLLFLFKISS
GEF3.2 342 SNFISLLWKPIIAAETCRKRDDITSKSGRASLGDSIYHYMNTADKFSPDHLLFLFKISS
GEF4 300 -----KAARASLGDIVYRYI-TSDNFSPECLLAHLDIST
GEF5.1 324 -----KSGKTNLGOELHKVL-LDESSNGEDMLKSLNLKLS
GEF5.2 297 -----KSGKTNLGOELHKVL-LDESSNGEDMLKSLNLKLS
GEF6 309 -----KNGRTCLGDFIYRYI-TSDQFSPECLLDCLDLSS
GEF7 296 -----KNGRASLGDSVYRSI-TVEFFDPPDQFLSTMDLSS
GEF8 235 -----KSGRASLGDITYRYMHSADKFSPDYLLDCLKLIST
GEF9 235 -----KD GKACLGDIIYRYI-SADQFSSECLLDCLDLSS

```

Dominio PRONE

```

GEF1 355 EHSALETINRLEAATFSWKERVKQEONG--RSPLETSWSFKKDPVSGMDKMETLLDRAE
GEF2 133 EHVALEIANRVEASIHVWRRRRGHSRPPNPSRSTTKSSWEIVKDFMADGDKRELLAERAE
GEF3.1 350 EHEALDLVDRVESSMYTWRRK-----
GEF3.2 402 EHEALDLVDRVESSMYTWRRK-----
GEF4 333 EHOALEIANRVEASIYIWHKKTNSKPASRATRSSSRSSWEMFRDLIVEGEKSEMLVERAE
GEF5.1 357 EHIVLETINRLEAAIFSLKEKITEQVSR---KSPARTSWSFVKDSLSEVDKMGLLMDRAE
GEF5.2 330 EHIVLETINRLEAAIFSLKEKITEQVSR---KSPARTSWSFVKDSLSEVDKMGLLMDRAE
GEF6 342 EHVALEIANRVEAAIYVWRRRAHSRSSPSPNRTSTRSSWEIVKDFMVDGDKRELLADRAE
GEF7 329 EHKILDLKNRLEASIVIWKRKMNQ-----DSKSAWGS---AVSLEKRELFEERAE
GEF8 269 EHEALQLADKVESSMYT-----
GEF9 268 EHHTLDIVNRLEAAVNVWRLKDHKKHLS--SVKARESWSGVKGLVADGEKHHFLSQRAE

```

Dominio PRONE

```

GEF1 412 TLIKQLKTEYPNLPOTFLDAAKVQYGK-----VSFTL-----
GEF2 193 NILLSLKQRFPGLTQTTLDTSKIQCNKDVGKAILEGYSRVLESMAFNIVARIDDLLYVDD
GEF3.1 -----
GEF3.2 -----
GEF4 393 SILLSLMQRFPGLPOTALDMSKIQCNKDVGKSILESYSRVLESLASNIVARIDDVLYVDD
GEF5.1 414 TLLQLLKIRFPNLPPTFLDATKVQYGKDIGHSILEAYSRVLGNLAFSILSRIRDILQEDS
GEF5.2 387 TLLQLLKIRFPNLPPTFLDATKVQYGKDIGHSILEAYSRVLGNLAFSILSRIRDILQEDS
GEF6 402 NILLSLKQRFPGLSOTTLDTSKIQCNKDVGKSILESYSRVLESMAFNIVARIDDLLYVDD
GEF7 377 TILLLLKHRFPGIPOSSLDISKIQFNKDVGQAVLESYSRILESLAFTVLSRIDDVLQADY
GEF8 -----
GEF9 326 TILQSLKHRFPGLPOTALDMAKIQYNKDVGQAILESYSRVMESLAFNIMARIDDVLYADD

```

```

GEF1 -----
GEF2 253 LTKHSDRFPLVPPTVNVSQQKLSR-SMAVSVSGTPHK-----ALSPVPLISPARGDR
GEF3.1 -----
GEF3.2 -----
GEF4 453 LTKHSDQFSSLP-KVAVITQKSISSAPYSMPVQSTSYK-----PAFG-TPCFSPAKG--
GEF5.1 474 FSNPNSPAAAINLSETWVVGSHVRHSLDKMNKANGQCCDSSFDSTSDLELS-----
GEF5.2 447 FSNPNSPAAAINLSETWVVGSHVRHSLDKMNKANGQCCDSSFDSTSDLELS-----
GEF6 462 LTKHSDKFALVPSTVNMASQKKVSCPSFSVSSDTPRKSAVG-TPRFSPAPLISPARG--
GEF7 437 QTQNVPGRKSSAARIS-FSKPSPREEMDKVGADQTPGSMTLSDFMGWGSDQADSEVKKD-
GEF8 -----
GEF9 386 TVKRCAAADSIP----LFSRGGFGGLPMQKRMSPSPFS----IQHSPYASPFATPSFCS-

```

```

GEF1      -----
GEF2      3 0 5  E R T P F L N I N N N N I I K P Q R R G F G V R R A L S N Y L G - - G E T K A T K M F S N A T E V N G T N P N C N K T E
GEF3.1    -----
GEF3.2    -----
GEF4      5 0 3  ----- K R S P I N F H S - - T D E E A - - - - A F E I D I E S S D C T D V K
GEF5.1    5 2 6  ----- I D A K S S V E I A T P S R S S A W C I S R E A C T S V S P Q N S
GEF5.2    4 9 9  ----- I D A K S S V E I A T P S R S S A W C I S R E A C T S V S P Q N S
GEF6      5 1 9  E R T P F L N - N N N N I I K P H R R G F G V R R V L S N Y L G - - G E T T K S K I G S N S I G V N G S S P S S K K T E
GEF7      4 9 5  ----- P F A A S D D F Y N N V D M K Q P Q K L P E V V T T K K V S Y L E T L G V M
GEF8      -----
GEF9      4 3 7  ----- S S P V S G S P C S P R R T R A V K K N A Q A - - T E S K T E K L A A A D F E R V W S Y T G N L S A R

```

```

GEF1      -----
GEF2      3 6 3  Q P E C Q K E S H D M R S K T K
GEF3.1    -----
GEF3.2    -----
GEF4      5 3 2  L N V L D R A W L E S Q S - - -
GEF5.1    5 5 9  P - - - - -
GEF5.2    5 3 2  P - - - - -
GEF6      5 7 6  Q R - - L K E L S C P K N R T K
GEF7      5 3 3  R S P T S R H - - - - -
GEF8      -----
GEF9      4 8 6  R A T G D A P E R D - - - - -

```

Figura 7: Alineamiento de secuencias de LjROPGEF identificadas. El dominio PRONE (recuadro verde) estaba presente en todas las secuencias detectadas.

En el dominio PRONE se observó conservación de la secuencia en las proteínas evaluadas, sin embargo las proteínas completas muestran una identidad de entre el 36-100% (Tabla 3) lo que demuestra la amplia variedad dentro de esta subfamilia de proteínas. El 100% de identidad solo fue observado entre las isoformas GEF5.1 y GEF5.2, realmente estas isoformas son diferentes proteínas como se observa en el alineamiento de secuencias, éstas difieren en el extremo N-terminal.

Tabla 3. Porcentaje de identidad de secuencia entre las proteínas GEF identificadas en *Lotus japonicus*.

| | GEF1 | GEF2 | GEF3.1 | GEF3.2 | GEF4 | GEF5.1 | GEF5.2 | GEF6 | GEF7 | GEF8 | GEF9 |
|--------|------|------|--------|--------|------|--------|--------|------|------|------|------|
| GEF1 | | 40 | 44 | 37 | 44 | 75 | 76 | 47 | 44 | 42 | 47 |
| GEF2 | 40 | | 53 | 40 | 60 | 43 | 43 | 76 | 49 | 54 | 56 |
| GEF3.1 | 41 | 53 | | 88 | 53 | 43 | 43 | 56 | 52 | 83 | 57 |
| GEF3.2 | 35 | 40 | 88 | | 49 | 36 | 36 | 48 | 43 | 70 | 48 |
| GEF4 | 44 | 60 | 52 | 45 | | 45 | 45 | 65 | 52 | 62 | 59 |
| GEF5.1 | 76 | 43 | 43 | 36 | 45 | | 100 | 48 | 44 | 46 | 47 |
| GEF5.2 | 76 | 43 | 43 | 36 | 45 | 100 | | 48 | 44 | 46 | 47 |
| GEF6 | 47 | 79 | 52 | 45 | 65 | 48 | 48 | | 49 | 60 | 59 |
| GEF7 | 44 | 50 | 52 | 44 | 53 | 44 | 44 | 50 | | 51 | 51 |
| GEF8 | 42 | 54 | 83 | 70 | 62 | 46 | 46 | 59 | 49 | | 57 |
| GEF9 | 47 | 56 | 57 | 48 | 59 | 47 | 47 | 59 | 51 | 57 | |

6.3.2 Identificación de genes codificantes para proteínas GAPs

Las proteínas GAP juegan un importante papel en la regulación de ROPs, las proteínas ROPs tienen una baja tasa de hidrólisis del GTP, una vez que interactúan con las GAPs, la tasa de hidrólisis se incrementa hasta en cinco órdenes de magnitud (Berken 2006). Existe un número variable de proteínas GAPs que han sido identificadas en otras especies de plantas. En *Lotus japonicus* se identificaron ocho *loci* codificantes para proteínas GAPs, que dan como resultado 10 proteínas diferentes. Hasta el momento en *L. japonicus* no se ha reportado el número de GAPs existentes. Las proteínas identificadas fueron nombradas según el orden de aparición en el genoma (Tabla 4).

Tabla 4: Nombres asignados a las proteínas GAPs encontradas mediante BLAST

| Números de acceso | Nombre asignado |
|-------------------|-----------------|
| Lj0g3v0174019.1 | GAP1.1 |
| Lj0g3v0174029.1 | GAP1.2 |
| Lj0g3v0334489.1 | GAP2 |
| Lj1g3v4717450.1 | GAP3 |
| Lj1g3v4764220.1 | GAP4.1 |
| Lj1g3v4764230.1 | GAP4.2 |
| Lj1g3v5060420.1 | GAP5 |
| Lj3g3v1182350.1 | GAP6 |
| Lj3g3v2993420.1 | GAP7 |
| Lj5g3v1681410.1 | GAP8 |

Las proteínas GAP se definen por tener un dominio CRIB y un dominio GAP. En los alineamientos realizados se identificaron ambos dominios en las proteínas GAPs detectadas (Fig. 8). Cuando el dominio GAP es funcional, incrementa la tasa de hidrólisis del GTP ayudando a las ROPs a intercambiar GTP por GDP. El dominio CRIB es esencial para considerar una proteína como GAP. Existen varias proteínas que tienen dominio CRIB, en el caso de las proteínas GAPs, dicho dominio se caracteriza por tener la secuencia conservada IGWPTNVRHVAHVTFD. El dominio CRIB se ubica entre el N-terminal y el dominio GAP y aunque su función no está bien establecida se ha determinado que interactúa con las ROPs (Wu *et al.*, 2001).


```

GAP1.2 1 -----
GAP1.1 1 MTGPVMVTRGCGCGGGKGRGG-----
GAP2 1 MTRLFRSKSCGLAATELNPPPPAVYIQVKDDE-----EELECCD-----
GAP3 1 MTEVLQLPSPSRRCNSNDGSHQTALIN-----NSSSVEEG-----V
GAP4.1 1 MTGPVMVTRGCGCGGGKGRGG-----
GAP4.2 1 -----
GAP5 1 MTRLFRSKSCGLVEFNPPSPSPFFHNVKDEEDDEDDEEEEEEEELYNDDEDYWSNPVS
GAP6 1 MTQVLHFAS--SSPTTSSSPS-----PFSSSHA-----
GAP7 1 MTEVLHSPPTPTSSPTTSSSDGGILILSRPDQEEQ-PPSSSSSASSVSPASCVSAEAVDG
GAP8 1 MTGLVMVTKGCGCGGKRTRASR-----

```

```

GAP1.2 1 -----MVGWRVDSPAD----VISAV
GAP1.1 23 -----RDAVEEAEQNOGSPAAFLLAGTKKSMVGRVDSPAD----VISAV
GAP2 43 -----GIRGNQTRHSQQQOFALIDVVVGVLRKSLVTCSSVVEEEMEEEEEDSSS
GAP3 36 LQLQTHLDLVEEDEEEEEKDREGDQLSLLTLLIATFRKSLIGSCSTSPRD---SGALSS
GAP4.1 23 -----RDAVEEAEQNOGSPAAFLLAALKSMVACSVDSPD----VISAV
GAP4.2 1 -----MVACSVDSPD----VISAV
GAP5 61 TPLINPAGSKDKGNWRGQSHNQNOQFAILDILVAATKKSIVTCSSVDREDDV-----
GAP6 27 -----IFAILLVTLFRKSPVAAFK-----SGRKHIL
GAP7 60 FSTVTDGDSEETVVTDRNHRTQOELSLALLVTLFRKSLVACRS-----EGR-EL
GAP8 23 -----TAEEQDRONQLSLVALLLALRKSVMACRVDRPDE----AISTV

```

Dominio CRIB

```

GAP1.2 17 HPMEIGWPTNVKHVTLVTFDRFNGFLGLPLELELVHVPAPVPSARVSVFGVSAESMOCASYD
GAP1.1 64 HPMEIGWPTNVKHVTLVTFDRFNGFLGLPLELELVHVPAPVPSARVSVFGVSAESMOCASYD
GAP2 91 SKLDIGWPTDVRHVSHVTFDRFNGFLGLPSEFOPEVPTRVPSARVSVFGVSAKSMOCASYD
GAP3 93 SSMEIGWPTNVRHVAVHVTFRFHGFLGLPVEFEPEVPRRPPSARVSVFGVSTESMQLSYD
GAP4.1 64 HPMEIGWPTNVKHVTHVTFDRFNGFLGLPLELELVHVPAPVPSASVSVFGVSAESMOCASYD
GAP4.2 17 HPMEIGWPTNVKHVTHVTFDRFNGFLGLPLELELVHVPAPVPSASVSVFGVSAESMOCASYD
GAP5 112 SSLDIGWPTDVRHVSHVTFDRFNGFLGLPTELOPEVPOKVPASAKVFGVSAKSMOCASYD
GAP6 51 CAMDIGWPTNVRHVAVHVTFRFNGFLGLPVEFEPEVPRRPPSASATVFGVSTESMQLSYD
GAP7 111 CAMEIGWPTNVRHVAVHVTFRFNGFLGLPVEFEPEVPTRPSPARAVFGVSTESMQLSYD
GAP8 64 HQMEIGWPTDVRHVTHVTFDRFNGFLGLPVEFEPEVTPGRVPSARVSVFGVSAESMOCASYD

```

Dominio GAP

```

GAP1.2 77 SKGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINPENGOEEHTRDQLNRGVVDPNDIDVHCLA
GAP1.1 124 SKGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINPENGOEEHTRDQLNRGVVDPNDIDVHCLA
GAP2 151 DRGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINAENSQEEFVRDQLNRGVVPHGIDVHCLS
GAP3 153 ARGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINAENSQEEFVRDQLNRGVVPHGIDVHCLA
GAP4.1 124 SKGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINPENGOEEHTRDQLNRGVVDPNDIDVHCLA
GAP4.2 77 SKGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINPENGOEEHTRDQLNRGVVDPNDIDVHCLA
GAP5 172 ERGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINAENSQEEFVRDQLNRGVVPHGIDVHCLS
GAP6 111 SRGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINPENGOEEHTRDQLNRGVVPHGIDVHCLA
GAP7 171 TRGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINAENSQEEFVRDQLNRGVVPHGIDVHCLA
GAP8 124 SKGNSVPTILLMQRERLYSQGGLMAEGIFRINPENGOEEHTRDQLNRGVVDPNDIDVHCLA

```

Dominio GAP

```

GAP1.2 137 GLIKAWFRELP SGVLDGLSPEQVLECNTEEEFVQLVKQLKPTTELALLNWAIDLMDADVVEE
GAP1.1 184 GLIKAWFRELP SGVLDGLSPEQVLECNTEEEFVQLVKQLKPTTELALLNWAIDLMDADVVEE
GAP2 211 GLIKAWFRELP TGVLDSLTPPEQVMHCYTEEDCTNLVKLLPSTEALLDWAIDLMDADVVEE
GAP3 213 GLIKAWFRELP TGVLDSLTPPEQVMHCYTEEDCTNLVKLLPSTEALLDWAIDLMDADVVEE
GAP4.1 184 GLIKAWFRELP SGVLDGLSPEQVLECNTEEEFVQLVKQLKPTTELALLNWAIDLMDADVVEE
GAP4.2 137 GLIKAWFRELP SGVLDGLSPEQVLECNTEEEFVQLVKQLKPTTELALLNWAIDLMDADVVEE
GAP5 232 GLIKAWFRELP TGVLDSLTPPEQVMHCYTEEDCTNLVKLLPSTEALLDWAIDLMDADVVEE
GAP6 171 GLIKAWFRELP TGVLDSLTPPEQVMHCYTEEDCTNLVKLLPSTEALLDWAIDLMDADVVEE
GAP7 231 GLIKAWFRELP TGVLDSLTPPEQVMHCYTEEDCTNLVKLLPSTEALLDWAIDLMDADVVEE
GAP8 184 GLIKAWFRELP TGVLDSLTPPEQVMHCYTEEDCTNLVKLLPSTEALLDWAIDLMDADVVEE

```

Dominio GAP

```

GAP1.2 197 EEHNKMDARNIAMVFAPNMTQVSDPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLISERE;ATTAGYSS
GAP1.1 244 EEHNKMDARNIAMVFAPNMTQVSDPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLISERE;ATTAGYSS
GAP2 271 EKINKMNARNIAMVFAPNMTQVADPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLIRERE;QITNGR--
GAP3 273 EHFNKMNARNIAMVFAPNMTQVADPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLIRERE;SIVKSNPV
GAP4.1 244 EEHNKMDARNIAMVFAPNMTQVSDPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLISERE;ATTAGYSS
GAP4.2 197 EEHNKMDARNIAMVFAPNMTQVSDPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLISERE;ATTAGYSS
GAP5 292 EQFNKMNARNIAMVFAPNMTQVADPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLIRERE;SMAKAR--
GAP6 231 EHVNKMNARNIAMVFAPNMTQVADPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLIRERE;SVVESHPK
GAP7 291 EHLKMNARNIAMVFAPNMTQVADPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLIRERE;SVVEPSRP
GAP8 244 EECNKMNARNIAMVFAPNMTQVSDPLTALMHAVQVMNLLKTLILKTLIRERE;TATCGYSS

```

```

GAP1.2 257 MSSHSSDRQSEDEYDSQLEMYTSAELRGSQSDCDDHVNNNSLNSSEEEVDSASVSEIEECF
GAP1.1 304 MSSHSSDRQSEDEYDSQLEMYTSAELRGSQSDCDDHVNNNSLNSSEEEVDSASVSEIEECF
GAP2    329 -LLSPTMYSPSCNNDPPVKFDREESCEQ--MKDSCDTKEPAM--KRKFSR-TSTLGRI
GAP3    333 PNLNSFDDDGHQSDSQVLPKDGSENGNDCSDEDTVFVSAEPSQSPTHHTEDGCETESGS
GAP4.1 304 MSSHSSDRQSEDEYDSQLEMYTSAELRGSQSDCDDHVNNNSLNSSEEEVDSASVSEIEECF
GAP4.2 257 MSSHSSDRQSEDEYDSQLEMYTSAELRGSQSDCDDHVNNNSLNSSEEEVDSASVSEIEECF
GAP5    350 -QLSSLLNSPSCKGDSHPFKDNREESSAQ--PVDTCATMPPD---KSEFS-----RM
GAP6    291 LYPGPSDENG---NRTLLESCOODTMAENEEAEETVVSEKTVVECSPELQNNTSTGGES
GAP7    351 FDLEPSDENGE--DQSPLGSYQQDVASENEEEVESFVWEKAVSECSPEPFQNKDSTEGEP
GAP8    304 MSFHSSDRRSEAEYDSQREMDTSGELRGAKSDCGSHYSHS---SEEEVEAESLSEIEERF

GAP1.2 317 LKQLNENKQGGFAEPARS-----TCSGYNLESAVSFTDAKPDNSC-----SSSY
GAP1.1 364 LKQLNENKQGGFAEPARS-----TCSGYNLESAVSFTDAKPDNSC-----SSSY
GAP2    382 ECCV---EKLWSSEEKGNGE-VFKS-----VSGGSITSRYENETSPLESSYRSY
GAP3    393 ETSPTPAENFLSSGSRLLIDSCPCNVSQLCSFAIGLODSSIATGOAKIS----RSKSLQ
GAP4.1 364 LKQLNENKQGGFAEPARS-----TCSGYNLESAVSFTDAKPDNSC-----SSSY
GAP4.2 317 LKQLNENKQGGFAEPARS-----TCSGYNLESAVSFTDAKPDNSC-----SSSY
GAP5    396 EWCVD--EKVWSSEEKGTGGALES-----VSGGSSPSRYE--SGPLESRYRGIY
GAP6    348 DSLVSSSENTICNED-----LYCEFPP-----KGNMG-----KGKPAQ
GAP7    409 ESLMSSSEILVCEED-----LYCQFPP-----KGNVG-----MSKTGQ
GAP8    361 LKQLDENTKG-FSEPAASLQEYVN--PSNSGYSVEPAASNTDSKTGKPC-----LRTG

GAP1.2 362 EDDSGATLSAEGSSAESSSPSIGSTYCTNDVEMMDKFADCVSLVPLFASS-
GAP1.1 409 EDDSGATLSAEGSSAESSSPSIGSTYCTNDVEMMDKFADCVSLVPLFASS-
GAP2    428 DSEHWLRLR-KGVRKLWREPVFQISKPSRSLQVLEVVK-KLGPKNAST---
GAP3    449 MSTSDIDIKSFKNVI---EFPVVG---PAEKNRGTAIIGRINSRTELTEAWR
GAP4.1 409 EDDSGATLSAEGSSAESSSPSIGSTYCTNDVEMMDKFADCVSLVPLFASS-
GAP4.2 362 EDDSGATLSAEGSSAESSSPSIGSTYCTNDVEMMDKFADCVSLVPLFASS-
GAP5    442 DSEHWLRLR-KGVRRLCQHPVFQLSKSTKKRADLGIVNTREGGEAWA---
GAP6    381 SSSSNARKGTKKTR--GKQPVDQTVPAEK-RGMRSASNTDSRYERVEAW-
GAP7    442 SSSSIAKKGFKKTR--GQOPMIHGTVAVEK-KGISNLSLIDSTSERIEAWR
GAP8    412 LD-----SSIDSSRAWTG---TKEVEMMDKFTDSVPPVPLVASS-

```

Figura 8: Alineamiento de secuencias de LjROPGAPs. La presencia de los dominios CRIB (recuadro verde) y GAP (recuadro rojo) fue detectado en cada proteína GAP identificada.

Todas las proteínas LjGAP evaluadas presentaron el dominio GAP y el dominio CRIB, con una alta conservación en ambos dominios, sin embargo, los extremos carboxilo y amino terminal son más variables. En el análisis del porcentaje de identidad entre los miembros de la familia GAP detectados en *Lotus japonicus* se observó que tienen entre 52-100% de identidad (Tabla 5). El 100% de identidad sólo fue observado entre las isoformas GAP4.1 y GAP.2, realmente estas isoformas son diferentes proteínas como se observa en el alineamiento de secuencias, éstas difieren en el extremo N-terminal.

Tabla 5. Porcentaje de identidad de secuencia entre las proteínas GAP identificadas en *Lotus japonicus*.

| | GAP1.1 | GAP1.2 | GAP2 | GAP3 | GAP4.1 | GAP4.2 | GAP5 | GAP6 | GAP7 | GAP8 |
|--------|--------|--------|------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| GAP1.1 | | 100 | 74 | 67 | 98 | 98 | 66 | 69 | 62 | 70 |
| GAP1.2 | 100 | | 74 | 72 | 53 | 98 | 72 | 70 | 67 | 71 |
| GAP2 | 72.50 | 72.50 | | 67.78 | 64.66 | 72.08 | 64.46 | 62.17 | 64.07 | 64.69 |
| GAP3 | 66 | 72 | 67 | | 65 | 68 | 53 | 54 | 54 | 69 |
| GAP4.1 | 98 | 98 | 64 | 66 | | 100 | 67 | 65 | 62 | 70 |
| GAP4.2 | 98 | 98 | 73 | 68 | 100 | | 71 | 70 | 67 | 71 |
| GAP5 | 69 | 72 | 64 | 58 | 71 | 71 | | 69 | 63 | 67 |
| GAP6 | 70 | 70 | 57 | 54 | 62 | 72 | 69 | | 75 | 67 |
| GAP7 | 66 | 73 | 62 | 55 | 66 | 72 | 63 | 75 | | 66 |
| GAP8 | 69 | 70 | 64 | 70 | 69 | 71 | 67 | 62 | 65 | |

6.3.3 Identificación de genes codificantes para proteínas GDIs

Las proteínas GDI participan en la regulación de proteínas ROPs. Estas proteínas interactúan con los grupos prenilo de las colas lipídicas que presentan las ROPs y de esta manera las GDIs regulan la unión a la membrana o la localización citosólica de las proteínas ROPs, así como su degradación y tiempo de vida media (Yalovsky, 2015). En *Lotus japonicus* se identificaron cuatro *loci* que codifican para proteínas ROPs, dichos *loci* codifican para cinco proteínas en total. Hasta el momento en *L. japonicus* no se ha reportado el número de GDI existentes, por lo que a las secuencias encontradas se le asignaron nombre según el orden de aparición en el genoma (Tabla 6).

Tabla 6: Nombres asignados a las proteínas GDIs encontradas mediante BLAST

| Números de acceso | Nombre asignado |
|-------------------|-----------------|
| Lj1g3v4515700.1 | GDI1 |
| Lj4g3v0120120.1 | GDI2 |
| Lj4g3v2573890.1 | GDI3 |
| Lj6g3v1764540.1 | GDI4 |

Las proteínas GDI se caracterizan por tener un dominio tipo inmunoglobulina (IG) y un dominio RA (*regulatory arm*). Los alineamientos de secuencia realizados para determinar la presencia de proteínas ROPGDI en *L. japonicus* mostraron la presencia de cinco proteínas ROPGDIs, con los dominios IG y RA presentes (fig. 9). Es frecuente encontrar un bajo número de proteínas GDI en los organismos eucariotas (Kost, 2010), en los alineamientos de secuencia realizados

observamos que de esta familia se encontró un bajo número de miembros en todas las especies analizadas.

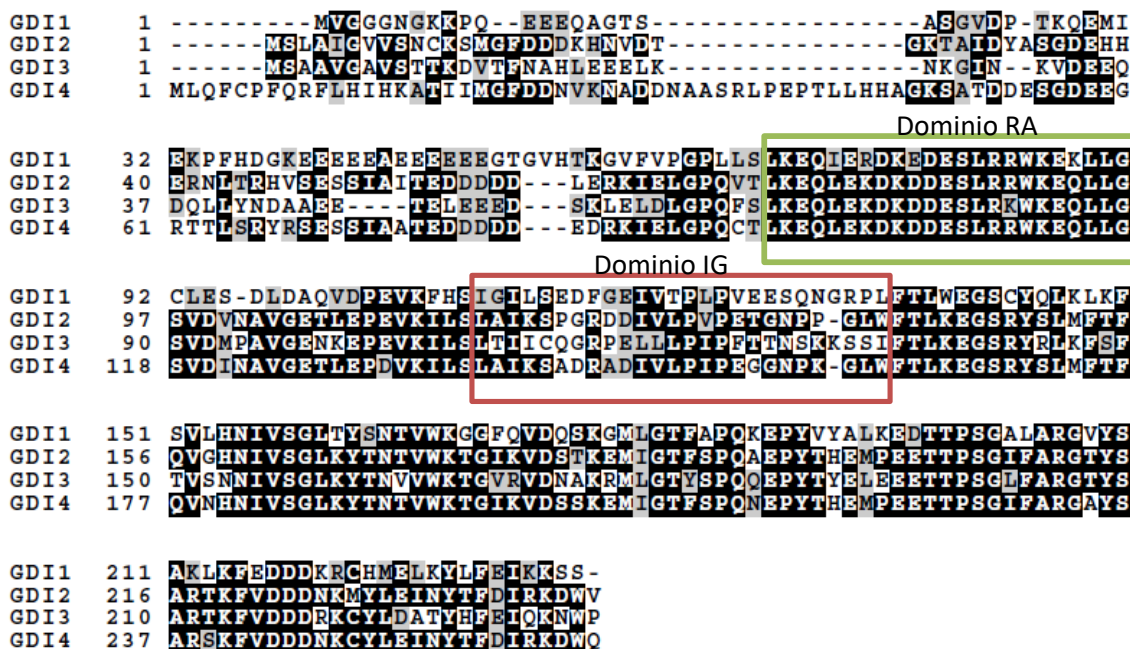


Figura 9: Alineamiento de secuencias de LjROPGDIs. En todas las GDIs detectadas se identificó el dominio RA (recuadro verde) y el dominio IG (recuadro rojo)

En el caso del dominio RA se observó una gran conservación de la secuencia, sin embargo, el dominio IG mostró una mayor variabilidad. Las proteínas GDIs identificadas en *Lotus japonicus* mostraron una identidad de 51-97% (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de identidad de secuencia entre las proteínas GDI identificadas en *Lotus japonicus*.

| | GDI1 | GDI2 | GDI3 | GDI4 |
|------|------|------|------|------|
| GDI1 | | 50 | 53 | 55 |
| GDI2 | 50 | | 52 | 73 |
| GDI3 | 53 | 52 | | 68 |
| GDI4 | 55 | 73 | 67 | |

La identificación de los miembros de las subfamilias GEF, GAP y GDI en *Lotus japonicus* no se ha reportado hasta el momento en la literatura. El hecho de haber detectado dichos miembros con los dominios que definen cada familia nos

va a permitir informar con una mayor claridad cuáles son los interactores de los miembros de la familia ROP, así como diseñar experimentos basados en las secuencias de estas proteínas que hasta el momento se desconocían.

6.4 Predicción de las interacciones de ROP6 con los miembros identificados de las familias GEF, GAP y GDI

Con el objetivo de predecir cuáles eran los posibles interactores de ROP6 dentro de las familias de proteínas reguladoras GEF, GAP y GDI, se realizaron acoplamiento computacionales proteína-proteína. Para ello primero se modelaron las estructuras tridimensionales de ROP6 y de todos los miembros encontrados de las familias GEF, GAP y GDI. Una vez que se obtuvieron los modelos tridimensionales, se minimizaron las estructuras y se prosiguió al acoplamiento proteína-proteína. Luego se calculó la energía libre de Gibbs y la constante de disociación para cada acoplamiento y se realizó un análisis de conglomerado y factorial discriminante para determinar la formación de grupos de posibles interactores.

6.4.1 Interacciones ROP6-GEFs

En el caso de los miembros de la familia GEF, los valores de energía calculados de los complejos cayó en el rango de -15.6 a -8.8 kcal mol⁻¹ y las constantes de disociación entre $3.5 \cdot 10^{-12}$ a $3.2 \cdot 10^{-7}$ M (Tabla 7).

Teniendo en cuenta el análisis de conglomerado se observó la formación de cuatro posibles grupos con una identidad de un 70% (fig. 10). El grupo 2 quedó integrado por el complejo ROP6-GEF5.1, ROP6-GEF7, ROP6-GEF9, con base en el valor de energía libre podemos asumir que los miembros de este grupo tienen la mayor probabilidad de interacción con ROP6 ya que son los complejos de menor energía. El tercer grupo quedó formado por los complejos ROP6-GEF3.1, en este grupo se agruparon los complejos de mayor energía y por tanto menos favorecidos, por lo que estos miembros son los que pudieran interactuar con ROP6 con menor probabilidad. El resto de los complejos se agruparon en los grupos 1 y 4 en estos grupos se agruparon los complejos de mayor energía y por tanto menos favorecidos, por lo que estos miembros son los que pudieran interactuar con ROP6 con menor probabilidad.

Tabla 7. Valores de energía libre de Gibbs (ΔG) y constante de disociación (Kd) para los complejos ROP6-GDP-GEFs.

| | ΔG (kcal mol ⁻¹) | Kd (M) at 25.0 °C |
|--------|--------------------------------------|------------------------|
| GEF1 | -13.2 | 2.30*10 ⁻¹⁰ |
| GEF2 | -13.4 | 1.60*10 ⁻¹⁰ |
| GEF3.1 | -8.8 | 3.20*10 ⁻⁰⁷ |
| GEF3.2 | -13.9 | 6.90*10 ⁻¹¹ |
| GEF4 | -10.9 | 9.70*10 ⁻⁰⁹ |
| GEF5.1 | -15.6 | 3.50*10 ⁻¹² |
| GEF5.2 | -13.1 | 2.40*10 ⁻¹⁰ |
| GEF6 | -13.5 | 1.30*10 ⁻¹⁰ |
| GEF7 | -15.0 | 9.90*10 ⁻¹² |
| GEF8 | -13.5 | 1.30*10 ⁻¹⁰ |
| GEF9 | -14.7 | 1.80*10 ⁻¹¹ |

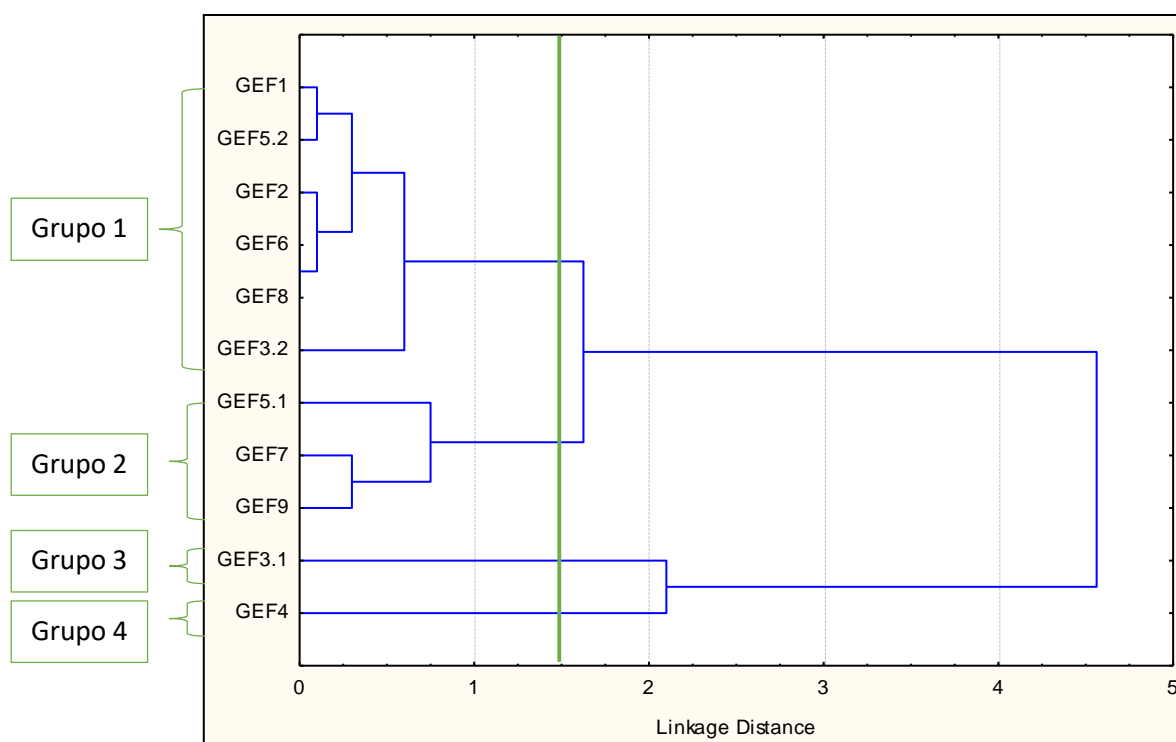


Figura 10: Análisis de conglomerado para agrupar los miembros de la familia GEF según su probabilidad de interacción con ROP6. La línea verde indica la distancia a la cual se realizó el corte (70%) para la formación de grupos. Para esta distancia se forman cuatro grupos con un nivel de confianza de 100%.

El haber encontrado tres miembros de la familia GEF que pudieran interactuar con ROP6 no indica que todos interactúen al mismo tiempo, es probable que cada miembro interactúe con ROP6 ante diferentes condiciones de la planta o en diferentes tejidos.

Al analizar los sitios de interacción de los complejos más favorecidos de ROP6 con GEFs, observamos que los sitios potenciales de interacción son la región switch I, la región switch II, algunos residuos del extremo N-terminal y la región $\alpha 3$ (fig 11). Estos sitios coinciden con los reportados por Dvorsky y Ahmadian (2004). En el caso del complejo ROP6-GEF7 también se observó interacción con la región de inserción, este sitio no se reportó como un sitio de interacción de las GEFs por Dvorsky y Ahmadian (2004), sin embargo, Thomas y Berken (2010), si reportan este sitio como posible sitio de interacción de ROP con GEF.

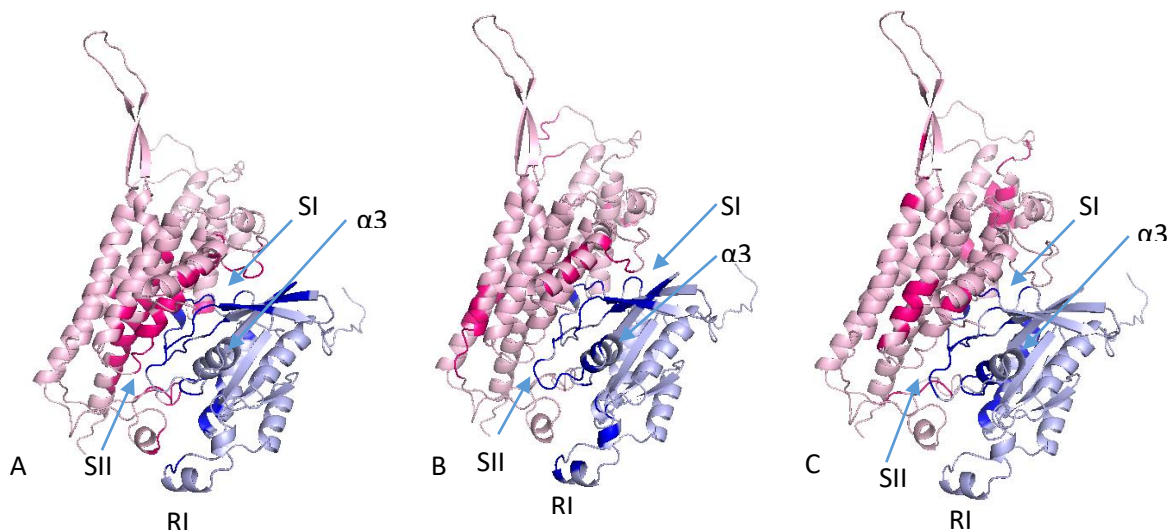


Figura 11: Complejos ROP6-GEF. ROP6-GDP-GEF5.1 (A), ROP6-GDP-GEF7 (B) ROP6-GDP-GEF9 (C). En azul se encuentra representado ROP6 y en rosa GEF5.1, GEF7 y GEF9. Los residuos de interacción se encuentran resaltados en azul oscuro para el caso de ROP6 y en rosa oscuro en el caso de las GEFs. SI: switch I, SII: switch II, RI: región I, $\alpha 3$.

Las proteínas ROPGEFs tienen alta especificidad por las ROPs de plantas ya que el dominio PRONE de estas proteínas no puede interactuar con las Rho de

animales. Sin embargo, una misma proteína GEF no puede interactuar con todos los miembros dentro de la familia ROP, aun cuando están muy conservadas. Esto se debe a las diferencias en el dominio PRONE que, aunque está presente en las GEFs no está altamente conservado y tales variaciones pueden influir en la interacción con las ROPs. Otra causa de la selectividad entre los miembros de ROPs se debe a la expresión diferencial de las GEFs en diferentes órganos de la planta (Thomas y Berken 2010).

Al analizar la acumulación de transcritos de los miembros de la familia GEF y particularmente de los miembros que forman los complejos más estables con ROP6 (GEF5.1, GEF7 y GEF9) se observó que GEF5.1 y GEF9 se expresan en raíces de *Lotus japonicus* después de tres días de inoculación y en el primordio de nódulos (fig 12). Sin embargo, en el caso de GEF7 su expresión es muy baja, por lo que podemos suponer que este miembro interactúa con ROP6 en otro órgano donde GEF7 se expresa en mayor concentración, teniendo en cuenta que la interacción es en cantidad equimolares.

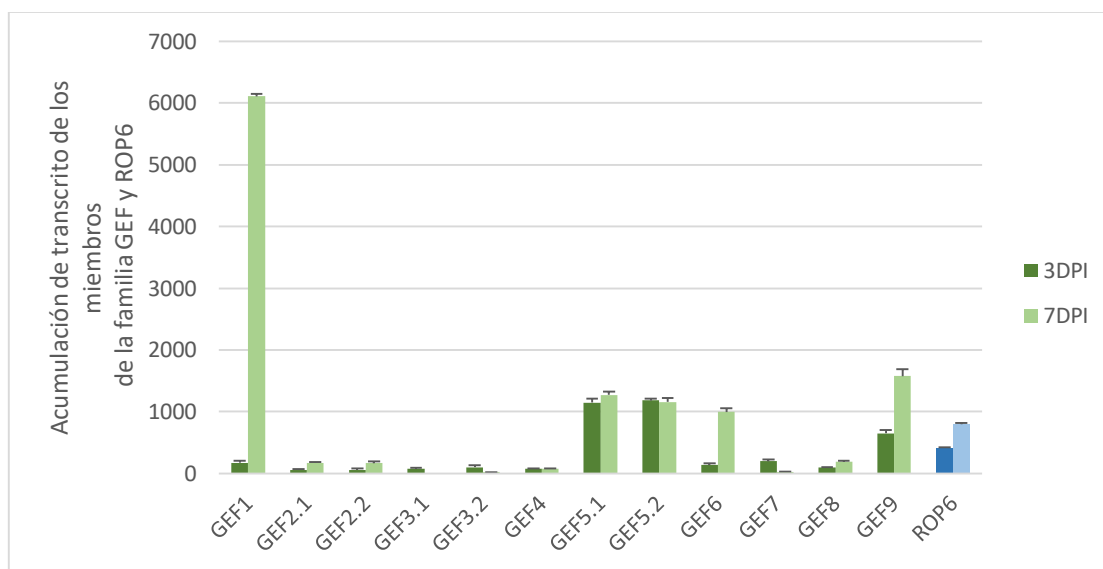


Figura 12: Nivel de expresión del transcrito de los miembros de la familia GDI y de ROP6 en raíces de *Lotus japonicus*. Expresión después de tres días post-inoculación (3DPI) y en primordios de nódulos siete días posteriores a la inoculación (7DPI). Análisis derivado de los datos obtenidos por Kelly *et al*, (2018).

6.4.2 Interacciones ROP6-GAPs

En el caso de los miembros de la familia GAP los valores de energía de los complejos estaban en el rango de -14.1 a -7.7 kcal mol⁻¹ y las constantes de disociación entre 4.8*10⁻¹¹ a 2.2*10⁻⁶ M (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de energía libre de Gibbs (ΔG) y constante de disociación (Kd) para los complejos ROP6-GTP-GAPs.

| | ΔG (kcal mol ⁻¹) | Kd (M) at 25.0 °C |
|--------|--------------------------------------|------------------------|
| GAP1.1 | -11.2 | 6.40*10 ⁻⁰⁹ |
| GAP1.2 | -7.7 | 2.20*10 ⁻⁰⁶ |
| GAP2 | -14.1 | 4.80*10 ⁻¹¹ |
| GAP3 | -9.4 | 1.40*10 ⁻⁰⁷ |
| GAP4.1 | -12.2 | 1.10*10 ⁻⁰⁹ |
| GAP4.2 | -12.8 | 4.40*10 ⁻¹⁰ |
| GAP5 | -13.9 | 6.7*10 ⁻¹¹ |
| GAP6 | -9.1 | 2.10*10 ⁻⁰⁷ |
| GAP7 | -9.2 | 1.70*10 ⁻⁰⁷ |
| GAP8 | -12.7 | 4.80*10 ⁻¹⁰ |

Basados en la energía libre de Gibbs y en la constante de disociación de los complejos, se realizó un análisis de conglomerado y se determinó la formación de cinco grupos con una identidad del 70% (fig 13). En el grupo 2 se agruparon los miembros ROP6-GTP-GAP2 y ROP6-GTP-GAP5 cuyos complejos son los más favorecidos energéticamente. En el grupo 4 quedó ubicado el complejo ROP6-GTP-GAP1.2, que constituye el complejo menos favorable. El resto de los complejos quedaron ubicados en los grupos 1, 3 y 5, estos complejos presentaron valores de ΔG y Kd intermedios donde el orden de estabilidad de los complejos quedaría grupo3>grupo1>grupo5.

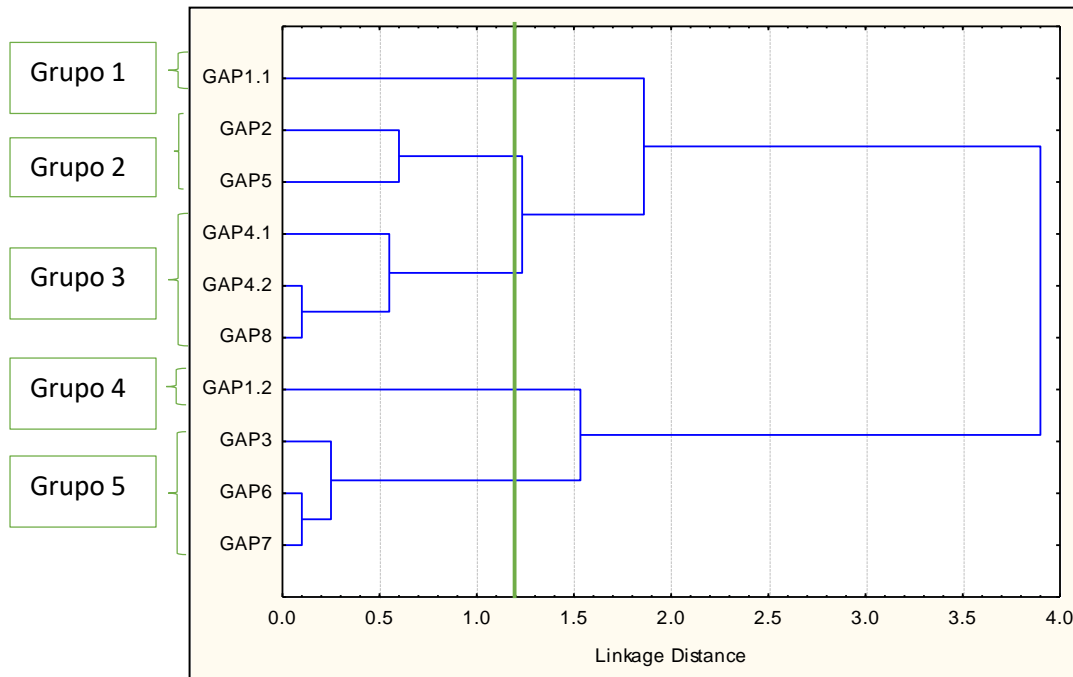


Figura 13: Análisis de conglomerado para agrupar los miembros de la familia GAP según su probabilidad de interacción con ROP6. La línea verde indica la distancia a la cual se realizó el corte (70%) para la formación de grupos. Para esta distancia se forman 5 grupos con un nivel de confianza de 100%.

Al analizar los sitios de interacción entre ROP6 y GAP2 y entre ROP6 y GAP5, observamos que ROP6 interactúa con la región switch I, switch II, $\alpha 3$ y la región de inserción (fig 14). Estos sitios coinciden con los reportados por Dvorsky y Ahmadian (2004) para la interacción de ROP6 con GAP.

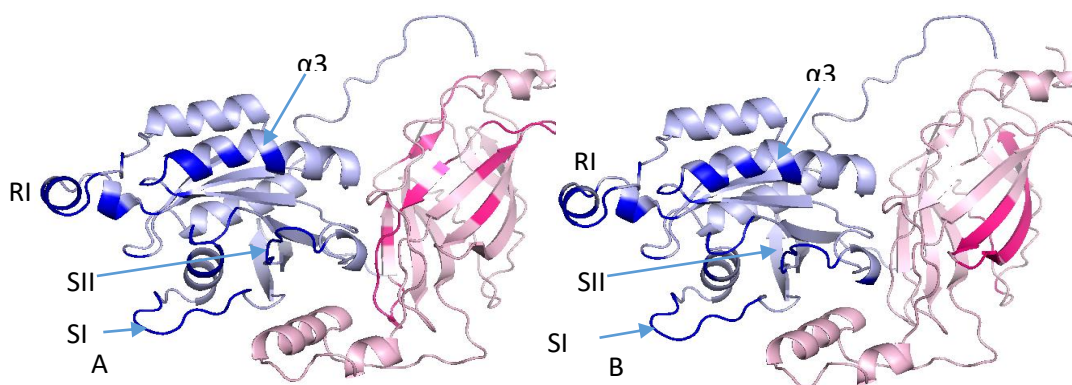


Figura 14: Complejos ROP6-GTP-GAP. Complejo ROP6-GTP-GAP2 (A), ROP6-GTP-GAP5 (B) En azul se encuentra representado ROP6 y en rosa GAP2 y GAP5. Los residuos de interacción se encuentran resaltados en azul oscuro para el caso de ROP6 y en rosa oscuro en el caso de las GEFs. SI: switch I, SII: switch II, RI: región de inserción.

Al analizar la acumulación de transcritos para los miembros de GAP en raíces de *Lotus japonicus* después de tres días de la inoculación y en primordios de nódulos, se observó que la proteína GAP3 es el miembro que más se expresa en raíces de *Lotus japonicus* a 3DPI (fig 15) y en primordio de nódulo. Sin embargo, esta proteína forma un complejo con ROP6 energéticamente menos favorecido en comparación con los complejos agrupados en el grupo 2, esto no anula la posibilidad de que estas proteínas interactúen en determinadas condiciones de la planta, aunque también existe la probabilidad de que sea un interactor de otro de los miembros de la familia ROP. Los candidatos que forman los complejos más estables con ROP6 (GAP2 y GAP5) se encuentran expresados en raíces de *Lotus japonicus* a 3DPI y a 7DPI, lo que sustenta el hecho que en raíz y ante estas condiciones estas proteínas pudieran interactuar con ROP6 para regular su actividad.

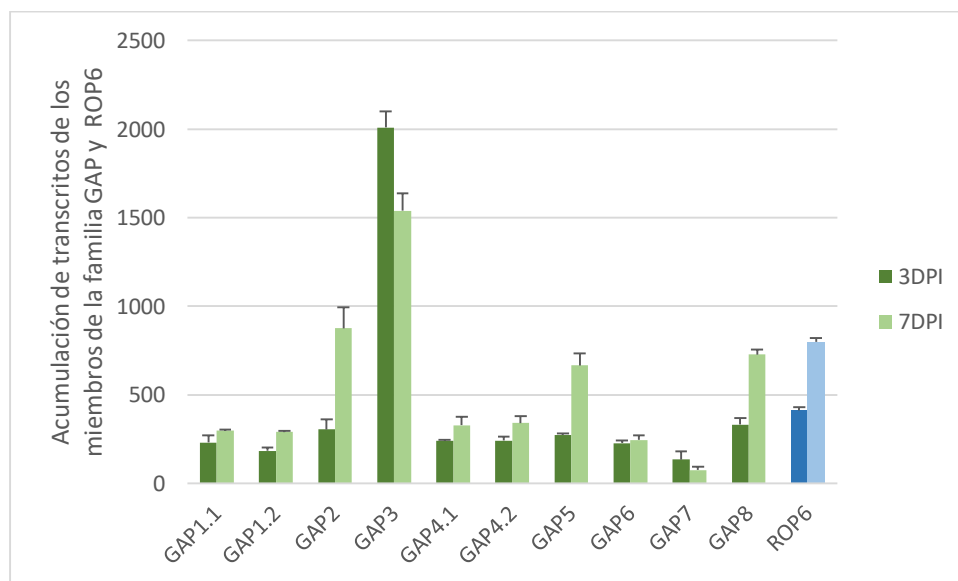


Figura 15: Nivel de expresión del transcrito de los miembros de la familia GAP y de ROP6 en raíces de *Lotus japonicus*. Expresión después de tres días post-inoculación (3DPI) y en primordios de nódulos siete días posteriores a la inoculación (7DPI). Análisis derivado de los datos obtenidos por (Kelly *et al*, 2018)

6.4.3 Interacciones ROP6-GDIs

En el caso de los miembros de la familia GDI los valores de energía de los complejos se calcularon en el rango de -15.1 a -11.1 kcal mol⁻¹ y las constantes de disociación entre 9.0*10⁻¹² a 7.5*10⁻⁹ M (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de energía libre de Gibbs (ΔG) y constante de disociación (K_d) para los complejos ROP6-GDP-GDIs.

| | ΔG (kcal mol ⁻¹) | K_d (M) a 25.0 °C |
|------|--------------------------------------|-----------------------|
| GDI1 | -15.1 | 9.0*10 ⁻¹² |
| GDI2 | -12.6 | 6.1*10 ⁻¹⁰ |
| GDI3 | -11.5 | 5.7*10 ⁻⁹ |
| GDI4 | -11.1 | 7.5*10 ⁻⁹ |

Para determinar las diferencias entre los complejos, se realizó un análisis de conglomerado y factorial discriminante basados en la energía libre de Gibbs y en la constante de disociación de los complejos. Teniendo en cuenta el análisis de conglomerado se observó la formación de tres posibles grupos con una identidad de un 70% (fig. 16). El grupo 1 quedó integrado por el complejo ROP6-GDI1 que resultó ser el complejo más favorable energéticamente, por lo que podemos suponer que dentro de toda la familia GDI, la proteína GDI1 va a interactuar con mayor probabilidad con ROP6 que el resto de los miembros. El grupo 2 quedó integrado por el complejo ROP6-GDI2, teniendo en cuenta el valor de energía libre podemos asumir que los complejos agrupados dentro de este grupo tienen una estabilidad intermedia. El tercer grupo quedó formado por los complejos ROP6-GDI3 y ROP6-GDI4, en este grupo se agruparon los complejos de mayor energía y por tanto menos favorecidos, por lo que estos miembros son los que pudieran interactuar con ROP6 con menor probabilidad.

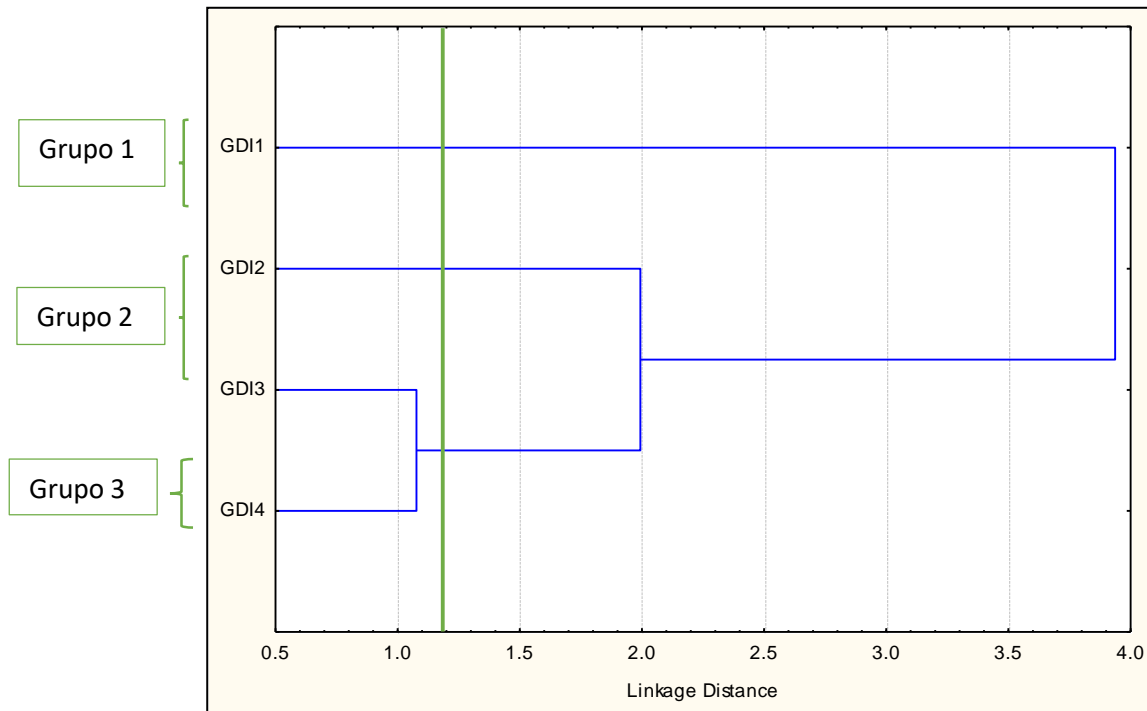


Figura 16: Análisis de conglomerado para agrupar los miembros de la familia GDI según su probabilidad de interacción con ROP6. La línea verde indica la distancia a la cual se realizó el corte (70%) para la formación de grupos. Para esta distancia se forman 3 grupos con un nivel de confianza de 100%.

Estos resultados no indican que los miembros del grupo 3 no puedan interactuar con ROP6, es probable que ante diferentes condiciones de la planta los miembros con menor probabilidad de interacción, interactúen con ROP6 o tal vez estos sean interactores de otros de los miembros de la familia ROP.

Al analizar el complejo ROP6-GDP-GDI1 observamos que los sitios de interacción concuerdan con los sitios informados en la literatura (fig 17).

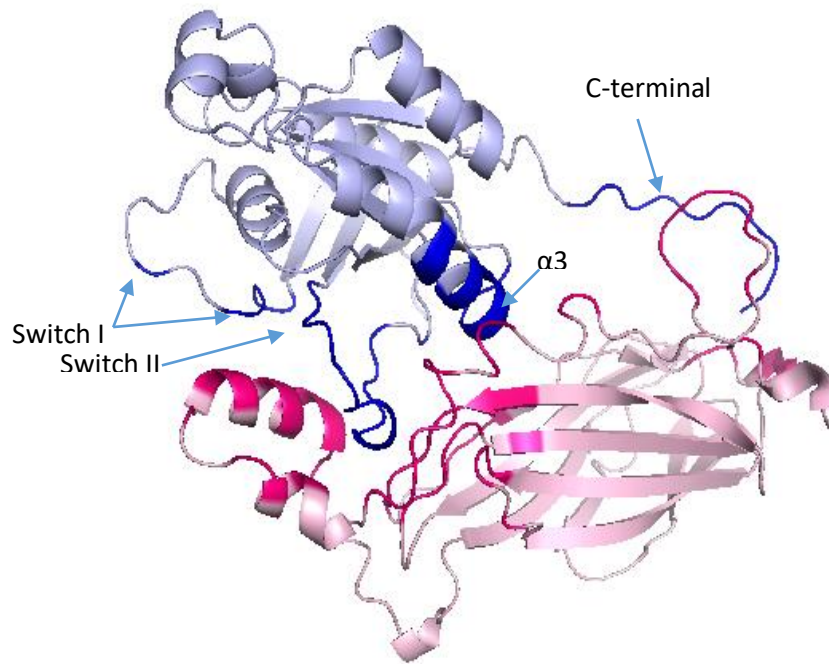


Figura 17: Complejo ROP6-GDP-GDI1. En azul se encuentra representado ROP6 y en rosa GDI1. Los residuos de interacción se encuentran resaltados en azul oscuro para el caso de ROP6 y en rosa oscuro en el caso de GDI.

Dvorsky y Ahmadian (2004) resumieron los residuos aminoacídicos de ROP por los cuales ocurriría interacción con las proteínas GDI, estos sitios son la región Switch I, la región Switch II, la región $\alpha 3$ y el C-terminal, estos resultados coinciden con los obtenidos en el complejo ROP6-GDP-GDI1. El extremo C-terminal contiene la secuencia consenso CaaX para el caso de ROP6 que es una ROP tipo I. Por este sitio ocurre una prenilación que se va a insertar dentro de un bolsillo hidrofóbico en la estructura de las GDI y de esta manera las ROPs se quedan secuestradas en el citosol. Por otra parte, el dominio RA de las proteínas GDI (α hélice resaltada en rosa oscuro en la figura 17) interactúa con las regiones switch I y switch II para evitar la hidrólisis del GTP o la remoción del GDP de las ROPs y así inhibir su actividad (Kost, 2010).

Al analizar la acumulación de transcritos para los miembros de GDI en raíces de *Lotus japonicus* a tres días post inoculación y en primordios de nódulos se observó que la proteína GDI1 es el miembro que más se expresa en raíces de *Lotus japonicus* a 3DPI (fig 18), sin embargo, en primordio de nódulo cae

drásticamente la acumulación de transcrito y se dispara la acumulación de *gdi2*. Estos resultados pudieran indicar que GDI1 interactúa con ROP6 en raíces de *L. japonicus* a 3DPI, pero en primordios de nódulos el interactor de ROP6 puede cambiar e interactuar con GDI2, que quedaba en el grupo de complejos ROP6-GDIs de estabilidad intermedia.

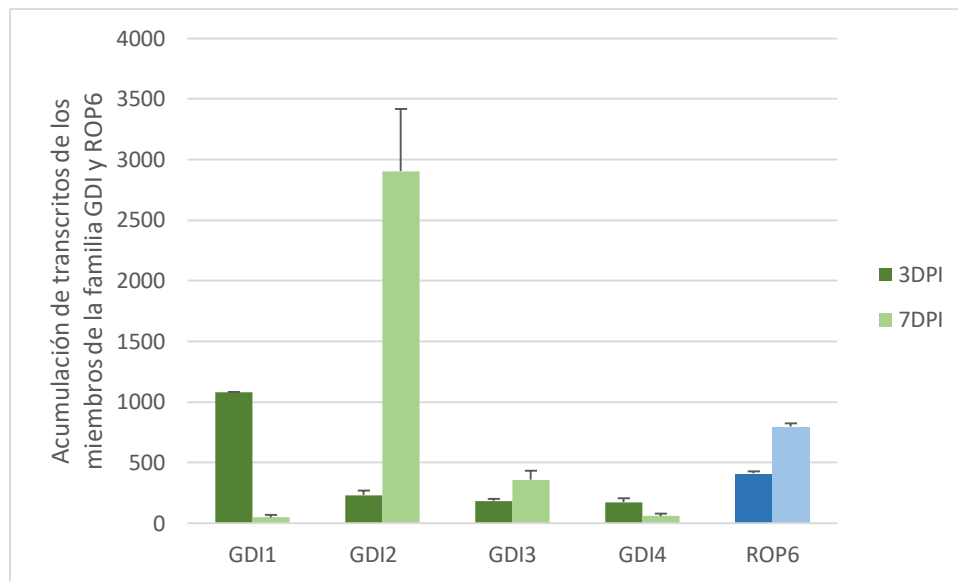


Figura 18: Nivel de expresión del transcrito de los miembros de la familia GDI y de ROP6 en raíces de *Lotus japonicus*. Expresión después de tres días post-inoculación (3DPI) y en primordios de nódulos siete días posteriores a la inoculación (7DPI). Análisis derivado de los datos obtenidos por (Kelly *et al*, 2018)

Existen diferentes técnicas que permiten el estudio de interacciones proteína-proteína, estas técnicas están desarrolladas para su utilización *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas, por lo que un estudio profundo de interacción proteína-proteína sería completo aplicando varias técnicas. En este estudio se aplicaron técnicas *in silico* que permitieron predecir cuales son los posibles interactores, dentro los miembros de las familias de proteínas reguladoras GEF, GAP y GDI, con la proteína ROP6. Estos resultados unidos a los datos de coexpresión de ROP6 con los miembros de cada familia, constituyeron los primeros pasos para la determinación del interactoma de ROP6 en el contexto de la endosimbiosis bacteriana. No obstante, estos miembros tienen que ser confirmados mediante otros ensayos. Una alternativa es usar el doble híbrido en levaduras para confirmar dichas interacciones, de esta manera

se podrían confirmar los resultados obtenidos *in silico* con una estrategia *in vitro*, en un sistema heterólogo.

VII Conclusiones

- La modelización computacional por homología de las versiones etiquetadas de ROP6, nos permitió predecir que la etiqueta FLAG, no afecta el plegamiento de las proteínas,
- La versión de ROP6 etiquetada en el bucle (ROP6NB) es la alternativa más adecuada para el ensayo pull down al ser la más similar a la estructura nativa y exponerse en su estructura.
- La detección de ROP6NB expresada en raíces de *Lotus japonicus* bajo su promotor endógeno y bajo el promotor 35S no fue posible de replicar mediante Western blot debido a la poca abundancia de la proteína.
- En *Lotus japonicus* se identificaron nueve genes que codifican para proteínas GEF, ocho genes que codifican para proteínas GAP y cuatro genes que codifican para GDI.
- La proteína ROP6 puede formar los complejos más estables con tres miembros de la subfamilia GEF (GEF5.1, GEF7 y GEF9), con dos miembros de la subfamilia GAP (GAP2 y GAP5) y con 1 miembro de la subfamilia GDI (GDI2).
- Los miembros de GEF, GAP y GDI, que potencialmente interactúan con ROP6 se coexpresan con ROP6 en raíces de *Lotus japonicus* tres días posteriores a la inoculación y en el primordio de nódulos.

VIII Perspectivas

- Comprobar las interacciones predichas de ROP6 con los miembros de GEF, GAP y GDI mediante ensayos de doble híbrido en levaduras.
- Generar controles positivos para la detección de la etiqueta y para la comprobación de exposición de la misma en la estructura de la proteína.
- Expresar la proteína ROP6 etiquetada empleando un sistema heterólogo.

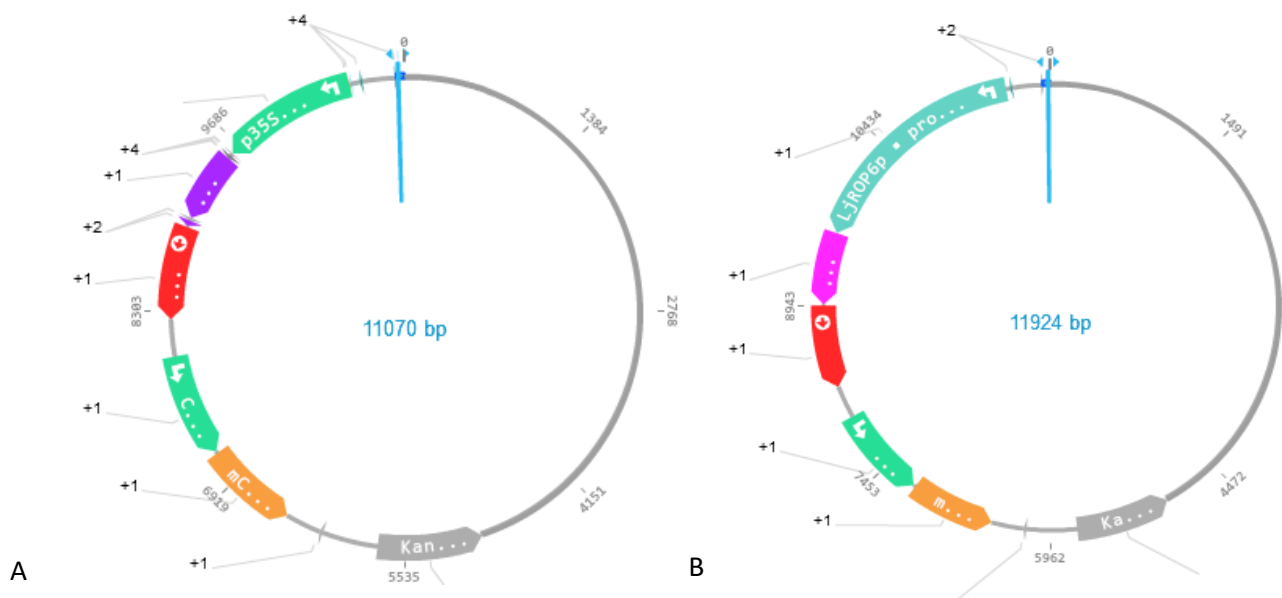
IX Bibliografía

1. Beatty P. and Good A. (2011). Future Prospects for Cereals That Fix Nitrogen. *Science* 333 (6041), 416-417
2. Berken A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2446–2459
3. Bishop and Hall. (2000). *Rho GTPases and their effector proteins* *Biochem. J.* 348, 241±255 .
4. Blanco FA, Meschini EP, Zanetti ME, Aguilar OM. A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-Rhizobium symbiotic association. *Plant Cell* 2009; 21:2797-810.
5. Broughton, W., & Dilworth, M. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*, 125 (4), 1075– 1080.
6. Dalal J. Yalamanchili R., La Hovary C., Ji M., Rodriguez-Welsh M., Aslett D., Ganapathy S., Grunden A., Sederoff H., Qu R. (2015). A novel gateway-compatible binary vector series (PC-GW) for flexible cloning of multiple genes for genetic transformation of plants *Plasmid* Volume 81, September 2015, Pages 55-62
7. Desbrosses G., Kopka J., y Udvardi M. (2005) Lotus japonicus Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for the Study of Plant-Microbe Interactions. *Plant Physiology*, Vol. 137, pp. 1302–1318
8. Dvorsky, R. and M.R. Ahmadian. (2004). Always look on the bright side of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* 5(12): p. 1130-6.
9. Feiguelman G., Fu Y., Yalovsky S. (2017). ROP GTPases structure-function and signaling pathways. Published by www.plantphysiol.org Copyright © 2017 American Society of Plant Biologists. DOI:10.1104/pp.17.01415.
10. Ke, D., *et al.* (2016). "ROP6 is involved in root hair deformation induced by Nod factors in Lotus japonicus." *Plant Physiol Biochem* 108: 488-498.

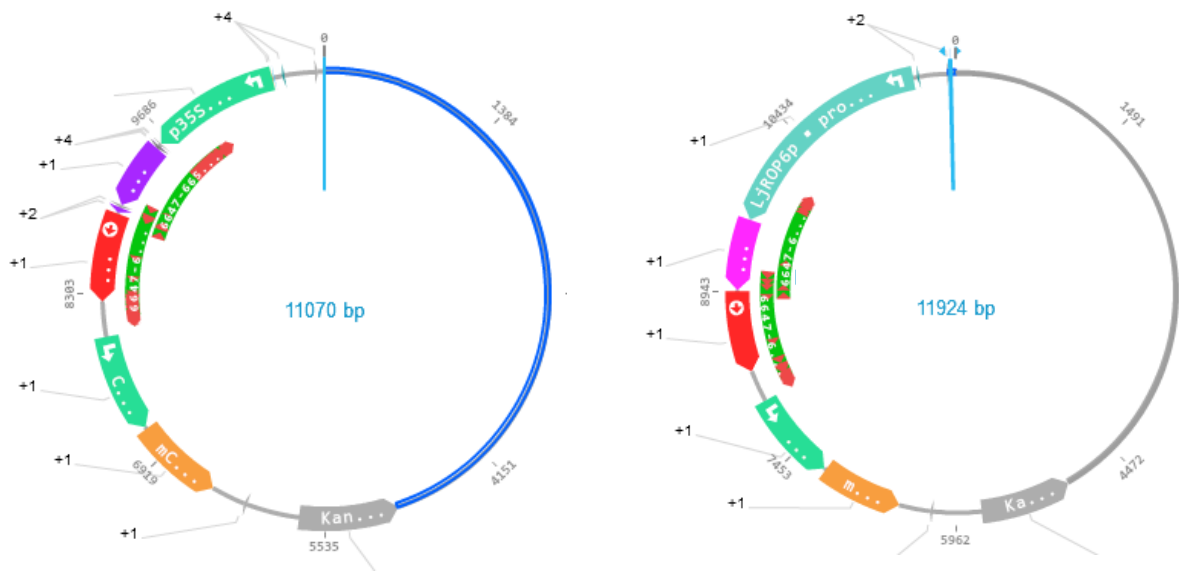
11. Kost B. 2010. Regulatory and cellular functions of plant RhoGAPs and RhoGDIs. In: Yalovsky S, Baluska F, Jones A, eds. Integrated G protein signaling in plants. Berlin: Springer Verlag, 27–48.
12. Lei M. J., Wang Q., Li X., Chen A., Luo L., Xie Y., Li G., Luo D., Mysore K., Wen J., Xie Z., Staehelin C., Wang y. (2015) The Small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* Is Required for Both Tip Growth of Root Hairs and Nod Factor-Induced Root Hair Deformation. *The Plant Cell*, Vol. 27: 806–822
13. Libault, M., *et al.*, Soybean root hairs: a valuable system to investigate plant biology at the cellular level. *Plant Signal Behav*, 2010. 5(4): p. 419-21.
14. Liu W., Chen A.M., Luo L., Sun J., Cao L.P., Yu G.Q., Zhu J.B., Wang Y.Z. (2010). Characterization and expression analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase family during the early stage of symbiosis. *J Integr Plant Biol*. Vol 52(7):639-52.
15. Oldroyd, G.E. and R. Dixon, *Biotechnological solutions to the nitrogen problem*. *Curr Opin Biotechnol*, 2014. 26: p. 19-24.
16. Rivero, C., *et al.* (2017). "Small GTPases in plant biotic interactions." Small GTPases: 1-11.
17. Qiao, Z. and M. Libault, Unleashing the potential of the root hair cell as a single plant cell type model in root systems biology. *Front Plant Sci*, 2013. 4: p. 484
18. Sauer M. (2014). MTV1 Pull-down Assay in *Arabidopsis*. Vol 4, Iss 12, June 20, 2014
19. Sormo C., Leiros I., Brembu T., Winge P., Os V., Bones A. (2006). The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* RAC7/ROP9: The first RAS superfamily GTPase from the plant kingdom. *Phytochemistry* vol. 67. 2332-2340.
20. Stephan O., Cottier S., Fahlén S., Montes-Rodriguez A., Magnus Eklund S., Klahre U., Kosta B. (2014). RISAP Is a TGN-Associated RAC5 Effector Regulating Membrane Traffic during Polar Cell Growth in Tobacco. *The Plant Cell*, Vol. 26: 4426–4447
21. Timmers, A.C., (2008). The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *J Microsc*, 231(2): p. 247-56

22. Udvardi M., Brodie E., Riley W., Kaeppler S., Lynch J. (2015). Impacts of agricultural nitrogen on the environment and strategies to reduce these impacts. *Procedia Environmental Sciences* 29: 303
23. Verdier J., Torres-Jerez I., Wang Y., Andriankaja A., Allen S., He J., Tang J., Murray J. y Udvardi M.(2013). Establishment of the Lotus japonicus Gene Expression Atlas (LjGEA) and its use to explore legume seed maturation. . *The Plant Journal* vol. 74, 351–362 doi: 10.1111/tpj.12119
24. Wu G., Li H., y Yang Z. (2000). Arabidopsis RopGAPs Are a Novel Family of RhoGTPase-Activating Proteins that Require the Cdc42/Rac-Interactive Binding Motif for Rop-Specific GTPase Stimulation. *Plant Physiology*. Vol. 124, pp 1626-1636.
25. Yalovsky, S. (2015) Protein lipid modifications and the regulation of ROP GTPase Function. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erv057
26. Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*,. 14 Suppl: p. S375-88.
27. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40 (2008)
28. Zgadzaja R., Garrido-Otera R., Jensen D., Koprivovad A., Schulze-Leferta P., Radutoiu S. (2016). Root nodule symbiosis in Lotus japonicus drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *PNAS*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1616564113
29. Zipfel C., Oldroyd GE. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity *Nature*. Vol 15;543(7645):328-336. doi: 10.1038/nature22009.
30. Thomas C. y Berken A. (2010) Structure and Function of ROPs and their GEFs. In: Yalovsky S, Baluska F, Jones A, eds. *Integrated G protein signaling in plants*. Berlin: Springer Verlag, 58-65.

Anexos



Vectores mcherry_p35SROP6NB (A) y pGW mcherry_pLjROP6ROP6NB (B).



Secuenciación de los vectores mcherry_p35SROP6NB (A) y pGW mcherry_pLjROP6ROP6NB (B).