



**“Dilucidación de una cascada de señalización de MAPK cinasas que participa en el desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* “**

Alumno:

Jesús Salvador López Bucio

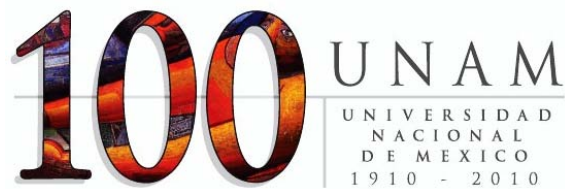
Comité tutorial:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz, Fac. Química-UNAM

Dr. Joseph Dubrovsky, IBT-UNAM

Asesor:

Dr. Ángel Arturo Guevara García.



Cuernavaca Morelos, octubre 2011.



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.

<b>I.-</b>	<b>ÍNDICE.</b>	
I.	ÍNDICE.	2
II.	TABLAS Y FIGURAS.	4
III.	RESUMEN.	6
1.	INTRODUCCIÓN.	8
1.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.	8
1.2.	Embriogénesis ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ).	9
1.3.	La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	12
1.3.1.	Las raíces laterales.	14
1.3.2.	Los pelos radicales.	17
1.4.	Sistemas de transducción de señales.	18
1.5.	Proteínas con función cinasa y MAPKs ( <u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inases).	21
1.6.	Interacciones macromoleculares.	25
1.7.	Interacción proteína-proteína.	26
1.8.	BiFC.	27
2.	ANTECEDENTES.	28
3.	HIPÓTESIS.	34
4.	OBJETIVOS.	34
4.1.	Objetivo general.	34
4.2.	Objetivos específicos.	34
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.	35
5.1.	Material vegetal.	35
5.2.	Genotipificación y análisis de desarrollo <i>in vitro</i> .	35
5.3.	Clonación de los genes <i>MPKK1</i> , <i>MPKK4</i> , <i>MPKK5</i> , <i>MPKK9</i> , <i>MPKKK1</i> y <i>MPKKK4</i> .	36
5.3.1.	Obtención de DNAs y cDNAs.	37
5.3.2.	Clonación en el vector pENTR™D-TOPO.	38
5.3.3.	Transformación en células electrocompetentes DH5α de <i>E. coli</i> .	38
5.3.4.	Movilización de genes del vector de entrada	

a vectores destino.	39
5.4. Sobreexpresión de proteínas en la cepa BL21 de <i>E. coli</i> .	40
5.4.1. Purificación de proteínas.	41
5.4.2. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .	42
5.5. Ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia.	42
5.5.1. Obtención de protoplastos de <i>N. benthamiana</i> .	43
5.6. Extracción de RNA.	44
5.7. Extracción de DNA.	45
6. RESULTADOS.	46
6.1. Objetivo específico 1.	46
6.2. Objetivos específicos 2 y 3.	50
7. DISCUSIÓN.	57
7.1. La cinasa MPK6 participa en el desarrollo del embrión y del sistema radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	58
7.2. La mutante <i>mpkkk4</i> tiene fenotipos de semilla y de desarrollo del sistema radical similares a la mutante <i>mpk6</i> .	60
7.3. Las mutantes <i>mpkk5</i> y <i>mpkk9</i> tienen fenotipos de semilla y/o raíz similares a la mutante <i>mpk6</i> .	61
7.4. Las MPKKs MPKK5, MPKK9 y MPKK4 interactúan con MPK6 <i>in planta</i> .	63
7.5. MPKKK4 ( <i>yoda</i> ), MPKK5 y MPKK9 participan río arriba de MPK6 regulando el desarrollo del embrión y del sistema radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	65
8. CONCLUSIONES.	66
9. BIBLIOGRAFÍA.	68
10. APÉNDICE I (Soluciones y reactivos).	77
11. APÉNDICE II (Figuras suplementarias).	82
12. APÉNDICE III (Secuencias de genes utilizados).	83

## II.- TABLAS Y FIGURAS.

<b>Tabla1.</b> Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR.	37
<b>Figura 1.</b> Etapas del desarrollo del embrión de <i>Arabidopsis</i> .	11
<b>Figura 2.</b> Esquema de la organización celular de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	14
<b>Figura 3.</b> Cambios morfológicos durante el proceso de formación y desarrollo de raíces laterales.	15
<b>Figura 4.</b> Mecanismos moleculares que median el inicio de raíces laterales.	16
<b>Figura 5.</b> Esquema general de una ruta de transducción de señales.	20
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de fosforilación/defosforilación de proteínas.	21
<b>Figura 7.</b> Elementos de una cascada de señalización de MAPKs.	23
<b>Figura 8.</b> Interacción proteína-proteína por complementación de la fluorescencia.	27
<b>Figura 9.</b> Fenotipos de semillas de la línea mutante <i>mpk6</i> .	30
<b>Figura 10.</b> Análisis del sistema radical de plántulas de la mutante <i>mpk6</i> .	31
<b>Figura 11.</b> Fenotipo de pelos radicales de la mutante <i>mpk6</i> .	32
<b>Figura 12.</b> Fenotipos de la raíz de plántulas provenientes de semillas explotadas, deformes y normales.	33
<b>Figura 13.</b> Fenotipos de la tercera generación de las semillas de mutantes del banco de SALK y la mutante <i>ctr1</i> .	46
<b>Figura 14.</b> Fenotipos de semillas de la mutante <i>mpkkk4 (yoda)</i> .	47
<b>Figura 15.</b> Fenotipos de la raíz de plántulas provenientes de embriones explotados de las mutantes <i>mpk6</i> y <i>mpkkk4 (yoda)</i> .	47
<b>Figura 16.</b> Fenotipos de los pelos radicales de plántulas provenientes de semillas explotadas de la mutante <i>yoda</i> (zona meristemática).	48
<b>Figura 17.</b> Cuantificación del crecimiento de la raíz primaria de la mutante <i>mpkkk4 (yoda)</i> (semillas deformes).	48
<b>Figura 18.</b> Fenotipos y cuantificación del crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales de plántulas provenientes de semillas normales de las mutantes <i>mpk6</i> y <i>mpkk5</i> .	49
<b>Figura 19.</b> Análisis del sistema radical de las mutantes <i>mpkk4</i>	

y <i>mpkkk1</i> ( <i>arakin</i> ).	50
<b>Figura 20.</b> Clonación de genes en el vector pDEST17.	51
<b>Figura 21.</b> Inducción de la expresión de proteínas en bacterias.	51
<b>Figura 22.</b> Extracción de proteínas e identificación de la proteína MPK6.	52
<b>Figura 23.</b> Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .	53
<b>Figura 24.</b> Clonación de genes en los vectores pSPYNE y pSPYCE para ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).	54
<b>Figura 25.</b> Ensayo de BiFC para determinar interacciones proteicas <i>in planta</i> .	55
<b>Figura 26.</b> Ensayo de BiFC para determinar interacciones proteicas <i>in planta</i> .	55
<b>Figura 27.</b> Evolución del Modelo que describe los componentes de la cascada de MAP cinasas que participa en el desarrollo del embrión y del sistema radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	67
<b>Figura a1.</b> Amplificación de los genes <i>YODA</i> y <i>ARAKIN</i> por PCR para su subclonación en el vector destino pSPYNE.	82
<b>Figura a2.</b> Vector de entrada pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO 2580 bp del sistema Gateway.	82
<b>Figura a2.</b> Fenotipos de semillas de mutantes de la familia MPKK ( <i>mpkk5</i> y <i>mpkk9</i> ).	83

### III.- RESUMEN.

En las plantas al igual que en otros organismos eucariontes, la forma de responder ante diversos estímulos extracelulares ocurre mediante la activación de cascadas de señalización intracelular en las que participan enzimas del tipo cinasas. Las MAPKs (por “Mitogen Activated Protein Kinases”) son proteínas con función de cinasa cuya participación en vías de transducción de señales en los organismos eucariontes les permite modular diversos procesos vitales, incluyendo la división y la diferenciación celular, así como respuestas a diversos estímulos intra y extracelulares. Un módulo de MAPKs funciona mediante eventos de fosforilación secuencial iniciando en una MPKKK que activa a una MPKK que a su vez fosforila a la última cinasa del módulo (MPK), la cual puede fosforilar a diferentes sustratos como proteínas de tipo cinasa, fosfatasa y lipasa e incluso factores de transcripción, conduciendo a respuestas celulares específicas que afectan el metabolismo o la expresión genética y de esta manera controlar diversos procesos celulares (MAPK group, 2002). En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado 90 MAPKs de las cuales 60 corresponden a la familia de las MPKKKs, 10 a la familia de las MPKKs y 20 a la de las MPKs. La redundancia funcional es común entre las MAPKs en distintos niveles del módulo (Bush y Krisan 2007), sin embargo, se ha reportado que la mutación de una MPK (*mpk6*) resulta en defectos en el desarrollo del embrión (embriones explotados o “burst”) y en el desarrollo del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (Bush & Krysan, 2007; Müller *et al*, 2010) este dato indica que al menos en estos procesos de desarrollo la función de la MPK6 no puede ser reemplazada por alguna otra MPK.

En este trabajo, además del fenotipo de embriones/semillas explotados que previamente se ha descrito para la mutante *mpk6*, se describen otros dos fenotipos que consisten en embriones/semillas deformes y embriones/semillas normales. Además estos están estrechamente relacionados a fenotipos de desarrollo del sistema radical y corresponden a un fenómeno de penetrancia y expresividad (Griffiths *et al.*, 2000). Las plántulas provenientes de embriones/semillas explotados no desarrollan raíz primaria, mientras que las

plántulas provenientes de embriones/semillas deformes tienen una raíz primaria corta y mayor densidad de raíces laterales y las plántulas provenientes de embriones/semillas normales tienen una raíz más larga y una mayor densidad de raíces laterales.

Además de buscar los componentes río arriba de la MPK6 que conforman un módulo de MAP cinasas involucrado en los programas de desarrollo del embrión y la raíz, también se emplearon estrategias genéticas basadas en la caracterización fenotípica de diferentes mutantes de MAPKs. Finalmente también se utilizaron herramientas moleculares enfocadas a la determinación de la interacción *in vivo* de algunos de los componentes del módulo de cinasas mediante ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC [Kerppola, 2009]). Los resultados obtenidos indican que las MAPKs, MPKKK4 (yoda), MPKK5 y MPKK9, son posibles componentes del módulo de señalización de MAPKs que participan en el desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana*.



## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

*Arabidopsis thaliana* es una planta de la misma familia *Brassicaceae*, en las que se incluye a la coliflor y la mostaza, que aunque no tiene importancia agronómica, destaca como modelo de investigación en genética y biología molecular de plantas.

*A. thaliana* fue descubierta por Johannes Thal en las montañas de Harz en Alemania en el siglo 16 llamándola en ese entonces *Pilosella siliquosa*. El primer reporte de una línea mutante de esta especie fue realizado por A. Braun en 1873. Posteriormente F. Laibach observó el potencial de *Arabidopsis* como organismo modelo para análisis genéticos en 1943 y él mismo determinó que el genoma de esta planta está compuesto de 5 cromosomas. E. Reinholz (estudiante de Laibach) organizó la primera colección de mutantes obtenidas artificialmente en 1945. En la década de 1950 a 1960, Langridge, al igual que J. H. Van der Veen en Holanda, J. Veleminski en Checoslovaquia y G. Röbbelen en Alemania, demostraron la utilidad de este organismo para estudios de laboratorio. G. Redei realizó una contribución importante al organizar el conocimiento existente sobre *Arabidopsis* que le permitió publicar una biblioteca genética (Rédei, 1975).

Las características principales de *Arabidopsis* que han favorecido su utilización como modelo de estudio son: (a) Poseer uno de los genomas más pequeños de los organismos vegetales, el cual ha sido completamente secuenciado y anotado (Nature, 408:796-815; 2000). (b) Tener un ciclo de vida relativamente corto, de entre 6 a 8 semanas desde la germinación hasta la producción de semillas. (c) Presentar un tamaño de individuos maduros de aproximadamente 30 cm, por lo que fácilmente se puede cultivar y manipular en condiciones de laboratorio (Meyerowitz, 1994).

En las últimas tres décadas, *Arabidopsis* ha sido el modelo vegetal por excelencia para el estudio de procesos genéticos, fisiológicos, moleculares y del desarrollo, generándose un vasto conocimiento que puede ser extrapolado a otras especies

vegetales y organismos. Estos estudios han sido favorecidos por la facilidad y alta eficiencia con que esta planta puede ser transformada, lo que ha permitido que actualmente existan colecciones de mutantes creadas por inserción del T-DNA, en las que se han identificado los genes afectados y que pueden ser adquiridas por catálogo, para profundizar en su caracterización fenotípica, molecular y funcional en respuesta a diferentes condiciones experimentales (<http://www.arabidopsis.org>).

## **1.2. Embriogénesis (*Arabidopsis thaliana*).**

En mamíferos el embrión maduro en general constituye la versión en miniatura del organismo adulto. Por el contrario, en plantas durante la embriogénesis se genera sólo un eje central que será morfológicamente similar durante la germinación a la estructura de la plántula, mientras que la morfología de la planta adulta se generará por las actividades de los meristemos apicales. Durante el desarrollo temprano de *Arabidopsis* se pueden predecir una serie de patrones de divisiones celulares (Mansfield y Briarty, 1991). En el inicio de su desarrollo el cigoto aumenta unas tres veces su tamaño inicial y se divide en una célula basal larga y una célula apical corta, esta división es asimétrica, en el sentido de que sus células hijas establecerán linajes con diferentes patrones de crecimiento y diferentes destinos de desarrollo (Scheres y Benfey, 1999). Las células del linaje apical adoptan un patrón de crecimiento isotrópico y forman el proembrión esférico. Por su parte, las células del linaje basal continúan alargándose y se dividen transversalmente produciendo una fila de 7-9 células (Lukowitz *et al.*, 2004).

La última célula del linaje basal (hipófisis) eventualmente se incorpora al embrión y genera una pequeña célula hija en forma de lente que se convertirá en el centro quiescente del meristemo apical de la radícula, otro de los destinos de las células del linaje basal será extra embrionario y formará el suspensor con diversas funciones, como la de posicionar al embrión en desarrollo en el centro de la semilla, generando una ruta de transporte de nutrientes hacia el embrión, también

se le ha implicado en la producción y la distribución de reguladores del desarrollo. El orden de los elementos en el eje apical-basal son: el meristemo apical del brote (SAM, Shoot Apical Meristem), los cotiledones, el hipocotilo, la radícula y el meristemo apical de la raíz (RAM, Root Apical Meristem). Los meristemos primarios del brote y de la raíz son generados como partes integrales de un proceso de señalización que definen un dominio embrionario apical y basal respectivamente (Capron *et al.*, 2009).

Durante el desarrollo del embrión se pueden identificar las siguientes etapas:

A).- Etapa de embrión temprano, que consiste en una sola célula de embrión verdadero (Figura 1A).

B).- Embrión temprano, que consiste en dos células de embrión verdadero (Figura 1B).

C).- Etapa de octante, en la cual se visualizan cuatro de ocho células en dos niveles (Figura 1C).

D).- Etapa de dermatógeno, en la cual se da una división tangencial de cada una de las ocho células de la etapa de octante que producirá células internas y células de protodermo que da origen a la epidermis (Figura 1D).

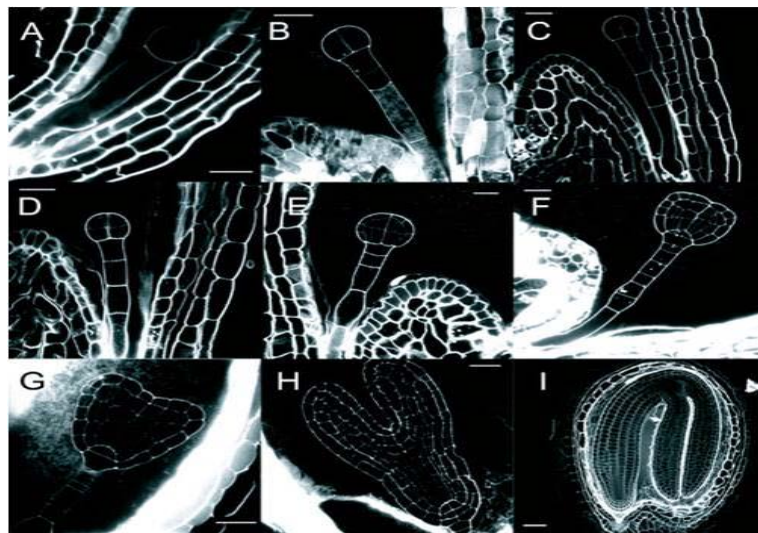
E).- Etapa globular temprana, en la cual se llevan a cabo divisiones de las células internas inmediatamente después de la etapa de dermatógeno y estarán orientadas en una dimensión apical-basal, dotando al embrión morfológicamente en un eje reconocible (Figura 1E).

F).- Etapa triangular, en la cual se puede observar un patrón polarizado en la que la mayoría de los elementos (ejes apical-basal, cotiledones y suspensor) se reconocen. Posteriormente mediante divisiones adicionales se distinguirá a la célula hipofiseal de otras células del suspensor, sus descendientes formaran el centro quiescente del meristemo de la raíz primaria y las células iniciales de la columnela (Figura 1F).

G).- Etapa de corazón, en la que los cotiledones crecen con un desarrollo subsecuente del meristemo apical entre las células que están entre los meristemos en crecimiento (Figura 1G).

H).- Etapa de medio torpeda, en la cual continúa el alargamiento de los cotiledones y del hipocotilo, además comienza a establecerse un patrón radial (Figura 1H).

I).- Etapa de cotiledones doblados, en la cual continúa elaborándose el patrón radial en diferentes órganos, en los cotiledones se puede distinguir una capa de células alargadas subepidermales adaxiales (Células palisadas del mesofilo) y el patrón radial del hipocotilo está compuesto de una sola capa de células epidermales, dos capas de cortex, una capa de endodermis y el cilindro vascular (Capron *et al.*, 2009) [Figura 1I].



**Figura 1.** Etapas del desarrollo del embrión de *Arabidopsis*. A) Etapa de embrión temprano B) Embrión temprano C) Etapa de octante D) Etapa de dermatógeno E) Etapa globular temprana F) Etapa triangular G) Etapa de corazón H) Etapa de medio torpeda I) Etapa de cotiledones doblados. (Imagen tomada de J. Runiors *Arabidopsis* book 2009).

En este trabajo nos referimos a un fenotipo observado en las semillas de la mutante *mpk6* que, como lo reportaron Bush y Krysan (2007), resulta en defectos en el desarrollo del embrión. Interesantemente, el fenotipo de embriones protruidos fuera de la testa de la semilla en la mutante *mpk6* (“burst seeds”), es

prácticamente idéntico al previamente reportado para la mutante *yoda* (Lukowitz *et al.*, 2004), *yoda* muestra defectos en el desarrollo del suspensor durante la embriogénesis que causan que el embrión quede aplastado entre las paredes de la cubierta de la semilla en desarrollo, provocando que el embrión sea expulsado fuera de testa. Como ya se mencionó, el suspensor es una estructura del embrión que lo posiciona en el centro de la semilla (Tomokazu y Goldberg 2009; Capron *et al.*, 2009), de manera que defectos en su desarrollo, como de hecho ocurren en las mutantes *mpk6* y *yoda* (López-Bucio *et al.* en preparación; Lukowitz *et al.*, 2004) impacta directamente el fenotipo de la semilla.

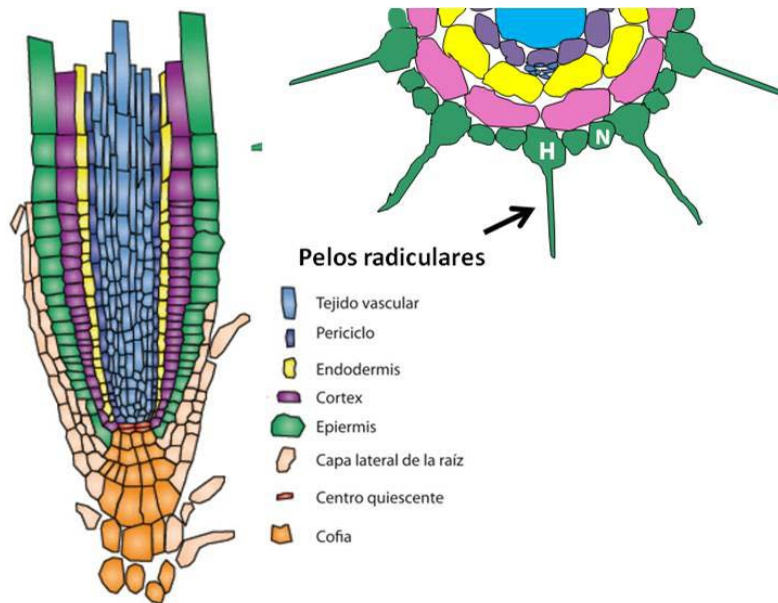
### **1.3. La raíz de *Arabidopsis thaliana*.**

Las plantas han adaptado su desarrollo post-embrionario en función de las señales internas (hormonas) o externas (ambientales). El sistema radical, además de anclar la planta al suelo y establecer relaciones con los microorganismos de la rizósfera, es responsable de adquirir agua y nutrientes. Su desarrollo está controlado por diferentes factores incluyendo la concentración de nutrientes dentro de la planta y en el suelo (López-Bucio *et al.*, 2003). Por lo tanto, las plantas han optimizado su desarrollo en función de las necesidades y son capaces de responder a cambios ambientales, modulando el desarrollo de RL o pelos radicales a lo largo de la raíz primaria.

Desde una perspectiva del desarrollo, la raíz de *Arabidopsis* representa un modelo adecuado y relativamente sencillo para investigaciones sobre procesos morfogénéticos. En este órgano un número pequeño de células madre generan todos los tipos celulares a través de divisiones estereotípicas seguidas de una expansión y diferenciación celular. Debido a que el crecimiento de la raíz es indeterminado, estos procesos son continuos. El crecimiento de la raíz primaria es el resultado de dos procesos: a) proceso de actividad proliferativa que ocurre en el meristemo apical de la raíz (RAM; Root Apical Meristem) y b) proceso de elongación rápida que se lleva a cabo en la zona de elongación, durante estos procesos de crecimiento se producen células en dos direcciones (apical y basal), e

incluye una capa de tejido llamado cofia, que abarca el extremo distal de las raíces. La cofia protege a la punta de la raíz a medida que crece a través del suelo, además percibe y procesa los estímulos ambientales y modula la dirección del crecimiento de la raíz en función de la gravedad (gravitropismo), luz (fototropismo), obstáculos (tigmotropismo), gradientes de temperatura (termotropismo), humedad (hidrotropismo), nutrientes y otras sustancias químicas (quimiotropismo) (Hasenstein y Evans 1988; Ishikawa y Evans 1990; Okada y Shimura, 1990).

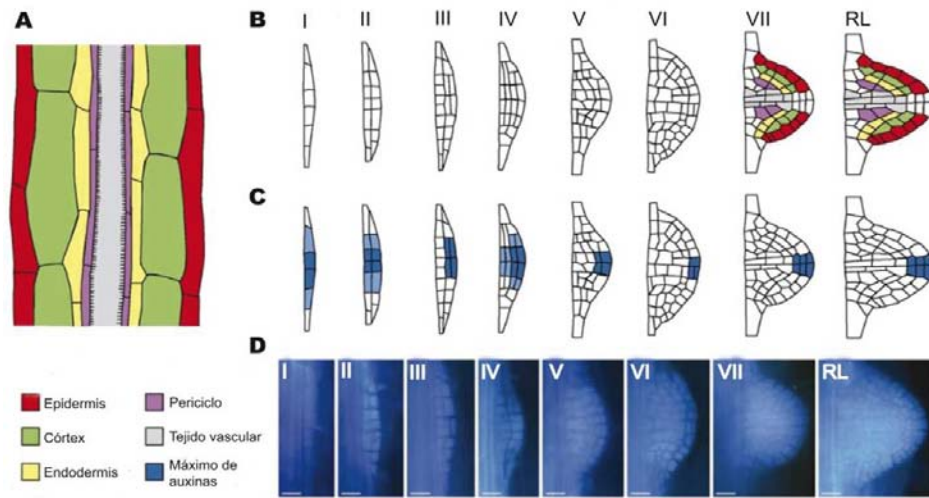
La raíz primaria es una estructura formada por diferentes tejidos, la epidermis, el cortex, la endodermis, y los tejidos provasculares de los cuales el periciclo es el más externo (Figura 2). Las células que forman los diferentes tejidos se producen a partir de cuatro células madre (células iniciales) localizadas en el ápice de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Internamente y en contacto con las células iniciales se encuentran un número pequeño de células llamado centro quiescente (QC, Quiescent Center) [Figura 2]. El centro quiescente presenta poca actividad mitótica, pero su función principal es la de mantener la organización de las células adyacentes. A medida que va creciendo la raíz, la zona de división celular (Zona meristemática) da paso a una fase de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de elongación. Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en su forma y función final, este proceso está evidenciado por la aparición de los pelos radicales, que son extensiones de células epidérmicas especializadas en la captura de agua y nutrientes. Por otra parte, mediante eventos de división celular en el periciclo, se forman las raíces laterales, órganos que incrementan la superficie total de exploración del suelo y contribuyen con un mejor anclaje. A pesar del conocimiento que se tiene de los procesos morfológicos que se llevan a cabo en la raíz, poco se sabe acerca de los mecanismos celulares y moleculares que participan en la regulación del sistema radical de las plantas.



**Figura 2.** Esquema de la organización celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran cortes longitudinal y transversal de la raíz primaria indicándose los diferentes tejidos que la componen (Modificado de Jaillais y Chory, 2010).

### 1.3.1. Las raíces laterales.

La mayor parte del sistema radical está formado por raíces laterales (RL), cuya formación postembrionaria es crucial para el desarrollo de la planta al proporcionarle un sistema radical adecuado. Las raíces laterales son originadas a partir de la raíz primaria y otras raíces. Las RL de *Arabidopsis* se originan longitudinalmente a partir de una o dos células del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2001) y radialmente a partir de tres o cuatro células del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2001) las cuales adquieren atributos de células fundadoras y están localizadas de manera opuesta a los polos del xilema (Dolan *et al.*, 1993; Dubrovsky *et al.*, 2008). Las RL se forman cuando las células fundadoras en el periciclo se dividen, creando una capa de hasta 10 células de igual tamaño (Estado I). Posteriormente, las células se dividen periclinalmente formando una segunda capa celular (Estado II). Más tarde, divisiones anticlinales y periclinales crean un primordio en forma de domo (Estados del III-VII) que eventualmente penetra las diferentes capas celulares de la raíz hasta emerger en forma de raíz lateral (Figura 3) [Malamy y Benfey, 1997; Benková y Bielach, 2010].

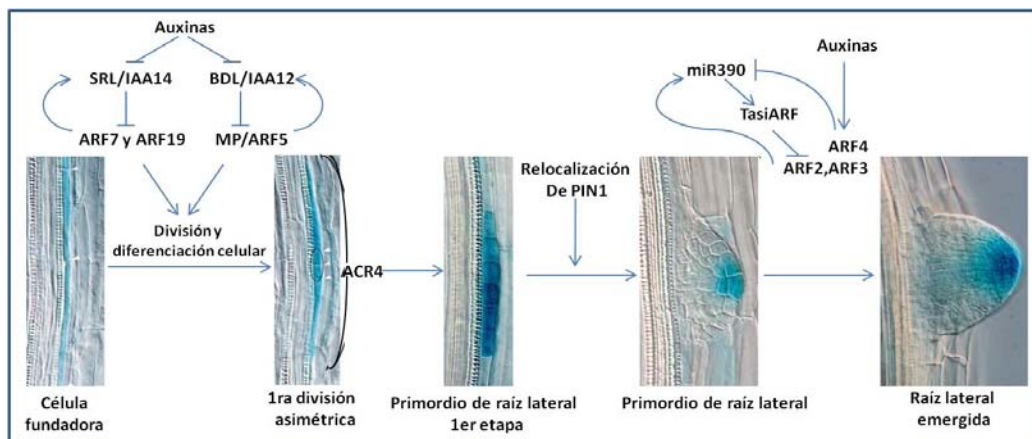


**Figura 3.** Cambios morfológicos durante el proceso de formación y desarrollo de raíces laterales. Las raíces laterales se originan de la raíz primaria a partir de células del periciclo (A). Los siete estados del desarrollo de los primordios de raíces laterales (en números romanos [Malamy y Benfey, 1997]) se muestra en (B) así como el establecimiento de la respuesta máxima a auxinas, demostrado por el marcador *DR5:uidA* (gradiente azul) [C y D]. Las barras de escala representan 20  $\mu\text{m}$  (Modificado de Péret *et al.*, 2009).

Los mecanismos moleculares que median el inicio de raíces laterales son poco conocidos, de éstos destacan la señalización mediada por auxinas de la cual se ha identificado a algunos de los componentes. En trabajos recientes se ha demostrado que la acumulación local de auxinas en las células del periciclo es la señal necesaria y suficiente para reespecificar ciertas células en células fundadoras de raíces laterales, por lo que este regulador puede ser considerado como un disparador morfogénico en la organogénesis de la planta (Dubrovsky *et al.*, 2008). La acumulación de auxinas en las células fundadoras activa la respuesta sucesiva a auxinas en los módulos *IAA14-ARF7* y *ARF19*, y *BDL/IAA12-MP/ARF5* que son factores de respuesta a auxinas que regulan positiva (*ARF7-ARF19*, *MP/ARF5*) y negativamente (*SRL/IAA14*, *BDL/IAA12*) la división celular que conduce a la iniciación de raíces laterales (Benková y Bielach, 2010) [Figura 4]. Adicionalmente, se ha identificado un receptor de tipo cinasa (ACR4) que ha sido descrito como uno de los genes que inducen la iniciación de raíces laterales, la pérdida de función de este receptor membranal conduce a una división celular incrementada de células del periciclo, y en consecuencia, a una



formación de primordios fusionados o producción de primordios con localizaciones ectópicas (De Smet *et al.*, 2008; Benková y Bielach, 2010). ACR4 entonces parece actuar de manera autónoma-celular y de manera no autónoma-celular. En la manera autónoma-celular puede ser requerido para la especificación correcta del primordio de raíz lateral, mientras que de manera no autónoma-celular, parece antagonizar el inicio de raíces laterales en células del periciclo vecinas (De Smet *et al.*, 2008; Benková y Bielach, 2010) [Figura 4]. Además, se ha encontrado que la distribución de auxinas coordina la división y diferenciación celular en la organogénesis de primordios de raíces laterales, ya que el transportador de auxinas de localización membranal PIN1 realocaliza el tránsito de auxinas redirigiéndolas hacia la punta del primordio (Benkova *et al.*, 2003; Benková y Bielach, 2010) [Figura 4]. Finalmente, el crecimiento de la raíz lateral es regulado por RNAs pequeños (sRNA, *miR390* y *tasiARF*) que controlan los módulos de respuesta a auxinas *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*. El sRNA *miR390* permite la producción del *tasiARFs* que reprime la expresión de *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, que a su vez regulan por retroalimentación positiva (*ARF2*) o retroalimentación negativa (*ARF3* y *ARF4*) al *miR390* (Marin *et al.*, 2010; Benková y Bielach, 2010) [Figura 4].



**Figura 4.** Mecanismos moleculares que median el inicio de raíces laterales. La acumulación de auxinas regula a los módulos de respuesta a auxinas SRL/IAA14-ARF7, ARF19, BDL/IAA12-MP/ARF5 para iniciar la división celular necesaria para la iniciación de la raíz lateral. El receptor tipo cinasa ACR4 promueve la correcta especificación del primordio de raíz lateral. El transportador de auxinas PIN1 redirige la translocación de auxinas hacia la punta del primordio. El crecimiento de la nueva raíz lateral está controlado por RNAs pequeños (*miR390* y *tasiARF*) que regulan a los módulos de respuesta a auxinas (*ARF4*, *ARF2* y *ARF3*). El color azul refleja la acumulación de auxinas monitoreada por el reportero *DR5::GUS* (Modificado de Benková y Bielach, 2010).

### 1.3.2. Los pelos radicales.

Los pelos radicales son extensiones celulares de las células epidérmicas que se diferencian. En *Arabidopsis* los pelos radicales tienen aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y pueden llegar a medir 1 mm o más de longitud. Debido a que incrementan tanto el área superficial como el diámetro de la raíz, se considera que los pelos radicales tienen como principal función la adquisición de agua y nutrientes, el anclaje y la interacción con microorganismos (Hofer, 1991). El crecimiento acelerado de estas estructuras (aproximadamente 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), ha facilitado estudios de expansión celular. Además, como no son esenciales para la viabilidad de la planta, ha sido posible el análisis de varios tipos de mutantes afectadas en el desarrollo de estas estructuras.

Durante el desarrollo de la raíz primaria en el RAM (meristemo apical de la raíz) se establecen dos tipos celulares en la epidermis, las células que posteriormente forman pelos radicales (tricoblastos o células H), que normalmente están en contacto con dos células corticales subyacentes, y las células que no forman pelos (atricoblastos o células N), las cuales solamente están en contacto con una sola célula cortical [Figura 2] (Cho y Cosgrove 2002). El desarrollo de los pelos radicales en *Arabidopsis* puede ser dividido en tres fases: la fase de especificación celular, la fase de iniciación y la fase de crecimiento. La fase de especificación se refiere a la distinción entre las células epidérmicas que se establecerán como pelo radical y las que no lo harán, lo cual básicamente depende de su posición (en contacto con 1 o 2 células corticales). La iniciación se refiere a la formación de una protrusión en el sitio de crecimiento y el crecimiento es el proceso de desarrollo prolongado que se da después de la iniciación. En el transcurso de las tres fases del desarrollo de los pelos radicales, se involucran muchos procesos celulares y genéticos (Cho y Cosgrove 2002). Entre los aspectos que involucran la morfogénesis de los pelos radicales se encuentran procesos de exocitosis, el flujo de iones, la homeostasis de calcio, las especies reactivas de oxígeno y reorganización del citoesqueleto (Cárdenas, 2009). Los pelos radicales son modelos excelentes para el estudio del crecimiento polar ya que pueden ser

confrontados con muchos factores extracelulares que afectan su patrón de desarrollo, como lo son los factores Nod, elicitores y hormonas vegetales, entre otros. El mecanismo que regula el desarrollo de los pelos radicales mejor descrito es el de gradiente de calcio en la punta del pelo en crecimiento. Experimentos recientes han mostrado que las oscilaciones en las especies reactivas de oxígeno, en pH y en calcio, están relacionados con el crecimiento de pelos radicales, aspectos que permiten considerar que los pelos radicales presentan un patrón de desarrollo similar al descrito para los tubos polínicos (Wylmer *et al.*, 1997; Bibikova *et al.*, 1998; Foreman *et al.*, 2003; Cárdenas, 2009).

#### **1.4. Sistemas de transducción de señales.**

Todos los seres vivos han desarrollado mecanismos de adaptación al ambiente que resultan altamente eficientes y que incluyen tanto la producción de una amplia gama de metabolitos con funciones de protección a agentes tóxicos e infecciosos, como la percepción y la integración de señales provenientes de estímulos bióticos y abióticos que alteran sus programas metabólicos y de desarrollo. Las plantas, a diferencia de los animales, son organismos sésiles que cumplen sus ciclos vitales ancladas al suelo y por lo tanto, no pueden escapar de los cambios en las condiciones ambientales o huir ante el ataque de depredadores y plagas, en este escenario, en los vegetales la percepción correcta de los cambios en las condiciones variantes de su entorno es un importante mecanismo de supervivencia que involucra una amplia gama de rutas de señalización (Misra *et al.*, 2006; Vivanco *et al.*, 2005). En dichas rutas participan sustancias con una clara función regulatoria como las fitohormonas, en las que se incluyen las auxinas, las citocininas, el etileno, el ácido abscísico, el ácido giberélico, el ácido jasmónico y el óxido nítrico, que alteran diferentes programas de crecimiento y desarrollo. Así mismo se encuentran otros compuestos que actúan como mensajeros intracelulares que transmiten y amplifican una señal determinada, para finalmente modular la expresión de genes. Tal es el caso de iones como el calcio, el sodio, el potasio o productos de la fotosíntesis como la sacarosa, cuyos

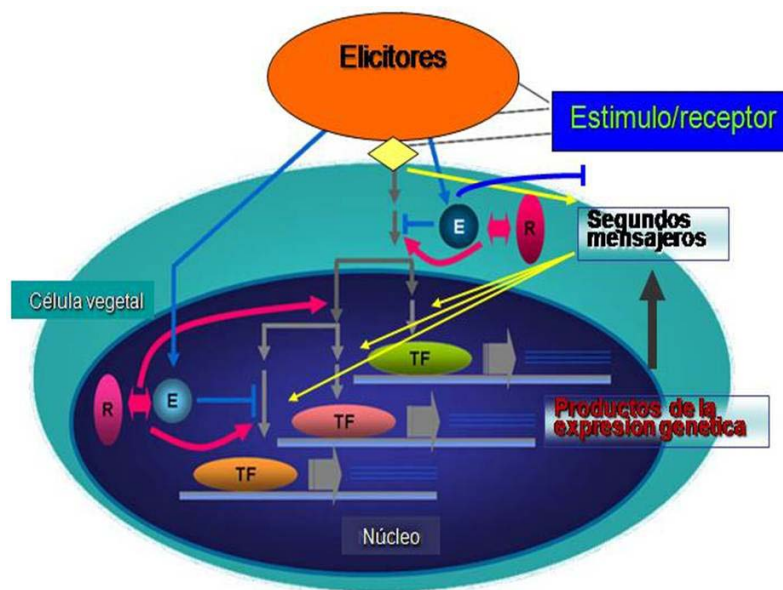
niveles intracelulares dirigen la activación de elementos específicos y ubicuos en las vías de señalización como son las lipasas, las cinasas, las fosfatasas y los factores de transcripción (Alberts *et al.*, 2008).

De esta manera, las vías de señalización permiten a las células responder eficientemente ante los cambios de su entorno e integrar señales internas o externas para responder a ellas a través de cambios en su metabolismo o modulando la expresión genética (Misra *et al.*, 2006; Vivanco *et al.*, 2005). La función adecuada de estas vías es crucial para la adaptación y sobrevivencia a condiciones variantes, pero también para modular los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular que permiten a los organismos cumplir su ciclo de vida (Misra *et al.*, 2006; Vivanco *et al.*, 2005). A estos sistemas celulares de producción, reconocimiento, transmisión y procesamiento de una o más señales es a lo que nos referimos como sistema de transducción de señales.

De manera simplista, puede decirse que todas las vías de transducción de señales constan de receptores, típicamente anclados a la membrana plasmática, aunque también pueden localizarse libres en el citoplasma, cuya activación por un ligando particular le permite transducir la señal a otros componentes, pudiendo ser membranales o citoplásmicos, entre los que se incluyen proteínas G heterotriméricas y proteínas G pequeñas (Ras), fosfatasas y cinasas de proteínas de diferentes tipos, frecuentemente responsables de activar o inactivar un factor de transcripción de localización nuclear que finalmente regula positiva o negativamente la expresión de genes, para establecer una respuesta general o específica ante el estímulo percibido (Alberts *et al.*, 2008). En primera instancia, la señalización se puede considerar como una conexión lineal entre elementos de entrada "input" (receptores) y elementos de salida "output" (elementos reguladores de la expresión genética), sin embargo, es innegable que diferentes vías de señalización interactúan unas con otras formando redes de comunicación flexibles y complejas o redundantes. De hecho, Schwartz y Barón (1999), introdujeron el término "crosstalk" (intercomunicación), para referirse a la interacción entre señales distintas, como en el caso de receptores que integran señales diferentes pero cooperativas entre sí para regular el crecimiento celular. A

la fecha ya se han descrito varias vías de señalización, así como eventos múltiples de intercomunicación entre ellas (Klipp y Liebermester, 2006). Tales estudios han demostrado que muchos de los elementos que componen una vía de transducción están conservados en todos los organismos, pero en cualquier caso, el esclarecer la participación, función e interacciones de los diferentes componentes de una vía de señalización que controlan una respuesta determinada, constituye uno de los mayores retos de investigación de la biología moderna.

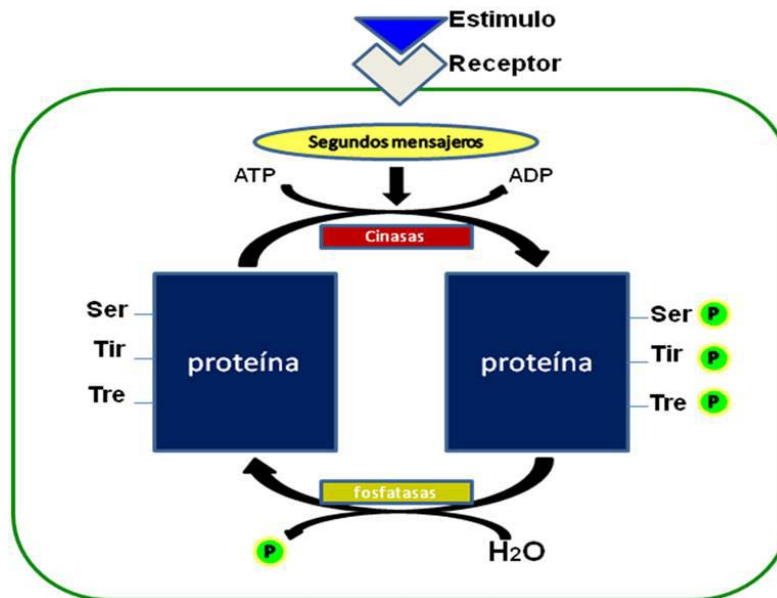
El estudio de las rutas de transducción de señales y sus interacciones ayudará a integrar el conocimiento experimental que eventualmente permitirá plantear hipótesis sobre la forma como las plantas se adaptan a múltiples estímulos, tal como ocurre en condiciones naturales. En la Figura 5 se muestra un esquema sencillo y general de una vía de transducción de señales típica, desde el reconocimiento del estímulo por el receptor, la participación de los segundos mensajeros y la modulación de la expresión génica (Hammond-Kosack y Jones, 2000).



**Figura 5.** Esquema general de una ruta de transducción de señales. Como primera instancia un estímulo se une a un receptor para activar una o más cascadas de señalización mediadas por segundos mensajeros. Éstos a su vez interactúan con otros compuestos como los factores de transcripción, para modular la expresión génica. (Adaptado de Hammond-Kosack y Jones, 2000). E= estímulo, R= receptor, TF= factor de transcripción.

### 1.5. Proteínas con función cinasa y MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases).

Las proteínas con función cinasa (“protein kinases”) catalizan la adición de fosfatos en residuos de aminoácidos específicos (serina, treonina o tirosina) y desempeñan un papel importante en las vías de transducción de señales. La fosforilación de proteínas es considerado el mecanismo más importante para el control de muchos procesos celulares fundamentales (Misrha *et al.*, 2006), por ser muy rápido y reversible, ya que el grupo fosfato puede ser removido por la acción de proteínas con función fosfatasa (Figura 6). Además se ha encontrado que alrededor del 80% de las proteínas tienen en su secuencia de aminoácidos S/T-P susceptible de ser fosforilada (Taj *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Mecanismo de fosforilación/defosforilación de proteínas. Se da en los aminoácidos serina, treonina o tirosina y es catalizado por enzimas con función cinasa/fosfatasa respectivamente, en respuesta a diversos estímulos. La activación de la cinasa es efectuada por segundos mensajeros de diverso tipo, para la adición de grupos fosfato (P) se requiere de ATP (trifosfato de adenosina) como donador del grupo fosfato, así como aporte de la energía necesaria para la reacción, la remoción del grupo fosfato la catalizan fosfatasas, generalmente por una reacción de hidrólisis.

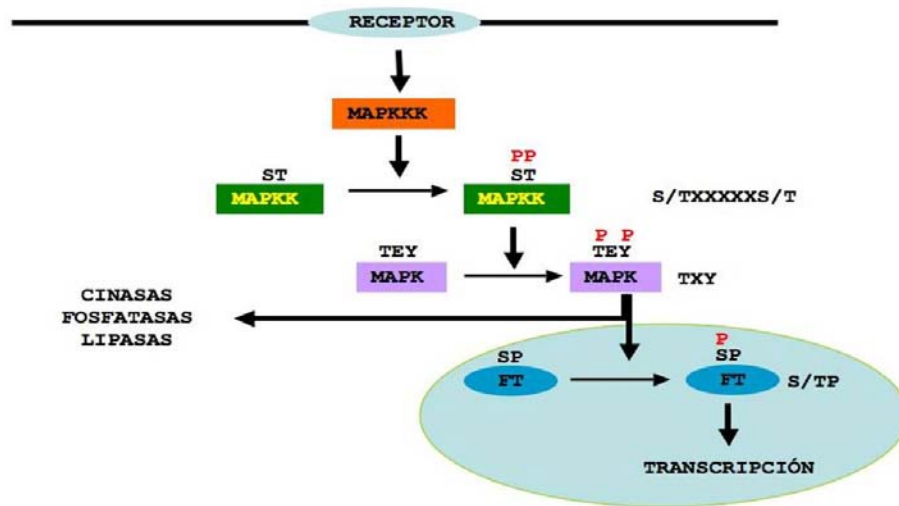
Por su parte, las MAPKs (por “Mitogen Activated Protein Kinases”) son proteínas con función cinasa cuya participación en vías de señalización permite modular

diversos procesos celulares, incluyendo la división y la diferenciación en los organismos eucariontes, así como respuestas a diversos estímulos intra y extracelulares.

Un módulo de señalización de cascadas del tipo MAPK funciona mediante eventos de fosforilación secuencial de al menos tres proteínas (Misrha *et al.*, 2006). El reconocimiento de un ligando por un receptor permite la fosforilación de una MPKKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase), que a continuación, mediante otro proceso de fosforilación, activa a la siguiente cinasa MPKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase), que a su vez fosforila a una MPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Esta última puede fosforilar otras proteínas (quinasas, lipasas, fosfatasas) e incluso a factores de transcripción (Figura 7). El resultado de estos eventos sucesivos de fosforilación de proteínas en respuesta a varios tipos de estrés biótico y abiótico, así como a fitohormonas, conduce a respuestas celulares específicas que afectan el metabolismo y/o la expresión genética para de esta manera modular diversos y numerosos procesos celulares (Misrha *et al.*, 2006).

La primera MAPK fue descubierta en 1986 en células animales la cual fue nombrada proteína tipo cinasa 2 asociada al microtúbulo (MAP-2 kinase), posteriormente esta cinasa se relacionó a un grupo de proteínas que son fosforiladas en un residuo de tirosina en respuesta a mitógenos y fue renombrada como MAPK. En plantas, los genes que codifican para MAPKs fueron reportados por primera vez en 1993 en chícharo. Actualmente, las MAPKs han sido encontradas en diversas especies vegetales tales como *Arabidopsis*, alfalfa, tabaco y petunia, entre otras. En levaduras y animales las MAPKs comprenden tres grupos: 1) Cinasas relacionadas a señales extracelulares (ERK's); 2) Cinasas del tipo c-jun amino terminal o cinasas activadas por estrés (JNK/SAPK) y 3) Las cinasas de respuesta a osmolaridad o cinasas p38 (Hog/p38). Las cinasas del tipo ERK son las responsables de la transducción de señales de los mitógenos, mientras que las cinasas JNK/SAPK y las Hog/p38 transducen señales de estrés (Roux y Blenis 2004; Mishra *et al.*, 2006). En mamíferos y levaduras las cascadas de señalización del tipo MAPKs son activadas por receptores acoplados a

proteínas G o RTK's (receptor de tirosina tipo cinasa) o por cinasas de histidina del sistema de dos componentes. En respuesta a estímulos los receptores activan proteínas G como Ras y Rho1, por la conversión de GDP en GTP, las proteínas G activas interactúan con muchos efectores como la cinasa PI-3, la proteína cinasa C o la MPKKK tipo Raf, el complejo Ras/Raf inicia la activación de la cascada (Alberts *et al.*, 2008). En plantas a diferencia de los mamíferos, no se conoce la forma exacta de cómo funciona en totalidad el sistema MAPK y la información sobre los sustratos de las MAPKs, así como los miembros que participan en un mismo módulo en un proceso dado, está emergiendo lentamente (Mishra *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Elementos de una cascada de señalización de MAPKs. Se puede apreciar en forma general el modo de operar de la cascada, desde que el receptor activado desencadena respuestas que llevan a la activación de la cascada de MAPKs pasando por la MPKKK, la MPKK y la MPK, hasta la fosforilación de sus blancos, que pueden ser factores de transcripción en el núcleo o bien, a otros sustratos, como fosfatasa, lipasa e incluso a otras cinasas. (Adaptado de Hirt, 2000). ST=aminoácidos que se fosforilan en la MPKK (serina-treonina), TEY=motivo de aminoácidos que se fosforilan en la MPK (treonina-acido glutámico-tirosina), SP=motivo de fosforilación en el sustrato (serina-prolina), P=fosforilación y FT=factor de transcripción.

En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado 90 MAPKs de las cuales 60 corresponden a la familia de las MPKKKs, 10 a la familia de las MPKK y 20 a la de las MPKs, esta clasificación se estableció de acuerdo a sus características estructurales y los miembros de cada familia se identifican por numeración consecutiva (MAPK group, 2002).



La familia de las MPKKs, comparada con las MPKs y las MPKKs, es la que contiene más miembros y tiene mayor variedad en su estructura primaria y en su composición de dominios, por lo que se dividió en tres grupos (A-C) y distintos subgrupos. Así por ejemplo, el grupo A se divide en cinco subgrupos (1-5), donde el subgrupo A1 tiene cuatro cinasas de proteínas que poseen motivos comunes en su región amino terminal los cuales pueden variar en su organización (MAPK group, 2002).

A su vez, la familia de las MPKs se dividió en cuatro grupos (A-D) por alineamiento en su secuencia de aminoácidos. Las cinasas de los grupos C y D son codificadas por genes que no tienen intrones. En el amino terminal de las MPKs, tanto de *Arabidopsis* como de otras plantas, se encuentra el dominio de unión a MPKs ([K/R][K/R][K/R]x(1-5)[L/I]x[L/I]) que es característico por sus dominios de residuos básicos [R/K] y conjuntos de residuos hidrofóbicos [L/I] (MAPK group, 2002). Debido a que el número de integrantes en la familia de las MPKs es la mitad del número de integrantes de la familia MPK, se asume que las MPKs pueden activar a más de una MPK y, por lo tanto, principalmente a este nivel existe una intercomunicación entre varias rutas de señalización (MAPK group, 2002).

Por su parte, las MPKs pueden dividirse en cuatro grupos (A-D) y la comparación en la secuencia del motivo que es fosforilado por MPKs (TxY) las clasifica en dos subtipos, las que tienen el motivo TEY y las que tienen el motivo TDY. El subtipo TEY comprende los grupos A, B y C y el subtipo TDY al grupo D. Las MPKs contienen en el extremo C-terminal el dominio CD, altamente conservado en los grupos A y B que funciona como el sitio de unión a MPKs, fosfatasas y sustratos proteicos. El dominio contiene la secuencia de aminoácidos [LH][LHY]Dxx[DE]xx[DE]EPxC que incluye dos residuos ácidos (D y E) que son cruciales para la interacción con el grupo de residuos de aminoácidos básicos (K y R) presentes en las MPKs. El dominio CD en el grupo C y D parece estar modificado (MAPK group, 2002).

## **1.6. Interacciones macromoleculares.**

Las interacciones macromoleculares constituyen una red regulatoria que coordina funciones celulares. Se han desarrollado numerosos métodos para detectar y caracterizar este tipo de interacciones, entre ellos se incluye la coprecipitación y reconstitución de complejos utilizando los componentes purificados, lo cual requiere la remoción de estos componentes de su entorno celular normal. Otros métodos, como, la identificación de mutaciones supresoras y los ensayos de dos híbridos (Causier y Davies 2002), permiten la detección de combinaciones de genes que tienen consecuencias funcionales no aditivas. La mayor ventaja de éstos y de otros métodos genéticos, es que permiten investigar una interacción en el ambiente celular normal incluido en el contexto fisiológico de organismos multicelulares (Kerppola, 2009).

Los métodos que permiten tanto caracterizar la interacción molecular así como su detección en el ambiente celular normal están basados en varios conceptos biofísicos, además, el uso de proteínas por las que los componentes de la interacción pueden ser etiquetados, permite detectar su localización o proximidad con otros miembros del complejo (Hu *et al.*, 2005; Kerppola, 2009).

Por lo tanto, la proximidad molecular puede ser medida etiquetando los componentes con fragmentos de proteínas, que en forma individual no tienen función pero que cuando se asocian o están a una distancia corta forman un complejo con una función detectable (Hu *et al.*, 2005; Kerppola, 2009). Así, se han identificado los fragmentos de muchas proteínas que pueden asociarse para formar un complejo detectable, demostrando que la eficiencia de la asociación para ciertas proteínas se aumenta fusionando estos fragmentos a moléculas potencialmente interactoras. La interacción de estas moléculas incrementa la concentración local de los fragmentos proteícos, facilitando la asociación y la recuperación de su función cuya actividad puede ser utilizada para detectar la interacción molecular (Hu *et al.*, 2005; Kerppola, 2009).

De esta manera los fragmentos de muchas proteínas se han utilizado para detectar proteínas interactoras. En principio se utilizaron fragmentos de ubiquitina, subsecuentemente se utilizaron fragmentos de  $\beta$ -galactosidasa, dihidrofolato

reductasa, proteínas autofluorescentes,  $\beta$ -lactamasa y varias luciferasas (Hu *et al.*, 2005; Kerppola, 2009).

La asociación de fragmentos de proteínas fluorescentes unidos a proteínas interactuantes es particularmente utilizado, debido a que la fluorescencia intrínseca del complejo permite la visualización de la localización subcelular de la interacción, sin ser necesario el uso de reactivos adicionales (Kerppola, 2009). A este método se le denomina como complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC), mismo que, por ser, en la actualidad el método más utilizado para la detección de interacciones proteicas basado en la asociación de fragmentos proteicos, se describirá con más detalle en el siguiente apartado (Figura 8) [Walter *et al.*, Hu *et al.*, 2005].

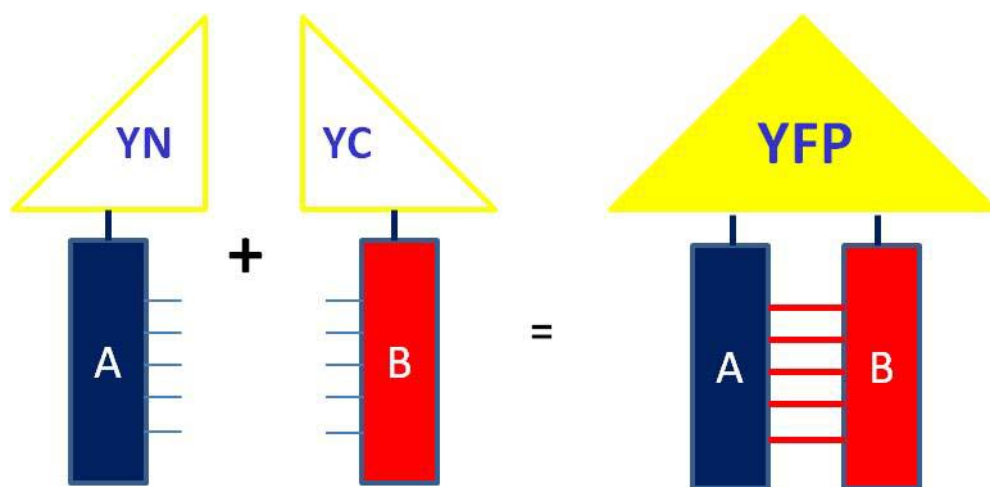
### **1.7. Interacción proteína-proteína.**

Las proteínas participan en forma ubicua en los sistemas de transducción de señales y regulan varios procesos celulares, por lo que el estudio de las interacciones proteína-proteína, es muy importante para determinar la forma en la que se lleva a cabo un determinado proceso celular. La característica estructural de diversas proteínas está determinada por las proteínas con las que interactuarán en la célula, por ejemplo, la estructura del carboxilo terminal de las MPKs, contiene residuos de aminoácidos ácidos que son cruciales para su interacción con el grupo de residuos básicos que tienen las MPKKs en su dominio de unión a MPKs (MAPK group, 2002). Las interacciones proteicas en respuesta a distintas señales extracelulares puede ocurrir en diferentes localizaciones subcelulares, la localización de los complejos proteicos y su regulación puede proveer un indicio sobre el papel funcional de las interacciones proteicas (Hu *et al.*, 2005; Kerppola, 2009). Existen diversas técnicas para estudiar la interacción entre proteínas de las cuales el sistema de dos híbridos, la transferencia de energía por resonancia tipo Förster (FRET, Förster/fluorescence Resonance Energy Transfer) y la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC, Bimolecular Fluorescence Complementation) [Causier y Davies 2002; Hink *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2004],

determinan interacciones proteicas *in vivo*, pero a diferencia del sistema de dos híbridos, en el que se determinan interacciones proteicas de sistemas heterólogos en levadura y FRET, que es más utilizada para determinar interacciones entre proteínas de membrana. Sin embargo, la técnica de BiFC permite el estudio de las interacciones de proteínas *in vivo* y en nuestro caso particular *in planta*, es decir, en el mismo organismo que se está utilizando como modelo de estudio (Walter *et al.*, 2004; Kerppola, 2009).

### 1.8. BiFC.

Una de las técnicas más utilizadas para determinar las interacciones proteicas es BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), que además de permitir observar interacciones *in vivo*, hace posible la localización subcelular donde ocurre la interacción. La técnica se basa en la complementación de dos fragmentos incapaces de fluorecer de la proteína YFP (yellow fluorescence protein), unidos a proteínas potencialmente interactoras, la fluorescencia se recupera gracias a la interacción de las proteínas a las que están unidas reconstituyendo una proteína fluorescente funcional (Figura 8) [Walter *et al.*, 2004; Kerppola, 2009].



**Figura 8.** Interacción proteína-proteína por complementación de la fluorescencia. Una proteína A unida a un fragmento no fluorescente de la YFP, interactúa con una proteína B unida a otro fragmento no fluorescente de la YFP. La interacción de las proteínas A-B reconstituye una proteína YFP funcional que manifiesta fluorescencia.

## 2. ANTECEDENTES.

Como ya se menciona, las MPKs constituyen el último peldaño del módulo de señalización mediado por este tipo de cinasas. En plantas, las MPKs más estudiadas son MPK3, MPK4 y MPK6, entre las que incluso se ha reportado que existe cierta redundancia funcional en la señal que transmiten y la respuesta que evocan (Bush y Krisan 2007). Por ejemplo, en plantas sometidas a estrés salino o frío, se observa que la MPKK2 activa a las cinasas MPK4 y MPK6 (Teige *et al.*, 2004). De manera similar, en el estrés biótico producido por PAMPs (Patogen Associated to Molecular Patterns) la MPKK9 activa a MPK3 y MPK6 para inducir la biosíntesis de etileno y camalexina (Xu *et al.*, 2008); Por otra parte, el peróxido de hidrógeno activa MPKK4 y MPKK5, que fosforilan a MPK3 y MPK6, esta interacción MPK3/MPK6 también ocurre durante el desarrollo del estoma (Kovtun *et al.*, 2000); La cinasa MKK1 que activa a MPK3/MPK6 de *Arabidopsis*, es activada en células tratadas con flagelina 22, un péptido de un dominio de 22 aminoácidos conservado en una proteína del flagelo bacteriano conocida como flagelina (Suarez-Rodríguez *et al.*, 2006). También se observa redundancia entre MPK3 y MPK6 a nivel de los sustratos que fosforilan, como se describió en un estudio de proteómica donde se postula que MPK3 tiene 48 sustratos potenciales, mientras que MPK6 tiene 38 sustratos, siendo 26 de estos sustratos comunes para ambas cinasas (Feilner *et al.*, 2005). En estudios del tipo doble híbrido y fosforilación *in vitro*, se encontraron que con MPK3 interactúan MPKK3, MPKK4, MPKK5, MPKK6, MPKK7 y MPKK9, con MPK4 MPKK1, MPKK2, MPKK5 y MPKK6 y con MPK6 MPKK1, MPKK2, MPKK3, MPKK4, MPKK5, MPKK6, MPKK7, MPKK9 y MPKK10, y simultáneamente se reportan los sustratos y fosfatasas que se ha demostrado que se relacionan con estas MAP cinasas. Por ejemplo, MPK3 interactúa con las fosfatasas PTP1, MKP1 y MKP2 y con los sustratos VIP1 (proteína del tipo bZIP que facilita el importe de complejos de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* al núcleo), EIN3 (Factor de transcripción) y SPEECHLESS (Factor de transcripción). La MPK4 interactúa con las fosfatasas AP2C1, DsPTP1 y MKP1 y con los sustratos MKS1 (proteína que interactúa con el factor de transcripción WRKY33). Y finalmente MPK6 interactúa con las fosfatasas

PTP1, MKP1, MKP2, AP2C1 y ABI1 y con los factores de transcripción WRKY53, WRKY62, WRKY6, EIN3, SPEECHLESS, ERF104, ACS6, TGA1 y WRKY65 (Andreasson y Ellis, 2010). Estos estudios, indican que una variedad de tratamientos con distintos tipos de estrés resultan en la activación de diferentes combinaciones de estas tres cinasas. Sin embargo, también hay eventos en los cuales estas y otras MPKs se activan de forma individual, controlando en conjunto con sus activadores río arriba y sus sustratos la especificidad de la señal que median, lo que a su vez depende de una variedad de factores reguladores, como fosfatasas, proteínas de andamiaje, y de su localización espacio temporal en el desarrollo de la planta (Muller *et al.*, 2009).

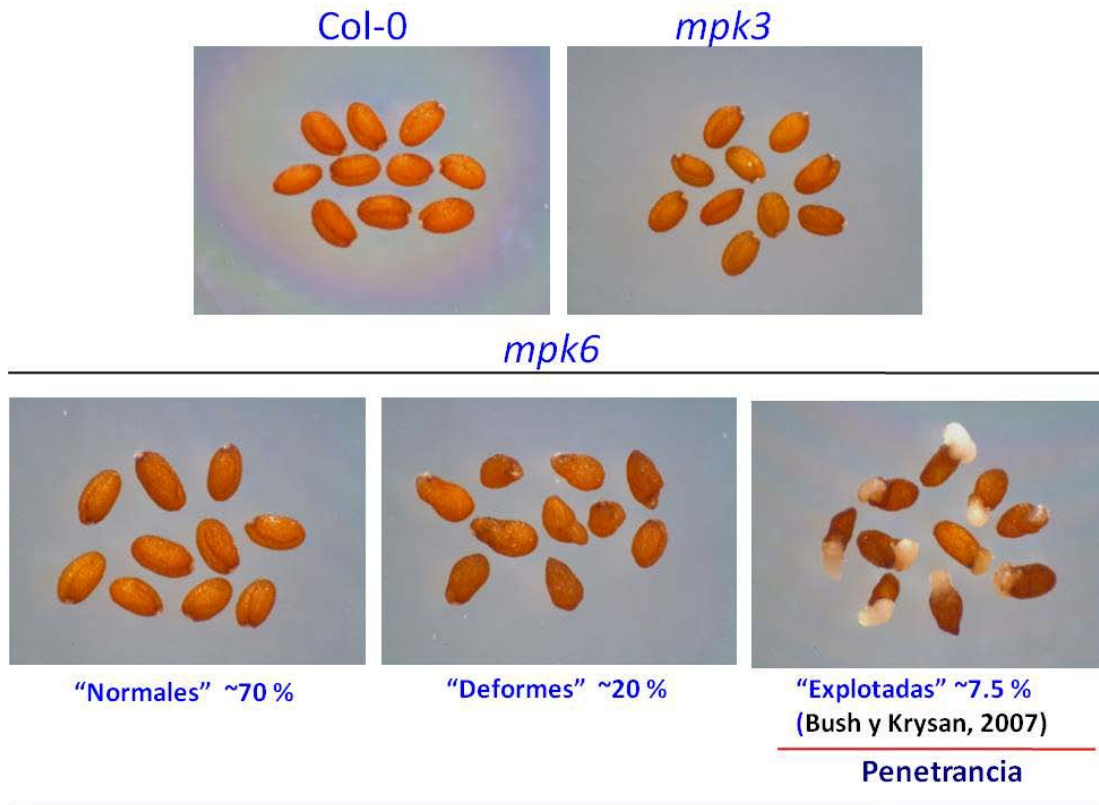
En un trabajo previo, enfocado en el estudio de la participación de MPK6 en la vía de señalización de azúcares, se observó que una mutante en dicho gen, presenta un fenotipo claro y reproducible de defectos en el desarrollo del embrión que repercute en alteraciones en el desarrollo la semilla (semillas deformes con embriones explotados que están expuestos fuera de la semilla), que se asocia con un desarrollo defectuoso del sistema radical (López-Bucio *et al.*, en preparación). Entre los fenotipos más característicos de la mutante *mpk6*, destacan los siguientes:

1) Tres tipos de semillas que corresponden a un fenómeno de penetrancia y expresividad, en el que los fenotipos similares a plantas del tipo silvestre y de semillas explotadas, representan a los menos y más penetrantes, respectivamente (Figura 9).

2) Defectos en el sistema radical caracterizados por:

- Ausencia de raíz primaria en plántulas provenientes de embriones explotados y raíz primaria corta en plántulas provenientes de semillas deformes (Figura 12).
- Formación de raíces adventicias (López-Bucio *et al.*, en preparación).
- Mayor densidad de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, en preparación).
- Mayor formación de pelos radicales (Figura 11) [López-Bucio *et al.*, en preparación].

Interesantemente la cuantificación de estos fenotipos demostró que las plántulas provenientes de semillas normales tienen un crecimiento mayor de la raíz primaria, con respecto a plántulas del tipo silvestre (Figura 10).

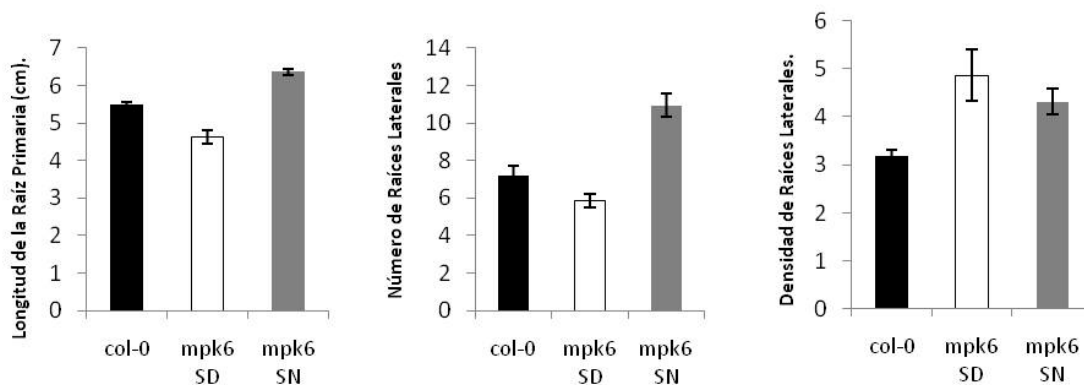


### Penetrancia y expresividad

**Figura 9.** Fenotipos de semillas de una línea homocigota de la mutante *mpk6*. Se muestran los fenotipos de: embriones "Burst" o explotados (Bush y Krysan, 2007), semillas "raisin" o deformes y las semillas "like wt" o normales. La presencia de estos diferentes fenotipos en un mismo fondo genético se debe a un fenómeno de penetrancia y expresividad definidas como el porcentaje de individuos con un mismo genotipo que exhiben diferentes fenotipos, y como la medida a la cual un genotipo dado es expresado a nivel fenotípico, respectivamente [Griffiths *et al.*, 2000]. Como control se incluye a la mutante *mpk3* que no presenta un fenotipo aparente en semillas, hecho por el que se descarta la posible redundancia funcional de estas cinasas en cuanto a desarrollo del embrión.

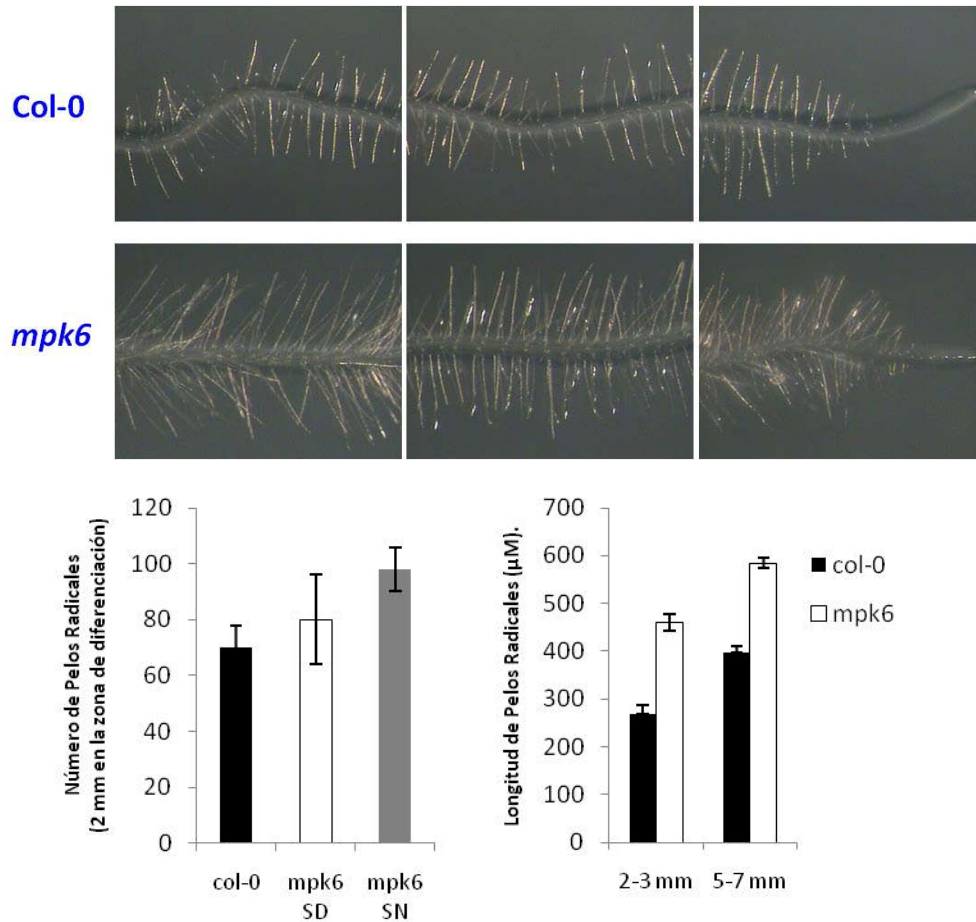
Como los fenotipos descritos no se reproducen en mutantes sobre los genes *MPK3* (*mpk3*) y *MPK4* (*mpk4*), se descarta la redundancia de estas cinasas al menos con respecto al desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis*. A este respecto, conviene resaltar que en el 2007 se reportó que las *MPK3* y *MPK6* están involucradas en el desarrollo del embrión en plantas de *Arabidopsis*, puntualizándose que mutantes sencillas para ambos genes (*mpk3* o

*mpk6*) presentan un desarrollo normal, en tanto que la doble mutante *mpk3-mpk6*, resulta letal (Wang *et al.*, 2007). Así mismo, ya se ha reportado que bajo ciertas condiciones de crecimiento la mutación del gen *MPK6*, causa un defecto en el desarrollo del embrión claramente asociado a un fenómeno de penetrancia (individuos con un genotipo homogéneo que exhiben fenotipo graduales en porcentajes variables, pero asociados al genotipo) y expresividad (medida de los fenotipos variables resultantes de un fenómeno de penetrancia) [Griffiths *et al.*, 2000], lo que indica que la función de *MPK6* es importante en el desarrollo embrionario y que esta función es independiente de *MPK3* y *MPK4* (Bush y Krysan, 2007). Por otro parte, recientemente se reportó que una mutante en el gen *MPKKK4* (*YODA*) presenta un fenotipo similar a la mutante en el gen *MPK6*, estos autores incluso mencionan que una cascada de MAPKs, en principio activada por el receptor interleucina-1, promueve la elongación del cigoto y el desarrollo del suspensor (Gossniklaus, 2009; Meinke *et al.*, 2009). Sin embargo, de ser este realmente el caso, los otros integrantes de esta hipotética cascada de MAPKs, están pendientes de ser determinados.



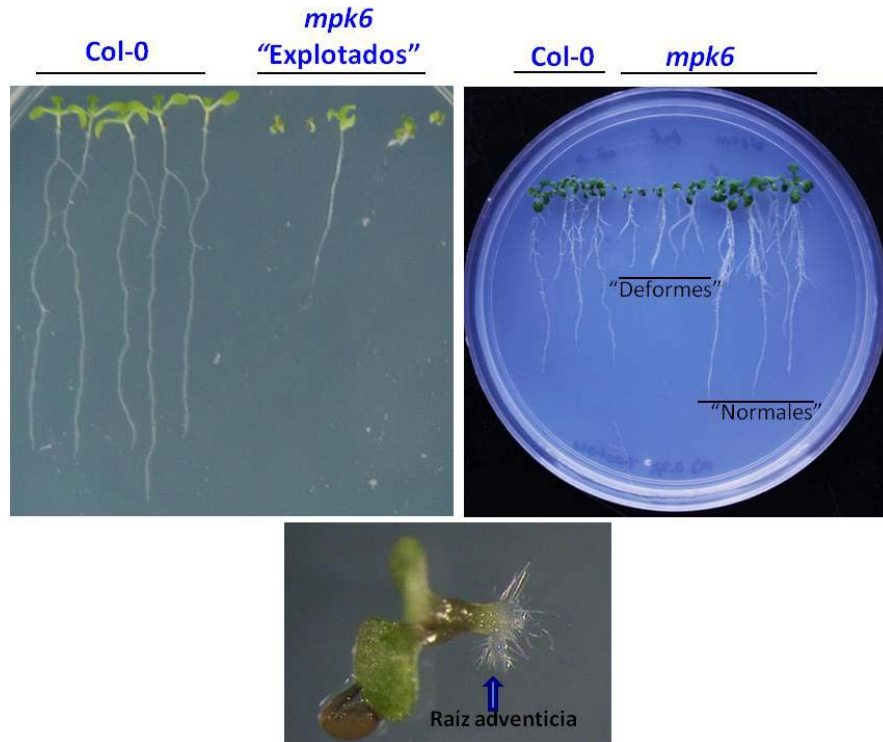
**Figura 10.** Análisis del sistema radical de plántulas de la mutante *mpk6*. Las plántulas provenientes de semillas deformes (SD) tienen la raíz primaria corta con menos raíces laterales pero una mayor densidad, mientras que las plántulas provenientes de semillas normales (SN) tienen la raíz primaria más larga, una mayor formación de raíces laterales y una mayor densidad de raíces laterales/cm. Datos comparados con los de plántulas del tipo silvestre (Col-0). Las barras representan la desviación estándar (DE) con una n=30 plántulas de 10 días después de germinación.





**Figura 11.** Fenotipo de pelos radicales de la mutante *mpk6*. Las plántulas provenientes de la mutante *mpk6* (semillas deformes SD y normales SN) tienen una mayor longitud y una mayor formación de pelos radicales en comparación de la línea del tipo silvestre (Col-0). Las longitudes se determinaron dentro de dos fragmentos de la raíz de 2 mm de largo (2-4 mm y 5-7 mm) a partir del inicio de la zona de diferenciación. Las barras representan la DE de una n=10 plántulas de 8 días después de germinación.

Actualmente en el laboratorio disponemos de una colección de mutantes de MAPKs en la que se incluyen a las mutantes *mpk3*, *mpk4* y *mpk6*, a las mutantes en las MPKKs, *mpkk1*, *mpkk4*, *mpkk5* y *mpkk9* y a las mutantes *mpkkk4* (*yoda*), *mpkkk1* (*arakin*) y *ctr1* del grupo de MPKKs, a través de cuya caracterización fenotípica se pretende ganar conocimiento sobre la cascada de MAPKs implicada en la vía de señalización responsable del control de los programas de desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis*, en la que claramente participa la enzima MPK6.



**Figura 12.** Fenotipos de la raíz de plántulas provenientes de semillas explotadas, deformes y normales. Las plántulas provenientes de semillas explotadas no tienen raíz primaria y completan su ciclo de vida produciendo raíces adventicias, las plántulas provenientes de semillas deformes tienen una raíz primaria corta, mientras que las plántulas provenientes de semillas normales tienen la raíz primaria más larga en comparación con las plántulas del tipo silvestre (Col-0).

### **3. HIPOTESIS.**

Un módulo clásico de MAPKs estructurado por tres elementos, una MPKKK, una MPKK y una MPK representada por MPK6, está involucrado en el control del desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana*.

### **4. OBJETIVOS.**

#### **4.1. Objetivo general.**

Identificar los componentes que actúan río arriba de MPK6 de la cascada de MAPKs involucrada en los programas de desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana*.

#### **4.2. Objetivos específicos.**

- 1) Caracterización fenotípica de un grupo de mutantes de inserción de T-DNA, pertenecientes a las familias MPKKK (3 miembros, *mpkkk1*, *mpkkk4* y *ctr1*) y MPKK (4 miembros *mpkk1*, *mpkk4*, *mpkk5*, y *mpkk9*).
- 2) Establecer interacciones *in vitro* y/o *in planta* entre MPK6 y cinasas MPKK potencialmente involucradas en los programas de desarrollo bajo estudio.
- 3) Establecer interacciones *in vitro* y/o *in planta* entre cinasas MPKKK y cinasas MPKK potencialmente involucradas en los programas de desarrollo bajo estudio.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

**Nota:** Las formulas de las soluciones referidas en esta sección están descritas en el apéndice I.

### 5.1. Material vegetal.

En los distintos estudios realizados se utilizó el siguiente material vegetal:

- a) Plantas tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0).
- b) Líneas mutantes por inserción de T-DNA de la colección SALK (<http://www.arabidopsis.org>), para los genes *MPKKK1* (At4g08500-SALK\_052557), *MPKKK4* (At1g63700-SALK\_053981), *MPKK1* (At4g26070-SALK\_140054), *MPKK4* (At1g51660-CS\_849071), *MPKK5* (At3g21220-CS\_874712), *MPKK9* (At1g73500-CS\_876952), *MPK6* (At2g43790-SALK\_073907 y SALK\_127507) *MPK4* (At4G01370-CS\_5205) y *MPK3* (At3g45640-SALK\_100651 y CS\_800169).

Antes de someterse a experimentación todas las líneas obtenidas de la colección de SALK se propagaron en cuartos de crecimiento para obtener suficiente semilla para realizar los estudios moleculares y fenotípicos.

### 5.2. Genotipificación y Análisis de desarrollo *in vitro*.

Las semillas de las líneas mutantes para MPKKKs y MPKKs se analizaron en búsqueda de fenotipos similares a los observados en la mutante *mpk6* (deformidad o embriones expuestos). Sobre aquellas líneas seleccionadas en este primer escrutinio, se confirmó el sitio de inserción del T-DNA, se estableció su genotipo y se utilizaron para análisis de desarrollo *in vitro*. Para su siembra en condiciones asépticas en medio de cultivo, las semillas se hidrataron en agua desionizada estéril durante 30 minutos y posteriormente se desinfectaron superficialmente con la aplicación sucesiva de etanol absoluto por un minuto, solución desinfectante (Apéndice I) durante 7 minutos y al menos 5 enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de solución

desinfectante. Finalmente, antes de proceder a su siembra en medios de cultivo, las semillas desinfectadas se sometieron a un proceso de estratificación que consiste en mantenerlas durante tres días a 4°C en condiciones de oscuridad. Para mantener condiciones asépticas, tanto el procedimiento de desinfección como la siembra de semillas, se realizaron en campana de flujo laminar.

Como medio de cultivo se utilizaron las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) 0.2X (Apéndice I), que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento *in vitro* de plantas (Murashige y Skoog, 1962), suplementadas con 0.6% de sacarosa y solidificado con 1% de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 y posteriormente el medio se sometió a esterilización en autoclave (120°C y 15 lb/cm<sup>2</sup> de presión por 20 min). Las cajas con semillas se incubaron a una temperatura de 24°C y un fotoperiodo de 16/8 hrs de luz/oscuridad, monitoreando el desarrollo de las plántulas cada 48 horas, durante los tiempos especificados en cada experimento. El análisis final consistió en medir la longitud de la raíz primaria, así como el número y densidad de raíces laterales (número de raíces laterales por centímetro, en la zona de producción de raíces laterales) para su análisis mediante métodos estadísticos.

Para la confirmación de los sitios de inserción del T-DNA y la genotificación de las líneas mutantes bajo estudio, se utilizaron plántulas de 12 días de edad, crecidas en las mismas condiciones descritas. A partir de este material vegetal, se hicieron preparaciones de (DNA/RNA) con los protocolos descritos a continuación, que se utilizaron para reacciones de (PCR/RT-PCR) en las condiciones y con los juegos de iniciadores referidos en la Tabla 1.

### **5.3. Clonación de los genes *MPKK1*, *MPKK4*, *MPKK5*, *MPKK9*, *MPKKK1* y *MPKKK4*.**

Con la idea tanto de lograr su sobreexpresión en bacterias, para tener proteína suficiente para ensayos de fosforilación *in vitro*, como de realizar ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia, para demostrar interacciones *in planta*, los genes referidos se clonaron en el vector de entrada del sistema

gateway pENTR™D-TOPO (Invitrogen Life Technologies) que permite su posterior movilización hacia diferentes vectores destino, como son pDEST17, pSPYNE y pSPYCE, que como se describirá más adelante, sirvieron para abordar los objetivos de este trabajo .

### 5.3.1. Obtención de DNAs y cDNAs.

Para la recuperación de los DNAs o cDNAs de cada uno de los genes referidos, se utilizaron 3 µg de DNA o RNA total de material vegetal de 12 días de edad crecido en las condiciones descritas obtenido con los protocolos 5.6 y 5.7 descritos a continuación. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la amplificación y para la confirmación de su clonación en los vectores correspondientes, se describe en la Tabla 1.

**Tabla1. Secuencias<sup>1</sup> de oligonucleótidos utilizados como iniciadores para reacciones de PCR y RT-PCR.**

Sustrato	Oligonucleótido 5'	Oligonucleótido 3'
<i>MPK6</i>	CGAGTCACTTCTGAGAG	CAGAATATCAGCAATAG
<i>MPKK1</i>	CACCATGAACAGAGGAAGCTTATGCC	GTTAGCAAGTGGGGGAATCAAA
<i>MPKK4</i>	CACCATGAGACCGATTCAATCGCCTC	TGTGGTTGGAGAAGAAGACGAG
<i>MPKK5</i>	CACCATGAAACCGATTCAATCTCC	AGAGGCAGAAGGAAGAGGACGA
<i>MPKK9</i>	CACCATGGCTTTAGTACGTGAACGTC	AAGATCTTCCCGAGAAAAGGA
<i>MPKKK1</i>	CACCATGGACAGATTTCTAGCTCGTA	GCATTCTTGTGCCTGACTTCCC
<i>MPKKK4</i>	CACCATGCCTTGGTGGAGTAAATC	GGGTCCTCTGTTTGTGATCCG
M13	GTAAAACGACGGCCAG	CAGGAAACAGCTATGAC
pDsLOX_LB1	GCGTCAATTTGTTTACACC	El del gen bajo análisis
pDsLOX_LB2	GGGTTCTATAGGGTTTCGC	El del gen bajo análisis
LB1-SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCT	El del gen bajo análisis
LB2-SAIL	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTAC	El del gen bajo análisis
C-YFP	CAGCTCGTCCATGCCGAGAGTG	El del gen bajo análisis
N-YFP	TGTAGTTGTACTCCAGCTTGTG	El del gen bajo análisis
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	El del gen bajo análisis

**1 mostradas en orientación 5'->3'**

Para el caso de los genes *MPKK4*, *MPKK5* y *MPKK9* (Apéndice III), que no contienen intrones (MAPK group, 2002), se utilizó como sustrato para las

reacciones de PCR DNA genómico. Por su parte, los cDNAs de los genes *MPKK1*, *MPKKK1* y *MPKKK4* (Apéndice III), que contienen intrones se obtuvieron mediante reacciones de RT-PCR a partir de RNA total. Dado que varios intentos de amplificación de estos cDNAs utilizando RNA proveniente de plantas crecidas en condiciones estándar resultaron infructuosos, se utilizó RNA extraído de plantas tratadas con peróxido de hidrogeno 10 mM, que es una condición de estrés abiótico reconocida para inducir su expresión (Nakagami *et al.*, 2006)

En todos los casos, los productos de PCR visibles en geles de agarosa, se purificaron por filtración del gel a través de columnas Wizard (Promega), resuspendiendo el producto en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

### **5.3.2. Clonación en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO (mapa en apéndice II).**

Para las reacciones de ligación en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO se siguieron las especificaciones del proveedor (Invitrogen Life Technologies). Brevemente, se mezclan 4.2  $\mu$ L del producto de PCR purificado con 1  $\mu$ L de solución salina diluida 1:4 v:v y con 0.8  $\mu$ L de vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO, incubándose a  $^{\circ}$ T ambiente por 1hr y a 4 $^{\circ}$ C entre 8 a 16 hrs, antes de proceder a la transformación de *E. coli* por electroporación.

### **5.3.3. Transformación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .**

De la reacción de ligación descrita se utilizan 1.5-2  $\mu$ L para transformar 50  $\mu$ l de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La mezcla de células/plásmido se coloca en una celda de electroporación mantenida en hielo y se les aplica un pulso de 1.8 kV en un elctroporador (MicroPulser<sup>TM</sup> de BIO-RAD), se le agrega 700  $\mu$ l de medio LB líquido (Apéndice I) y se incuban durante 45 min a 37 $^{\circ}$ C con agitación ligera para su recuperación. El cultivo se centrifuga durante 1 min a 8000 RPM, la pastillas se resuspende en  $\sim$ 100  $\mu$ L del sobrenadante y se dispersa en cajas de petri con medio LB sólido suplementado con el antibiótico al que el vector

confiere resistencia (kanamicina 50mg/mL), las placas se incuban a 37°C hasta que el crecimiento de colonias resistentes es evidente (8-12 horas).

#### **5.3.4. Movilización de genes del vector de entrada a vectores destino.**

Sobre algunas de las colonias crecidas en placas selectivas, se realizan reacciones de PCR utilizando iniciadores específicos para el gen de interés para corroborar su presencia en el vector. Con aquellas colonias que resultan positivas, se realiza una segunda reacción de PCR utilizando como iniciadores oligonucleótidos contra la región del fago M13 que contiene el vector, lo que permite amplificar un fragmento que contiene el gen de interés más dos sitios de recombinación que hacen posible su movilización hacia cualquier vector destino del sistema gateway, en este caso, los vectores pDEST17, para la sobreexpresión del gen en bacterias y pSPYCE o pSPYNE, para los ensayos de BiFC.

Para la reacción de recombinación se mezclan 3 µL del producto del segundo PCR purificado, 2 µL del vector destino, 4 µL de Buffer 5X LR clonasa, cbp 16 µL de TE pH 8.0 (Apéndice I) y 4 µL de enzima LR, en un volumen final de 20 µL, Esta mezcla de reacción se incuba durante un tiempo mínimo de 1 hora a 25°C, la reacción de recombinación se detiene con 2 µL de proteinasa K e incubación por 10 min a 37°C. Con 4 µL de la reacción anterior se electroporan células de *E. coli* de la manera previamente descrita y utilizando ampicilina a 100 mg/ml para la selección del vector pDEST17 (Figura 20), y kanamicina a 50 mg/ml para los vectores pPSPYNE y pSPYCE (Invitrogen Life Technologies) [Figura 24]. La verificación de las construcciones en el vector pDEST17 se realiza por PCR en colonia, utilizando como iniciadores un oligonucleótido sobre el promotor T7 (5') y un oligonucleótido sobre el gen de interés (3'). En el caso de los vectores pPSPYNE y pSPYCE la verificación se hace de la misma manera, pero empleando oligonucleótidos 5' sobre el gen de interés y 3' sobre el gen YFP [C-YFP y N-YFP Tabla 1. (Walter *et al.*, 2004)].

Las colonias seleccionadas se emplean para la purificación de DNA plasmídico que posteriormente se usará para transformar las cepas requeridas para



sobreproducir la proteína correspondiente en *E.coli* (cepa BL21™ Invitrogen Life Technologies) y para los experimentos de BiFC [*Agrobacterium tumefaciens* cepa PGV2260 (Hoekema *et al.*, 1983)].

#### **5.4. Sobreexpresión de proteínas en la cepa de *E. coli* BL21.**

Una colonia de la cepa de *E. coli* BL21 se inocula en 5 ml de medio LB líquido suplementado con el marcador de selección (ampicilina 100 mg/mL) y se deja crecer por aproximadamente 8 hrs a 30°C con agitación continua. Estos 5 mL se utilizan para inocular 50 mL de medio LB líquido selectivo dejándose crecer a 30°C con agitación hasta que alcance una  $A_{600\text{nm}}$  de entre 0.4-0.6 nM. Para determinar el tiempo de máxima acumulación de proteínas, a dicho cultivo se le adiciona IPTG como inductor a una concentración final de 500  $\mu\text{M}$  y se realiza una cinética a intervalos de 1 hora con un tiempo final de 5 horas tomando muestras de 2 mL en cada tiempo. Como control simultáneamente se procesa un cultivo al que no se le adiciona el inductor (IPTG). Para establecer el mejor tiempo de inducción, las muestras de la cinética se resuelven en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (Apéndice I). Una vez que se determina el tiempo de máxima concentración proteica, se repite el proceso de inducción con IPTG, colectando todo el medio de cultivo al tiempo seleccionado, el cual se centrifuga a 8000 RPM durante 10 min. La pastilla obtenida se puede procesar inmediatamente o almacenar a -20°C hasta el momento de su utilización. Para los análisis de expresión proteica, la pastilla se resuspende en 5 mL de PBS 1X (Apéndice I), de donde se toma una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  a la que se le adiciona un volumen del reactivo de Leammli (Apéndice I) [Leammli, 1970]. La muestra se calienta a 96°C por 5 min, se centrifuga brevemente y se resuelve en un gel de poliacrilamida al 10% a 120 Volts durante aproximadamente 2 hrs. El gel se tiñe con azul de Coomassie (Apéndice I) para su análisis visual (Sambrook *et al.*, 1989). Para el análisis de inmunodetección las proteínas contenidas en el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante electroelución a 400 mA en buffer de transferencia (Apéndice I). La membrana que contiene las proteínas se procesa de

la siguiente manera (Sambrook *et al.*, 1989): a) Se tiñe con Ponceau's al 0.2% para verificar la presencia de proteínas, esta membrana teñida se puede digitalizar para utilizarse como control de carga; b) Se incuba durante dos horas a °T ambiente o durante toda la noche a 4°C, en una solución de leche en polvo al 5% en PBS1X con 100-X Triton al 0.5%; c) Se lava tres veces con PBS1X con 100-X Triton al 0.5%; d) Se incuba con el anticuerpo primario (específico contra la proteína bajo estudio o en este caso contra el epítipo de 6 histidinas adicionado por el vector pDEST17), disuelto en PBS1X con 100-X Triton al 0.5%, durante 1 hora a °T ambiente; e) Se lava tres veces con PBS1X con 100-X Triton al 0.5%, para eliminar el exceso de anticuerpo; f) Se incuba con el anticuerpo secundario (fosfatasa alcalina) disuelto en PBS1X con 100-X Triton al 0.5%, durante 1 hora a °T ambiente; g) La presencia de la proteína de interés se revela siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor del anticuerpo secundario utilizado, en este caso ZIMED laboratorios inc.

#### **5.4.1. Purificación de proteínas.**

Las diferentes proteínas producidas en *E. coli* se purificaron por electroelución de la siguiente forma:

Se realiza una electroforesis del extracto proteico en gel de poliacrilamida de la manera descrita y el gel se tiñe por 10 min con azul de Coomassie, una vez identificada la banda correspondiente a la proteína de interés se destiñe el gel mediante lavados sucesivos con solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%, posteriormente la zona de la banda se corta con un bisturí y se coloca en una bolsa de diálisis con buffer de corrida (Apéndice I), esta se coloca en una cámara de electroforesis con el mismo buffer y la proteína se electroeluye aplicando corriente generada por 200 volts a 4°C por 2 hrs, posteriormente, con el fin de despegar la proteína electroeluida de la bolsa de diálisis, se invierte el voltaje durante 2 hrs. El buffer contenido dentro de la bolsa de diálisis se colecta y se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford,

1976). Este proceso se repite las veces necesarias para obtener la cantidad de proteína requerida (250 µg) para los ensayos de fosforilación *in vitro*.

#### **5.4.2. Ensayo de fosforilación *in vitro*.**

Se prepara un gel de poliacrilamida al 12% conteniendo 250µg/mL de la proteína que se quiere probar como sustrato de fosforilación. Los extractos de proteínas totales obtenidos de muestras que tentativamente contienen a las cinasas de la proteína incluida en el gel, se resuelven en condiciones desnaturalizantes a 200 Volts durante aproximadamente 2 horas. Al finalizar la electroforesis, las proteínas contenidas en el gel se renaturalizan mediante 3 lavados sucesivos de 30 minutos con 300 mL de buffer de renaturalización (Apendice I). El gel con las proteínas renaturalizadas se incuba en 30 mL de buffer de reacción que contiene ATP frío y  $\gamma$ -ATP<sup>32</sup> radiactivo (Apéndice I) por una hora, el ATP sirve como donador de los grupos fosfatos que se utilizan en la reacción de fosforilación y el  $\gamma$ -ATP no incorporado se elimina mediante lavados sucesivos (~3) con 100 mL de buffer de lavado (apendice I). Finalmente, el gel se seca a 120°C con vacío y se expone ante películas radiográficas Kodak a -70°C por al menos un día. La película se revela manualmente hasta la aparición de la señal de autorradiografía que servirá para el análisis de los resultados (Zhang y Klessig, 1997).

#### **5.5. Ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia.**

Para este tipo de ensayos se requieren cepas de *A. tumefaciens* PGV2260 portadoras de los vectores pSPYNE y pSPYCE, que expresan las proteínas cuya interacción se desea demostrar fusionadas a los extremos COOH-terminal (pSPYCE) o NH<sub>2</sub>-Terminal (pSPYNE) de la proteína amarillo fluorescente (YFP) que sirve como reportera de la interacción, una cepa de *A. tumefaciens* PGV260 portadora del plásmido p19 (Voinnet *et al.*, 2003) que sirve como facilitadora y potenciadora de la transformación de tejidos vegetales, así como una cepa de *A. tumefaciens* PGV2260 que expresa la GFP (Voinnet *et al.*, 2003), que sirve como

control positivo de los procesos de transformación y expresión de proteínas en células vegetales. Cada una de las cepas referidas se pone a crecer en 5 ml de medio LB líquido suplementado con los marcadores de selección correspondientes (rifampicina 100 mg/ml, ampicilina 100 mg/ml y kanamicina 50 mg/ml), durante 12 horas a 30°C con agitación continua.

Estos cultivos se utilizan para inocular 50 ml del mismo medio selectivo que se ponen a crecer en las mismas condiciones hasta una  $A_{600}$  cercana a 1. Los cultivos se centrifugan a 8000 RPM durante 10 minutos y las pastillas se resuspenden de manera independiente en 5 mL de medio de infiltración (MES 10 mM/MgCl<sub>2</sub> 10 mM [Voinnet *et al.*, 2003]), de las que se realizan diluciones 1:20 para determinar su  $A_{600}$  nm. Los volúmenes de cada cultivo se ajustan para obtener una  $A_{600}$  final de 1 de cada cepa en la mezcla de transformación compuesta de las cepas cuya interacción se desea evaluar y la cepa facilitadora p19. De la misma manera se preparan mezclas de los controles negativos (cepas potencialmente interactuantes individuales) y positivos (cepa que expresa GFP). A cada una de las mezclas se les adiciona 5 µL de acetosiringona a una concentración final de 50 µg/mL y se incuban por 3 horas a °T ambiente. Para la agroinfiltración en hojas de plántulas de *Nicotiana benthamiana* de alrededor de 6 semanas de edad, se utiliza una jeringa de insulina sin aguja (Walter *et al.*, 2004). Los análisis de interacción en protoplastos de hojas de *N. benthamiana* infiltradas, se realizan a los 2 días del tratamiento de transformación.

#### **5.5.1. Obtención de protoplastos de *N. benthamiana*.**

Los ensayos de BiFC sobre hojas de *N. benthamiana* se realizan sobre protoplastos obtenidos de las hojas infiltradas. Para esto, las hojas se cortan en tiras muy delgadas con la ayuda de un bisturí y se colocan en una solución enzimática (Apéndice I) donde se incuban por 3 horas en oscuridad, a °T ambiente y agitación suave. La liberación de protoplastos se verifica en microscopio estereoscópico y una vez que es evidente la suspensión se filtra a través de una malla de nylon de 100 µm de poro, estéril y humedecida con solución isotónica

(Apendice I), al filtrado se le agrega un volumen de la misma solución y se centrifuga a 3000 RPM durante 3 min, el sobrenadante se elimina cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur, conservando alrededor de 500  $\mu$ L para resuspender la pastilla. La fluorescencia en los protoplastos se analiza en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Y-FL) y por microscopía confocal excitando a 488 nm (ZEISS LMS-510).

### **5.6. Extracción de RNA (método del TRIzol Invitrogen Life Technologies).**

El tejido recolectado se muele en un mortero manteniéndolo siempre frío con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo homogéneo, a 50-100 mg de este tejido pulverizado se le agrega 1 mL de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, cat#15596-018) y se mezcla con la ayuda de un vortex. Posteriormente se deja reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionan 200  $\mu$ L de cloroformo por cada mL de TRIzol utilizado y se agita con ayuda de un vortex. Después se centrifugan las muestras a 13,200 rpm durante 15 minutos a 4°C y la parte acuosa se recupera transfiriéndola a un tubo eppendorf limpio al que se le adicionan 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico por cada mL de TRIzol utilizado, se mezcla suavemente y se deja en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente ó a -20°C. Si se decide no continuar con la extracción, se centrifuga a 13,200 rpm por 10 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla (sedimento blanco) con 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRIzol utilizado, se agita bien con la ayuda de un vortex, se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante, posteriormente se deja secando por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar completamente los restos de etanol. Finalmente, la pastilla se resuspende en 400  $\mu$ L de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) ó de calidad  $\mu$ Q estéril. Para determinar la concentración y pureza del RNA obtenido se utiliza un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 260/280 nm, haciendo la cuantificación según la siguiente relación:

$$1U A_{260} \text{ de RNA} = 40 \mu\text{g/ml}$$

De manera general, una solución de RNA puro tiene una relación  $A_{260}/A_{280}$  de alrededor de 2.0.

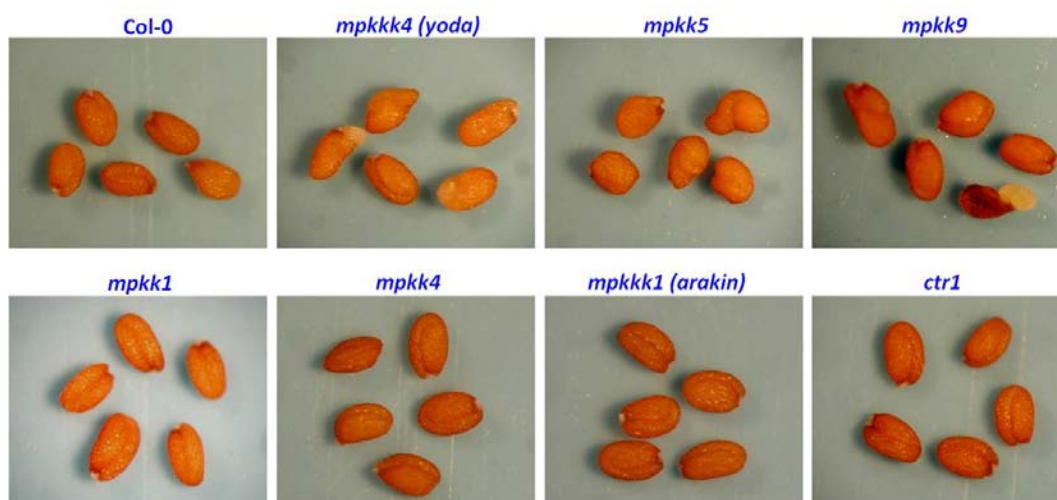
**5.7. Extracción de DNA (extracción con CTAB de “positional cloning in *Arabidopsis*” <http://carnegiedpb.stanford.edu/methods/ppsuppl.html>).**

se muele una pequeña cantidad de tejido recolectado en un tubo eppendorf de con la ayuda de un pistilo, se le agregan 300  $\mu\text{L}$  de buffer CTAB 2X (apéndice 1) y se incuban a  $65^{\circ}\text{C}$  por al menos 10 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se deja 5 minutos a temperatura ambiente, se le agregan 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se mezcla con ayuda de un vortex. Después se centrifuga a 13,200 rpm por 10 minutos, hasta observar 2 fases de las cuales se recupera la fase acuosa que se encuentra en la parte superior del tubo y se transfiere a un tubo limpio, se le agregan 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se mezcla bien por inversión. Posteriormente se centrifuga a 13,200 rpm por 10 minutos para precipitar el DNA, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%, se agita bien con la ayuda de un vortex se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos y se elimina el sobrenadante, después se deja secando por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar completamente los restos de etanol. Finalmente, la pastilla se resuspende en 50  $\mu\text{L}$  de agua de calidad  $\mu\text{Q}$  estéril, el DNA se puede almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$  por semanas o a  $-20^{\circ}\text{C}$  por periodos prolongados. Para reacciones de PCR se utilizan en promedio 1-2  $\mu\text{L}$ .

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Objetivo específico 1.

Caracterización fenotípica en lo que se refiere a defectos sobre el desarrollo del embrión y el desarrollo de la planta, de un grupo de mutantes de inserción de T-DNA, pertenecientes a las familias MPKKK (3 miembros) y MPKK (4 miembros). Se han obtenido tres generaciones de las líneas mutantes *mpkkk1*, *mpkkk4* (*yoda*), *mpkk1*, *mpkk4*, *mpkk5*, *mpkk9* provenientes del banco SALK (Figura 13). Adicionalmente, en este estudio se incluyó la mutante *ctr1*, que ya formaba parte de la colección del laboratorio, que codifica para una MPKKK involucrada en la vía de señalización de etileno (Ouaked *et al*, 2003).



**Figura 13.** Fenotipos de la tercera generación de semillas de mutantes del banco de SALK y la mutante *ctr1*. Las mutantes *mpkkk4* (*yoda*), y *mpkk9* presentan fenotipos de semillas deformes y explotadas, la mutante *mpkk5* presenta fenotipo de semillas deformes mientras que las mutantes *mpkkk1*, *ctr1*, *mpkk1* y *mpkk4* no presentan fenotipos de semillas explotadas ni deformes.

En los análisis de las mutantes se encontró que la mutante *mpkk5* presenta fenotipo de semillas deformes, mientras que las mutantes *mpkkk4* y *mpkk9* presentan tanto el fenotipo de semillas deformes como de semillas explotadas. Por su parte, las mutantes *ctr1*, *mpkkk1*, *mpkk1* y *mpkk4* no muestran ningún fenotipo de defectos en la semilla o el embrión (Figura 13).

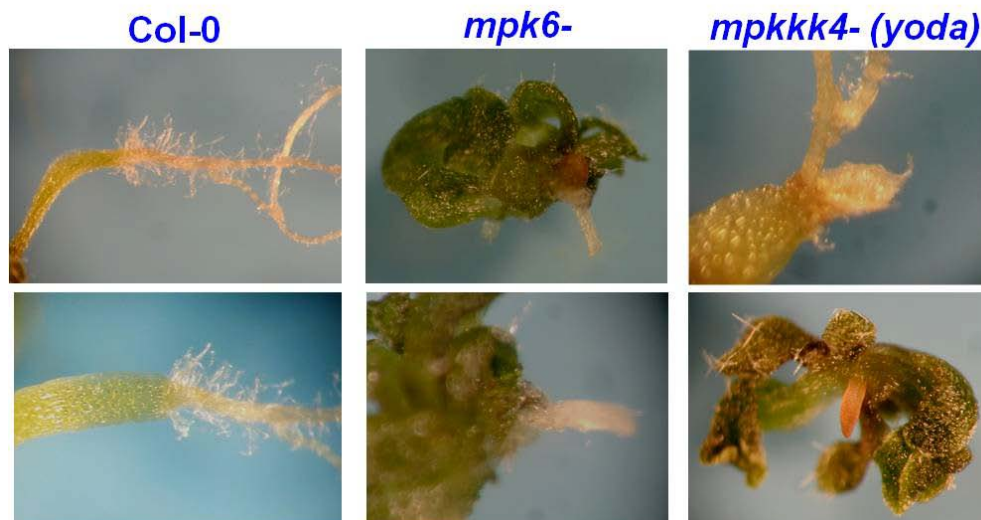
Interesantemente, la mutante *yoda* muestra los fenotipos de semillas normales, deformes y explotadas en proporciones muy similares a los encontrados en la mutante *mpk6* (Figura 14).



**Figura 14.** Fenotipos de semillas provenientes de la mutante *mpkkk4 (yoda)*. La mutante presenta fenotipos de semillas normales, deformes y explotadas muy similares a los encontrados en la mutante *mpk6*.

Adicionalmente, en los análisis de desarrollo del sistema radical de la mutante *yoda*, se observó que a partir de semillas explotadas se obtienen plántulas con un desarrollo anormal que si bien tiene la capacidad de formar raíces adventicias, muestran un evidente arresto del crecimiento de la raíz primaria (Figura 15). En el caso de las semillas deformes la mutante *yoda* muestra una alta producción de pelos radicales y un mayor crecimiento de la raíz primaria con respecto a plántulas del tipo silvestre (Figuras 16 y 17).

Nuevamente, es importante resaltar que los fenotipos descritos de semilla y de raíz de la mutante *yoda* son muy similares a los mostrados por la mutante *mpk6*.

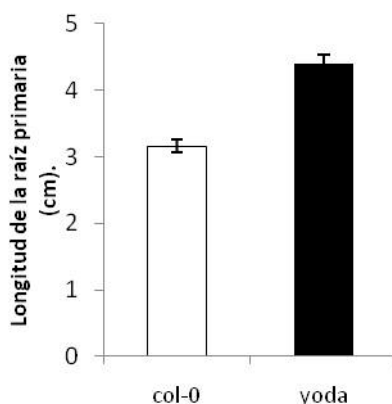




**Figura 15.** Fenotipos de la raíz de plántulas provenientes de embriones explotados de las mutantes *mpk6* y *mpkkk4* (*yoda*). Tanto las plántulas provenientes de *mpk6* explotados como de *yoda* explotados carecen de raíz primaria y producen raíces adventicias para completar su ciclo de vida. Para el tipo silvestre (*Col-0*) se muestra la zona de transición entre el hipocotilo y la raíz primaria. n= 20 plántulas de 15 días después de germinación.



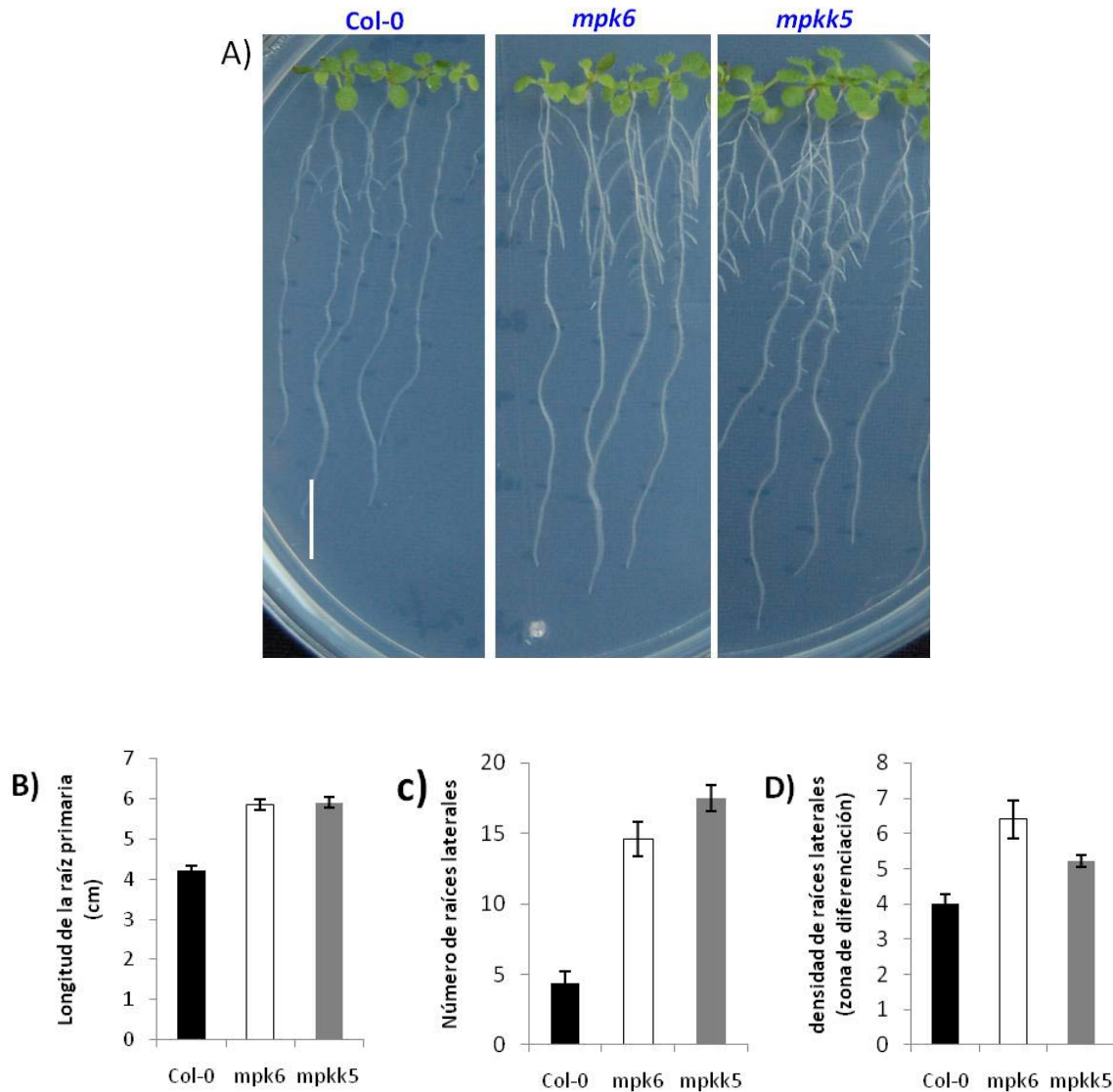
**Figura 16.** Fenotipos de los pelos radicales de plantulas provenientes de semillas explotadas de las mutantes *yoda* y *mpk6* (zona meristemática). La mutante *yoda* tiene fenotipo de sobreproducción de pelos radicales similar al mostrado por la mutante *mpk6*. n= 20 plántulas de 15 días después de germinación.



**Figura 17.** Cuantificación del crecimiento de la raíz primaria de la mutante *mpkkk4* (*yoda* semillas deformes). Las semillas deformes de la mutante *mpkkk4* producen un raíz primaria más larga que las plántulas del tipo silvestre (*Col-0*). n=20 plántulas a los 10 días después de germinación.

Por lo que respecta a las mutantes de la familia MPKK, los fenotipos de semillas normales, deformes y explotadas, se presentan en proporciones muy diferentes a los encontrados en las mutantes *mpk6* y *yoda*. La mutante *mpkk5* no produce embriones explotados, mientras que la proporción de semillas deformes es superior al 70%. Por su parte, en la mutante *mpkk9* el porcentaje de embriones explotados es menor al 1% y la proporción de semillas deformes es de alrededor del 9% (Figuras 13 y a3 Apéndice II). En cuanto a los análisis sobre el desarrollo del sistema radical se observa que apartir de semillas normales de la mutante *mpkk5* se producen plantulas con fenotipo de raíz mas larga, con un mayor número de raíces laterales y una mayor densidad de raíces laterales (Figura 18),

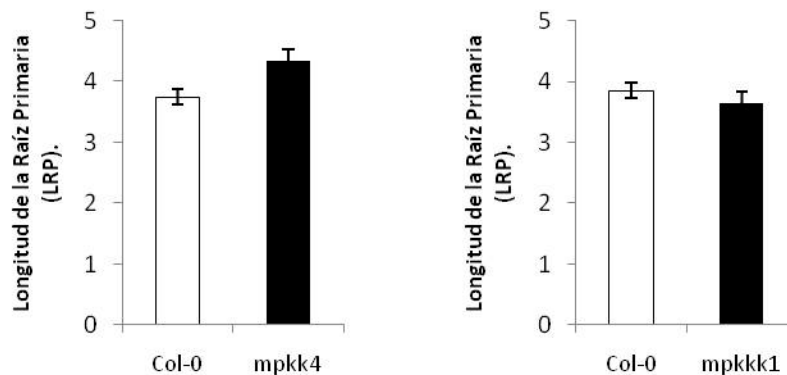
mientras que las semillas deformes desarrollan una raíz primaria más corta que la de plántulas del tipo silvestre. Ambos fenotipos muy parecidos a los mostrados por la mutante *mpk6* (Figura 27). En el caso de la mutante *mpkk9* no se observaron diferencias significativas en el desarrollo del sistema radical a las plántulas del tipo silvestre.



**Figura 18.** Fenotipos y cuantificación del crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales de plántulas provenientes de semillas normales de las mutantes *mpk6* y *mpkk5*. Comparadas con plántulas del tipo silvestre, tanto las plántulas de la línea *mpk6* como las de la mutante *mpkk5* tienen la raíz primaria más larga (A y B), con una mayor formación de raíces laterales (C) y una mayor densidad de raíces laterales/cm en la zona de formación de raíces laterales (D). n=30 plántulas de 10 días después de germinación.

En los análisis sobre el desarrollo del sistema radical de las mutantes *mpkk4* y *mpkkk1* (*arakin*), se han encontrado ligeras diferencias en el crecimiento de la raíz de la mutante *mpkk4*, mientras que *mpkkk1* tiene un crecimiento de raíz primaria similar al de plántulas del tipo silvestre (Figura 19).

Para profundizar en estos estudios, se realizó una cruce entre las mutantes *mpkk5* y *mpkk9*, para generar una doble mutante que actualmente está en proceso de selección para posteriormente someterla a los análisis de desarrollo correspondientes.

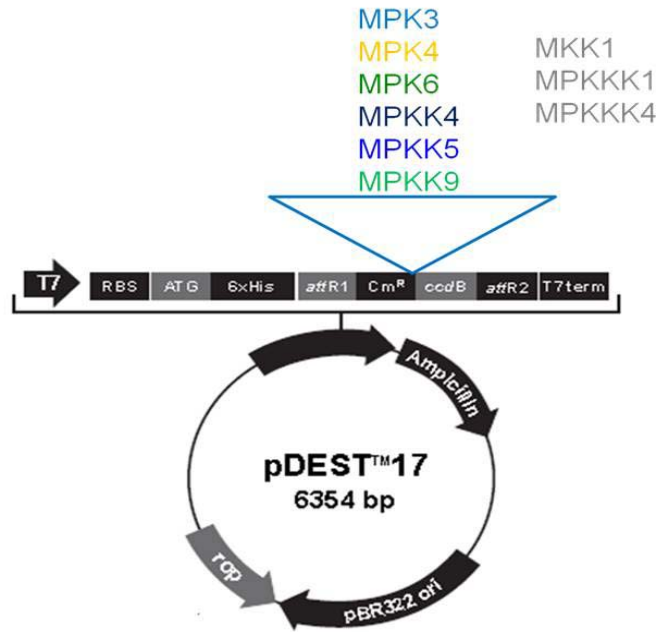


**Figura 19.** Análisis del sistema radical de las mutantes *mpkk4* y *mpkkk1* (*arakin*) [semillas con fenotipo normal en ambos casos]. La mutante *mpkk4* presenta una raíz primaria más larga mientras que la mutante *mpkkk1* no presentan diferencias en el crecimiento de la raíz primaria comparada con las plántulas del tipo silvestre (Col-0). n=20 plántulas de 10 días después de germinación.

## 6.2. Objetivos específicos 2 y 3.

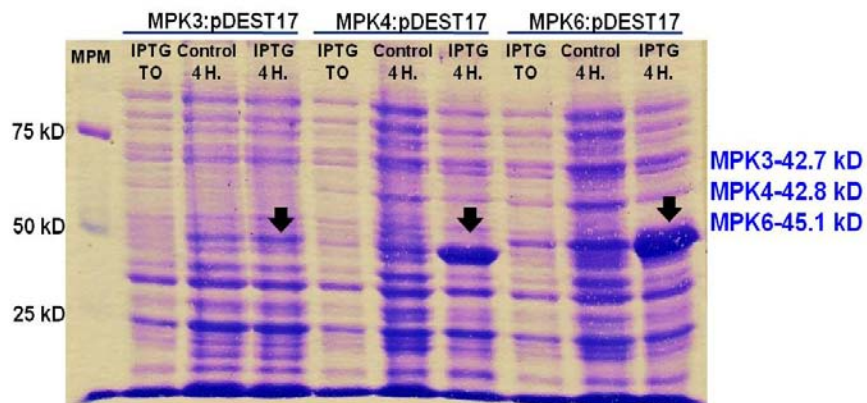
Determinar las posibles interacciones *in vitro* y/o *in planta* entre MPK6 y cinasas MPKK (Objetivo 2), así como entre cinasas MPKKK y cinasas MPKK (Objetivo 3) potencialmente involucradas en los procesos de desarrollo bajo estudio.

Los genes *MPK3*, *MPK4*, *MPK6*, *MPKK4*, *MPKK5* y *MPKK9* se clonaron en el vector pDEST17 para dirigir su sobreexpresión y la sobreproducción de proteína en bacterias (Figura 20). Adicionalmente se recuperaron los c-DNAs de los genes *MPKK1*, *MPKKK1* y *MPKKK4*, mismos que actualmente están en proceso de clonación en el mismo vector de sobreexpresión de proteínas en bacterias (Figura a1 Apéndice II).



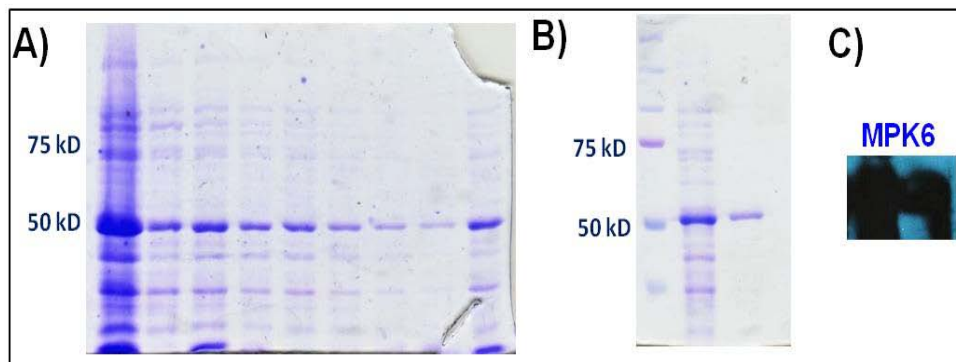
**Figura 20.** Clonación de genes en el vector pDEST17. Se han clonado los C-DNA de los genes *MPK3*, *MPK4*, *MPK6*, *MPKK4*, *MPKK5* Y *MPKK9* en el vector pDEST17 para la sobreexpresión de estas proteínas en bacterias. La clonación de los genes *MPKK1*, *MPKKK1* y *MPKKK4* se encuentra en proceso.

Utilizando las construcciones *MPK4::pDEST17* y *MPK6::pDEST17*, se ha logrado la sobreproducción de las proteínas *MPK4* y *MPK6*. Por su parte, la construcción *MPK3::pDEST17* no ha resultado adecuada para estos fines (Figura 21).



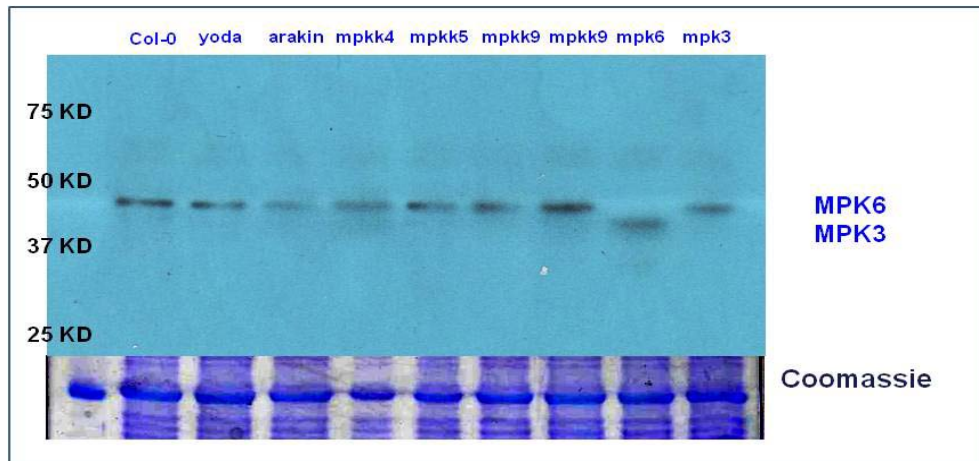
**Figura 21.** Inducción de la expresión de las proteínas *MPK4* y *MPK6* en bacterias (*E. coli*). La inducción de la expresión se da a las 4 horas después de adicionar al cultivo 500µM de IPTG como inductor de la expresión génica. Las flechas negras indican las proteínas correspondientes. También se muestra la construcción *MPK3::pDES17*, con la que no se ha logrado la sobreproducción de proteína. TO=proteína extraída al momento de agregarle el IPTG, IPTG 4H= proteína extraída a las 4 horas después de agregarle el IPTG y control 4H= proteína extraída a las 4 horas en cultivos sin inductor.

Para la purificación de proteínas inicialmente se utilizaron las columnas de afinidad con resina de níquel, para lo que está diseñado el vector. Sin embargo, esta purificación resultó muy inespecífica (Figura 22A), por lo que se decidió intentar la purificación de las proteínas sobreexpresadas en bacterias mediante electroelución. Esta estrategia resultó en una adecuada recuperación de proteína pura, cuya identidad se ha corroborado mediante ensayos de tipo western blot con anticuerpos específicos (Figura 22 B y C).



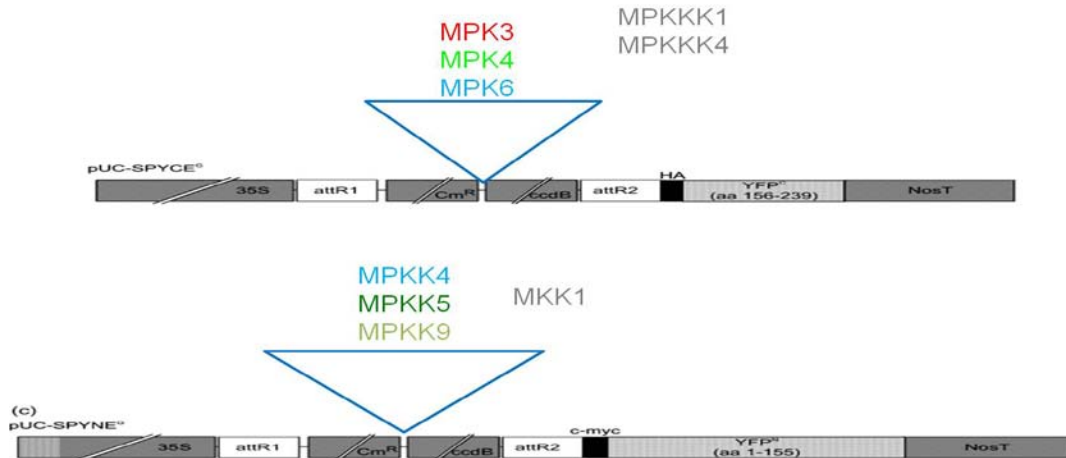
**Figura 22.** Extracción proteica e identificación de la proteína MPK6. Se ha realizado extracción de proteínas por columna de afinidad con resina de níquel (A) y por electroelución (B), la identidad de la proteína MPK6 se ha corroborado por ensayos de western blot con anticuerpos específicos (C).

Intentando determinar si la ausencia de alguna MPKKK o MPKK afecta la actividad de MPK6, se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* utilizando como sustrato de fosforilación a la proteína de mielina básica bovina. En el ensayo enzimático se incluyeron extractos de proteínas totales obtenidos de mutantes de inserción de T-DNA para los genes *MPKKK1*, *MPKKK4*, *MPKK4*, *MPKK5*, *MPKK9*, *MPK6* y *MPK3* (Figura 23). Puesto que, con excepción del extracto de la mutante *mpk6* que se utilizó como control negativo, en todos los casos experimentales se obtuvo actividad de MPK6. Con estos resultados se concluyó que dada la bien documentada redundancia de función de las MAPKs a todos los niveles del modulo, esta estrategia resulta inadecuada para identificar posibles activadores directos de MPK6. Entre las alternativas para poder utilizar este tipo de ensayos para nuestros fines, se contemplan la generación de dobles (o triples) mutantes de los genes bajo análisis o la obtención de extractos de proteína de tejidos vegetales específicos.



**Figura 23.** Ensayo de fosforilación *in vitro*. El ensayo de fosforilación *in vitro* se realizó usando como sustrato de MPKs a la proteína de mielina básica bovina. En el ensayo se utilizaron como fuente enzimática extractos de proteína total de las diferentes líneas mutantes para los genes *MPKKKs* y *MPKKs*, indicados. Como controles se usaron extractos proteicos de plántulas del tipo silvestre (Col-0; control positivo) y mutantes en los genes *MPK6* (control negativo) y *MPK3* (para corroborar la identidad de *mpk6*)

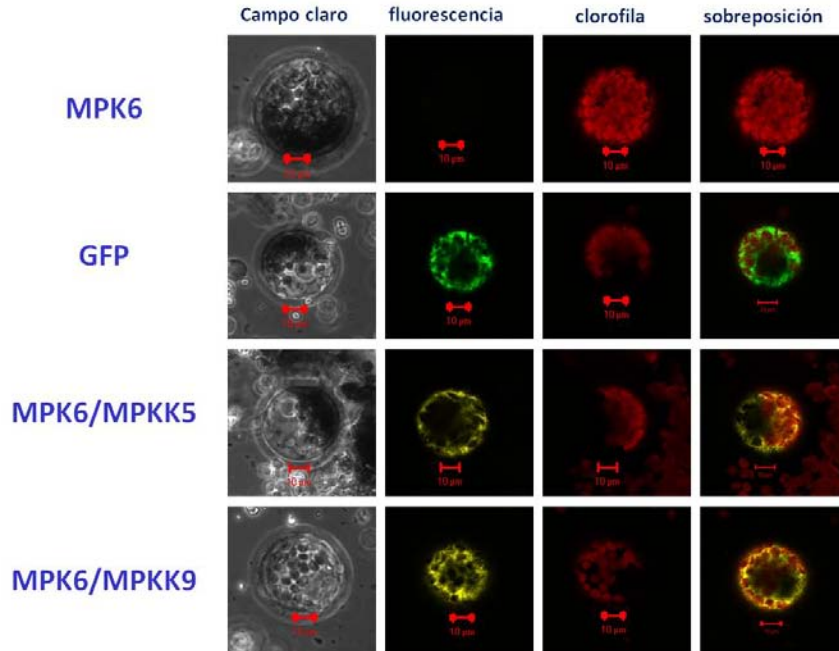
Como una estrategia alterna para demostrar interacción entre *MPK6* y las *MPKKs* consideradas para ser sus activadores directos, se realizaron ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC). Para estos fines se clonaron los genes *MPK3*, *MPK4*, *MPK6*, *MPKK4*, *MPKK5* y *MPKK9* en los vectores pSPYNE (*MPK3*, *MPK4* y *MPK6*) o pSPYCE (*MPKK4*, *MPKK5* y *MPKK9*) (Figura 24) (Lentz *et al*, 2009), específicamente diseñados para este tipo de ensayos. Adicionalmente se tienen clonados los c-DNAs de los genes *MPKK1*, *MPKKK1* y *MPKKK4*, en el vector de entrada del sistema Gateway (pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO 2580 bp [Figura a2, Apéndice II]) y actualmente se está intentando subclonarlos en los vectores referidos.



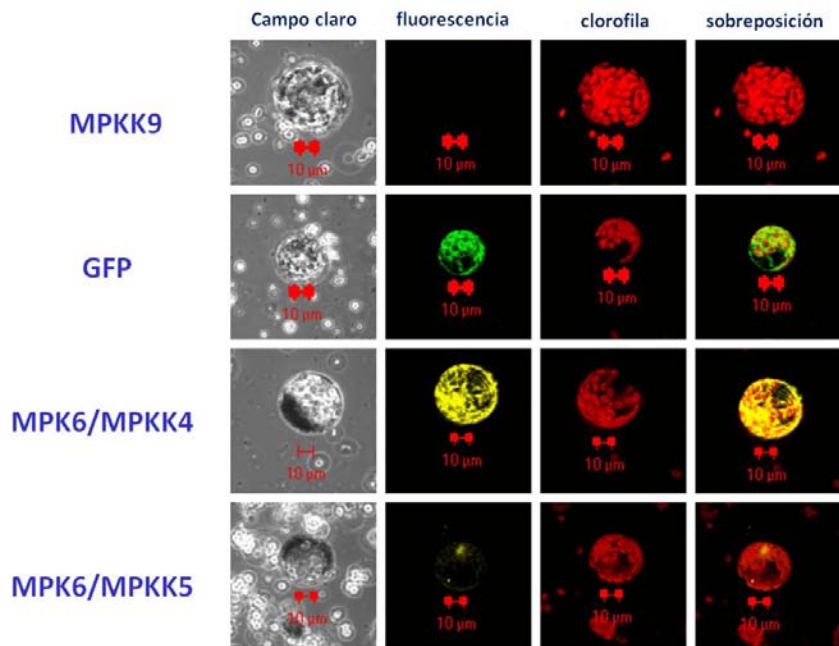
**Figura 24.** Clonación de genes en los vectores pSPYNE y pSPYCE para ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC). Se han clonado los C-DNA de los genes *MPK3*, *MPK4*, y *MPK6* en el vector pSPYCE y *MPKK4*, *MPKK5* y *MPKK9* en el vector pSPYNE. La clonación de los genes *MPKK1*, *MPKKK1* y *MPKKK4* en estos vectores se encuentra en proceso.

En un ensayo preliminar de BiFC se encontró que las interacciones *MPK6/MPKK5* y *MPK6/MPKK9* son positivas *in planta*. Cuando las construcciones independientes portadoras de cada una de las proteínas fusionadas a los extremos amino o carboxi terminal de la proteína reportera (Figura 24), son coinfiltrados en hojas de *Nicotiana benthamiana*, la reconstitución de la actividad de la proteína YFP es evidente en protoplastos obtenidos 48 horas después de la infiltración de hojas (Figura 25). La repetición de estos experimentos, incluyendo construcciones para analizar otras interacciones, confirmo la interacción entre *MPK6* y *MPKK5* y revelo una interacción entre *MPK6* y *MPKK4* (Figura 26).





**Figura 25.** Ensayo de BiFC para determinar interacciones proteicas *in planta*. Se muestran imágenes de microscopía confocal que demuestran la interacción entre la proteína MPK6 con las proteínas MPKK5 y MPKK9. El ensayo consistió de coinfiltraciones de hojas de plantas de *Nicotiana banthamiana*, con cada una de las construcciones correspondientes, de las que a las 48 horas posteriores a la infiltración se prepararon protoplastos. Como control positivo de la infiltración se muestran protoplastos de hojas infiltradas con la proteína GFP y como control negativo protoplastos de hojas infiltradas exclusivamente con la construcción MPK6::pSPYCE.



**Figura 26.** Ensayo de BiFC para determinar interacciones proteicas *in planta*. Se muestran imágenes de microscopía confocal que demuestran la interacción entre la proteína MPK6 con las proteínas MPKK5 y MPKK4. El ensayo consistió de coinfiltraciones de hojas de plantas de *Nicotiana banthamiana*, con cada una de las construcciones correspondientes, de las que a las 48



horas posteriores a la infiltración se prepararon protoplastos. Como control positivo de la infiltración se muestran protoplastos de hojas infiltradas con la proteína GFP y como control negativo protoplastos de hojas infiltradas exclusivamente con la construcción MPK9::pSPYCE.

Los resultados de los ensayos de BiFC claramente demuestran que hay una interacción directa entre la proteínas MPK6 y las proteínas MPKK4, MPKK5 y MPKK9. A este respecto, es importante resaltar que las interacciones MPK6/MPKK4 y MPK6/MPKK5, ya habían sido reportadas mediante ensayos de dos híbridos (Andreasson y Ellis 2010) sin embargo, la interacción MPK6/MPKK9 solo ha sido reportada anteriormente por ensayos de fosforilación in vitro (Andreasson y Ellis 2010; Popescu *et al.*, 2009), lo que dado el fenotipo de semilla y/o raíz que estas presentan, sugiere la posible participación de estas MAPKs en una cascada de señalización implicada en el control de este (os) programa (s) de desarrollo. La corroboración de esta hipótesis es uno de las principales perspectivas a corto plazo de este trabajo.

## 7. DISCUSIÓN.

El módulo de señalización de cascadas del tipo MAPK funciona mediante eventos de fosforilación secuencial de proteínas (Misrha *et al.*, 2006). El reconocimiento de un ligando por un receptor permite la fosforilación de una MPKKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase), que a continuación activa por fosforilación a la siguiente cinasa MPKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase), que a su vez fosforila a una MPK (Mitogen Activated Protein Kinase), capaz de fosforilar otras proteínas (quinasas, lipasas, fosfatasas) incluyendo a factores de transcripción (Figura 7). El resultado de estos eventos sucesivos de fosforilación de proteínas en respuesta a varios tipos de estrés biótico y abiótico, así como a fitohormonas, conduce a respuestas celulares específicas que afectan el metabolismo o la expresión genética para modular diversos y numerosos procesos celulares (Misrha *et al.*, 2006).

De acuerdo a características estructurales se ha establecido que el genoma de *Arabidopsis* contiene 90 MAPKs, de las cuales 60 corresponden a la familia de las MPKKKs, 10 a la familia de las MPKK y 20 a la de las MPKs. Los miembros de cada familia se identifican por numeración simple y en base sus características estructurales se subdividen en grupos (MAPK group, 2002). Debido a que el número de integrantes en la familia de las MPKK es apenas la mitad del número de integrantes de la familia MPK, resulta evidente que las MPKKs pueden activar a más de una MPK creando una complicada red de intercomunicación entre varias rutas de señalización (MAPK group, 2002). La identificación de cada uno de los miembros de las MPKs que constituyen una cascada para controlar una respuesta determinada, aunado al esclarecimiento de las intercomunicaciones entre diferentes rutas de señalización, es objeto de estudio de varios grupos de investigación alrededor del mundo. En plantas, a la fecha solamente se han logrado establecer los componentes de las vías de señalización que controlan los procesos de respuesta a flagelina y desarrollo de estomas (Suarez-Rodríguez *et al.*, 2006; Lampard *et al.*, 2009). Asimismo, a pesar de que algunos de los componentes de estas cascadas no están plenamente identificados, se ha logrado determinar intercomunicación entre las vías de respuesta a auxinas (regulación del

ciclo celular) y respuestas a estrés oxidativo mediante la participación de una MPKKK (ANP), entre las vías de respuesta a estrés biótico y estrés abiótico mediante la participación de MPK6 y MPK3 y entre vías de respuesta a estrés biótico y estrés abiótico mediante la participación de MPKK4 y MPKK5 entre otras (Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Por otra parte, también se han descrito procesos de redundancia funcional en los cuales más de una MPKK puede activar a una MPK en un mismo proceso, por ejemplo, en respuesta a peróxido de hidrogeno las MPKK4 y MPKK5 activan a las cinasas MPK3/MPK6 (Kovtun *et al.*, 2000), mientras que las MPKKs MPKK4 y MPKK5 regulan negativamente y las MPKK7 y MPKK9 regulan positivamente el desarrollo de estomas a través de la activación de las MPKs 3 y 6 (Lampard *et al.*, 2009). La redundancia funcional también se ha evidenciado a nivel de los sustratos que fosforilan las MPK, mediante estudios de proteomica se ha demostrado que cinasas MPK3 y MPK6 comparten 26 sustratos (Feilner *et al.*, 2005) y más recientemente por estudios del tipo de dos híbridos, se demostró que estas mismas cinasas interactúan con las fosfatasa PTP1, MKP1 y MKP2 y con los factores de transcripción EIN3 y SPEECHLESS (Andreasson y Ellis, 2010).

En este complicado escenario de intercomunicación y redundancia funcional, parece claro que la disponibilidad de mutantes con fenotipos que no pueden ser complementados por otros miembros de la familia, representa una valiosa herramienta experimental para el reconocimiento de los diferentes componentes de la cascada de MAPKs actuando en el proceso tipificado por el fenotipo.

### **7.1. La cinasa MPK6 participa en el desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana*.**

La mutante *mpk6* previamente se reportó que tiene un fenotipo caracterizado porque el embrión se encuentra protruido fuera de la cubierta de la semilla (“burst seeds”) en una proporción del 7% de las semillas de dos alelos homocigotos independientes de la mutante (*mpk6-2* y *mpk6-4*) [Bush y Krysan 2007]. Por otra parte, para uno de los alelos de esta mutante (*mpk6-2*) también se reportaron

fenotipos en el desarrollo de la raíz, estableciéndose que algunas plántulas de la mutante carecen de raíz primaria (“no root”) mientras que otras muestran claros defectos en el desarrollo de sus raíces (“short root”) [Muller *et al.*, 2009]. La cuantificación de estos fenotipos de raíz demostró que con respecto a plántulas del tipo silvestre, la mutante tiene una mayor capacidad para la formación de raíces adventicias y que la longitud de la raíz primaria de la mutante “short root” es 2 veces más corta, si bien, su producción de raíces laterales no parece estar alterada (Muller *et al.*, 2009). La existencia y persistencia de los fenotipos descritos a través de generaciones, descartan la posible redundancia de función entre MPK6 y otras cinasas de este tipo, en las vías de señalización que controlan estos importantes procesos de desarrollo. Tomando ventaja de estos resultados, en nuestro grupo de trabajo nos enfocamos a profundizar en su análisis. Así fue que logramos establecer que el fenotipo de semillas explotadas (Bush y Krysan 2007), representa el más penetrante de los tres fenotipos (semillas explotadas, semillas deforme y semillas normales) que pueden asociarse a la mutación de *mpk6* (Figura 9). Además, en este trabajo establecimos que los fenotipos de semilla están directamente relacionados con los fenotipos del sistema radical previamente descritos (Muller *et al.*, 2009). Es decir, un fenotipo de semilla determinado resulta en un fenotipo de raíz, dando lugar a los fenotipos de “semillas explotadas/ausencia de raíz primaria”, “semillas deformes/raíz primaria corta” y “semillas normales/raíz primaria larga” aquí descritos, cuya variedad, al estar bajo un mismo fondo genético, corresponde a un fenómeno de penetrancia y expresividad (Griffiths *et al.*, 2000).

En este sentido, es importante resaltar que en el reporte del fenotipo de desarrollo de raíz de Muller *et al.* (2009), no se tomó en cuenta la relación que existe entre los fenotipos de la semilla y los fenotipos de raíz, dando lugar a una interpretación errónea de los resultados. Particularmente, es importante mencionar que la producción de raíces adventicias está restringida a plántulas provenientes de semillas explotadas que no desarrollan raíz primaria, por lo que solamente llegan a completar su ciclo de vida mediante la producción de este tipo de raíces. Por su parte, las plántulas provenientes de semillas deformes desarrollan una raíz corta

que aparenta tener una mayor densidad de raíces laterales pero que realmente, en comparación con plántulas del tipo silvestre, no tienen un mayor número de este tipo de raíces. Finalmente las plántulas de la línea mutante *mpk6* que provienen de semillas normales, en relación con plántulas del tipo silvestre, tienen una raíz primaria más larga, así como una mayor densidad y número de raíces laterales (Figura 9). Adicionalmente a los fenotipos en raíz primaria y en raíces laterales descritos en este trabajo, todas las plántulas de la línea mutante *mpk6* independiente del tipo de semillas de las que provengan, producen una mayor cantidad de pelos radicales que además son más largos (Figura 11). Nuestros resultados, por una parte sugieren que la MPK6 está involucrada en el control de los programas de desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* y por otra, establecen que en cualquier estudio fenotípico y/o fisiológico que se realice con la mutante *mpk6*, deben tomarse en cuenta los diferentes fenotipos asociados a la mutación *mpk6* ya que el utilizar una mezcla de semillas invariablemente conducirá a dificultades en la repetición de condiciones experimentales y errores en la interpretación de resultados.

## **7.2. La mutante *mpkkk4* tiene fenotipos de semilla y de desarrollo del sistema radical similares a la mutante *mpk6*.**

Dada la naturaleza modular de las cascadas de MAP cinasas (Figura 7) y que MPK6 es representante del último eslabón de la cadena, nosotros hipotetizamos que mutantes en cinasas actuando río arriba de MPK6 podrían presentar fenotipos de semilla y/o raíz similares a los descritos, a través de cuya identificación sería posible ubicarlos en la cascada de MAPKs que participa en alguno de los programas de desarrollo bajo estudio. Con esta idea en mente, se utilizó el fenotipo de la mutante *mpk6* como marcador fenotípico para realizar un escrutinio sobre el grupo de mutantes de inserción de T-DNA en genes MPKKKs y MPKKs ya referidas en la sección de materiales y métodos. En el transcurso de nuestro estudio, en un trabajo enfocado a la búsqueda en mutantes de genes EMB (embryo-defective), se encontró una mutante con un fenotipo inusual para estos

genes descrito como “externo”, debido a que los embriones cuando maduran se protruyen de la semilla (Meinke *et al.*, 2009). El locus de esta mutante designada *emb71*, resulto ser un alelo del gen *YODA*, que codifica para una MPKKK (MAPKKK4/At1G63700) previamente reportada como el primer componente de una cascada de MAPKs que promueve la proliferación de células del linaje basal (células del suspensor) durante el desarrollo del embrión (Lukowitz *et al.*, 2004). En nuestro trabajo, un análisis más detallado de la mutante *yoda* reveló no solamente que el fenotipo de semillas explotadas es muy similar al mostrado por la mutante *mpk6*, sino que también produce semillas deformes y normales (Figura 14). Adicionalmente, nosotros encontramos una asociación entre los fenotipos de semilla y fenotipos de raíz consistentes en ausencia de raíz primaria en plántulas provenientes de semillas explotadas (Figura 15) una raíz primaria más larga, tanto en plántulas provenientes de semillas deformes, como en plántulas provenientes de semillas normales, ambas con una mayor producción de pelos radicales (Figuras 16 y 17). Estos resultados indican que *yoda* aparentemente es la MPKKK actuando río arriba de MPK6 en la cascada de fosforilación que participa en los programas de desarrollo del embrión y del sistema radical de *A. thaliana*. De hecho, *YODA* ya ha sido reportada para actuar río arriba de MPK6 en los programas de producción de estomas (Lampard *et al.*, 2009).

### **7.3. Las mutantes *mpkk5* y *mpkk9* tienen fenotipos de semilla y/o raíz similares a la mutante *mpk6*.**

Con el objetivo de identificar algún miembro de la familia MPKK actuando en la misma cascada de MAPKs que *yoda* y *MPK6*, que participa en los programas de desarrollo de semillas y raíz, también se realizaron escrutinios fenotípicos en (4) mutantes de MPKKs. Como resultado de este análisis, se encontró que la mutante *mpkk9* tiene fenotipos de semillas normales, deformes y explotadas en proporciones de 90%, 9% y <1% (Figura a3), respectivamente que son notablemente diferentes a los encontrados en *mpk6* y *yoda* (Figura 13). Además, la mutante *mpkk9*, no presenta fenotipos en el desarrollo del sistema radical. Los

bajos porcentajes de semillas deformes y explotadas encontradas en esta mutante, así como la ausencia de fenotipos del sistema radical sugieren que la función de esta enzima puede estar siendo parcialmente complementada por alguna otra MPKK. Como ya mencionó, la redundancia funcional entre MAPKs ocurre a todos los niveles y debe ser más acentuada al nivel de MPKKs, cuyo número en el genoma de *Arabidopsis* (10) resulta insuficiente para activar a las 20 MPKs actuando río abajo de ellas (MAPK group, 2002). De cualquier manera, los fenotipos de semilla mostrados por esta mutante, sugieren fuertemente su participación en el programa de desarrollo de semilla.

Otra de las mutantes en MPKKs identificadas en este estudio para mostrar fenotipos de semilla y/o raíz fue *mpkk5*. En esta mutante no se han encontrado fenotipos de semillas explotadas, pero muestra una gran cantidad de semillas deformes (más del 70%) y semillas normales en baja proporción (menos del 30%) [Figura a3]. Además, ambos fenotipos de semilla parecen estar asociados con fenotipos en el desarrollo del sistema radical. Específicamente, las plántulas provenientes de semillas deformes tienen una raíz primaria más corta (Figura 27), mientras que las plántulas provenientes de semillas normales, tienen una raíz primaria más larga, un mayor número y densidad de raíces laterales, en comparación a plántulas del tipo silvestre (Figuras 18 y 27). En este caso, nosotros pensamos que la ausencia de embriones explotados nuevamente puede ser consecuencia de fenómenos de redundancia funcional con otras MPKKs, si bien, también debe considerarse la posibilidad de que el fenotipo de semillas deformes sea el más penetrante para esta mutante.

Además de los fenotipos identificados en las mutantes *mpkk5* y *mpkk9*, otro de las mutantes en MPKKs que muestra un fenotipo relacionado con los procesos bajo estudio fue *mpkk4*, que aunque no tiene fenotipos de semilla, si desarrolla plántulas con raíz primaria más larga con respecto a plántulas tipo silvestre (Figura 19), similares a los mostrados por las plántulas de la mutante *mpk6* provenientes de semillas normales (Figura 12).

Una estrategia experimental para evitar el posible enmascaramiento de fenotipos por redundancia funcional, es la generación de dobles (y triples mutantes) para los

genes bajo estudio. Experimentos en este sentido están actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio y representan perspectivas de continuación de este trabajo. Finalmente, con respecto a los análisis de las mutantes en genes de MPKKs, es interesante resaltar que a la fecha no existe ningún reporte de algún fenotipo asociado a mutaciones en estos genes, así como que la interacción *in vivo* entre la proteína MPK6 y las proteínas MPKK4 y MPKK5 (también se ha demostrado la interacción entre MPK6 y las proteínas MPKK2 y MPKK6 [Andreasson y Ellis, 2010]), ya ha sido demostrada por ensayos de dos híbridos, lo que en cierta manera apoya nuestra propuesta de que MPKK4, MPKK5 y MPKK9, participen en una cascada de MAPKs implicada en los programas de desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis*, de la que *yoda* y *mpk6* son los componentes río arriba y río abajo, respectivamente (Figura 27).

#### **7.4. Las MPKKs MPKK5, MPKK9 y MPKK4 interactúan con MPK6 *in planta*.**

Con el fin de demostrar la interacción *in planta* entre MPK6 y su posible activador en los procesos de desarrollo bajo estudio, se realizaron ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia entre las MPKKs, con fenotipos similares a la mutante *mpk6*, y *yoda*. Estos experimentos demostraron que las proteínas MPKK4, MPKK5 Y MPKK9 ciertamente interactúan con la proteína MPK6 *in planta* (Figuras 25 y 26). Nuestros resultados por una parte corroboran las interacciones entre estas proteínas, previamente demostradas por ensayos de fosforilación *in vitro* (MPKK4, MPKK5 y MPKK9), con microarreglos de proteínas de alta densidad (Popescu *et al.*, 2008) e *in vivo* (MPKK4 y MPKK5), mediante ensayos de dos híbridos, en los que se utilizaron cada una de las 10 MPKKs de *Arabidopsis* como carnada, contra cada una de las 20 MPKs de *Arabidopsis* como presa (Andreasson y Ellis, 2010). Sin embargo, si bien nuestros resultados aportan la demostración de que las interacciones entre MPK6 y MPKK4, MPKK5 y MPKK9 pueden ocurrir *in planta*, al mismo tiempo ponen en controversia la confiabilidad de este tipo de ensayos de interacción para demostrar irrefutablemente que estas proteínas forman parte de una misma cascada de fosforilación. Al respecto,



conviene resaltar que dada la naturaleza de este tipo de enzimas, su interacción es predecible en ensayos dirigidos como los publicados a la fecha y el realizado durante este trabajo, por lo que de ninguna manera pueden considerarse concluyentes para establecer que dichas interacciones realmente ocurren en los procesos de desarrollo bajo estudio. De hecho, los resultados del ensayo de fosforilación en gel realizado en este trabajo (Figura 23), apoyan la idea de la problemática asociada a este tipo de experimentos de interacción/activación dirigida. De tal manera, como estrategia alternativa para demostrar que las interacciones predichas entre las MPKKs y MPK6 referidas, verdaderamente son consecuencia de su participación en la cascada de fosforilación propuesta en esta tesis, se propone la generación de plantas transgénicas, sencillas o dobles, que expresen genes reporteros cuya expresión esté dirigida por los promotores de los genes bajo estudio. Los análisis de los patrones de expresión en estas plantas reporteras, que actualmente están siendo desarrolladas en el laboratorio, indudablemente servirán para monitorear la expresión espacio-temporal simultánea requerida para demostrar que las enzimas bajo estudio conforman una cascada de MAP cinasas.

#### **7.5. MPKKK4 (*yoda*), MPKK4, MPKK5 y MPKK9 participan río arriba de MPK6 regulando el desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana*.**

Con base en los resultados de los estudios fenotípicos realizados en este trabajo, que establecen que las mutantes *yoda*, *mpkk4*, *mpkk5* y *mpkk9*, tienen fenotipos de semillas y/o de desarrollo del sistema radical similares a los de la mutante *mpk6*, en la Figura 27 se presenta la evolución de nuestro modelo de trabajo a lo largo del desarrollo de esta tesis, que culmina con la descripción del módulo de MAPKs operando en los procesos de desarrollo bajo estudio.

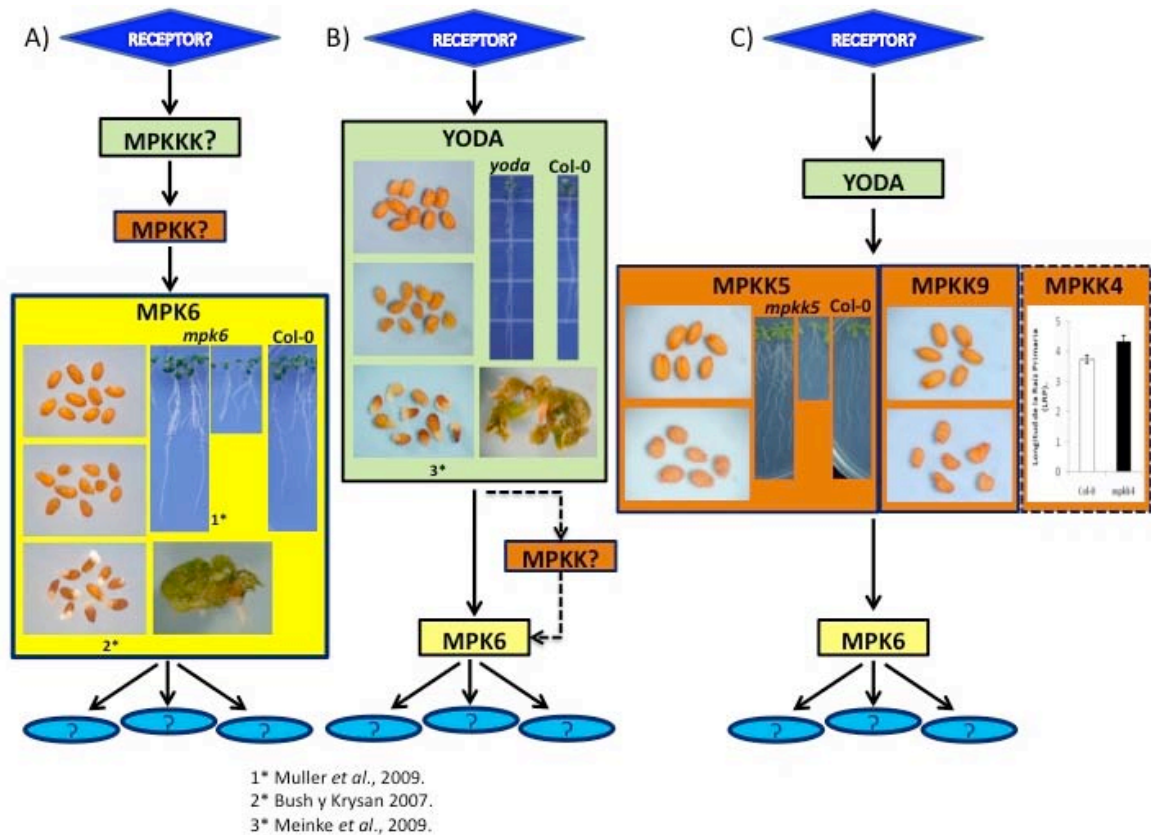
La identificación de los componentes activadores de esta cascada (receptores), así como de las moléculas efectoras (sustratos) activados por MPK6, para directa o indirectamente impactar los programas de desarrollo del embrión/semilla y del

sistema radical de *Arabidopsis thaliana*, mediante la caracterización fenotípica y molecular de candidatos identificados *in silico*, complementado con la generación y análisis de los patrones de expresión de las plantas transgénicas referidas, representan la continuación lógica de esta tesis y son objeto de interés de la investigación que actualmente estamos abordando en el laboratorio.

## 8. CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones del trabajo se describen a continuación:

1. Las mutantes *mpkkk1*, *ctr1*, *mpkk1*, (*mpk3* y *mpk4*), no presentan fenotipo de semilla ni de raíz.
2. Las mutantes *mpkkk4*, *mpkk5* y *mpkk9* tienen fenotipos de semilla similares a la mutante *mpk6*.
3. Las mutantes *mpkkk4*, *mpkk4* y *mpkk5* muestran fenotipos en el desarrollo de raíz similares a la mutante *mpk6*.
4. Dada la evidente redundancia de función de las MAPKs a todos los niveles, los ensayos de fosforilación *in vitro* resultan inadecuados para tratar de identificar posibles activadores directos de MPK6.
5. Mediante ensayos de BiFC en protoplastos de tabaco, se demostró que las MPKKs MPKK4, MPKK5 y MPKK9 interactúan con MPK6 *in planta*.
6. En base a los resultados de los análisis fenotípicos y de interacciones *in vivo* de proteínas realizados en el presente trabajo, proponemos un modelo preliminar de la cascada de MAPKs involucrada en el control de los programas de desarrollo del embrión y de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Figura 27).



**Figura 27.** Evolución del Modelo que describe los componentes de la cascada de MAP cinasas que participa en el desarrollo del embrión y del sistema radical de *Arabidopsis thaliana*. A) Caracterización detallada de fenotipos reportados de semilla/embrión (Bush y Krysan 2007) y del sistema radical (Müller *et al.*, 2009) de la mutante *mpk6*. Se propone que una cascada de MAP cinasas está involucrada en el control de estos procesos de desarrollo. B) Descripción detallada del fenotipo de “embrión externo” (Meinke *et al.*, 2009) reportado para la mutante *emb71/yoda*. En base a la similitud de fenotipos entre las mutantes *yoda* y *mpk6*, se propone que ambas forman parte de la misma cascada de fosforilación involucrada en los programas de desarrollo del embrión y del sistema radical de *A. thaliana*. C) Identificación de fenotipos de semilla y/o raíz en mutantes de cinasas de la familia MPKK. De 4 mutantes de esta familia analizados se encontró que la mutante *mpkk4* muestra un fenotipo de raíz primaria más larga que la de plántulas del tipo silvestre, la mutante *mpkk5* tiene fenotipos de semilla y raíz similares a la mutante *mpk6* y la mutante *mpkk9* presenta un fenotipo de semilla similar a la mutante *mpk6*. Derivadas de estas observaciones, complementadas con datos de interacción *in vitro* (MPKK9/MPKK5/MPKK4 & MPK6) [Popescu *et al.*, 2010; Andreason y Ellis 2010], *in vivo* (MPKK5/MPKK4 & MPK6) [Andreason y Ellis 2010] e *in planta* (MPKK9/MPKK5/MPKK4 & MPK6) entre algunas de estas proteínas, se propone que YODA-MPKK4/MPKK5/MPKK9-MPK6, constituyen una cascada de MAP cinasas que participa en los procesos de desarrollo del embrión y del sistema radical de *A. thaliana*.

La búsqueda de los componentes río arriba (receptores) y/o río abajo (sustratos), de la cascada de MAPKs descrita, representa una de las principales perspectivas de continuación de esta investigación.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosche M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjarvi J (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis* during ozone exposure. *Plant Journal* 40:512-522.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walker P (2008). Mechanisms of cell communication in “Molecular Biology of the Cell” 5th edition, San Francisco CA *Garland Science*.

Andreason E, Ellis B (2010). Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends in Plant Science* 15:2 106-113.

Baum SF and Rost TL (1996). Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*. 1. Root cap and protoderm. *Protoplasma*. 192:178-188.

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003). Local, efflux- dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602.

Benková E and Bielach A (2010). Lateral root organogenesis – From cell to organ. *Current Opinion in Plant Biology* 13:1-7.

Berger F, Hung CY, Dolan L, Schiefelbein J (1998b). Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.* 194:235-245.

Bibikova TN, Jacob T, Dashe I, Gilroy S (1998). Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125:2925-2934.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-274.

Bush SM, Krysan PJ (2007). Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anter, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* 58:2181-2191.

Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T (2009). Embryogenesis: Pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book* 7: 1-28.

Causier B, Davies B (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two hybrid system. *Plant Molecular Biology* 50:855-870.

Cho HT, Cosgrove DJ (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14:3237-3253.

De Smet I, Vassileva V, DE Rybel B, Levesque MP, Grunewald W, Van Damme D, Van Noorden G, Naudts M, Van Isterdael G, De Clercq R (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the Arabidopsis root. *Science* 322:594-597.

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

Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214:30-36.

Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *PNAS* 105:8790-8794.

Feilner T, Hultschig C, Lee Justin, Meyer S, Immink RGH, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D, Cahill DJ, Lehrach H, Kreutzberger J, Kersten B (2005). High Throughput Identification of Potential *Arabidopsis* Mitogen-activated Protein kinases substrates. *Molecular & Cellular Proteomics* 4:1558-1568.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT (2000). Penetrance and expressivity In “An Introduction to Genetic Analysis” 7th edition, New York, W. H. Freeman and Company.

Gronlund AL, Dickinson RJ, Kille P, Harwood JL, Herberts RJ, Francis D, Rogers HJ (2009). Plant WEE1 Kinase Interacts with a 14-3-3 Protein, GF14 but a Mutation of WEE1 at S485 Alters Their Spatial Interaction. *The open plant Science journal*. 3:40-48.

Grossniklaus U (2009). Paternal patterning cue. *Science* 323:1439-1440.

Hammond-Kosack KE, Jones JDG (2000). Responses to Plant Pathogens In “Biochemistry and Molecular Biology of Plants” 1<sup>st</sup> edition, Berkeley CA, American society of plant biologists.

Hasenstein KH and Evans ML (1988). The effect of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol*. 86: 890-894.

Hink MA, Bisseling T, Visser A (2002). Imaging protein-protein interactions in living cells. *Plant Molecular Biology* 50:871-883.

Hirt H (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS* 97:2405-2407.

Hofer RM (1991). Root hairs In "Plant Roots The Hidden Half", Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, eds., pp 129-148.

Hoekema A, Hirsch P, Hooykaas P, Schilperoort R (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303.

Hu CD, Grinberg AV, Kerppola TK (2005). Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Current protocols in cell biology* 21.3.1-21.3.21.

Ishikawa H, and Evans ML (1990). Stimulation of root growth by mechanical impedance is independent of the root cap (abstract No. N-14). *Am. SOC Gravi. S. Biol. Bull.* 4:105.

Jaillais Y and chory J (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature* 17:6 642.645.

Kerppola T (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society Reviews* 38, 2876-2886.

Klipp E, Liebermeister W (2006). Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC Neuroscience* 7:S10.



Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* 97:6.

Lampard GR, Lukowitz W, Ellis BE, Bergmann D (2009). Novel and expanded roles for MAPK signaling in Arabidopsis stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *The Plant Cell* 21:3506-3517.

Leammi UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:280–287.

Luis Cárdenas (2009). New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells. *Plant Signaling & Behavior* 4:1, 4-8.

Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004). A MAPKK kinase gene regulates extra embryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* 116, 109-119.

Malamy JE, Benfey PN (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* 124:33-44.

Mansfield SG and Briarty LG (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*: I. The developing embryo. *Can J Bot.* 69: 71461–476

Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nassaume L, Crespi MD, Maizel A (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22:1104-1117.

MAPK Group (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *TRENDS in plant science* 7:301-308.

Meyerowitz E (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Monograph Series 27.

Meinke D, Sweeney C, Muralla R (2009). Integrating the genetic and physical maps of *Arabidopsis thaliana*: identification of mapped alleles of cloned essential (*EMB*) genes. *PLoS ONE* 4:e7386.

Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452:55-68.

Muller J, Beck M, Mettbach U, Komis G, Hause G, Menzel D, Samaj J (2009). *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, end localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* 61:234-248.

Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15.

Nakagami H, Soukupová H, Schicora A, Zárský V, Hirt H (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281:50.

Okada K, and Shimura Y (1990). Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science*. 250:274–276.

Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* 22:6 1282-1288.

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* 14:7.

Rédei GP (1975). Arabidopsis as a genetic tool. *Annual Review of Genetics* 9:111-127.

Roux PP, and Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-Activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Micobiology and Molecular Biology Reviews* 68:320-344.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1987). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* second edition:7.3-7.8.

Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development*. 120:2475-2487.

Scheres B, and Benfey PN (1999). Asymmetric cell divisions in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 505–537.

Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su S-H, Jester PJ, Zhang S, Bent AF, Krysan PJ (2006). MEKK1 is required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology* 143:661-669.

Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A (2010). MAPK machinery in plants Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling & Behavior* 5:11, 1372-1380.

Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* 15:141-152.

Tomokazu K and Golberg RB (2009). The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science* 15:1.

Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM, Flores HE (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia* 341.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal* 33, 949-956.

Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckemann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Decking C, Harter K, Kudla G (2004). Visualization of protein interactions in living plant cell using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* 40, 428-438.

Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007). Stomatal Development and patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 19:63-73.

Wylmer CL, Bibikova TN, Gilroy S (1997). Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 12:427-439.

Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D (2008). Activation of MAP kinase kinase 9 induces ethylene, and camalexin biosynthesis, and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*.

Zhang S and Klessig D (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant cell* 9:809-824.

Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L XU S, Xue L, An L (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:274-283.

## 10. APÉNDICE I (Soluciones y reactivos).-

### **Azul de Coomassie:**

Metanol	40%
Ácido acético	7%
Azul brillante R-250	0.25%

En agua destilada.

### **Buffer CTAB 2X:**

Tris HCl pH 8.0	100 mM
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
CTAB (bromuro de cetil-metil-amonio)	2%

En agua destilada.

### **Buffer de corrida para geles de proteínas 10X (1 L):**

Tris HCl pH 8.8	30.2 g
Glicina	144 g
SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	10 g

En agua destilada

Se filtra a través de papel Whatmann.

### **Buffer de lavado para ensayos de fosforilación *in vitro*:**

Tris HCl pH 7.5	25 Mm
DTT (Ditiotreitol)	0.5 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Orto Vanadato de Sodio)	0.1 mM
NaF (Fluoruro de Sodio)	5 mM
BSA (Albumina Sérica Bovina)	0.5 mg/mL
Triton X-100	0.1%

En agua destilada.

**Buffer de reacción para ensayos de fosforilación *in vitro*:**

Tris HCl pH 7.5	25 mM
EGTA (Ácido Etilenglicoltetracético)	2 mM
MgCl <sub>2</sub> (Cloruro de Magnesio)	0.12 mM
DTT	1 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.1 mM
ATP (Trifosfato de Adenosina)	200 nM
$\gamma^{32-P}$ -ATP (ATP Radiactivo)	50 $\mu$ Ci

En agua destilada.

**Buffer de renaturalización de proteínas:**

Tris HCl pH 7.5	25 mM
DTT	1 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.1 mM
NaF	5 mM

En agua destilada.

**Buffer de transferencia:**

Tris HCl pH 8.8	6 g
Glicina	28.8 g
Metanol	400 mL
En agua destilada	cbp. 2 Lts

**Gel de poliacrilamida 10% (10 mL):**

Mezcla de acrilamida 30%	3.3 mL
Tris/glicina 1.5 M (pH 8.8)	1.3 mL
SDS 10%	0.05 mL
Persulfato de sodio 10%	0.05 mL
TEMED (Tetrametil Etil N-Diamina)	0.02 mL

En agua destilada.

**Gel concentrador para gel de poliacrilamida (2 mL):**

Mezcla de acrilamida 30%	0.33 mL
Tris/glicina 1 M (pH 6.8)	0.25 mL
SDS 10%	0.02 mL
Persulfato de sodio 10%	0.02 mL
TEMED	0.001 mL

En agua destilada.

**Medio de crecimiento MS 0.2X líquido (1L):**

Sales de MS (Murashige-Skoog)	0.9 g
Sacarosa	6 g

En agua destilada.

**Medio de crecimiento MS 0.2X sólido (1L):**

Sales de MS	0.9 g
Sacarosa	6 g
Fita gar	10 g

En agua destilada.

**Medio LB (Luria-Bertani) líquido (1 L):**

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g

En agua destilada.

**Medio LB sólido (1 L):**

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	15 g

En agua destilada.



**Mezcla de acrilamida 30%:**

Acrilamida	29.2%
N,N'-metilen-bis-acrilamida	0.8%

En agua destilada.

**Solución desinfectante:**

Hipoclorito de sodio	20%
Tween 20	1%

En agua destilada.

**Solución enzimática para extracción de protoplastos de *N. benthamiana*:**

Manitol	0.5 M
Celulasa ONOZUKA R-10	1%
Macerozima R-10 Yakult	0.05%

En agua destilada.

**Solución isotónica para extracción de protoplastos de *N. benthamiana*:**

Manitol	0.6 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de potasio Monobásico)	0.1 mM
KNO <sub>3</sub> (Nitrato de Potasio)	1 mM
MgSO <sub>4</sub> (Sulfato de Magnesio)	1 mM
CaCl <sub>2</sub> (Cloruro de Calcio)	10 mM
KI (Yoduro de Potasio)	1 μM
CuSO <sub>4</sub> (Sulfato de Cobre)	0.1 μM

En agua destilada.

**Ponceau's:**

Ponceau's	0.2%
Ácido acético	1%

En agua destilada.

**Buffer T<sub>10</sub> E<sub>1</sub> (TE):**

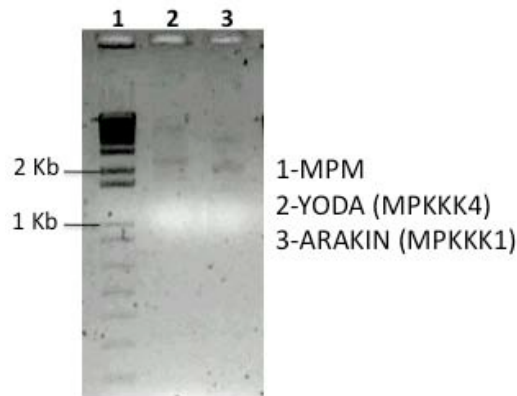
Tris HCl pH8 10mM

EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) 1 mM

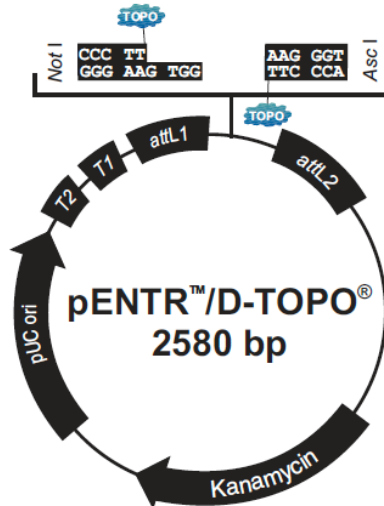
Ajustar a pH 8

En agua destilada.

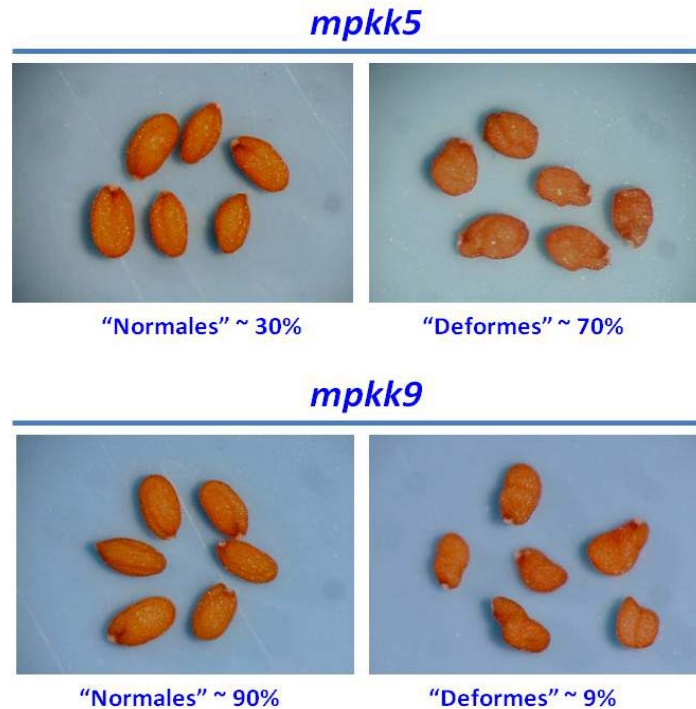
## 11. APÉNDICE II (Figuras suplementarias).



**Figura a1.** Amplificación de los genes *YODA* y *ARAKIN* por PCR para su subclonación en el vector destino pSPYNE. Se amplificaron los genes *YODA* y *ARAKIN* a partir de DNA de los plásmidos pENTR:*YODA* y pENTR:*ARAKIN*, con los oligonucleótidos M13 (5´ y 3´, Tabla 1) que incorporan los sitios de recombinación (*attL1* y *attL2*, Invitrogen life technologies) a los productos de PCR, para dirigir su subclonación en vectores destino del sistema gateway. En este caso se subclonarán en el vector pSPYNE para ensayos de tipo BiFC. 1=MPM (marcador de peso molecular) 1Kb plus DNA Ladder GIBCO life technologies. 2= Amplificación del gen *YODA*, clonado en el pENTR. 3= Amplificación del gen *ARAKIN* clonado en el pENTR.



**Figura a2.** Vector e entrada pENTR™/D-TOPO 2580 bp del sistema Gateway. El vector contiene los sitios de recombinación *attL1* y *attL2* para subclonación en vectores destino, dos secuencias para el termino de la transcripción del plásmido (T1 y T2), un origen de replicación pUC para mantener un alto número de copias en *E. coli* y un gen de resistencia a kanamicina para su selección en *E. coli* (Invitrogen pENTR™ directional TOPO User Manual).



**Figura a3.** Fenotipos de semillas de mutantes de la familia MPKK (*mpkk5* y *mpkk9*). La mutante *mpkk5* no produce embriones explotados, mientras que la proporción de semillas normales y deformes es cercana al 30% y 70% respectivamente. Por su parte, en la mutante *mpkk9* el porcentaje de embriones normales es alrededor del 90% y la proporción de semillas deformes es de alrededor del 9%.

## 12. APÉNDICE III (Secuencias de los genes utilizados).

tactttg= UTR (Región no traducida).

GCCTT= Exones.

Gtgagt= Intrones.

**ATG**= Inicio de la traducción.

### MPKKK4 YODA.

```

ttactttgtaatgttgaacaagagccttttaaagagtgatagtgtagtgagtgtagtgctcttggtttgtgggaagaagatcATGCCCTTGGG
AGTAAATCAAAAGATGAAAAAAGAAAAC TAATAAGGAGAGTATCATTGATGCGTTTAATCGGAAACTGGTT
CGCATCTGAGGATAGGTCTAGTGGAAGATCAAGAAAATCAAGACGACGACGTGATGAGATTGTGTCTGAA
AGAGGAGCTATATCTCGATTACCATCAAGATCTCCCTCTCCTTCTACTCGGGTTTCACGCTGTCAGAGTTT
TGCAGAAAGATCTCCTGTACCTCTTCCTCGTCCTATTGTCCGTCCTCATGTAACCACTGATTCAG
GAATGAATGGATCACAGAGACCAGGTTTAGATGCAAATTTGAAGCCGTCATGGTTGCCACTTCCAAAGCC
CCATGGTGCTACAAGCATACTGATAATACCGGTGCTGAGCCTGATTTTGCCACTGCTTCTGTGTCTAGTG
GAAGTTCTGTGGGTGACATTCCATCTGATTCTCTTCTCAGTCCATTGGCGTCTGATTGTGAAAATGGGAAC
CGAACACCAGTAAACATATCTTCGAGgtgagtttgaattgtgattgtactattgtgattgtgctctctctctattgctctctatttctaaacatggt
atatctactctttatgtatagGGATCAGTCAATGCATAGTAACAAAACTCAGCTGAGATGTTTAAGCCAGTCCCTAAT
AAAAATAGGATTCTGTCTGCATCTCCTAGGCGGAGACCTCTGGGAACCTCATGTGAAGAATCTACAAATCCC
CCAACGAGATTTAGTGCTATGCAGTGCTCCAGATAGTTTGTGTTGCTAGTCCCTCCAGGAGTCCAATGAGAT

```





gttcctttcagtgctctttcaatttcttcgacgaaactcatttctcaatttctttgattttgatcgcttcgaagaacgaatcaatttaagcctgccacaaacaacc  
ctagaatacgcacaacgcacgcagcgaagaagtcgaagaagactactataaacgcgaagatcattctcaatctcaatcgagctttaaattttca  
gatcgtagaagaaaatcgaactttgatccaaaagc**ATC**AGACCGATTCAATCGCTCCAGGAGTTTCCGTTCCGGTGAA  
AAGCCGTCCCGTCGCGTCCCTGATCTTACCTTACCGCTTCCCTCAACGCGATGTTTCTCTCGCTGTACCT  
CTTCTCTCCACCTACTTCCGGTGGTTCCGGTGGCTCTAGTGGATCTGCGCCGTCTTCTGGTGGTTCCGG  
CGTCTTCAACGAACACTAACAGCTCCATAGAAGCGAAGAATAATCCGATTTAGTGAGAGGTAACCGTATC  
GGAAGCGGAGCAGGTGGAACGGTATACAAAGTGATTCACCGTCCGAGTTCTCGTCTATATGCACCTAAGG  
TGATATACGGTAACCACGAGGAGACTGTGAGACGTCAGATCTGTAGAGAGATCGAGATTTTACGAGATGT  
GAATCATCCAAACGTTGTGAAATGTCACGAGATGTTTGATCAGAACGGTGAGATCCAGGTTTTGCTTGAGT  
TTATGGATAAAGTTACTTTAGAAGGTGCTCATGTGTGGAAAGAGCAACAATTAGTCTATCTCGTCAAG  
ATTCTTAGTGGTTAGCTTATCTCCATAGCCGTCATCGTATCAACCATCGAATCTTTTG  
ATAAACTCTGCTAAAAACGTTAAGATTGCTGATTTTGGAGTTAGTAGGATCTTGGCTCAGACTATGTTCC  
GTGTAATTCATCTGTTGGAACCATGCTTATATGAGTCTGAGAGGATTAACACTGATTTGAATCAGGGAA  
AGTATGATGGTTATGCTGGAGATATTTGGAGCTTAGGTGTTAGCATTTTGGAGTTTTACTTGGGGAGGTTT  
CCTTTCCCTGTGAGTAGACAAGGTGATTGGGCTAGTCTTATGTGTGCCATTTGTATGTCTCAGCCTCCAGA  
AGCTCCAGCGACTGCGTCGCCGGAGTTTCCGCATTTTATCTCGTGTGCTTGCAGAGAGAACCAGGGGAA  
AAGGAGGAGTGCTATGCAGCTATTGCAGCATCCTTTCATATTAAGAGCAAGTCCGAGCCAGAACAGGTCT  
CCTCAGAATCTACATCAACTTGCCTCCTCCTCGTCTCTGCTCTTCTTCTCCAACCATAGcgttt  
tctctctccctcatcaactcatatttttggactactgtcttgatgctgcaattttgctaactcatggaggctctgaatttacattttagggagtaa  
aaaactcgagagaggggttttgggattattgtttctagaaggtaaaagagaacaatgataatattctatgctatgatggtgatgtatcccaatgtagctttg  
tgaattttcataaaagttttgccttggttttctttgt

**MAPKK5 (sin intrones).**

gaagcttcattctctcttgattgatctctttgaaaaacgcgaatcaaaacaaacccctagagtcgaagtcgaatcatgatgataatacaaacctggaagataa  
agaatcaacctgtgaaaaaaacactttgatccctctctctctaaagcc**ATC**AAACCGATTCAATCTCCTTCTGGAGTAGC  
TTCACCTATGAAGAACCCTTACGCAAACGTCCTGACCTAAGCTTACCACTCCACACCCGACGTCGCT  
CTCGCCGTACCTCTCCCTCTCCACCTCCTTCTTCTCTTCCATCCGCTCCGGCGTCTTCTCCGCGATCTC  
AACCAACATCTCCGCCGCTAAAAGCTTATCCGAGCTAGAACGAGTGAACCGAATCGGAAGCGGAGCCGG  
AGGAACGGTTTACAAAGTAATCCACACTCCGACGTCACGTCCTTTCCGCTCTCAAAGTGATTTACGGAAACC  
ACGAAGATACCGTGAGACGTCAGATCTGTAGAGAGATCGAGATCTTAAGAAGTGTGATCATCCAAACGTT  
GTGAAATGTCACGATATGTTGATCATAACGGTGAGATCCAGGTTTTGCTTGAGTTTATGGATCAAGGATC  
CTTATGAAAGGAGCTCATATATGGCAAGAACGGAATTAGCTGATCTCTCTCGTCAGATTCTTAGTGGATTAG  
TGTGAAAATTGCTGATTTTTGGTGTGAGTAGGATCTTGGCACAAACAATGGATCCTTGTAAATTCATCTGTTG  
GTACTATTGCTTATATGAGTCTGAGAGGATTAATACTGATTTGAATCATGGTCGTTACGATGGTTATGCTG  
GAGATGTTTGGAGTTTGGTGTAGTATCTTGGAGTTTTACTTGGGGAGGTTTCTTTTGTGTGAGTAGA  
CAAGGTGATTGGGCTAGTCTTATGTGTGCTATTTGTATGTCTCAGCCACCTGAAGCTCCGGCTACGGCGT  
CTCAGGAGTTTCGTCACCTTTGTTTCTTGTGTTTACAGAGTGATCCTCCTAAGAGATGGTCAGCTCAACAG  
CTTTTGCAGCATCCTTTCATACTTAAAGCTACCGGTGGTCTAATCTCCGTCAAATGTTGCCGCCGCTCG  
TCTCTTCTTCTGCTCTTATGttttctaccattttgctttctgttttcaattttctgagttttctgacattttccataagttttgatacccccaagc  
aaagataatgagaagtagaagaacaatgtggtttgtaggtttgtagtgagtcgtaggaagaactcagtttggttagggtttaggtctttagctttagctatg  
ctgctaagcttgattgtcttagggtaagaatgtttgctagaaaatggaacaaaaaaatagacaagaagaattcttaggttaagagtgatttagctg  
gatttgcttatattgtttataaaggaagtaaatggaggatcttctaggataattctcattataaagcttctctttaaattctc

**MPKK9 (sin intrones).**

atlttaagataagaataaaactaataaaggaaaaagaaggataatgagtcattctcaccttccctgtctcctcacactgtaaagacttgaaactcatata  
aatctcaagctctctattctcttctcatcatcatcatcactctctctctctctctattcc**ATC**GCTTTAGTACGTGAACGTCGTCAG  
CTAAATCTCCGCTCTTCTCTTCTTCCCAATCTCCGACCCGCGCTTCTCCACCTCTTCTCCACCTCAGCCACCAC  
CACCACCTGCTGGCTGTAAACGGAATCTCCGCTTGTGATCTCGAGAAACTCAACGTTCTCGGATCGGGA  
AACGGCGGGATTGTTTACAAAGTCCGTCATAAAACCACATCGGAGATCTACGCTTTGAAAACAGTTAACGG  
CGACATGGATCCGATTTTACAAGACAGTTGATGCGAGAGATGGAGATTCTCCGCCGTACAGATTACCCG  
TACGTCGTTAAGTGTACGGAATCTTCGAGAAACCTGTCGTCGGTGAAGTATCGATTCTAATGGAGTATAT  
GGACGGCGGAACCCTAGAATCACTACGCGGGCGGTGAACGGAGCAAAAACCTCGCCGGATTCTGCTAAACA  
GATCTTAAAAGGATTAAGCTATTTACACGCTCTTAAAGATCGTTCATCGTATCAAAACCGGCAATCTTCT  
TCTCAATTCGAAAACGAAGTAAAAATCGCTGATTTCCGAGTTAGTAAGATCTTAGTCCGATCATTAGATTC  
GTGTAATTCGATGTTGGTACTTGTGCTTATATGAGTCCGGAGAGGTTTATTTCGGAATCTTCCGGTGGAA

GCTCTGATATCTACGCCGGAGATATCTGGAGTTTCGGATTGATGATGCTTGAGCTTCTCGTTGGTCATTTT  
CCTTTGCTTCCGCCGGGACAGAGACCTGATTGGGCGACGTTGATGTGCGCGGTGTGTTTTGGAGAACCG  
CCGCGAGCGCCGGAGGGATGTTCTGAAGAGTTTAGGAGCTTCGTTGAGTGTGTCTCCGTAAAGATTCTGA  
GTAAGCGATGGACGGCGCCGCAGCTTCTTGCTCATCCTTTTCTCCGGGAAGATCTTTAGttcgattcctttgtaaca  
gaatctggaatctaaaagtggaatattagattgaaattatttaatttttagagtttctggagatattatgatcgtgattttgtacataataataactccagaat  
gttaggggaaaatcgttcttgaagaacccttaattattaagatcatcaaatatgttcttttcaattcattcaatcaatcaatcggtacataagtttgggtaatcta  
tattaaatcaaaaagtaatagtcactcgtgacaagtgtagtagatatctatagtattattgtagaatgttgaatcataatcaa